



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบลักษณะเฉพาะและวิเคราะห์ส่วนประกอบของไหมไทย

โดย

ผศ.ดร. อรุณี คงดี และคณะ

วันที่เสร็จโครงการ วันที่ 31 ตุลาคม 2553

สัญญาเลขที่ MRG4880206

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบลักษณะเฉพาะและวิเคราะห์ส่วนประกอบของไหมไทย

ผู้วิจัย

ผศ.ดร. อรุณี คงดี

รศ.ดร. นันทยา ยานูเมศ

สังกัด

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Project Code : MRG4880206

(รหัสโครงการ)

Project Title : การตรวจสอบลักษณะเฉพาะและวิเคราะห์ส่วนประกอบของไหมไทย

(ชื่อโครงการ)

Investigator : ผศ.ดร. อรุณี คงดี

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : arunee.k@mju.ac.th

Project Period : 1 มิถุนายน 2548 – 31 ตุลาคม 2553

(ระยะเวลาโครงการ)

สารบัญ

		หน้า
	บทคัดย่อ	ญ
	Abstract	ฎ
	บทสรุปผู้บริหาร	ฎ
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1 ไหมและลักษณะของไหม	1
	1.2 เทคนิคใช้ส้อมเอกซคลูชันโครมาโทกราฟี	5
	1.3 เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส	6
	1.4 โครงสร้างทางเคมีของโปรตีน	8
	1.4.1 โครงสร้างปฐมภูมิ	8
	1.4.2 โครงสร้างทุติยภูมิ	9
	1.4.3 โครงสร้างตติยภูมิ	11
	1.4.4 โครงสร้างจตุรภูมิ	11
	1.5 โครงสร้างทางกายภาพของไหม	12
	1.6 สมบัติทางเชิงกลของเส้นใยไหม	14
บทที่ 2	วิธีการทดลอง	19
	2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	19
	2.2 การเก็บตัวอย่างรังไหม	21
	2.3 การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านน้ำหนักโมเลกุลของไหม	21
	2.3.1 การเตรียมสารละลายเซรีซินและสารละลายไฟโบรอิน	21
	2.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเลาว์รีย์	22
	2.3.3 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินและไฟโบรอินด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส	23
	2.3.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินและเซรีซินด้วยเทคนิคใช้ส้อมเอกซคลูชันโครมาโทกราฟี	28
	2.4 การวิเคราะห์ความเป็นผลึกของไฟโบรอิน	29
	2.5 การวิเคราะห์สมบัติทางเชิงกลของเส้นใยไหม	29
บทที่ 3	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
	3.1 ลักษณะภายนอกของรังไหม	31
	3.2 สมบัติการละลายของโปรตีนไหม	32
	3.3 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไหมไทยพันธุ์ต่างๆ	33

	หน้า
3.3.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิส	33
3.3.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลใหม่ด้วยเทคนิคไซส์เอกซคลูชัน โครมาโทกราฟี	41
3.3.2.1 น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบริน	41
3.3.2.2 น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซิน	64
สรุปผลการวิจัย	82
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	86

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.1	วงชีวิตของไหม	2
รูปที่ 1.2	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงพื้นผิวของรังไหมที่มีกลุ่มเส้นใยไฟโบรอินยึดด้วยกาวไหม	3
รูปที่ 1.3	ภาพถ่ายเส้นไหมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) เส้นไหมดิบ (ข) เส้นไหมหลังการฟอก	3
รูปที่ 1.4	การแยกสารตามขนาดที่แตกต่างกันด้วยวัสดุที่มีรูพรุน	5
รูปที่ 1.5	กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง	6
รูปที่ 1.6	ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสและการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยกระแสไฟฟ้า	7
รูปที่ 1.7	โครงสร้างทั่วไปของโปรตีน	8
รูปที่ 1.8	โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน	8
รูปที่ 1.9	โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (ก) α -helix (ข) β -pleated sheet	10
รูปที่ 1.10	โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน (ก) α -helix (ข) β -pleated sheet	11
รูปที่ 1.11	โครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีน	11
รูปที่ 1.12	ปฏิกิริยาการรีดิวซ์โปรตีนด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล	12
รูปที่ 1.13	การไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซินได้โปรตีนแฟรกชัน	12
รูปที่ 1.14	ส่วนประกอบของเส้นใยไหมแสดงให้เห็นไมโครไฟบริลที่ประกอบกันจากไฟโบรอิน	13
รูปที่ 1.15	มอร์โฟโลยีของเส้นใยไหมอธิบายด้วย (ก) Fringed micelle structure (ข) Fringed fibril structure	14
รูปที่ 1.16	กราฟของแรงดึง-การยืดตัวของเส้นใยขนาด 30 เซนติเมตร ความละเอียด 0.3 เท็กซ์ และความหนาแน่น 1.5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติ - เมตร	16
รูปที่ 1.17	งานของการแยกหาได้จากพื้นที่ใต้กราฟของแรงดึง-การยืดตัว	17
รูปที่ 2.1	การประกอบแผ่น slab gel	26
รูปที่ 2.2	การเติมน้ำเพื่อทดสอบการรั่วของแผ่น slab gel	26
รูปที่ 2.3	การเตรียม Stacking gel	27
รูปที่ 2.4	หยอดตัวอย่างลงในช่อง	27
รูปที่ 2.5	ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสประกอบด้วยเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าและSDS-	28
PAGE		

		หน้า
รูปที่ 3.1	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโมเลกุลโปรตีนในสารละลายเบส	32
รูปที่ 3.2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA	34
รูปที่ 3.3	SDS-PAGE แผ่นที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 17.3 – 224 kDa ของเจลแผ่นที่ 1 (ก) สแกนจากแผ่นเจล (ข) สเก็ทซ์มาจากรูปสแกน (A; Myosin, B; Phosphorylase B, C; BSA, D; Ovalbumin, E; Carbonic anhydrase, F; Trypsin inhibitor และ G; Lysozyme)	35
รูปที่ 3.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log M_w$ กับค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 1	36
รูปที่ 3.5	แถบโปรตีนเซรีซินของไหมแต่ละพันธุ์ที่ความเข้มข้นต่างกันบนเจลแผ่นที่ 2 (ก) สแกนจากเจล (ข) สเก็ทซ์มาจากรูปสแกน	37
รูปที่ 3.6	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอกล็อกน้ำหนักโมเลกุลกับค่า R_f ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 2	38
รูปที่ 3.7	แถบโปรตีนเซรีซินของไหมพันธุ์ต่างๆ บนเจลแผ่นที่ 3 (a) สแกนจากแผ่นเจล (b) สเก็ทซ์มาจากรูปสแกน	39
รูปที่ 3.8	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอกล็อกของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานบนเจล แผ่นที่ 3	40
รูปที่ 3.9	โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์และเครื่องตรวจวัด 28 องศาเซลเซียส	42
รูปที่ 3.10	โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่อัตราการไหล 0.5 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์และเครื่องตรวจวัด 28 องศาเซลเซียส	42
รูปที่ 3.11	โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่อัตราการไหล 0.5 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 30 °C	43
รูปที่ 3.12	ความสัมพันธ์ระหว่างลอกล็อกน้ำหนักโมเลกุลกับเวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอล	46
รูปที่ 3.13	ความสัมพันธ์ระหว่างลอกล็อกน้ำหนักโมเลกุลกับเวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลในช่วงที่เป็นเส้นตรง	46
รูปที่ 3.14	โครมาโทแกรมของโปรตีนแฟรกชันจากไฟโบรอิน (a) พันธุ์เหลือง	47

สุรินทร์ และ (b) พันธุ์สำโรง

		หน้า
รูปที่ 3.15	โครมาโทแกรมของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (a) thyroglobulin (b) γ -globulin (c) ovalbumin (d) myoglobin (e) vitamin B ₁₂	49
รูปที่ 3.16	ความสัมพันธ์ระหว่างลิกนินน้ำหนักโมเลกุลกับเวลาคงค้างของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน	50
รูปที่ 3.17	กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน	51
รูปที่ 3.18	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ BSA	52
รูปที่ 3.19	โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 จากการรีดิวซ์ไฟโบรอินด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลของ (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางนวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ (ข) ไหมพันธุ์อีรี ไหมพันธุ์ยูบี ไหมพันธุ์ดอกบัว และ ไหมพันธุ์นางน้อย	55
รูปที่ 3.20	โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 จากการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางนวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ (ข) ไหมพันธุ์อีรี ไหมพันธุ์ยูบี ไหมพันธุ์ดอกบัว และ ไหมพันธุ์นางน้อย	59
รูปที่ 3.21	โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3 จากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลและไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางนวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ (ข) ไหมพันธุ์อีรี ไหมพันธุ์ยูบี ไหมพันธุ์ดอกบัว และ ไหมพันธุ์นางน้อย	63
รูปที่ 3.22	โครมาโทแกรมของเซรีซิน (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางนวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ (ข) ไหมพันธุ์อีรี ไหมพันธุ์ยูบี ไหมพันธุ์ดอกบัว และ ไหมพันธุ์นางน้อย	66
รูปที่ 3.23	โครมาโทแกรมของเซรีซินแฟรกชันจากการรีดิวซ์เซรีซินด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางนวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ (ข) ไหมพันธุ์อีรี ไหมพันธุ์ยูบี ไหมพันธุ์ดอกบัว และ ไหมพันธุ์นางน้อย	70
รูปที่ 3.24	ดิฟแฟรกโทแกรมของไฟโบรอินจากไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ สำโรง และดอกบัว	75
รูปที่ 3.25	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของ	76

