



การสกัดโปรตีนเซรีซินเพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพและความงาม

อรรรรณ วนะชีวิน

วลีพรรณ รกิตกุล

โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และโปรแกรมวิชาเทคโนโลยีเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนสนับสนุนงานวิจัย  
เพื่อการพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย



การสกัดโปรตีนเซรีซินเพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพและความงาม

อรรวรรณ วนะชีวิน

วลีพรรณ รกิติกุล

โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และโปรแกรมวิชาเทคโนโลยีเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนสนับสนุนงานวิจัย  
เพื่อการพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

## บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซินที่มีประสิทธิภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม โดยศึกษาผลของสภาวะต่อเปอร์เซ็นต์ผลผลิต ขนาดของโปรตีนที่สกัดได้ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยใช้ตัวอย่างรังไหมสีทองจากวิสาหกิจชุมชนผู้เพาะเลี้ยงไหม ในจังหวัดเชียงรายเป็นวัตถุดิบหลัก ระเบียบวิธีวิจัยประกอบด้วยการเปรียบเทียบสภาวะการสกัด 8 กรรมวิธี โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น และ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ที่อุณหภูมิ 60 และ 80 °C ระยะเวลา 30 และ 60 นาที ร่วมกับการใช้คลื่นความถี่สูง (Ultrasonication) จากนั้นคัดเลือกสารสกัดที่ได้จากกรรมวิธีที่เหมาะสมมาทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (Bromelain) ความเข้มข้น 5% (w/w) เพื่อลดขนาดโมเลกุลและเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการศึกษาพบว่า สภาวะการสกัดที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือ การใช้สารละลาย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดที่  $20.76 \pm 0.92\%$  และมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำถึง 2 เท่า ( $395.98 \pm 11.60 \mu\text{g/ml}$ ) ผลการวิเคราะห์หมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนเซรีซินที่สกัดได้มีขนาดโมเลกุลหลากหลายทั้งในช่วงของแถบโปรตีนที่มีขนาดมากกว่า 250 ที่ขนาด 100 kDa และขนาดในช่วง 10-25 kDa อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน พบว่าสารสกัดโปรตีนด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด ถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลงกว่า 10 kDa ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมต่อการซึมซาบเข้าสู่ชั้นผิวหนัง นอกจากนี้การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทุติยภูมิอย่างชัดเจนในบริเวณแถบ Amide I และ II ซึ่งบ่งชี้การเปลี่ยนสถานะระหว่างโครงสร้างแบบ beta-sheet และ random coil จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ แม้สารสกัดด้วย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ในสภาวะเริ่มต้นจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารสกัดด้วยสารน้ำ (TEAC = 0.37) แต่การย่อยสารสกัดดังกล่าวด้วยเอนไซม์สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระได้สูงถึง 2.3 เท่า เนื่องจากการเปิดเผยหมู่ฟังก์ชันที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ผู้วิจัยได้นำสารสกัดโปรตีนเซรีซินไปพัฒนาต้นแบบ เซรั่มบำรุงผิวหน้าภายใต้แบรนด์ “Silkéra” โดยใช้สารสกัดเข้มข้น 2.5% สูตรผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงตัวดี มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (pH 6-6.5) มีส่วนผสมที่ช่วยรักษาความชุ่มชื้นของผิว ต้านอนุมูลอิสระได้ดี สรุปได้ว่ากระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซินด้วย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ร่วมกับการใช้อุณหภูมิ 80 °C ภายใต้อัลตราซาวด์ และการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนเป็นแนวทางที่มีศักยภาพสูงในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับรังไหมในท้องถิ่น เพื่อประยุกต์ใช้เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เสริมความงามได้อย่างเป็นรูปธรรม

**คำสำคัญ:** รังไหม, เซรีซิน, การสกัด, การย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน, ผลิตภัณฑ์ความงาม

## Abstract

This research aimed to develop an efficient extraction process for sericin protein for cosmetic applications. The study investigated the effects of extraction conditions on percentage yield, molecular weight distribution, and the development of a prototype product. Golden silk cocoons from a local community enterprise in Chiang Rai province were utilized as the primary raw material. The methods involved comparing eight extraction conditions using two solvents: distilled water and sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) solution, at 60°C and 80°C for 30 and 60 minutes, integrated with ultrasonication. The optimal extract was subsequently subjected to enzymatic hydrolysis using 5% (w/w) bromelain to reduce molecular size and enhance biological activities. The results indicated that the most effective extraction condition was 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  at 80°C for 30 minutes, yielding a maximum of  $20.76 \pm 0.92\%$  and a protein concentration 2-fold higher than aqueous extraction ( $395.98 \pm 11.60 \mu\text{g/ml}$ ). Molecular weight analysis via SDS-PAGE revealed a broad distribution of sericin proteins, ranging from over 250 kDa and 100 kDa to 10–25 kDa. However, following bromelain hydrolysis, the protein extracts from both solvents were reduced to molecular weights below 10 kDa, an optimal size for skin permeation. Furthermore, FTIR functional group analysis demonstrated significant changes in secondary structure within the Amide I and II bands, indicating a transition between beta-sheet and random coil configurations. Regarding antioxidant activity, while the initial 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  extract exhibited lower activity (TEAC = 0.37) compared to the water extract, enzymatic hydrolysis enhanced its efficiency by up to 2.3 times through the exposure of antioxidant functional groups. The hydrolyzed sericin extract was further formulated into a prototype facial serum under the brand “Silkéra” at a 2.5% concentration. The resulting formulation showed good stability, an appropriate pH range (6–6.5), and effective moisturizing and antioxidant properties. In conclusion, the extraction of sericin using 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  at 80°C combined with ultrasonication and bromelain hydrolysis represents a high-potential approach for value-adding to local silk cocoons and practical application in the beauty industry.

**Keywords:** Silk cocoon, Sericin, Extraction, Bromelain hydrolysis, Cosmeceutical products

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับสมบูรณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความรู้และความสนับสนุนอย่างดีจากหลายภาคส่วน คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ กองทุนสนับสนุนงานวิจัยเพื่อการพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ที่ได้อนุมัติงบประมาณสนับสนุนการวิจัย ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การดำเนินงานวิจัยและกระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซินเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพและความงามในครั้งนี้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และโปรแกรมวิชาเทคโนโลยีเคมี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ ห้องปฏิบัติการ รวมถึงเครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ ที่จำเป็นในการวิเคราะห์ข้อมูล และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งส่งผลให้ข้อมูลงานวิจัยมีความถูกต้องและแม่นยำตามหลักวิชาการ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงต่อ กลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เพาะเลี้ยงไหมในจังหวัดเชียงราย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างรังไหมสีทองคุณภาพสูงสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการศึกษา รวมถึงการแบ่งปันองค์ความรู้เกี่ยวกับการผลิตไหมในท้องถิ่น ซึ่งเป็นแรงบันดาลใจสำคัญในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหลือทิ้งเพื่อประโยชน์ของชุมชนอย่างยั่งยืน

ท้ายที่สุดนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ได้สละเวลาให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนเพื่อนร่วมงานที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จของโครงการวิจัยฉบับนี้ คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าองค์ความรู้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมเครื่องสำอางและการพัฒนาท้องถิ่นสืบไป

คณะผู้วิจัย  
เมษายน 2569

## คำนำ

รายงานฉบับสมบูรณ์เรื่อง "การสกัดโปรตีนเซรีซินเพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพและความงาม" ฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมสีทองในท้องถิ่นจังหวัดเชียงราย โดยมุ่งเน้นการค้นหาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณภาพ ขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมต่อการดูดซึม และมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื้อหาภายในรายงานฉบับนี้ประกอบด้วยรายละเอียดสภาวะการทดลองเชิงเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลายต่าง ๆ การใช้คลื่นความถี่สูง (Ultrasonication) และกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อเพิ่มศักยภาพของสารสกัด ตลอดจนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบเซรั่มบำรุงผิวหน้า ซึ่งผลการศึกษาที่ปรากฏในรายงานนี้ไม่เพียงแต่เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเคมีเท่านั้น แต่ยังเป็นการสนับสนุนการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบรังไหมไหมในท้องถิ่น ช่วยยกระดับเศรษฐกิจฐานรากและส่งเสริมอุตสาหกรรมความงามอย่างยั่งยืน

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานภาครัฐ เอกชน นักวิจัย และผู้ที่สนใจ เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการต่อยอดงานวิจัยหรือประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ หากมีข้อชี้แนะประการใด คณะผู้วิจัยขอน้อมรับไว้ด้วยความขอบคุณยิ่ง

คณะผู้วิจัย  
เมษายน 2569

## สารบัญ

|                                                                                 | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| บทคัดย่อ .....                                                                  | ค    |
| Abstract .....                                                                  | ง    |
| กิตติกรรมประกาศ .....                                                           | จ    |
| คำนำ .....                                                                      | ฉ    |
| สารบัญ .....                                                                    | ช    |
| สารบัญตาราง .....                                                               | ญ    |
| สารบัญภาพ .....                                                                 | ฎ    |
| อักษรย่อและสัญลักษณ์ .....                                                      | ฏ    |
| <br><b>บทที่</b>                                                                |      |
| <b>1 บทนำ</b>                                                                   |      |
| ที่มาและความสำคัญของปัญหา .....                                                 | 1    |
| คำถามการวิจัย .....                                                             | 2    |
| วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย .....                                               | 2    |
| คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย .....                                        | 2    |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย .....                                                     | 2    |
| <br><b>2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>                           |      |
| ไหม (silk) .....                                                                | 3    |
| โปรตีนไหม (silk protein) .....                                                  | 3    |
| โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซรีซิน .....                                   | 5    |
| สารสำคัญอื่นๆ ที่แทรกอยู่ในชั้นกาวไหม .....                                     | 6    |
| กระบวนการฟอกไหม .....                                                           | 6    |
| กระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซิน .....                                                | 7    |
| ผลของกระบวนการสกัดต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพ .....                         | 11   |
| การใช้ประโยชน์ของโปรตีนเซรีซินในด้านผลิตภัณฑ์เสริมความงามและ<br>สுகอนามัย ..... | 12   |

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่

|          |                                                                                                                    |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>3</b> | <b>วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>                                                                                       |    |
|          | วัสดุอุปกรณ์ .....                                                                                                 | 14 |
|          | สารเคมี .....                                                                                                      | 14 |
|          | วิธีการทดลอง .....                                                                                                 | 15 |
|          | การศึกษาวิธีการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมในจังหวัดเชียงราย .....                                                   | 15 |
|          | การทำให้แห้งด้วยเครื่องพ่นฝอย (Spray Drying) .....                                                                 | 16 |
|          | การศึกษาเอกลักษณ์ของสารสกัดเซรีซิน .....                                                                           | 16 |
|          | การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดโปรตีนเซรีซินด้วยเทคนิค<br>Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) ..... | 18 |
|          | การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging<br>Assay .....                                    | 18 |
|          | การพัฒนาผลิตภัณฑ์ความงามต้นแบบ .....                                                                               | 19 |
|          | การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....                                                                                   | 19 |
| <b>4</b> | <b>ผลการศึกษา และอภิปรายผลการศึกษา</b>                                                                             |    |
|          | การศึกษาวิธีการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมในจังหวัดเชียงราย .....                                                   | 20 |
|          | ปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัด .....                                                                               | 22 |
|          | การศึกษาลักษณะของโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดย SDS-PAGE .....                                                          | 25 |
|          | การศึกษาลักษณะของโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดย SDS-PAGE ของสาร<br>สกัดเซรีซินที่นำมาย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน .....      | 28 |
|          | ผลการวิเคราะห์ FT-IR .....                                                                                         | 30 |
|          | ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเซรีซิน .....                                                          | 31 |
|          | การพัฒนาผลิตภัณฑ์ความงามต้นแบบ .....                                                                               | 33 |
| <b>5</b> | <b>สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ</b>                                                                                |    |
|          | สรุปผลการวิจัย .....                                                                                               | 36 |
|          | ข้อเสนอแนะ .....                                                                                                   | 37 |
|          | <b>บรรณานุกรม</b>                                                                                                  | 38 |

|           |              |    |
|-----------|--------------|----|
| บทที่     | สารบัญ (ต่อ) |    |
| ภาคผนวก   |              |    |
| ภาคผนวก ก | .....        | 44 |
| ภาคผนวก ข | .....        | 45 |
| ภาคผนวก ค | .....        | 47 |
| ภาคผนวก ง | .....        | 50 |
| ภาคผนวก จ | .....        | 51 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                  | หน้า |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | รูปแบบการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหม .....                                                                                                        | 7    |
| 2        | แสดงสัดส่วนของกรดอะมิโนที่พบของเซรีซินแต่ละชั้น .....                                                                                            | 10   |
| 3        | แสดงสัดส่วนของกรดอะมิโนที่พบของเซรีซินที่สกัดได้จากไหม <i>B.mori</i><br>ด้วยวิธีการต่างๆ .....                                                   | 11   |
| 4        | เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของการสกัดเซรีซินที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด<br>ร่วมกับคลื่นความถี่สูง .....                                                | 22   |
| 5        | ความเข้มข้นโปรตีนในสารสกัดเซรีซินที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ<br>น้ำ และ 0.2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ร่วมกับคลื่นความถี่สูง ..... | 24   |
| 6        | ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด .....                                                                                                    | 32   |
| 7        | ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เซรัมบำรุงผิวหน้าผสมสารสกัดเซรีซินต้นแบบ..                                                                                 | 33   |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                 | หน้าที่ |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1      | ภาพแสดงโครงสร้างต่อมใหม่ ที่ประกอบด้วย ต่อมส่วนหน้า ส่วนกลาง และส่วนหลัง .....                                                                  | 3       |
| 2      | ภาพแสดงการยืดเหนียวระหว่างโปรตีนไฟโบรอินและเซรีซินด้วยพันธะไฮโดรเจน .....                                                                       | 3       |
| 3      | แผนภาพแสดงแหล่งเซรีซิน วิธีการสกัด คุณสมบัติ และการประยุกต์ในทางชีวการแพทย์และเวชสำอาง .....                                                    | 5       |
| 4      | รังไหมสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีสีแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบรงควัตถุในชั้นกาวไหม และภาพแสดงสัดส่วนเซรีซินแต่ละชั้นในรังไหมขาวเชิงพาณิชย์               | 6       |
| 5      | ตัวอย่างวัตถุบิรังไหมสีทอง .....                                                                                                                | 20      |
| 6      | สีของสารสกัดในวิธีการสกัด 8 กรรมวิธี .....                                                                                                      | 21      |
| 7      | ปริมาณโปรตีนที่พบในสารสกัดจาก 8 กรรมวิธี .....                                                                                                  | 24      |
| 8      | ผลการรันเจล SDS-PAGE ชุดตัวอย่างจากการสกัดซ้ำที่ 1 .....                                                                                        | 26      |
| 9      | ผลการรันเจล SDS-PAGE ชุดตัวอย่างจากการสกัดซ้ำที่ 2 .....                                                                                        | 26      |
| 10     | ผลการรันเจล SDS-PAGE ชุดตัวอย่างจากการสกัดซ้ำที่ 3 .....                                                                                        | 27      |
| 11     | ผลการรันเจล SDS-PAGE ชุดตัวอย่างจากการสกัดซ้ำที่ 4 .....                                                                                        | 27      |
| 12     | ความเข้มข้นโปรตีนในสารสกัดเซรีซินที่สกัดได้หลังผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน .....                                                       | 29      |
| 13     | ผลการรันเจล SDS-PAGE ของตัวอย่างสารสกัดเซรีซินที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน .....                                                           | 29      |
| 14     | ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค ATR-FTIR ของสารสกัดเซรีซินในสถานะต่างๆ .....                                                               | 31      |
| 15     | ผลิตภัณฑ์เซรัมผสมสารสกัดโปรตีนเซรีซินต้นแบบ .....                                                                                               | 34      |
| 16     | การถ่ายทอดองค์ความรู้ในกระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหม และแนวทางการต่อยอดสู่ผลิตภัณฑ์เพื่อการจำหน่ายของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงไหม ..... | 35      |

## อักษรย่อและสัญลักษณ์

|                                 |   |                                                                                                       |
|---------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| °C                              | = | องศาเซลเซียส (Degree Celsius)                                                                         |
| %                               | = | ร้อยละ/เปอร์เซ็นต์ (Percentage)                                                                       |
| g                               | = | กรัม (Gram)                                                                                           |
| ml                              | = | มิลลิลิตร (Milliliter)                                                                                |
| µg/ml                           | = | ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Micrograms per milliliter)                                                     |
| mg/ml                           | = | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Milligrams per milliliter)                                                     |
| nm                              | = | นาโนเมตร (Nanometer)                                                                                  |
| kDa                             | = | กิโลดาลตัน (Kilodalton)                                                                               |
| rpm                             | = | รอบต่อนาที (Revolutions per minute)                                                                   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | = | โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)                                                                   |
| BSA                             | = | โปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin                                                                    |
| WC                              | = | กลุ่มสารสกัดด้วยน้ำกลั่น (Water Control/Extraction)                                                   |
| SC                              | = | กลุ่มสารสกัดด้วย 0.2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                                 |
| WB                              | = | สารสกัดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน                                                  |
| SB                              | = | สารสกัดด้วย 0.2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน                    |
| w/w                             | = | สัดส่วนโดยน้ำหนัก (Weight by weight)                                                                  |
| SDS-PAGE                        | = | การแยกโมเลกุลโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจล<br>(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) |
| FT-IR                           | = | การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี<br>(Fourier Transform Infrared Spectroscopy)  |
| TEAC                            | = | ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับ Trolox<br>(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)     |
| Mean                            | = | ค่าเฉลี่ย                                                                                             |
| S.D.                            | = | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน                                                                                   |
| ±                               | = | ค่าความคลาดเคลื่อนบวกหรือลบ                                                                           |
| Sig. (p-value)                  | = | ระดับนัยสำคัญทางสถิติ                                                                                 |
| R <sup>2</sup>                  | = | สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination)                                                |

## บทที่ 1

### ที่มาและความสำคัญ

ประเทศไทยมีการเลี้ยงไหมมานานกว่า 3000 ปี โดยเริ่มมีการพัฒนาส่งเสริมการปลูกหม่อนเลี้ยงไหม สาวไหม และทอผ้าไหม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเป็นสินค้าส่งออก ในปี พ.ศ. 2544 จากข้อมูลการส่งออกผลิตภัณฑ์ มูลค่าการส่งออกไหมเส้นไหม ผ้าไหม ในแต่ละปีไม่ต่ำกว่า 100 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2565) กรมหม่อนไหมดำเนินโครงการส่งเสริมการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมในเขตพื้นที่ภาคเหนือ ภายใต้โครงการไทยนิยม ยั่งยืน ซึ่งมุ่งเน้นการแก้ไขปัญหาตามนโยบายการทวงคืนผืนป่า แรงฟื้นฟูป่าต้นน้ำ และลดปัญหาการบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ของเกษตรกรในพื้นที่ภาคเหนือ โดยแบ่งเป็นกิจกรรมการเลี้ยงไหมอุตสาหกรรม และการเลี้ยงแผ่นใยไหม ซึ่งกรมหม่อนไหมโดยศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติเป็นผู้วางแผนการผลิตท่อนพันธุ์หม่อนและไข่ไหมเพื่อสนับสนุนเกษตรกร (กรมหม่อนไหม, 2562) สำหรับเส้นใยไหมเป็นเส้นใยประเภทโปรตีนที่หม่อนไหมสร้างขึ้นในระยะดักแด้เพื่อใช้ห่อหุ้มตัวอ่อนที่จะพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย โดยแบ่งผีเสื้อที่ผลิตหม่อนไหมออกเป็น กลุ่มไหมมัลเบอร์รี่ (Mulberry silkworms) หรือเรียกอีกอย่างว่า กลุ่มไหมบ้าน (Domesticated silkworms) นิยมนำมาเลี้ยงในครัวเรือน และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่น ไหมบ้าน (*Bombyx mori*) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Bombycidae และกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ไม่ใช่ไหมมัลเบอร์รี่ หรือที่เรียกว่า กลุ่มไหมป่า (Wild silkworm) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในธรรมชาติ เช่น ไหมทาชาร์ (*Antheraea mylitta*, *Atheraea pernyi*) และไหมอีรี่ (*Samia* spp.) เป็นต้น ซึ่งเริ่มมีการพัฒนาสายพันธุ์ไหมป่าให้เป็นไหมเลี้ยงเพื่อประโยชน์เชิงเศรษฐกิจ ในเส้นไหมมีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ 2 ส่วนคือ ส่วนของเส้นใยที่เรียกว่า ไฟโบรอิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักมีอยู่ประมาณ 70% เป็นเส้นใยโปรตีนชนิดไม่มีขั้วส่งผลให้ไม่ละลายน้ำ และส่วนที่เป็นกาวไหม เรียกว่า เซอริซิน มีปริมาณ 20-30 % เป็นส่วนของโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ (Ahsan et al. 2018, Hurst et al 1892, Lee et al. 2004) ในกระบวนการผลิตเส้นใยไหมเพื่อนำไปใช้ในการทอผ้า เซอริซินหรือกาวไหมเป็นสิ่งที่ต้องกำจัดออกด้วยกระบวนการลอกกาวไหม เพื่อให้ได้เส้นใยไหมที่มีความเรียบและมันวาว ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดน้ำของเสียที่เป็นสาเหตุสร้างมลพิษให้กับสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยหลายงานพบว่าเซอริซินที่ถูกกำจัดออกในระหว่างกระบวนการผลิตเส้นไหมนั้น เป็นโปรตีนที่สามารถละลายน้ำและดูดซับน้ำได้ดี อีกทั้งยังมีคุณสมบัติที่ดีต่างๆ เช่น มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Manesa et al., 2020) และต้านการอักเสบ (Aramwit et al., 2013) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้นิยมใช้เซอริซินเป็นส่วนประกอบในเวชสำอาง เครื่องสำอาง และทางการแพทย์ เช่น ความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นไฮโดรเจล (Padamwar & Pawar, 2004) ทั้งนี้จากรายงานการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่แตกต่างกันในการสกัด เซอริซินจากไหมนั้นส่งผลต่อการละลาย ขนาดโมเลกุล และลักษณะในการก่อเจลของเซอริซินและสมบัติเชิงกล (Saha et al., 2019, Padamwar & Pawar, 2004) กระบวนการสกัดโปรตีนเซอริซินในแต่ละรูปแบบมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันออกไป เช่นการสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยเอนไซม์เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ และก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย แต่ก็มี

