

ปริมาณโปรตีน สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกาไหมที่สกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ

Protein Content, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Sericin

Extracted by Various Methods

วิชุดา จันทรข้างแรม¹ และ สุนทรต์ ชูลักษณ์^{2*}

Wichuda Jankangram¹ and Sunthorn Chooluck^{2*}

¹คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

²ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

¹Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sakaeo Campus

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University

*E-mail: sunthornc@buu.ac.th

Received: Jun 18, 2022

Revised: Sep 19, 2022

Accepted: Sep 23, 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีน และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกาไหมที่สกัดจากไหมพันธุ์ลูกผสม (*Bombyx mori*) ด้วยวิธีการสกัดต่าง ๆ ในการศึกษานี้ใช้วิธีการสกัด 3 วิธี คือ การสกัดด้วยน้ำกลั่น การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และการสกัดด้วยสารละลายขี้เถ้าที่เหลือจากการเผาข้าวหลาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เป็นเวลา 30 นาที มีร้อยละของการลอกกาไหม (%Degumming) ที่มากที่สุด คือ ร้อยละ 25.483±4.039 จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay พบว่ากาไหมที่สกัดได้จากการสกัดด้วยสารละลายขี้เถ้า เป็นเวลา 30 นาที มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (164.073 ± 0.059 mg/g dry weight) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารฟลาโวนอยด์แสดงให้เห็นว่ากาไหมที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เป็นเวลา 30 นาที มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (428.254 ± 0.099 mg gallic acid equivalent/g dry weight) และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (7.435 ± 0.029 mg quercetin equivalent/g dry weight) สูงที่สุด จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect และวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay กาไหมที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เป็นเวลา 90 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่ากาไหมที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 90 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้อาจมีประโยชน์ต่อการสกัดและการนำกาไหมไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง วิศวกรรมเนื้อเยื่อ และชีวการแพทย์

คำสำคัญ: กาไหม ปริมาณโปรตีน สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

This research aimed to determine protein content and content of bioactive compounds and to study antioxidant activity of sericin extracted from hybrid mulberry silk (*Bombyx mori*) by various extraction methods. In this study, 3 extraction methods were used which were extraction with distilled water, extraction with sodium carbonate solution and extraction with ash solution preparing from waste materials left from Khao-Larm processing. The results showed that the extraction with sodium carbonate solution for 30 min had the highest percentage of sericin recovery (%Degumming) which was 25.483±4.039%. From protein content analysis by Bradford assay, it was found that sericin extracted with ash solution for 30 min contained the highest amount of

protein (164.073 ± 0.059 mg/g dry weight). The analysis of total phenolic and flavonoid contents showed that sericin extracted with sodium carbonate solution for 30 min contained the highest amount of total phenolic content (428.254 ± 0.099 mg gallic acid equivalent/g dry weight) and flavonoid content (7.435 ± 0.029 mg quercetin equivalent/g dry weight). From antioxidant activity analysis, when ABTS decolorization scavenging effect method and Potassium ferricyanide reducing power assay method were used, sericin extracted with sodium carbonate solution for 90 min was found to exhibit the highest antioxidant activity. However, when DPPH radical scavenging assay was used, sericin extracted with distilled water for 90 min was found to exhibit the highest antioxidant activity. The data obtained from this study might be useful for the extraction and application of sericin in the food industry, cosmetic, tissue engineering and biomedicine.