เส้นไหมพันธุ์ชัยภูมิ

หน้า

รูปที่ 3.26	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของ เส้นไหมพันธุ์นางพญา	76
รูปที่ 3.27	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของ เส้นไหมพันธุ์นางเหลือง	77
รูปที่ 3.28	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของ เส้นไหมพันธุ์นางน้อย	77
รูปที่ 3.29	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของ เส้นไหมพันธุ์ดอกบัว1	78
รูปที่ 3.30	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของ เส้นไหมพันธุ์ดอกบัว2 (สาวจากโรงไหมชั้นนอก)	78
รูปที่ 3.31	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของ เส้นไหมพันธุ์ดอกบัว2 (สาวจากโรงไหมชั้นใน)	79
รูปที่ 3.32	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของ เส้นไหมพันธุ์บุรีรัมย์	79
รูปที่ 3.33	กราฟ stress-strain ของเส้นใยบางชนิด	80
รูปที่ 3.34	ค่าความทนต่อแรงดึงเฉลี่ยของเส้นไหมพันธุ์ต่างๆ	82
รูปที่ 3.35	ค่าความทนต่อแรงดึงจำเพาะเฉลี่ยของเส้นไหมพันธุ์ต่างๆ	82

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1	สัดส่วนของกรดอะมิโนในไฮโฟโบรอินและเซรีซิน
ตารางที่ 2.1	สารเคมีในงานวิจัย
ตารางที่ 2.1	สารเคมีในงานวิจัย (ต่อ)
ตารางที่ 2.2	วัสดุและเครื่องมือ
ตารางที่ 2.2	วัสดุและเครื่องมือ (ต่อ)
ตารางที่ 2.3	การเตรียมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยเลาเวอรี่
ตารางที่ 2.4	สารเคมี และปริมาตรสารเคมีสำหรับเตรียม Separating gel และ Stacking gel
ตารางที่ 3.1	พันธุ์ แหล่งตัวอย่างและลักษณะของรังไหม
ตารางที่ 3.1	พันธุ์ แหล่งตัวอย่างและลักษณะของรังไหม (ต่อ)
ตารางที่ 3.2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ 750 นาโนเมตร ในช่วงความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล.
ตารางที่ 3.2	ค่าการดูดกลืนแสง และค่าความเข้มข้นของสารละลายเซรีซินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA
ตารางที่ 3.3	ระยะทางในการเคลื่อนที่ และค่า relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานชนิดต่างๆ ของเจลแผ่นที่ 1
ตารางที่ 3.4	ระยะทางในการเคลื่อนที่ และค่า relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 2
ตารางที่ 3.5	น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในเซรีซินจากไหมพันธุ์ต่างๆ โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานบนเจลแผ่นที่ 2
ตารางที่ 3.6	ระยะทางในการเคลื่อนที่ และค่า relative mobility (R_f) โปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 3
ตารางที่ 3.7	น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันในไหมพันธุ์ต่างๆ โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานของเจล แผ่นที่ 3
ตารางที่ 3.8	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเซรีซินแฟรกชันในไหมพันธุ์ต่างๆโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานของเจลแต่ละแผ่น
ตารางที่ 3.9	เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da ที่อัตราไหล 1.0 mL/min อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส

	หน้า
ตารางที่ 3.9 เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da ที่อัตราไหล 1.0 mL/min อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส	44
ตารางที่ 3.10 เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da ที่อัตราไหล 0.5 ml/min อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส	44
ตารางที่ 3.11 เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da ที่อัตราไหล 0.5 ml/min อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส	45
ตารางที่ 3.12 น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันจากไหมพันธุ์สำโรง	47
ตารางที่ 3.13 น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันจากไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์	48
ตารางที่ 3.14 ค่าคงค้างของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 1,350 Da- 670 kDa	50
ตารางที่ 3.15 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของ BSA	52
ตารางที่ 3.16 ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายเซรีซินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA	53
ตารางที่ 3.17 ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA	54
ตารางที่ 3.18 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1	56
ตารางที่ 3.18 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 (ต่อ)	57
ตารางที่ 3.19 ลำดับและแยกช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 จากการรีดิวซ์ไฟโบรอินจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์	57
ตารางที่ 3.20 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 โดยการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน	60
ตารางที่ 3.20 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 โดยการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน (ต่อ)	61
ตารางที่ 3.21 ลำดับและแยกช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 จากการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน จากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์	61
ตารางที่ 3.22 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3	63
ตารางที่ 3.23 ลำดับและช่วงน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3	65
ตารางที่ 3.24 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซิน	67

	หน้า
ตารางที่ 3.24	เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีน (ต่อ)
ตารางที่ 3.25	ช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์
ตารางที่ 3.26	เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนแฟรกชันจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล
ตารางที่ 3.26	เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนแฟรกชันจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (ต่อ)
ตารางที่ 3.27	ช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนแฟรกชันจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์
ตารางที่ 3.28	การเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนแฟรกชันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟีและเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส
ตารางที่ 3.29	ค่าความทนต่อแรงดึงของเส้นไหมพันธุ์ต่างๆ

บทคัดย่อ

ประเทศไทย สามารถส่งไหมในลักษณะใยไหมและเส้นผ้าจากไหมเป็นสินค้าออกในตลาดโลก มีกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มที่ให้ความสำคัญกับการเพิ่มผลผลิตเส้นใยไหมโดยการปรับปรุงพันธุ์ไหมและหม่อนโดยไม่ได้คำนึงถึงผลต่อลักษณะโมเลกุลของเส้นใยไหม งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาเส้นใยไหมไฟโบรอินและกาวไหมเซรีซินในแง่น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และไซส์เอกซclusionโครมาโทกราฟี (SEC) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเป็นผลึกของไฟโบรอินและความทนต่อแรงดึงของไฟโบรอินด้วย จากผลการวิจัย พบว่า เทคนิค SDS-PAGE ของเซรีซินที่ผ่านการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโทเอทานอล ให้แถบโปรตีน 2 แถบ ซึ่งเรียกว่า แถบของโมเลกุลน้ำหนักสูง (H-chain) และแถบน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (L-chain) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล ในช่วง 41 – 70 และ 16 – 19 kDa ตามลำดับ เทคนิค SEC แสดงโครมาโทแกรมของไฟโบรอินและเซรีซินที่มีหลายพีค จากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโทเอทานอล ปรากฏว่าได้ไฟโบรอินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2 ช่วง นั่นคือ H-chain และ L-chain เช่นเดียวกัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 203 – 368 และ 1 – 7 กิโลดาลตัน ตามลำดับ การไฮโดรไลซิสไฟโบรอินด้วยเอนไซม์โคโมทริปซินมีผลทำให้ไฟโบรอินขาดออก ได้พอลิเปปไทด์ที่มีความยาวใกล้เคียงกันและมีน้ำหนักโมเลกุล 17 – 18 and 1 – 8 กิโลดาลตัน สำหรับเซรีซินที่ไม่ได้รีดิวซ์ พีคของ H-chain และ L-chain จากไหมไทยทุกสายพันธุ์มีค่า 227 – 612 กิโลดาลตัน แต่สำหรับไหมอีรี่ (ไหมป่า) พบว่า H-chain มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากคือ 2,328 กิโลดาลตัน การรีดิวซ์สามารถเปลี่ยนโมเลกุลเซรีซินให้มีความยาวใกล้เคียงกันมากขึ้นซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 0.05 – 30 กิโลดาลตัน

มอร์โฟโลยีของไฟโบรอินประกอบด้วยส่วนผลึกและส่วนอสัณฐาน ซึ่งอธิบายด้วยเทคนิคการกระจายรังสีเอ็กซ์ กราฟเทนชันัลของไฟโบรอินจากไหมไทยแสดงให้เห็นว่า ไฟโบรอินมีค่าความทนต่อแรงดึงจำเพาะสูง อยู่ในช่วง 15.85 - 37.45 กรัมต่อเทกซ์ และมีความสามารถในการยืดตัว

Abstract

Thailand is able to export silk as fiber and garment to world market. There are many researches focusing on increase in production volume of silk fiber by breeding silk and mulberry. However, data of Thai silks in molecular scale are shortage. Molecular characteristics of silk fiber (fibroin) and silk glue (sericin) by means of molecular weight determined by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and size exclusion chromatography (SEC) were interested. In addition, crystallinity and tensile strength of fibroin were analyzed. Results of SDS-PAGE of sericin from all silks reduced with 2-mercaptoethanol showed protein bands of two molecular weight ranges. High molecular weight chain (H-chain) and low molecular weight chain (L-chain) had molecular weights of 41 – 70 and 16 – 19 kDa, respectively. Chromatograms of ISEC from all silks showed many peaks of fibroin and sericin. By reducing fibroin with 2-mercaptoethanol, there were two ranges of molecular weight i.e. H-chain and L-chain having molecular weight in the range of 203 – 368 and 1 – 7 kDa, respectively. Hydrolysis fibroin with chymotrypsin enzyme resulted in absence of H-chain peaks which was indicated cleavage of fibroin, uniform chain length polypeptides with low molecular weight as 17 – 18 and 1 – 8 kDa were obtained. For sericin without reduction, peaks of H-chain and L-chain from all silks were present in chromatogram. Molecular weight of H-chain was 227 – 612 kDa for Thai silks, but very high molecular weight as 2,328 kDa of H-chain from Eri (wild silk) was investigated. Reduction of sericin changed L-chain to more uniform chain length polypeptides with lower molecular weight of 0.05 – 30 kDa.

