

การพัฒนากระบวนการสกัดโปรตีนไหมด้วยเอนไซม์โบรมิเลน และศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

Development of silk sericin extraction process using bromelain and study antioxidant activities of the hydrolysates

2

สุวรรณี แทนธานี¹, ปัทมาพร จิตปรีดา¹, ธนวรรณ โรจนปิติกุล¹, สิบงกช ทรัพย์แดง¹
Suwannee Thaenthanee¹, Pattamaporn Jitpreeda¹, Thanawan Rojpitikul¹, Subongkoch Subtaeng¹

บทคัดย่อ

โปรตีนเซรีซิน (Sericins) หรือโปรตีนไหมเป็นโปรตีนที่ได้จากเส้นใยของหนอนไหม (*Bombyx mori*) ได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาใช้ประโยชน์ด้านเครื่องสำอางและการแพทย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการสกัดโปรตีนไหมจากรังไหมสีขาวเพื่อการใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยดำเนินการศึกษาวิธีการสกัดและปริมาณเอนไซม์โบรมิเลนที่เหมาะสมต่อการย่อยโปรตีนไหม ในการศึกษาปริมาณเอนไซม์โบรมิเลนที่เหมาะสม ได้เตรียมสารสกัดโปรตีนไหมและนำสารสกัดมาย่อยด้วยเอนไซม์ โดยศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ 5 ความเข้มข้น คือ ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 เก็บสารสกัดโปรตีนไหมหลังการย่อยด้วยเอนไซม์มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนที่ใช้ในการย่อยมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดของโปรตีนไหม ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 5 ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.20±0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเลือกใช้เอนไซม์โบรมิเลนที่มีความเข้มข้นดังกล่าวในการย่อยสารสกัดโปรตีนไหมที่ได้จากกระบวนการสกัด 3 วิธี ได้แก่ 1) การสกัดด้วยน้ำกลั่น ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน 2) การสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน และ 3) การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตหรือเบกกิ้งโซดาร้อยละ 0.2 ร่วมกับการให้ความร้อน จากนั้น นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ขนาดโมเลกุลของโปรตีน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 13.00±0.64, 12.30±0.50, และ 13.20±0.95 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โมเลกุลของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่วัดด้วยด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis โดยใช้ระบบ Tricine (Tricine-SDS-PAGE) พบว่ามีขนาดเล็กกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย และสารสกัดโปรตีนไหมหลังการย่อยด้วยเอนไซม์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนไหมก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์โบรมิเลนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไหมได้

คำสำคัญ: โปรตีนไหม การสกัด โบรมิเลน การต้านอนุมูลอิสระ

Keywords: Sericin, Extraction, Bromelain, Antioxidant

¹กรมวิทยาศาสตร์บริการ

^{*}Corresponding author e-mail address : suwannee@dss.go.th

Abstract

Sericins, the glue-like proteins obtained from silk threads of *Bombyx mori*, have received many attentions in cosmetic and biomedical applications. This research aimed to study extraction process of sericins from white silk cocoon. Firstly, silk cocoon were cleaned, dried, and extracted with distilled water in an autoclave. The silk extract was digested with bromelain in 5 different levels at 1, 2, 3, 4 and 5%. After digestion, the extracts were tested for antioxidant activities by DPPH assay. It was found that the protein hydrolysate with 5% bromelain gave the highest antioxidant activities against DPPH assay with IC₅₀ value of 7.20 ± 0.10 mg/ml. Therefore, the bromelain concentration at 5% was chosen to digest silk extracts obtained from the 3 extraction methods, 1) extraction with distilled water in an autoclave, 2) extraction with phosphate buffer solution pH 7.0 in an autoclave and 3) extraction with 0.2% sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) or baking soda solution and heating. Then the extracts were further digested with 5% bromelain in appropriate condition. The protein hydrolysates were collected, and the protein contents, molecular size, and antioxidant activities were measured. It was found that the protein hydrolysates had protein content of 13.00 ± 0.64 , 12.32 ± 0.50 and 13.20 ± 0.95 mg/ml, respectively. Molecular size analysis using Tricine system of Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tricine SDS-PAGE) showed that the sizes of protein hydrolysates were smaller than that of the undigested. The antioxidants activities by DPPH assay revealed that protein hydrolysates showed significantly higher antioxidant activities than that of proteins before enzymatic digestion. It can be concluded that bromelain can enhance the antioxidant efficiency of the silk sericin extract.

