

การวิจัยและพัฒนาการสกัดโปรตีนกาวไหม เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอาง เชิงพาณิชย์สำหรับวิสาหกิจชุมชน

ศิวากร รัตนภากร^{1*}, จริญญา อาริมิตร², พิมลรัตน์ เมธินธรรังสรรค์³, ณัฐวดี กันพิพิธ⁴, สุธาสนิ ทัพพสารพงค์⁵

¹ ภม., กลุ่มงานคุ้มครองผู้บริโภคและเภสัชสาธารณสุข สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดขอนแก่น

² ผศ.ดร., สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ขอนแก่น

⁴ ดร., สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵ รศ.ดร., สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ติดต่อผู้พิมพ์: ศิวากร รัตนภากร กลุ่มงานคุ้มครองผู้บริโภคและเภสัชสาธารณสุข สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดขอนแก่น

108 หมู่ 4 ถ.ศรีจันทร์ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000 email: siwakornps@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยและพัฒนาการสกัดโปรตีนกาวไหม เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอางเชิงพาณิชย์สำหรับวิสาหกิจชุมชน

ศิวากร รัตนภากร^{1*}, จริญญา อาริมิตร², พิมลรัตน์ เมธินธรรังสรรค์³, ณัฐวดี กันพิพิธ⁴, สุธาสนิ ทัพพสารพงค์⁵

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2568; 21(1) : 78-92

รับบทความ: 14 พฤศจิกายน 2567

แก้ไขบทความ: 19 ธันวาคม 2567

ตอบรับ: 24 กุมภาพันธ์ 2568

วิสาหกิจชุมชนปลูกหม่อนเลี้ยงไหมนำน้ำเหลือทิ้งที่ได้จากกระบวนการฟอกกาวเส้นไหมที่ตกกรรมด้วยความร้อนและความดันสูงโดยใช้หม้ออัดแรงดันมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอางเพื่อเพิ่มมูลค่า กรรมวิธีดังกล่าวยังไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดถึงคุณภาพมาตรฐานของกระบวนการผลิต รวมถึงปริมาณและคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหม นอกจากนี้หลักเกณฑ์การจดแจ้งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางไม่อนุญาตให้กล่าวอ้างว่าสารสกัดดังกล่าวมีโปรตีนกาวไหม ทำให้เสียโอกาสในการแข่งขันทางเศรษฐกิจ ดังนั้นการหาสภาวะการสกัดด้วยหม้ออัดแรงดันที่เหมาะสมเพื่อให้ได้โปรตีนกาวไหมที่มีปริมาณและคุณภาพที่คงที่ในทุกๆ ครั้งที่ทำการผลิต รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนกาวไหมที่ได้ จะเป็นการเพิ่มคุณค่าให้วัสดุชีวภาพที่เหลือทิ้งให้มีคุณค่าในเชิงพาณิชย์และมูลค่าทางเศรษฐกิจของวัตถุดิบในท้องถิ่น และยกระดับหน่วยเศรษฐกิจฐานรากของประเทศไทยให้มีศักยภาพ มีความสามารถในการแข่งขันในระดับที่สูงขึ้น **วัตถุประสงค์:** เพื่อหาสภาวะการสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยหม้ออัดแรงดันที่เหมาะสมสำหรับวิสาหกิจชุมชน เพื่อให้ได้โปรตีนกาวไหมที่มีปริมาณและคุณภาพที่คงที่ในทุกๆ ครั้งที่ทำการผลิต รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ปริมาณโปรตีน มวลโมเลกุล และฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโปรตีนกาวไหมที่สกัดได้จากวิธีการสกัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับสภาวะดั้งเดิม **วิธีการ:** สกัดโปรตีนกาวไหมด้วยหม้ออัดแรงดันด้วยกรรมวิธีที่วิสาหกิจชุมชนทำอยู่ คือ ต้มเส้นไหมดิบ ไหมน้อย ไหมแดง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) ในน้ำสะอาด ด้วยหม้ออัดแรงดันขนาด 5 ลิตร ในอัตราส่วนเส้นไหมต่อน้ำสะอาด 1 ต่อ 2 ให้ความร้อนด้วยเตาแม่เหล็กไฟฟ้า กำลังไฟ 1,800-2,000 วัตต์ นาน 30 นาที แล้วนำมาทำเป็นผงแห้งด้วยวิธีพ่นฝอยและแช่เยือกแข็ง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน มวลโมเลกุล ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากนั้นเลือกเส้นไหมที่ให้ผลการทดสอบดีที่สุด มาต้มสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยหม้ออัดแรงดันขนาด 7 ลิตร ที่ควบคุมกำลังไฟคงที่ 1,600 วัตต์ นาน 30 นาที แล้วนำไปทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย แล้วทำการวิเคราะห์คุณสมบัติข้างต้น เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำต้มและผงแห้งเส้นไหมจากการต้มสกัดทั้งสองวิธี **สรุปผลการศึกษา:** สารสกัดโปรตีนกาวไหมในรูปแบบน้ำต้มและผงแห้งจากเส้นไหมดิบ ไหมน้อยและไหมแดง ที่ได้จากการต้มในหม้ออัดแรงดันด้วยกรรมวิธีที่วิสาหกิจชุมชนทำอยู่ พบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำต้มและผงแห้งเส้นไหมดิบมากที่สุด ($7,187.78 \pm 83.89 \mu\text{g/ml}$ และ $276.00 \pm 23.64 \text{ mg/g}$ ตามลำดับ) ร้อยละของผงแห้งที่ได้จากน้ำต้มเส้นไหมดิบมี

ค่ามากที่สุดทั้งจากวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็ง (%yield) (ร้อยละ 1.76 และ 2.21 ตามลำดับ)ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำต้มและผงแห้งเส้นไหมดิบดีที่สุด ค่า IC50 ของการต้านออกซิเดชัน (พ่นฝอย 8.79 ± 0.33 mg/g และแช่เยือกแข็ง 8.75 ± 0.13 mg/g) และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (พ่นฝอย 7.23 ± 0.04 mg/g และแช่เยือกแข็ง 7.46 ± 0.42 mg/g) ของผงแห้งเส้นไหมดิบจากการทำแห้งทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีน อยู่ในช่วง 25 – 250 KDa แต่การต้มสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยวิธีสาคูชุมชนทำอยู่ทำให้เกิดการเดือดล้นของของเหลวออกจากหม้อต้ม ทำให้ปริมาณสารสกัดที่ได้ในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีใหม่ที่มีการควบคุมสภาวะการสกัดที่เหมาะสม พบว่า ปริมาณสารสกัดและปริมาณโปรตีนของกรรมวิธีใหม่ที่ได้ในแต่ละครั้งใกล้เคียงกัน และปริมาณโปรตีนของน้ำต้มไหมดิบทั้งสี่ตัวอย่างของกรรมวิธีใหม่เพิ่มขึ้นจากกรรมวิธีเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณโปรตีนของผงแห้งไหมดิบทั้งสี่ตัวอย่างของกรรมวิธีใหม่ไม่แตกต่างจากวิธีเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผงแห้งไหมดิบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนของกรรมวิธีใหม่อยู่ในช่วงเดียวกันกับกรรมวิธีเดิม จากข้อมูลข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า การสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยหม้ออัดแรงดัน ภายใต้สภาวะการสกัดที่เหมาะสม ทำให้ได้ปริมาณและคุณภาพ รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนกาวไหมที่ใกล้เคียงกัน และเป็นกรรมวิธีการสกัดโปรตีนกาวไหมที่ง่าย ไม่ซับซ้อน มีต้นทุนต่ำเหมาะสมสำหรับวิสาหกิจชุมชน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการต่อยอดการสร้างรายได้ให้กับกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกหม่อนเลี้ยงไหมต่อไป

คำสำคัญ: การสกัด, โปรตีนกาวไหม, ต้านออกซิเดชัน, ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, เครื่องสำอาง

Research and development of silk glue protein extraction for use as raw materials in commercial cosmetic production for community enterprises

Siwakorn Ratanapakorn^{1*}, Jringjai Areemit², Pimonrat Methintharangsun³, Nattawadee Kanpivit⁴,
Suthasinee Thapphasaraphong⁵

¹ Consumer Protection and Public Health Pharmacy Group, Khon Kaen Provincial Health Office

² Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

³ Queen Sirikit Sericulture Center, Khon Kaen

⁴ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

⁵ Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

***Corresponding author:** Siwakorn Ratanapakorn, Consumer Protection and Public Health Pharmacy Group, Khon Kaen Provincial Health Office

108 M.4 Sri chan Road, 108 Nai Muang Sub district, Muang District, Khon Kaen province 40000 email: siwakornps@gmail.com

Abstract

Research and development of silk glue protein extraction for use as raw materials in commercial cosmetic production for community enterprises

Siwakorn Ratanapakorn^{1*}, Jringjai Areemit², Pimonrat Methintharangsun³, Nattawadee Kanpivit⁴, Suthasinee Thapphasaraphong⁵