Keywords: Sericin, Protein content, Bioactive compounds, Antioxidant activity

1. บทนำ

เซรีซิน (Sericin) หรือกาไหมเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ผลิตโดยหนอนไหม ที่ล้อมรอบและและยึดเส้นใยไฟโบรอินทั้ง 2 เส้นเข้าด้วยกัน มักพบในของเสียจากอุตสาหกรรมสิ่งทอเนื่องจากต้องลอกกาไหมออกเพื่อให้เส้นไหมมีความมันวาวและเรียบเนียน จึงถูกทิ้งให้สูญเปล่าโดยไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ แต่จากการศึกษาพบว่าเซรีซินมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่มีประโยชน์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในวงการวิทยาศาสตร์และสามารถนำไปเพิ่มมูลค่าทางการค้าได้ เนื่องจากกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในกาไหมมีหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้วสูงอยู่มาก เช่น $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$ ทำให้สามารถรวมตัวกับพอลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymers) ชนิดต่าง ๆ ได้ดี และการที่มีสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) รงควัตถุ (Pigments) ต่าง ๆ แทรกอยู่ในชั้นของเซรีซิน รวมถึงมีกรดอะมิโนเซอรีน (Serine) และ ทรีโอนีน (Threonine) อยู่สูง ทำให้เซรีซิน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) กับร่างกายของมนุษย์ ฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase และ elastase เซรีซินจึงสามารถนำไปต่อยอดใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและทางการแพทย์ได้ [1]-[5]

การสกัดเซรีซินสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น การสกัดด้วย 75% ethanol แล้วนำไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อให้ได้เซรีซินแบบผง และวิธีที่นิยมใช้คือการสกัดด้วยการต้มน้ำ แล้วใช้ด่างหรือกรดมาช่วย [6] ในปัจจุบันพบว่าการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate solution) ให้ผลผลิตที่สูง แต่ยังมีการพัฒนาต่อไปเพื่อหาสภาวะสกัดที่เหมาะสมมากที่สุด [7] การสกัดด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ Calcium hydroxide solution) มีข้อดีคือสามารถนำเซรีซินทั้งหมดกลับมาใช้ได้ด้วย

การทำให้เป็นกลางก่อนด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) นอกจากนี้เซรีซินที่ได้จากการสกัด ยังมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ที่ดีด้วย วิธีนี้จึงนิยมนำไปใช้ในการผลิตชีวเภสัชภัณฑ์เครื่องสำอางและอาหารเพื่อสุขภาพ [8] นอกจากนี้กาไหมที่สกัดได้จากไหมแต่ละสายพันธุ์ ก็มีองค์ประกอบที่แตกต่างกันไปทั้งชนิดและปริมาณของโปรตีนและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกาไหมที่สกัดจากไหมพันธุ์ลูกผสม (*Bombyx mori*) ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี คือ การสกัดด้วยน้ำกลั่น การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และการสกัดด้วยสารละลายซีเถ้าที่เหลือจากการเผาข้าวหลาม ซึ่งเป็นการใช้สารจากธรรมชาติ หาได้ง่าย ราคาถูก และเป็นวัสดุเหลือจากขบวนการเผาข้าวหลามที่เป็นผลิตภัณฑ์จากวิสาหกิจชุมชน

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมสารสกัดจากรังไหม

ใช้ตัวอย่างรังไหมพันธุ์ลูกผสมระหว่างไหมพันธุ์ไทยแท้และไหมพันธุ์สกอตแลนด์ที่ได้จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ สกอตแลนด์ นำรังไหมมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 0.5 เซนติเมตร และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น ชั่งไหม 0.5 กรัม แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น วิธีต้มด้วย 0.2% (w/v) สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต วิธีต้มด้วยสารละลายซีเถ้าที่เหลือจากการเผาข้าวหลาม (ซีเถ้า 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) ที่ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที เมื่อครบเวลานำสารตัวอย่างกาไหมที่สกัดได้มากรองด้วย Whatman filter paper

จากนั้นเก็บสารตัวอย่างกาวยางใหม่ที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

2.2. การคำนวณร้อยละของการลอกกาวยางใหม่ (%Degumming)

นำยางที่เหลือจากการต้มด้วยน้ำกลั่น สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และสารละลายซีเฝ้าที่เหลือจากการเผาข้าวหลาม ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำยางที่อบแห้งแล้วออกมาชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณหาร้อยละของการลอกกาวยางใหม่