1. บทนำ (Introduction)

รังไหม (Silk cocoon) ที่สร้างจากหนอนไหม (*Bombyx mori*) ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนไฟโบรอิน (Fibroin) หรือโปรตีนเส้นใย มีประมาณร้อยละ 70-75 และโปรตีนเซรีซิน (Sericin) หรือโปรตีนกาวไหม มีประมาณร้อยละ 25-30 โปรตีนกาวไหมทำหน้าที่คล้ายกาว (Glue-like protein) ยึดโปรตีนเส้นใยไฟโบรอินให้อยู่ด้วยกันทำให้เกิดโครงร่างเป็นรังไหม ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องกำจัดโปรตีนกาวไหมออกก่อนกระบวนการสาวไหมเพื่อให้สามารถสาวเป็นเส้น ทำให้เกิดของเหลือทิ้งในกระบวนการฟอกไหม ต่อมาจึงมีผู้สนใจศึกษาสมบัติของโปรตีนกาวไหมถึงแนวทางการประยุกต์ใช้เพื่อการเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมไหม และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

โปรตีนกาวไหมจัดเป็นโปรตีนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) หรือเรียกว่าเป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถละลายได้ในน้ำร้อน [1] ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 18 ชนิด โดยเป็นกรดอะมิโนมีขั้ว (Polar amino acid) มากกว่าร้อยละ 70 จึงทำให้ดูดซับน้ำได้ดี โดยมีกรดอะมิโนเซอรีน (Serine) เป็นองค์ประกอบหลักถึงร้อยละ 30-33 จึงเป็นที่มาของชื่อเซรีซิน โปรตีนกาวไหมมีสมบัติโดดเด่นเป็นพิเศษในการกักเก็บน้ำ สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ จึงเป็นสารช่วยคงความชุ่มชื้นให้แก่ผิว นอกจากนี้ยังสามารถต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอความชรา มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และป้องกันรังสี UV ได้ กระบวนการสกัดโปรตีนมีหลายวิธีขึ้นกับวัตถุประสงค์การใช้งาน แต่ละวิธีจะให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน เช่น การสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์ร่วมกับการให้ความร้อนและลดความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ได้โปรตีนกาวไหมที่มีน้ำหนักโมเลกุล 35-150 kDa ในขณะที่การใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต้มเดือดเป็นเวลา 30 นาที ได้โปรตีนกาวไหมที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15-75 kDa การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicate) ร่วมกับการใช้เอนไซม์ให้ประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนกาวไหมน้อยกว่าการใช้สารละลายต่าง [2],[3] นอกจากนี้ สายพันธุ์ไหมที่ต่างกันจะให้โปรตีนที่มีส่วนประกอบต่างกันและมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันด้วย

จากการลงพื้นที่ยกระดับสินค้า OTOP ของกรมวิทยาศาสตร์บริการ พบว่ามีผู้ประกอบการ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีความต้องการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ โดยได้ผลิตสารสกัดโปรตีนไหมด้วยวิธีการตามภูมิปัญญา เช่น การสกัดรังไหมด้วยสารละลายต่างชนิด และนำมาเติมลงในผลิตภัณฑ์ อาจส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนจากโลหะหนัก และอาจเกิดความระคายเคืองจากต่างที่ใส่สกัด ทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานได้ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ กระบวนการสกัดโปรตีนจากรังไหมที่ทำได้ง่าย ได้โปรตีนที่มีคุณภาพดี โดยศึกษากระบวนการสกัดและการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีเอส เพื่อให้ได้เทคนิคเฉพาะในการสกัดโปรตีนกาวไหมโดยไม่ใช้สารเคมีเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีความปลอดภัย รวมทั้งมีผลการพิสูจน์

