ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247395

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเพิ่มมูลค่ารังไหมอีรี่ โดยการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอาหารเสริมในสัตว์และคน

Value added of eri silk cocoon for product development as cosmetics and food additives in animal and human

ชื่อผู้วิจัย

ผศ. ดร. สุพร นุชดำรงค์

ผศ. ดร. ธนเศรษฐ์ เสนาวงศ์

รศ. ดร. ศิวิลัย สิริมังคารัตน์

ดร.ประวีณา กิติคุณ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

600252683
247395
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247395

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเพิ่มมูลค่ารังไหมอีรี่
โดยการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอาหารเสริมในสัตว์และคน

Value added of eri silk cocoon for product development as cosmetics and food additives in animal and human

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ชื่อผู้วิจัย

ผศ. ดร. สุพร นุชดำรงค์

ผศ. ดร. ธนเศรษฐ์ เสนาวงศ์

รศ. ดร. ศิวิลัย สิริมังคารัตน์

ดร.ประวีณา กิติคุณ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่อไปนี้ คือ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ให้ความสนับสนุนด้านบุคคลากร สถานที่ สาธารณูปโภคพื้นฐาน ตลอดจนเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. วรรณดี บุญญัติรัชต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับความอนุเคราะห์อาหารลี้ยงเชื้อ Lactobacillus

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบ ประมาณ 2552 กลุ่มวิจัย “การเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม” ที่ร่วมสนับสนุนงบประมาณบางส่วนในการวิจัย รวมทั้งศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ

บทคัดย่อ

247395

โปรตีนไฟโบรอินจากไหมอีรี่ (*Philosamia ricini* หรือในชื่อใหม่ *Samia ricini*) ซึ่งเตรียมได้ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นและรายงานไว้ในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2551 ละลายน้ำได้ด้วยความเข้มข้นสูงสุด 200 นาโนกรัม/มล. การทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่า ไฟโบรอินไหมอีรี่ (0.1-200 นาโนกรัม/มล.) ไม่กระตุ้นการเจริญของเซลล์แต่แสดงผลต้านออกซิเดชัน ไฟโบรอินไหมอีรี่ 1-2.5 นาโนกรัม/มล. สามารถหักล้างผลออกซิเดชันโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 2 เท่าของค่า LC_{50} ได้อย่างสมบูรณ์ ต่างจากโปรตีนไฟโบรอินไหมบ้าน (*Bombyx mori*) ซึ่งกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้ 150-218.6% ขึ้นกับความเข้มข้นโดยออกฤทธิ์สูงสุดที่ 35-50 นาโนกรัม/มล. แต่ผลการต้านออกซิเดชันไม่มีนัยสำคัญ การทดลองใช้ไฟโบรอินไหมอีรี่ 0.5 นาโนกรัม/มล. ร่วมกับไฟโบรอินไหมบ้านหลายความเข้มข้นเกิดผลเสียกระตุ้นให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์รอดชีวิตน้อยลง ทดสอบการย่อยโปรตีนไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ทริปซิน (ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 0.001โมลาร์) วิเคราะห์จากปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น ใช้ไฟโบรอินที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนระบบ sterilization ระบบต้มเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส 15 นาทีและ 30 นาที เปรียบเทียบกับไฟโบรอินควบคุมไม่ผ่านความร้อน ผลคือ ไฟโบรอินไหมอีรี่เกิดการสลายเองเล็กน้อยโดยกรดที่ใช้ละลายเอนไซม์ และเพิ่มขึ้น 1.5-2 เท่าด้วยผลความร้อน สามารถวิเคราะห์ได้ว่าเกิดการย่อยด้วยทริปซิน ซึ่งเมื่อใช้เอนไซม์ 5% ค่าการย่อยของชุดควบคุม ($0.767\pm 0.009 \times 10^{-5}$ PAU/ นาที) สูงขึ้นประมาณ 5 เท่าจากการใช้เอนไซม์ 0.1% ไฟโบรอินไหมอีรี่ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนไม่ทำให้การย่อยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากชุดควบคุม ($0.740\pm 0.007 \times 10^{-5}$ - $0.941\pm 0.013 \times 10^{-5}$ PAU/ นาที) ค่ามากกว่าผลของกรดไฮโดรคลอริก 5-7 เท่า ส่วนไฟโบรอินไหมบ้านถูกสลายได้ง่ายด้วยกรดไฮโดรคลอริก วิเคราะห์ค่า PAU ได้ไม่ต่างจากผลการทดลองย่อยด้วยทริปซิน ทดลองแปรรูปไฟโบรอินไหมอีรี่ด้วยกรดซิตริกในสภาวะ sterilization เป็นเวลา 15 นาทีและ 30 นาที ได้รูปแบบโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่น่าจะเป็นเปปไทด์ ความเข้มข้นของกรดซิตริกเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดผลิตภัณฑ์มากขึ้น การใช้กรดซิตริก 30% ทำให้ย่อยไฟโบรอินไหมอีรี่ได้ 45.92±1.32 % (ตามน้ำหนัก) ซึ่งถึง 15.66±1.36% เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้อง เวลาและอุณหภูมิไม่เป็นปัจจัยสำคัญ ผลการทดสอบสมบัติกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* 1463 ซึ่งเพิ่มขึ้นได้ประมาณ 3 เท่า แต่ไม่กระตุ้น *Escherichia coli* แสดงว่าไฟโบรอินไหมอีรี่เป็นโปรตีนพรีไบโอติก (prebiotic) ทดลองประยุกต์ใช้ไฟโบรอินไหมอีรี่ผสมในเครื่องสำอางได้แก่ สบู่ (อาสาสมัครทดลองมีความพึงพอใจสูงสุดเมื่อผสมด้วยไหมอีรี่ 0.16%) โลชั่นทาผิวกายที่ผสมไหมอีรี่ 0.008% (อาสาสมัครมีความพึงพอใจสูงถึง 81.94± 7.51% เมื่อเปรียบเทียบกับความพึงพอใจ 64.29± 5.30% ในกลุ่มควบคุม) การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของโลชั่นได้ผลน่าพอใจ ทดลองเติมไฟโบรอินไหมอีรี่ในสูตรแชมพูสุนัขได้ลักษณะแชมพูที่มีความหนืดลดลงเนื่องจากสมบัติการเป็น emulsifier ของโปรตีน

