

การพัฒนากระบวนการเตรียมผงไฟโบรอินไฮโดรไลสจากผงไฟโบรอิน ชนิดไม่ละลายน้ำเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

Development of Hydrolysate Fibroin Powder from Insoluble Fibroin Powder for Use in Cosmetic Products

ปิยรัตน์ มูลศรี^{1*}

^{1*} คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

โทรศัพท์ 0-56-717100 ต่อ 2713 E-mail : piyarutto@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาการเตรียมผงไฟโบรอินไฮโดรไลสจากผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยใช้สารละลายเกลือผสมระหว่าง $\text{CaCl}_2 : \text{EtOH} : \text{H}_2\text{O}$ (1:2:8) และเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายเส้นใยไฟโบรอิน สารละลายไฟโบรอินที่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่องและวิธีเจลฟิวเรชัน สารละลายไฟโบรอินที่ได้ทำให้เป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งและศึกษาสมบัติบางประการของผงไฟโบรอินไฮโดรไลส ได้แก่ ลักษณะพื้นฐานวิทยา โครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิ การละลาย สมบัติแอนติออกซิแดนซ์ และองค์ประกอบเคมีบางประการ ผลที่ได้พบว่าสารละลายไฟโบรอินที่เตรียมโดยใช้สารละลายผสม $\text{CaCl}_2 : \text{EtOH} : \text{H}_2\text{O}$ (1:8:2) ทำได้ง่ายและสะดวกกว่าการใช้เอนไซม์โปรติเอส มีสถานะที่เหมาะสมในการทำละลายที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และการทำให้สารละลายไฟโบรอินบริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่องมีความสะดวกและมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีเจลฟิวเรชัน อีกทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายกว่าการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไดอะไลซิสแบบเดิม ผงไฟโบรอินไฮโดรไลสที่ได้มีพื้นฐานวิทยาเป็นแผ่นขนาดเล็กระดับไมโครเมตร มีโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิแบบ Silk I (random coil and α -helix structure) ละลายน้ำได้มากกว่าร้อยละ 70 มีสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ มีปริมาณโปรตีนมากกว่าร้อยละ 72 และมีปริมาณถ่านน้อยกว่าร้อยละ 2 จากสมบัติเหล่านี้ ผงไฟโบรอินไฮโดรไลสที่ได้จึงสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบางประเภทได้

คำสำคัญ : ผงไฟโบรอินไฮโดรไลส, ผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ, ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

Abstract

In this research, hydrolysate fibroin powder was prepared from an insoluble fibroin powder and tested for use in cosmetic products. Fibroin solution was prepared using both a mixed salt solution of $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:8) and protease enzyme fermentation. Following this, the fibroin solution was purified using a dialysis process which employed a continuous flow system and gel filtration. The purified fibroin solution was freeze-dried, powdered and studied, in particular for its morphology, secondary protein structure, solubility, antioxidant properties, and some of its chemical composition. It was found that preparing fibroin solution using a mixed salt solution was

easier and more convenient than using enzyme fermentation. The optimal condition for dissolving the insoluble fibroin powder using the mixed salt solution is at 80°C and for 30 min. In addition, using dialysis with a continuous flow system was more convenient and performed better than did gel filtration. It also reduced time and cost when compared with previously used dialysis processes. The results of the study show the sheet-like characteristics of fibroin particles at the micro-level. The material has a Silk I structure (a random coil and an α -helix structure) and a water solubility of more than 70%. In addition, the hydrolysed fibroin powder has antioxidant properties, a protein content higher than 72% and ash content lower than 2% and it may therefore be suitable for use in the development of certain cosmetic products.

Keywords : Hydrolysate fibroin powder, Insoluble fibroin powder, cosmetic product

1. บทนำ

เส้นใยไฟโบรอิน (Fibroin fiber) เป็นองค์ประกอบหลักในเส้นไหมซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์โปรตีน (Protein polymer) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เช่น ไกลซีน (Glycine) และอะลานีน (Alanine) โดยทั่วไปแล้วเส้นไหมมีองค์ประกอบของเส้นใยไฟโบรอินอยู่ประมาณร้อยละ 70 - 75 อยู่ร่วมกับสารเซรีซิน (Sericin) ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่ละลายน้ำได้ มีอยู่ในเส้นไหมประมาณร้อยละ 25 - 30 ทำหน้าที่คล้ายกาว “gum-like-protein” ยึดเส้นใยไฟโบรอินให้อยู่ด้วยกัน

ปัจจุบันเส้นใยไฟโบรอินมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ นอกเหนือจากการใช้ในอุตสาหกรรมทอผ้า รวมถึงปุ๋ยไหมและเศษไหมซึ่งเป็นวัสดุที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตเส้นไหม ก็ถูกนำมาสกัดสารไฟโบรอินที่อยู่ในเส้นไหมมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ โดยนิยมทำให้อยู่ในรูปผงไหมไฟโบรอินที่ละลายน้ำ (Hydrolysate fibroin powder) เพื่อความสะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ จากองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในไฟโบรอินทั้งชนิดที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ ไกลซีน (Gly) อะลานีน (Ala) ซึ่งมีอยู่รวมกันในไฟโบรอินประมาณร้อยละ 71.5 และกรดอะมิโนชนิดที่มีขั้ว ได้แก่ เซรีน (Ser) ไทโรซีน (Tyr) กรดแอสพาทิก (Asp) และวาลีน (Val) ซึ่งมีอยู่รวมกันประมาณร้อยละ 21.9 ดังนั้นไฟโบรอินจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในเครื่องสำอางหลายประเภท ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงถูกนำไปใช้ในการผลิตวัสดุทางการแพทย์ เช่น ผิวน้ำเทียม คอนแทคเลนส์ วัสดุสำหรับเพาะกระดูก กระดูกเทียม วัสดุควบคุมการกระจายตัวของยา หรือการใช้เป็นวัสดุสำหรับตรึงเอนไซม์ในงานด้านไบโอเซนเซอร์ เป็นต้น (Altman et al., 2003)