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปใช้ในการต่อยอดในการผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีคุณภาพ ได้มาตรฐาน และสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ผู้ประกอบการได้

2. วิธีการวิจัย (Experimental methods)

2.1 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยโปรตีนกาวไหม

2.1.1 สกัดโปรตีนกาวไหมและย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน 5 ระดับความเข้มข้น

เลือกวัตถุดิบที่นำมาใช้สกัด ได้แก่ รังไหมสีขาวทำความสะอาดรังไหม ลอกเส้นใยและสิ่งสกปรกออก ล้างด้วยน้ำสะอาด อบให้แห้ง เก็บใส่ถุงพลาสติก ในการสกัดใช้รังไหมในอัตราร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก โดยใช้น้ำหนักรังไหม ตัดย่อยให้เป็นชิ้นเล็ก เติมน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำสารสกัดโปรตีนกาวไหมแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขวดละ 100 มิลลิลิตร ละลายเอนไซม์โบรมิเลน (Sigma, US.) ด้วยน้ำกลั่น และเติมน้ำในขวดสารสกัดโปรตีนกาวไหมให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักรังไหม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารสกัดโปรตีนกาวไหมหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยการปั่นเหวี่ยงตกตะกอน นำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

2.1.2 ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนกาวไหมที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน 5 ระดับความเข้มข้น เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีและสารมาตรฐานวิตามินอี

ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน โดยการเตรียมสารอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ในตัวทำละลาย absolute ethanol ให้มีความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ สารมาตรฐานวิตามินซี (L-ascorbic acid) และสารมาตรฐานวิตามินอี (Trolox) เจือจางด้วยน้ำกลั่นลดลงทีละครึ่งเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.0078125, และ 0.00390625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำสารละลายมาตรฐานที่เจือจางแล้วมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH และวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS microplate spectrophotometer ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง จากนั้น คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ดังสมการ

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) =
$$\frac{[(A-B)-(C-D)]}{(A-B)} \times 100$$

เมื่อ A หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ Control (DPPH + เอทานอล)

B หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank control (เอทานอล)

C หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ Test sample (ตัวอย่าง + DPPH)

D หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank sample (ตัวอย่าง + เอทานอล)

ค่า % Inhibition จะสูงขึ้นตามความเข้มข้นของสาร นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและ %Inhibition เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (IC50)

ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนขาวโหมที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น โดยการนำสารสกัดโปรตีนขาวโหม มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นโดยลดลงทีละครึ่งเท่า ให้ได้ระดับการเจือจาง 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 เท่า จากนั้น นำสารสกัดที่เจือจางแล้ว มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง โดยใช้วิธีดำเนินการเช่นเดียวกับการทดสอบสารละลายมาตรฐาน คำนวณค่า IC50 เปรียบเทียบค่า IC50 และคัดเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนที่ให้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป

2.2 ศึกษากระบวนการสกัดโปรตีนขาวโหม

เตรียมรังไหมสีขาว และนำมาผ่านกระบวนการสกัด 3 วิธี ดังนี้ วิธีที่ 1 สกัดด้วยน้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 2.1 วิธีที่ 2 สกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดันโดยการเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 จากสารละลาย 0.05M ไดเบสิด โซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4) และ 0.05 M ไมโนเบสิด โซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ตามวิธีของ Gomori 1995 [4] และใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการสกัดโปรตีนขาวโหมแทนการใช้น้ำกลั่น โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 วิธีที่ 3 สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) หรือเบกกิ้งโซดา (Baking soda) ร่วมกับการให้ความร้อนโดยการเตรียมสารละลายเบกกิ้งโซดาร้อยละ 0.2 ใส่ลงในบีกเกอร์ ชั่งน้ำหนักรังไหมใส่ลงในสารละลาย ให้ความร้อนจนเริ่มเดือด ใช้แท่งแก้วกดให้รังไหมจมและคนเป็นระยะ ลดความร้อนลง และต้มต่อเป็นเวลา 10 นาที แยกรังไหมส่วนที่ไม่ละลายออก เก็บสารสกัดส่วนใสที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรดด่าง (ค่า pH) และนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน เนื่องจากเอนไซม์โบรมิเลน มีช่วงการทำงานใน pH ที่เหมาะสม ผู้วิจัยจึงวัดค่า pH ของสารสกัดโปรตีนขาว