2.3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

นำสารตัวอย่างกาวยางใหม่ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมกับ Bradford solution ปริมาตร 1200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น Blank และใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน [9] จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารตัวอย่างกาวยางใหม่ 1 กรัม จากสูตร

$$C = cV/g$$

เมื่อ

C = ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ต่อน้ำหนักแห้งยางใหม่ 1 กรัม)

c = ปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

V = ปริมาตรรวมของสารสกัดกาวยางใหม่

g = น้ำหนักของยางใหม่ที่นำมาสกัด

2.4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

สารตัวอย่างกาวยางใหม่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ น้ำกลั่นปริมาตร 1,580 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's phenol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 20% (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น Blank และใช้ Gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน [10]

2.5. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Aluminium chloride colorimetric assay)

นำสารตัวอย่างกาวยางใหม่ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกับ 2% (w/v) สารละลายอลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น Blank และใช้ Quercetin เป็นสารละลายมาตรฐาน [11]

2.6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

เตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ละลายใน Ethanol เก็บให้พ้นแสง จากนั้นเติมสารตัวอย่างกาวยางใหม่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลายที่ใช้สกัดอีก 500 ไมโครลิตร ให้มีปริมาตรรวม 1000 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ Ethanol เป็น Blank [12] นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Vitamin C และนำไปคำนวณค่า % Inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลองที่มีกาวยางใหม่สกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ

2.7. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

เตรียมสารละลาย ABTS โดยเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ละลายในน้ำกลั่นผสมกับ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ละลายในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:1 เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้สารละลาย ABTS ก่อนนำไปใช้ต้องเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 ± 0.02 วิเคราะห์ความสามารถในการ

ต้านอนุมูลอิสระ โดยเติมสารตัวอย่างกากไหม 50 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แล้วเติม ABTS 1500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ Ethanol เป็น Blank [13] นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Vitamin C และนำไปคำนวณค่า % Inhibition ดังที่กล่าวมาข้างต้น

2.8. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay

นำสารตัวอย่างกากไหม 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ pH 6.6 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) ความเข้มข้น 1% (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) ความเข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบน 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ความ

เข้มข้น 0.1% (w/v) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมเป็น Blank [14] นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Vitamin C

3. ผลการวิจัย

3.1. ปริมาณร้อยละของการลอกกากไหม

จากผลการทดลองพบว่า ร้อยละของการลอกกากไหม (%Degumming) ด้วยวิธีการต่าง ๆ มีค่าอยู่ระหว่าง 1.81-21.59 โดยการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เป็นเวลา 30 นาที มีร้อยละของการลอกกากไหม (%Degumming) ที่มากที่สุด คือ ร้อยละ 25.483±4.039 (Table 1)

3.2. ปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างกากไหมที่สกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ แสดงใน Table 2 พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของกากไหมมีค่าอยู่ที่ประมาณ 24.952 ± 5.948 ถึง 346.857 ± 1.429 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และพบว่าเมื่อคิดเป็นปริมาณ 1 กรัม ต่อน้ำหนักแห้งของรังไหม วิธีการต้มด้วยสารละลายซีเฝ้า 30 นาที ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ 164.073 ± 0.059 mg/g dry weight

Table 1 Percentage of sericin recovery (%Degumming) by different extraction methods

Extraction method	Time (min)	Weight of raw silk before extraction (g)	Weight of raw silk after extraction (g)	%Degumming
Extraction with distilled water	30	0.511±0.009	0.472±0.027	7.470±5.211
	60	0.509±0.003	0.485±0.008	4.817±1.545
	90	0.508±0.005	0.498±0.006	1.881±0.955
Extraction with sodium carbonate solution	30	0.513±0.005	0.382±0.020	25.483±4.039
	60	0.511±0.005	0.420±0.006	17.894±1.983
	90	0.508±0.003	0.409±0.008	19.405±1.624
Extraction with ash solution	30	0.507±0.004	0.443±0.005	12.579±1.115
	60	0.509±0.004	0.419±0.002	17.531±1.045
	90	0.507±0.003	0.431±0.004	15.051±1.256