ชิดชัย ปัญญาสวรรค์ และพิลาณี ไชยอนมสัจย์ (2549) ได้ศึกษากระบวนการผลิตผงไหมชนิดละลายน้ำจากไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 โดยการละลายในสารละลายผสมของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) น้ำและเอทานอลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการไดอะลิซิสในน้ำกลั่น เป็นเวลา 2 วัน เพื่อขจัดไอออนของเกลือและนำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อขจัดสิ่งเจือปนอื่นออก จากนั้นนำสารละลายไหมบริสุทธิ์ไปทำให้แห้งโดยการแช่แข็งสุญญากาศและบดให้ละเอียดจะได้ผงไหมชนิดละลายได้ในน้ำสีเหลืองนวลจากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีพบว่า มีลักษณะปรากฏและรูปแบบของกรดอะมิโนทั้งหมดใกล้เคียงกับ

ผงไหมทางการค้า อย่างไรก็ตามผงไหมจากห้องปฏิบัติการมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สูงกว่าในขณะที่มีปริมาณความชื้นและเถ้าต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับผงไหมทางการค้าและมีขนาดโมเลกุลประมาณ 40 kDa ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับและเก็บรักษาความชื้น จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง

ปิยรัตน์ มุลศรี (2551) ได้เตรียมผงไฟโบรอินระดับไมโครและนาโนเมตรจากปุยไหมโดยใช้วิธีทางกายภาพและวิธีการทางเคมี โดยวิธีทางกายภาพทำโดยการปั่นเส้นใยไฟโบรอินด้วยเครื่องปั่นอย่างง่ายและการบดด้วยเครื่องบดลมิลล์ ส่วนการเตรียมโดยวิธีทางเคมีทำโดยนำสารละลายไฟโบรอินไปตกตะกอนในตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เอทานอล อะซิโตน อะซิโตรไนไตร์ และไอโซพิวทานอล และการเติมสารก่ออนุภาคได้แก่ เซเรเนียม และโซเดียมคลอไรด์ และทำให้เป็นผงโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งและวิธีการทำแห้งแบบอบลมร้อน ลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้อง SEM พบว่าผงไฟโบรอินที่เตรียมโดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นและการบดด้วยเครื่องบดลมิลล์มีขนาดอนุภาคประมาณ 50 μm และ 20 μm ตามลำดับ ส่วนอนุภาคไฟโบรอินที่เตรียมโดยวิธีการตกตะกอนและการใช้สารก่ออนุภาคจะมีขนาดอนุภาคประมาณ 0.5 μm การเตรียมโดยวิธีทางกายภาพและการตกตะกอนในตัวทำละลายอินทรีย์แสดงโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิเป็นแบบ β -sheet (Silk II) ในขณะที่การใช้สารก่ออนุภาคจะมีโครงสร้างเป็นแบบแรนดอมคอยล์ (Silk I) โดยผงไฟโบรอินที่เตรียมได้โดยวิธีทางกายภาพและการตกตะกอนในตัวทำละลายอินทรีย์มีเปอร์เซ็นต์การละลายน้ำน้อย ในขณะที่การใช้สารก่ออนุภาคจะได้ผงไฟโบรอินที่ละลายน้ำได้มากถึง 20% การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคโดยการเลี้ยวเบนแสงเลเซอร์พบว่า การบดด้วยเครื่องบดลมิลล์ทำให้ได้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของไฟโบรอินประมาณ 14 μm ขณะที่วิธีการทางเคมีทำให้ได้อนุภาคเฉลี่ยประมาณ 3.72 μm ซึ่งมีอนุภาคไฟโบรอินที่เล็กที่สุดที่ตรวจวัดได้ประมาณ 130 nm และยังพบว่าไฟโบรอินเตรียมโดยวิธีทางกายภาพมีสมบัติการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์น้อย ในขณะที่การเตรียมโดยวิธีทางเคมีจะแสดงความเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ในช่วงร้อยละ 15-22 จากผลที่ได้คาดว่าผงไฟโบรอินที่เตรียมได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง และประติษฐานวัสดุทางชีวภาพต่อไปได้

Dash et al., (2006) ได้ศึกษาการแยก การทำให้บริสุทธิ์ และสมบัติของโปรตีนไหมเซรีซินจากรังไหมพันธุ์ *Anteraea mylitta* พบว่าโปรตีนเซรีซินที่เตรียมได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและละลายน้ำได้ การสกัดทำโดยใช้สารละลายผสมของ 8 M Urea และ 1% SDS และ 2% β -mercaptoethanol หรือ 1% NaCl และถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี (Gel filtration chromatography) น้ำหนักโมเลกุลที่หาด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีค่าประมาณ 200 kDa องค์ประกอบกรดอะมิโนส่วนใหญ่ได้แก่ ไกลซีน และเซรีน มีโครงสร้างทุติยภูมิที่ศึกษาด้วยวิธี Circular Dichroism spectrometry (CD spectroscopy) เป็นแบบ β -sheet 36.7% แบบ random coil 52.7% และแบบอื่น ๆ อีกร้อยละ 10.6 แต่ไม่พบโครงสร้างแบบ α -helix เลย

โครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนากระบวนการเตรียมผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสท (ผงไฟโบรอินที่ละลายน้ำได้ดี) จากผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ ซึ่งกระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเปลี่ยนโครงสร้างทุติยภูมิของผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำที่มีโครงสร้างแบบ Silk II (β -sheet) ไปเป็นผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีขึ้นซึ่งมีโครงสร้างแบบ Silk I (random coil) เพื่อให้ได้ผงไฟโบรอินที่สามารถละลายน้ำสำหรับการนำไปใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง

หรือสามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องได้ และเพิ่มมูลค่าของปุ๋ยไหมที่เหลือทิ้งจากกระบวนการอุตสาหกรรมผลิตเส้นไหมได้

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 สารเคมีและการเตรียมตัวอย่าง

ในการวิจัยครั้งนี้สารเคมีที่ใช้เป็นสารเคมีระดับเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) และใช้น้ำกลั่นในการเตรียมสารละลายตลอดการทดลอง ผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำเตรียมในห้องปฏิบัติการโดยใช้ปุ๋ยไหมจากบริษัทจุลไหมไทย จำกัด จังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งผ่านการคัดแยกสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ในปุ๋ยไหมออกไปและกำจัดสารเชรีซิน (กาวไหม) โดยใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเส้นไหมไฟโบรอินที่ได้หนัก 20 กรัม ไปแช่ทิ้งไว้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 400 ml ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างเส้นไหมด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นนำมาลดขนาดด้วยเครื่องปั่นจนละเอียดเป็นเวลาประมาณ 5 นาที จะได้สารคอลลอยด์ของอนุภาคไฟโบรอินไป แล้วทำการแยกตะกอนของอนุภาคไฟโบรอินออกจากตัวกลางด้วยวิธีการกรองแบบสุญญากาศ และนำไปอบให้แห้งด้วยเครื่องอบแบบลมร้อน จากนั้นนำผงไฟโบรอินที่ได้ปริมาณ 100 กรัม ใส่ลงในโถบดแบบบอลมิลล์ แล้วนำไปบดอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำที่มีขนาดอนุภาคประมาณ $48 \mu\text{m}$

2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำละลายผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ

การศึกษาการเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำในการศึกษานี้ ทำโดยศึกษาเปรียบเทียบการทำละลายผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำระหว่าง 2 วิธี คือ 1) การใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง แคลเซียมคลอไรด์ : น้ำ : เอทานอล (อัตราส่วน 1:8:2) โดยนำสารละลายที่ผสมระหว่าง แคลเซียมคลอไรด์ : น้ำ : เอทานอล ปริมาตร 100 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml จากนั้นให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วค่อย ๆ เติมผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำปริมาณ 10 กรัม ที่ละน้อยจนผงไฟโบรอินละลายหมด แล้วบันทึกเวลาที่ใช้ในการทำละลายทั้งหมด จากนั้นทำการละลายผงไฟโบรอินซ้ำตามวิธีการข้างต้น แต่เปลี่ยนมาใช้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 100 องศาเซลเซียส และ 120 องศาเซลเซียส ตามลำดับและ 2) การหมักด้วยเอนไซม์โปรติเอส โดยซึ่งผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 ml จำนวน 4 ใบ ๆ ละ 10 กรัม จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์โปรติเอสลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ๆ ละ 100 ml แล้วทำการแช่สารผสมระหว่างผงไหมไฟโบรอินและเอนไซม์ในแต่ละใบทิ้งไว้ 3 วัน 5 วัน 7 วัน และ 9 วัน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการกรองเพื่อแยกเอาเฉพาะสารละลายออกมา และนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนไหมไฟโบรอิน

2.3 การศึกษาการทำให้สารละลายไฟโบรอินที่เตรียมได้จากการใช้สารละลายเกลือผสมให้บริสุทธิ์

การทำให้สารละลายไฟโบรอินที่เตรียมได้ให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นทำโดย 2 วิธี คือ 1) การศึกษาการใช้กระบวนการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลแบบต่อเนื่อง โดยการใส่สารละลายไฟโบรอินลงไปในถุงไดอะไลซิสความยาวประมาณ 10 cm จากนั้นนำไปใส่ไว้ในภาชนะสำหรับการไดอะไลซิสซึ่งมีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ และมีระบบการไหลอย่างต่อเนื่อง (โดยมีการต่อปั๊มเพื่อดูดน้ำภายในภาชนะไปยังเครื่องกรองน้ำ โดยน้ำที่ผ่านจากเครื่องกรองแล้วถูกนำกลับมาสู่ภาชนะที่ใช้ในการไดอะไลซิสอีกครั้งหนึ่ง) สารละลายไฟโบรอินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่องนี้ ถูกนำไปวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอิน ที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้าทุก ๆ 6 ชั่วโมง และ 2) การศึกษาการใช้วิธีเจลฟิวเทรชัน โดยทำการแพ็คคอลัมน์ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm มีความยาวประมาณ 30 cm ด้วย Sephadex G-25 โดยชั้นหนัประมาณ 20 กรัมและทำการแช่ไว้ด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้อยู่ในสภาพสมดุลของการดูดซับน้ำเข้าไปในอนุภาคของ Sephadex G-25 แล้วทำการบรรจุลงไปในคอลัมน์และทิ้งไว้ให้อนุภาคของ Sephadex เซทตัวลงไปในคอลัมน์ จนมีระดับของ Sephadex มีความสูงประมาณ 20 cm ก่อนทำเจลฟิวเทรชันของสารละลายไฟโบรอิน ที่ผ่านการทำให้ละลายด้วยสารละลายเกลือมาแล้ว นำสารละลายไฟโบรอินดังกล่าวมาทำการกรองก่อนด้วยตัวกรอง Millex-SR ขนาด $0.5 \mu\text{m}$ จากนั้นสารละลายไฟโบรอิน ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า โดยปริมาตร นำไปผ่านคอลัมน์เจลฟิวเทรชัน โดยใช้ความเร็วของการหยดสารละลาย 1 ml/min โดยนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปวัดค่าการนำไฟฟ้าทุก ๆ 30 นาที