Morphology of fibroin composed of crystalline and amorphous regions which was revealed by X-ray diffraction technique. Tensile curve of fibroin from Thai silks showed high specific strength in the range of 15.85 - 37.45 g/tex with high elongation.

บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

ไหม เป็นสัตว์เศรษฐกิจของชาติ เส้นไหมไหมและผลิตภัณฑ์อื่นจากไหมกลายเป็นสินค้าส่งออกประเภทสิ่งทอ นำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก งานวิจัยต่างๆ ในประเทศมุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตเส้นไหมไหมโดยการปรับปรุงพันธุ์ไหมหรือพันธุ์หม่อนเพื่อให้ได้ผลผลิตเส้นไหมไหมสูงขึ้น โดยขาดการศึกษาในระดับโมเลกุลของเส้นไหมไหม ที่อาจได้รับผลกระทบจากการปรับปรุงพันธุ์ไหมหรือพันธุ์หม่อน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาลักษณะของไหมพันธุ์พื้นบ้านในระดับโมเลกุลด้านน้ำหนักโมเลกุลของเส้นไหมไหมและกาวไหมไหมด้วยเทคนิคไฮสเอกซคลูชัน โครมาโทกราฟี และเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และได้เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับไหมป่า จากนั้นได้ศึกษาความแข็งแรงของเส้นไหมไหมในแง่ความทนต่อแรงดึง ผลการวิจัยไหมไหมเส้นไหมไหม (ไฟโบรอิน) และกาวไหมไหม (เซรีซิน) ด้วย 2-เมอร์แคปโทเอทานอล พบว่าโมเลกุลของไฟโบรอินและเซรีซินของไหมไหมพันธุ์ต่างๆ ประกอบขึ้นมาเป็นโครงสร้างของโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ ประกอบด้วยส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (H-chain) และส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (L-chain) ส่วนการวิจัยด้วย 2-เมอร์แคปโทเอทานอล และการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซินจะได้พอลิเปปไทด์ที่มีความยูนิฟอร์มมากขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของพอลิเปปไทด์มีความยาวใกล้เคียงกันมากขึ้น (วิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮสเอกซคลูชัน โครมาโทกราฟี) ทำให้เกิดองค์ความรู้ในการตัดโมเลกุลไฟโบรอินและเซรีซินให้มีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลที่แคบลง เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวัสดุที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นที่มีมูลค่าสูงกว่าการเป็นวัสดุสิ่งทอ เช่น เครื่องสำอาง วัสดุทางการแพทย์ต่อไป

จากผลการวิเคราะห์ความเป็นผลึกของเส้นไหมไหมไฟโบรอิน พบว่า เส้นไหมไหมไฟโบรอินมีสัณฐานวิทยาที่ประกอบไปด้วยด้วยผลึกและส่วนอสัณฐาน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสมบัติทางเชิงกล คือ เส้นไหมไหมไฟโบรอินมีทั้งความแข็งแรง และความสามารถในการยืดตัวซึ่งแตกต่างจากเส้นไหมธรรมชาติ และเส้นไหมสังเคราะห์อื่นๆ

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะตัวของไหมไหมไทยพันธุ์ต่าง ๆ เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความเป็นผลึก สัดส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบในเส้นไหมไหม
- หาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเส้นไหมไหม
- เพื่อเก็บข้อมูลดังกล่าวของไหมไหมไทยจะได้ใช้เป็นแหล่งอ้างอิงทั้งในและต่างประเทศ เพื่อการประยุกต์ใช้ต่อไป

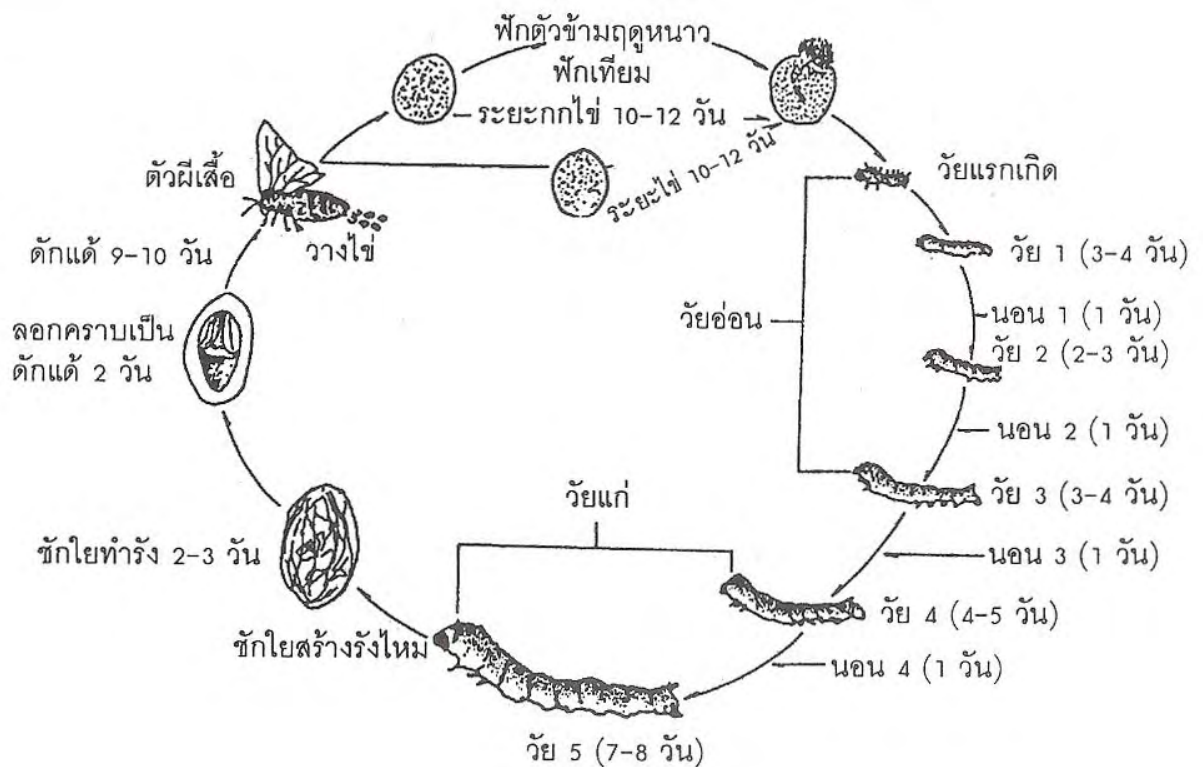
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ไหมและลักษณะของไหม