IUPS, 2025; 21(1) : 78-92

Received: 14 November 2024

Revised: 19 December 2024

Accepted: 24 February 2025

The community enterprise engaged in mulberry cultivation and silkworm farming repurposes wastewater from the degumming process of handcrafted silk, using high heat and pressure from a pressure cooker, as a raw material for cosmetic production to enhance its value. This method has no clear evidence regarding the quality and standards of the production process, as well as the quantity and properties of silk glue protein. Additionally, cosmetic product registration regulations do

not allow claims that the extract contains silk glue protein, leading to a loss of economic competitiveness. Therefore, determining the optimal extraction conditions using a pressure cooker to obtain silk glue protein with consistent quantity and quality in every production cycle, as well as studying its physicochemical properties and biological activities, will add value to this biowaste material. This, in turn, can enhance its commercial potential, increase the economic value of local raw materials, and strengthen Thailand's local economy by improving its competitiveness. **Objectives:** To determine the optimal conditions for extracting silk glue protein using a pressure cooker for the community enterprise to achieve consistent quantity and quality in each production cycle, including investigate the physicochemical properties, including protein content and molecular weight, as well as the biological activities, such as antioxidant and antityrosinase activity, of the extracted silk glue protein under optimized conditions compared to conventional extraction methods. **Methods:** Silk glue protein was extracted using a pressure cooker following the community enterprise's method. Thai hybrid silks, including Luep, Noi, and Laeng varieties of Saraburi Yellow (J108 × Nang Lai), were boiled in clean water using a 5-liter pressure cooker at a silk-to-water ratio of 1:2. The heating was performed using an induction cooker with a power range of 1,800–2,000 W for 30 minutes. The silk extract was then dried using both spray drying and freeze-drying methods. Protein content, molecular weight, antioxidant activity, and antityrosinase activity were analyzed. The silk variety that exhibited the best results was then used for silk extraction with a 7-liter pressure cooker under controlled conditions with a constant power of 1,600 W for 30 minutes. The extract was then spray-dried and analyzed for the same properties to compare the characteristics of the silk extracts obtained from both methods in liquid and dried forms. Based on the above information, it can be concluded that extracting silk glue protein using a pressure cooker under optimal extraction conditions results in a comparable quantity, quality, and biological activity of the silk glue protein. This extraction method is simple, non-complex, and low-cost, making it suitable for community enterprises. It can serve as a guideline for further developing income-generating opportunities for mulberry farmers and silk producers. **Results:** The silk extracts in both liquid and dried forms from Luep, Noi, and Laeng silk varieties, obtained through the community enterprise's pressure cooking method, revealed that Luep silk had the highest protein content in both liquid and dried forms ($7,187.78 \pm 83.89 \mu\text{g/ml}$ and $276.00 \pm 23.64 \text{ mg/g}$, respectively). The percentage yield of dried extract obtained from Luep silk liquid was the highest for both spray-drying and freeze-drying methods (1.76% and 2.21%, respectively). The antioxidant and antityrosinase activities of both liquid and dried Luep silk extracts were the highest. The IC₅₀ values for antioxidant activity (spray-dried: $8.79 \pm 0.33 \text{ mg/g}$; freeze-dried: $8.75 \pm 0.13 \text{ mg/g}$) and antityrosinase activity (spray-dried: $7.23 \pm 0.04 \text{ mg/g}$; freeze-dried: $7.46 \pm 0.42 \text{ mg/g}$) of dried Luep silk extracts obtained from both drying methods showed no statistically significant difference ($P > 0.05$). The molecular weight of the extracted proteins ranged from 25 to 250 kDa. However, the conventional pressure cooking method used by the community enterprise resulted in liquid overflow from the pressure cooker, leading to inconsistent extract yields in each batch. When compared to the newly optimized extraction method, the extract yield and protein content from the new method were more consistent across batches. Additionally, the protein content in the liquid extract of all four Luep silk samples obtained using the new method was significantly higher than that of the conventional method. However, the protein content in the dried extracts of the four Luep silk samples did not differ significantly between the two methods. The antioxidant and antityrosinase activities of the dried Luep silk extract were significantly enhanced in the new method, while the protein molecular weight range remained similar to that of the conventional method.

Keywords: Extraction, Sericin Protein, Antioxidant, Antityrosinase, Cosmetic

บทนำ

โปรตีนกาวไหมหรือเซรีซิน เป็นโปรตีนที่ได้จากกระบวนการสกัดโปรตีนกาวไหมออกจากรังไหมหรือเส้นไหม เส้นไหมจัดอยู่ในกลุ่มของพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีลำดับเบสที่ซ้ำกันทั้งชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ เส้นไหมแต่ละชนิดมีองค์ประกอบ โครงสร้าง และคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา โครงสร้างของเส้นไหมที่ได้จากหนอนไหม *Bombyx mori* ประกอบด้วยชั้นของเส้นใยไฟโบรอินสองเส้นที่ถูกห่อหุ้มด้วยเซรีซินซึ่งทำหน้าที่เป็นกาวยึดเส้นใยไฟโบรอินเข้าด้วยกัน องค์ประกอบทางเคมีทั่วไปของเส้นไหม ประกอบด้วยไฟโบรอิน ร้อยละ 72-81 เซรีซินร้อยละ 19-28 ไหมนและซีผึ้งร้อยละ 0.8-1.0 สารสีและเถ้าร้อยละ 1.0-1.4 ของน้ำหนักทั้งหมด โครงสร้างมีการเรียงตัวกันเป็นระเบียบ มีความเป็นผลึกสูง ทำให้เส้นไหมมีความแข็งแรง ยืดหยุ่น ทนทาน และคงตัวได้ถึงอุณหภูมิ 140°C สลายตัวเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 1500°C (Babu, 2020) ไฟโบรอินเป็นโปรตีนเส้นใยที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากต่อมที่ริมฝีปากส่วนหลังของหนอนไหม (posterior labial gland) เซรีซินเป็นโปรตีนก่อนกลมที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากต่อมที่ริมฝีปากส่วนกลางของหนอนไหม (middle labial gland) มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20-400 KDa โครงสร้างเป็นแบบคอยล์สุ่ม (random coil) และแผ่นเบต้า (β -sheets) โปรตีนเซรีซินที่ห่อหุ้มเส้นใยไฟโบรอินมีโครงสร้าง 3 ชั้น โครงสร้างโมเลกุลที่ชอบน้ำจะลดลงทีละน้อยจากชั้นนอก ชั้นกลาง ชั้นใน ทำให้ความสามารถในการละลายลดลงจากชั้นนอกไปชั้นในสุดที่ติดกับไฟโบรอิน โครงสร้างแบบคอยล์สุ่มจะเปลี่ยนเป็นแผ่นเบต้าเมื่อมีการยืดตัว การดูดซับความชื้น และมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โปรตีนจะเปลี่ยนเป็นรูปแบบที่ละลายได้ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50–60°C หรือสูงกว่า แต่เมื่ออุณหภูมิลดลง ความสามารถในการละลายจะลดลง และโครงสร้างแบบคอยล์สุ่มจะเปลี่ยนเป็นแผ่นเบต้า ส่งผลให้เกิดการก่อตัวของเจล ด้วยคุณสมบัติของโครงสร้างโมเลกุลที่ชอบน้ำ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด ที่มีหมู่ที่มีขั้ว เช่น คาร์บอกซิล, ไฮดรอกซิล, และหมู่อะมิโน ร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีประกอบด้วย คาร์บอน 46.5% ออกซิเจน 31% ไนโตรเจน 16.5% และไฮโดรเจน 6% ทำให้เซรีซินมีความเข้ากันได้กับพอลิเมอร์อื่น ๆ ไม่ทำปฏิกิริยาต่อระบบภูมิคุ้มกันจึงก่อให้เกิดอาการระคายเคืองและการแพ้ต่ำ มีคุณสมบัติให้ความชุ่มชื้น กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ต้านแบคทีเรีย เป็นต้น ดังนั้นเซรีซินจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหาร ยา เครื่องสำอาง วัสดุชีวภาพหรือวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์