ค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่เหมาะแก่การประยุกต์ใช้สำหรับในการผลิตไหมในระดับชุมชน การสกัดด้วยยูเรียและสารเคมีอื่นๆ ร่วมด้วยให้ผลดีในการก่อให้เกิดโปรตีนไหมที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน แต่กระบวนการสกัดดังกล่าวสามารถใช้ได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการเนื่องจากสารเคมีที่ใช้มีความเป็นอันตรายสูง ด้วยเหตุนี้ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาวิธีการสกัดโปรตีน เซรีซินจากส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการลอกไหมและรังไหม ด้วยการสกัดด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด หรือด่าง ร่วมกับการใช้ความร้อนจึงเป็นแนวทางทางเลือกที่มีความน่าสนใจในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและศึกษาขนาดของโปรตีนที่สกัดได้เพื่อให้ได้รูปแบบการสกัดที่นำไปประยุกต์ใช้อย่างเหมาะสมและเกิดมูลค่าสูงสุด

### คำถามการวิจัย

วิธีการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมในจังหวัดเชียงรายที่ต่างกันจะทำให้ได้ขนาดของโปรตีนที่เหมาะสมต่อผลิตภัณฑ์เสริมความงามหรือไม่

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบการสกัดโปรตีนเซรีซินที่เหมาะสมแก่การนำไปใช้งานในด้านผลิตภัณฑ์เสริมความงาม
2. เพื่อศึกษาขนาดของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธีต่างๆ เช่น ขนาดของโปรตีน และฤทธิ์ทางชีวภาพที่สอดคล้องกับการใช้งาน
3. เพื่อพัฒนาด้านแบบผลิตภัณฑ์เสริมความงามจากโปรตีนเซรีซิน

### คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) รังไหม โปรตีนรังไหม กาวไหม เซรีซิน สกัดเซรีซิน ขนาดโปรตีน

(ภาษาอังกฤษ) silk cocoon, silk protein, silk gumming, sericin, sericin extraction, sericin molecular weight

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

ขอบเขตด้านเวลา: กุมภาพันธ์ 2568 - มกราคม 2569

ขอบเขตด้านสถานที่ : จังหวัดเชียงราย

ขอบเขตด้านประชากร: รังไหมในจังหวัดเชียงราย

## บทที่ 2

### แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การปลูกหม่อนเลี้ยงไหมได้รับการส่งเสริมมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2513 จนเป็นที่แพร่หลายอย่างกว้างขวาง และมีหน่วยงานในการดูแลกระบวนการปลูกหม่อน เลี้ยงไหม รักษาพันธุ์ไหมพื้นเมืองของไทย การย้อมสีธรรมชาติ ตลอดจนสนับสนุนการทอผ้าไหมอย่างครบวงจรที่ถูกจัดตั้งขึ้นในปี พ.ศ. 2552 คือ กรมหม่อนไหม (กรมหม่อนไหม, 2564) โดยหนึ่งในพันธกิจของกรมหม่อนไหมตามแผนปฏิบัติการราชการ ระยะ 5 ปี (พ.ศ. 2566-2570) คือ การวิจัยพัฒนาองค์ความรู้ เทคโนโลยี นวัตกรรม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ การผลิตและเพิ่มมูลค่าสินค้าหม่อนไหม (กรมหม่อนไหม, 2565)

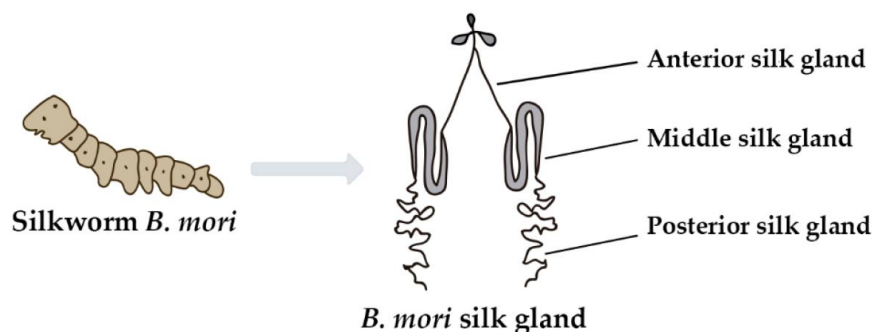
**2.1 ไหม (silk)** (บุษรา และคณะ, 2545; ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เลย, ม.ป.ป.)

หนอนไหมจัดอยู่ในวงศ์ Bombycidae หรือ Saturniidae สามารถผลิตเส้นใยที่มีความเหนียวซึ่งเหมาะในการนำไปใช้ถักทอเป็นผ้าไหมที่มีความละเอียด ประณีต สวยงาม จนได้รับความสนใจทั้งในและต่างประเทศ ไหมจึงจัดเป็นแมลงเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ หนอนไหมที่กินใบหม่อน หรือกลุ่มมัลเบอร์รี่ (mulberry silkworm) ซึ่งมีการเลี้ยงมากกว่า 3,000 ปี โดยพันธุ์พื้นเมืองที่เลี้ยงมามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bombyx mori* จัดอยู่ในวงศ์ Bombycidae ซึ่งให้เส้นใยที่มีคุณภาพสูง และมีขนาดเล็ก ถูกเลี้ยงด้วยใบหม่อน (*Morus spp.*) และหนอนไหม ที่ไม่ได้กินใบหม่อนเป็นอาหาร หรือกลุ่มที่ไม่ใช่มัลเบอร์รี่ (non-mulberry silkworms) หนอนไหมในวงศ์นี้จัดเป็นผีเสื้อกลางคืนอยู่ในวงศ์ Saturniidae มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย มีรายงานทั้งสิ้น 3 สกุล ได้แก่ ไหมทาชาร์ จะกินใบพืช *Terminalia arjuna*, *terminalia tomentosa* และ *Sorea robusta* ไหมมูก้า จะกินใบของต้นอบเชย การบูร และเสียด และไหมอีรี่ ซึ่งกินใบต้นมันสำปะหลัง ละหุ่ง อ้อยช้างและมะละกอเป็นอาหาร

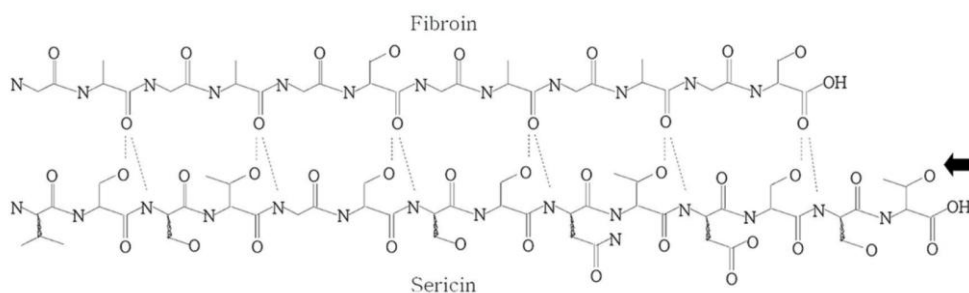
### 2.2 โปรตีนไหม (silk protein)

ไหมเป็นจัดเป็นสารประเภทโปรตีนเส้นใยที่ผลิตจากหนอนไหม ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีนไฟโบรอินมีปริมาณ 70-75% ซึ่งจะอยู่ด้านในของรังไหมหรือเรียกว่า เส้นใยไหม และโปรตีนเซรีซินที่เป็นโปรตีนกาว (Silk glue) ที่สามารถละลายน้ำได้ โดยทั่วไปรังไหมจะประกอบด้วยโปรตีนเซรีซินประมาณ 15-35% ของน้ำหนักรวม (Da Silva et al., 2014; Zhang, 2002, Johnson et al., 2020; Zhao & Zhang, 2020) โปรตีนเซรีซิน สร้างและหลั่งออกมาจากต่อมไหม (Labial glands) ของหนอนไหม *Bombyx mori* (ภาพที่ 1) โดยต่อมไหมส่วนกลางทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนเซรีซิน ต่อมไหมส่วนท้ายทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนไฟโบรอิน (Silva et al., 2022) เซรีซินเป็นโปรตีนกาวที่ช่วยยึดไฟโบรอินให้เชื่อมติดกัน โดยระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิดมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล ซึ่งช่วยให้โครงร่างของรังไหมเสถียร (ภาพที่ 2) เซรีซินเป็นสายพอลิเปปไทด์ที่มีหลายขนาดอยู่ในช่วง

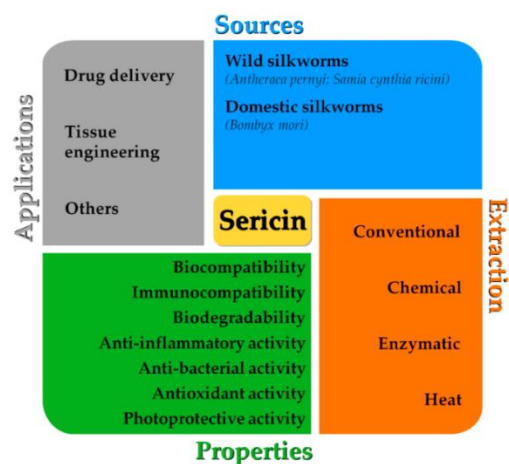
24 - 400 กิโลดาลตัน (kDa) (Gamo et al., 1997 , Michaille et al.; 1986, Takasu et al., 2002) ใน เซรีซินพบกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ทั้งหมด 18 ชนิด โดยกรดอะมิโนชนิดที่พบมากที่สุดคือ เซอรีน (40%) รองลงมาคือ ไกลซีน (16%) โดยในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เซรีซิน หรือกาไหมเป็นสิ่งที่จะต้องกำจัดออกเพื่อให้ได้เส้นใยไหมที่มีความเรียบมันวาว ซึ่งกาไหมนี้จะป็นของเสียที่เป็นสาเหตุสร้างมลพิษให้กับสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยหลายฉบับพบว่าเซรีซินมีคุณสมบัติคุณสมบัติที่ดีในด้านชีวภาพ เช่น มีคุณสมบัติดูดซับความชุ่มชื้น (Shah et al., 2019) การสร้างเนื้อเยื่อ (Galiano et al., 2018) ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Fatahian et al., 2021) (Xue et al., 2016) ความสามารถในการยับยั้งการสร้างเม็ดสี (Su et al., 2019) การยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์ (Zhang et al., 2019) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (Cao and Zhang, 2017) และมีฤทธิ์ในด้าน การลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด (Zhang et al., 2019) เป็นต้น ทั้งนี้ในกระบวนการผลิตเส้นใยไหมใน อุตสาหกรรมสิ่งทอ ส่วนของกาไหมจะถูกกำจัดออกจากเส้นใยไหม และเสียทิ้งไปอย่างเปล่าประโยชน์กับ น้ำทิ้งจากกระบวนการลอกกาไหม ซึ่งเมื่อพิจารณาคุณสมบัติของโปรตีนกาไหมก็นับได้ว่าเป็นการ สูญเสียสารที่มีประโยชน์ไป รวมถึงน้ำที่เกิดจากกระบวนการฟอกย้งก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้น การหากระบวนการทางเลือกในการสกัดสารเซรีซินจากรังไหม และน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอก รวมถึง วิธีการใช้ประโยชน์จากเซรีซินที่ได้ในการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ จึงนับเป็นการลดการก่อให้เกิดของเสีย สูสิ่งแวดล้อม ควบคู่ไปกับการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมผ้าไหม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 ภาพแสดงโครงสร้างต่อมไหม ที่ประกอบด้วย ต่อมส่วนหน้า ส่วนกลาง และส่วนหลัง (ที่มา: Silva et al., 2022)



ภาพที่ 2 ภาพแสดงการยึดเหนี่ยวระหว่างโปรตีนไฟโบรอินและเซรีซินด้วยพันธะไฮโดรเจน (ที่มา: Silva et al., 2022)



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงแหล่งเซรีซิน วิธีการสกัด คุณสมบัติ และการประยุกต์ในทางชีวการแพทย์และเวชสำอาง (ที่มา: Silva et al., 2022)

### 2.3 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซรีซิน

เซรีซินหรือกาไหมมีโครงสร้างเป็นชั้นๆ หุ้มล้อมรอบเส้นใยไหมหรือไฟโบรอิน โดยจากรายงานการศึกษาในแหล่งต่างๆ ได้มีการแบ่งเซรีซินออกเป็น 3-4 ชั้น โดยการแบ่งสามารถทำได้หลายรูปแบบทั้งตามความยากง่ายในการละลาย ขนาดโมเลกุล และตำแหน่งที่ตั้ง

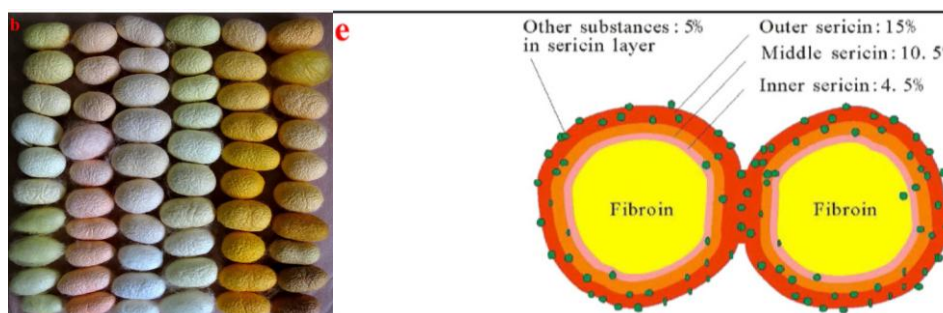
การแบ่งชั้นของเซรีซินตามความสามารถในการละลาย (Solubility-based layers) ในงานวิจัยบางงานแบ่งเซรีซินออกเป็น 4 ส่วน เรียงจากชั้นนอกไปชั้นในสุด ได้แก่ Sericin I, II, III และ IV (สุธาสินี และคณะ, 2550) โดยเซรีซินชั้นนอกสุด (Sericin I) มีความสามารถในการละลายได้ดีในน้ำร้อน และเริ่มละลายที่อุณหภูมิประมาณ 70 °C เซรีซินชั้นกลางสามารถละลายได้ในน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 100 °C ในขณะที่เซรีซินชั้นในสุด (Sericin IV) ซึ่งอยู่ติดกับเส้นใยไหมมากที่สุด ละลายน้ำได้ยากกว่า และต้องใช้สภาวะที่รุนแรงมากขึ้น เช่น การใช้ด่างโซเดียมคาร์บอเนต หรืออุณหภูมิสูงถึง 120 °C ในการละลาย (Cao & Zhang, 2016; Razikova et al., 2023) โดยเซรีซินชั้นนอก กลาง และในมีสัดส่วนอยู่ที่ 15%, 10.5% และ 4.5% เมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมด (ภาพที่ 4) การแบ่งเซรีซินตามลักษณะโครงสร้างทางชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเซรีซินออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ แอลฟาเซรีซิน ( $\alpha$ -sericin) ซึ่งอยู่ส่วนนอก มีโครงสร้างทุติยภูมิแบบสุ่ม (Random coil) ทำให้มีความยืดหยุ่น และละลายน้ำได้ง่าย และ บีต้าเซรีซิน ( $\beta$ -sericin) ซึ่งเป็นส่วนชั้นใน เป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรและมีความเป็นผลึกมากกว่า จึงละลายน้ำได้ยากกว่า (Zhao & Zhang, 2020)

เมื่อพิจารณาสัดส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเซรีซินแต่ละชั้น เซรีซินชั้นนอกจะมีปริมาณของกรดอะมิโนที่มีขั้ว (Polar amino acids) รวมถึงกรดอะมิโนเซอร์รีนสูงถึง 30-40% (Cao & Zhang, 2016) ในขณะที่เซรีซินที่อยู่ชั้นลึกกว่าจะมีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วเช่น ออลานีน เพิ่มขึ้น จึงทำให้มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับโปรตีนใยไหมหรือไฟโบรอินมากกว่าเซรีซินชั้นนอก (Zhao & Zhang, 2020) เซรีซินตามธรรมชาติมีขนาดมวเลกุลที่หลากหลาย (Molecular weight

heterogeneity) จากการวิเคราะห์ขนาดโปรตีนจากต่อมไหมชั้นกลางด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบประกอบด้วยพอลิเพปไทด์หลัก 3 กลุ่มที่มีขนาด 400, 250 และ 150 kDa (Takasu et al., 2002)

## 2.4 สารสำคัญอื่นๆ ที่แทรกอยู่ในชั้นกาวไหม

ในชั้นโปรตีนเซรีซิน หรือกาวไหมไม่ได้มีเพียงโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว แต่ยังมีสารสำคัญออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ประกอบอยู่ราว 1-5% ของน้ำหนักไหม สารสำคัญต่างๆ เช่น สารรงควัตถุ (Pigments) ได้แก่ ลูทีน (Lutein) และเบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) รวมถึงในบางสายพันธุ์หายากที่อาจพบคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) ซึ่งส่งผลต่อการเกิดสีในรูปแบบต่างๆ ของรังไหม (ภาพที่ 4) นอกจากนี้ยังมีสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และอนุพันธ์ไกลโคไซด์ของมัน สารเหล่านี้มักพบมากในชั้นนอกของกาวไหม และมีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเพื่อปกป้องดักแด้ในรังไหม (Cao & Zhang, 2016; Aramwit et al., 2010)



ภาพที่ 4 รังไหมสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีสีแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบรงควัตถุในชั้นกาวไหม และภาพแสดงสัดส่วนเซรีซินแต่ละชั้นในรังไหมขาวเชิงพาณิชย์ (ที่มา: Cao & Zhang, 2016)

## 2.4 กระบวนการฟอกไหม (ศูนย์ความรู้ความสามารถด้านการจัดการความรู้, 2562)

การผลิตผ้าไหมไทยนิยมทำการฟอกย้อมสีเส้นไหม ซึ่งถือเป็นเอกลักษณ์ของผ้าไหมไทยที่แตกต่างจากผ้าไหมทั่วโลก โดยการฟอกไหมเป็นขั้นตอนที่ดำเนินการก่อนการนำเส้นไหมดิบที่ได้จากการสาวไหมไปย้อมสี การฟอกไหมมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดกาวไหมเซรีซินออกจากเส้นใยไหม กระบวนการฟอกไหมเป็นกระบวนการสำคัญต่อคุณภาพของผ้าไหมที่ขอรับการรับรองมาตรฐานต่างๆ เช่น ทรานกยุงพระราชทาน โดยหากในขั้นตอนไม่สามารถลอกกาวไหมออกได้หมด ก็จะส่งผลต่อความสามารถในการติดสี และการตกสีเวลาซักของผ้าไหม สำหรับกระบวนการในการฟอกไหมนั้นสามารถทำได้โดย การใช้วัสดุจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง เช่น น้ำขี้เถ้า หรือใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างในการฟอก สำหรับมาตรฐานการผลิตผ้าไหมและสิ่งทอของไทยและมาตรฐานนานาชาติ ได้ออกประกาศข้อกำหนดให้ผ้าไหม ทรานกยุงพระราชทานทุกชนิดจะต้องไม่ใช่สีที่ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในขั้นตอนการลอกกาวไหมด้วยน้ำด่างธรรมชาติ จึงมีขั้นตอนคือ

1. เติมน้ำผสมน้ำด่างเข้มข้นมาก ( $\text{pH} > 12$ ) โดยเติมน้ำ 3 – 5 เท่าของน้ำด่าง
2. นำใจไหมแช่ลงในน้ำด่าง ให้เส้นไหมจมน้ำด่างทั้งหมด โดยไม่ต้องตั้งไฟ ระหว่างแช่ให้กลับไหมและสังเกตเป็นระยะ โดยเมื่อเส้นไหมอ่อนตัวนุ่มมีลักษณะเป็นเมือกให้ยกขึ้น หากแช่เป็นเวลานานแล้วเส้นไหมไม่อ่อนตัวให้ยกเส้นไหมออกมาพักไว้ แล้วนำน้ำด่างไปอุ่นไฟพออุ่น แล้วยกภาชนะน้ำด่างลงจากเตาและแช่เส้นไหมจนเส้นไหมอ่อนตัว
3. ต้มน้ำในภาชนะสแตนเลส หรือภาชนะเคลือบให้เดือด นำเส้นไหมที่แช่น้ำด่างได้ที่แล้วลงไปลวก หมั่นพลิกเส้นไหมให้สัมผัสน้ำร้อนให้ทั่ว กาวไหมจะละลายออกมาในน้ำเดือดจนกระทั่งเส้นไหมกลายเป็นสีครีม (สีมันปู)
4. ล้างเส้นไหมในน้ำร้อนอีกครั้ง แล้วผึ่งให้เย็นลง
5. ล้างเส้นไหมด้วยน้ำสะอาดอี 2-3 ครั้ง บิดให้พอหมาด กระตุกให้เส้นไหมเรียงตัว นำไปผึ่งในที่ร่ม ถ้าต้องการลอกกาวเส้นไหมเพื่อย้อมสีอ่อน ให้ผสมสบู่ขาวในน้ำร้อนที่ล้างเส้นไหม จากนั้นล้างด้วยน้ำอุ่นอีกครั้ง ให้คราบสบู่หลุด แล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาด

## 2.5 กระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซิน

ในทางอุตสาหกรรมผ้าไหม การลอกกาวไหมหรือการฟอกไหมนั้นสามารถทำได้โดยใช้สารชะล้างที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพดีในการลอกกาวไหมได้อย่างสมบูรณ์ และได้เส้นใยไหมที่มีคุณภาพดีเหมาะสมแก่การใช้ในการผลิตผ้าต่อไป อย่างไรก็ตามในกระบวนการข้างต้น หากมีความต้องการในการสกัดโปรตีนกาวไหมมาใช้ต่อในด้านอื่นๆ กลับพบว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้สลายตัวง่าย เกิดการสูญเสียขนาดโมเลกุล รวมถึงยังทำให้สูญเสียคุณสมบัติทางชีวภาพบางประการ จึงทำให้โปรตีนกาวไหมที่ได้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อการพัฒนาด้านชีวการแพทย์และเภสัชกรรม ด้วยเหตุนี้การพัฒนาระบบการสกัดซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ประโยชน์จากโปรตีนกาวไหมจึงถูกศึกษาวิจัยๆ และมีกระบวนการแยกสกัดในหลากหลายรูปแบบทั้งโดยการใช้ความร้อน สารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง การใช้เอนไซม์ ดังแสดงรูปแบบการสกัด ข้อดี ข้อจำกัดของวิธีการแบบต่างๆ ในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 1** รูปแบบการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหม (Silva et al., 2022)

| วิธีการสกัด    | กระบวนการสกัด                                                                       | ข้อดี                                                                                                                                                                                | ข้อจำกัด                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| วิธีปกติ       | สารซักล้าง สบู่ โซเดียมคาร์บอเนต                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>● มีประสิทธิภาพในการสกัด</li> </ul>                                                                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>● โปรตีนเซรีซินสลายตัวง่าย</li> <li>● การทำบริสุทธิ์โปรตีนเซรีซินกลับคืนยุ่งยาก</li> <li>● กระบวนการสกัดไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม</li> </ul>                                             |
| การใช้สารเคมี  | สารต่าง เช่น โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมฟอสเฟต โซเดียมซิลิเกต โซเดียมไฮโดรซัลไฟด์      | <ul style="list-style-type: none"> <li>● สกัดรวดเร็ว</li> <li>● ราคาถูก</li> <li>● มีประสิทธิภาพ</li> </ul>                                                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>● โปรตีนเซรีซินสลายตัวง่าย</li> <li>● การทำบริสุทธิ์โปรตีนเซรีซินกลับคืนยุ่งยาก</li> <li>● จำเป็นต้องมีกระบวนการทำบริสุทธิ์</li> <li>● กระบวนการสกัดไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม</li> </ul> |
|                | สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก กรดซัคซินิก                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>● โปรตีนเซรีซิน</li> <li>● สลายตัวน้อยกว่าการใช้สารละลายต่างในการสกัด</li> </ul>                                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>● โปรตีนเซรีซินยังสามารถสลายตัวได้</li> <li>● มีประสิทธิภาพต่ำในการสกัด</li> <li>● จำเป็นต้องใช้กระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีน</li> <li>● กระบวนการสกัดไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม</li> </ul>  |
|                | ยูเรีย (โดยใช้/ไม่ใช้สารเมอร์แคปโตเอทานอลร่วมด้วย)                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>● มีประสิทธิภาพ</li> <li>● ใช้เวลานาน</li> <li>● โปรตีนย่อยสลายน้อย</li> </ul>                                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>● จำเป็นต้องใช้กระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีน</li> <li>● โปรตีนสกัดมีการปนเปื้อนสูง</li> <li>● มีความเป็นพิษต่อเซลล์</li> </ul>                                                              |
| การใช้เอนไซม์  | เอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น โบรมิเลน แพนครีเอติน อัลคาเลส ซาวิเนส ดิกัมเมส ปาเปน ทริปซิน | <ul style="list-style-type: none"> <li>● มีประสิทธิภาพ</li> <li>● เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม</li> </ul>                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>● ค่าใช้จ่ายสูง</li> <li>● โปรตีนเซรีซินสลายตัวง่าย</li> <li>● ใช้เวลานาน</li> </ul>                                                                                                     |
| การใช้ความร้อน | การต้มในน้ำร้อน (ร่วม/ไม่ร่วมกับการใช้ความดันสูง)                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● กระบวนการไม่ซับซ้อน</li> <li>● ใช้เวลานาน</li> <li>● ไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีน</li> <li>● เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● โปรตีนเซรีซินย่อยสลายหากมีการใช้อุณหภูมิสูงร่วมด้วย</li> <li>● เส้นใยโปรตีนไฟโบรอินเสียหาย</li> <li>● สามารถสกัดได้เฉพาะส่วน Outer layer of sericin (OLS)</li> </ul>                   |

ดังนั้นการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีขนาดมวโมเลกุลและคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องเลือกใช้สารเคมีและสภาวะการสกัดที่เหมาะสม เนื่องจากโปรตีนเซรีซินตามธรรมชาติ มีลักษณะเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีความหลากหลายสูงทั้งในด้านโครงสร้างและขนาด มวโมเลกุล จากการรวบรวมรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสกัด พบวิธีการสกัดหลักๆ ดังนี้

1. การสกัดด้วยน้ำร้อนภายใต้ความดัน (Hydrothermal/autoclave) เป็นการสกัดที่อุณหภูมิ 100 – 120 °C วิธีการนี้มีข้อดีคือมีความปลอดภัยสูง ไม่มีการตกค้างของสารเคมี และสามารถรักษาสัดส่วนกรดอะมิโนรวมถึงเซรีซินที่มีขนาดมวโมเลกุลสูงไว้ได้ดีกว่าการใช้สารเคมีในการสกัด (Wang et al, 2021; Manosroi, et al, 2010; ธนาภา เลิศขยันดี และคณะ, 2563)
2. การสกัดด้วยสารละลายด่าง (Alkaline extraction) โดยด่างที่นิยมใช้คือ โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.5% (Cao & Zhang ,2016; Silva et al., 2022) หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) (Zhao & Zhang, 2020) โดยด่างจะช่วยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ทำให้เกิดการสลายพันธะระหว่างโปรตีน เกิดการสกัดอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง
3. การสกัดด้วยเอนไซม์ (Enzymatic extraction) มีรายงานการใช้เอนไซม์ร่วมในการสกัด เช่น เอนไซม์โบรมิเลน (Bromelain) ทริปซิน (Trypsin) ซึ่งวิธีการดังกล่าวช่วยย่อยโปรตีนเซรีซินที่มีขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง และยังสามารถส่งผลเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพบางอย่างของโปรตีนที่ได้ให้แตกต่างจากประสิทธิภาพก่อนการย่อยได้อย่างมีนัยสำคัญ (สุวรรณ และคณะ, 2565; Silva, et al., 2022)
4. การสกัดด้วยวิธีการอื่นๆ มีการศึกษาที่ใช้การสกัดด้วยการใช้สาร 8M ยูเรียร่วมกับสารละลายพันธะ เช่น 2%  $\beta$ -mercaptoethanol ผลการสกัดที่ได้สามารถรักษขนาดของโปรตีนเซรีซินดั้งเดิมได้ดี แต่สามารถทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ได้ยาก (Cao & Zhang, 2016; Silva et al., 2022) มีการทดลองสกัดด้วยการใช้น้ำทะเลลึก รวมถึงแนวทางการสกัดด้วยสารละลายซีเฝ้าจากธรรมชาติ (ธัญพรรณ ฮ่อบรรทัด, 2564)

ตัวอย่างกระบวนการสกัดและผลที่เกิดขึ้นต่อลักษณะทางกายภาพของโปรตีนเซรีซิน เช่น การศึกษาของ Monthatong และ Jitjak (2016) ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบการสกัดเซรีซินจากรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ และยูปี 1 ด้วย 3 วิธีการหลัก ได้แก่ 1) การต้มใน 1.2% กรดซิตริก 2) การต้มในน้ำกลั่น และ 3) การต้มใน 8 M ยูเรียที่มีส่วนผสมของ 2% beta-mercaptoethanol ที่อุณหภูมิ 80 °C พบว่าการสกัดด้วยกรดซิตริกให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้น้ำกลั่น โดยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษได้ผลผลิตโปรตีนรวมเมื่อเทียบกับน้ำหนักรังไหมดิบ 17.3 % และ สายพันธุ์ UB1 ให้ผลผลิต 13.1 % ตามลำดับ และขนาดของโปรตีนที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE มีขนาดอยู่ในช่วง 9-52 kDa, 11 -116 kDa และ 5 – 73 kDa โดยการสกัดด้วยสารละลายพันธะคือ 8 M Urea ร่วมกับ 2%  $\beta$ -

mercaptoethanol เป็นวิธีการที่ก่อให้เกิดการย่อยโปรตีนได้จำเพาะที่สุด จนปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจนชัดเจนที่ 15 20 28 34 และ 68 kDa การใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ก็สามารถแยกเซรีซินที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ออกมาได้ เช่นการใช้บัฟเฟอร์ 0.35 M Tris-HCl buffer, pH 8.6 ร่วมกับ 8M urea ในการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมกลุ่มมัลเบอร์รี่ ที่แยกพอลิเพปไทด์ขนาด 80 134 145 177 และ 309 kDa (Tokutake,1980) การสกัดด้วยสารละลาย 0.13 M-ethylene diamine/ 0.06 M-cupric hydroxide solution ให้ผลขนาดของโปรตีนเซรีซินที่แตกต่างออกไป โดยมีขนาดที่ 24 150 250 และ 400 kDa (Teramoto & Miyazawa, 2005) ในขณะที่การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นต่ำ (0.025 N NaOH) ในรังไหมที่ไม่ใช่กลุ่มมัลเบอร์รี่ พบเซรีซินที่ขนาด 66 kDa (Ahmead et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิธีการสกัดที่ลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์นับเป็นแนวทางการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เช่นการใช้สารละลายซีเล็กซ์จากเปลือกถั่วและลูกขุ่นในการสกัดเซรีซินจากรังไหมไทยนางน้อยศรีสะเกษ 1 โดยใช้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.1 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 30 นาที พบว่าให้ปริมาณสารสกัดที่ไม่แตกต่างจากการใช้ 0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> อย่างมีนัยสำคัญ. อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิ หรือใช้เวลากัดเกินกว่าจุดที่เหมาะสม ปริมาณโปรตีนจะลดลงเนื่องจากการสลายตัวของโมเลกุล (Degradation) (ธัญพรรณ ฮ่อบรรทัด, 2564)

นอกเหนือจากรายงานการศึกษาการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมข้างต้นแล้ว ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการนำโปรตีนเซรีซินกลับมาใช้ใหม่จากน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมฟอกขาวไหม (Degumming waste water) ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการลดปัญหามลพิษทางน้ำที่มีค่าความเป็นพิษสูง โดยกระบวนการนำโปรตีนเซรีซินกลับมาใช้ใหม่ มีทั้งการใช้เทคนิคเมมเบรนประเภทต่างๆ เช่น Ultrafiltration (UF) และ Nanofiltration (NF) ในการแยกน้ำฟอกขาวไหมที่ผ่านการปรับ pH เป็น 3.5 ซึ่งผลพบว่าการใช้ NF ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าที่ความดัน 4 บาร์ โดยให้โปรตีนที่กรองแยกได้สูงถึง 37,000 mg/ml (Gençtürk, 2021)

**ตารางที่ 2** แสดงสัดส่วนของกรดอะมิโนที่พบของเซรีซินแต่ละชั้น (Cao & Zhang, 2016)

| No. | Amino acids | S     | So    | Sm    | Si    | F     |
|-----|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1.  | Gly         | 17.85 | 16.29 | 16.35 | 17.87 | 42.62 |
| 2.  | Ala         | 6.70  | 5.20  | 6.13  | 11.58 | 33.38 |
| 3.  | Val*        | 4.05  | 3.77  | 4.27  | 5.43  | 2.58  |
| 4.  | Leu*        | 1.49  | 1.21  | 1.77  | 4.06  | 0.54  |
| 5.  | Ile*        | 1.02  | 0.79  | 1.17  | 3.76  | 0.72  |
| 6.  | Phe*        | 0.67  | 0.64  | 0.66  | 2.49  | 0.81  |
| 7.  | Met*        | 0.31  | 0     | 0     | 0.83  | 0.15  |
| 8.  | Pro         | 0.81  | 0     | 0.64  | 0     | 0.47  |
| 9.  | Tyr         | 3.10  | 2.87  | 3.98  | 4.09  | 5.84  |
| 10. | Cys         | 0.38  | 0.69  | 0.95  | 0.75  | 0.26  |
| 11. | Ser         | 25.50 | 28.00 | 25.57 | 13.32 | 7.65  |
| 12. | Thr*        | 7.47  | 7.78  | 8.13  | 5.66  | 0.85  |
| 13. | Asp         | 18.38 | 17.97 | 17.08 | 15.83 | 1.79  |
| 14. | Glu         | 5.74  | 6.25  | 4.65  | 7.34  | 1.36  |
| 15. | His         | 1.32  | 1.32  | 1.69  | 1.38  | 0.21  |
| 16. | Lys*        | 2.08  | 3.72  | 3.16  | 2.18  | 0.33  |
| 17. | Arg         | 3.12  | 3.52  | 3.83  | 3.41  | 0.44  |

Note: "\*" denotes amino acids that are essential for the human body.

หมายเหตุ S = เซรีซินรวม So = เซรีซินชั้นนอก Sm = เซรีซินชั้นกลาง Si = เซรีซินชั้นใน F=ไฟโบรอิน

ตารางที่ 3 แสดงสัดส่วนของกรดอะมิโนที่พบของเซรีซินที่สกัดได้จากไหม *B.mori* ด้วยวิธีการต่างๆ (Aramwit et al., 2010)

| Amino Acid    | Extraction Method |                  |                  |                    |
|---------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
|               | Heat              | Urea-Degradation | Acid-Degradation | Alkali-Degradation |
| Serine        | 33.63             | 31.27            | 31.86            | 30.01              |
| Aspartic acid | 15.64             | 18.31            | 15.93            | 19.88              |
| Glutamic acid | 4.61              | 5.27             | 5.75             | 5.93               |
| Glycine       | 15.03             | 11.23            | 10.49            | 11.01              |
| Histidine     | 1.06              | 3.26             | 2.47             | 1.72               |
| Arginine      | 2.87              | 5.41             | 4.92             | 4.92               |
| Threonine     | 8.16              | 8.36             | 8.51             | 6.49               |
| Valine        | 2.88              | 2.96             | 2.95             | 2.94               |
| Methionine    | 3.39              | 0.12             | 0.06             | 0.15               |
| Lysine        | 2.35              | 3.14             | 3.48             | 2.89               |
| Isoleucine    | 0.56              | 0.96             | 0.87             | 0.75               |
| Leucine       | 1.00              | 1.58             | 1.43             | 1.56               |
| Phenylalanine | 0.28              | 0.60             | 0.71             | 0.81               |

## 2.6 ผลของกระบวนการสกัดต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพ

วิธีการในการสกัดไม่ว่าจะเป็นการใช้ความร้อน สารละลายน้ำ รวมถึงการใช้หรือไม่ใช้เอนไซม์ร่วมด้วยในกระบวนการ ส่งผลโดยตรงต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ และขนาดของโมเลกุล ในการสกัดด้วยด่าง ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) มักเป็นวิธีการที่ให้ผลผลิตสูงและให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้ความร้อน โดยให้ผลผลิตในช่วง 24-30% (Cao & Zhang, 2016; วิชุดา และสุนทรต์, 2566) อย่างไรก็ตามการเพิ่มระยะเวลาในการสกัดด้วยน้ำร้อนที่ยาวนานมากขึ้น เช่นการสกัดที่ 9 ชั่วโมง สามารถทำให้ผลผลิตที่ได้เพิ่มขึ้นจนมากถึง 21.67% ได้ (สุธาสินี และคณะ, 2550) หากกล่าวถึงขนาดของโมเลกุลที่ได้ การสกัดด้วยด่างจะส่งผลให้ขนาดโมเลกุลของเซรีซินมีขนาดที่ลดลง เช่น มีขนาดโมเลกุลในช่วง 15-75 kDa (Da Silva et al., 2014; Johnson et al., 2020) การย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 kDa ซึ่งเป็นขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมแก่การซึมซาบเข้าสู่ผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

โปรตีนเซรีซินนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมความงามและการแพทย์ ด้วยฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากในโปรตีนเซรีซินมีกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชัน เช่น หมู่ไฮดรอกซิล คาร์บอกซิล ที่สามารถทำหน้าที่ในการให้โปรตรอนกับสารอนุมูลอิสระได้ดี การย่อยโปรตีนเซรีซินด้วยเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส เช่น เอนไซม์โบรมิเลน หรือทริปซิน ยังช่วยเผยหมู่ฟังก์ชันข้างต้น ทำให้สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดียิ่งขึ้น (สุวรรณ และคณะ, 2563; Omar et al., 2021) โปรตีนเซรีซินยังมีคุณสมบัติในการเพิ่มความกระจ่างใสของผิวด้วยกลไกการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน หรือคือฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Manosroi et al., 2010) นอกเหนือจากเซรีซินที่มีผลแล้ว สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และแคโรทีนอยด์ที่พบในรังไหมก็มีส่วนในการส่งเสริมคุณสมบัตินี้ด้วย (Aramwit et al., 2010) โครงสร้างของเซรีซินยังมีลักษณะทางเคมีคล้ายกับ Natural Moisturizing Factor (NMF) ของมนุษย์ จึงช่วยรักษาความชุ่มชื้นและเพิ่มความยืดหยุ่นให้ผิว (Zhao & Zhang, 2020)

## 2.7 การใช้ประโยชน์ของโปรตีนเซรีซินในด้านผลิตภัณฑ์เสริมความงามและสุขภาพ

เซรีซินมีคุณสมบัติด้าน biocompatibility สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติและความสามารถในการเปื่อยน้ำได้ ทำให้สามารถประยุกต์ใช้ทางด้านเครื่องสำอางได้อย่างหลากหลายทั้งผิว ผิวนุ่ม ในรูปแบบของ ครีม โลชั่น และซีรั่ม ซึ่งสามารถทำให้ช่วยในเรื่องของความยืดหยุ่นผิว ต้านริ้วรอย ปกป้องผิวจากรังสียูวี ปกป้องเส้นผม และเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว (Padamwar, 2004; Barajas-Gamboa et al, 2016; Kirikawa et al., 2000) จากการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนเซรีซิน พบว่าการสกัดโปรตีนเซรีซินจากไหมต่างสายพันธุ์ จากพื้นที่ต่างกัน และวิธีการสกัดที่ต่างกัน ทำให้ได้แบบแผนโปรตีนเซรีซินที่แตกต่างกัน ทำให้การนำไปใช้ประโยชน์ต่างกันเช่น เซรีซินที่มีขนาดต่ำกว่า 20 kDa จะประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางและทางการแพทย์ ในขณะที่เซรีซินที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 20 kDa นั้นนิยมใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมประเภทการนำส่งยา เนื้อเยื่อ ไฮโดรเจล เส้นใย สำหรับการพัฒนายาชีวกรรม เนื้อเยื่อ (Das et al., 2021) โดยมีรายงานว่า เซรีซินประกอบด้วยกรดอะมิโนเซอรีนซึ่งเป็น อะมิโนที่เป็นองค์ประกอบสูงสุดในผิวหนังมนุษย์ประมาณ 30% ดังนั้นจึงมีการนำเซรีซินไปใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางและเครื่องสำอาง เช่น สบู่ แชมพูสระผม ครีม โลชั่น จากสมบัติการลดความดันโลหิต ลดระดับน้ำตาลในเลือด ช่วยกระตุ้นการปลูกผม เนื่องจากกรดอะมิโนเซรีซินมีสมบัติในการดูดซับน้ำและพองตัว อีกทั้งยังสามารถละลายในน้ำร้อนได้ดี จึงสามารถยัดติดกับผิวหนัง ซึมซาบและรักษาความชุ่มชื้นได้ นอกจากนี้ยังมีการนำเซรีซินมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ โดยเชื่อมต่อ เซรีซิน -แอล- แอสพาราจิเนส (sericin-L-asparaginase) เป็นยาด้านโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (lymphoblastic leukemia) (Zhang et al., 2004) เซรีซิน-เบต้า-กลูโคซิเดส (sericin- $\beta$ -glucosidase) เป็นกลูโคส เซ็นเซอร์ (Zhang et al., 2002) และ เซรีซิน-อินซูลิน (sericin-insulin) สำหรับผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้มีระยะเวลาในการสลายตัวเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังพบว่า ช่วยลดการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Dash et al., 2008)

งานวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นถึงความก้าวหน้าในด้านวัสดุสำหรับการดูแลผิว โดยมุ่งเน้นไปที่มาสก์หน้าและส่วนประกอบจากไหม การศึกษาของ Nilforoushzadeh และคณะ (2018) เน้นบทบาทของมาสก์ เครื่องสำอางในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้น ความยืดหยุ่น และปรับเนื้อผิวให้ดีขึ้น แม้จะต้องการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลลัพธ์อย่างชัดเจน ในขณะที่ Kim และคณะ (2023) ศึกษาผลกระทบของปริมาณเซรีซินที่แตกต่างกันต่อความแข็งแรง รูพรุน และดูดซึมน้ำของเส้นไหมที่ไม่ถูกทอ เพื่อให้เหมาะสมต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิว Aramwit และ Bang (2014) ได้นำเสนอนาโนเซลล์โลสจากแบคทีเรียที่ปล่อยเซรีซินจากไหม โดยเน้นความเข้ากันได้ทางชีวภาพ คุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการให้ความชุ่มชื้นอย่างยั่งยืน ซึ่งสอดคล้องกับแนวโน้มเครื่องสำอางที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ส่วน Wang และ Zhou (2020) มุ่งเน้นไปที่กระดาศมาสก์จากเส้นใยธรรมชาติ โดยแสดงให้เห็นถึงการกักเก็บน้ำที่ดีขึ้น ความนุ่มสบายและความเข้ากันได้กับสารออกฤทธิ์เมื่อเทียบกับมาสก์จากผ้าฝ้ายทั่วไป สุดท้าย การศึกษา โดย Lee และคณะ (2023) วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของเซรีซินที่ผ่านการละลายใหม่ พบว่ายังคงรักษาคุณสมบัติทางชีวภาพ เช่นการกักเก็บความชุ่มชื้น และ

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ แม้ผ่านกระบวนการผลิต ทำให้เป็นส่วนผสมที่มีประโยชน์  
หลากหลายสำหรับผลิตภัณฑ์ดูแลผิวและการรักษาแผล ดังนั้นจากงานวิจัยดังกล่าวทำให้เห็นถึงศักยภาพ  
ของวัสดุจากไหมและวัสดุที่ยั่งยืนในการพัฒนามาस्कหน้าที่มีประสิทธิภาพสูง

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.3.1 หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 15 ml
- 3.3.2 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 ml
- 3.3.3 ตะแกรงวางหลอดทดลอง
- 3.3.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
- 3.3.5 เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า
- 3.3.6 เครื่องรันเจลแนวตั้ง
- 3.3.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 3.3.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบเพลท
- 3.3.9 ปิเปตอัตโนมัติขนาด 10, 200, 1000 และ 5000  $\mu$ l
- 3.3.10 ถังมือ
- 3.3.11 แพลท 96 หลุม
- 3.3.12 ขวดแก้วบรรจุผลิตภัณฑ์พร้อมฝาขนาด 30 ml

#### 3.2 สารเคมี

- 3.2.1 น้ำกลั่น
- 3.2.2 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- 3.2.3 โพรตีนอัลบูมินมาตรฐาน (Bovine serum albumin, BSA)
- 3.2.4 สีย้อมโคแมสซี (Coomassie Brilliant blue R250)
- 3.2.5 Acrylamide/bis
- 3.2.6 สารละลายฟอสเฟต
- 3.2.7 เอทานอล (Ethanol)
- 3.2.8 ผงเซรีซิน (Hydrolyzed silk sericin powder)
- 3.2.9 4-20% MP TGX stain free gel 12W
- 3.2.10 10x Tris/Glycine/SDS buffer
- 3.2.11 เอนไซม์โบรมิเลน (500,000 U/g)