ไหม เป็นเส้นใยสิ่งทอที่เกิดจากตัวหนอนไหมพ่นของเหลวออกจากปาก กลายเป็นเส้นใย ล้อมรอบตัวเมื่อเข้าสู่วัยดักแด้ ไหมเป็นเส้นใยโปรตีนที่นำมาทำเป็นเสื้อผ้าเนื่องจากเส้นใยมีความยาวมาก (filament) ทนทาน มีความนุ่ม และมันวาวให้ความสวยงาม มีการนำเส้นใยไหมมาใช้ประโยชน์ โดยเริ่มแรกที่ราชวงศ์จีน การเลี้ยงและผลิตไหมนารายได้มาสู่ประเทศจีนเป็นจำนวนมาก แล้วเกิดการแพร่หลายขึ้นในประเทศญี่ปุ่นในเวลาต่อมา การเลี้ยงและผลิตไหมในประเทศไทยมีกำเนิดขึ้นในรัชกาลที่ 5 เมื่อประเทศไทยมีสนธิสัญญากับประเทศญี่ปุ่น ชาวญี่ปุ่นได้เข้ามาให้ความรู้เรื่องการปลูกหม่อน เลี้ยงไหม และได้สร้างสถานทดลองปลูกหม่อนเลี้ยงไหมขึ้นเป็นแห่งแรกที่จังหวัดนครราชสีมา การส่งเสริมการผลิตไหมในส่วนราชการได้หยุดชะงักไปในระยะเวลาหนึ่ง เนื่องจากตัวหนอนไหมเกิดโรคระบาด แต่ในส่วนของเอกชนยังมีการดำเนินต่อจนส่วนราชการมีนโยบายส่งเสริมอีกครั้งในปีพ.ศ. 2479 โดยให้ความช่วยเหลือด้านการตลาด ส่งเสริมการปลูกหม่อนพันธุ์ดี การคัดเลือกพันธุ์ไหมที่ต้านทานโรค และการทอผ้าไหมอย่างต่อเนื่อง และในปี 2514–2519 รัฐบาลได้กำหนดให้หม่อนไหมเป็นพืชสัตว์เศรษฐกิจตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 3 ในปัจจุบันเกิดการเลี้ยงและผลิตไหมเป็นระบบอุตสาหกรรมแบบ Sericulture ขึ้น เริ่มตั้งแต่การปลูกหม่อนเลี้ยงไหม การผลิตเส้นใยไหม และการทอผ้าไหม ก่อให้เกิดรายได้แก่ประเทศ ประเทศไทยจึงนับได้ว่าเป็นหนึ่งในหลายประเทศที่เป็นผู้นำด้านการส่งออกนอกเหนือจากประเทศจีน อิตาลี อินเดีย เกาหลี ตุรกี และบราซิล (มณฑล, 2541) ไหมที่ให้เส้นใยจากแมลงที่อยู่ในอันดับ Lepidoptera จินัส Bombyx และสปีชีส์ mori หรือเรียกกันว่า Bombyx mori หรือ B. mori ไหมจำแนกออกเป็น 3 ชนิด ตามจำนวนวงจรชีวิตต่อปี ได้แก่ ชนิดที่ฟักได้ตามธรรมชาติ 1 ครั้งต่อปี (monovoltine) และชนิดที่ฟักได้ตามธรรมชาติ 2 ครั้งต่อปี (bivoltine) มีกำเนิดจากเขตอบอุ่น และชนิดที่ฟักได้ตามธรรมชาติหลายครั้งต่อปี (multivoltine) มีกำเนิดจากเขตร้อน นอกจากนี้อาจจำแนกชนิดไหมตามสีของรังไหม ได้แก่ รังไหมสีขาว เหลือง เหลืองทอง เขียว ชมพู ชนิดที่นิยมเลี้ยงในประเทศในระดับอุตสาหกรรม จะเป็นพันธุ์ผสมต่างประเทศเนื่องจากเป็นรังไหมสีขาวและให้ผลผลิตสูงกว่าไหมพันธุ์ไทย หรือพันธุ์ไทยที่ชาวบ้านยังเลี้ยงกันอยู่บ้าง

ไหมได้มาจากรังไหมหรือใยที่ห่อหุ้มตัวหนอนไหม (larvea) ในช่วงชีวิตวัย 5 (ดูรูปที่ 1.1) ในขณะที่จะกลายเป็นดักแด้ (pupae)

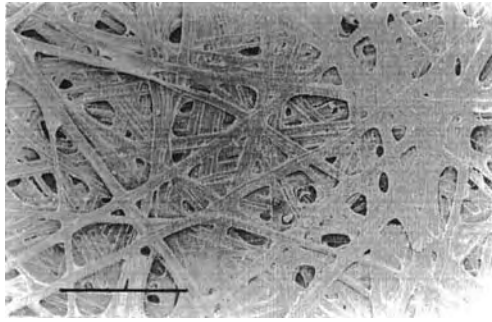


รูปที่ 1.1 วงชีวิตของไหม

ที่มา: พรรณี ศรีบรรเทา. เทคนิคการเลี้ยงไหมสำหรับประเทศไทย. 2530.

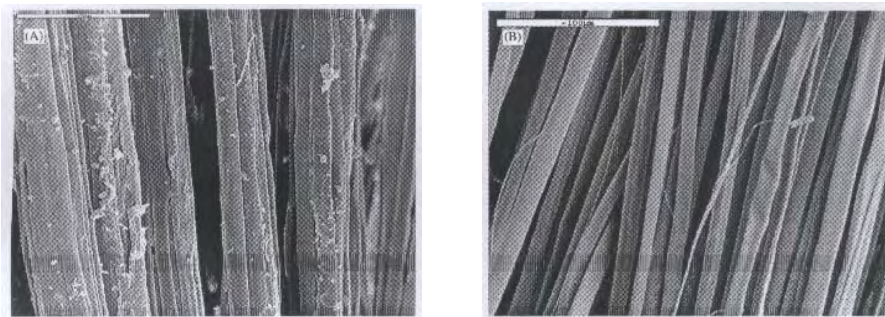
ไข่ไหมชนิดที่ฟักตัวได้หลายครั้งต่อปีจะใช้เวลาฟักตัวตามธรรมชาติ 9-12 วัน ส่วนไหมที่ฟักตัว 1-2 ครั้งต่อปี จะใช้วิธีการฟักเทียมซึ่งจะทำให้เกิดการฟักตัวภายใน 9-10 วัน เมื่อไข่ฟักตัวเป็นตัวหนอน (larvae) จะกินอาหารทันที ช่วงที่เป็นตัวหนอนจะใช้เวลานานที่สุดในวงจรชีวิตของไหม มีการกินอาหารมาก ทำให้ตัวหนอนไหมเจริญเติบโตเร็วมาก การเจริญเติบโตของหนอนไหมจะแบ่งออกเป็นช่วงๆ เรียกว่า วัย คือ วัย 1 วัย 2 วัย 3 วัย 4 และวัย 5 เมื่อถึงวัยสุดท้าย ตัวหนอนไหมจะเจริญเต็มที่ หยุดกินอาหาร ลำตัวมีสีเหลือง เรียกว่าไหมสุก ตัวหนอนไหมจะเริ่มหาที่ทำรัง โดยพ่นของเหลวออกมาเมื่อสัมผัสอากาศของเหลวจะแข็งตัวกลายเป็นเส้นใยหุ้มตัวเองที่เรียกว่า รังไหม ภายในเวลา 2-3 วัน ตัวหนอนไหมจะกลายเป็นดักแด้นอนอยู่ในรังเป็นเวลา 6-7 วัน ดักแด้จะกลายเป็นผีเสื้อและพ่นของเหลวที่มีฤทธิ์เป็นเบสละลายรังไหมดันตัวออกมา ผสมพันธุ์และวางไข่ หลังจากนั้นจะมีชีวิตต่ออีก 7-9 วัน (มณฑา, 2541)

ไหมเป็นโมเลกุลโปรตีนที่ผลิตออกมาจากตัวหนอนไหม โปรตีนไหมประกอบด้วยสองส่วนคือ กาวไหม มีลักษณะเป็นกาวที่เรียกว่าเซรีซินหุ้มเส้นใยไหมซึ่งเรียกว่าไฟโบรอินไว้ ดังแสดงในรูปที่ 1.2 และรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงพื้นผิวของรังไหมที่มีกลุ่มเส้นใยไฟโบรอินยึดด้วยกาวไหม

ที่มา : Horan et al., In vitro degradation of silk fibroin, **26**, 3385 – 3393, 2003.

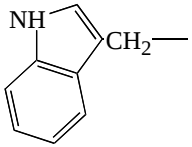
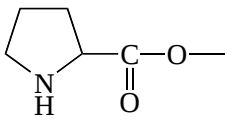
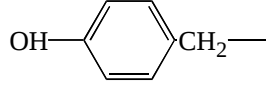
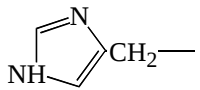
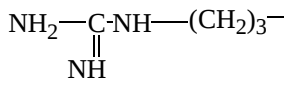


รูปที่ 1.3 ภาพถ่ายเส้นไหมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) เส้นไหมดิบ (ข) เส้นไหมหลังการฟอก

ที่มา : Horan et al., In vitro degradation of silk fibroin, **26**, 3385 – 3393, 2003.

มีรายงานว่าไหมเป็นสารป้องกันอนุมูลอิสระ (antioxidant) กันแสงยูวี (UV-blocking) เป็นสารเพิ่มความชุ่มชื้น (moisturizer) การแยกเอาไหมเซรีซินออกจากเส้นไหมไฟโบรอินด้วยกระบวนการ Degumming จะทำให้ไฟโบรอินสะอาดขึ้น ย้อมติดสีได้ง่าย ส่วนเซรีซินนั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง การทำพอลิเมอร์คอมพอสิตของกาวไหมเพื่อใช้เป็นเมมเบรนแยกตัวทำละลายต่างชนิดออกจากกัน การใช้วัสดุรักษาบาดแผลจากไฟโบรอิน จะทำให้แผลหายง่าย เซลล์บริเวณบาดแผลเจริญได้เร็วขึ้น (Mizoguchi, 1991; Yoshikawa, 2001) เนื่องจากทั้งเซรีซินและไฟโบรอินเป็นโปรตีน ในโมเลกุลจึงประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 สัดส่วนของกรดอะมิโนในไฮโฟโบรอนและเซรีซีน