การสกัดโปรตีนกาวไหมในปัจจุบันทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สบูหรือสารซักฟอก การใช้ความร้อนและความดันสูง การใช้ความร้อนร่วมกับสารเคมี การใช้สารเคมีที่เป็นกรดหรือด่าง การใช้ยูเรีย การใช้เอนไซม์ เป็นต้น กระบวนการฟอกกาวแต่ละวิธีมีผลต่อโครงสร้าง กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล คุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของเซรีซิน ทั้งนี้ ขึ้นกับสภาวะอุณหภูมิ ความดัน ระยะเวลา การให้ความร้อน อัตราส่วนของรังไหมต่อปริมาณน้ำ และชนิดของสารเคมีที่ใช้ ในอุตสาหกรรมการผลิตเส้นไหมดั้งเดิมใช้สบูและสารซักฟอกในการกำจัดกาว วิธีนี้ทำให้เซรีซินเปลี่ยนสภาพและเกิดการไฮโดรไลซิสบางส่วน น้ำหนักโมเลกุลลดลงและสูญเสียคุณสมบัติบางประการไป ส่วนการใช้ความร้อนร่วมกับการใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรดต่าง หรือยูเรีย ให้ผลผลิตโปรตีนกาวไหมสูงและมีการเสื่อมสภาพน้อยกว่าแต่มีสารเคมีตกค้างซึ่งการแยกสารเคมีเหล่านี้อมีความยุ่งยากซับซ้อนและมีต้นทุนสูง ส่วนการใช้เอนไซม์ให้ผลผลิตสูงไม่มีสารเคมีปนเปื้อน ใช้พลังงานน้อย ไม่ทำลายเส้นใย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่มีต้นทุนสูง ส่วนการใช้ความร้อนสูงร่วมกับความดันสูง มีข้อดีคือ ปราศจากการใช้สารเคมี ต้นทุนการผลิตต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สารสกัดที่ได้ไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ให้คอลลาเจนสูง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง แต่มีข้อเสียคือ ให้ผลผลิตน้อยและอาจทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซรีซินได้ เนื่องจากเซรีซินชั้นนอกเป็นกลุ่มที่ละลายออกมาได้มากที่สุด ขณะที่ชั้นในสุดที่ติดกับไฟโบรอิน ไม่ละลายในน้ำร้อน (Kunz et al., 2016; Liu et al., 2022; Miguel and Alvarez-Lopez, 2020; Vaishnav and Singh, 2023)

กลุ่มวิสาหกิจชุมชนปลูกหม่อนเลี้ยงไหมเวียงแก้ว ตำบลหนองกุ้งใหญ่ อำเภอกะนวน จังหวัดขอนแก่น เป็นเกษตรกรผู้ปลูกหม่อนเลี้ยงไหมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เลี้ยงไหมแบบหัตถกรรมเป็นอาชีพเสริมรายได้แบบพื้นบ้าน พันธุ์ไหมที่ใช้เป็นไหมที่กินใบหม่อนเป็นอาหาร (*Bombyx mori*) ตามแต่ฤดูกาล ได้แก่ สายพันธุ์ไทยพื้นบ้าน เช่น ทับทิมสยาม นางน้อย นางลาย นางหัน นางตุ้ย และสายพันธุ์ไทยลูกผสม เช่น เหลืองสระบุรี เหลืองไพโรจน์ เป็นต้น ผลผลิตที่ได้เป็นรังไหมสีเหลือง เมื่อได้ผลผลิตรังไหมเกษตรกรจะแยกรังไหมดีออกจากรังไหมเสีย เพื่อให้ได้เส้นไหมที่มีคุณภาพ แล้วจึงนำรังไหม 80-100 รัง ไปต้มในน้ำสะอาด แล้วทำการสาวไหม โดยดึงเส้นไหมออกจากรังไหม จะได้เส้นไหมดิบ 3 ประเภท แตกต่างกันตามชั้นของรังไหมที่สาว ได้แก่ 1) เส้นไหมสืบหรือเส้นไหมชั้นเปลือกนอก 2) เส้นไหมน้อย คือ เส้นไหมจากเปลือกชั้นใน และ 3) เส้นไหมแดง คือไหมจากเปลือกชั้นในสุดที่เหลือ

จากการสาวไหมแล้วและนำมาสาวซ้ำอีกครั้ง (Sericulture Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2017) จากนั้นนำเส้นไหมที่ได้ไปผ่านกระบวนการฟอกขาวโดยแช่ในน้ำด่างซีเถ้าธรรมชาติจากผักโขมหนามหรือเหง้ากล้วยที่ผ่านการกรองเอาแต่ส่วนใสซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 12-12.5 แล้วนำไปต้มให้เดือดประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเส้นไหมไปล้างในน้ำสะอาด แล้วนำไปเรียงเป็นเส้น ตากให้แห้งสนิทเก็บไว้ย้อมสีทอผ้าต่อไป น้ำที่ได้จากกระบวนการฟอกขาวดังกล่าว มีความเป็นด่างค่อนข้างสูง หากต้องการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอาง จะต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีต้นทุนสูง ดังนั้นศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ ขอนแก่น จึงแนะนำให้ใช้เส้นไหมที่ได้ไปต้มด้วยน้ำสะอาดในหม้ออัดแรงดัน ซึ่งมีข้อดีตามที่กล่าวข้างต้น แต่ไม่ได้กำหนดค่ากำลังไฟที่เหมาะสม ทำให้เกิดการเดือดล้นและรั่วซึมของของเหลวออกจากหม้อต้ม ทำให้ได้ปริมาณสารสกัดในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน ทำให้ไม่สามารถควบคุมกระบวนการผลิตและคุณภาพของโปรตีนกาวไหมให้เหมือนกันทุกๆ ครั้งได้ นอกจากนี้หลักเกณฑ์การจดแจ้งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางไม่อนุญาตให้กล่าวอ้างว่าสารสกัดดังกล่าวมีโปรตีนกาวไหม ทำให้เสียโอกาสในการแข่งขันทางเศรษฐกิจ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะการสกัดด้วยหม้ออัดแรงดันที่เหมาะสม สำหรับการใช้งานจริงในวิสาหกิจชุมชน เพื่อให้ได้มาซึ่งโปรตีนกาวไหมที่มีปริมาณและคุณภาพที่คงที่ในทุกๆ ครั้งที่ทำการผลิต รวมทั้งเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนกาวไหมที่สกัดได้จากวิธีการสกัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับสภาวะดั้งเดิม เพื่อใช้ในการต่อยอดแนวทางให้กับกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกหม่อนเลี้ยงไหมต่อไป นอกจากนี้การนำโปรตีนกาวไหมกลับมาใช้ใหม่ยังเป็นการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมจากปัญหาขยะอินทรีย์ในแหล่งน้ำซึ่งทำให้เกิดความต้องการออกซิเจนสูง เกิดการปนเปื้อนในน้ำ และยังช่วยเพิ่มคุณค่าให้วัสดุชีวภาพที่เหลือทิ้งให้มีคุณค่าในเชิงพาณิชย์ เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของวัตถุดิบในท้องถิ่น และยกระดับหน่วยเศรษฐกิจฐานรากของประเทศไทยให้มีความศักยภาพ มีความสามารถในการแข่งขันในระดับที่สูงขึ้น

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยและพัฒนา (Research and Development)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบ

1) เส้นไหมดิบ สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย)

2) เส้นไหมแลง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย)

3) เส้นไหมน้อย สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย)

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1) หม้ออัดแรงดัน ขนาด 5 ลิตร และ 7 ลิตร

2) เต้าแม่เหล็กไฟฟ้า

3) เครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic bath, D-series, GT-Sonic, China)

4) เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (PX224, Pioneer, OHAUS, USA)

5) เครื่องอ่านปฏิกิริยาในไมโครเพลต (Microplate Reader, Perkin)

6) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert GmbH, Germany)

7) SDS-PAGE electrophoresis (Biorad, USA)

8) เครื่องให้ความร้อน (Hot – plate stirrer, Germany)

3. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1) Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Waltham, MA, USA).

2) Ethanol, Methanol (RCI Labscan, Thailand)

3) 96-well plates (SLP Life Science, Korea)

4) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cat.Number 10049-21-5, ProLABO)

5) Na_2HPO_4 (Cat. Number 10245 SS, VWR international Ltd, England)

6) NaCl (Cat.number S3014-1KG, Sigma, USA)

7) 30% Acrylamide/Bis solution (Cat.number. 161-0158, Bio-Rad laboratory, china)

8) Tris.base

9) Glycine (Cat.number. 5037G, USP grade research organic InC, USA.)

10) Trizma base

11) HCl

12) sodium dodecyl sulfate (SDS, Cat.number. 161-0302, Biorad Laboratory)

13) Ammonium persulfate (APS)

14) TEMED expiry (Cat.number. 1L009216, GE, Healthcare Bio-science, AB)

15) Laemmli sample buffer

16) Mercapto EtOH

17) Coomassie blue R-250

4. การเตรียมสารสกัดโปรตีนกาวไหม

ระยะที่ 1 ผู้วิจัยและคณะ ลงพื้นที่กลุ่มวิสาหกิจชุมชนปลูกหม่อนเลี้ยงไหมเวียงแก้ว หมู่บ้านเวียงแก้ว หมู่ 2 ตำบลหนองกุ้งใหญ่ อำเภอกะนวน จังหวัดขอนแก่น ระหว่างเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนธันวาคม 2566 เพื่อศึกษาสถานการณ์ ปัญหาในกระบวนการสกัดโปรตีนกาวไหมของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนฯ แล้วเก็บตัวอย่างน้ำต้มเส้นไหมดิบ ไหมน้อย ไหมแดง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) อย่างละ 1 ตัวอย่าง อัตราส่วนเส้นไหมต่อน้ำสะอาด เท่ากับ 1 ต่อ 2 ต้มด้วยหม้ออัดแรงดันไฟฟ้า ขนาด 5 ลิตร ให้ความร้อนด้วยเตาแม่เหล็กไฟฟ้า กำลังไฟเริ่มต้น 2,000 วัตต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างใส่ภาชนะบรรจุกลับห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษ Whatman NO.1 g นำส่วนใสที่กรองได้ ไปเตรียมเป็นผงแห้งต่อไป