โหม ก่อนย่อยและหลังย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการย่อยของแต่ละวิธีเหมือนกัน

2.3 ย่อยสารสกัดโปรตีนขาวโหมด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและการศึกษาสมบัติของสารสกัด

ดำเนินการย่อยสารสกัดโปรตีนขาวโหมที่ได้จากกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธีโดยใช้เอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักรังไหม โดยใช้สภาวะการย่อยเช่นเดียวกับข้อ 2.1 จากนั้น เก็บสารสกัดโปรตีนขาวโหมหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ไปศึกษาสมบัติของสารสกัด ดังนี้

2.3.1 วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

เจือจางโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA) ให้ได้ความเข้มข้นระหว่าง 1-1,500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับสารละลายในชุดทดสอบ Modified Lowry Protein Assay (Thermo scientific, USA) ตามที่ระบุในคู่มือ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายโปรตีนมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสงเตรียมสารสกัดโปรตีนขาวโหมเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ระดับการเจือจาง 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 เท่า นำมาทำปฏิกิริยากับชุดทดสอบ และหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.3.2 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยการทำ SDS-PAGE

วิเคราะห์ขนาดโปรตีนขาวโหมก่อนการย่อยและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ระบบ Tricine โดยเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ และใช้ 16% Tricine gel precast gel ในการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) ให้ความต่างศักย์ 100 โวลต์กับเจล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลออกมาย้อมสีในสารละลาย Coomassie brilliant blue R250 และล้างเจลด้วยสารละลาย 10% acetic acid ใน 50% methanol จนเห็นแถบโปรตีน ล้างด้วยน้ำกลั่น เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐาน

2.3.3 ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ดำเนินการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนขาวโหมที่ได้จากกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธีก่อนการย่อยและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน เช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดโปรตีนขาวโหมและค่าการดูดกลืนแสง เพื่อ

คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระ 50% (IC50) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยโปรตีนกวางไหม

3.1.1 สกัดโปรตีนกวางไหมและย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน 5 ระดับความเข้มข้น

เอนไซม์โบรมิเลน (Bromelain) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อย (Hydrolysis) โมเลกุลของสารประเภทโปรตีน สกัดจากลำต้นของสับปะรด (*Ananas comosus*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Bromeliaceae มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน เอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ในช่วง pH 6.8-9.0 และช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส แต่ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และจะถูกทำลายด้วยความร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส 5-6 ในช่วงแรกได้ทดลองย่อยโปรตีนกวางไหมออกจากรังไหมด้วยสารละลายเอนไซม์โบรมิเลน พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถย่อยโปรตีนกวางไหมได้ เนื่องจากโปรตีนเซรีซินที่ห่อหุ้มรังไหมมีความแข็งแรง ไม่เปื่อยน้ำ และไม่ละลายในน้ำเย็น อย่างไรก็ตาม โปรตีนดังกล่าวจะถูกไฮโดรไลซ์ ทำให้โมเลกุลโปรตีนแตกตัวออกได้ในน้ำร้อน [7] คณะผู้วิจัยจึงได้ปรับวิธีการสกัดโปรตีนกวางไหมโดยใช้น้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน เพื่อให้ได้สารสกัดโปรตีนกวางไหมแล้วจึงนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้น 5 ระดับ และนำสารสกัดโปรตีนกวางไหมก่อนการย่อยและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

3.1.2 ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนกวางไหมที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน 5 ระดับความเข้มข้น เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีและสารมาตรฐานวิตามินอี

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนกวางไหมที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1-5 ด้วยวิธี DPPH assay พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 5 ให้สารสกัดโปรตีนกวางไหมที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่า IC50 เท่ากับ 7.20 ± 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และรองลงมาที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 4 ให้ค่า IC50 อยู่ระหว่าง 10.26–11.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดโปรตีนกวางไหมที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก ไม่สามารถนำมาคำนวณค่า IC50 ได้ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าสารสกัดโปรตีนกวางไหมที่ย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 5 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสารสกัดโปรตีนกวางไหมที่ย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 1-4 ที่ $P < 0.05$ ดังแสดงในตารางที่ 1 จึงได้เลือกความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ค่า IC50) ของสารสกัดโปรตีนกวางไหมที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1-5

ความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลน (ร้อยละของน้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักรังไหม)	ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 IC50 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
Ascorbic acid	0.0155	0.0154	0.0153	0.0154 ± 0.0001
Trolox	0.0170	0.0175	0.0171	0.0172 ± 0.0003
5	7.15	7.31	7.14	7.20 ± 0.10^a
4	11.07	11.31	9.79	10.72 ± 0.82^{bc}
3	10.37	10.14	10.27	10.26 ± 0.11^b
2	11.52	11.06	11.40	11.33 ± 0.24^c

1	11.93	11.07	11.04	11.35 ± 0.51^c
0 (สารสกัดก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน)	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND หมายถึง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก ไม่สามารถคำนวณค่า IC50 ได้ตัวเลขที่มีอักษร a, b, และ c กำกับต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3.2 ศึกษากระบวนการสกัดโปรตีนกาวไหม

สารสกัดโปรตีนกาวไหมที่ได้จากกระบวนการสกัดด้วยน้ำกลั่น และที่สกัดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาว และเกิดเป็นเจลที่ไม่ละลายน้ำเมื่อเย็นตัวลง วัดค่า pH ของสารสกัดได้เท่ากับ 6.71 และ 6.52 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาว และไม่เป็นเจล วัดค่า pH ได้ 9.40 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kweon และคณะ (2000) ที่รายงานว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนเซรีซินจะลดลงเมื่อโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนเปลี่ยนจากโครงสร้างที่ไม่เฉพาะเจาะจง (Random coil) เป็นปิตาซีหรือสภาวะที่เป็นผลึก (Crystalize state) โปรตีนกาวไหมจะละลายได้ในกรดที่มีค่า pH ต่ำกว่า 2.5 และละลายได้ในด่างที่มีค่า pH สูงกว่า 9.5 [8] และเมื่อนำสารสกัดโปรตีนกาวไหมที่ได้จากกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธี ไปย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่าสารสกัดหลังการย่อยด้วยเอนไซม์มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาว และไม่เป็นเจล เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนได้ถูกไฮโดรไลซ์ ให้มีขนาดเล็กลง จึงไม่เกิดการก่อตัวเป็นเจล แสดงว่าเอนไซม์ทำงานได้ในสภาวะที่กำหนดในการทดลอง สอดคล้องกับรายงานของ อารี (2554) ที่พบว่าเอนไซม์โบรมิเลนทำงานได้ในช่วง pH ที่กว้าง 5.0 - 9.0 และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 [5] สารสกัดโปรตีนกาวไหมหลังการย่อยมีค่า pH ลดลง อยู่ในช่วง 5.40–6.71 เนื่องจากเอนไซม์โบรมิเลนสกัดจากสับปะรดจึงมีฤทธิ์เป็นกรด จึงมีผลทำให้ค่า pH ของสารสกัดลดลง ลักษณะของสารสกัดโปรตีนกาวไหมและผลการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างก่อนและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะของสารสกัดโปรตีนกาวไหม และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่า pH) ของสารสกัดโปรตีนกาวไหมที่ผ่านกระบวนการสกัด 3 วิธี ก่อนการย่อยและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