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การศึกษาวิธีการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมในจังหวัดเชียงราย

รังไหมดิบถูกนำมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก ล้างด้วยน้ำกลั่นสะอาด 3 ครั้งเพื่อลดสิ่งปนเปื้อน จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนจนแห้งสนิท จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาทำการสกัดโปรตีนเซรีซินด้วยวิธีการสกัดดังรายละเอียดต่อไปนี้

##### 3.3.1.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด 2 สภาวะอุณหภูมิ และ 2 ระยะเวลา (8 กรรมวิธี)

- 1) ชั่งรังไหมจำนวน 6 กรัม โดยบันทึกค่าน้ำหนักรังไหมเริ่มต้นก่อนการสกัดโดยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง จากนั้นเติมตัวทำละลายน้ำกลั่น หรือตัวทำละลาย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ลงไปในอัตราส่วน 6 % โดยน้ำหนัก (W/W)
- 2) ทำการสกัดตัวอย่างทดสอบในสภาวะอุณหภูมิ 2 สภาวะได้แก่ 60 °C และ 80 °C ที่ระยะเวลา 30 หรือ 60 นาที
- 3) ทุกตัวอย่างทำการสกัดโดยใช้คลื่นความถี่สูงในการสกัด (Ultrasonication)
- 4) นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดแล้วมากรองสารละลายขณะร้อนด้วยกระดาษกรอง
- 5) นำสารสกัดที่ได้เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนถัดไป
- 6) นำตัวอย่างรังไหมส่วนที่เหลือไปอบให้แห้ง และทำการชั่งน้ำหนักหลังอบแห้งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (น้ำหนักไฟโบรอินที่เหลือ) (Hong et al., 2019)
- 7) คำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดจากสูตร ดังแสดง

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลผลิต} = \left( \frac{\text{น้ำหนักรังไหมเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักรังไหมที่เหลือ}}{\text{น้ำหนักรังไหมเริ่มต้น}} \right) \times 100$$

##### 3.3.1.2 การย่อยโปรตีนเซรีซินด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (ดัดแปลงจาก สุวรรณิ แทนธานี, 2563)

จากการศึกษาสภาวะการสกัดในขั้นตอน 3.3.1.1 เลือกสภาวะการสกัดที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที มาใช้เป็นสภาวะทดสอบการย่อยโปรตีนเซรีซินด้วยเอนไซม์โบรมิเลนในขั้นตอนนี้ เนื่องจากสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนเซรีซิน โดยขั้นตอนในการศึกษาได้แก่

- 1) นำรังไหมดิบมาตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก ล้างด้วยน้ำกลั่นสะอาด 3 ครั้งเพื่อลดสิ่งปนเปื้อน จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนจนแห้งสนิท และชั่งน้ำหนักได้ 12 กรัม ตัวอย่างรังไหมแห้งถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการสกัด และทำการเติมตัวทำละลายโดยปริมาตร 250 มิลลิลิตร ดังนี้
  - กลุ่มที่ 1 (WC): สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น
  - กลุ่มที่ 2 (SC): สกัดด้วยตัวทำละลาย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

- 2) ตัวอย่างทั้งสองกลุ่มถูกนำไปสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic extraction) ที่อุณหภูมิ  $80 \pm 2$  °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองสารละลายขณะร้อนด้วยกระดาษกรองและแบ่งสารละลายแต่ละชุดออกเป็นสองส่วนเท่า ๆ กัน ได้แก่
  - กลุ่มที่ 3 (WB): สารสกัดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน
  - กลุ่มที่ 4 (SB): สารสกัดด้วย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน
- 3) ในสภาวะทดสอบที่ต้องการย่อยด้วยเอนไซม์ ให้เติมเอนไซม์โบรมิเลนในปริมาณ 5% โดยน้ำหนักเทียบกับน้ำหนักแห้ง (w/w) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที
- 4) นำสารละลายที่ได้จากแต่ละชุดการสกัดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนออก จากนั้นเก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและกระบวนการทำให้แห้งด้วยเครื่องพ่นฝอย (spray dryer) เพื่อการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR ต่อไป

### 3.3.2 การทำให้แห้งด้วยเครื่องพ่นฝอย (Spray Drying)

- 3.3.2.1 สารละลายเซริซินที่ได้จากกระบวนการสกัดถูกนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องพ่นฝอย (spray dryer) ที่อุณหภูมิของอากาศร้อน (inlet temperature) 180 °C อัตราการป้อนสารละลาย (solution pump)  $1.25 \times 10^{-7}$  m<sup>3</sup>/s และอัตราการไหลของอากาศ (air flow rate)  $1.0 \times 10^{-3}$  m<sup>3</sup>/s เพื่อให้ได้ผงเซริซินสำหรับการวิเคราะห์สมบัติเพิ่มเติมในขั้นตอนต่อไป

### 3.3.3 การศึกษาเอกลักษณ์ของสารสกัดเซริซิน

- 3.3.3.1 การศึกษาความเข้มข้นโปรตีน (Bio-Rad Laboratories, 2015)  
นำสารสกัดโปรตีนเซริซินที่ได้จากกระบวนการในข้อ 3.3.1.1 และ 3.3.1.2 มาวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay โดยมีขั้นตอนดังนี้
  - 1) เตรียมสารโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin, BSA ในช่วงความเข้มข้น 0, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, และ 1000 µg/ml
  - 2) เจือจางสี Coomassie reagent ในน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 3:1
  - 3) เติมตัวอย่างหรือสารมาตรฐานลงในแพลททดสอบ 96 หลุม หลุมละ 20 µl โดยทำซ้ำ 2-3 หลุม/ตัวอย่าง
  - 4) เติมสีที่เตรียมไว้ลงไป 180 µl โดยในหลุมที่ใช้เป็นหลุมอ้างอิง (reference blank) เติมน้ำปราศจากไอออนแทนสี
  - 5) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาทีเพื่อรอให้ปฏิกิริยาการเกิดสีสมบูรณ์

- 6) นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบเพลทภายในเวลาไม่เกิน 30 นาทีหลังจากผสมสี
- 7) คำนวณหาปริมาณโปรตีนในหน่วย  $\mu\text{g/ml}$  ในตัวอย่างโดยการเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยเลือกใช้ช่วงกราฟที่มีค่า  $R^2$  มากกว่า 0.95
- 8) สำหรับการคำนวณปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารตัวอย่างกาวไหม 1 กรัม คำนวณจากสูตร  

$$C = cV/g$$

$$C = \text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ต่อน้ำหนักแห้งรังไหม 1 กรัม)}$$

$$c = \text{ปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน}$$

$$V = \text{ปริมาตรรวมของสารสกัดกาวไหม}$$

$$g = \text{น้ำหนักของรังไหมที่นำมาสกัด}$$

### 3.3.3.2 การศึกษามวลโมเลกุลของโปรตีนในสารสกัดเซรีซินด้วยวิธี SDS-PAGE (ดัดแปลงจาก Monthatong & Jitjak, 2016) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1) วัดปริมาณโปรตีนที่พบในสารสกัดที่ได้จากแต่ละกรรมวิธีด้วย Bradford assay
- 2) ทำการปรับค่าความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0.9 mg/ml
- 3) ผสมตัวอย่างใน 4x Laemmli buffer ที่เติม  $\beta$ -mercaptoethanol เรียบร้อยแล้ว ในอัตราส่วน 3:1 จากนั้นนำตัวอย่างไปต้มที่อุณหภูมิ 70 °C 10 นาที
- 4) รันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่มีตัวอย่าง โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 นาน 10 นาที
- 5) โหลดตัวอย่าง 10  $\mu\text{l}$  ใน 12% SDS-PAGE ที่เตรียมไว้ หรือใน 4-20% mini-Protein<sup>®</sup> TGX stain-Free
- 6) รันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้กระแสไฟ 100 V นาน 60-90 นาที
- 7) ใช้ Protein ladder, PRO-STAIN<sup>™</sup> Pre-stained Standard protein ladder เป็นโปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดได้
- 8) เมื่อรันเจลเรียบร้อยแล้ว ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 5 นาที
- 9) ทำการย้อมสีเจลด้วย 1% Coomassie Brilliant Blue R250 พร้อมเขย่าตลอดเวลาการย้อมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่นบันทึกผล

### 3.3.4 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดโปรตีนเซรีซินด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR)

- 3.3.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดโปรตีนเซรีซินที่ถูกทำให้แห้งด้วยเทคนิคพ่นฝอยแบบผง (Spray dry) โดยใช้เทคนิคฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrometer FTIR, รุ่น VERTEX 80v, Bruker, Germany) เพื่อศึกษาหมู่ฟังก์ชันและพันธะเคมีที่เกิดขึ้นในตัวอย่าง
- 3.3.4.2 การวัดค่าทำในช่วงคลื่น  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งอยู่ในย่าน Mid-IR โดยตั้งค่าความละเอียด (resolution) ที่  $4\text{ cm}^{-1}$  และทำการสแกนสะสมสัญญาณทั้งหมด 32 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่างเพื่อเพิ่มความแม่นยำของสเปกตรัมการวัดดำเนินการในโหมด Attenuated Total Reflectance (ATR mode) โดยใช้ผลึกเพชรเป็นวัสดุสะท้อนภายใน เพื่อให้สามารถวัดตัวอย่างได้โดยตรงโดยไม่ต้องเตรียมในรูปผงผสมกับสารโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr)
- 3.3.4.3 การเตรียมตัวอย่างทำโดยการวางตัวอย่างบนพื้นผิวผลึก ATR และวัดสเปกตรัมทันที อุณหภูมิขณะทำการวัดอยู่ในช่วง  $23\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$  เพื่อรักษาความเสถียรของสัญญาณและป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเนื่องจากอุณหภูมิ
- 3.3.4.4 การประมวลผลและแก้สัญญาณพื้นหลัง (background correction) ทำด้วยโปรแกรม OPUS ของบริษัท Bruker เพื่อให้ได้สเปกตรัมที่ชัดเจนและถูกต้อง
- 3.3.4.5 พิสูจน์เอกลักษณ์เปรียบเทียบกับสารเซรีซินเชิงพาณิชย์ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกัน

### 3.3.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

- 3.3.5.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น  $0.1\text{ mM}$  โดยชั่ง DPPH ปริมาณ  $0.00985\text{ กรัม}$  ละลายในเมทานอล  $250\text{ มิลลิลิตร}$
- 3.3.5.2 สารมาตรฐาน Trolox เตรียมที่ความเข้มข้น  $1\text{ mM}$  โดยชั่ง  $0.025\text{ กรัม}$  ละลายในเมทานอล  $100\text{ มิลลิลิตร}$  จากนั้นทำการเจือจางแบบลำดับขั้น (serial dilution) เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น  $125, 250, 500, 1000, 1500, 2000$  และ  $4000\text{ }\mu\text{M}$
- 3.3.5.3 ตัวอย่างและสารมาตรฐานถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ในอัตราส่วน  $1:1\text{ (v/v)}$  แล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา  $30\text{ นาที}$  จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $517\text{ นาโนเมตร}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 517\text{ nm}$ ) โดยใช้สารละลายเมทานอลเป็น blank
- 3.3.5.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานถูกนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

- 3.3.5.5 จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) กับความเข้มข้นของสาร ( $\mu\text{g/mL}$  หรือ  $\mu\text{M}$ ) เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $\text{IC}_{50}$ ) ของสารมาตรฐานและสารสกัด

### 3.3.6 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ความงามต้นแบบ

- 3.3.6.1 นำตัวอย่างสารสกัดที่ถูกคัดเลือกจำนวน 1 รูปแบบพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่สอดคล้องกับสรรพคุณของสารสกัด
- 3.3.6.2 เตรียมสูตรพื้นฐานหรือตำรับและการทดสอบความคงทนและประสิทธิภาพของตำรับ โดยเลือกสูตรที่เหมาะสมจากการทดสอบความคงตัว รวมถึงการพัฒนาบรรจุภัณฑ์และฉลากที่เหมาะสม
- 3.3.6.3 ถ่ายทอดกระบวนการสกัดสาร และการแนะนำแนวทางในการต่อยอดผลิตภัณฑ์ต่อกลุ่มเป้าหมาย

### 3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองซ้ำอิสระ 3 ชุด ถูกคำนวณและนำเสนอข้อมูลในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) เพื่อแสดงค่ากลางและการกระจายตัวของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลอง ก่อนดำเนินการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ข้อมูลถูกนำมาทดสอบความเป็นเอกพันธ์ของความแปรปรวน (Test of Homogeneity of Variances) โดยใช้สถิติ Levene Statistic จากนั้นทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way Analysis of Variance: ANOVA) เพื่อทดสอบสมมติฐานและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองต่าง ๆ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% Yield) ปริมาณโปรตีน โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ( $p < 0.05$ ) ในกรณีที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว ทำการทดสอบรายคู่ (Post-hoc Comparison) โดยเลือกใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) หรือ Tukey's HSD ตามความเหมาะสมของลักษณะข้อมูล

## บทที่ 4

### ผลการศึกษา และอภิปรายผลการศึกษา

การวิจัยเรื่อง การสกัดโปรตีนเซรีซินเพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพและความงาม มีผลการศึกษาดังต่อไปนี้

#### 4.1 การศึกษาวิธีการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมในจังหวัดเชียงราย

ในการศึกษาได้ใช้ตัวอย่างรังไหมสีทอง (ภาพที่ 5) ที่ได้จากวิสาหกิจชุมชนแม่บ้านเกษตรกรปลูกหม่อนเลี้ยงไหม 211 หมู่ 5 ต.ศรี อ.เชียงของ จ.เชียงราย โดยในกระบวนการสกัดรังไหมถูกทำความสะอาดและอบให้แห้ง ตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก และนำไปผ่านกระบวนการสกัดที่ใช้ตัวทำละลาย อุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดที่มีความแตกต่างกัน 8 กรรมวิธี



ภาพที่ 5 ตัวอย่างวัตถุดิบรังไหมสีทอง ก) รังไหมก่อนตัด ข) ผีเสื้อไหม  
ค) ตัวอย่างรังไหมตัดก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการสกัด

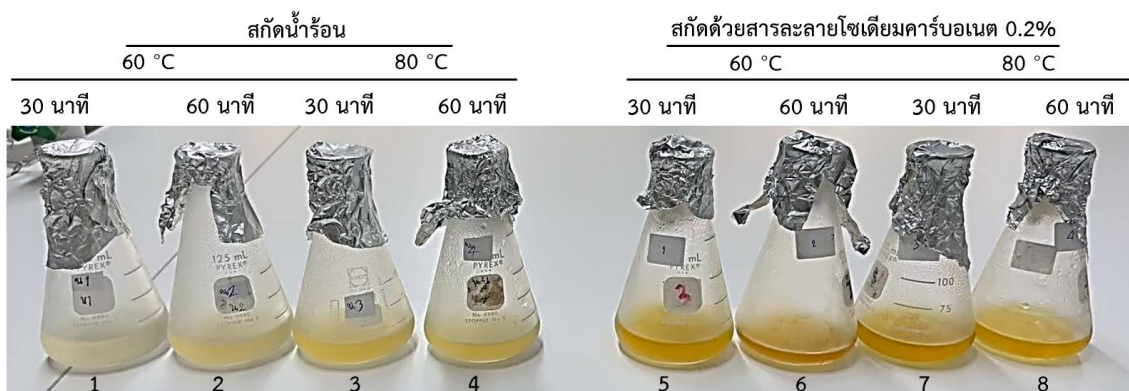
เมื่อสังเกตลักษณะสีสารละลายของสารสกัดที่ได้ (ภาพที่ 6) ด้วยตาเปล่าพบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายละลาย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ในทุกสภาวะให้สีของสารสกัดสีเหลืองเข้มกว่าการสกัดด้วยน้ำอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างระยะเวลาการสกัดที่ 30 และ 60 นาที ไม่ได้ส่งผลให้ความเข้มสีของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งสารสีเหลืองที่พบได้จากการสกัดรังไหมในการศึกษาครั้งนี้คาดว่าสีเหลืองนั้นเกิดจากส่วนประกอบซึ่งเป็นสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนเซรีซิน (non-sericin protein) เช่น ลูทีน และเบต้าแคโรทีน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มักสะสมอยู่ในชั้นกาไหมและมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (Cao & Zhang, 2016)

ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% Yield) แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดคือการใช้ 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งให้ผลผลิตสูงถึง  $20.76 \pm 0.92\%$  ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตมากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาการสกัดเดียวกันถึง 2 เท่า ในขณะที่การสกัดด้วย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ในสภาวะอื่นๆ เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำให้ประสิทธิภาพการสกัดที่มากกว่าในช่วง 1.68-2.10 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนช่วยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ทำให้กาไหมเกิดการสลายตัวและแยกออกจากเส้นใยไหมได้

ง่ายกว่าการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ วิชุดา และสุนทรต์ (2566) ที่สกัดรังไหมด้วย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ด้วยการต้มเป็นเวลา 30 นาที พบผลเปอร์เซ็นต์การลอกกาไหมดีที่สุดที่  $25.483 \pm 4.039\%$  และ การเพิ่มเวลาหลังจากนั้นไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณการลอกกาไหมอย่างมีนัยสำคัญ และพบแนวโน้มว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัดให้นานขึ้น ปริมาณผลผลิตกลับมีทิศทางลดลงเล็กน้อย ซึ่งปรากฏการณ์นี้อาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของสายโซ่โปรตีน (Protein degradation) หรือการสูญเสียองค์ประกอบเชิงโครงสร้างเนื่องจากการได้รับความร้อนและสารเคมีต่อเนื่องเป็นเวลานาน สอดคล้องกับการศึกษาของ ธัญพรรณ (2564) ที่ระบุว่าการใช้อุณหภูมิและระยะเวลาที่เกินจุดเหมาะสมจะส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ลดลงเนื่องจากการสลายตัวของโมเลกุล การเลือกใช้เวลา 30 นาทีจึงเป็นสภาวะที่สมดุลที่สุดระหว่างประสิทธิภาพการผลิตและการรักษาคุณภาพของสารสกัด

ในรายงานการศึกษาก่อนหน้า ความเข้มข้นของ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่นิยมใช้ในการสกัดโปรตีนเซรีซินทั้งในระดับการทดลองในห้องปฏิบัติการ และในอุตสาหกรรมมีการรายงานการใช้ในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.5% (w/v) (Cao & Zhang, 2016; Aramwit et al., 2010a; Aramwit et al., 2010b) โดยการเลือกใช้สาร  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้นต่ำๆ เช่นที่ 0.2% มีความเหมาะสมต่อการค่อยๆ สลายโปรตีนเซรีซินออกจากเส้นใยไหม ในขณะที่การเลือกใช้  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่ความเข้มข้นที่มากขึ้น เช่นที่ 0.5% มักมีวัตถุประสงค์เพื่อการลอกกาไหมอย่างรวดเร็วในการผลิตเส้นใยไหม หรือเพื่อต้องการให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนเซรีซินให้มีขนาดเล็กลง

จากรายงานการศึกษาก่อนหน้าการสกัดโปรตีนเซรีซินด้วย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  จากรังไหมหลากหลายสายพันธุ์ พบปริมาณโปรตีนที่ได้แตกต่างกันตามองค์ประกอบทางพันธุกรรม ตัวอย่างเช่น การสกัดรังไหมสายพันธุ์ลูกผสม UB1xUB5 ด้วย 0.5% ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 60 นาที พบว่าให้ปริมาณโปรตีนจริง (Actual protein content) อยู่ที่ 15.14 %โดยน้ำหนัก (สุธาสนี และคณะ, 2550) จึงกล่าวได้ว่าการสกัดโปรตีนเซรีซินด้วยด่าง ประสิทธิภาพการสกัดนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยทั้งสายพันธุ์ของรังไหม ความเข้มข้นของสารสกัด อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้



ภาพที่ 6 สีของสารสกัดในวิธีการสกัด 8 กรรมวิธี

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์ผลผลิตของการสกัดเชรีซินที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ร่วมกับคลื่นความถี่สูง

| ตัวทำละลาย     | เปอร์เซนต์ของเชรีซินที่สกัดได้ |        |                  |        |                                                          |        |                  |        |
|----------------|--------------------------------|--------|------------------|--------|----------------------------------------------------------|--------|------------------|--------|
|                | น้ำกลั่น                       |        |                  |        | 0.2% โซเดียมคาร์บอเนต (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) |        |                  |        |
|                | อุณหภูมิต่ำ (°C)               |        | อุณหภูมิสูง (°C) |        | อุณหภูมิต่ำ (°C)                                         |        | อุณหภูมิสูง (°C) |        |
| เวลา (นาท)     | 30                             | 60     | 30               | 60     | 30                                                       | 60     | 30               | 60     |
| กรรมวิธีที่    | 1                              | 2      | 3                | 4      | 5                                                        | 6      | 7                | 8      |
| สกัดครั้งที่ 1 | 2.54                           | 6.25   | 8.44             | 13.58  | 18.45                                                    | 19.09  | 21.82            | 17.23  |
| สกัดครั้งที่ 2 | 8.31                           | 9.15   | 12.06            | 10.09  | 7.32                                                     | 17.09  | 20.33            | 18.48  |
| สกัดครั้งที่ 3 | 7.39                           | 8.86   | 10.51            | 10.01  | 8.71                                                     | 14.79  | 20.13            | 21.15  |
| ค่าเฉลี่ย      | 6.08                           | 8.09   | 10.34            | 11.23  | 11.49                                                    | 16.99* | 20.76*           | 18.96* |
|                | ± 3.10                         | ± 1.59 | ± 1.81           | ± 2.04 | ± 6.06                                                   | ± 2.15 | ± 0.92           | ± 2.00 |

หมายเหตุ: \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.2 ปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัด

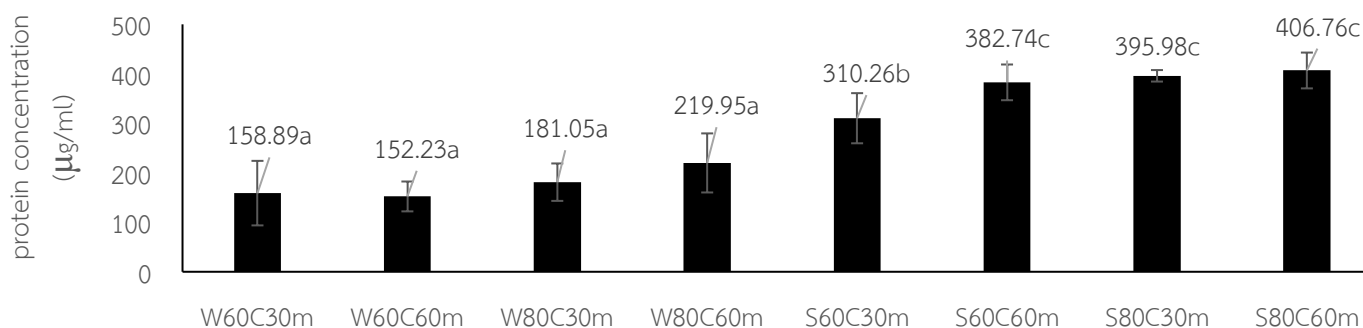
การสกัดโปรตีนเชรีซินด้วยสารละลายน้ำให้ค่าปริมาณโปรตีนในช่วง  $158.89 \pm 65.20$  ถึง  $219.95 \pm 59.68$   $\mu\text{g/ml}$  โดยแนวโน้มของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดในขณะที่การสกัดด้วยสารละลาย 0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที ส่งผลให้ได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้นจากกรรมวิธีที่ 1-5 อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการสกัดในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น (กรรมวิธีที่ 7-8) ไม่ได้ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.2) การสกัดโปรตีนด้วย สารละลาย 0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ในกรรมวิธีที่ 5-8 ให้ผลปริมาณโปรตีนที่ได้มากกว่าการสกัดด้วยสารละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตมีฤทธิ์เป็นด่างอ่อน จึงช่วยในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และพันธะไฮโดรเจนที่ยึดระหว่างโปรตีนเชรีซินไว้กับเส้นใยไฟโบรอิน (เกียรติชัย, 2553) นอกจากนี้ดังยังสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายได้ดียิ่งขึ้นเพราะมีการเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ในโมเลกุลของโปรตีนเชรีซินให้เป็นหมู่คาร์บอกซิเลต (-COONa<sup>+</sup>) ซึ่งส่งผลให้เกิดการละลายน้ำได้ดีมากกว่าการใช้สารละลายน้ำร้อนเพียงอย่างเดียว (Silva et al., 2022) การสกัดที่อุณหภูมิ 80 °C มีแนวโน้มในการสกัดโปรตีนได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 60 °C นั้นมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่ส่งผลให้เกิดการละลายของโปรตีนเชรีซินชั้นนอก (Outer layer, upper layer) ที่เริ่มละลายได้ที่อุณหภูมิประมาณ 70 °C ในขณะที่เชรีซินชั้นใน (Inner layer) ละลายได้ดีที่ 80 °C ดังนั้นการใช้การสกัดที่ 80 °C จึงช่วยให้สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากขึ้นตามลำดับ (Razikova et al., 2023) ในด้านของระยะเวลาการสกัดจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การสกัดที่อุณหภูมิ 60 °C ด้วย 0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ระยะเวลาการสกัดที่นานมากขึ้นเป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัด เนื่องจากที่อุณหภูมิดังกล่าวพลังงานความร้อนไม่สูงมากพอที่จะสลายชั้นกาวไหมได้อย่างรวดเร็ว ประสิทธิภาพการสกัดจึงขึ้นอยู่กับระยะเวลา เพื่อที่สารละลายต่างจะค่อยๆ แทรกซึมและเข้าทำปฏิกิริยา

กับชั้นกาวยไหม ในทางตรงกันข้ามการสกัดที่อุณหภูมิ 80 °C ร่วมกับการใช้ 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  กลับพบว่าระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นไม่ได้ส่งผลให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด ทั้งนี้คาดว่าสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่มีประสิทธิภาพสูงจนสามารถดึงเซรีซินส่วนใหญ่ออกมาได้เกือบทั้งหมดภายในเวลา 30 นาทีแรกแล้ว หรืออาจมีสาเหตุมาจากการที่การสกัดด้วย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ร่วมกับการใช้ความร้อนเป็นระยะเวลานานอาจส่งผลให้สายโปรตีนเกิดการแตกตัวอย่างรุนแรงจนหลายเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก และอาจส่งผลต่อการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford จากผลปริมาณโปรตีนที่ได้ รวมถึงผลเปอร์เซ็นต์ของเซรีซินที่ได้จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ จึงกล่าวได้ว่าสภาวะที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุดในการศึกษานี้คือ การสกัดด้วย 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นโปรตีนในสารสกัดเซรีซินที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ น้ำ และ 0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ร่วมกับคลื่นความถี่สูง

| ความเข้มข้นของโปรตีน (µg/ml) |                     |                     |                     |                     |                                                               |                     |                     |                     |
|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| ตัวทำละลาย                   | น้ำ                 |                     |                     |                     | 0.2% โซเดียมคาร์บอเนต (0.2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) |                     |                     |                     |
| อุณหภูมิ (°C)                | 60                  |                     | 80                  |                     | 60                                                            |                     | 80                  |                     |
| เวลา (นาท)                   | 30                  | 60                  | 30                  | 60                  | 30                                                            | 60                  | 30                  | 60                  |
| กรรมวิธีที่                  | 1                   | 2                   | 3                   | 4                   | 5                                                             | 6                   | 7                   | 8                   |
| ซ้ำที่ 1                     | 152.4 ± 0.87        | 180.1 ± 0.96        | 235.0 ± 8.42        | 282.4 ± 7.88        | 408.1 ± 5.96                                                  | 433.6 ± 2.93        | 358.9 ± 3.01        | 436.3 ± 10.59       |
| ซ้ำที่ 2                     | 147.6 ± 1.00        | 176.5 ± 6.9         | 253.0 ± 21.4        | 259.7 ± 6.9         | 348.4 ± 8.40                                                  | 372.5 ± 8.10        | 384.9 ± 5.90        | 365.6 ± 7.00        |
| ซ้ำที่ 3                     | 118.5 ± 1.39        | 126.8 ± 0.52        | 165.0 ± 1.60        | 169.9 ± 7.08        | 274.4 ± 4.12                                                  | 363.3 ± 11.56       | 316.9 ± 17.61       | 421.1 ± 3.94        |
| ซ้ำที่ 4                     | 111.7 ± 3.22        | 125.4 ± 0.79        | 176.3 ± 7.57        | 167.9 ± 5.51        | 259.3 ± 8.64                                                  | 359.0 ± 6.99        | 395.0 ± 21.33       | 415.6 ± 1.36        |
| ค่าเฉลี่ย                    | 158.89 <sup>a</sup> | 152.23 <sup>a</sup> | 181.05 <sup>a</sup> | 219.95 <sup>a</sup> | 310.26 <sup>b</sup>                                           | 382.74 <sup>c</sup> | 395.98 <sup>c</sup> | 408.98 <sup>c</sup> |
|                              | ± 65.20             | ± 30.18             | ± 37.82             | ± 59.68             | ± 50.65                                                       | ± 36.11             | ± 11.60             | ± 29.89             |

หมายเหตุ: อักษร a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



ภาพที่ 7 ปริมาณโปรตีนที่พบในสารสกัดจาก 8 กรรมวิธี

หมายเหตุ: อักษร a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

#### 4.3 การศึกษาลักษณะของโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดย SDS-PAGE

จากการนำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดทั้ง 8 กรรมวิธีมาวิเคราะห์ด้วยการรันเจล SDS-PAGE เพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนเซรีซินที่สกัดได้ (ภาพที่ 8-11) ผลการศึกษาในภาพรวม พบว่าแถบโปรตีนในเลนที่ 1-4 ในภาพที่ 8-9 และเลนที่ 2-5 ในภาพที่ 10-11 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ทำการสกัดด้วยน้ำในสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ แทบไม่ปรากฏสัญญาณซึ่งสะท้อนการมีปริมาณโปรตีนที่น้อยกว่าความสามารถในการย้อมของสี Coomassie Brilliant blue การสกัดด้วยน้ำโดยการใช้อุณหภูมิเพียงแค่ 60 และ 80 °C ในระยะเวลาเพียง 30 – 60 นาที นั้นอาจทำให้เกิดการละลายของชั้นกาวไหมหรือเซรีซินเพียงแคในส่วนชั้นนอก ( $\alpha$ -sericin) ที่สามารถละลายได้ง่ายในน้ำอุ่น (Silva et al., 2022) ในขณะที่เลนที่ 5-8 ในภาพที่ 8-9 และเลนที่ 6-9 ในภาพที่ 10-11 ซึ่งเป็นตัวอย่างจากการสกัดด้วยสารละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  พบแถบสีน้ำเงินอ่อนเป็นช่วงกว้างในช่วงบนของเจลที่ขนาดโมเลกุลมากกว่า 100 kDa โดยเฉพาะในภาพที่ 9 จะเห็นแถบเข้มอย่างชัดเจนที่ขนาดโมเลกุลมากกว่า 250 kDa โดยหากพิจารณาที่การสกัดด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 60 °C จะพบแถบกว้างอีกช่วงในช่วงกลางของเจล ซึ่งมีค่าขนาดโมเลกุลในช่วงประมาณ 25-50 kDa ในขณะที่การสกัดด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C นั้นให้ผลแถบในช่วงบนของเจลที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 250 kDa และช่วงแถบช่วงล่างของเจลที่ค่าขนาดโมเลกุลที่ต่ำลงมา ในช่วง 10-25 kDa (ภาพที่ 8 เลนที่ 5-8 และภาพที่ 10 เลนที่ 8-9) การพบลักษณะแถบโปรตีนช่วงกว้าง (Smear pattern) และการมีขนาดโปรตีนที่หลากหลาย (Heterogeneity) นี้สอดคล้องกับลักษณะของเซรีซินตามธรรมชาติ ที่ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์หลายชนิดที่มีมวลโมเลกุลต่างกันตั้งแต่ 10-400 kDa และความหลากหลายของขนาดของโปรตีนที่ได้ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด (Da Silva et al., 2014) การพบแถบโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีขนาดมากกว่า 100kDa และ 250 kDa ในการสกัดด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  สะท้อนว่าการสภาวะการสกัดที่ใช้ยังคงรักษาส่วนประกอบของเซรีซินที่มีขนาดใหญ่ไว้ได้ ซึ่งอาจรวมถึงเกิดจากการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน (Aggregation) ของโปรตีนขนาดเล็ก (Omar et al., 2021) แต่ในการศึกษานี้ไม่พบแถบโปรตีนที่สังเกตได้ในช่วงขนาด 15-75 kDa เช่นเดียวกับในรายงานการศึกษาการสกัดโปรตีนเซรีซินด้วยต่างของ Aramwit และคณะ (2010b) แต่กลับพบเพียงแบนที่สังเกตได้ที่ประมาณ 100 kDa ในชุดการสกัดที่ 3 (ภาพที่ 10) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุได้ทั้งจากความต่างของอุณหภูมิ (การต้มในน้ำเดือด) และความเข้มข้นของต่าง (0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ที่ใช้ในการสกัด การพบแถบโปรตีนในช่วงขนาด 10-25 kDa ในการสกัดที่อุณหภูมิ 80 °C อาจมีสาเหตุมาจากการกระตุ้นการสลายตัวของโปรตีนจนกลายเป็นพอลิเปปไทด์สายสั้นๆ ได้ดีขึ้นเมื่อเทียบกับการสกัดที่อุณหภูมิ 60 °C โปรตีนเซรีซินที่มีขนาดต่ำกว่า 20 kDa นั้นมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาในด้านผลิตภัณฑ์เสริมความงามและผลิตภัณฑ์บำรุงผิวภัณฑ์ (Çapar & Aygün, 2015) ทั้งนี้ผลรูปแบบของโปรตีนในสารเซรีซินทางการค้า (Commercialized sericin) ซึ่งแสดงในเลนที่ 1 และ 9 ของภาพที่ 9 และ เลนที่ 10-11 ในภาพที่ 10 ที่ได้ทำการโหลดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 50 mg/ml ที่วัดปริมาณโปรตีนได้  $132.1 \pm 1.64 \mu\text{g/ml}$  (ภาคผนวก ง) กลับไม่พบแถบที่แสดงถึงขนาดโปรตีนในช่วงใดของเจลที่สามารถเห็นได้ชัดเจนเลย การไม่พบแถบโปรตีนในเซรีซินทางการค้านี้เนื่องจากเป็นตัวอย่างเซรีซินผ่านการย่อยสลายโดยสมบูรณ์ (Hydrolyzed sericin) จนทำให้มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa จึงไม่ตรวจพบด้วยการรันเจล SDS-PAGE มาตรฐาน

(สุธาสินี และคณะ, 2550) ซึ่งเป็นขนาดโปรตีนที่เหมาะสมต่อการซึมเข้าสู่ผิวหนังในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Silva et al., 2022)

#### Sample set A :

- 0.12 mg/ml protein
- (0.9 mg/ml protein in final concentration)
- 20 microliter/lane
- (Approx. 18 microgram protein loading)

#### Running condition

- 4%, 12% Fast Cast Acrylamide gel
- Pre-run 100 v, 15 min
- Marker 10 ul/lane
- Run 100 v, 60 min

**M** = Protein marker

**Lane 1** Water-60 °C- 30 min

**Lane 2** Water-60 °C- 60 min

**Lane 3** Water-80 °C- 30 min

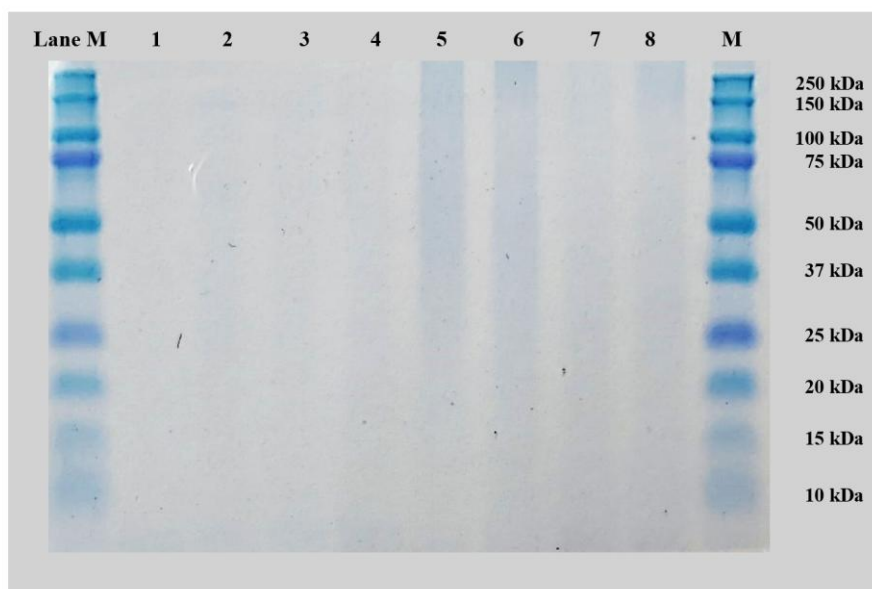
**Lane 4** Water-80 °C- 60 min

**Lane 5** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-60 °C- 30 min

**Lane 6** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-60 °C- 60 min

**Lane 7** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-80 °C- 30 min

**Lane 8** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-80 °C- 60 min



ภาพที่ 8 ผลการรันเจล SDS-PAGE ชุดตัวอย่างจากการสกัดซ้ำที่ 1

#### Sample set B :

- 0.12 mg/ml protein
- (0.9 mg/ml protein in final concentration)
- 20 microliter/lane
- (Approx. 18 microgram protein loading)

#### Running condition

- 4%, 12% Fast Cast Acrylamide gel
- Pre-run 100 v, 15 min
- Marker 10 ul/lane
- Run 100 v, 60 min

**M** = Protein marker

**Lane 1** Water-60 °C- 30 min

**Lane 2** Water-60 °C- 60 min

**Lane 3** Water-80 °C- 30 min

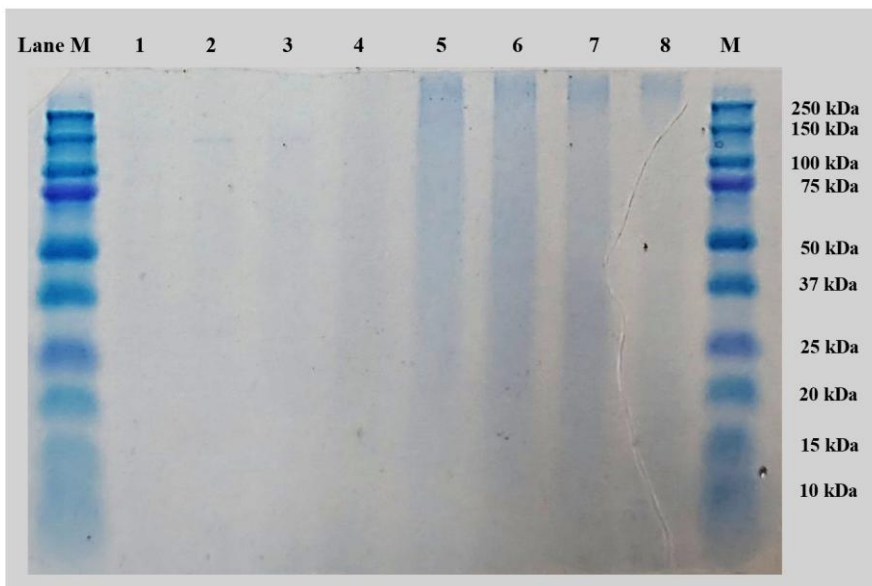
**Lane 4** Water-80 °C- 60 min

**Lane 5** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-60 °C- 30 min

**Lane 6** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-60 °C- 60 min

**Lane 7** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-80 °C- 30 min

**Lane 8** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-80 °C- 60 min



ภาพที่ 9 ผลการรันเจล SDS-PAGE ชุดตัวอย่างจากการสกัดซ้ำที่ 2

**Sample set C :**

- 30 microliter of each sample solution were mixed with 4x Laemmli buffer with 2-mercaptoethanol
- 10 microliter/lane

**Running condition**

- Gradient 4-20% miniProtein TGX stain free
- Pre-run 100 v, 10 min
- Marker 10 uL/lane
- Sample 10 uL/lane
- Run 100 v, 60 min

**M** = Protein marker

**Lane 1** Commercialized sericin

**Lane 2** Water-60 °C- 30 min

**Lane 3** Water-60 °C- 60 min

**Lane 4** Water-80 °C- 30 min

**Lane 5** Water-80 °C- 60 min

**Lane 6** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-60 °C- 30 min

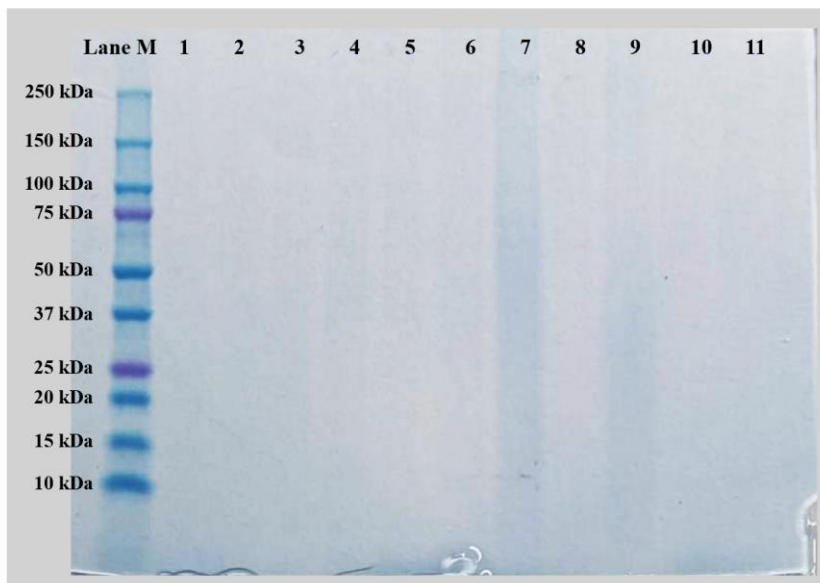
**Lane 7** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-60 °C- 60 min

**Lane 8** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-80 °C- 30 min

**Lane 9** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-80 °C- 60 min

**Lane 10** 4x Laemmli buffer

**Lane 11** Commercialized sericin



ภาพที่ 10 ผลการรันเจล SDS-PAGE ชุดตัวอย่างจากการสกัดซ้ำที่ 3

**Sample set D :**

- 30 microliter of each sample solution were mixed with 4x Laemmli buffer with 2-mercaptoethanol
- 10 microliter/lane

**Running condition**

- Gradient 4-20% miniProtein TGX stain free
- Pre-run 100 v, 10 min
- Marker 10 uL/lane
- Sample 10 uL/lane
- Run 100 v, 60 min

**M** = Protein marker

**Lane 1** Commercialized sericin

**Lane 2** Water-60 °C- 30 min

**Lane 3** Water-60 °C- 60 min

**Lane 4** Water-80 °C- 30 min

**Lane 5** Water-80 °C- 60 min

**Lane 6** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-60 °C- 30 min

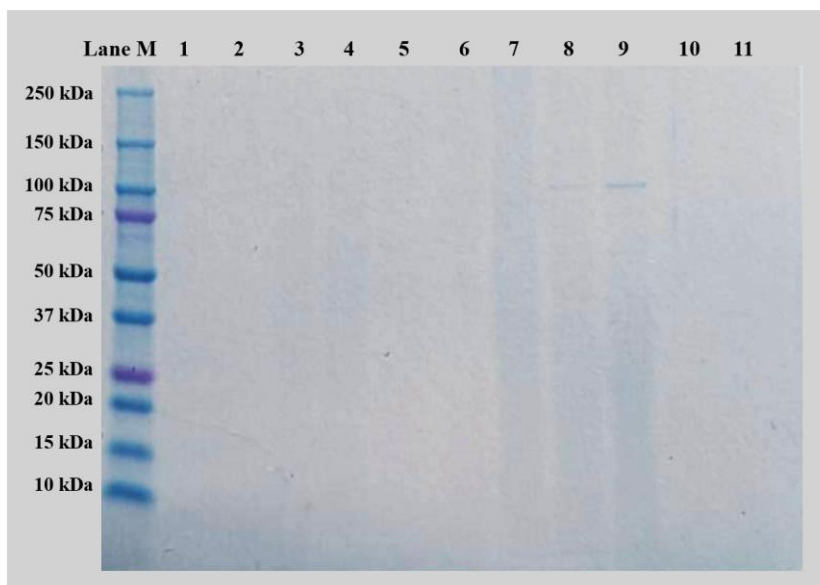
**Lane 7** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-60 °C- 60 min