สารละลายไฟโบรอินที่เตรียมได้นำไปทำให้แห้งเป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dryer, model Flexi-DryTM MP, FTS Systems, USA)

2.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของผงไหมไฟโบรอิน

การศึกษาสมบัติของผงไหมไฟโบรอินที่เตรียมได้จากการทดลองนำไปทำการวิเคราะห์สัณฐานวิทยา (Morphology) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, model JSM-6335F, JEOL, Japan)

การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของผงไฟโบรอินทำโดยใช้เครื่อง ฟลูเรียทรานสฟอรั่มอินฟราเรด สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrophotometer, model Tensor 27, Bruker, Germany) โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ด้วย KBr

การวิเคราะห์การละลายของผงไฟโบรอินทำโดยการหาเปอร์เซ็นต์การละลายจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 276 nm ตามวิธีของ Li et al. (2003) โดยใช้เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer, model uv-1700, Shimadzu, Japan) ทำโดยการเขย่าผงไฟโบรอินหนัก 20 mg ในน้ำ 10 ml ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง และหาร้อยละการละลายของผงไฟโบรอินได้จากสมการ $D = (KVA/G) \times 100$ โดย D คือร้อยละการละลาย, K คือ ค่าคงที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ 1.0826 mg/ml

การศึกษาสมบัติเชิงความร้อนทำโดยการอบผงไหมไฟโบรอินที่อุณหภูมิ 60 80 100 และ 120 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิด้วย

เครื่อง FT-IR การศึกษาสมบัติความเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ทำโดยวิธีการ ฟรีเรดิคัล สคาร์เวนจิง แอตทิวิตี (Free radical scavenging activity) โดยการใช้สารให้เรดิคัลเป็น 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) ตามวิธีการของ Wu et al. (2007) ทำโดยเตรียมสารละลายไฟโบรอินให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 60 mg/ml จากนั้นปีบตสารละลายไฟโบรอินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.5 ml ลงในภาชนะขนาด 5 ml แล้วเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1.0×10^{-4} mol/l ปริมาตร 3.5 ml ลงไปในภาชนะที่บรรจุสารละลายไฟโบรอินแต่ละใบแล้วเริ่มจับเวลา เขย่าสารละลายผสมประมาณ 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ในภาชนะที่ไม่ให้มีแสงแดดผ่านที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเวลาผ่านไป 25 นาที นำสารละลายผสมนั้นออกมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบที่ 6400 rpm นาน 5 นาที และดูดเอาสารละลายส่วนที่อยู่ด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยการใช้สารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินและเมทานอลเป็นสารอ้างอิง (Blank) ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ (OD_{sample}) นำไปใช้คำนวณต่อไป ทำเช่นเดียวกันแต่ใช้สารละลายของ DDP โดยไม่มีสารไฟโบรอินอยู่ ด้วยแทนสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินและ DPPH ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ (ค่า OD_{blind}) กำหนดให้เป็นค่าเปรียบเทียบกับในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ สคาร์เวนจิงแอตทิวิตีจากสมการ

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{blind}}} \right) \times 100$$

เมื่อ OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 517 nm
 OD_{blind} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เริ่มต้นที่ใช้

การศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีอย่างง่ายของผงไหมไฟโบรอินไฮโดรไลเสททำโดยการหาปริมาณโปรตีน (โดยวิธี Kjeldahl) และการหาปริมาณเถ้า (โดยวิธี AOAC, 2000)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำละลายผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ โดยใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายเกลือผสมระหว่าง CaCl_2 : EtOH : H_2O (1:2:8) พบว่าการทำละลายที่อุณหภูมิ 80 90 100 และ 120 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการทำละลายผงไหมหมดภายใน 30 25 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ซึ่งการใช้อุณหภูมิในการทำละลายเพิ่มขึ้นจะใช้เวลาในการละลายน้อยลง แต่เนื่องจากการใช้สภาวะการละลายที่อุณหภูมิสูงสามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินและสมบัติของผงไฟโบรอินที่เตรียมได้ (Chen et al., 2001) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมสารละลายไฟโบรอินคือที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ซึ่งหากเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากเศษไหมหรือปุ๋ยไหมโดยตรงพบว่ามีความสะดวกในการเตรียมสารละลายไฟโบรอินเพิ่มขึ้นอย่างมาก การเตรียมสารละลายไฟโบรอินโดยการหมักด้วยเอนไซม์โปรติเอสพบว่าการใช้เวลาในการหมัก 3 5 7 และ 9 วัน มีปริมาณของสารไฟโบรอินที่ละลายอยู่ในสารละลายเท่ากับ 3 7 12 และ 20 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งยังถือว่าวิธีการหมักด้วยสารละลายเอนไซม์โปรติเอสนี้ยังทำให้ได้ปริมาณของไฟโบรอินที่ละลายน้ำได้น้อยกว่าวิธีการเตรียมโดยใช้ตัวทำละลาย