ระยะที่ 2 จากผลในระยะที่ 1 ผู้วิจัยและคณะ คัดเลือกชนิดของเส้นไหมที่ให้ปริมาณโปรตีนกาวไหมมากที่สุด และมีคุณสมบัติด้านออกซิเดชันและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในห้องปฏิบัติการดีที่สุด มา 1 ชนิด มาทำการทดลองต้มด้วยหม้ออัดแรงดันไฟฟ้าซ้ำ จำนวน 4 ตัวอย่าง อัตราส่วนเส้นไหมต่อน้ำสะอาด เท่ากับ 1 ต่อ 2 ต้มด้วย หม้ออัดแรงดันไฟฟ้า ขนาด 7 ลิตร ให้ความร้อนด้วยเตาแม่เหล็กไฟฟ้า ทดลองให้กำลังไฟคงที่ 1,600-1,800 วัตต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างน้ำต้มเส้นไหมแต่ละตัวอย่างมากรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษ Whatman NO.1 g เพื่อเอาแต่ส่วนใส ไปเตรียมเป็นผงแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมผงแห้งจากน้ำต้มเส้นไหมหัตถกรรม

1.1 การทำแห้งของน้ำต้มเส้นไหมด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry)

นำน้ำต้มเส้นไหมที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษ Whatman NO.1 g แล้วนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (Minispray dryer B-290, Buchi, USA) โดยกำหนดอุณหภูมิอากาศร้อนขาเข้า (Inlet temperature) ที่ 150 °C อุณหภูมิอากาศร้อนขาออก (Outlet temperature) ที่ 80 °C อัตราการไหลเชิงปริมาตรของอากาศร้อน 35 ลูกบาศก์เมตรต่อ

ชั่วโมง และอัตราการป้อนสารที่ 6 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นนำผงแห้งที่ได้มาคำนวณหาค่า % Yield โดยเทียบกับน้ำหนักของสารทั้งหมดที่ทำการพ่นฝอย โดยคำนวณจาก น้ำหนักผงแห้งที่ได้ x 100 / น้ำหนักสารทั้งหมดที่ทำการพ่นฝอย นำผงแห้งที่ได้เก็บในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสงและความชื้น ที่อุณหภูมิ 22 ± 2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 55 ± 5% นำผงแห้งที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและคุณสมบัติด้านออกซิเดชันและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในห้องปฏิบัติการ ก่อนนำไปใช้

1.2. การทำแห้งของน้ำต้มเส้นไหมด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)

นำน้ำต้มเส้นไหมที่ได้ ในปริมาณที่กำหนด (V0) ใส่ลงใน Round bottom flask แล้วนำไปกลิ้งใน Chiller อุณหภูมิ -40 °C เพื่อทำให้แข็งตัว จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer (Gamma 2-16 LSCplus; Christ, Germany) ที่อุณหภูมิ -80 °C ภายใต้ระบบสุญญากาศที่ 0.100 mbar นำน้ำหนักของแข็งที่ได้ (W) ไปทำการคำนวณ % Solid content ด้วยสมการ (1) Solid content (%w/v) = W * 100 / V0 (1)

2. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay (Microplate reader) (Bradford, 1976)

เตรียมสารมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 1-1000 µg/mL ในน้ำกลั่น นำทุกตัวอย่างที่ได้มาเจือจางกับน้ำกลั่น 1:20 ปิเปตสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ปริมาตร 10 µL (ชนิดละ 3 ซ้ำ) ทำปฏิกิริยากับน้ำยา Bradford ปริมาตร 100 µL บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 nm วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาพล็อตกราฟมาตรฐานของ BSA และคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง µg/mL ของไหมแต่ละชนิด แล้วแปลงหน่วยเป็น mg/mL

3. การตรวจสอบมวลโมเลกุลของเซรีซินด้วยวิธี SDS-PAGE electrophoresis (Kanpivit et al., 2022)

1) นำน้ำต้มเส้นไหมที่มีโปรตีนเซรีซิน โดยชั่งน้ำหนัก 1 mg/mL มาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE โดยประกบแผ่นกระจก 2 แผ่น วาง โดยวางกระจกแผ่นสั้นไว้ด้านหน้า ตั้งแผ่นกระจกที่มีลูกศรไว้ด้านบน นำแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นวางลงใน Casting Frame ตรวจสอบการรั่วโดยเทน้ำกลั่นทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ถ้ารั่วจะมีน้ำไหลออกจากแผ่นกระจก 2) เตรียม 12% Resolving โดยมีส่วนผสมดังนี้ (30%Acrylamide 2mL, Distilled 1.7 mL,

1.5M Tris HCl pH 8.8 1.25 ml, 10%SDS 50 μ L, 10%APS 50 μ L, TEMED 5 μ L * ต่อ 1 เจล) เทลงในแผ่นกระจกที่ประกอบและเติมน้ำกลั่นเพื่อปิดผิวหน้าของเจลแล้วรอจนแข็ง จากนั้นเทน้ำกลั่นออก 3) เตรียม 4% stacking gel ดังนี้ (30% Acrylamide 0.325ml, Distilled 1.25 ml, 1.5M Tris HCl pH 6.8 0.63 ml, 10%SDS 25 μ L, 10%APS 25 μ L, TEMED 5 μ L * ต่อ 1 เจล) จากนั้นเท Stacking gel ลงบน Resolving gel ตามเสียบ Comb ลงไปรอให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำออกจาก Casting stand และนำไปต่อเข้ากับ Electrode Assembly จากนั้นนำไปใส่ไว้ใน Inner chamber เท Buffer 1XSDS-PAGE running buffer ตามขีดบอก และเทเข้าข้างในให้เต็ม 4) เอาช่องหัวออก 5) นำตัวอย่างผสมกับ Laemmli buffer ในอัตราส่วนที่เท่ากัน 1:1 และจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที (การเตรียม 10% APS : ชั่ง Ammonium persulfate 0.1 g และเติม DI water 1 mL ใส่หลอด 1.5 mL การเตรียม Laemmli buffer : เติมน้ำ Laemmli buffer 950 μ L และ BME 50 μ L ใส่หลอด 1.5 mL 6) นำมาโหลดลงช่องหัว โดยใช้ปริมาตรที่โหลด 10 ไมโครลิตร ส่วน Protein marker ใช้ปริมาตร 3 ไมโครลิตรเพื่อใช้เทียบกับตัวอย่าง ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ 100V, กระแสไฟฟ้า 300 mA, เวลาในการรัน 70 นาที 7) เมื่อรันโปรตีนเสร็จ นำแผ่นเจลออกจากกระจก ตัดส่วน Stacking gelทิ้ง นำส่วน Resolving ย้อมสีด้วย Coomassie blue เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีออกด้วย Destain I และ Destain II ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที

4. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (Yongram *et al.*, 2019) เตรียมน้ำต้มเส้นไหมให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL ละลายด้วยน้ำร้อน แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น 8, 16, 31, 63, 125, 250, 500 และ 1000 μ g/mL

เตรียมสารมาตรฐาน โดยกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ สารมาตรฐาน L-ascorbic acid (AR grade, Fisher Chemical, UK) เตรียมให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.5, 1, 3, 4, 5, 8, 16, 31, 63, 125, 250 และ 500 μ g/mL

เตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH เตรียมสารละลาย 10 mM 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH (Aldrich Chemistry, Germany) โดยละลาย DPPH 0.0394 g ด้วย 95% เอทานอลใน volumetric flask ขนาด 10 mL แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.1 mM DPPH solution

ขั้นตอนการทดสอบ

1) เตรียมตัวอย่างจากผงจากน้ำต้มเส้นไหมที่ทำแห้งแล้วให้มีความเข้มข้น 1000 μ g/mL จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้น ในช่วง 1-1000 μ g/mL โดยละลายในน้ำ (จากนั้นให้ความร้อนจนกว่าผงโปรตีนจะละลาย) สำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลวจะเจือจางกับน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 10 เท่า ก่อนนำมาวิเคราะห์

2) ดูดตัวอย่างน้ำต้มเส้นไหม 100 μ L ลงใน 96-well plate

3) เติมน้ำ 0.1 mM DPPH solution 100 μ L 4) เขย่าให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย microplate reader spectrophotometer (Sunrise, Switzerland) 6) คำนวณ % Inhibition จากสมการ แล้วนำไปหาค่า IC₅₀ จากความสัมพันธ์ของกราฟ % Inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs.Control} - \text{Abs.Sample}) \times 100}{\text{Abs.Control}}$$

Abs.Control = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม,
Abs.Sample = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง

5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง (Chaikhong *et al.*, 2023)