ชนิดกรดอะมิโน	โครงสร้างของหมู่ R	น้ำหนักโมเลกุล	ปริมาณ (%โดยโมล)	
			ไฮโฟโบรอน	เซรีซีน
Glycine	H -	75.06	44.60	13.49
Alanine	CH ₃ -	89.09	29.40	5.97
Valine*	(CH ₃) ₂ CH -	117.15	2.20	2.75
Leucine*	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -	131.17	0.53	1.14
Isoleucine*	CH ₃ CH ₂ CH (CH ₃) -	131.17	0.66	0.72
Phenylalanine*	C ₆ H ₅ CH ₂ -	165.19	0.63	0.53
Methionine*	CH ₃ SCH ₂ CH ₂ -	149.21	0.10	0.04
Tryptophane*		204.23	0.11	0.21
Proline		115.13	0.36	0.68
Tyrosine		181.19	5.17	2.61
Cystine/2	SHCH ₂ -	240.30	0.20	0.15
Serine	HOCH ₂ -	105.09	12.10	33.43
Threonine*	CH ₃ CH (OH) -	119.12	0.91	9.74
Aspartic acid	HOOCCH ₂ -	133.10	1.30	16.71
Glutamic acid	HOOC CH ₂ CH ₂ -	147.13	1.02	4.42
Histidine		155.16	0.14	1.30
Lysine*	H ₂ N(CH ₂) ₃ CH ₂ -	146.19	0.32	3.30
Arginine		174.20	0.47	3.10

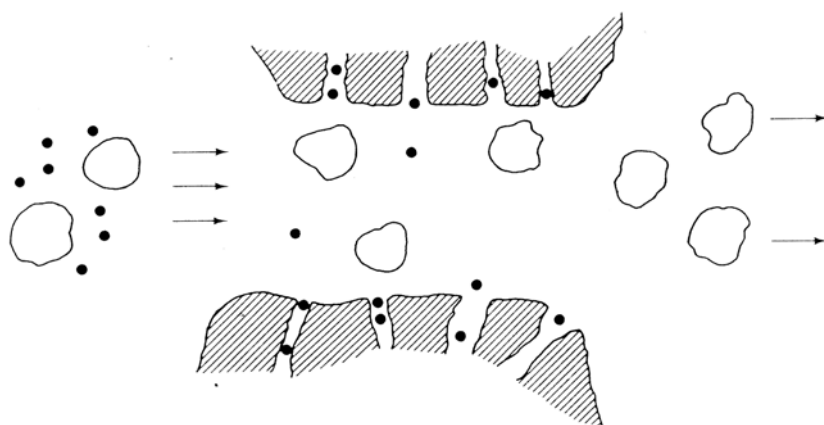
* กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย

ที่มา : Robson, 1998

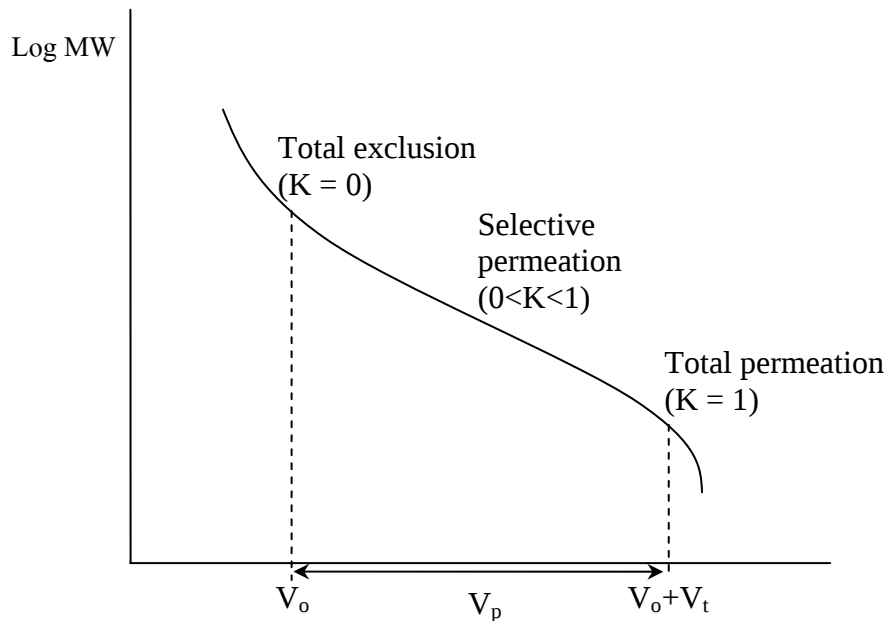
ในงานวิจัยนี้จะได้ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของกาวไหมเซรีซินและเส้นใยไหมไฟโบรอินของไหมพันธุ์ต่างๆ ทั้งพันธุ์พื้นบ้านและและไหมป่า ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของเส้นใยไหมไฟโบรอินอาจจะสัมพันธ์กับสมบัติทางกายภาพ เช่น สมบัติทางเชิงกลได้

1.2 เทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี

เทคนิคไซส์เอกซคลูชัน โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารขนาดใหญ่ เช่น พอลิเมอร์ หรือสารชีวโมเลกุล แต่ละโมเลกุลของสารเหล่านี้จะถูกแยกออกตามขนาดตามปริมาตรที่โมเลกุลจะเข้าไปในรูพรุน (V_p) ดังรูปที่ 1.4 ในช่วงที่เกิดการแยก (selectivity range) โมเลกุลของสารจะเดินทางผ่านเข้าไปในรูพรุนของวัสดุในคอลัมน์ โมเลกุลเล็กจะผ่านเข้าไปในรูพรุนขนาดต่างๆ จะใช้เวลานานในการเดินทางในคอลัมน์ ในขณะที่สารโมเลกุลใหญ่กว่าจะเข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งมีจำนวนน้อยกว่า จึงใช้เวลาเดินทางน้อยกว่า และสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่เกินกว่าที่จะเข้าไปในรูพรุนใดๆ ของวัสดุ จะผ่านเข้าไปในคอลัมน์ตามช่องว่าง (void) ที่อยู่ระหว่างอนุภาควัสดุเท่านั้น และจะเดินทางออกมาอย่างรวดเร็ว ได้ปริมาตร V_0 ส่วนโมเลกุลที่มีขนาดเล็กมาก จะใช้เวลาในการเดินทางเข้าไปในรูพรุนทุกๆ รูพรุน ได้ปริมาตร V_t จากการที่ขนาดโมเลกุลของสารสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักของโมเลกุล ซึ่งจะมีผลต่อเวลาคงค้างในคอลัมน์ตามกราฟมาตรฐานในรูปที่ 1.5 ดังนั้นการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างจึงสามารถหาได้จากเวลาคงค้างในคอลัมน์



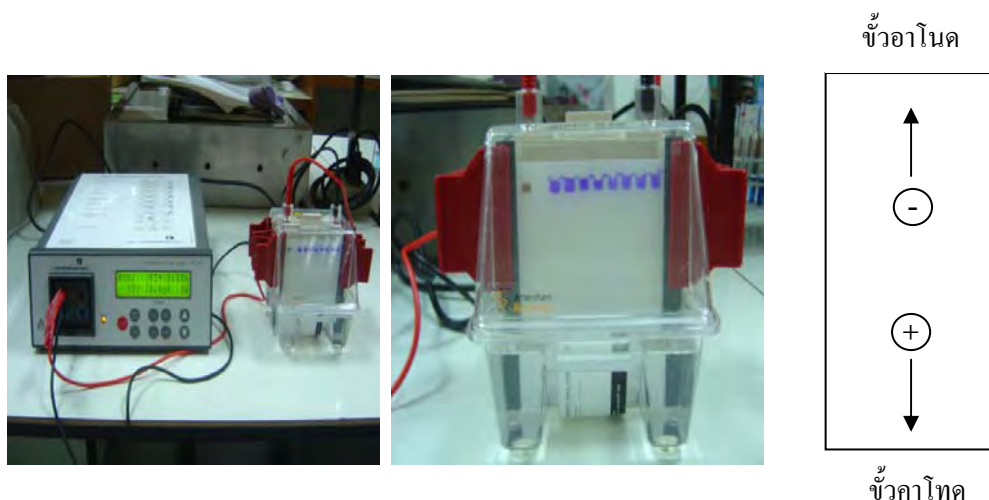
รูปที่ 1.4 การแยกสารตามขนาดที่แตกต่างกันด้วยวัสดุที่มีรูพรุน



รูปที่ 1.5 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง

1.3 เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่นิยมใช้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยให้โมเลกุลของโปรตีนที่ถูกปรับสภาพให้มีประจุ เคลื่อนที่บนแผ่นเจลพอลิอะครีลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้าไปยังขั้วคาโทดและอโนด ดังรูปที่ 1.6 สารแต่ละชนิดสามารถถูกแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุล เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีการเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตในบัฟเฟอร์ จะทำให้เกิดการทำลายพันธะไฮโดรเจนและแรงไฮโดรโฟบิกระหว่างโมเลกุลโปรตีนที่เป็นเกลียวหรือก่อนกลมคลายออกเป็นโมเลกุลเส้นตรง และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตจะทำให้จำนวนประจุสุทธิต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโปรตีนเท่ากัน ดังนั้นโปรตีนจึงถูกแยกตามขนาด โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางมากกว่า ระยะการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ของโปรตีนตัวอย่างจะนำไปเทียบกับ ระยะการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน ทำให้ได้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง



รูปที่ 1.6 ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสและการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยกระแสไฟฟ้า