เกลือผสมซึ่งมีไฟโบรอินละลายอยู่ประมาณร้อยละ 3 w/v (Moonsri et al., 2008) อย่างมาก ดังนั้น การเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำนี้ โดยใช้ตัวทำละลายเกลือผสม จึงมีความเหมาะสมกว่าวิธีการเตรียมโดยใช้เอนไซม์เนื่องจากมีความสะดวกและได้ปริมาณไฟโบรอินที่ละลายอยู่สูงกว่า แต่สารละลายไฟโบรอินที่เตรียมได้โดยการใช้ตัวทำละลายเกลือผสมนี้ จะต้องนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการกำจัดตัวทำละลายเกลือออกไป

3.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารละลายไฟโบรอินที่ผ่านกระบวนการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่อง

ความบริสุทธิ์ของสารละลายไฟโบรอินที่ได้ ศึกษาจากการวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอิน โดยหากสารละลายไฟโบรอินมีไอออนปนเปื้อนอยู่มาก จะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายมีค่ามากตามไปด้วย ซึ่งค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่องที่เวลาต่าง ๆ แสดงได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่เวลาต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการไดอะไลซิสแบบการไหลอย่างต่อเนื่อง

เวลาที่ผ่านไปของกระบวนการ (Hrs)	ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่วัดได้ (mS/cm)
6	1.740
12	1.054
18	0.952
24	0.776
48	0.664
72	0.540

จากผลที่ได้พบว่าค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการนี้เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมงค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินยังมีค่าที่มากอยู่ แสดงว่ายังมีปริมาณของไอออนของเกลือตัวทำละลายอยู่มาก แต่เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 12 ชั่วโมง พบว่าค่าการนำไฟฟ้ามีค่าลดลง และเมื่อเวลาผ่านไปอีกค่าการนำไฟฟ้าก็มีค่าลดลงมากขึ้น ซึ่งจากค่าที่ได้จะเห็นได้ว่า ภายหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้ว การลดลงของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินมีค่าที่เปลี่ยนแปลงน้อยมาก เมื่อเทียบกับในช่วงเริ่มต้น ดังนั้นการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่องนี้ ทำให้สารละลายไฟโบรอินมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการดำเนินการประมาณ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการไดอะไลซิส (โดยการเปลี่ยนน้ำของสารละลายทุก ๆ 12 ชั่วโมง นาน 3 วัน) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน แสดงได้ว่ากระบวนการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่องนี้ช่วยให้ประหยัดระยะเวลาและประหยัดน้ำกลั่นที่ใช้ในการทำการไดอะไลซิสด้วย

3.3 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารละลายไฟโบรอินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิวเตรชัน

การวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีเจลฟิวเตรชันที่แฟกซ์ต่าง ๆ แสดงได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่เวลาต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิวเตรชัน

เวลาที่ผ่านไปของกระบวนการ (min)	ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินที่วัดได้ (mS/cm)
30	0.701
60	0.837
120	1.172
180	1.445
240	1.883
300	1.989

ที่เวลาผ่านไป 30 นาที ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินมีค่าน้อยที่สุด แสดงว่าสารละลายไฟโบรอินที่ได้นี้มีปริมาณของเกลือที่ปนเปื้อนน้อย นั่นคือสามารถแยกเกลือออกจากสารละลายไฟโบรอินได้ดี แต่เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอินในแฟกซ์ที่เวลานั้นมีค่ามากขึ้นแสดงได้ว่ามีปริมาณของเกลือหรือไอออนที่นำไฟฟ้าได้มากขึ้น ดังนั้นการแยกเกลือตัวทำละลายออกจากสารละลายไฟโบรอินโดยวิธีการเจลฟิวเตรชันนี้ ควรทำการเก็บแฟกซ์ของสารละลายไฟโบรอินในช่วงระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเกลือตัวทำละลาย แต่ทั้งนี้เมื่อนำสารละลายไปทำให้เป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งพบว่าได้ปริมาณของผงไฟโบรอินไฮโดรไลสในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นวิธีการเจลฟิวเตรชันนี้จึงยังไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการเตรียมผงไฟโบรอินไฮโดรไลสในระดับที่ต้องการปริมาณของผงไฟโบรอินมาก

สำหรับต้นทุนในการทำสารละลายไฟโบรอินบริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ ของการศึกษานี้ทำได้ยาก แต่อาจประมาณการต้นทุนผันแปรอย่างคร่าว ๆ ว่าการเตรียมผงไฟโบรอินไฮโดรไลสโดยใช้สารละลายเกลือเป็นตัวทำละลาย และการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกระบวนการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่อง มีต้นทุนการเตรียมที่ต่ำกว่า 10,000 บาทต่อกิโลกรัม ทั้งนี้เนื่องจากการเตรียมผงไฟโบรอินไฮโดรไลสโดยทั่วไปที่ใช้สารละลายเกลือในการทำละลายและใช้วิธีการไดอะไลซิสเพียงอย่างเดียวจะมีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่า 10,000 บาท (ปิยรัตน์ มุลศรี, 2551) ซึ่งต้องใช้ปริมาณของน้ำกลั่น ปริมาณของกระแสไฟฟ้า และระยะเวลาที่มากกว่าวิธีการเตรียมสารละลายไฟโบรอินที่บริสุทธิ์ด้วยการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลอย่างต่อเนื่อง

3.4 ลักษณะทางกายภาพทั่วไปของผงไหมไฟโบรอินไฮโดรไลส

ลักษณะทางกายภาพทั่วไปของผงไหมไฟโบรอินไฮโดรไลสที่ได้จากการทำให้เป็นผงของสารละลายไฟโบรอินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยใช้วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เนื่องจากไม่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนและการเสื่อมสภาพของผงไหม ลักษณะของผงไหมไฟโบรอินไฮโดรไลสที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ แสดงได้ดังภาพที่ 1



(ก)



(ข)