1) เตรียมตัวอย่างผงที่ได้จากน้ำต้มเส้นไหมที่ทำแห้งแล้วให้มีความเข้มข้น 1000 μ g/mL จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้น ในช่วง 1-1000 μ g/mL โดยละลายในน้ำ (จากนั้นให้ความร้อนจนกว่าผงโปรตีนจะละลาย) สำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลวจะเจือจางกับน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 10 เท่า ก่อนนำมาวิเคราะห์ ส่วนกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ สารมาตรฐาน Kojic acid ใน PBS pH 6.8 เตรียมให้มีความเข้มข้นในช่วงเดียวกับตัวอย่าง

2) สารตัวอย่าง 20 μ L ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเอนไซม์ไทโรซิเนส 200 unit/mL 20 μ L และ 140 μ L ของ PBS pH 6.8 ใน 96 well plate

3) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด

4) เติมน้ำ 2.5 mM ของ L-DOPA ปริมาตร 40 μ L

5) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ในที่มืด

6) วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 492 nm จากนั้นคำนวณค่า IC₅₀ จากสมการเส้นตรงของทุกความเข้มข้นของตัวอย่าง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แสดงผลลัพธ์เป็นค่า Mean $\pm$ SD วิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ ไหมดิบ ไหมน้อย ไหมแดง และไหมดิบในระยะที่ 1 กับระยะที่ 2 โดยใช้สถิติตามวิธี ANOVA (Analysis of Variance) ทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ Post hoc (วิธีของดุกี (Tukey)) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย และวิธีการแช่เยือกแข็ง โดยใช้ Pair t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics 27.0 (KKU software)

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ขนาดมวโมเลกุลฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดโปรตีนขาวไหมที่ได้จากกระบวนการฟอกขาวเส้นไหมหัตถกรรม ในระยะที่ 1 (กรรมวิธีดั้งเดิม)

จากการศึกษาการต้มเส้นไหมหัตถกรรม ได้แก่ ไหมดิบ ไหมน้อย และไหมแดง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) (รูปที่ 1) เพื่อสกัดโปรตีนขาวไหม (เซรีซิน) ด้วยกรรมวิธีดั้งเดิมของกลุ่มวิสาหกิจชุมชน พบว่า ในระหว่างการต้ม น้ำในหม้อต้มเกิดการเดือดล้นและรั่วซึม เมื่อครบเวลา 30 นาที ได้ตัวอย่างของน้ำต้มเส้นไหมดิบ ไหมน้อย และไหมแดง คงเหลือคิดเป็นร้อยละ 37.5, 29.2 และ 32.6 ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 1) พบว่า ปริมาณโปรตีนของน้ำต้มเส้นไหมดิบมากที่สุด รองลงมาเป็นไหมน้อยและไหมแดง คือ $7,187.78 \pm 83.89 \mu\text{g/ml}$, $6,843.33 \pm 33.33 \mu\text{g/ml}$ และ $6,810.00 \pm 88.19 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำต้มเส้นไหมดิบมากที่สุด รองลงมาเป็นไหมน้อย และไหมแดง คือ 67.69 ± 1.50 , 42.94 ± 0.16 และ 41.82 ± 0.32 ตามลำดับ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำต้มเส้นไหมดิบมากที่สุด รองลงมาเป็นไหมน้อย และไหมแดง คือ 51.53 ± 4.03 , 49.14 ± 2.31 และ 48.01 ± 6.10 ตามลำดับ โดยปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำต้มเส้นไหมดิบแตกต่างจากไหมน้อยและไหมแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำต้มเส้นไหมทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>$

0.05) เมื่อนำน้ำต้มเส้นไหมทั้งสามชนิด ไปทำเป็นผงแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry) และวิธีการแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) พบว่า ลักษณะผงแห้งของวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีขนาดเล็ก สม่าเสมอและหนาแน่นกว่าวิธีการแช่เยือกแข็งซึ่งผงแห้งมีลักษณะเป็นแผ่นขนาดใหญ่และน้ำหนักเบากว่าแบบพ่นฝอย ไหมดิบมีสีเหลืองเข้มมากที่สุด รองลงมาเป็นไหมน้อยและไหมแดง ตามลำดับ (รูปที่ 2) ร้อยละผลได้ของวิธีการแช่เยือกแข็ง (ร้อยละ 2.21 โดยน้ำหนัก) มากกว่าแบบพ่นฝอย (ร้อยละ 1.76 โดยน้ำหนัก) โดยพบว่าวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีร้อยละผลได้ของน้ำต้มเส้นไหมดิบมีค่ามากที่สุด คือ 2.21 รองลงมาเป็นไหมน้อย คือ 0.94 และไหมแดง คือ 0.80 ตามลำดับ ส่วนวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าร้อยละผลได้ของน้ำต้มเส้นไหมดิบ มีค่ามากที่สุดคือ 1.76 รองลงมาเป็นไหมน้อย คือ 0.60 และไหมแดง คือ 0.49 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อนำผงแห้งไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่า ปริมาณโปรตีนของผงแห้งไหมดิบทั้งวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยและวิธีการแช่เยือกแข็งมากที่สุด รองลงมาเป็นไหมน้อยและไหมแดง ตามลำดับ และปริมาณโปรตีนของผงแห้งไหมดิบทั้งวิธีการทำแห้งทั้งสองวิธี มีความแตกต่างจากไหมน้อยและไหมแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยปริมาณโปรตีนของผงแห้งไหมดิบจากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทำนองเดียวกันปริมาณโปรตีนของผงแห้งไหมน้อยและไหมแดงเมื่อเปรียบเทียบวิธีการทำแห้งทั้งสองวิธีพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการต้านออกซิเดชันและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ระดับ 50% (IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)) ทั้งวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยและวิธีการแช่เยือกแข็งของผงแห้งเส้นไหมดิบที่ดีที่สุด และค่า IC_{50} ของการต้านออกซิเดชันและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผงแห้งเส้นไหมดิบจากการทำแห้งทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนค่า IC_{50} ของการต้านออกซิเดชันและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผงแห้งเส้นไหมน้อยและไหมแดงพบว่ามีค่ามากกว่า 10 mg/mL (ตารางที่ 3) ในการวิเคราะห์ขนาดมวโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากน้ำต้มเส้นไหม (รูปที่ 3ก) และผงแห้งของเส้นไหมดิบ ไหมน้อยและไหมแดงจากวิธีการทำแห้งทั้งสองวิธี (รูปที่ 3ข) พบว่า ขนาดมวโมเลกุลของโปรตีนเป็นแถบกว้างอยู่ในช่วง 25 – 250 KDa



เส้นไหมดิบ

เส้นไหมน้อย

เส้นไหมแดง

รูปที่ 1 ภาพแสดงลักษณะเส้นไหมดิบ ไหมน้อยและไหมแดง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย)

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของ น้ำต้มเส้นไหมดิบ ไหมน้อยและไหมแดง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) จากตัวอย่างระยะที่ 1

ชนิดของเส้นไหม	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$)	DPPH (% inhibition)	Tyrosinase (% inhibition)
ไหมดิบ	$7,187.78 \pm 83.89^a$	67.69 ± 1.50^a	51.53 ± 4.03^a
ไหมน้อย	$6,843.33 \pm 33.33^b$	42.94 ± 0.16^b	49.14 ± 2.31^a
ไหมแดง	$6,810.00 \pm 88.19^b$	41.82 ± 0.32^b	48.01 ± 6.10^a

a,b แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มเดียวกัน ($P < 0.05$)



ผงแห้งไหมดิบ (S)



ผงแห้งไหมน้อย (S)



ผงแห้งไหมแดง (S)



ผงแห้งไหมดิบ (F)



ผงแห้งไหมน้อย (F)



ผงแห้งไหมแดง (F)

รูปที่ 2 ภาพแสดงลักษณะของผงแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย Spray dry (S) และวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง Freeze dry (F) ของน้ำต้มเส้นไหมดิบ ไหมน้อยและไหมแดง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) จากตัวอย่างระยะที่ 1

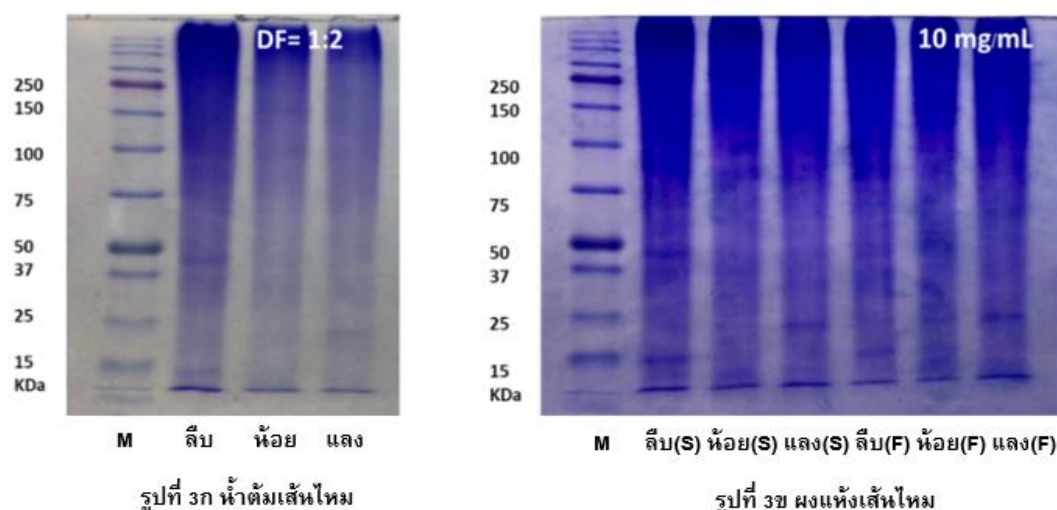
ตารางที่ 2 น้ำหนักของ ผงแห้ง (% Yield) ของน้ำต้มเส้นไหมดิบ ไหมน้อยและไหมแดง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) โดยด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากตัวอย่างระยะที่ 1