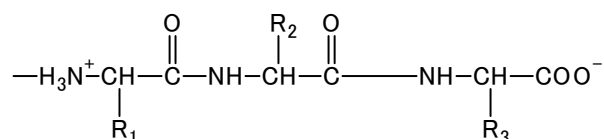
Robson (Robson, 1998) ได้กล่าวถึงความยุ่งยากในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน เนื่องจากการละลายยาก ปัญหาความบริสุทธิ์ และการสลายของโมเลกุลขณะการเตรียมสารละลาย ผลการรายงานค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินจึงมีความแตกต่างกัน ทั้งวิธีการวิเคราะห์ ชนิดของตัวทำละลาย เช่น การใช้ Osmotic pressure โดยมีคิวปริเอทิลีนไดเอมีนเป็นตัวทำละลายไฟโบรอินให้ค่า 33,000 ดาลตัน ในขณะที่เทคนิค viscosity และ streaming birefringence ที่มีลิเทียมไทโอไซยาเนตเป็นตัวทำละลายมีค่า 55,000 ดาลตัน การวิเคราะห์ไฟโบรอินจากต่อมไหมโดยเทคนิค Ultracentrifugation ให้ค่า 103,000 ดาลตัน ทั้งนี้เขาได้กล่าวว่า การใช้ตัวทำละลายคิวปริเอทิลีนไดเอมีนเป็นตัวทำละลายจะทำให้ไฟโบรอินเกิดปฏิกิริยา alkaline hydrolysis ในขณะที่ลิเทียมไทโอไซยาเนตทำให้เกิด neutral reaction การสกัดไฟโบรอินจากต่อมไหมด้วยยูเรียหรือ guanidine-HCl ทำให้น้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างแน่นอน และช่วงของค่าแคบลง คือ 350,000 360,000 365,000 และ 370,000 ดาลตัน การตัดพันธะไดซัลไฟด์ในไฟโบรอินแล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 103,000 ดาลตัน แสดงให้เห็นว่าพันธะไดซัลไฟด์ในไฟโบรอินจะเชื่อมสองคอมโพเนนต์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำเข้าด้วยกัน ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักของ H-chain 350,000 และ L-chain 25,000 ดาลตัน ตามลำดับ ในอัตราส่วนโดยโมลของ H-chain ต่อ L-chain เท่ากับ 1:1 และเขาสรุปว่า ยีนเป็นสาเหตุที่ทำให้ไฟโบรอินที่ได้จากแต่ละ species มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ซึ่งอยู่ในช่วง 340,000 ถึง 380,000 ดาลตัน

ส่วนเซรีซินนั้น มีรายงานว่า น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินขึ้นอยู่กับแหล่งของเซรีซินที่ถูกสกัดออกมา เช่น เซรีซินจากส่วนกลางของ anterior region มีน้ำหนักโมเลกุล 130,000 ถึง 220,000 ดาลตัน และน้ำหนักเซรีซินที่สกัดจากรังไหมด้วยน้ำร้อนมีค่าน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 100,000 ถึง 120,000 ดาลตัน

ในงานวิจัยนี้ จะได้ใช้เทคนิค SDS-PAGE และเทคนิคไซส์เอกซclusion โครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไหมทั้งกวไหมเซริซินและเส้นใยไหมไฟโบรอิน เพื่อหาคุณลักษณะเฉพาะของไหมพันธุ์พื้นบ้านเปรียบเทียบกับไหมป่า ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลอาจมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของเส้นใยไหม

1.4 โครงสร้างทางเคมีของโปรตีน

โปรตีนเป็นพอลิเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดตั้งแต่ 100 หน่วยขึ้นไป เช่น เอนไซม์ปาเปนในยางมะละกอประกอบด้วยกรดอะมิโน 198 หน่วย แต่ละหน่วยของกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรง จึงทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีความแข็งแรง โครงสร้างทั่วไปซึ่งแสดงดังรูปที่ 1.7

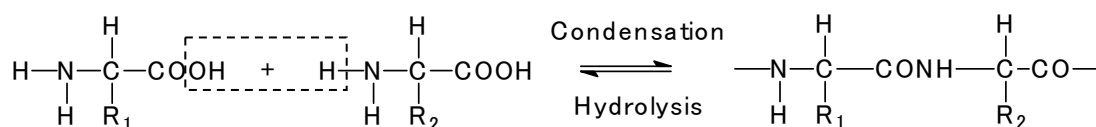


รูปที่ 1.7 โครงสร้างทั่วไปของโปรตีน

โปรตีนส่วนใหญ่มีโครงสร้างซับซ้อน และมีโครงสร้างหลายระดับ ดังนี้

1.4.1 โครงสร้างปฐมภูมิ

โครงสร้างปฐมภูมิ เป็นโครงสร้างที่ง่ายที่สุดของโปรตีน ซึ่งมักจะแสดงในรูปรหัสของตัวอักษรของกรดอะมิโนที่เรียงต่อกันจาก N-terminus ไปยัง C-terminus โปรตีนที่มีโครงสร้างแบบปฐมภูมิมิลักษณะเป็นพอลิเปปไทด์สายยาว (linear-chain polypeptide) โปรตีนแต่ละโมเลกุลประกอบขึ้นจากกรดอะมิโนหลายตัวที่ใช้ปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลิกเข้าทำปฏิกิริยาควบนั่นกับปลายหมู่อะมิโนก่อให้เกิดพันธะเปปไทด์ดังแสดงในรูปที่ 1.8



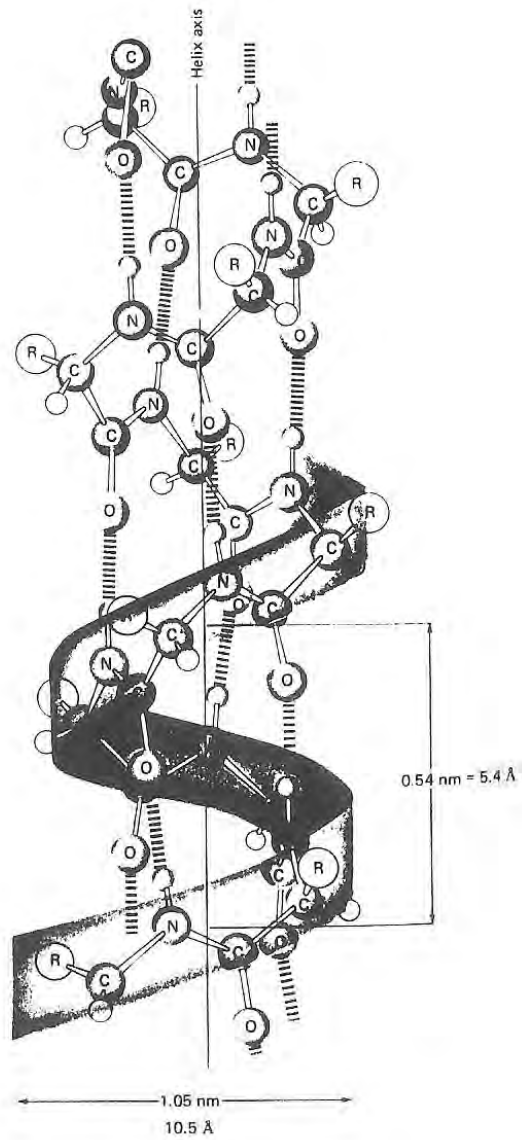
รูปที่ 1.8 โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน

ข้อมูลการเรียงลำดับของกรดอะมิโน ส่วนใหญ่หาได้จากการทดลองหาลำดับดีเอ็นเอ แล้วแปลงให้เป็นลำดับกรดอะมิโน เพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์โปรตีน

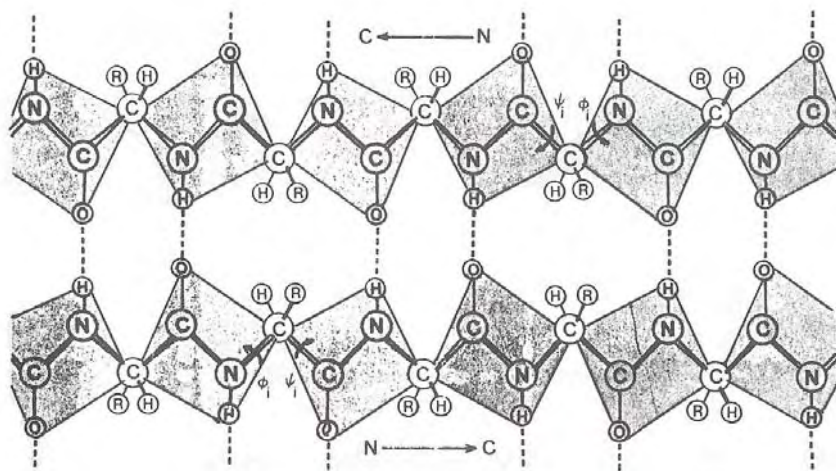
1.4.2 โครงสร้างทุติยภูมิ

โครงสร้างทุติยภูมิ บอกถึงการจัดเรียงกรดอะมิโนที่มีลักษณะจำเพาะ เพื่อเพิ่มความ

เสถียรของโครงสร้างโปรตีน สนับสนุนการทำงาน และปรับโปรตีนให้เหมาะกับสภาพแวดล้อม โครงสร้างทุติยภูมิที่สำคัญของโปรตีนได้แก่ α -helix เกิดจากการม้วนตัวเป็นเกลียวของสายเพปไทด์ เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโน ขนแกะ (wool) มีโครงสร้างชนิดนี้ และ β -pleated sheet เป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิลและหมู่อะมิโนของสายเพปไทด์ต่างเส้นที่เรียงขนานกัน มีรายงานว่า เส้นใยไหมไฟโบรอิน มีโครงสร้างแบบ β -pleated sheet (พัชรา, 2541) รูปที่ 1.9 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน



(ก)

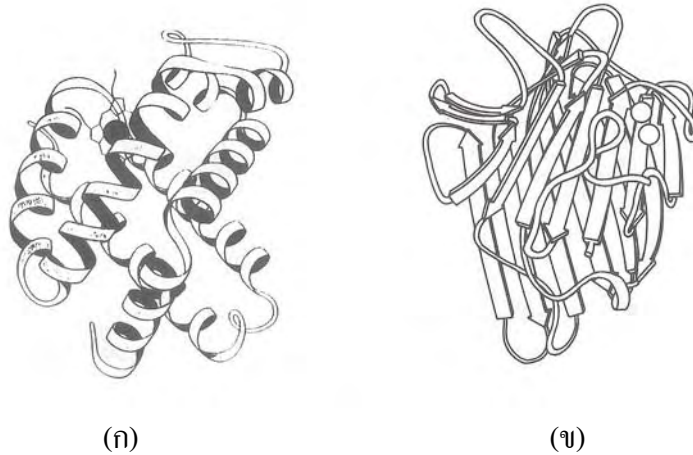


(ข)

รูปที่ 1.9 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (ก) α -helix (ข) β -pleated sheet

1.4.3 โครงสร้างตติยภูมิ

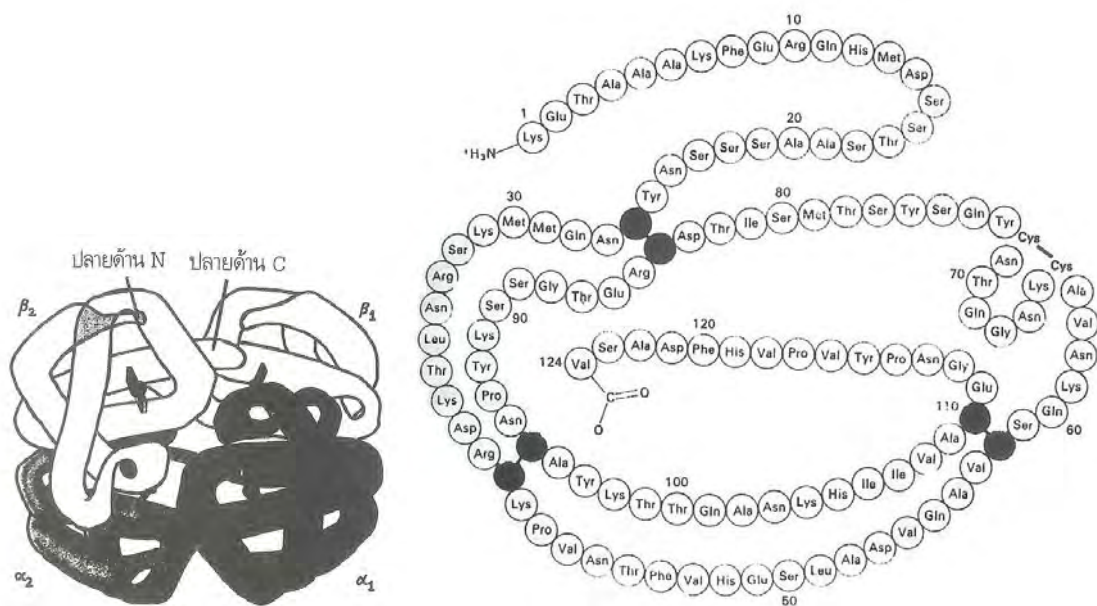
โครงสร้างตติยภูมิ เป็นโครงสร้างทุติยภูมิแบบ α -helix ที่ม้วนและไขว้เข้าหากันด้วยแรงยึดเหนี่ยวอ่อนๆ แสดงดังรูปที่ 1.10 โครงสร้างโปรตีนชนิดนี้มีความซับซ้อนมากขึ้นตามลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของสายเพปไทด์ เกิดเป็นโครงสร้างที่มีความจำเพาะต่อการทำหน้าที่ต่างๆ



รูปที่ 1.10 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน (ก) α -helix (ข) β -pleated sheet

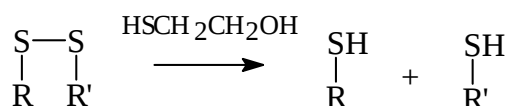
1.4.4 โครงสร้างจตุรภูมิ

โครงสร้างจตุรภูมิ มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน (globular structure) ที่ประกอบจากหน่วยย่อยมากกว่าหนึ่งหน่วย เช่น ฮีโมโกลบิน ดังรูปที่ 1.11 ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยสี่หน่วยมาเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน



รูปที่ 1.11 โครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีน

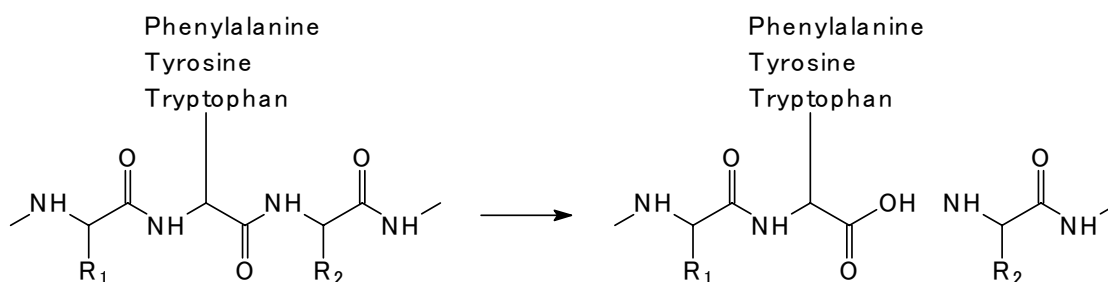
โปรตีนสามารถเกิดปฏิกิริยาโครโมไลซิสได้ด้วยกรดหรือเบส ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนใหม่ (ทั้งเซรีซินและไฟโบรอิน) จะทำการรีดิวซ์โมเลกุลของโปรตีนใหม่มาก่อน เพื่อได้หน่วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กลง และเพื่อทำลายโครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน การเติม 2-mercaptoethanol ลงในสารละลายโปรตีน จะทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของโมเลกุลโปรตีน จะทำให้การเชื่อมต่อกันของโมเลกุลโปรตีนบริเวณซิสเทอีนในส่วนของพันธะไดซัลไฟด์ (-S-S) ขาดออกจากกันดังรูปที่ 1.12 จะได้หน่วยโปรตีน (sub-unit) ขึ้นมา โดยทั่วไปโมเลกุลของโปรตีนใหม่จะประกอบด้วย 2 หน่วยหลัก คือหน่วยที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำ ซึ่งสามารถแยกออกจากกันโดยทำการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (Datta, 2001) ซึ่งจากการทดลองโครมาโทแกรมที่ได้ พบว่า ประกอบด้วยบางฟิสิกส์ที่ไม่แยกออกจากกันเป็นฟิสิกส์เดียว แสดงว่ามีหน่วยของโปรตีนใหม่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก และปรากฏฟิสิกส์ที่ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก อาจเกิดเนื่องจากหน่วยโปรตีนใหม่เกิดการเชื่อมโยงโมเลกุลทำให้เกิดเป็นเจลของโปรตีน ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น



รูปที่ 1.12 ปฏิกิริยาการรีดิวซ์โปรตีนด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

ที่มา : P. A. Bailey, An Introduction to Peptide Chemistry, 1990

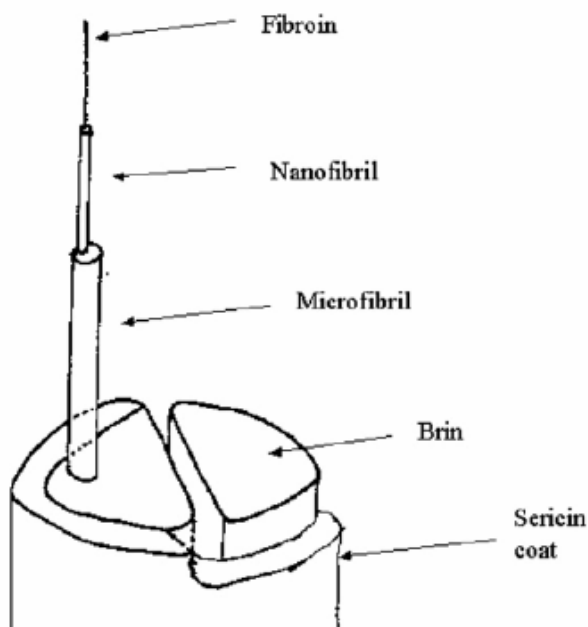
การใช้เอนไซม์ไโคโมทริปซินทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีน เกิดการตัดสายโซ่โปรตีนจำเพาะที่ตำแหน่งฟีนอลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน (ดูรูปที่ 1.13) ทำให้สายโซ่ของโปรตีนสั้นลง กลายเป็นโปรตีนแฟรกชันได้



