



การสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบกาไหมจากไหมไทยพื้นบ้าน
พันธุ์นางตุ้ย (*Bombyx mori* L.) ด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก
Extraction and Biological Activity of Silk Sericin from Thai Native Silk
(*Bombyx mori* L.) with Macerated Banana Leaves Solution

สุนทรต์ ชูลักษณ์¹ และ วิชุดา จันทรข้างแรม^{2*}

Sunthorn Chooluck¹ and Wichuda Jankangram^{2*}

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

²คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จังหวัดสระแก้ว 27160

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131

²Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo, 20131

*Corresponding Author E-mail: wichudajan@buu.ac.th

Received: 2 November 2022 | Revised: 18 December 2022 | Accepted: 26 December 2022

บทคัดย่อ

ปัจจุบันไหมเป็นที่นิยมเลี้ยงกันเป็นอย่างมากในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและ
เป็นอุตสาหกรรมที่สร้างรายได้สูงให้กับเกษตรกร รังไหมประกอบไปด้วยโปรตีนไฟโบรอิน (fibroin) และเซรีซิน (sericin) โดย
ไฟโบรอินนั้นถูกนำมาทำอุตสาหกรรมสิ่งทอ วิศวกรรมเนื้อเยื่อ และเทคนิคขั้นสูงทางการแพทย์ ส่วนเซรีซินหรือกาไหมนั้น
จะไม่ถูกนำมาใช้ประโยชน์แต่ในปัจจุบันพบว่ากาไหมนั้นมีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมเวชสำอาง ยา อาหาร และ
ทางการแพทย์ เพราะมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีลอกกาไหมโดยหลีกเลี่ยงการใช้
สารเคมีในสภาวะที่รุนแรงและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของไหมไทยพื้นบ้านสายพันธุ์นางตุ้ย (*Bombyx mori* L.) โดยการต้ม
ด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก แล้วนำไปเปรียบเทียบกับวิธีลอกกาไหมด้วยการต้มด้วยน้ำกลั่น การต้มด้วย 0.2% (w/v)
โซเดียมคาร์บอเนต และวิธีการสกัดหยาบด้วยวิธี autoclave ผลการวิจัยพบว่า การสกัดกาไหมด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก
นาน 90 นาทีมีประสิทธิภาพในการลอกกาไหม (% Degumming) เท่ากับร้อยละ 10.47 และมีค่าใกล้เคียงกับน้ำกลั่น
(ร้อยละ 9.50) จากนั้นนำสารสกัดแบบหยาบมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay และวิเคราะห์หาปริมาณ
สารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่าวิธีการสกัดหยาบโดยการต้มด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก นาน 60
นาที มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ 6.293 mg GAE/g DW วิธีการสกัดหยาบโดยการต้มด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก
นาน 30 นาที ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด คือ 10.589 mg GAE/g DW แล้วศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี
ABTS assay และวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay ผลการวิจัยพบว่า ด้วยวิธี ABTS assay การต้มด้วย
สารละลายใบกล้วยหมัก นาน 60 นาที นั้นมีร้อยละการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันสูงสุดที่สุด คือ 77.543 ± 2.240 ส่วนสารสกัด
ด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก นาน 30 นาที มี reducing ability มากที่สุดเทียบเท่าวิตามินซีเข้มข้น 245.651 ± 22.184

($\mu\text{g/ml}$) จะเห็นได้ว่าการลอกกาไหมโดยใช้สารละลายหมักใบกล้วยเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรังไหมได้

ABSTRACT

Sericulture in Thailand has continued to grow steadily, particularly in the North-eastern part. Silk production is one of the major industries that generates substantial income for farmers. Silk cocoon consist of two main proteins, fibroin and sericin. Fibroin has long been utilized in the textile industry and most recently, in tissue engineering as well as in advanced medical techniques. Sericin was previously regards as a silk industrial waste, however, recent findings suggested that sericin possess various bioactive compounds responsible for numerous applications. The objective of the study was to isolate and evaluate the biological properties of bioactive substances from Thai native silk *Bombyx mori* L. using non-chemical approach. The cocoon were extracted with macerated banana leaves (MBL) solution at 100 °C compared with conventional solvents extraction (hot water, sodium carbonate and extraction by autoclave method). The extraction parameters such as extraction time and solvent concentration were optimized. The results revealed that hot water and alkaline extracts showed higher degree of sericin recovery than the alternative green approach. The protein concentrations in all extracts were analyzed using Bradford assay and the total phenolics and flavonoids content in all extracts were determined and the antioxidant capacity were also analyzed based on ABTS assay and Potassium ferricyanide reducing power assay. Results indicated that, MBL extracted for 60 minutes contain highest amount of polyphenols ($6.293 \mu\text{g GAE/ gDW}$) and MBL extracted for 30 minutes has the most flavonoids ($10.589 \text{ mg GAE/g DW}$). The MBL extracted for 60 minutes possesses the highest radical scavenging ability ($77.543 \pm 2.240\%$ inhibition) with ABTS assay. The reducing ability of MBL extracted for 30 minutes appeared to possess maximum reducing power (Vitamin C equivalent = $245.651 \pm 22.184 \mu\text{g/ml}$). The finding of this study suggested that using macerated banana leaves solution for sericin extraction provide alternative method to obtain bioactive compounds that added value to the waste materials from local products.