Abstract

247395

Silk fibroin protein of eri (*Philosamia ricini* or renamed *Samia ricini*) was prepared using the self-developed method previously described in the full report established under the General Supporting Fund of Khon Kaen University, fiscal year i. Its solubility in water was 200 ng/mL maximally. According to the test on fibroblast cells, eri fibroin (0.1-200 ng/mL) showed no activation effect on cell proliferation but anti-oxidation activity. Its concentration in the range of 1-2.5 ng/mL completely neutralized oxidation effect by 2 times IC_{50} level of hydrogen peroxide. This was different from the fibroin of domesticated silkworm (*Bombyx mori*) which enhanced cell proliferation to 150-218.6% as a function of protein concentration with an activation peak at the concentration of 35-50 ng/mL. No significant anti-oxidation was observed in this case. Combination of eri fibroin (0.5 ng/mL) with varying amount of *B. mori* fibroin led to worse effect for viability of fibroblast cells. Digestibility of fibroin by trypsin soluble in 0.001 M HCl was studied by analysis of the released tyrosine residues. The tests were made on the fibroin undergoing heat processing by sterilization, as well as boiling at 100°C for 15 and 30 min, comparing to the heat processed control fibroin. The acidity of trypsin solution caused slight degradation of eri fibroin, which was enhanced 1.5-2 times by heat. However, trypsin digestion was clearly detectable. When 5% enzyme was used, digestibity of control eri fibroin ($0.767 \pm 0.009 \times 10^{-5}$ PAU/min) was5 times higher related to the result of 0.1% trypsin. No difference was obtained for the heat treated eri fibroin ($0.740 \pm 0.007 \times 10^{-5}$ - $0.941 \pm 0.013 \times 10^{-5}$ PAU/min). These results from trypsin digestion were 5-7 times above the hydrochloric effect. Strikingly, *B. mori* fibroin was highly susceptible to acidity, thereby resulting in indifferent PAU value to the tryptic treatment. Derivation of eri fibroin was done by citric acid digestion under sterilization for 15 and 30 min. The chromatograms so-obtained were suggested to be those of peptide products. The concentration of citric acid was the key factor to determine the amount of the products that 30% citric acid degraded eri fibroin by 45.92 ± 1.32 % on the weight basis, though 15.66 ± 1.36% was gained even at room temperature. Factors of time and temperature were not crisis. Growth stimulation on *Lactobacillus* 1463 by 3 times, but not on *Escherichia coli*, indicated eri fibroin as a prebiotic protein. Application of eri fibroin in the cosmetic formulation included soap (highest satisfaction by volunteers with the soap containing 0.16% eri fibroin) and body lotion (81.94 ± 7.51% satisfaction once blended with 0.008% eri fibroin comparing to 64.29 ± 5.30% in the control lotion). The physical stability of the lotion was acceptable. Application of eri fibroin to the dog shampoo formulation was also tried, and the formulation with less viscosity was obtained due to the emulsifying property of eri fibroin.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีดำเนินการวิจัย	18
ผลการวิจัย	27
อภิปรายผลการวิจัย	52
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก-ประวัติและผลงานวิจัยของนักวิจัย และคณะ	68