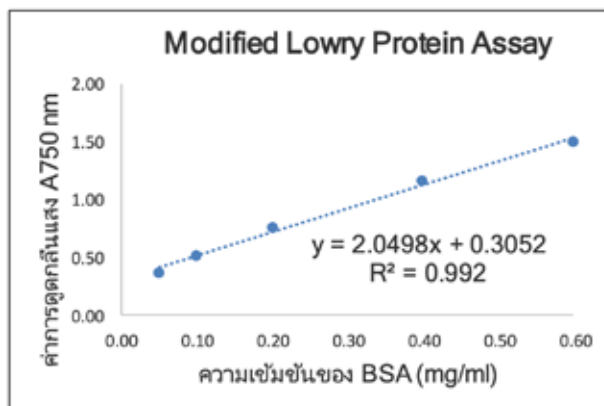
กระบวนการสกัด	สารสกัดโปรตีนกาวไหมก่อนการย่อยและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน	ลักษณะของสารสกัด โปรตีนกาวไหม	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่า pH)
น้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน	ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์	สารละลายสีขาว เกิดเจล เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	6.71 ± 0.02
	หลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน	สารละลายสีขาว ไม่เกิดเจล	5.40 ± 0.02
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน	ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์	สารละลายสีขาว เกิดเจล เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	7.02 ± 0.01
	หลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน	สารละลายสีขาว ไม่เกิดเจล	5.63 ± 0.02
สารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา ร่วมกับการให้ความร้อน	ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์	สารละลายสีขาว ไม่เกิดเจล	9.40 ± 0.01
	หลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน	สารละลายสีขาว ไม่เกิดเจล	6.71 ± 0.01

3.3 ย่อยสารสกัดโปรตีนกาวไหมที่ด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและการศึกษาสมบัติของสารสกัด

ดำเนินการย่อยสารสกัดโปรตีนกาวไหมที่ได้จากกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธีโดยใช้เอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยนำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักงัวไหม เก็บสารสกัดโปรตีนกาวไหมหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ไปศึกษาสมบัติของสารสกัด ดังนี้

3.3.1 วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

ผลการวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ที่ได้จากกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธี โดยการใช้ชุดทดสอบ Modified Lowry Protein Assay (Thermo scientific, USA) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 1) พบว่าสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ผ่านกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธีหลังการย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 13.00 ± 0.64 , 12.32 ± 0.50 และ 13.20 ± 0.95 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 3



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยการใช้ชุดทดสอบ Modified Lowry Protein Assay

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดโปรตีนขาวใหม่หลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยการใช้ชุดทดสอบ Modified Lowry Protein Assay

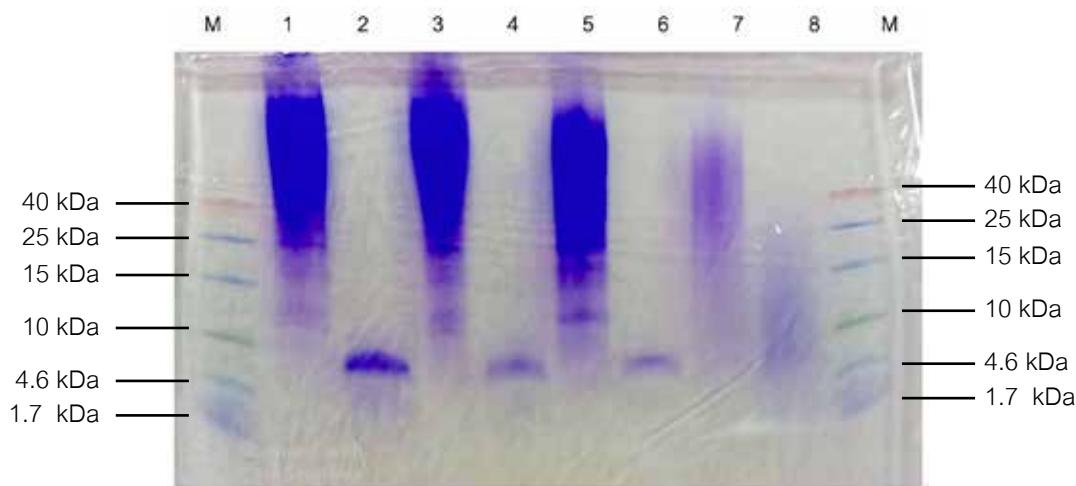
กระบวนการสกัด	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
น้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน	13.36	12.26	13.39	13.00 ± 0.64^{ab}
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดันและผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน	11.90	12.87	12.18	12.30 ± 0.50^a
สารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา ร่วมกับการให้ความร้อน และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน	12.18	14.05	13.36	13.20 ± 0.95^b