Table 2 Protein content of sericin extracted by different extraction methods

Extraction method	Time (min)	Protein content ($\mu\text{g/mL}$)	Total protein content (mg/mL)	Total protein content (mg/g dry weight)
Extraction with distilled water	30	24.952 ± 5.948	7.642 ± 0.140	15.532 ± 0.073
	60	92.095 ± 5.408	20.681 ± 0.053	40.922 ± 0.061
	90	178.286 ± 6.227	22.260 ± 0.062	44.435 ± 0.041
Extraction with sodium carbonate solution	30	162.571 ± 1.429	54.806 ± 3.460	105.085 ± 0.073
	60	236.857 ± 1.429	59.168 ± 0.130	117.486 ± 0.020
	90	323.429 ± 2.182	44.308 ± 0.108	87.682 ± 0.063
Extraction with ash solution	30	256.857 ± 5.151	83.426 ± 0.047	164.073 ± 0.059
	60	249.714 ± 1.429	49.889 ± 0.062	98.494 ± 0.075
	90	346.857 ± 1.429	47.613 ± 0.075	94.439 ± 0.052

3.3. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารสกัดกาวไหมด้วยวิธีการต่าง ๆ มีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 30.778 ± 4.111 ถึง 326.333 ± 3.819 $\mu\text{g gallic acid equivalent (GAE)/mL}$ และเมื่อคิดเป็นปริมาณต่อ 1 กรัม น้ำหนักแห้งของรังไหม วิธีการต้มด้วยโซเดียมคาร์บอเนต 30 นาที ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ 457.574 ± 0.063 $\text{mg GAE/g dry weight}$ (Table 3)

3.4. ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

ปริมาณฟลาโวนอยด์ในกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ มีค่าอยู่ในช่วง 20.932 ± 0.819 ถึง 182.447 ± 1.612 $\mu\text{g quercetin equivalent (QE)/mL}$ และเมื่อคิดเป็นปริมาณต่อ 1 กรัม น้ำหนักแห้งของรังไหม วิธีการต้มด้วยโซเดียมคาร์บอเนต 30 นาที ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 8.230 ± 0.013 $\text{mg QE/g dry weight}$

3.5.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระศึกษาด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

สารสกัดกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 0.931 ± 0.172 ถึง $7.822 \pm$

0.044 $\mu\text{g vitamin C equivalent (VCE)/mL}$ โดยสารสกัดกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วยน้ำกลั่น 90 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ 7.822 ± 0.044 $\mu\text{g VCE/mL}$ (Table 5)

3.6. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระศึกษาด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

สารสกัดกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 2.018 ± 0.059 ถึง 18.390 ± 0.139 $\mu\text{g VCE/mL}$ โดยสารสกัดกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 90 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ 18.390 ± 0.139 $\mu\text{g VCE/mL}$ (Table 6)

3.7. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระศึกษาด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay

จากการทดลองพบว่าสารสกัดกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 90 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ 123.487 $\mu\text{g VCE/mL}$ (Figure 1)

Table 3 Phenolic content in sericin extracted by different extraction methods

Extraction method	Time (min)	Phenolic content (µg GAE/mL)	Total phenolic content (mg GAE/mL)	Total phenolic content (mg GAE/g dry weight)
Extraction with distilled water	30	30.778 ± 4.111	38.396 ± 0.086	76.587 ± 0.060
	60	43.278 ± 2.546	38.889 ± 0.079	77.103 ± 0.052
	90	66.333 ± 0.833	33.159 ± 0.051	66.078 ± 0.049
Extraction with sodium carbonate solution	30	176.889 ± 3.469	229.904 ± 0.051	457.574 ± 0.063
	60	225.500 ± 1.443	225.502 ± 0.008	447.292 ± 0.044
	90	318.556 ± 4.739	175.215 ± 0.027	346.110 ± 0.064
Extraction with ash solution	30	167.722 ± 2.546	218.109 ± 0.072	428.254 ± 0.099
	60	241.889 ± 3.938	193.487 ± 0.057	381.901 ± 0.015
	90	326.333 ± 3.819	179.460 ± 0.047	335.597 ± 0.028