ชนิดของเส้นไหม	% yield การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry)	% yield การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)
ไหมดิบ	1.76	2.21
ไหมน้อย	0.60	0.94
ไหมแดง	0.49	0.80

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ของ ผงแห้ง เส้นไหมดิบ ไหมน้อยและไหมแลง สายพันธุ์ไทยลูกผสม เหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากตัวอย่างระยะที่ 1

ชนิดของ เส้นไหม	ปริมาณโปรตีน (mg/g $\pm$ SD)		DPPH (IC50 mg/ml)		Tyrosinase (IC50 mg/ml)	
	พ่นฝอย	เยือกแข็ง	พ่นฝอย	เยือกแข็ง	พ่นฝอย	เยือกแข็ง
ไหมดิบ	276.00 $\pm$ 23.64 ^a	273.77 $\pm$ 6.66 ^a	8.79 $\pm$ 0.33	8.75 $\pm$ 0.13	7.23 $\pm$ 0.04	7.46 $\pm$ 0.42
ไหมน้อย	238.22 $\pm$ 8.39 ^b	236.00 $\pm$ 6.94 ^b	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL
ไหมแลง	234.89 $\pm$ 1.92 ^b	232.67 $\pm$ 13.88 ^b	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL

a,b แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มเดียวกัน (P<0.05)



รูปที่ 3 ขนาดมวโมเลกุลของเส้นไหมดิบ ไหมน้อยและไหมแลง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) ในรูปแบบสารละลาย (รูปที่ 3ก) และรูปแบบผงแห้ง (รูปที่ 3ข) โดยวิธี วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย Spray dry (S) และวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง Freeze dry (F)

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน มวโมเลกุล ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดโปรตีนจากไหมที่ได้จากกระบวนการฟอกขาวเส้นไหมหัตถกรรม ในระยะที่ 2

จากผลการทดลองในระยะที่ 1 ผู้วิจัยและคณะจึงเลือกเส้นไหมดิบมาทำการทดลอง โดยทำการสกัดเป็น จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยใช้หลักการเดิม คือ ต้มเส้นไหมในน้ำสะอาด โดยใช้อัตราส่วนเส้นไหมต่อน้ำสะอาดเท่าเดิม และต้มด้วยหม้ออัดแรงดันไฟฟ้า นาน 30 นาที เท่าเดิม แต่ปรับเพิ่มขนาดของหม้ออัดแรงดันไฟฟ้า โดยกำหนดให้ปริมาณน้ำในหม้อต้มไม่เกิน 1 ใน 3 ของความจุหม้อ ปรับลดกำลังไฟของเตาไฟฟ้าลงและใช้กำลังไฟคงที่ 1,600-1,800 วัตต์ พบว่า ที่กำลังไฟ 1,600 วัตต์ น้ำในหม้อต้มไม่เกิดการเดือดล้นและร่วซึมออกมาจากหม้อต้ม ปริมาณน้ำต้มไหมดิบ ไหมน้อย และไหม

แลง คงเหลือเพิ่มขึ้นและได้ปริมาณใกล้เคียงกัน คงเหลือคิดเป็นร้อยละ 62.5, 63.0, 65.0 และ 65.0 ตามลำดับ แล้วนำน้ำต้มเส้นไหมดิบทั้ง 4 ตัวอย่าง ไปทำเป็นผงแห้ง จากที่วิธีการทำแห้งทั้งสองวิธีไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้วิจัยและคณะจึงได้เลือกวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากทำให้ได้อนุภาคขนาดเล็กที่มีความสม่ำเสมอ ละลายน้ำได้เร็วกว่า มีต้นทุนต่ำกว่าและใช้เวลาน้อยกว่าการทำแห้งแบบวิธีการแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำน้ำต้มและผงแห้งเส้นไหมดิบมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในห้องปฏิบัติการ พบว่า ปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำต้ม (ตารางที่ 4) และผงแห้งเส้นไหมดิบทั้ง 4 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโร

ชีเนสของน้ำต้มเส้นไหมดิบ ในระยะที่ 1 และ 2 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สถิติตามวิธี ANOVA และทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยปริมาณโปรตีนของน้ำต้มเส้นไหมดิบในระยะที่ 1 คือ $7,187.78 \pm 83.89 \mu\text{g/ml}$ และปริมาณโปรตีนของน้ำต้มเส้นไหมดิบในระยะที่ 2 ซึ่งอยู่ในช่วง $7,991.11 - 8,224.44 \mu\text{g/ml}$ โดยการสกัดในระยะที่ 2 หลังจากได้มีการควบคุมวิธีการสกัด ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจากระยะที่ 1 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำต้มเส้นไหมดิบในระยะที่ 1 (% inhibition คือ 67.69 ± 1.50) กับระยะที่ 2 (%inhibition ของตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ 66.32 ± 1.06 , 67.88 ± 1.06 , 68.65 ± 1.06 และ 67.68 ± 1.97 ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำต้มเส้นไหมดิบในระยะที่ 2 (%inhibition ของตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ 64.75 ± 2.22 , 65.52 ± 2.38 , 63.22 ± 2.44 และ

67.57 ± 3.43 ตามลำดับ) เพิ่มขึ้นจากระยะที่ 1 (%inhibition คือ 51.53 ± 4.03) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 6) ส่วนการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจากผงแห้งของเส้นไหมดิบพบว่า ในระยะที่ 1 คือ $276.00 \pm 23.64 \mu\text{g/ml}$ กับระยะที่ 2 ของตัวอย่าง ที่ 1, 2 , 3 และ 4 คือ 288.22 ± 3.84 , 288.22 ± 5.09 , 287.11 ± 3.33 และ $289.33 \pm 3.89 \mu\text{g/ml}$ มีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผงแห้งเส้นไหมดิบในระยะที่ 1 (IC₅₀ คือ $8.79 \pm 0.33 \text{ mg/ml}$) กับระยะที่ 2 (IC₅₀ ของตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ 7.90 ± 0.18 , 7.72 ± 0.29 , 7.81 ± 0.07 และ 7.92 ± 0.08 ตามลำดับ) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผงแห้งเส้นไหมดิบในระยะที่ 1 (IC₅₀ คือ $7.23 \pm 0.04 \text{ mg/ml}$) กับระยะที่ 2 (IC₅₀ ของตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ 6.42 ± 0.04 , 6.42 ± 0.06 , 6.33 ± 0.04 และ $6.40 \pm 0.06 \text{ mg/ml}$) พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 4 ปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำต้มเส้นไหมดิบ จากตัวอย่างระยะที่ 2 ทั้ง 4 ตัวอย่างสายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย)

ชนิดของเส้นไหม	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$)	DPPH (% inhibition)	Tyrosinase (% inhibition)
ไหมดิบ ตัวอย่างที่ 1	$7,991.11 \pm 76.98^a$	66.32 ± 1.06^a	64.75 ± 2.22^a
ไหมดิบ ตัวอย่างที่ 2	$8,224.44 \pm 69.39^a$	67.88 ± 1.06^a	65.52 ± 2.38^a
ไหมดิบ ตัวอย่างที่ 3	$8,124.44 \pm 269.43^a$	68.65 ± 1.06^a	63.22 ± 2.44^a
ไหมดิบ ตัวอย่างที่ 4	$8,213.33 \pm 120.19^a$	67.68 ± 1.97^a	67.57 ± 3.43^a

a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 5 ปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ของผงแห้งเส้นไหมดิบจากตัวอย่างระยะที่ 2 ทั้ง 4 ตัวอย่างสายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ชนิดของเส้นไหม	ปริมาณโปรตีน ($\text{mg/g} \pm \text{SD}$)	DPPH IC ₅₀ (mg/ml)	Tyrosinase IC ₅₀ (mg/ml)
ไหมดิบ ตัวอย่างที่ 1	288.22 ± 3.84^a	7.90 ± 0.18^a	6.42 ± 0.04^a
ไหมดิบ ตัวอย่างที่ 2	288.22 ± 5.09^a	7.72 ± 0.29^a	6.42 ± 0.06^a
ไหมดิบ ตัวอย่างที่ 3	287.11 ± 3.33^a	7.81 ± 0.07^a	6.33 ± 0.04^a
ไหมดิบ ตัวอย่างที่ 4	289.33 ± 3.89^a	7.92 ± 0.08^a	6.40 ± 0.06^a

a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ของน้ำต้มเส้นไหมดิบจากตัวอย่างระยะที่ 1 และระยะที่ 2 สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย)