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ร้อยละโดยจำนวนโมลของกรดอะมิโนแต่ละชนิดเซอริซิน ที่สกัดแยกได้จากเปลือกรังไหม 7

ตารางที่ 2 กรดอะมิโนองค์ประกอบของโปรตีนไฟโบรอิน 10

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน 0.1% 34

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์การย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน 5% 36

ตารางที่ 5 การย่อยไฟโบรอินไหมอีรี่ด้วยกรดซิตริก 41

ตารางที่ 6 การทดสอบการคงตัวทางกายภาพของโลชั่นโดยสภาวะเร่ง 45

ตารางที่ 7 การทดสอบการคงตัวทางกายภาพของโลชั่น เมื่อบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 46

ตารางที่ 8 การทดสอบการคงตัวทางกายภาพของโลชั่น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง 46

ตารางที่ 9 ความพึงพอใจต่อโลชั่นสูตร 1 47

ตารางที่ 10 ความพึงพอใจต่อโลชั่นสูตร 2 47

ตารางที่ 11 ความพึงพอใจต่อโลชั่นสูตร 3 48

ตารางที่ 12 ความพึงพอใจต่อโลชั่นสูตร 4 48

ตารางที่ 13 ความพึงพอใจต่อโลชั่นสูตร 2 ควบคุม 50

ตารางที่ 14 ความพึงพอใจต่อโลชั่นสูตร 2 ปรับผสมไฟโบรอินไหมอีรี่ 50

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างตัดขวางของเส้นใยไหม วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด 5

ภาพที่ 2 โมเดลแสดงโครงสร้างจุลภาค (microstructure) ของโปรตีนไฟโบรอิน 9

ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของไฟโบรอินไหมอีรี่ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 27

ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของไฟโบรอินจากไหมบ้าน *B. mori* ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 28

ภาพที่ 5 พิษของสาร H_2O_2 ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 29

ภาพที่ 6 การออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฟโบรอินไหมอีรี่ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 30

ภาพที่ 7 การออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผงโปรตีนไฟโบรอินจากไหมบ้าน *B. mori* ต่อ H_2O_2 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 31

ภาพที่ 8 ผลของของไฟโบรอินไหมอีรี่ร่วมกับไฟโบรอินไหมบ้าน *B. mori* ต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 32

ภาพที่ 9 ผลการย่อยไฟโบรอินด้วยกรดซิตริก 1% 2% 5% 10% เป็นเวลา 15 นาที 38

ภาพที่ 10 ผลการย่อยไฟโบรอินด้วยกรดซิตริก 1% 2% 5% 10% เป็นเวลา 30 นาที 35

ภาพที่ 11 ผลการย่อยไฟโบรอินด้วยกรดซิตริก10% 20% 30% เป็นเวลา 15 นาที 40

ภาพที่ 12 การวิเคราะห์ผลของไฟโบรอินของไหมอีรี่ต่อการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Lacto- bacillus* 1463 42

ภาพที่ 13 สบู่ที่มีโปรตีนไฟโบรอินของไหมอีรี่ผสม 44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
BSA	bovine serum albumin
CFU	colony forming unit
DMSO	dimethyl sulfoxide
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
kDa	กิโลดาลตัน (kilodalton)
g	gravity force
LMW	low molecular weight marker
rpm	round per min