หมายเหตุ ตัวเลขที่มีอักษร a และ b กำกับต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3.3.2 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยการทำ SDS-PAGE

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขาวใหม่ก่อนการย่อยและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis โดยใช้ระบบ Tricine (Tricine-SDS-PAGE) ซึ่งเป็นระบบที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนหรือพอลิเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กขนาดตั้งแต่ 2 kDa ขึ้นไปได้ดี (รูปที่ 2) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน (เลนที่ 1) สกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน (เลนที่ 2) และสกัดด้วยสารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา (เลนที่ 3) ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์

โบรมิเลนมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 40 kDa และสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ที่ได้จากกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธี หลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีรูปแบบเดียวกันคือพบแถบโปรตีนอยู่ระหว่าง 4.6 - 10 kDa (เลนที่ 2,4 และ 6) แสดงว่าโปรตีนขาวใหม่ถูกเอนไซม์โบรมิเลนไฮโดรไลซ์ให้เป็นโปรตีนขนาดเล็กลง ในขณะที่โปรตีนขาวใหม่ทางการค้าแหล่งที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลกระจายตัวระหว่าง 1.7-15 kDa (เลนที่ 7) และโปรตีนขาวใหม่ทางการค้าแหล่งที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุลกระจายตัวตั้งแต่ 10 kDa ขึ้นไปจนถึงมากกว่า 40 kDa (เลนที่ 8)



รูปที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน สกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน และสกัดด้วยสารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (เลนที่ 1, 3, และ 5) และหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (เลนที่ 2, 4 และ 6) เปรียบเทียบกับสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ทางการค้าแหล่งที่ 1 และ 2 (เลนที่ 7 และ 8) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Tricine- SDS-PAGE

3.3.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ที่ได้จากกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธีก่อนและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน โดยคำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระ 50% (IC₅₀) พบว่า สารสกัดโปรตีนขาวใหม่ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน สกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน และสกัดด้วยสารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.20 ± 0.10 , 6.87 ± 0.22 , และ 15.70 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 ในขณะที่โปรตีนขาวใหม่ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก ไม่สามารถคำนวณค่า IC₅₀ ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สรวิรัตน์ และคณะ (2555) ที่พบว่าการสกัดโปรตีนขาวใหม่ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูง และสูงกว่าการสกัดด้วยสารละลายด่างโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) [9] นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า การใช้เอนไซม์โบรมิเลนย่อยโปรตีนจากกากทานตะวัน ทำให้ได้โปรตีนขนาดเล็กลง และมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อย [10]

ตารางที่ 4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ค่า IC50) ของสารสกัดโปรตีนขาวใหม่ได้จากกระบวนการสกัดทั้ง 3 วิธี ก่อนการย่อยและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

สารมาตรฐาน/สารสกัดโปรตีนขาวใหม่	กระบวนการสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 IC50 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
Ascorbic acid	-	0.0155	0.0154	0.0153	0.0154±0.0001
Trolox	-	0.0170	0.0175	0.0171	0.0172±0.0003
สารสกัดโปรตีนขาวใหม่ก่อนการย่อย	น้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน	ND	ND	ND	ND
	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน	ND	ND	ND	ND
	สารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา ร่วมกับการให้ความร้อน	ND	ND	ND	ND
สารสกัดโปรตีนขาวใหม่หลังการย่อย	น้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน	7.15	7.31	7.14	7.20±0.10 ^a
	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน	6.65	7.10	6.86	6.87±0.22 ^a
	สารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา ร่วมกับการให้ความร้อน	15.58	15.64	15.89	15.70±0.17 ^b