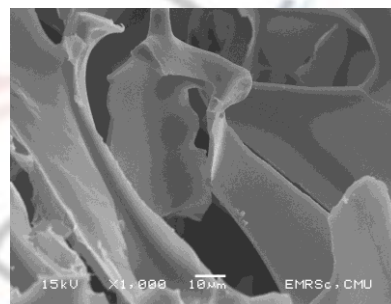
ภาพที่ 1 ลักษณะของ (ก) ผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำและ (ข) ผงไหมไฟโบรอินไฮโดรไลเสท

3.5 การศึกษาสัณฐานวิทยาด้วย SEM

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาโดยกล้อง SEM แสดงลักษณะของผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำและลักษณะของผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้แสดงได้ดังภาพที่ 2



(ก)



(ข)

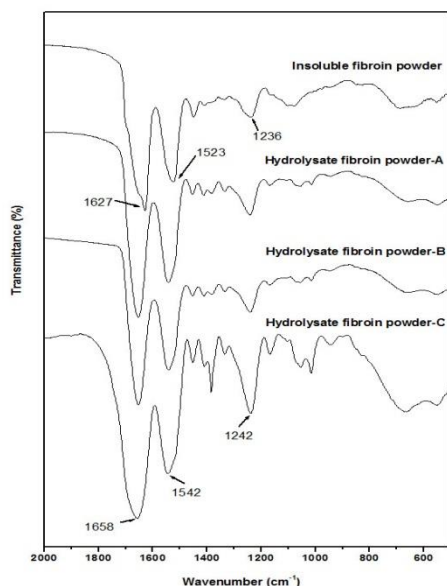
ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ (ก) ผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ (ข) ผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสท

จากการตรวจหาสัณฐานวิทยาของผงไหมไฟโบรอิน ด้วยกล้อง SEM พบว่า ผงไหมไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำมีลักษณะคล้ายแท่ง (Rod-like) และมีขนาดเล็กในระดับไมโครเมตร ดังแสดงได้ดังภาพที่ 2 (ก) ในขณะที่ผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้จากสารละลายไฟโบรอินซึ่งเตรียมได้ด้วยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง มีลักษณะเป็นคล้ายแผ่น (Sheet-like) และมีขนาดเล็กในระดับไมโครเมตรดังแสดงได้ดังภาพที่ 2 (ข)

3.6 การศึกษาโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิของไฟโบรอินด้วยเทคนิค FT-IR

การศึกษาโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิโดยใช้เครื่องฟลูออรีทรานสฟอร์มอินฟราเรด (FT-IR) ของผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่เตรียมโดยวิธีการต่าง ๆ ซึ่งผ่านการทำให้แห้งเป็นผงโดยวิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 3 โดยพบว่าเส้นสเปกตรัมของผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้โดยใช้สารละลายเกลือและทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการไดอะไลซิสที่มีระบบการไหลอย่างต่อเนื่อง (Hydrolysate fibroin powder-A) ผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้โดยใช้สารละลายเกลือและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการเจลฟิวเรชัน (Hydrolysate fibroin powder-B) และผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้โดยใช้สารละลายเอนไซม์โปรติเอส (Hydrolysate fibroin powder-C) มีการแสดงพิกที่ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) ใกล้เคียงกันคือประมาณ 1658 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} และ 1242 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งพิกของหมู่ amide I, amide II และ amide III ตามลำดับ ของโครงสร้าง

แบบ Silk I (random coil and α -helix) ในขณะที่ผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำแสดงตำแหน่งของพีกที่ 1627 cm^{-1} , 1523 cm^{-1} และ 1236 cm^{-1} ของหมู่ amide I, amide II และ amide III ตามลำดับ ซึ่งจะแสดงถึงโครงสร้างแบบ Silk II (β -sheet plate) ที่เป็นโครงสร้างที่มักพบได้โดยทั่วไปในเส้นใยไฟโบรอิน (Um et al., 2003) รวมถึงผงไฟโบรอินที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้ยาก (ปิยรัตน์ มูลศรี, 2551) ซึ่งตำแหน่งของพีกที่ปรากฏของโครงสร้างแบบ Silk I และ Silk II นี้จะมีผลต่อคุณสมบัติการละลายน้ำของผงไฟโบรอินที่เตรียมได้ จากการตรวจสอบตำแหน่งของเลขคลื่นที่แสดงพีกของหมู่ amide I, amide II และ amide III ของผงไฟโบรอินไฮโดรไลสทั้งแบบ A, B และ C ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีต่าง ๆ แสดงว่ามีโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิเป็นแบบโครงสร้างแบบ Silk I ซึ่งแตกต่างจากผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ (insoluble fibroin powder) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมที่มีโครงสร้างแบบ Silk II โดยการที่ผงไหมไฟโบรอินไฮโดรไลสที่มีโครงสร้างเป็นแบบ Silk I นี้จะส่งผลทำให้ผงไฟโบรอินไฮโดรไลสที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้มากขึ้น

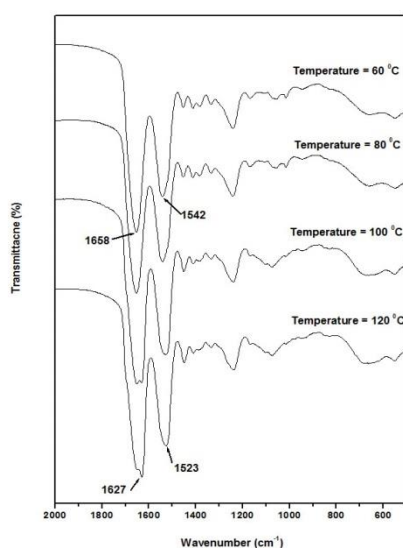


ภาพที่ 3 โครงสร้างทุติยภูมิของผงไฟโบรอินไฮโดรไลสที่เตรียมได้โดยวิธีต่าง ๆ เทียบกับผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ

3.7 การศึกษาสมบัติเชิงความร้อนของผงไหมไฟโบรอิน

การศึกษาสมบัติเชิงความร้อนของผงไฟโบรอินไฮโดรไลส โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิที่อุณหภูมิจากการอบผงไหมช่วง 60 -120 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิคทาง FT-IR ผลจากการศึกษาพบว่าผงไฟโบรอินไฮโดรไลสที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส มีโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิเป็นแบบ α -helix จากการแสดงพีกที่ตำแหน่งเลขคลื่นที่ 1658 cm^{-1} และ 1542 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งพีกของหมู่ amide I และ amide II ตามลำดับ ในขณะที่การอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีการแสดงพีกที่ตำแหน่ง 1658 cm^{-1} และ 1653 cm^{-1} ของหมู่ amide I และที่ตำแหน่ง 1542 cm^{-1} ของหมู่ amide II เมื่อเพิ่ม

อุณหภูมิขึ้นเป็น 120 องศาเซลเซียส มีการแสดงตำแหน่งของพีคที่ 1627 cm^{-1} และ 1523 cm^{-1} ของหมู่ amide I และหมู่ amide II ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างแบบ β -sheet plate ดังภาพที่ 4 ดังนั้นการอบผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส จะทำให้ผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิจากโครงสร้างแบบ Silk I ไปเป็นแบบ Silk II ส่งผลทำให้ผงไฟโบรอินที่เตรียมได้มีความสามารถในการละลายน้ำลดลงหรือละลายน้ำได้ยากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2001) ที่พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินเมมเบรนจากโครงสร้างแบบ Silk I ไปเป็นโครงสร้างแบบ Silk II



ภาพที่ 4 โครงสร้างทุติยภูมิของผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้ในช่วงอุณหภูมิ 60-120 องศาเซลเซียส

3.8 การศึกษาสมบัติการละลาย scavenging activity ปริมาณโปรตีนและปริมาณเถ้า

จากการศึกษาสมบัติการละลายของผงไฟโบรอินชนิดต่าง ๆ โดยพิจารณาจากค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม (276 nm) ของสารละลายไฟโบรอินในตัวทำละลายที่เป็นน้ำกลั่น (มีพีเอชประมาณ 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง ภายหลังจากการนำผงไฟโบรอินแช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง และนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้โดยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละการละลายโดยใช้สมการของ Li et al. (2003) การตรวจหา Scavenging activity ตลอดจนการตรวจหาปริมาณโปรตีนและปริมาณเถ้าของผงไฟโบรอินไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้โดยวิธีการต่าง ๆ ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3 ดังนี้คือ

ตารางที่ 3 ร้อยละการละลายของผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสที่เตรียมได้ด้วยวิธีต่าง ๆ

ชนิดของผงไฟโบรอิน	ค่าเฉลี่ยร้อยละการละลาย	Scavenging activity (%)	ค่าเฉลี่ยของร้อยละโปรตีน	ค่าเฉลี่ยร้อยละเถ้า
Hydrolysate fibroin powder-A	79.57	26	80.1	1.13
Hydrolysate fibroin powder-B	76.85	22	78.6	1.84
Hydrolysate fibroin powder-C	70.64	18	72.7	0.91

การละลายของผงไฟโบรอินที่เตรียมได้โดยวิธีการต่าง ๆ มีค่าการละลาย ที่มากกว่าร้อยละ 70 ซึ่งการเตรียมไฟโบรอินไฮโดรไลเซสจากการใช้ตัวทำละลายเกลือ และการทำให้สารละลายไฟโบรอินมีความบริสุทธิ์ขึ้นทั้งกระบวนการไดอะไลซิสด้วยระบบแบบต่อเนื่อง (Hydrolysate fibroin powder-A) และการใช้วิธีเจลฟิวเรชัน (Hydrolysate fibroin powder-B) มีค่าร้อยละการละลายได้ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องสูงกว่าร้อยละ 75 ซึ่งสูงกว่าผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสที่เตรียมโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส (Hydrolysate fibroin powder-C) ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากการใช้สารละลายเกลือในการทำละลายผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ ทำให้สายโซ่โปรตีนของไฟโบรอินมีขนาดเล็กลงกว่าการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย เนื่องจากไฟโบรอินเป็นโมเลกุลไบโอพอลิเมอร์ประกอบด้วยกรดอะมิโนมาต่อกันเป็นสายโซ่ยาว การใช้สารละลายเกลือผสมจึงทำให้เกิดการตัดพันธะได้มากกว่าการใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับบางตำแหน่งเท่านั้น ดังนั้นจึงทำให้ผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสที่ได้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่า

4. สรุปผลและอภิปรายผล

การเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำ โดยการใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายเกลือผสมระหว่าง CaCl_2 : EtOH : H_2O (1:2:8) มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำละลายที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ซึ่งหากเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากเศษไหมหรือปุ๋ยไหมโดยตรงพบว่ามีความสะดวกและความง่ายในการเตรียมสารละลายไฟโบรอินเพิ่มขึ้นอย่างมาก การเตรียมสารละลายไฟโบรอินโดยการหมักด้วยเอนไซม์โปรติเอสพบว่าการใช้เวลาในการหมักประมาณ 1 อาทิตย์ จะมีปริมาณของสารไฟโบรอินที่ละลายอยู่ในสารละลายประมาณ 12 mg/ml ซึ่งยังถือว่าวิธีการหมักด้วยสารละลายเอนไซม์โปรติเอสนี้ ยังทำให้ได้ปริมาณของไฟโบรอินที่ละลายน้ำได้น้อยมาก