คำสำคัญ: การสกัด ฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสกัดหยาบกาไหม ไหมไทยพื้นบ้านนางตุ้ย สารละลายใบกล้วยหมัก

Keywords: Extraction, Biological Activity, Silk Sericin, Thai Native Silk, Macerated Banana Leaves Solution

บทนำ

เส้นไหม เป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติที่มีองค์ประกอบหลัก คือ โปรตีนไฟโบรอิน (fibroin) คิดเป็นร้อยละ 60-80 ของน้ำหนักรังไหมทั้งหมด และโปรตีนเซรีซิน (sericin) หรือโปรตีนกาไหมอยู่ร้อยละ 15-35 และส่วนประกอบที่ไม่ใช่เซรีซิน เช่น แร็กซ์ เม็ดสีน้ำตาล และสิ่งเจือปนอื่นๆ อยู่ร้อยละ 1-5 เซรีซินมีปริมาณกรดอะมิโนซีรีน (serine) สูงถึงร้อยละ 30 - 33 ขององค์ประกอบ จึงเป็นที่มาของชื่อ “เซรีซิน” และเซรีซินมีลักษณะเหนียวคล้าย

กาวที่คอยยึดติดเส้นใยไฟโบรอินเข้าด้วยกันจึงนิยมเรียกว่าเป็น “กาวไหม” โดยมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 65-400 kDa กาวไหมจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็นถึง 9 ชนิด (essential amino acids) ซึ่งส่วนใหญ่มีแขนงข้าง (side chain) เช่น หมู่ไฮดรอกซิล หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อะมิโน โดยเฉพาะหมู่ไฮดรอกซิลที่มีปริมาณที่มากจึงทำให้กาวไหมละลายน้ำได้ดี ไหมนั้นถูกนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอย่างมาก การที่จะนำไหมไปทอผ้าไหมได้นั้น ต้องทำการกำจัดกาวไหมออกในกระบวนการที่เรียกว่าการสาวไหมหรือ

การลอกกาวยไหม เพื่อให้ได้เส้นไหมที่นุ่มและเงา โดยมีวิธีการสกัดกาวยไหมหลายวิธี เช่น การต้มด้วยน้ำเดือด การต้มด้วยโซเดียมคาร์บอเนต การต้มด้วยสารละลายกรดหรือด่าง การสกัดด้วยเอนไซม์หรือการสกัดด้วยสารเคมี เป็นต้น ซึ่งปริมาณกาวยไหมที่ได้ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด สายพันธุ์ของหนอนไหม และชนิดของอาหารของหนอนไหม ซึ่งวิธีการสกัดด้วยสารเคมีจะทำให้สามารถลอกกาวยไหมออกมาได้ในปริมาณที่มาก แต่จะมีการเจือปนของสารเคมี ซึ่งต้องนำไปแยกออกก่อนจึงสามารถนำไปใช้งานต่อไปได้ ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีความยุ่งยากและอาจทำได้ไม่หมด จึงนิยมใช้สารละลายอินทรีย์มาสกัดกาวยไหมมากกว่าการใช้สารเคมีเพื่อลดต้นทุน ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Kato et al., 1998; Takasu et al., 2002; Padamwar and Pawar, 2004; Tao et al., 2005; Aramwit et al., 2010; Cao and Zhang, 2016)

จากรายงานจากศึกษาวิจัย การลอกกาวยไหม ด้วยสารละลายอินทรีย์เปรียบเทียบกับวิธีการลอกด้วยสารเคมี เช่น การลอกกาวยไหมด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่เตรียมจากยางมะละกอแห้ง ในสภาวะที่อุณหภูมิ 55 65 75 และ 85 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่มีประสิทธิภาพในการลอกกาวยไหมมากที่สุดคือ ความเข้มข้นของยางมะละกอแห้ง 4% ของน้ำหนักเส้นใย ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในสภาวะที่เป็นกลางเส้นใยไหมที่ได้จะมีความมันเงา ผิวสัมผัสนุ่ม ผิวของเส้นใยไม่ถูกทำลายและไม่มีผลกระทบต่อค่าความแข็งแรงของเส้นไหม นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำยางมะละกอสดในการลอกกาวยไหมได้เช่นเดียวกันกับยางมะละกอแห้ง (นงนุช และกาญจนา, 2551) การลอกกาวยไหมด้วยวัสดุธรรมชาติด้วยซีเถ้าเปลือกนุ่นและซีเถ้าลูกขนุน ในการสกัดเซรีซินจากเส้นไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ-1 โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด พบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ให้ปริมาณเซรีซินมากที่สุด 219.17 และ 177.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการลอกกาวยไหมด้วยน้ำกลั่น เบสลอกกาวยไหมสำเร็จรูป และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต พบว่าการลอกกาวยไหมด้วยสารละลายซีเถ้าเปลือกนุ่น และสารละลายซีเถ้าลูกขนุนให้ปริมาณเซรีซินที่ไม่แตกต่างกันและเซรีซินที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่า เมื่อเทียบกับการลอกกาวยไหมด้วย

สารละลายเบสลอกกาวยไหมสำเร็จรูปและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ธัญพรรณ, 2559)