ชนิดของเส้นไหม	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$)	DPPH (% inhibition)	Tyrosinase (% inhibition)
ไหมดิบ ระยะที่ 1	$7,187.78 \pm 83.89^a$	67.69 ± 1.50^a	51.53 ± 4.03^a
ไหมดิบ ระยะที่ 2 ตัวอย่างที่ 1	$7,991.11 \pm 76.98^b$	66.32 ± 1.06^a	64.75 ± 2.22^b
ไหมดิบ ระยะที่ 2 ตัวอย่างที่ 2	$8,224.44 \pm 69.39^b$	67.88 ± 1.06^a	65.52 ± 2.38^b
ไหมดิบ ระยะที่ 2 ตัวอย่างที่ 3	$8,124.44 \pm 269.43^b$	68.65 ± 1.06^a	63.22 ± 2.44^b
ไหมดิบ ระยะที่ 2 ตัวอย่างที่ 4	$8,213.33 \pm 120.19^b$	67.68 ± 1.97^a	67.57 ± 3.43^b

a,b แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มเดียวกัน ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ของผงแห้งเส้นไหมดิบโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย จากตัวอย่างระยะที่ 1 และระยะที่ 2 สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย)

ชนิดของเส้นไหม	ปริมาณโปรตีน ($\text{mg/g} \pm \text{SD}$)	DPPH IC50 (mg/ml)	Tyrosinase IC50 (mg/ml)
ไหมดิบ ระยะที่ 1	276.00 ± 23.64^a	8.79 ± 0.33^b	7.23 ± 0.04^b
ไหมดิบ ระยะที่ 2 ตัวอย่างที่ 1	288.22 ± 3.84^a	7.90 ± 0.18^a	6.42 ± 0.04^a
ไหมดิบ ระยะที่ 2 ตัวอย่างที่ 2	288.22 ± 5.09^a	7.72 ± 0.29^a	6.42 ± 0.06^a
ไหมดิบ ระยะที่ 2 ตัวอย่างที่ 3	287.11 ± 3.33^a	7.81 ± 0.07^a	6.33 ± 0.04^a
ไหมดิบ ระยะที่ 2 ตัวอย่างที่ 4	289.33 ± 3.89^a	7.92 ± 0.08^a	6.40 ± 0.06^a

a,b แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มเดียวกัน ($P < 0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่า น้ำที่ได้จากกระบวนการฟอกขาวเส้นไหมหัตถกรรม ได้แก่ ไหมดิบ ไหมน้อย และไหมแลง สายพันธุ์ไทยลูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) ด้วยความร้อนสูงและความดันสูง โดยการประยุกต์ใช้หม้ออัดแรงดันไฟฟ้าด้วยกรรมวิธีดั้งเดิมของวิสาหกิจชุมชน มีโปรตีนไหมเป็นส่วนประกอบ พบโปรตีนไหมจากสารสกัดไหมดิบมากที่สุด รองลงมาเป็นไหมน้อย และไหมแลงตามลำดับ ให้ผลผลิตโปรตีนไหมประมาณร้อยละ 0.5-2 ซึ่งให้ผลผลิตน้อยกว่าการสกัดโปรตีนไหมด้วยหม้อนึ่งความดันที่ Manosroi และคณะ (Manosroi et al., 2010) รายงานว่าให้ผลผลิตโปรตีนไหม (เซรีซิน) ร้อยละ 5.2-8.0 โปรตีนไหมมีขนาดโมเลกุล อยู่ในช่วง 20-250 kDa สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sprague (Sprague, 1975) ที่ระบุขนาดโมเลกุล

ของเซรีซินจากต่อมไหมส่วนกลางของตัวอ่อนหนอนไหม Bombyx mori อยู่ที่ 20-220 kDa และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aramwit และคณะ (Aramwit et.al, 2010) ที่ระบุขนาดโมเลกุลของเซรีซินจากรังไหม Bombyx mori สายพันธุ์ไทยพื้นเมือง ได้แก่ สายพันธุ์จุล 1/1 (เปลือกสีขาว) และ 4/2 (เปลือกสีเหลือง) ที่สกัดด้วยยูเรีย มีโมเลกุลตั้งแต่ 10 ถึง >220 Kda เมื่อนำสารสกัดโปรตีนไหมทั้งในรูปแบบน้ำต้มและผงแห้งไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ไหมดิบทั้งในรูปแบบน้ำต้มและผงแห้งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างจากไหมน้อยและไหมแลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ค่า IC50 (Inhibitory Concentration 50 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ระดับ 50% ของสารสกัดไหมดิบในรูปแบบผงแห้ง (พ่นฝอย)

เท่ากับ 8.79 ± 0.33 mg/ml และ 7.23 ± 0.04 mg/ml ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Butkhup และคณะ (Butkhup L *et al*, 2012) ที่ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดโปรตีนขาวไหมจากรังไหมสายพันธุ์ไทย ได้แก่ สายพันธุ์นางน้อย โชคอำนวย 1 และโชคอำนวย 2 โดยใช้การสกัดด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C และความดัน 103.5 Kpa เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH แล้วรายงานผลเป็นค่า EC50 (Effective Concentration 50 คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่จำเป็นในการต้านออกซิเดชันได้ครึ่งหนึ่งของประสิทธิภาพสูงสุดที่สารนั้นทำได้) ของสารสกัดโปรตีนขาวไหมจากรังไหมสายพันธุ์นางน้อย โชคอำนวย 1 และโชคอำนวย 2 มีค่า EC50 เท่ากับ 1.05 ± 0.02 , 0.96 ± 0.02 และ 1.04 ± 0.03 mg/ml ตามลำดับ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Manosroi และคณะ (Manosroi *et al.*, 2010) ที่ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันหรือยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนขาวไหมจากรังไหม Bombyx mori สายพันธุ์ไทย ได้แก่ เขียวสกล นางน้อย นางเหลือง สำโรง และโนนฤๅชี โดยใช้การสกัดด้วยหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH แล้วรายงานผลเป็นค่า SC50 (Scavenging Concentration 50 คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถกำจัดหรือต้านออกซิเดชันได้ 50%) ของสารสกัดโปรตีนขาวไหมสายพันธุ์ไทย ได้แก่ เขียวสกล นางน้อย นางเหลือง สำโรง และโนนฤๅชี เท่ากับ 19.63 ± 0.09 , 32.33 ± 2.06 , 13.65 ± 0.20 , 15.49 ± 0.19 และ 24.44 ± 0.26 mg/ml ตามลำดับ และรายงานค่า IC50 (Tyrosinase) ของสารสกัดโปรตีนขาวไหมสายพันธุ์ไทย ได้แก่ เขียวสกล นางน้อย นางเหลือง สำโรง และโนนฤๅชี เท่ากับ 5.92 ± 0.16 , 18.76 ± 0.14 , 2.90 ± 0.31 , 9.19 ± 0.31 และ 4.28 ± 0.21 mg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโปรตีนขาวไหมในงานวิจัยนี้ และจากการศึกษาประสิทธิภาพของเซริซินในการรักษาภาวะผิวหนังที่มีสีเข้มผิดปกติ (hyperpigment disorders) ในงานวิจัยของ Aramwit และคณะ (Aramwit *et.al*, 2018) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส การปรับสมดุลระบบภูมิคุ้มกัน และการต่อต้านการสร้างเมลานินของเซริซินในเซลล์เมลานोไซต์ เซลล์เดนดริติก (DCs) และผิวหนังเทียม (MelanoDerm™) พบว่าเซริซินที่สกัดด้วยยูเรียมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเม็ดสีเมลานิน ด้านการอักเสบ และการแพ้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดโปรตีนขาวไหม

(เซริซิน) อาจนำมาใช้ในการรักษาภาวะการสร้างเม็ดสีของผิวหนังที่มากผิดปกติ อย่างไรก็ตามควรนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติมด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัยต่อไป