**Lane 8** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-80 °C- 30 min

**Lane 9** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-80 °C- 60 min

**Lane 10** Commercialized sericin

**Lane 11** Commercialized sericin

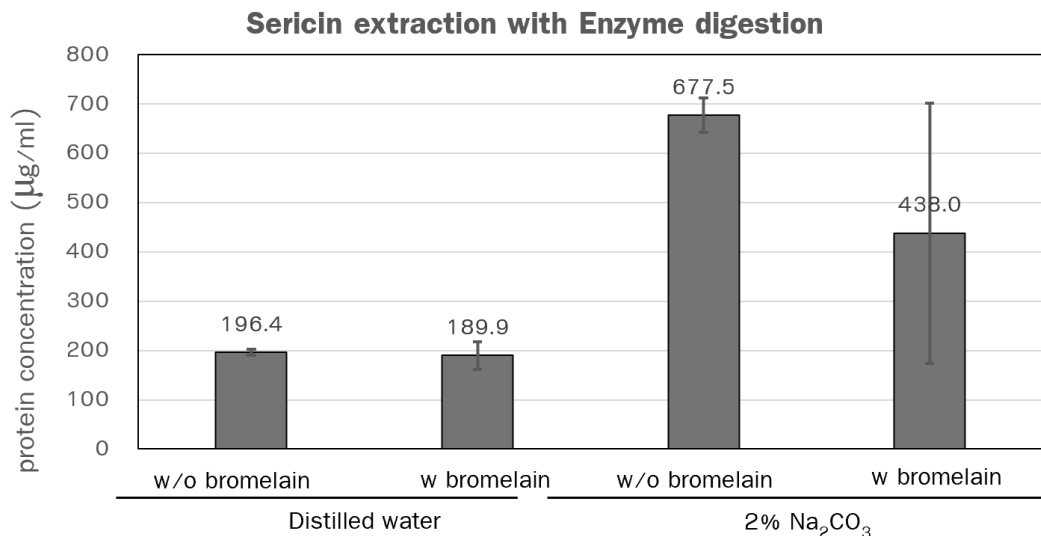


ภาพที่ 11 ผลการรันเจล SDS-PAGE ชุดตัวอย่างจากการสกัดซ้ำที่ 4

#### 4.4 การศึกษาลักษณะของโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดย SDS-PAGE ของสารสกัดเชริซินที่นำมาย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

จากผลการศึกษาการสกัดโปรตีนเชริซินจากรังไหมด้วยตัวทำละลายน้ำ และ สารละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  จากการศึกษาก่อนหน้านี้ สภาวะการสกัดโดยใช้ 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C ระยะเวลา 30 นาที ถูกนำมาทดสอบต่อ โดยการย่อยสารสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนความเข้มข้น 3% W/V ซึ่งจากผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำอิสระ แสดงผลดังในภาพ โดยในเลนที่ 1-3 และ 7-9 คือการสกัดที่ไม่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งในสภาวะการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ไม่พบแถบโปรตีนที่ชัดเจน ในขณะที่การสกัดด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ให้ลักษณะแถบกว้าง ในช่วง ขนาดโมเลกุลมากกว่า 250 kDa แถบช่วงยาวในทุกช่วงขนาดโมเลกุล ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะโปรตีนที่ได้หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ (เลนที่ 4-6 และเลนที่ 10-12) จะพบว่า มีแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 10 kDa ทั้งในสภาวะที่สกัดด้วยน้ำ และสารละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  โดยในการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ ให้ผลการทดลองในทิศทางเดียวกัน จากผลการศึกษาพบว่าทั้งในสภาวะการสกัดด้วยน้ำ และ 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Cysteine protease ทำให้โปรตีนเชริซินที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้กลายเป็นเปปไทด์สายสั้น ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาโดย สุวรรณี และคณะ (2563) ที่ได้รายงานผลว่าสารสกัดเชริซินที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจะมีน้ำหนักโมเลกุลลดลงมาอยู่ในช่วง 4.6-10 kDa ทั้งนี้เป็นข้อสังเกตว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำแต่ไม่มีการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนแทบไม่มีแถบบนเจล แต่เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์กลับปรากฏแถบโปรตีนที่ขนาดเล็กกว่า 10 kDa ได้เช่นเดียวกัน จึงกล่าวได้ว่าการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนสามารถทำงานได้ดีในทั้งสองสารละลายที่ทำการศึกษา ในผลการศึกษาไม่ได้มีการรันเจลเพื่อชี้ชัดถึงแถบโปรตีนที่น่าจะเป็นเอนไซม์โบรมิเลน ซึ่งมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 23.8 kDa แต่จะเห็นได้ว่าแถบที่ปรากฏส่วนมากนั้นมีขนาดเล็กกว่า 10 kDa จึงอนุมานได้ว่าแถบที่พบดังกล่าวเป็นโปรตีนเชริซินที่เกิดการสลายตัวเป็นหลัก

ผลการศึกษาขนาดของโปรตีนเชริซินที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนนี้ แสดงให้เห็นว่าการย่อยสารสกัดด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5% ต่อน้ำหนักรังไหม ส่งผลให้เกิดการย่อยโปรตีนเชริซินที่มีความหลากหลายในเชิงโครงสร้างและขนาดโมเลกุลให้มีขนาดเล็กกว่า 10 kDa ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมแก่การดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม (Johnson et al., 2020) และขนาดของโปรตีนที่ได้มีความสอดคล้องการรายงานผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ที่ความเข้มข้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณโปรตีนที่พบในสารสกัดก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ และยังมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง จึงเป็นสารสกัดที่มีความเหมาะสมในการนำไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวต้นแบบต่อไป



ภาพที่ 12 ความเข้มข้นโปรตีนในสารสกัดเซรีซินที่สกัดได้หลังผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

หมายเหตุ: ข้อมูลค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำอิสระ  
อักษร a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**Sample – Enzyme digestion :**

- 30 microliter of each sample solution were mixed with 4x Laemmli buffer with 2-mercaptoethanol
- 10 microliter/lane

**Running condition**

- Gradient 4-20% miniProtein TGX stain free
- Pre-run 100 v, 10 min
- Marker 10 ul/lane
- Sample 10 ul/lane
- Run 100 v, 60 min

All extraction is under 80 °C- 30 min

**Lane 1** Water- w/o Enz-1

**Lane 2** Water- w/o Enz-2

**Lane 3** Water- w/o Enz-3

**Lane 4** Water- w Enz-1

**Lane 5** Water- w Enz-2

**Lane 6** Water- w Enz-3

**Lane 7** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – w/o Enz-1

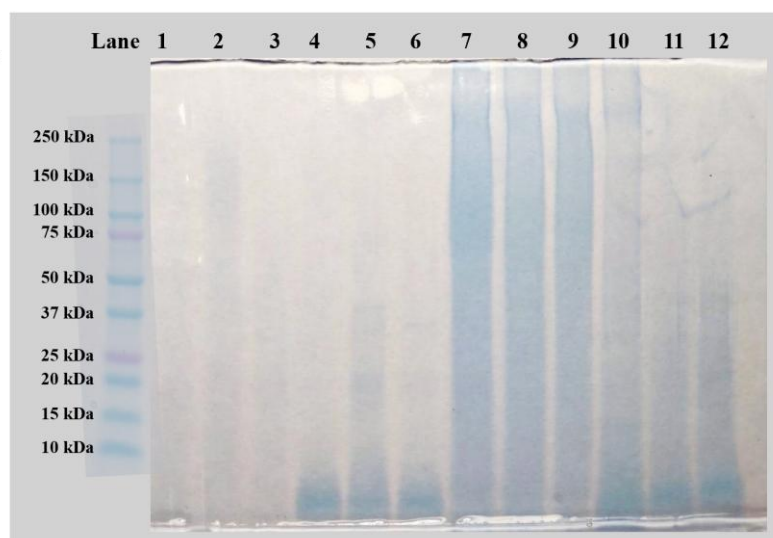
**Lane 8** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – w/o Enz-2

**Lane 9** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – w/o Enz-3

**Lane 10** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – w Enz-1

**Lane 11** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – w Enz-2

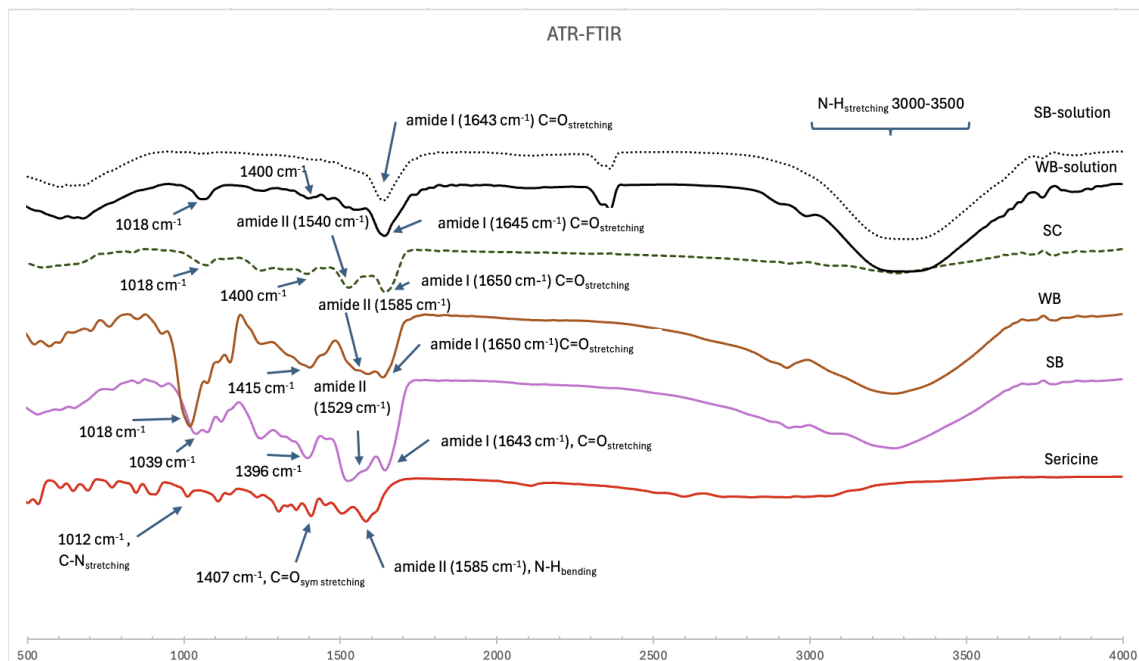
**Lane 12** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – w Enz-3



ภาพที่ 13 ผลการรันเจล SDS-PAGE ของตัวอย่างสารสกัดเซรีซินที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

#### 4.5 ผลการวิเคราะห์ FT-IR

ผลการวิเคราะห์สเปกตรัมอินฟราเรดแบบฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม (ATR-FTIR) ของตัวอย่าง เซรีซินที่ได้จากกระบวนการสกัดต่างๆ แสดงดังภาพที่ 14 พบแถบการดูดกลืนที่เป็น ลักษณะเฉพาะของโปรตีน ได้แก่ แถบ amide I ซึ่งเกิดจากการสั่นแบบ stretching ของพันธะ คาร์บอนิล ( $\text{C}=\text{O}$  stretching) ที่เลขคลื่นประมาณ  $1640\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นช่วงที่สัมพันธ์กับ โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน เช่น  $\beta$ -sheet และ random coil (Byler & Susi, 1986; Seo et al., 2023; Boulet-Audet et al., 2015) นอกจากนี้จะพบแถบ amide II ซึ่งเกิดจากการสั่นของ พันธะ  $\text{N-H}$  bending และ  $\text{C-N}$  stretching ปรากฏในช่วงเลขคลื่น  $1520\text{--}1585\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นแถบที่ไว ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีน (Seo et al., 2023; Rodin and Belton, 2022) สำหรับ ตัวอย่างเซรีซินเชิงพาณิชย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางแสดงสัญญาณแถบ amide I และ amide II ที่เลขคลื่น  $1643\text{ cm}^{-1}$  และ  $1585\text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ บ่งชี้ถึงโครงสร้างแบบ  $\beta$ -sheet ซึ่งมีความเสถียรจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโพลีเปปไทด์ นอกจากนี้ยังพบแถบที่เลขคลื่น  $1407\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นการสั่นของพันธะ  $\text{C}=\text{O}$  ( $\text{C}=\text{O}$  symmetric stretching) ของหมู่คาร์บอกซิเลต ( $\text{COO}^-$ ) แสดงถึงการมีอยู่ของกรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลไฟด์ภายในโครงสร้างของเซรีซิน (Seo et al., 2023) ใน ส่วนของตัวอย่าง SB ที่ทำการสกัดด้วยสารละลาย  $0.2\% \text{ Na}_2\text{CO}_3$  และตามด้วยการย่อยด้วย เอนไซม์โบรมิเลนพบแถบ amide I ที่เลขคลื่น  $1643\text{ cm}^{-1}$  และ amide II ที่ เลขคลื่น  $1529\text{ cm}^{-1}$  การเลื่อนตำแหน่งและการลดความเข้มของแถบเมื่อเทียบกับเซรีซินเชิงพาณิชย์ แสดงให้ เห็นถึงการแตกของพันธะเพปไทด์บางส่วน และการลดจำนวนพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดจาก กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ สำหรับตัวอย่าง WB ซึ่งได้จากการสกัดด้วยน้ำแล้วตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ bromelain พบแถบ amide I ที่เลขคลื่นประมาณ  $1650\text{ cm}^{-1}$  และ amide II ที่  $\sim 1585\text{ cm}^{-1}$  การเลื่อนของแถบ amide I ไปยังค่าความยาวคลื่นที่สูงขึ้นแสดงถึง การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีนจากแบบ  $\beta$ -sheet ไปสู่ random coil ซึ่งบ่งชี้ว่าการย่อย ด้วยเอนไซม์หลังการสกัดด้วยน้ำส่งผลให้สายโปรตีนมีการคลายตัวและเปิดโครงสร้างมากขึ้นใน ขณะที่ตัวอย่าง SC ที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย  $0.2\% \text{ Na}_2\text{CO}_3$  เท่านั้น พบแถบ amide I ที่ เลขคลื่น  $1645\text{ cm}^{-1}$  และ amide II ที่  $1540\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งใกล้เคียงกับสเปกตรัมของเซรีซินทั่วไป แต่มีความเข้มลดลงเล็กน้อย อาจบอกได้ว่าการสกัดด้วยด่างเพียงอย่างเดียว สามารถรักษา โครงสร้างเพปไทด์หลักไว้ได้ แม้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธะไฮโดรเจนบางส่วนนอกจากนี้ จะเห็นแถบกว้างในช่วงเลขคลื่น  $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  ที่พบในสเปกตรัมของ SB-solution และ WB-solution สัมพันธ์กับการสั่นของพันธะ  $\text{N-H}$  stretching ของหมู่ amide ซึ่งมีความเด่นชัดมาก ขึ้น สะท้อนถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่อะมิโน ของโปรตีนกับโมเลกุลของน้ำภายหลัง การย่อยและละลายเนื่องจากเป็นตัวอย่างในรูปสารละลาย นั่นคือจากผลการวิเคราะห์สเปกตรัม ATR-FTIR แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสกัดและการย่อยด้วยเอนไซม์มีผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิ ของโปรตีนเซรีซินอย่างชัดเจน ทั้งในแง่ของการเปลี่ยนแปลงแถบ amide I และ II ซึ่งบ่งบอกถึง การเปลี่ยนแปลงสมดุลระหว่างโครงสร้างแบบ  $\beta$ -sheet และ random coil ของโปรตีน



ภาพที่ 14 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค ATR-FTIR ของสารสกัดเซรีซินในสถานะต่างๆ  
SB solution (เส้นประสีดำ): ตัวทำละลายน้ำ

WB solution (เส้นสีดำทึบ): ตัวทำละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

SC (เส้นประสีเขียว): ผงแห้งของสารสกัดเซรีซินด้วยตัวทำละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

WB (เส้นสีน้ำตาล): ผงแห้งของสารสกัดเซรีซินด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น/ ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

SB (เส้นสีชมพู): ผงแห้งของสารสกัดเซรีซินด้วยตัวทำละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  /ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

Sericin (เส้นสีแดง): สารสกัดเซรีซินเชิงพาณิชย์ (Hydrolyzed sericin)

#### 4.6 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเซรีซิน

การทดลองนี้ศึกษาผลของวิธีการสกัดและการใช้เอนไซม์โบรมิเลนต่อประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนเซรีซินจากรังไหม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า วิธีการสกัดมีผลต่อทั้งปริมาณสารสกัดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย

วิธีการสกัดด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  มีประสิทธิภาพในการให้ผลผลิตสารสกัดสูงสุด โดยได้สารสกัดสูงมากถึง 24.10–25.45% ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนเซรีซินในรังไหม (Cao & Zhang, 2016) แต่กลับมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระน้อย (TEAC = 0.37) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าการย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนเซรีซินด้วยต่างก่อให้เกิดการย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนอย่างรุนแรงจนสูญเสียองค์ประกอบสำคัญ หรือกรดอะมิโนที่มีหมู่มิซิวซึ่งช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ และส่งผลให้คุณสมบัติทางชีวภาพบางอย่างของเซรีซินลดลง เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Hobanthad, 2018; Kabir et al, 2024; Aad & Versentini, 2024) ในขณะที่การสกัดด้วยน้ำร้อนที่ให้ผลผลิตสารสกัดต่ำกว่าที่ประมาณ 8.64% กลับให้ค่า  $\text{IC}_{50}$  ที่ดีกว่า (1359.30  $\mu\text{g/ml}$ ) และให้ค่า TEAC ถึง 0.78 ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวน่าจะมาจากการสกัดด้วยสภาวะที่ไม่รุนแรงสามารถช่วยรักษาโครงสร้างปฐมภูมิและกรดอะมิโนที่มีหมู่มิซิวเช่น เซอรีน

(Serine) และทรีโอนีน (Threonine) ได้ดีกว่า (วิชุดา และสุนทรต์, 2566; Hong et al., 2019) ที่น่าสนใจคือเมื่อมีการย่อยสารถักด้วยเอนไซม์โบรมิเลนทั้งในสารถักด้วยตัวทำละลายน้ำ (WB) และ 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (SB) สามารถส่งผลให้ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารถักดีขึ้น โดยมีค่า TEAC เพิ่มขึ้นจาก 0.78 และ 0.37 เป็น 0.84 และ 0.83 ตามลำดับ โดยเฉพาะในสารถักด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีขึ้นเกือบ 2.3 เท่า เป็นการยืนยันถึงการเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารถักเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (สุวรรณ และคณะ, 2020) ในเชิงกลไกทางชีวเคมี สามารถอธิบายถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นของสารถักที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ได้โดยหลักการคือ การย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัดพันธะเพปไทด์ในโปรตีนเซรีซิน ทำให้ได้ขนาดโมเลกุลที่เล็กลงกว่า 10 kDa เปปไทด์สายสั้นนี้มีความสามารถในการเข้าถึงตำแหน่งของอนุมูลอิสระได้ดีกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีอุปสรรคเชิงโครงสร้าง (Omar et al., 2021) นอกจากนั้นการย่อยด้วยเอนไซม์ยังช่วยเปิดเผยหมู่ฟังก์ชันภายในโปรตีนเซรีซิน เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของกรดอะมิโนเซอรีน และทรีโอนีน หรือกรดอะมิโนที่มีวงแหวนอะโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน ฟีนอลอะลานีน และทริптоเฟน ซึ่งมีความสามารถในการเป็นตัวให้อะตอมไฮโดรเจน หรือตรึงอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น (สุวรรณ และคณะ, 2020) จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองทั้งหมดในเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรมความงามแล้ว การสารถักด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที และนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนความเข้มข้น 5% จึงเป็นสภาวะการสารถักที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ผลผลิตสารถักสูง (25.45%) ความเข้มข้นของโปรตีนและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ในด้านการบำรุงผิวต่อไป

**ตารางที่ 6** ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารถัก

| ตัวทำละลาย/เอนไซม์                                | สภาวะการสารถัก | เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสารถัก (W/V) | เปอร์เซ็นต์ผลผลิตผงเซรีซินหลังการพ่นฝอย (Spray dry) | ค่า $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระเทียบ Trolox (TEAC ratio) |
|---------------------------------------------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Trolox                                            | สารมาตรฐาน     | -                             | -                                                   | 1066.01                                   | 1.00                                                   |
| น้ำกลั่น (WC)                                     | 80 °C, 30 นาที | 8.64                          | 0.25                                                | 1359.30                                   | 0.78                                                   |
| น้ำกลั่น/<br>5% โบรมิเลน (WB)                     | 80 °C, 30 นาที | 8.63                          | 1.83                                                | 1267.00                                   | 0.84                                                   |
| 0.2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (SC)               | 80 °C, 30 นาที | 24.10                         | 11.35                                               | 2872.54                                   | 0.37                                                   |
| 0.2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ / 5% โบรมิเลน (SB) | 80 °C, 30 นาที | 25.45                         | 10.25                                               | 1279.34                                   | 0.83                                                   |

#### 4.7 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ความงามต้นแบบ

สารสกัดโปรตีนเซรีซินในรูปแบบสารละลายจาก 2 กรรมวิธีได้แก่ 1) สารสกัดด้วยตัวทำละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C ระยะเวลา 30 นาที ที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและ 2) สารสกัดในสภาวะเดียวกันและผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เซรัมบำรุงผิวต้นแบบ โดยผสมสารสกัดที่ 2.5 % ในสูตรเซรัมพื้นฐานดังรายละเอียดที่ในตารางที่ 4.3 โดยสูตรฐานดังกล่าวเป็นสูตรผลิตภัณฑ์เซรัมที่ได้รับการพัฒนาโดยบริษัทนาอีฟอินโนว่าจำกัด ให้มีความคงตัวและมีสภาวะความเป็นกรดต่างที่มีความเหมาะสมแก่การใช้งานแล้ว ลักษณะเนื้อเซรัมที่ได้มีสีเหลืองอ่อนใส มีความหนืดเล็กน้อย มีค่า pH อยู่ในช่วง 6-6.5 เซรัมถูกบรรจุในขวดบรรจุภัณฑ์แก้วพร้อมฝาปิดในลักษณะหลอดหยด ขนาด 30 ml (ภาพที่ 4.10) ภายใต้ชื่อแบรนด์ “Silkéra” อ่านว่า ซิล-เคร่า โดยชื่อผลิตภัณฑ์มีที่มาจากการผลิตคำว่า Silk ซึ่งหมายถึงไหม และคำว่า era ที่หมายถึงช่วงเวลายาวนานที่มีลักษณะเด่นชัด หรือยุคสมัย เพื่อต้องการสื่อให้เห็นถึงตัวตนของแบรนด์สินค้าที่สื่อถึงความหรูหราที่จับต้องได้ และความลึกซึ้งของช่วงเวลา ในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ “รักษาความอ่อนเยาว์ข้ามกาลเวลา” โดยในผลิตภัณฑ์ต้นแบบมีส่วนผสมที่ช่วยก่อให้เกิดความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังหลากหลายชนิด ทั้งตัวสารสกัดเซรีซิน กลีเซอริน และกรดไฮยาลูโรนิก ทั้งนี้สารเซรีซินเป็นสารที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางอย่างกว้างขวาง เนื่องจากประสิทธิภาพที่ดีต่อผิวในด้านต่างๆ เช่น การต้านรังสี UV, การเพิ่มความสว่างสีผิว และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Cao & Zhang, 2016)