การศึกษาประสิทธิภาพการลอกกาวยไหมวิธีด้วยสารละลายซีเถ้าจากใบกล้วยและสบู่มাত্রฐานที่ pH 8 9 และ 10 นาน 3 6 และ 9 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ผลการศึกษา สันฐาน สมบัติทางกายภาพของเส้นใยจากภาพแนวยาว และภาพแนวขวางของเส้นใยไหมวิธีที่ผ่านการลอกกาวยไหมด้วยสารละลายซีเถ้าจากใบกล้วยและสบู่มাত্রฐานพบว่า มีการสลายออกของกาวยเซรีซินสารละลายสบู่มাত্রฐานที่ pH 8 นาน 3 วัน มีค่าร้อยละของน้ำหนักที่ลดลงมากที่สุดที่ร้อยละ 36.9 ในขณะที่สารละลายซีเถ้าจากใบกล้วยที่ pH 10 ระยะเวลา 9 วัน มีค่าร้อยละของน้ำหนักที่ลดลงมากที่สุดที่ร้อยละ 67.6 สารละลายซีเถ้าจากใบกล้วยมีการสลายออกของกาวยเซรีซินดีกว่าสารละลายสบู่มাত্রฐาน ค่า pH และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่สารละลายที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการไฮโดรไลซิสของน้ำในสารละลายซีเถ้าจากใบกล้วยภายใต้ภาวะที่เป็นด่างเพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการแยกพันธะเปปไทด์ (ธีรธัช และคณะ, 2553) และการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมเสียสีขาวและรังไหมเสียสีเหลือง ด้วยสารสกัดที่ได้จากต่างของซีเถ้ากล้วยและต่างของซีเถ้าผักโขมหนามโดยเปรียบเทียบกับน้ำกรองและน้ำกลั่น พบว่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที สารที่ใช้ดักสกัดรังไหมเสียสีเหลืองจากสารสกัดของซีเถ้ากล้วย และสารที่ใช้ดักสกัดรังไหมเสียสีขาวจากสารสกัดของซีเถ้าผักโขม สามารถสกัดโปรตีนได้สูงที่สุด (กนกพร และสินินาฏ, 2556)

กาวยไหม มีคุณสมบัติเหมือนโปรตีนทั่วไป ที่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์อย่างเช่น โปรตีเอส หรือโปรตีนเนสเป็นกระบวนการย่อยสลายแบบชีวภาพและจึงเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต จากการวิจัยพบว่า กาวยไหมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Kunz et al., 2016) สามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ทำหน้าที่รวมเม็ดสีที่ผิวหนังส่งผลทำให้ผิวพรรณดูขาวเปล่งปลั่งตามธรรมชาติ (Kato et al., 1998) กาวยไหมคุณสมบัติที่คล้ายเจล กักเก็บความชุ่มชื้นได้ดี (Sasaki et al., 2000) ทำให้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ด้านเวชสำอางและทางการแพทย์ (Jena et al., 2018) อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของที่ไม่ใช้แล้วให้เกิด

ประโยชน์สูงสุดกับเกษตรกรและชุมชน โดยการศึกษาการเพิ่มมูลค่าไหมบ้านและไหมอีรี่ของ สินีนาฏ และกนกพร (2560) เพื่อพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลที่ใช้งานได้ด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์นึ่ง ซึ่งเชริชินจากไหมบ้านสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* และ *E. coli* รวมถึง *Proionibacterium acnes* ที่เป็นเชื้อก่อสิวได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้ได้ง่าย มีต้นทุนต่ำ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สามารถนำไปพัฒนาเป็นแผ่นปิดรักษาสิวต่อไป (สินีนาฏ และกนกพร, 2560) การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สนใจการนำวัตถุดิบที่ได้จากผลพลอยได้ทางการเกษตร ได้แก่ ไบโกล้วย ซึ่งเป็นพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น โตเร็ว ช่วยลดต้นทุนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ทดแทนการใช้สารเคมีในการลอกกาไหมอีกด้วย โดยใช้ตัวอย่างรังไหมไทยสายพันธุ์นางตุ้ยในการลอกกาไหม การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างรังไหมไทยสายพันธุ์นางตุ้ยในการลอกกาไหม และศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำกลั่น Na_2CO_3 น้ำหมักไบโกล้วย และน้ำกลั่นผ่านความร้อนจากหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay และศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay และ Potassium ferricyanide reducing power assay ตามลำดับ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากรังไหม

เตรียมสารสกัดตัวอย่างด้วยการต้ม โดยดัดแปลงจาก Yun et al. (2013) โดยนำรังไหมไทยสายพันธุ์นางตุ้ยจากจังหวัดขอนแก่นมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.2 เซนติเมตรและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งไหม 0.5 กรัม แล้วนำไปสกัดโดยวิธีการต้มในน้ำกลั่น สารละลาย 0.2% Na_2CO_3 และสารละลายไบโกล้วยหมัก 6 วัน ใช้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ต้ม นาน 30 60 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แยกเอาเส้นใยไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำมาชั่งแล้วคำนวณหา

% Degumming ส่วนสารละลายวัดปริมาตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

2. การเตรียมสารละลายไบโกล้วยหมัก 6 วัน

นำไบโกล้วยหมักสี่เขียวตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร นำมาแช่ในน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3 เป็นเวลานาน 6 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บสารละลายที่ได้เพื่อใช้ในการสกัดกาไหม