การทำให้สารละลายไฟโบรอินบริสุทธิ์ขึ้นจากตัวทำละลายเกลือ CaCl_2 โดยกระบวนการไดอะไลซิสด้วยระบบการไหลแบบต่อเนื่องนาน 24 ชั่วโมง ทำให้สารละลายไฟโบรอินที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นมากใกล้เคียงกับสารละลายไฟโบรอินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีการไดอะไลซิสแบบเดิม จึงช่วยทำให้ประหยัดระยะเวลาและน้ำกลั่นที่ใช้ใน และมีต้นทุนในการดำเนินการที่ถูกกว่าการไดอะไลซิสแบบเดิมสำหรับการทำให้สารละลายไฟโบรอินบริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีเจลฟิวเรชันนั้น ควรทำการเก็บแฟกชันของสารละลายไฟโบรอินในช่วงระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้มีเกลือตัวทำละลายปนเปื้อนอยู่น้อยที่สุด

แต่ทั้งนี้สารละลายไฟโบรอินที่ได้เมื่อนำไปทำให้เป็นผงแล้วยังได้ในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นวิธีการเจลฟิวเทรชันนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในระดับที่ต้องการปริมาณของผงไฟโบรอินมาก ลักษณะสัณฐานวิทยาของผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสที่เตรียมด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีลักษณะคล้ายแผ่น (sheet-like) ในระดับไมโครเมตร มีโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิเป็นแบบ Silk I (random coil and α -helix) ในขณะที่ผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำมีโครงสร้างแบบ Silk II (β -sheet plate) มีค่าการละลายมากกว่าร้อยละ 70 โดยการอบผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส จะทำให้ผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิเป็นแบบ Silk II ซึ่งจะ ทำให้ผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสมีสมบัติที่เปลี่ยนไปจากเดิม ผงไหมไฟโบรอินไฮโดรไลเซสที่เตรียมได้มีร้อยละสคาเวนจิงแอกทิวิตีที่แสดงถึงความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์โดยมีค่าสูงกว่าร้อยละ 18 โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสที่เตรียมได้มีมากกว่าร้อยละ 72 และมีปริมาณเถ้าอยู่น้อยกว่าร้อยละ 2 ดังนั้นผงไฟโบรอินไฮโดรไลเซสที่เตรียมได้จึงคาดว่าจะสามารถนำไปใช้สำหรับการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอางได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยใคร่จะขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย และบริษัทจุลไหมไทย จังหวัดเพชรบูรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยไหม

6. เอกสารอ้างอิง

- ชิดชัย ปัญญาสวรรค์ และพิลาณี ไวณอมสัตย์. (2549). การผลิตผงไหมชนิดละลายได้ในน้ำจากไหมหม่อนพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1. รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ปิยรัตน์ มุลศรี. (2551). การเตรียมผงไฟโบรอินชนิดไม่ละลายน้ำระดับไมโครเมตร-นาโนเมตร จากปุ๋ยไหม. เพชรบูรณ์ : มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.
- ปิยรัตน์ มุลศรี. (2551). การผลิตผงไหมต้นทุนต่ำเพื่อการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์. เครือข่ายการวิจัยภาคเหนือตอนล่าง สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา. พิษณุโลก : มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- สถาบันวิจัยไหมไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติฯ กรมวิชาการเกษตร. (2548). การผลิตผงไหม. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. [Online]. Available from: <http://www.moac.go.th/builder/mu/index.php?page=415&clicksub=415&sub=442> [9 ตุลาคม 2550]
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., & Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterial*, 24, pp.401-409.
- Chen, X., Shao, Z., Marinkovic, N. S., Miller, L. M., Zhou, P., & Chance, M. R. (2001). Conformation transition kinetics of regenerated Bombyx mori silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Biophys. Chem*, 89, pp.25-34.

- Dash, R., Mukherjee, S., & Kundu, S. C. (2006). Isolation purification and characterization of silk protein sericin from cocoon peduncles of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 38, pp.255-258.
- Freddi, G., Mossotti, R., & Innocenti, R. (2003). Degumming of silk fabric with several protease. *J. Biotechnol.*, 106, pp.101-112.
- Li, M., Tao, W., Lu, S., & Kuga, S. (2003). Complicant film of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin by chemical crosslinking. *Int. J. Biol. Macromol.*, 32, pp.159-163.
- Moonsri, P., Watanesk, S., Watanesk, R., Niamsup, H., & Deming, R.L. (2008). Fibroin membrane preparation and stabilization by polyethylene glycol diglycidyl ether. *J. Appl. Polym. Sci.*, 108, pp.1402-1406.
- Um, I.C., Kweon, H. Y., Kwang, G. L., and Park, Y. H. (2003). The role of formic acid in solubility and crystallization of silk protein polymer. *Int. J. Biol. Macromol.* 33: pp.203-213.
- Wu, J. -H., Wang, Z., Xu, S. -Y. (2007). Preparation and characterization of sericin powder extract from silk industry wastewater. *Food. Chem.*, 103, pp.1255-1262.
- Yamada, H., Nakao, H., Takasu, Y., & Tsubouchi, K. (2001). Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Mat. Sci. Eng.*, 14, pp. 41-46.
- Yeo, J.-H., Lee, K.-G. Lee, Y.-W., & Kim, S. Y. (2003). Simple preparation and characteristics of silk fibroin microsphere. *Europ. Polym. J.*, 39, pp.1195-1199.