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เซรัมบำรุงผิวหน้าผสมสารสกัดเซรีซินต้นแบบ

| ลำดับ | ส่วน | ส่วนประกอบ           | INCI Name                                                    | คุณสมบัติของสาร            | เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก |
|-------|------|----------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1     | A    | Water                | Aqueous                                                      | Solvent                    | 72.35                 |
| 2     |      | 2NaEDTA              | Disodium EDTA                                                | Chelating agent            | 0.1                   |
| 3     |      | Allantoin            | Allantoin                                                    | Soothing agent             | 0.2                   |
| 4     |      | Niacinamide          | Vitamin B3                                                   | Brightening                | 3                     |
| 5     |      | Witch hazel          | Hamamelis Virginiana                                         | Reducing acne              | 2                     |
| 6     |      | Microcare            | Phenoxyethanol (and) Chlorphenesin (and) Aqua (and) Glycerin | Preservative               | 0.6                   |
| 7     |      | สารสกัดโปรตีนเซรีซิน | -                                                            | Active Ingredient          | 2.5                   |
| 9     | B    | PEG-40               | PEG-40 Hydrogenated                                          | Solubilizer                | 3                     |
|       |      |                      | castor oil                                                   |                            |                       |
| 10    |      | Perfume              | Perfume                                                      | Flavor                     | 0.2                   |
| 11    | C    | Butylene Glycol      | Butylene glycol                                              | Cosolvent                  | 7                     |
| 12    |      | Glycerin             | Glycerin                                                     | Moisturizing, Penetration  | 8.5                   |
| 13    | D    | Hyaluronic acid      | Hyaluronic acid                                              | Moisturizing and Hydrating | 0.05                  |
|       |      | HEC                  | Hydroxyethylcellulose                                        | Stabilizer                 | 0.5                   |

หมายเหตุ สูตรตำรับผลิตภัณฑ์เซรัมฐานที่พัฒนาให้มีความคงตัวแล้วโดยบริษัทนาอีฟอินโนว่าจำกัด



ภาพที่ 15 ผลิตภัณฑ์เซรั่มผสมสารสกัดโปรตีนเซรีซินต้นแบบ  
(ที่มา: ออกแบบแบรนด์สินค้า และฉลากโดย นางสาวเพ็ญพรรณ โกมลศิริ)

ในการศึกษาในครั้งนี้ทางทีมผู้วิจัยได้ดำเนินการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการที่เหมาะสมในการสกัดแยกโปรตีนเซรีซินอย่างเหมาะสม ให้แก่สมาชิกกลุ่มวิสาหกิจ ซึ่งมีผลสำคัญอย่างยิ่งต่อทั้งปริมาณของสารสำคัญ และฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้ของสารสกัด โดยแนวทางในการถ่ายทอดความรู้เป็นไปในรูปแบบการเรียนรู้จากการให้ลองลงมือปฏิบัติในการสกัดเปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยน้ำร้อน สารละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  และประกอบด้วยการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด เพื่อให้สามารถมองเห็นผลความแตกต่างของปริมาณสารที่ได้จากประสบการณ์จริง และได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ที่ดีของสารสกัดเพื่อก่อให้เกิดความเข้าใจในผลิตภัณฑ์ และการแลกเปลี่ยนความคิดเห็นเกี่ยวกับการกำหนดราคาที่มีความคุ้มค่า และการยกตัวอย่างในการคำนวณความคุ้มค่าทุนอย่างง่ายในการผลิต และจำหน่ายสินค้า



ภาพที่ 16 การถ่ายทอดองค์ความรู้ในกระบวนการสกัดโปรตีนเซรีซินจากขิงใหม่ และแนวทางการต่อยอดสู่ผลิตภัณฑ์เพื่อการจำหน่ายของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงไหม

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 สภาวะที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมสีทอง จากการศึกษาเปรียบเทียบการสกัด 8 กรรมวิธีและมีความเหมาะสมในการนำไปต่อยอดประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ได้แก่การใช้ ตัวทำละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C ระยะเวลา 30 นาที ภายใต้การใช้คลื่นความถี่สูง โดยสภาวะดังกล่าวให้ผลผลิตสารสกัดสูงที่สุดที่  $20.76 \pm 0.92\%$  และให้ปริมาณโปรตีนที่ทำการวัดด้วยเทคนิค Bradford assay สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ  $395.98 \pm 11.60 \mu\text{g/ml}$  ซึ่งในการสกัดด้วยตัวทำละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ให้ผลการสกัดโปรตีนที่ดีกว่าการใช้ตัวละลายน้ในสภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาเดียวกันมากถึง 2 เท่า

5.1.2 จากการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนเซรีซินที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนเซรีซินที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วงขนาดที่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อนหน้า (10-400 kDa) โดยขนาดของโปรตีนเซรีซินที่พบในการศึกษานี้มีทั้งโปรตีนเซรีซินที่มีขนาดมากกว่า 250 kDa ขนาดในช่วง 100 kDa และขนาดในช่วง 10-25 kDa โดยการสกัดด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ให้ผลแถบโปรตีนชัดเจนกว่าการสกัดด้วยน้ำ และการสกัดที่อุณหภูมิ 80 °C ส่งผลให้เกิดแถบโปรตีนเซรีซินที่มีขนาดลดลงเมื่อเทียบกับการสกัดที่อุณหภูมิ 60 °C เล็กน้อย โดยคาดว่ามาจากการสลายตัวของโปรตีนที่เกิดจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้การสกัดในการศึกษานี้ยังสามารถคงสภาพโปรตีนเซรีซินขนาดโมเลกุลใหญ่ไว้ได้ส่วนหนึ่ง

5.1.3 การย่อยสารสกัดที่ได้ด้วยเอนไซม์โบรมิเลนความเข้มข้น 5% (w/w) มีประสิทธิภาพดีในการย่อยโปรตีนเซรีซินทั้งจากการสกัดด้วยน้ำ และ 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ส่งผลให้ได้โปรตีนเซรีซินขนาดโมเลกุลเล็ก ที่มีขนาดต่ำกว่า 10 kDa ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมต่อการดูดซึมเข้าสู่ชั้นผิวหนังในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลขนาดโปรตีนที่วิเคราะห์ได้โดยเทคนิค SDS-PAGE มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR ที่บ่งชี้ถึงการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีนจากแบบ beta-sheet สู่โครงสร้างแบบ Random coil ที่เพิ่มมากขึ้นหลังขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์

5.1.4ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ ของสารสกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพสูง (TEAC = 0.78) ในทางตรงกันข้าม สารสกัดด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  มีประสิทธิภาพต่ำ (TEAC = 0.37) อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารสกัดมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ได้ส่งผลให้ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระทั้งในชุดที่สกัดด้วยน้ำ และ 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (TEAC = 0.84 และ 0.83 ตามลำดับ) โดยเฉพาะในสารสกัดด้วย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีขึ้นถึง 2.3 เท่า

5.1.5 ในการศึกษา ได้มีการนำสารสกัดจากสภาวะที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ การสกัดด้วย ตัวทำละลาย 0.2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ที่อุณหภูมิ 80 °C ระยะเวลา 30 นาที ภายใต้การใช้คลื่นความถี่สูง และย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวดันแบบภายใต้ชื่อแบรนด์ “silkéra” ซึ่งในผลิตภัณฑ์ใช้สารสกัดดังกล่าวเป็นส่วนผสมถึง 2.5% ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงตัว มีค่า

pH (6-6.5) ที่เหมาะสมต่อการใช้งานกับผิว และทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านกระบวนการสกัด และแนวทางการต่อยอดผลิตภัณฑ์ต้นแบบสู่การจำหน่ายจริงในตลาดโดยกลุ่มวิสาหกิจฯ เพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบรังไหมในท้องถิ่นต่อไป

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการศึกษาในอนาคตควรมีการทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ รวมถึงการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในด้านประสิทธิภาพต่อการเพิ่มความชุ่มชื้นและการลดริ้วรอยในอาสาสมัคร

5.2.2 ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนต่อคุณสมบัติทางชีวภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ เนื่องจากกระบวนการย่อยบางส่วน (Partial digestion) อาจส่งผลให้ได้สารสกัดที่มีการกระจายตัวของขนาดโมเลกุลที่เหมาะสม ทั้งเปปไทด์ขนาดเล็กที่ซึมซาบได้ดีและเปปไทด์ขนาดกลางที่ช่วยในการสร้างฟิล์มเคลือบผิว ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในด้านการรักษาความชุ่มชื้นและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้สูงสุด โดยหลีกเลี่ยงการย่อยสลายที่มากเกินไปจนสูญเสียคุณสมบัติสำคัญ

5.2.3 ในการต่อยอดการศึกษา ควรมีการศึกษากการสกัดแบบเฉพาะชั้น (Layer extraction) เพื่อสกัดเฉพาะส่วนโปรตีนเซรีซินชั้นนอก (Outer layer sericin) ซึ่งเป็นชั้นโปรตีนที่มีรายงานการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าโปรตีนเซรีซินชั้นลึกลงไป และมีเสถียรภาพทางความร้อนที่สูงกว่า ร่วมกันการใช้นาโนเทคโนโลยีในการกักเก็บสารสกัดเพื่อลดการเสื่อมง่ายของโปรตีน และเป็นการช่วยส่งเสริมการดูดซึมสารสกัดเข้าสู่ชั้นผิวที่ลึกมากยิ่งขึ้น หรือช่วยควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ในยาวนาน

## บรรณานุกรม

- Aad, R., Dragojlov, I., & Vesentini, S. (2024). Sericin protein: Structure, properties, and applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(1), 322. <https://doi.org/10.3390/jfb15110322>
- Ahmad, R., Kamra, A., & Hasnain, S. E. (2004). Fibroin silk proteins from the nonmulberry silkworm *Philosamia ricini* are biochemically and immunochemically distinct from those of the mulberry silkworm *Bombyx mori*. *DNA and cell biology*, 23(3), 149-154.
- Ahsan, F., Ansari, T. M., Usmani, S., & Bagga, P. (2018). An insight on silk protein sericin: From processing to biomedical application. *Drug Development Research*, 68(4), 317–327.
- Aramwit, P., & Bang, N. (2014). The characteristics of bacterial nanocellulose gel releasing silk sericin for facial treatment. *BMC biotechnology*, 14(1), 104.
- Aramwit, P., Damrongsakkul, S., Kanokpanont, S., & Srichana, T. (2010a). Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(2), 91–98. <https://doi.org/10.1042/BA20090186>
- Aramwit, P., Kanokpanont, S., Nakpheng, T., & Srichana, T. (2010b). The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(5), 2200–2211. <https://doi.org/10.3390/ijms11052200>
- Aramwit, P., Towiwat, P., & Srichana, T. (2013). Anti-inflammatory potential of silk sericin. *Natural Product Communications*, 8(4), 501–504.
- Barajas-Gamboa, J. A., Serpa-Guerra, A. M., Restrepo-Osorio, A., & Álvarez-López, C. (2016). Sericin applications: a globular silk protein. *Ingeniería y competitividad*, 18(2), 193-206.
- Bio-Rad Laboratories. (2015). *Quick Start™ Bradford protein assay: Instruction manual* (Bulletin 4110065A). Retrieved from <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>.
- Boulet-Audet, M., Vollrath, F., & Holland, C. (2015). Identification and classification of silks using infrared spectroscopy. *Journal of Experimental Biology*, 218(19), 3138-3149.
- Byler, D. M., & Susi, H. (1986). Determination of Secondary Structure of Proteins from Their Infrared Spectra. *Biopolymers*, 25(3), 469–487. [https://jenalib.leibniz-fl.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE\\_FTIR.html?utm\\_source=chatgpt.com](https://jenalib.leibniz-fl.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html?utm_source=chatgpt.com)

Cao, T. T., & Zhang, Y. Q. (2017). The potential of silk sericin protein as a serum substitute or an additive in cell culture and cryopreservation. *Amino Acids*, 49(6), 1029-1039.

Cao, T.-T., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.082>

Çapar, G., & Aygün, S. S. (2015). Characterization of sericin protein recovered from silk wastewater. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 72(3).

Da Silva, T. L., Da Silva, A. C., Ribani, M., Vieira, M. G. A., Gimenes, M. L., & Da Silva, M. G. (2014). Evaluation of molecular weight distribution of sericin in solutions concentrated via precipitation by ethanol and precipitation by freezing/thawing. *Chem. Eng. Trans*, 38, 103-108.

Das, G., Shin, H.-S., Campos, E. V. R., Fraceto, L. F., Rodriguez-Torres, M. D., Mariano, K. C. F., de Araujo, D. R., Fernández-Luqueño, F., Grillo, R., & Patra, J. K. (2021). Sericin-based nanoformulations: A comprehensive review on molecular mechanisms of interaction with organisms to biological applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 30. <https://doi.org/10.xxxx/yyyy>

Dash, R., Mandal, M., Ghosh, S. K., & Kundu, S. C. (2008). Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 311(1), 111–119.

Fatahian, R., Fatahian, A., Fatahian, E., & Fatahian, H. (2021). A critical review on application of silk sericin and its mechanical properties in various industries. *Journal of Research and Applications in Mechanical Engineering*, 9(2).

Galiano, F., Briceño, K., & Marino, T. (2018). Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications. *Journal of Membrane Science*, 564, 562–586.

Gamo, T., Inokuchi, T., & Laufer, H. (1997). Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*, 7(3), 285–295.

Gençtürk, M. (2021). *Sericin protein recovery from silk degumming wastewater in pilot scale via membrane hybrid process* (Master's thesis, Middle East Technical University). Middle East Technical University Repository.

Hobanthad, T. (2018). Extraction of sericin from Thai native silk (Nangsew) yarn using mulberry (cv. Buriram 60) leaves extracts as a greener solvent. *SNRU Journal of Science and Technology*, 10(3), 156–164.

Hong, S. M., Choi, S. C., Park, H. M., & Seok, Y. S. (2019). Preparation and characterization of sericin powder extracted with deep sea water. *3 Biotech*, *9*(1), 30. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1558-7>.

Hurst, G. H. (1892). Silk dyeing, printing, and finishing. *Nature*, *46*, 75–34.

Johnson, W., Jr., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Jr., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., & Heldreth, B. (2020). Safety assessment of silk protein ingredients as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, *39*(3\_suppl), 127S–144S. <https://doi.org/10.1177/1091581820966953>

Kabir, M., Hasan, M. K., Rafi, M. N., Repon, M. R., Islam, T., Saha, J., & Rahman, M. (2024). Biowaste transformation to functional materials: Structural properties, extraction methods, applications, and challenges of silk sericin. *ChemistrySelect*, *9*, e202403777.

Kim, J. Y., Kim, S. G., & Garagiola, U. (2023). Relevant properties and potential applications of sericin in bone regeneration. *Current Issues in Molecular Biology*, *45*(8), 6728-6742.

Kirikawa, M., Kasaharu, T., Kishida, K., & Akiyama, D. (2000). Silk protein micropowders for coating with excellent feeling, antistaticity, and moisture absorbability and releasability, and their manufacture. *Chemical Abstracts*, *132*(1), 8–20.

Lee, H. G., Jang, M. J., Park, B. D., & Um, I. C. (2023). Structural characteristics and properties of redissolved silk sericin. *Polymers*, *15*(16), 3405.

Lee, H. G., Jang, M. J., Park, B.-D., & Um, I. C. (2023). Structural characteristics and properties of redissolved silk sericin. *Polymers*, *15*(3405). <https://doi.org/10.3390/polym15163405>

Lee, K. H. (2004). Silk sericin retards the crystallization of silk fibroin. *Macromolecular Rapid Communications*, *25*, 1792–1796.

Manesa, K. C., Kebede, T. G., Dube, S., & Nindi, M. M. (2020). Profiling of silk sericin from cocoons of three Southern African wild silk moths with a focus on their antimicrobial and antioxidant properties. *Materials (Basel)*, *13*(24), 5706. <https://doi.org/10.3390/ma13245706>

Manosroi, A., Boonpisuttinant, K., Winitchai, S., Manosroi, W., & Manosroi, J. (2010). Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of oils and sericin extracted from Thai native silkworms (*Bombyx mori*). *Pharmaceutical Biology*, *48*(8), 855-860.

Michaille, J.-J., Couble, P., Prudhomme, J.-C., & Garel, A. (1986). A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori*. *Biochimie*, *68*(10), 1165–1173.

Monthatong, M., & Jitjak, W. (2016). Utilization of sericin on water mold growth inhibition and serum substitution in cell culture. *KKU Science Journal*, 44(1), 22–31.

Nilforoushzadeh, M. A., Amirkhani, M. A., Zarrintaj, P., Salehi Moghaddam, A., Mehrabi, T., Alavi, S., & Mollapour Sisakht, M. (2018). Skin care and rejuvenation by cosmeceutical facial mask. *Journal of cosmetic dermatology*, 17(5), 693-702.

Omar, A., Gao, Y., Wubulikasimu, A., Arken, A., Aisa, H. A., & Yili, A. (2021). Effects of trypsin-induced limited hydrolysis on the structural, functional, and bioactive properties of sericin. *RSC advances*, 11(41), 25431-25440.

Padamwar, M. N., & Pawar, A. P. (2004). Silk sericin and its applications: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63(4), 323–329.

Razikova, M., Rasulova, D., Mirzayeva, D., & Mirkhodjayeva, D. (2023). Separation and physico-chemical analysis of sericin protein from silk. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 434, p. 03040). EDP Sciences.

Rodin, V. V., & Belton, P. S. (2022). Changes in Natural silk Fibres by hydration, tensile loading and heating as studied by <sup>1</sup>H NMR: anisotropy in NMR relaxation times. *Polymers*, 14(17), 3665.

Saha, J. H., Mondal, M. I., Karim Sheikh, M. R., & Habib, M. A. (2019). Extraction, structural and functional properties of silk sericin biopolymer from *Bombyx mori* silk cocoon waste. *Journal of Textile Science and Engineering*, 9, 2–20.

Seo, S. J., Das, G., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2023). Silk Sericin Protein Materials: Characteristics and Applications in Food-Sector Industries. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4951. <https://doi.org/10.3390/ijms24054951>

Shah, A., Buabeid, M.-A., & Arafa, E.-A. (2019). The wound healing and antibacterial potential of triple-component nanocomposite (chitosan-silver-sericin) films loaded with moxifloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 564, 22–38.

Silva, A.S., Costa, E.C., Reis, S., Spencer, C., Calhelha, R.C., Miguel, S.P., Ribeiro, M.P., Barros, L., Vaz, J.A. and Coutinho, P. (2022). Silk sericin: a promising sustainable biomaterial for biomedical and pharmaceutical applications. *Polymers*, 14(22), 4931.

Su, D., Ding, S.-L., & Shi, W.-L. (2019). *Bombyx mori* silk-based materials with implication in skin repair: Sericin versus regenerated silk fibroin. *Journal of Biomaterials Applications*, 34(1), 36–46.

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), 2715-2718.

Teramoto, H., & Miyazawa, M. (2005). Molecular orientation behavior of silk sericin film as revealed by ATR infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6(4), 2049-2057.

Tokutake, S. (1980). Isolation of the smallest component of silk protein. *Biochemical Journal*, 187(2), 413-417.

Wang, H., & Zhou, B. (2020). Development and performance study of a natural silk fiber facial mask paper. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 15, 1–8. <https://doi.org/10.1177/1558925020975756>

Wang, W. H., Lin, W. S., Shih, C. H., Chen, C. Y., Kuo, S. H., Li, W. L., & Lin, Y. S. (2021). Functionality of silk cocoon (*Bombyx mori* L.) sericin extracts obtained through high-temperature hydrothermal method. *Materials*, 14(18), 5314.

Xue, R., Liu, Y., Zhang, Q., Liang, C., Qin, H., Liu, P., ... & Wei, Y. (2016). Shape changes and interaction mechanism of Escherichia coli cells treated with sericin and use of a sericin-based hydrogel for wound healing. *Applied and environmental microbiology*, 82(15), 4663-4672.

Zhang, M., Cao, T.-T., & Wei, Z.-G. (2019). Silk sericin hydrolysate is a potential candidate as a serum-substitute in the culture of Chinese hamster ovary and Henrietta Lacks cells. *Journal of Insect Science*, 19(1), 1–12.

Zhang, Y. Q. (2002). Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advances*, 20(2), 91–100.

Zhang, Y.-Q., Tao, M.-L., Shen, W.-D., Zhou, Y.-Z., Ding, Y., Ma, Y., & Zhou, W.-L. (2004). Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*, 25(17), 3751–3759.

Zhao, Z. L., & 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.

เกียรติชัย ดวงศรี. (2553). การใช้สารสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมเสีย [วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี].

กรมหม่อนไหม. (2562). จดหมายข่าว กรมหม่อนไหม ปีที่ 10 ฉบับที่ 2/2562. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. <https://qsds.go.th/wp-content/uploads/2019/06/2r2019.pdf>

กรมหม่อนไหม. (2564). เฉลิมราชพัสดรา (Grace of the Queen's Attire). กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. <https://online.fliphtml5.com/bobzp/azhx/#p=4>

กรมหม่อนไหม. (2565). แผนปฏิบัติการราชการ ระยะ 5 ปี (พ.ศ. 2566 - 2570) กรมหม่อนไหม. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. <https://qsds.go.th/wp-content/uploads/2026/01/Plan5Yea8r2566-2570.pdf>

กรมหม่อนไหม. (2565). ข้อมูลสถิติด้านหม่อนไหม ย้อนหลัง 10 ปี ตารางที่ 1 ปริมาณเส้นไหมดักแด้ ผ้าไหมที่ผ่านการรับรองมาตรฐานตรานกยูงพระราชทาน ปี พ.ศ. 2555 - 2565. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. <https://qsds.go.th/qsisplan/wp-content/uploads/sites/119/2022/12/Stat-10-Year-2012-2022.pdf>

ธนาภา เลิศชัยนดี และคณะ. (2563). คุณสมบัติและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮโดรเจลที่ผสมเซรีซินจากงาช้าง J108. *วารสารวิจัย มข. (ฉบับพิเศษศึกษา)*, 20(3), 201-210.