3. การเตรียมสารสกัดหยาบจากรังไหมด้วยการใช้ autoclave

เตรียมสารสกัดตัวอย่างในน้ำกลั่น สารละลาย 0.2% Na_2CO_3 และสารละลายไบโกล้วยหมัก 6 วัน ด้วยวิธีการใช้ autoclave โดยดัดแปลงจากวิธีของ Jena et al. (2018) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง วัดปริมาตรสารละลายแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดด้วยวิธี Bradford assay ดัดแปลงจากวิธีของ Bradford (1976) โดยนำสารสกัดหยาบจากรังไหมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ Bradford reagent (Bio-rad) ที่เจือจาง 5 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาทีและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolics Content)

วิธีการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากรังไหมโดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent และดัดแปลงจากวิธีของ Singleton et al. (1999) โดยใส่สารสกัดหยาบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1,580 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้ Gallic acid ที่เป็นสารละลายมาตรฐาน

6. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

ทำการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric method ที่ดัดแปลงจาก Chandra et al. (2014) โดยนำสารสกัดหยาบจากรังไหมปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมสารละลาย 2% $AlCl_3$ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐาน

7. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay

นำสารสกัดหยาบจากรังไหมปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ pH 6.6 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติม 1% Potassium ferricyanide ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ นาน 20 นาที จากนั้นเติม 10% TCA แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 1,000 rpm นาน 10 นาที นำส่วนใสมา 500 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร เติม 1% Ferric chloride ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน (Jemli et al., 2016)

8. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 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 ก่อนนำไปใช้ต้องเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734

นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 ± 0.02 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเติมสารสกัดหยาบจากรังไหม 50 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แล้วเติม ABTS 1,500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืดนาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน Vitamin C (Re et al., 1999)

9. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation analysis)

ทำการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) เป็นเทคนิคทางสถิติในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป (หรือข้อมูล 2 ชุดขึ้นไป) ว่ามีความสัมพันธ์กันในระดับใด และมีความสัมพันธ์ในทิศทางใด โดยใช้การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) ค่าที่ใช้วัดความสัมพันธ์ เรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) (Pearson's correlation coefficient, 2008)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การคำนวณหาร้อยละของการลอกกาไหม (% Degumming)

เมื่อทำการลอกกาไหมด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่นต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 และต้มด้วยน้ำใบกล้วยหมัก 6 วัน ทำการคำนวณร้อยละของการลอกกาไหมโดยการเปรียบเทียบน้ำหนักของไหมก่อนการลอกกาไหมและน้ำหนักของไหมที่ผ่านการลอกกาไหมแล้ว ได้ร้อยละของการลอกกาไหม ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่ามีร้อยละของการลอกกาไหมประมาณระหว่าง 8.41 - 33.93 โดยการสกัดหยาบด้วย 0.2% Na_2CO_3 ที่เวลา 90 นาที มีร้อยละของการลอกกาไหมมากที่สุด คือ 33.93

ตารางที่ 1 น้ำหนักของไหมที่เหลือจากการสกัดหยาบด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 และต้มด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก 6 วัน

วิธีสกัด	เวลา (นาที)	% Degumming
H_2O	30	8.41
	60	9.50
	90	8.70
0.2% Na_2CO_3	30	33.04

ตารางที่ 1 น้ำหนักของไหมที่เหลือจากการสกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na₂CO₃ และต้มด้วยสารละลายโบกลัวหมัก 6 วัน (ต่อ)

วิธีสกัด	เวลา (นาที)	% Degumming
0.2% Na ₂ CO ₃	60	31.64
	90	33.93
	30	9.97
	60	10.07
	90	10.47
โบกลัวหมัก 6 วัน	30	9.97
	60	10.07
	90	10.47
	30	9.97
	60	10.07

2. การคำนวณปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธี Bradford assay

จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างการไหมที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ แสดงในตารางที่ 2 และตารางที่ 3 พบว่าปริมาณโปรตีนของสารสกัดหยาบจากไหมนางตุ้ยด้วยวิธีต่างๆ อยู่ระหว่าง 4.029 - 46.201 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีการสกัดหยาบด้วย 0.2% Na₂CO₃ ที่เวลา 30 นาที

ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุด คือ 46.201 มิลลิกรัม เมื่อคิดเป็นปริมาณ 1 กรัมต่อน้ำหนักแห้งของรังไหม (g DW = gram of dry weight)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolics Content)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดหยาบจากรังไหมด้วยวิธีต่างๆ แสดงในตารางที่ 4 และตารางที่ 5

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na₂CO₃ และต้มด้วยสารละลายโบกลัวหมัก 6 วัน

วิธีสกัด	เวลา (นาที)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน/รังไหม 1 กรัม (mg/g DW)
H ₂ O	30	12.584 ± 0.242	25.168
	60	11.687 ± 0.370	23.379
	90	2.014 ± 0.033	4.029
0.2% Na ₂ CO ₃	30	23.100 ± 0.994	46.201
	60	18.893 ± 0.581	37.788
	90	14.441 ± 0.892	28.883
โบกลัวหมัก	30	15.376 ± 0.547	30.753
	60	11.924 ± 0.322	23.849
	90	4.452 ± 0.096	8.905

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยน้ำกลั่น 0.2% Na₂CO₃ และโบกลัวหมัก 6 วัน โดยใช้ autoclave

วิธีสกัด	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน/รังไหม 1 กรัม (mg/g DW)
H ₂ O	15.712 ± 0.994	31.426
0.2% Na ₂ CO ₃	18.867 ± 0.700	37.735
โบกลัวหมัก 6 วัน	11.767 ± 0.407	23.536

ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na₂CO₃ และต้มด้วยสารละลายโบกลัวหมัก 6 วัน

วิธีสกัด	เวลา(นาท)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g DW)
H ₂ O	30	2.127 ± 392.500
	60	2.164 ± 572.054
	90	3.485 ± 47.933
0.2% Na ₂ CO ₃	30	19.173 ± 882.219
	60	18.822 ± 1631.958
	90	6.299 ± 535.007
โบกลัวหมัก 6 วัน	30	6.234 ± 771.454
	60	6.293 ± 309.245
	90	2.593 ± 184.789

ตารางที่ 5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยน้ำกลั่น 0.2% Na₂CO₃ และโบกลัวหมัก 6 วัน โดยใช้วิธี autoclave

วิธีสกัด	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g DW)
H ₂ O	7.801 ± 1087.696
0.2% Na ₂ CO ₃	18.398 ± 1865.424
โบกลัวหมัก 6 วัน	15.593 ± 992.898

ผลจากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบจากรังไหมนางดูยที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบจากรังไหม มีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 2.127 - 19.173 mg GAE/g DW โดยวิธีการสกัดด้วยการต้ม 0.2% Na₂CO₃ ที่เวลา 30 นาที ให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ 19.173

mg GAE/g DW

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดหยาบจากรังไหมด้วยวิธีต่างๆ แสดงในตารางที่ 6 และตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na₂CO₃ และต้มด้วยสารละลายโบกลัวหมัก 6 วัน

วิธีสกัด	เวลา (นาท)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g DW)
H ₂ O	30	2.773 ± 167.877
	60	3.077 ± 30.509
	90	1.541 ± 53.791
0.2% Na ₂ CO ₃	30	11.546 ± 122.470
	60	8.116 ± 78.677

ตารางที่ 6 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 และต้มด้วยสารละลายไบกลัยหมัก 6 วัน (ต่อ)

วิธีสกัด	เวลา (นาท)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g DW)
0.2% Na_2CO_3	90	1.982 ± 30.934
ไบกลัยหมัก 6 วัน	30	10.589 ± 29.266
	60	4.940 ± 29.266
	90	2.610 ± 10.186

ตารางที่ 7 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยกลั่น 0.2% Na_2CO_3 และไบกลัยหมัก 6 วัน โดยใช้ autoclave

วิธีสกัด	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g DW)
H_2O	5.489 ± 128.048
0.2% Na_2CO_3	7.498 ± 89.223
ไบกลัยหมัก 6 วัน	8.049 ± 313.674

ผลจากการทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของตัวอย่างกาวไหมนางตู่ที่สกัดหยาบด้วยวิธีต่างๆ พบว่า สารสกัดหยาบกาวไหมมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 1.541-11.546 mg QE/ml of Extract โดยวิธีการสกัดหยาบด้วย 0.2% Na_2CO_3 ที่เวลา 30 นาที มีปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 11.546 mg QE/g DW

5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect ในสาร ตัวอย่างกาวไหมที่สกัดหยาบด้วยวิธีต่างๆ แสดงในตารางที่ 8 และตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น 0.2% Na_2CO_3 และต้มด้วยสารละลายไบกลัยหมัก 6 วัน

วิธีสกัด	เวลา (นาท)	Vitamin C equivalent ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% inhibition
H_2O	30	4.760 ± 0.666	24.081 ± 3.004
	60	7.134 ± 0.464	34.794 ± 2.094
	90	19.592 ± 0.136	91.017 ± 0.615
0.2% Na_2CO_3	30	21.139 ± 0.270	97.998 ± 1.218
	60	21.055 ± 0.291	97.619 ± 1.312
	90	21.271 ± 0.083	98.593 ± 0.375
ไบกลัยหมัก 6 วัน	30	11.703 ± 0.185	55.411 ± 0.833
	60	16.607 ± 0.496	77.543 ± 2.240
	90	16.511 ± 0.436	77.110 ± 1.968

ตารางที่ 9 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ในสารสกัดหยาบที่จากรังไหมสกัดด้วยกลั่น 0.2% Na₂CO₃ และใบกล้วยหมัก 6 วัน โดยใช้ autoclave

วิธีสกัด	Vitamin C equivalent (µg/ml)	% inhibition
H ₂ O	14.676 ± 0.251	68.831 ± 1.136
0.2% Na ₂ CO ₃	21.475 ± 0.072	99.513 ± 0.325
ใบกล้วยหมัก 6 วัน	18.130 ± 0.324	84.416 ± 1.461

ผลจากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect ในสารตัวอย่างจากรังไหมที่สกัดหยาบด้วยวิธีต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบจากรังไหมมีร้อยละของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%inhibition) อยู่ระหว่าง 24.081 - 99.513 โดยวิธีการสกัดหยาบด้วยสารละลาย 0.2% Na₂CO₃ โดยใช้ autoclave มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ 99.513 %

5.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay ในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ แสดงในตารางที่ 10 และตารางที่ 11

ตารางที่ 10 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay ในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na₂CO₃ และต้มด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก 6 วัน