Table 4 Flavonoid content in sericin extracted by different extraction methods

Extraction method	Time (min)	Flavonoid content (µg QE/mL)	Total flavonoid content (mg QE/mL)	Total flavonoid content (mg QE/g dry weight)
Extraction with distilled water	30	20.932 ± 0.819	0.843 ± 0.037	1.707 ± 0.029
	60	34.492 ± 0.572	1.050 ± 0.058	2.053 ± 0.048
	90	26.689 ± 1.050	0.438 ± 0.027	0.883 ± 0.008
Extraction with sodium carbonate solution	30	95.477 ± 0.227	4.082 ± 0.068	8.230 ± 0.013
	60	118.508 ± 0.473	3.946 ± 0.018	7.822 ± 0.016
	90	159.492 ± 1.513	2.919 ± 0.017	5.693 ± 0.116
Extraction with ash solution	30	87.295 ± 0.787	3.744 ± 0.074	7.435 ± 0.029
	60	106.386 ± 1.041	2.818 ± 0.017	5.539 ± 0.115
	90	182.447 ± 1.612	3.336 ± 0.021	6.641 ± 0.038

Table 5 Antioxidant activity determined by DPPH radical scavenging assay of sericin extracted by different extraction methods

Extraction method	Time (min)	Antioxidant activity ($\mu\text{g VCE/mL}$)	% Inhibition
Extraction with distilled water	30	5.891 ± 0.184	47.180 ± 1.409
	60	7.217 ± 0.115	57.338 ± 0.882
	90	7.822 ± 0.044	61.973 ± 0.337
Extraction with sodium carbonate solution	30	1.764 ± 0.011	15.568 ± 0.083
	60	1.670 ± 0.013	14.846 ± 0.096
	90	1.268 ± 0.006	11.765 ± 0.048
Extraction with ash solution	30	1.626 ± 0.031	14.513 ± 0.240
	60	1.445 ± 0.017	13.125 ± 0.127
	90	0.931 ± 0.172	9.184 ± 1.317

Table 6 Antioxidant activity determined by ABTS decolorization scavenging effect of sericin extracted by different extraction methods

Extraction method	Time (min)	Antioxidant activity ($\mu\text{g VCE/mL}$)	% Inhibition
Extraction with distilled water	30	2.018 ± 0.059	7.789 ± 0.305
	60	2.302 ± 0.095	9.265 ± 0.491
	90	2.420 ± 0.034	9.876 ± 0.176
Extraction with sodium carbonate solution	30	14.253 ± 0.106	71.317 ± 0.551
	60	15.488 ± 0.281	77.731 ± 1.457
	90	18.390 ± 0.139	92.799 ± 0.722
Extraction with ash solution	30	12.910 ± 0.162	64.343 ± 0.841
	60	15.665 ± 0.206	78.647 ± 1.069
	90	18.067 ± 0.236	91.119 ± 1.225

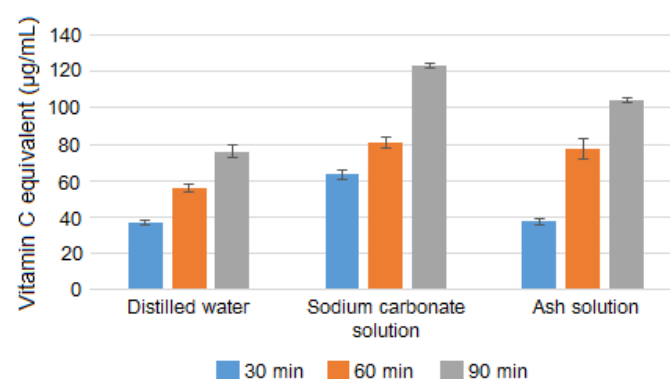


Figure 1 Antioxidant activity determined by potassium ferricyanide reducing power assay of sericin extracted with distilled water, sodium carbonate solution and ash solution

4. อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกาไหมที่สกัดจากไหมพันธุ์ลูกผสม (*Bombyx mori*) ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี คือ การสกัดด้วยน้ำกลั่น การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และการสกัดด้วยสารละลายซีเถ้าที่เหลือจากการเผาข้าวหลาม เป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที เมื่อทำการวัดปริมาณที่ได้ เพื่อนำมาคำนวณหาร้อยละของการลอกกาไหม (%Degumming) จาก Table 1 พบว่าเมื่อใช้เวลาในการสกัด 30 นาที สารสกัดหยาบตัวอย่างกาไหมที่ต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต มีร้อยละของการลอกกาไหม มากที่สุด คือ 21.59 และเมื่อใช้เวลาในการสกัด 90 นาที สารสกัดหยาบตัวอย่างกาไหมที่ต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต มีร้อยละของการลอกกาไหม 17.85 ซึ่งมากกว่าสารสกัดหยาบตัวอย่างกาไหมที่ต้มด้วยสารละลายซีเถ้าและน้ำกลั่น ส่วนที่เวลา 60 นาที สารสกัดหยาบตัวอย่างกาไหมที่ต้มด้วยสารละลายซีเถ้า มีร้อยละของการลอกกาไหม 16.45 ซึ่งมีร้อยละของการลอกกาไหมมากกว่าการสกัดสารตัวอย่างกาไหมอีก 2 วิธี แต่มีความแตกต่างจากการต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เพียงแค่ร้อยละ 0.19 จะเห็นได้ว่าการใช้สารละลายซีเถ้าในการลอกกาไหมไม่เพียงมีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างจากสารละลายต่างที่ใช้กันทั่วไปในอุตสาหกรรมสิ่งทอเท่านั้น หากยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมพร้อมทั้งเป็นการนำเอาของเสียจากกระบวนการผลิตข้าวหลามซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์อีกด้วย

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ในสารสกัดหยาบตัวอย่างกาไหม จาก Table 2 เมื่อทำการสกัดกาไหมเป็นเวลา 30 และ 90 นาที พบว่าสารสกัดหยาบตัวอย่างกาไหมที่ได้จากวิธีการต้มด้วยสารละลายซีเถ้ามีปริมาณโปรตีนมากที่สุดใน 2 ช่วงเวลาที่ทดสอบ เมื่อเทียบกับการต้มด้วยน้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต คือ 164.005 mg/g dry weight และ 94.497 mg/g dry weight เมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 30 และ 90 นาทีตามลำดับ เซรีนเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี เพราะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ชอบน้ำอยู่สูง เมื่อเซรีนละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว หรือถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease หรือผ่านกระบวนการ hydrolysis ด้วยสารละลายกรดหรือด่าง ขนาดของเซรีนที่ได้เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับหลากหลายปัจจัยเช่น อุณหภูมิ pH และ เวลาที่ใช้ใน

การสกัด วิธีการสกัด รวมไปถึงสายพันธุ์ของหนอนไหมที่นำมาสกัดด้วย [15]

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดกาไหม จะเห็นได้ว่า เมื่อทำการสกัดกาไหมเป็นเวลา 30 และ 60 นาที พบว่าสารสกัดหยาบตัวอย่างกาไหมที่ได้จากวิธีการต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดกาไหมที่ได้จากวิธีการต้มด้วยสารละลายซีเถ้าและน้ำกลั่น คือ 457.623 mg GAE/g dry weight และ 447.332 mg GAE/g dry weight ตามลำดับ แต่ที่เวลา 90 นาทีพบว่าสารสกัดกาไหมที่ได้จากวิธีการต้มด้วยสารละลายซีเถ้า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ 355.624 mg GAE/g dry weight

การทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกาไหม เมื่อทำการสกัดกาไหมเป็นเวลา 30 และ 60 นาที สารสกัดกาไหมที่ได้จากวิธีการต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ 8.234 mg QE/g dry weight และ 7.836 mg QE/g dry weight ตามลำดับ แต่ที่เวลา 90 นาที สารสกัดหยาบตัวอย่างกาไหมที่ได้จากวิธีการต้มด้วยสารละลายซีเถ้ามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากกว่าการต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเพียงเล็กน้อย