ธัญพรรณ ฮ่อบรรทัด. (2564). ประสิทธิภาพการสกัดเซรีซินจากเส้นไหมโดยใช้เถ้าเปลือกกุ้งและขี้เถ้าลูกขนุน. *ราชภัฏวิจัยครั้งที่ 4*, 1163-1172.

บุษรา ระวีญู, สมหมาย นิลพันธุ์, พินัย ห่องทองแดง, และ มาโนช ปัญญวานิช. (2545). *ไหมป่าและการใช้ประโยชน์*. กรมวิชาการเกษตร. <http://lib.doa.go.th/multim/BB00161.pdf>

วิชุดา จันทร์ข้างแรม และ สุนทรต์ ชูลักษณ์. (2566). ปริมาณโปรตีน สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 25(1), 30-39.

ศูนย์ความรู้ความสามารถด้านการจัดการความรู้. (2562). *คู่มือองค์ความรู้และการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ไหม*. สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.). [https://dkmmap.nrct.go.th/dkmmap-2021/dkm-dm/upload\\_manual/62-022.pdf?v=1y0sfHSvD6](https://dkmmap.nrct.go.th/dkmmap-2021/dkm-dm/upload_manual/62-022.pdf?v=1y0sfHSvD6)

ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เลย. (ม.ป.ป.). *การเลี้ยงไหม*. กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. <https://qsds.go.th/newqssclei/การเลี้ยงไหม>

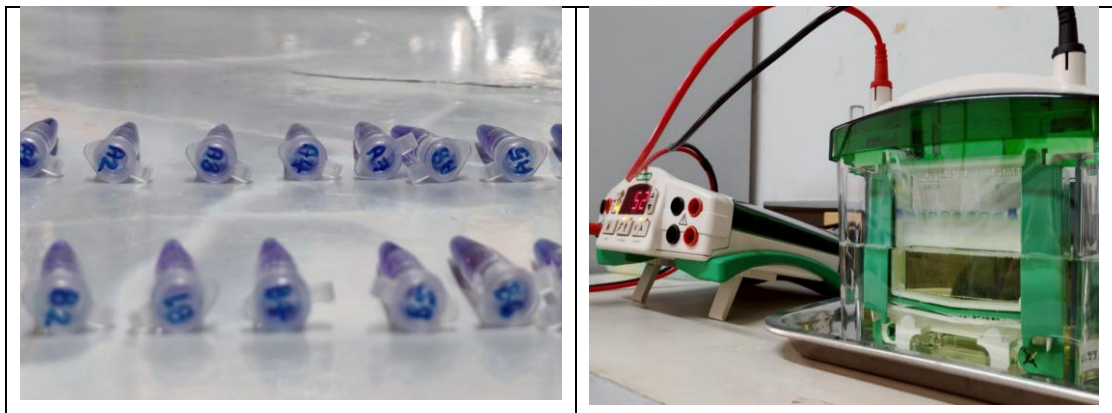
สุธาสินี ทัพพสารพงศ์, นัฏฐา กรีนเวย์, และ วีรวัฒน์ กรีนเวย์. (2550). *โครงการการศึกษาคุณสมบัติผงโปรตีนจากงาช้างเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมเครื่องสำอาง*. สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.).

สุวรรณี แทนธานี, ปัทมาพร จิตปรีดา, ธนวรรณ โรจน์ปิติกุล, และ สุปงกช ทรัพย์แดง. (2020). การพัฒนากระบวนการสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยเอนไซม์โบรมิเลน และศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด. *กรมวิทยาศาสตร์บริการ. BULLETIN OF APPLIED SCIENCES VOL. 9 NO. 9 AUGUST 2020*

ภาคผนวก ก  
การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษา



ภาพผนวก ก1 การทำความสะอาดรังไหม การสกัด และการคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิต



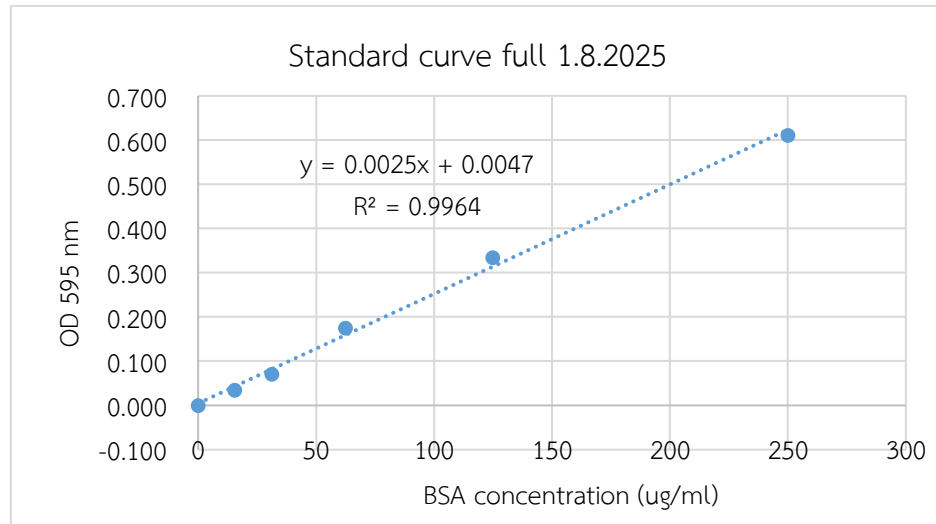
ภาพผนวก ก2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE



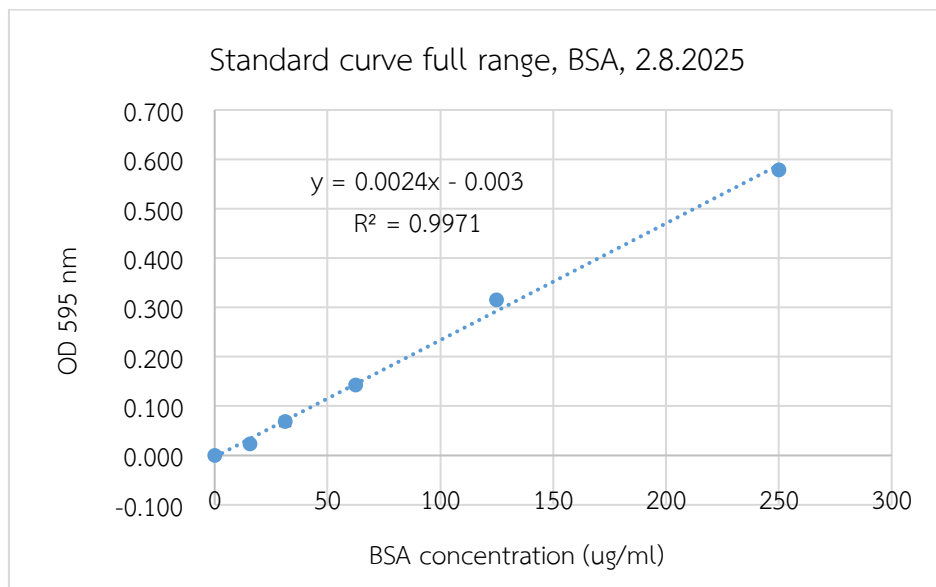
ภาพผนวก ก3 การย่อยสารสกัดด้วยเอนไซม์

### ภาคผนวก ข

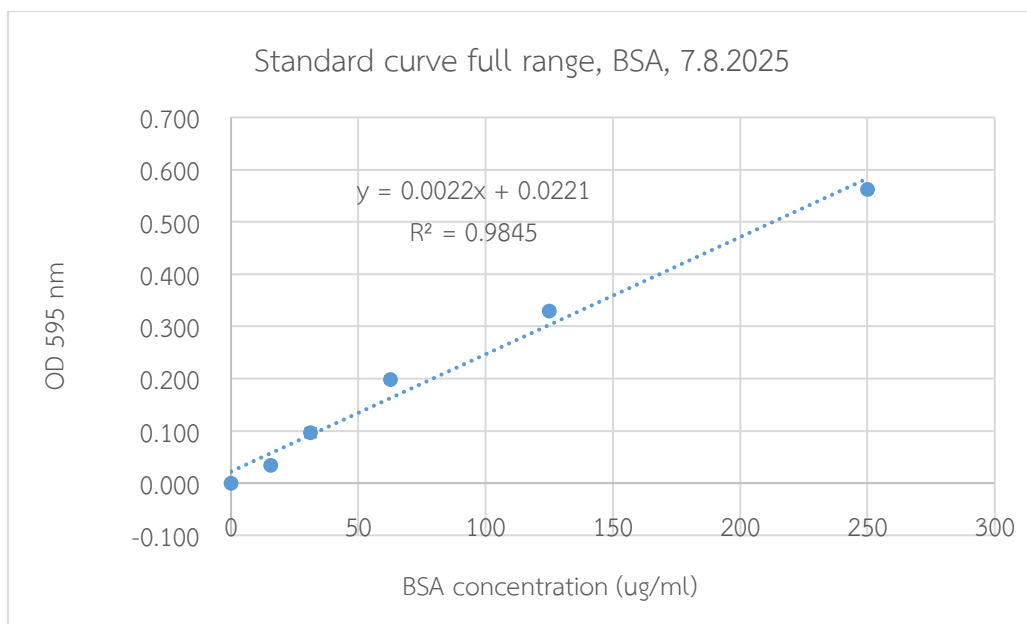
กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน



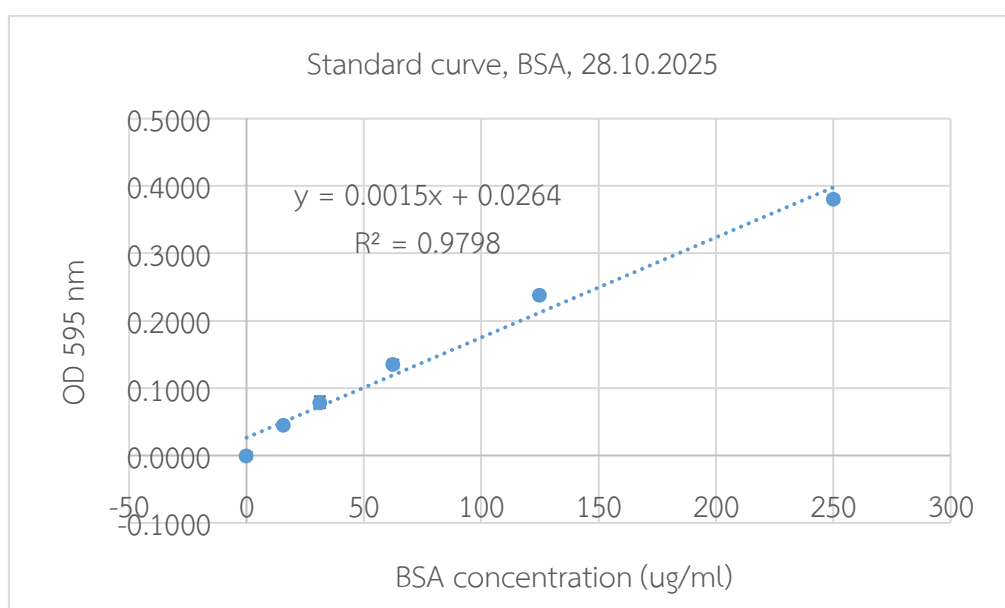
ภาพผนวก ข1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น BSA (x) ต่อ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm (y) ครั้งที่ 1



ภาพผนวก ข2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น BSA (x) ต่อ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm (y) ครั้งที่ 2



ภาพผนวก ข3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น BSA (x) ต่อ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm (y) ครั้งที่ 3



ภาพผนวก ข4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น BSA (x) ต่อ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm (y) ครั้งที่ 4

**ภาคผนวก ค**  
ผลวิเคราะห์ทางสถิติ

| Descriptives |    |         |                |            |                                  |             |         |         |
|--------------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| yield        |    |         |                |            |                                  |             |         |         |
|              |    |         |                |            | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|              | N  | Mean    | Std. Deviation | Std. Error | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| 1.00         | 3  | 6.0800  | 3.10005        | 1.78981    | -1.6209                          | 13.7809     | 2.54    | 8.31    |
| 2.00         | 3  | 8.0867  | 1.59720        | .92214     | 4.1190                           | 12.0543     | 6.25    | 9.15    |
| 3.00         | 3  | 10.3367 | 1.81621        | 1.04859    | 5.8249                           | 14.8484     | 8.44    | 12.06   |
| 4.00         | 3  | 11.2267 | 2.03844        | 1.17689    | 6.1629                           | 16.2904     | 10.01   | 13.58   |
| 5.00         | 3  | 11.4933 | 6.06460        | 3.50140    | -3.5720                          | 26.5586     | 7.32    | 18.45   |
| 6.00         | 3  | 16.9900 | 2.15174        | 1.24231    | 11.6448                          | 22.3352     | 14.79   | 19.09   |
| 7.00         | 3  | 20.7600 | .92342         | .53314     | 18.4661                          | 23.0539     | 20.13   | 21.82   |
| 8.00         | 3  | 18.9533 | 2.00241        | 1.15609    | 13.9791                          | 23.9276     | 17.23   | 21.15   |
| Total        | 24 | 12.9908 | 5.59549        | 1.14217    | 10.6281                          | 15.3536     | 2.54    | 21.82   |

**ภาพผนวก ค1** ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์ผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้

| Test of Homogeneity of Variances |                                      |                  |     |       |      |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------------|-----|-------|------|
|                                  |                                      | Levene Statistic | df1 | df2   | Sig. |
| yield                            | Based on Mean                        | 3.678            | 7   | 16    | .015 |
|                                  | Based on Median                      | .484             | 7   | 16    | .832 |
|                                  | Based on Median and with adjusted df | .484             | 7   | 4.934 | .814 |
|                                  | Based on trimmed mean                | 3.205            | 7   | 16    | .025 |

**ภาพผนวก ค2** การทดสอบความเท่ากันของความแปรปรวนของของเปอร์เซ็นต์ผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้

| ANOVA          |                |    |             |        |      |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| yield          |                |    |             |        |      |
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
| Between Groups | 588.344        | 7  | 84.049      | 10.205 | .000 |
| Within Groups  | 131.774        | 16 | 8.236       |        |      |
| Total          | 720.118        | 23 |             |        |      |

**ภาพผนวก ค3** การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์ผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้

| yield               |       |   |                         |         |
|---------------------|-------|---|-------------------------|---------|
|                     | group | N | Subset for alpha = 0.05 |         |
|                     |       |   | 1                       | 2       |
| Duncan <sup>a</sup> | 1.00  | 3 | 6.0800                  |         |
|                     | 2.00  | 3 | 8.0867                  |         |
|                     | 3.00  | 3 | 10.3367                 |         |
|                     | 4.00  | 3 | 11.2267                 |         |
|                     | 5.00  | 3 | 11.4933                 |         |
|                     | 6.00  | 3 |                         | 16.9900 |
|                     | 8.00  | 3 |                         | 18.9533 |
|                     | 7.00  | 3 |                         | 20.7600 |
|                     | Sig.  |   | .052                    | .146    |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**ภาพผนวก ค4** การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างคู่ทดสอบ หลังการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Duncan)

|       | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum |
|-------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|
|       |    |          |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |
| 1.00  | 4  | 158.8925 | 65.20246       | 32.60123   | 55.1408                          | 262.6442    | 111.70  |
| 2.00  | 4  | 152.2300 | 30.17962       | 15.08981   | 104.2075                         | 200.2525    | 125.41  |
| 3.00  | 4  | 181.0500 | 37.82352       | 18.91176   | 120.8643                         | 241.2357    | 147.85  |
| 4.00  | 4  | 219.9500 | 59.68323       | 29.84162   | 124.9807                         | 314.9193    | 167.91  |
| 5.00  | 4  | 310.2625 | 50.64618       | 25.32309   | 229.6731                         | 390.8519    | 259.35  |
| 6.00  | 4  | 382.7400 | 36.11334       | 18.05667   | 325.2756                         | 440.2044    | 358.97  |
| 7.00  | 3  | 395.9767 | 11.60411       | 6.69964    | 367.1505                         | 424.8029    | 384.92  |
| 8.00  | 4  | 408.9825 | 29.89056       | 14.94528   | 361.4199                         | 456.5451    | 365.59  |
| Total | 31 | 272.3987 | 111.59017      | 20.04219   | 231.4671                         | 313.3303    | 111.70  |

**ภาพผนวก ค5** ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัด

#### Test of Homogeneity of Variances

|               |                                      | Levene Statistic | df1 | df2   | Sig. |
|---------------|--------------------------------------|------------------|-----|-------|------|
| concentration | Based on Mean                        | 2.310            | 7   | 23    | .061 |
|               | Based on Median                      | 1.270            | 7   | 23    | .308 |
|               | Based on Median and with adjusted df | 1.270            | 7   | 9.445 | .357 |
|               | Based on trimmed mean                | 2.045            | 7   | 23    | .092 |

**ภาพผนวก ค6** การทดสอบความเท่ากันของความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัด

**ANOVA**

| concentration  |                |    |             |        |      |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
| Between Groups | 328549.059     | 7  | 46935.580   | 23.978 | .000 |
| Within Groups  | 45021.908      | 23 | 1957.474    |        |      |
| Total          | 373570.967     | 30 |             |        |      |

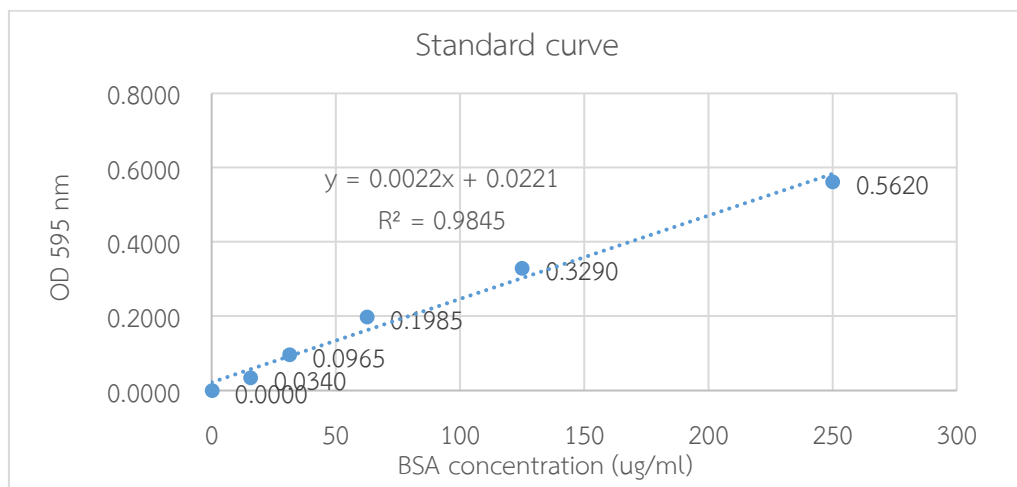
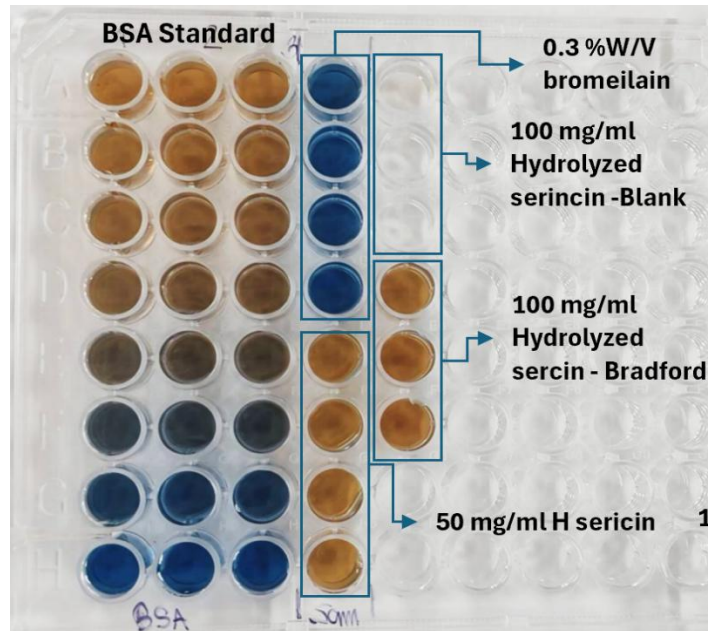
**ภาพผนวก ค7** การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) ของปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัด

| concentration            |       |                         |          |          |          |
|--------------------------|-------|-------------------------|----------|----------|----------|
|                          |       | Subset for alpha = 0.05 |          |          |          |
|                          | group | N                       | 1        | 2        | 3        |
| Tukey HSD <sup>a,b</sup> | 2.00  | 4                       | 152.2300 |          |          |
|                          | 1.00  | 4                       | 158.8925 |          |          |
|                          | 3.00  | 4                       | 181.0500 |          |          |
|                          | 4.00  | 4                       | 219.9500 | 219.9500 |          |
|                          | 5.00  | 4                       |          | 310.2625 | 310.2625 |
|                          | 6.00  | 4                       |          |          | 382.7400 |
|                          | 7.00  | 3                       |          |          | 395.9767 |
|                          | 8.00  | 4                       |          |          | 408.9825 |
|                          | Sig.  |                         | .432     | .136     | .081     |
| Duncan <sup>a,b</sup>    | 2.00  | 4                       | 152.2300 |          |          |
|                          | 1.00  | 4                       | 158.8925 |          |          |
|                          | 3.00  | 4                       | 181.0500 |          |          |
|                          | 4.00  | 4                       | 219.9500 |          |          |
|                          | 5.00  | 4                       |          | 310.2625 |          |
|                          | 6.00  | 4                       |          |          | 382.7400 |
|                          | 7.00  | 3                       |          |          | 395.9767 |
|                          | 8.00  | 4                       |          |          | 408.9825 |
|                          | Sig.  |                         | .063     | 1.000    | .446     |

**ภาพผนวก ค8** การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างคู่ทดสอบ หลังการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Duncan)

## ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเซรีซินทางการค้า และเอนไซม์โบรมิเลน



| ตัวอย่าง                     | ความเข้มข้นโปรตีน (μg/ml) |
|------------------------------|---------------------------|
| 0.3% W/V Bromelain           | 490.4 ± 10.49             |
| 50 mg/ml Hydrolyzed sericin  | 132.1 ± 1.64              |
| 100 mg/ml Hydrolyzed sericin | 127.1 ± 3.18              |