หมายเหตุ ND หมายถึง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก ไม่สามารถคำนวณค่า IC50 ได้ตัวเลขที่มีอักษร a และ b กำกับต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

กระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซิน (Sericins) หรือโปรตีนกาวไหมด้วยการใช้เอนไซม์โบรมิเลน จำเป็นต้องสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยน้ำกลั่นหรือสารละลายที่เหมาะสมร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวไม่ละลายในน้ำเย็น จากนั้นจึงนำสารสกัดโปรตีนกาวไหมมาแยกด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส มีรายงานว่า การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอสจะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ ในการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 5 ให้สารสกัดโปรตีนกาวไหมที่มีค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ในการทดลองสกัดโปรตีนกาวไหม 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยน้ำกลั่นร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน และการสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ร่วมกับการให้ความร้อนและความดัน และการสกัดด้วยสารละลาย 0.2% เบกกิ้งโซดา ร่วมกับการให้ความร้อน สามารถสกัดโปรตีนกาวไหมออกมาในรูปสารละลายได้ และให้ปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม สารสกัดที่ได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อนำสารสกัดโปรตีนกาวไหมมาแยกด้วยเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 5 ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าโปรตีนกาวไหมหลังย่อยด้วยเอนไซม์มีขนาดโมเลกุลเล็กลง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์โบรมิเลนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนกาวไหมได้

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ ปีงบประมาณ 2561-2562 ขอขอบคุณกลุ่มผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ไม่ใช่อาหาร สำนักเทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] GAMO, T., T. INOKUCHI and H. LAUFER. Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*. 1977, 7(3), 285-295.
- [2] ARAMWIT, P., S. DAMRONGSAKKUL, S. KANOKPANONT and T. SRICHANA. Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2010, 55(2), 91-98.
- [3] MAHMOODI, N. M., M. ARAMI, F. MAZAHARI and S. RAHIMI. Degradation of sericin (Degumming) of Persian silk by ultrasound and enzymes as a cleaner and environmentally friendly process. *Journal of Cleaner Production*. 2010, 18(2), 146-151.
- [4] GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods of enzymology*. 1955. 1, 138-146.
- [5] อาริ ฤทธิบุรณ์. การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นของสับปะรดและการนำไปใช้ประโยชน์ในการทำหมักเนื้อนุ่ม. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2554.
- [6] นกนิรา แสงสุริยะ, สุชนิ ตียะชัยพานิช และ เอื้ออารีย์ พรเศรษฐคุณ . การผลิตเอนไซม์โบรมิเลนจากลำต้นสับปะรด. วิทยานิพนธ์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2535.
- [7] GULRAJANI, M. L. (ed.). *Silk dyeing, printing, and finishing*. Hauz Khas, New Delhi : Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology. 1988.
- [8] KWEON, H. Y., J. H. YEO, K. G. LEE, Y. W. LEE, Y. H. PARK, J. H. NAHM and C. S. CHO. Effects of poloxamer on the gelation of silk sericin. *Macromolecular rapid communications*. 2000, 21(18), 1302-1305.
- [9] สรวิรัตน์ พวงบริสุทธ์, สุพนิดา วินิจชัย, หทัยรัตน์ ริมศิริ, วิชัย หฤทัยธนาสันต์ และ สุคันธธส ธาดากิตติสาร. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส สมบัติทางกายภาพ และเคมีบางประการของผงโปรตีนไหมพันธุ์โนนฤๅษีที่เตรียมโดยการสกัดวิธีต่าง ๆ. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร*. 2555. หน้า 319-327.
- [10] พัสตราภรณ์ ทองอิมพงษ์, ณัฏฐา เลหากุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น, สุรพงษ์ พิณจกลางและ เบญจวรรณ ธรรมนารักษ์. สมบัติต้านอนุมูลอิสระและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากกากทานตะวันทีไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและ Flavourzyme®. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจร*. 2559, 39(4) ตุลาคม - ธันวาคม, 565-583.