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนเซรีน นอกจากเป็นผลของสาร Polyphenols และฟลาโวนอยด์ที่พบอยู่ในสารสกัดกาไหมแล้ว ในโครงสร้างของเซรีนที่มีกรดอะมิโนในกลุ่ม Hydrophilic amino acids เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 76% ก็มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยมีรายงานว่ากรดอะมิโน Serine และ Threonine ที่พบมากในเซรีนทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระโดย หมู่ -OH ของ Serine และ Threonine สามารถไปจับกับธาตุต่าง ๆ เช่น เหล็กหรือทองแดงได้ ส่วนกรดอะมิโนที่มี aromatic ring เป็นองค์ประกอบ เช่น Phenylalanine, Tryptophan และ Tyrosine จะสามารถทำหน้าที่เป็น Electron donors เมื่อเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระต่าง ๆ [16], [17]

5. บทสรุป

การสกัดเซรีนจากกาไหมด้วยวิธีต่าง ๆ คือ การต้มด้วยน้ำกลั่น การต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และการต้มด้วยสารละลายซีเถ้า พบว่า การสกัดเซรีนด้วยการต้มด้วยสารละลายซีเถ้าให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุด แต่ในกรณีของ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect และวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay พบว่าสารสกัดที่ได้จากวิธีต้มด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตให้ค่ามากที่สุด ส่วนในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดหยาบตัวอย่างกาวไหมที่ได้จากวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด กระบวนการลอกกาไหมสามารถทำได้หลากหลายวิธีมากกว่าที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้เป็นการทดลองนำไข่ที่เหลืออกจากกระบวนการเผาข้าวหลามมาใช้ในการสกัด ซึ่งให้ผลได้เทียบเท่ากับการใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และเป็นการลดการปลดปล่อยมลพิษออกสู่สิ่งแวดล้อม

6. References

- [1] Kunz, R.I. and et al. 2016. Silkworm sericin: Properties and biomedical applications. **BioMed Research International**. 2016: 8175701.
- [2] Padamwar, M.N. and Pawar, A. 2004. Silk sericin and its applications: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**. 63: 323-329.
- [3] Chlapanidas, T. and et al. 2013. Sericins exhibit ROS-scavenging, anti-tyrosinase, anti-elastase, and in vitro immunomodulatory activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. 58: 47-56.
- [4] Gupta, D., Chaudhary, H. and Gupta, C. 2015. Sericin-based polyester textile for medical applications. **The Journal of The Textile Institute**. 106(4): 366-376.
- [5] Ahsan, F. and et al. 2018. An insight on silk protein sericin: From processing to biomedical Application. **Drug Research**. 68(6): 317-327.
- [6] Wu, J.H., Wang, Z. and Xu, S.Y. 2007. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. **Food Chemistry**. 103(4): 1255-1262.
- [7] Yun, H. and et al. 2013. Extraction conditions of *Antheraea mylitta* sericin with high yields and minimum molecular weight degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**. 52: 59-65.
- [8] Zhao, Z.L. and Zhang, Y.Q. 2020. Greener degumming production of layered sericin peptides from a silkworm cocoon and their physicochemical characteristics and bioactivities in vitro. **Journal of Cleaner Production**. 261: 121080.
- [9] Zaguri, M. and et al. 2021. Protein quantification in ecological studies: A literature review and empirical comparisons of standard methodologies. **Methods in Ecology and Evolution**. 12(7): 12401-1251.
- [10] Rueangsuksud, P. and Punnongwa, W. 2022. Physicochemical properties and antioxidant activity of Japanese purple sweet potato starch modified by acid and heat treatments. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 24(2): 72-80. (in Thai)
- [11] Chandra, S. and et al. 2014. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2014: 253875.
- [12] Kansing, S. and et al. 2017. Comparison of protein extraction methods and protein pattern. **KKU Science Journal**. 45(1): 128-137. (in Thai)
- [13] Srisorn, P. and et al. 2020. Effect of frozen storage on quality of Chormuang dough contains pregelatinized Hom Nil flour. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 22(3): 92-102. (in Thai)

- [14] El Jemli, M. and et al. 2016. Radical-scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**. 2016: 6392656.
- [15] Zhang, Y.Q. 2002. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. **Biotechnology Advances**. 20(2): 91-100.
- [16] Fan, J.B. and et al. 2009. Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Food Biochemistry**. 33(1): 74-88.
- [17] Kato, N. and et al. 1998. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 62(1): 145-147.