การประยุกต์ใช้หม้ออัดแรงดันในการสกัดโปรตีนขาวไหมจากเส้นไหมหัตถกรรมให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกับการใช้หม้อนึ่งแรงดันในห้องปฏิบัติการ ผลผลิตโปรตีนขาวไหมที่ได้มีความสะอาดบริสุทธิ์มากกว่าการใช้สารเคมี การใช้งานไม่ซับซ้อน มีต้นทุนต่ำ เหมาะสำหรับผู้ประกอบการขนาดเล็ก เช่น วิสาหกิจชุมชน หม้ออัดแรงดันอาศัยหลักการความร้อนสูงความดันสูง ความร้อนส่วนเกินทำให้น้ำเดือดกลายเป็นไอ ในหม้อความดันแบบปิด จุดเดือดของน้ำจะเพิ่มขึ้นตามความดันที่เพิ่มขึ้น ความดัน 1 บาร์หรือ ~15 psi (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เหนือความดันบรรยากาศที่มีอยู่ น้ำในหม้ออัดแรงดันสามารถไปถึงอุณหภูมิได้สูงถึง 120 องศาเซลเซียส สำหรับหม้ออัดแรงดันไฟฟ้าที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ คู่มือระบุอุณหภูมิสูงสุดของน้ำสูงสุดเท่ากับ 117 องศาเซลเซียส – 80 Kpa การศึกษาวิจัยนี้พบว่าเมื่อปรับปรุงกรรมวิธีการต้ม ทำให้คุณภาพและมาตรฐานการผลิตดีขึ้น คือ ปริมาณน้ำต้มคงเหลือในแต่ละครั้งใกล้เคียงกัน เมื่อนำไปทำผงแห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า เมื่อปรับปรุงกรรมวิธีการสกัด ปริมาณโปรตีนขาวไหมของเส้นไหมดิบเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเส้นไหมดิบที่ได้จากกรรมวิธีปรับปรุงดีกว่ากรรมวิธีเดิม อาจเนื่องจากกรรมวิธีปรับปรุงใช้กำลังไฟในการต้มคงที่ ขณะที่กรรมวิธีเดิมปรับเปลี่ยนลดกำลังไฟในระหว่างการต้ม จึงอาจส่งผลให้อุณหภูมิและความดันในหม้อต้มของกรรมวิธีเดิมไม่คงที่ อุณหภูมิและความดันที่สูงขึ้นระหว่างการสกัดสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโปรตีนขาวไหมได้ (Wang *et al*, 2021)

ดังนั้น หากต้องการนำสารสกัดที่ได้จากกระบวนการฟอกขาวเส้นไหมด้วยกรรมวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอางเชิงพาณิชย์ ผู้วิจัยแนะนำว่าควรใช้สารสกัดที่ได้จากเส้นไหมดิบ สายพันธุ์ไทยถูกผสมเหลืองสระบุรี (J108 x นางลาย) ในรูปแบบผงแห้ง (silk powder) โดยแนะนำให้ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-1.4% ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใช้แล้วไม่ต้องล้างออก และความเข้มข้น 0.1% ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใช้แล้วต้องล้างออก (คำนวณจากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของผงไหมที่ใส่ในตำรับเพื่อให้สารสกัดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้าน

เอนไซม์ไทโรซิเนส คือ ผงไหม 8 มิลลิกรัม มีปริมาณโปรตีน 288.32 กรัม) ซึ่งความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่คณะผู้เชี่ยวชาญด้านความปลอดภัยของสารที่ใช้ในเครื่องสำอาง The Expert Panel for 1 Cosmetic Ingredient Safety (2020) (Johnson *et al.*, 2020) แนะนำให้ใช้เป็นส่วประกอบในเครื่องสำอาง โดยทำหน้าที่เป็นสารบำรุงผม (hair conditioning) สารบำรุงผิว (skin conditioning agents) และสารเพิ่มปริมาณ (bulking agent) ในตำรับ ในกรณีที่ผู้ประกอบการไม่สามารถนำสารสกัดไปทำเป็นผงแห้งได้ สามารถใช้สารสกัดในรูปแบบน้ำต้ม (silk extract) โดยใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.0036-0.015% ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใช้แล้วไม่ต้องล้างออก และความเข้มข้น 0.0013-0.015% ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใช้แล้วต้องล้างออก ตามคำแนะนำของคณะผู้เชี่ยวชาญด้านความปลอดภัยของสารที่ใช้ในเครื่องสำอาง The Expert Panel for 1 Cosmetic Ingredient Safety (2020) ได้ ข้อสำคัญของการสกัดด้วยกรรมวิธีนี้ คือ ควรใช้หม้ออัดแรงดันไฟฟ้า ขนาด 7 ลิตร ต้มบนเตาแม่เหล็กไฟฟ้า โดยใช้กำลังไฟอยู่ที่ 1,600 วัตต์ นาน 30 นาที แนะนำใส่ของเหลวไม่เกิน 1 ใน 3 ส่วนของหม้อ เพื่อป้องกันการเดือดล้นและรั่วซึมของของเหลวจากหม้อต้ม และตรวจเช็คอุปกรณ์ทั้งหมดของหม้ออัดแรงดันว่าอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ โดยเฉพาะวาล์วระบายอากาศและวาล์วควบคุมแรงดันไม่ให้ชำรุดเสียหายและไม่อุดตัน ซิลยางไม่เสื่อมคุณภาพ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้หัวหน้าโครงวิจัยเป็นผู้ออกทุนเองทั้งหมด ขอขอบพระคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดขอนแก่น ที่ให้โอกาสไปบรรยายให้ความรู้เกี่ยวกับการจัดแจงผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแก้วสาหกิจชุมชนปลูกหม่อนเลี้ยงไหมเวียงแก้วจนนำไปสู่การทำวิจัยพัฒนาในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้อาสาสมัครในการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

References

Aramwit P, Damrongsakkul S, Kanokpanont S, Srichana T. Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods. *Biotechnol Appl Biochem.* 2010;55:91–8.

Aramwit P, Luplertlop N, Kanjanapruthipong T, Ampawong S. Effect of urea-extracted sericin on melanogenesis: potential applications in post-inflammatory hyperpigmentation. *Biol Res.* 2018;51–4.

Babu KM. Silk fibres – structure, properties and applications. In: Kozłowski RM, Mackiewicz-Talarczyk M, editors. *Handbook of Natural Fibres.* 2nd ed. Vol. 1: Types, Properties and Factors Affecting Breeding and Cultivation. Cambridge: Woodhead Publishing; 2020. p. 385–416.

Boonchu S, Rakphong N. *Wisdom of Thai silk production in the northeastern region.* Bangkok: Agricultural Cooperative Community of Thailand; 2012.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.

Butkhup L, Jeenphakdee M, Jorjong S, Samappito S, Samappito W, Butimal J. Phenolic composition and antioxidant activity of Thai and Eri silk sericins. *Food Sci Biotechnol.* 2012;21(2):389–98.

Chaikhong K, Chumpolphant S, Rangsinth P, Sillapachaiyaporn C, Chuchawankul S, Tencomnao T, *et al.* Antioxidant and anti-skin aging potential of selected Thai plants: in vitro evaluation and in silico target prediction. *Plants (Basel).* 2023;12(1):65.

Johnson Jr W, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, *et al.* Safety assessment of silk protein ingredients as used in cosmetics. *Int J Toxicol.* 2020;39(3_suppl):127S–44S.

Kanpipit N, Nualkaew N, Kiatpongarp W, Priaprem A, Thapphasaraphong S. Development of a sericin hydrogel to deliver anthocyanins from purple waxy corn cob (*Zea mays* L.) extract and in vitro evaluation of anti-inflammatory effects. *Pharmaceutics.* 2022;14(3):577.

- Kunz RI, Brancalhão RM, Ribeiro LF, Natali MR. Silkworm sericin: properties and biomedical applications. *Biomed Res Int*. 2016;1–19.
- Liu J, Shi L, Deng Y, Zou M, Cai B, Song Y, *et al*. Silk sericin-based materials for biomedical applications. *Biomaterials*. 2022;287.
- Manosroi A, Boonpisuttinant K, Winitchai S, Manosroi W, Manosroi J. Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of oils and sericin extracted from Thai native silkworms (*Bombyx mori*). *Pharm Biol*. 2010;48(8):855–60.
- Miguel GA, Álvarez-López C. Extraction and antioxidant activity of sericin, a protein from silk. *Braz J Food Technol*. 2020;23.
- Sinchaisri N, Chanopas R. Mulberry cultivation and silk raising [Internet]. In: Thai Encyclopedia for Youth, Volume 7. Bangkok: Foundation for the Thai Encyclopedia for Youth Project by the royal initiative of His Majesty King Bhumibol Adulyadej the Great; 1982 [cited 2023 May 24]. Available from: https://www.saranukromthai.or.th/Ebook/BOOK7/pdf/book7_3.pdf
- Sericulture Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Silkworm raising patterns [Internet]. 2017 [cited 2023 Jun 15]. Available from: <https://qsds.go.th/2017/12/09/รูปแบบการเลี้ยงไหม/>
- Sprague KU. The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry*. 1975;14(5):925–31.
- Vaishnav SR, Singh SA. Sericin, a by-product of the silk industry: extraction and applications. In: Kuddus M, Ramteke P, editors. Value-Addition in Agri-Food Industry Waste Through Enzyme Technology. Elsevier Inc.; 2023. p. 199–208.
- Wang WH, Lin WS, Shih CH, Chen CY, Kuo SH, Li WL, *et al*. Functionality of silk cocoon (*Bombyx mori* L.) sericin extracts obtained through high-temperature hydrothermal method. *Materials*. 2021;14(18):5314.
- Yongram C, Sungthong B, Puthongking P, Weerapreeyakul N. Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of leaves, bark, twigs and oleo-resin of *Dipterocarpus alatus*. *Molecules*. 2019;24(17):3083.