วิธีสกัด	เวลา (นาที)	Vitamin C equivalent (µg/ml)
H ₂ O	30	35.337 ± 0.732
	60	45.129 ± 0.808
	90	69.185 ± 1.929
0.2% Na ₂ CO ₃	30	121.949 ± 2.536
	60	273.593 ± 4.049
	90	41.847 ± 1.051
ใบกล้วยหมัก 6 วัน	30	245.651 ± 2.184
	60	227.337 ± 2.267
	90	102.145 ± 0.783

ตารางที่ 11 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay ในสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยกลั่น 0.2% Na₂CO₃ และใบกล้วยหมัก 6 วัน โดยใช้ autoclave

วิธีสกัด	Vitamin C equivalent (µg/ml)
H ₂ O	90.916 ± 1.491
0.2% Na ₂ CO ₃	350.367 ± 2.747
ใบกล้วยหมัก 6 วัน	168.675 ± 2.153

ผลจากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay ในสารสกัดหยาบจากรังไหมด้วยวิธีต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 35.337-350.367 $\mu\text{g/ml}$ (Vitamin C equivalent) โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลาย 0.2% Na_2CO_3 โดยใช้ autoclave มีร้อยละของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 350.367 $\mu\text{g/ml}$ (Vitamin C equivalent)

6. ความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์เพื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณโปรตีน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS assay และ Potassium ferricyanide reducing power assay ที่ใช้สารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ แสดงในตารางที่ 12 และตารางที่ 13

ตารางที่ 12 ค่าสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson Correlation) ของสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วยน้ำกลั่น นาน 30 60 และ 90 นาที

	phenolic	Flavonoid	ABTS	Reducing power
phenolic	1			
Flavonoid	-0.97757	1		
ABTS	0.9745	-0.90539	1	
Reducing power	0.966187	-0.89022	0.999406	1

ตารางที่ 13 ค่าสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson Correlation) ของสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 นาน 30 60 และ 90 นาที

	phenolic	Flavonoid	ABTS	Reducing power
phenolic	1			
Flavonoid	0.999209	1		
ABTS	0.975424	0.96589	1	
Reducing power	0.749239	0.774984	0.584897	1

จะเห็นได้ว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีความสัมพันธ์ในระดับที่มากกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS ($r = 0.9745$) และ Reducing power assay ($r=0.9662$) แต่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ($r = -0.9776$)

ในกรณีของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์ในระดับที่มาก เมื่อทดสอบด้วยวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ($r = 0.9992$) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS assay ($r = 0.9754$) และมีความสัมพันธ์กันปานกลางกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย Reducing power assay ($r = 0.7492$)

ตารางที่ 14 ค่าสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson Correlation) ของสารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก 6 วัน นาน 30 60 และ 90 นาที

	phenolic	Flavonoid	ABTS	Reducing power
phenolic	1			
Flavonoid	0.715858	1		
ABTS	0.982003	0.83485	1	
Reducing power	0.991403	0.801066	0.998273	1

จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีความสัมพันธ์ในระดับที่มากกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS ($r = 0.9820$) และ Reducing power assay ($r = 0.9914$) แต่มีความสัมพันธ์กันปานกลางกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ($r = 0.7159$)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาวิธีการสกัดโปรตีนจากไหมออกจากเส้นไหมพันธุ์นางตุ้ย โดยหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในสภาวะรุนแรงด้วยวิธีการสกัดต่างๆ คือการต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 และสารละลายใบกล้วยหมัก จะเห็นได้ว่า การลอกกาไหมนางตุ้ยด้วยการต้มกับสารละลายใบกล้วยหมักในช่วงเวลาต่างๆ นั้น เมื่อเทียบกับการสกัดหยาบด้วยการต้มด้วยน้ำกลั่นและต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 จะมีร้อยละการลอกกาไหมแตกต่างกัน โดยพบว่า สารสกัดที่ต้มด้วยน้ำกลั่นและสารสกัดที่ต้มด้วยสารละลายใบกล้วยหมักที่มีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีร้อยละการลอกกาไหมน้อยกว่าการสกัดที่ต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของธัญพรรณ (2559) ที่ศึกษาปริมาณเซรีซินที่ได้จากการใช้เถ้าของเปลือกนุ่นและลูกขนุนในการสกัดเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำกลั่น เบสลอกกาไหมสำเร็จรูปและโซเดียมคาร์บอเนต ซึ่งพบว่าปริมาณเซรีซินที่ได้ไม่แตกต่างกันอีกทั้งยังให้เซรีซินที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่า

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนจากสารสกัดหยาบจากรังไหมด้วยวิธี Bradford การสกัดโดยต้มด้วยน้ำกลั่น ต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 และต้มด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก 6 วัน นาน 30 นาที มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าช่วงเวลาอื่น การสกัดหยาบด้วย 0.2% Na_2CO_3 ที่เวลา 30 นาที พบปริมาณโปรตีนมากที่สุด หากเทียบกับวิธีที่ทำ

ทั้งหมด การต้มด้วยสารละลายใบกล้วยหมักมีปริมาณโปรตีนมากกว่าการสกัดที่ต้มด้วยน้ำกลั่นและมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าการ สกัดที่ต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 (ตารางที่ 2 และ 3)

ผลจากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin - Ciocalteu ของสารสกัดหยาบจากรังไหม พบว่าสารสกัดหยาบจากรังไหมโดยการต้มด้วยน้ำกลั่น นาน 90 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด เมื่อเทียบกับที่ต้มนาน 30 และ 60 นาที และสารสกัดหยาบโดยการต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 นาน 30 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด เมื่อเทียบกับที่ช่วงเวลา 60 และ 90 นาที ส่วนในกรณีสกัดด้วยสารละลายใบกล้วยหมัก 6 วัน ที่ช่วงเวลา 60 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด เมื่อเทียบกับที่ช่วงเวลา 30 และ 90 นาที และสารสกัดหยาบที่ได้จากการต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 นาน 30 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบโดยการต้มด้วยน้ำกลั่นและสารละลายใบกล้วยหมัก 6 วัน แต่สารละลายใบกล้วยหมัก 6 วัน พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดหยาบโดยการต้มด้วยน้ำกลั่น

จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay ของสารสกัดหยาบจากรังไหมพบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากการต้มด้วยน้ำกลั่น นาน 60 นาที มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่าที่เวลา 30 และ 90 นาที การสกัดหยาบที่ได้จากการต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 สารละลายใบกล้วยหมัก 6 วัน ที่เวลา 30 นาที มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่าที่เวลา 60 และ 90 นาที แต่การสกัดด้วย 0.2% Na_2CO_3 มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุด มากกว่าสารสกัดหยาบที่ต้มด้วยน้ำกลั่น และสารสกัด

หยาบที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายโบกัลลัวหมัก 6 วัน แต่สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายโบกัลลัวหมัก 6 วัน มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดหยาบที่ต้มด้วยน้ำกลั่น

มีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพอันหลากหลายของ โปรตีนเซรีซิน รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งนอกจากจะเป็นผลมาจากการทำงานของสาร polyphenols และฟลาโวนอยด์ที่พบอยู่ในสารสกัดจากกาวไหมแล้วนั้น ในโครงสร้างของเซรีซินที่มีกรดอะมิโนในกลุ่ม hydrophilic amino acids เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 76% ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยมีรายงานว่า serine และ threonine ที่พบมากในเซรีซินทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการการต้านอนุมูลอิสระโดย หมู่ OH ของ serine และ threonine สามารถไปจับกับธาตุต่างๆ เช่น เหล็ก หรือทองแดงได้ ส่วนกรดอะมิโนที่มีวงแหวนอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบทำหน้าที่เป็น electron donors เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระต่างๆ (Fan et al., 2009)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีในรูปของ ABTS decolorization scavenging effect พบว่า การสกัดที่ต้มด้วยน้ำกลั่น และต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 นาน 90 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าที่เวลา 30 และ 60 นาที การสกัดหยาบที่ต้มด้วยสารละลายโบกัลลัวหมัก 6 วัน นาน 60 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าที่เวลา 30 และ 90 นาที และ สารสกัดหยาบที่ต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากการต้มด้วยสารละลายโบกัลลัวหมักและต้มด้วยน้ำกลั่น มีค่า %inhibition สูงสุดเท่ากับ 98.593% ซึ่งมีค่าสูงกว่าการสกัดหยาบที่ต้มด้วยสารละลายโบกัลลัวหมัก 6 วัน และการสกัดหยาบที่ต้ม ด้วยน้ำกลั่นตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay พบว่า สารสกัดหยาบโดยการต้มด้วยน้ำกลั่น นาน 90 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าที่เวลา 30 และ 60 นาที สารสกัดหยาบโดยการต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 นาน 60 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าที่เวลา

30 และ 90 นาที ส่วนในกรณีที่ต้มด้วยสารละลายโบกัลลัวหมัก 6 วัน สารสกัดหยาบจากรังไหมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ สารสกัดหยาบโดยการต้มด้วย 0.2% Na_2CO_3 รองลงมาคือสารสกัดหยาบหยาบโดยการต้มด้วยสารละลายโบกัลลัวหมัก 6 วัน และสารสกัดหยาบโดยการต้มด้วยน้ำกลั่น ตามลำดับ

จากการสกัดด้วยน้ำกลั่น 0.2% Na_2CO_3 การสกัดด้วยสารละลายโบกัลลัวหมัก 6 วัน และการสกัดหยาบโดยใช้ autoclave พบว่า การสกัดหยาบด้วยสารละลายโบกัลลัวหมัก 6 วัน มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (8.049 mg QE/g DW) และการสกัดด้วย 0.2% Na_2CO_3 มีปริมาณโปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS และวิธี Potassium ferricyanide reducing power assay สูงที่สุด จะเห็นได้ว่าการสกัดหยาบโดยใช้ autoclave เป็นวิธีการสกัดที่ได้ปริมาณสารสกัดกาวไหมที่สูง แต่ด้วยราคาเครื่องมือที่แพง การใช้งานยุ่งยาก จึงไม่เหมาะสมแก่นำไปใช้กับประชาชนทั่วไป

จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์เพียร์สัน โดยใช้สารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วยน้ำกลั่น พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS และ Potassium ferricyanide reducing power assay แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณประกอบฟลาโวนอยด์ สารสกัดหยาบจากรังไหมที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วยด้วย 0.2% Na_2CO_3 และการต้มด้วยน้ำโบกัลลัวหมัก 6 วัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบรังไหมอาจเป็นกลุ่มของสารประกอบทั้งสองชนิด ซึ่งน่าสนใจในการศึกษา จำแนกชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป

จากการทดลองลอกกาวไหมด้วยการต้มด้วยน้ำกลั่น สารละลาย 0.2% Na_2CO_3 และน้ำโบกัลลัวหมัก หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดหยาบจากรังไหมด้วยวิธี Bradford assay วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เปรียบเทียบความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกาวไหมด้วยวิธี ABTS และ

Potassium ferricyanide reducing power assay จะเห็นได้ว่าการใช้สารละลายไบโกลีวหมักมัลลอกาวไหมนั้นมีประสิทธิภาพในการลอกกาวไหมที่ดีกว่าสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต แต่ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำไปทดสอบวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย 0.2% Na_2CO_3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สูงที่สุด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอีกด้วย ส่วนสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยสารละลายไบโกลีวหมักนั้นจะมีประสิทธิภาพที่รองลงมาแต่จะมีปริมาณสารสำคัญ รวมไปถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่น ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้ มุ่งเน้นไปที่วิธีการสกัดด้วยสารละลายไบโกลีวหมัก 6 วัน ซึ่งเป็นวัสดุทางการเกษตรที่หาได้ง่าย ราคาถูก พบได้ทั่วไปในทุกพื้นที่ของประเทศ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ลดต้นทุนและการลดใช้สารเคมี จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากกาวไหมได้

เอกสารอ้างอิง

- กนกพร พลเยี่ยม และสินีนางู ศิริ. (2556). การสกัดเซรีนจากรังไหม *Bombyx mori* and *Samila Cynthia ricini*. ใน: การประชุมวิชาการการวิจัยเพื่อพัฒนาสังคมไทย “การประชุมหาดใหญ่ ครั้งที่ 4”. มหาวิทยาลัยหาดใหญ่, สงขลา. (43-51).
- ธัญพรรณ อ้อบรรทัด. (2559). ประสิทธิภาพการสกัดเซรีนจากเส้นไหมโดยซีเถ้าเปลือกนุ่นและซีเถ้าลูกขนุน ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ “ราชภัฏวิจัยครั้งที่ 4” (กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์, บุรีรัมย์. (1163-1172).
- ธีรรัช อารมณ์, สาคร ชลธาร และรัตนพล มงคลรัตนสิทธิ์. (2553). ประสิทธิภาพการลอกกาวไหมออร์โดยการแช่รังไหมในสารละลายซีเถ้าจากไบโกลีวและสุบูมาตรฐาน. วารสารวิจัยราชชมงคลกรุงเทพ 14(2): 104-115.
- นงนุช ศศิธร และกาญจนา ลอพงษ์. (2551). การลอกกาวไหมด้วยยางมะละกอ. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร 2(1): 70-75.
- สินีนางู ศิริ และกนกพร พลเยี่ยม. (2560). การเพิ่มมูลค่าไหมบ้านและไหมออร์ด้วยการพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลที่ ใช้งานได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง. รายงานวิจัยสาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- Aramwit, P., Damrongsakkul, S., Kanokpanont, S. and Srichana, T. (2010). Properties and anti tyrosinase activity of sericin from various extraction methods. Biotechnology and Applied Biochemistry 55(2): 91-98.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Analytical Biochemistry 72(1-2): 248-254.
- Cao, T.T. and Zhang, Y.Q. (2016). Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines. Materials Science and Engineering: C 61: 940-952.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M.H., Elsohly, M.A. and Khan, I.A. (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: 1-9.
- Fan, J.B., Wu, L.P., Chen, L.S., Mao, X.Y., and Ren, F.Z. (2009). Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*. Journal of Food Biochemistry 33(1): 74-88.

- Jemli, M.E., Kamal, R., Marmouzi, I., Zerrouki, A., Cherrah, Y. and Alaoui, K. (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 Sciences* 2016: 639-656.
- Jena, K., Pandey, J. P., Kumari, R., Sinha, A.K., Gupta, V.P., and Singh, G.P. (2018). Tasar silk fiber waste sericin: New source for anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-oxidant compounds. *International Journal of Biological Macromolecules* 114: 1102-1108.
- Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N., and Nomura, M. (1998). Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 62(1): 145-147.
- Kunz, R.I., Brancalhão, R.M., Ribeiro, L.F., and Natali, M.R. (2016). Silkworm sericin: Properties and biomedical applications. *Biomed Research International* 2016: 1-19.
- Padamwar, M. and Pawar, A. (2004). Silk sericin and its applications: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 63: 323-329.
- Pearson's Correlation Coefficient. (2008). In Kirch, W. (Eds.) *Encyclopedia of Public Health*. Dordrecht: Springer-Verlag. pp. 1090-1091.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9-10): 1231-1237.
- Sasaki, M., Kato, N., Watanabe, H., and Yamada, H. (2000). Silk protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice. Silk protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Oncology Reports* 7(5): 1049-1052.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Takasu, Y., Yamada, H., Tsubouchi, K. (2002). Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience biotechnology and biochemistry* 66(12): 2715-8
- Tao, W., Li, M., and Xie, R. (2005). Preparation and structure of porous silk sericin materials. *Macromolecular Materials and Engineering* 290(3): 188-194.
- Yun, H., Oh, H., Kim, M.K., Kwak, H.W., Lee, J.Y., Um, L.C. and Lee, K.H. (2013). Extraction conditions of *Antheraea mylitta* sericin with high yields and minimum molecular weight degradation. *International Journal of Biological Macromolecules* 52: 59-65.