รูปที่ 1.13 การไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยเอนไซม์ไโคโมทริปซินได้โปรตีนแฟรกชัน

1.5 โครงสร้างทางกายภาพของไหม

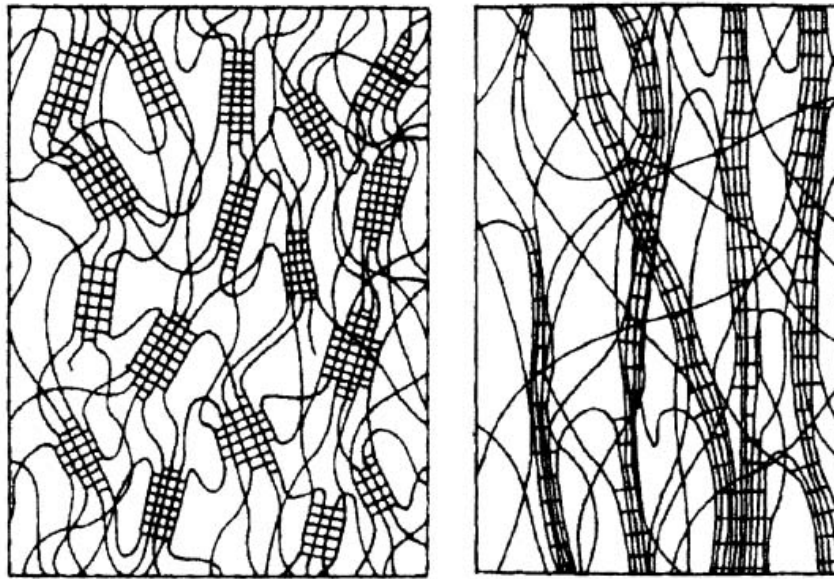
เส้นใยไหม จัดเป็นวัสดุจากพอลิเมอร์ทางธรรมชาติชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นเส้นที่ประกอบมาจากเส้นใยขนาดเล็ก (microfibril) เป็นโปรตีนชนิดเส้นใย (fibrous protein) ชื่อไฟโบรอิน รูปที่ 1.14 แสดงส่วนประกอบของเส้นใยไหมที่ประกอบขึ้นมาจากไมโครไฟบริลของไฟโบรอิน ซึ่งจะเห็นได้ว่าฟิลาเมนต์ของเส้นไหม (brin) มีลักษณะเป็นเส้นคู่และมีกาวไหมเซรีซินหุ้มอยู่ ส่วนย่อยที่ประกอบกันเป็น brin คือ microfilament ซึ่งประกอบมาจาก nanofilament ซึ่งมีหน่วยย่อย fibroin ประกอบขึ้นมา



รูปที่ 1.14 ส่วนประกอบของเส้นใยไหมแสดงให้เห็นไมโครไฟบริลที่ประกอบกันจากไฟโบรอิน

ที่มา : O. Hakimi et al., Composites: Part B 38 (2007) 324–337.

เนื่องจากเส้นใยไหมเป็นโมเลกุลยาว จึงไม่สามารถจัดเรียงตัวขนานกันสม่ำเสมอเกิดเป็นโครงสร้าง pleated sheet ได้ทั้งหมด ดังนั้นมอร์โฟโลยีของเส้นใยไหมจึงมีส่วนที่เป็นผลึก (crystalline region) และส่วนอสัณฐาน (amorphous region) ดังเช่นพอลิเมอร์ส่วนใหญ่ โครงสร้างความเป็นผลึกของพอลิเมอร์มีหลายโมเดล สามารถอธิบายมอร์โฟโลยีของเส้นใยไหมได้ดังรูปที่ 1.15 (ก) และ 1.15 (ข)



รูปที่ 1.15 มอร์โฟโลยีของเส้นใยไหมอธิบายด้วย (ก) Fringed micelle structure (ข) Fringed fibril structure

ที่มา : C. Woodings, Regenerated cellulose fibres, 2001.

Fringed micelle structure อธิบายว่า ส่วนผลึกเป็นส่วนของโมเลกุลที่เป็นระเบียบเรียกว่าไมเซลล์ฝังตัวอยู่ในส่วนอสัณฐานที่เป็นส่วนของโมเลกุลที่ไม่มีความเป็นระเบียบ ในแบบจำลองของ Fringed fibril structure อธิบายว่า ส่วนหัวท้ายของส่วนผลึกมีสายโซ่โมเลกุลที่ไม่เป็นระเบียบคือส่วนอสัณฐานไหลออกมาเป็นไฟบริลตามแนวเส้นใย เมื่อเส้นใยได้รับแรงดึงจากภายนอก โครงสร้างของเส้นใยจะพยายามจัดเรียงตัวตามแนวทิศทางของแรงดึง โมเลกุลจึงเกิดความเป็นระเบียบ เหมือนกับการ drawing เส้นใยสังเคราะห์

1.6 สมบัติทางเชิงกลของเส้นใยไหม

สมบัติการทนต่อแรงดึง (tensile properties) เป็นสมบัติทางเชิงกลที่สำคัญอย่างหนึ่งของเส้นใยสิ่งทอ เป็นสมบัติที่ตอบสนองต่อแรงที่กระทำและการเสียรูปไปตามแกนของเส้นใย ที่จะส่งผลถึงพฤติกรรมของเส้นใยในขณะกระบวนการผลิตและสมบัติของสิ่งทอที่กลายเป็นผลิตภัณฑ์

สมบัติการทนต่อแรงดึงของเส้นใยที่สามารถทดสอบได้โดยง่ายคือ การยืดตัว และการขาดออกเมื่อมีการเพิ่มแรงดึงที่น้อยๆ ปัจจัยที่จะมีผลต่อความแข็งแรงของเส้นใย มีดังนี้ คือ

- วัสดุที่จะทดสอบและภาวะขณะการทดสอบ

พฤติกรรมของวัสดุ ขึ้นอยู่กับธรรมชาติและการจัดเรียงตัวของโมเลกุลที่ประกอบกับ

กลายเป็นวัสดุนั้น ความแตกต่างด้านธรรมชาติและการจัดเรียงตัวจะมีความแตกต่างในแต่ละโมเลกุล และในแต่ละตัวอย่างด้วย นอกจากนี้ภาวะที่กระทำต่อตัวอย่างและภาวะขณะทดสอบตัวอย่าง เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ก็มีผลต่อค่าความทนต่อแรงดึงเช่นเดียวกัน

- การจัดเรียงตัวและขนาดของตัวอย่างที่จะทดสอบ

ขนาดของตัวอย่างมีผลโดยตรงกับค่าความทนต่อแรงดึง เช่น แรงที่จะทำให้ตัวอย่างขาดจะเป็นสัดส่วนกับพื้นที่หน้าตัดของเส้นใย และการยืดจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของเส้นใย ดังนั้น จึงต้องกำหนดความทนต่อแรงดึงและความยาวของเส้นใยที่จะทดสอบให้เท่ากัน ในกรณีที่ตัวอย่างประกอบจากเส้นใยหลายเส้น จึงไม่จำเป็นที่ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจะขาดที่แรงเท่ากันและยืดตัวออกได้เท่ากัน

- ธรรมชาติและระยะเวลาในการทดสอบ

การยืดตัวของเส้นใยไม่ได้มีผลจากแรงที่ใช้ดึงอย่างเดียว แต่มีผลจากระยะเวลาในการดึง นั่นคือ อัตราการดึง (test speed or rate of loading) ด้วย

สมบัติทางเชิงกลของเส้นใย สามารถนำเสนอได้ด้วยหลายตัวแปร ดังนี้

- กราฟของแรงดึง-การยืดตัวและกราฟของความเค้น-ความเครียด

พฤติกรรมของเส้นใยแต่ละเส้นเมื่อถูกดึงด้วยแรงที่เพิ่มขึ้นทีละน้อย สามารถพิจารณาได้จากกราฟของแรงดึง-การยืดตัวที่มีจุดขาด ดังแสดงในรูปที่ 1.16 แรงที่ใช้ดึง (F) อาจจะเป็นนิวตัน หรือกรัมได้ ส่วนการยืดตัว (L) มีหน่วยเป็นเซนติเมตร เมื่อต้องการเปรียบเทียบค่าดังกล่าวของเส้นใย คนละชนิดที่มีขนาดไม่เท่ากัน แรงดึงจะถูกเปลี่ยนเป็นความเค้น (stress, σ) ดังสมการ

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

เมื่อ σ คือ ความเค้น มีหน่วยเป็น นิวตันต่อตารางเมตร หรือ ปาสคาล

F คือแรงดึง มีหน่วยเป็นนิวตัน

A คือพื้นที่หน้าตัด มีหน่วยเป็นตารางเมตร

ในกรณีที่เส้นใยสิ่งทอ การกำหนดขนาดหรือพื้นที่หน้าตัดของเส้นใยหรือเส้นด้ายทำได้ยาก จึงใช้การพิจารณาน้ำหนักและความหนาแน่นของเส้นใยและเส้นด้ายแทน จะได้ ความเค้นจำเพาะ (specific stress, σ^*)

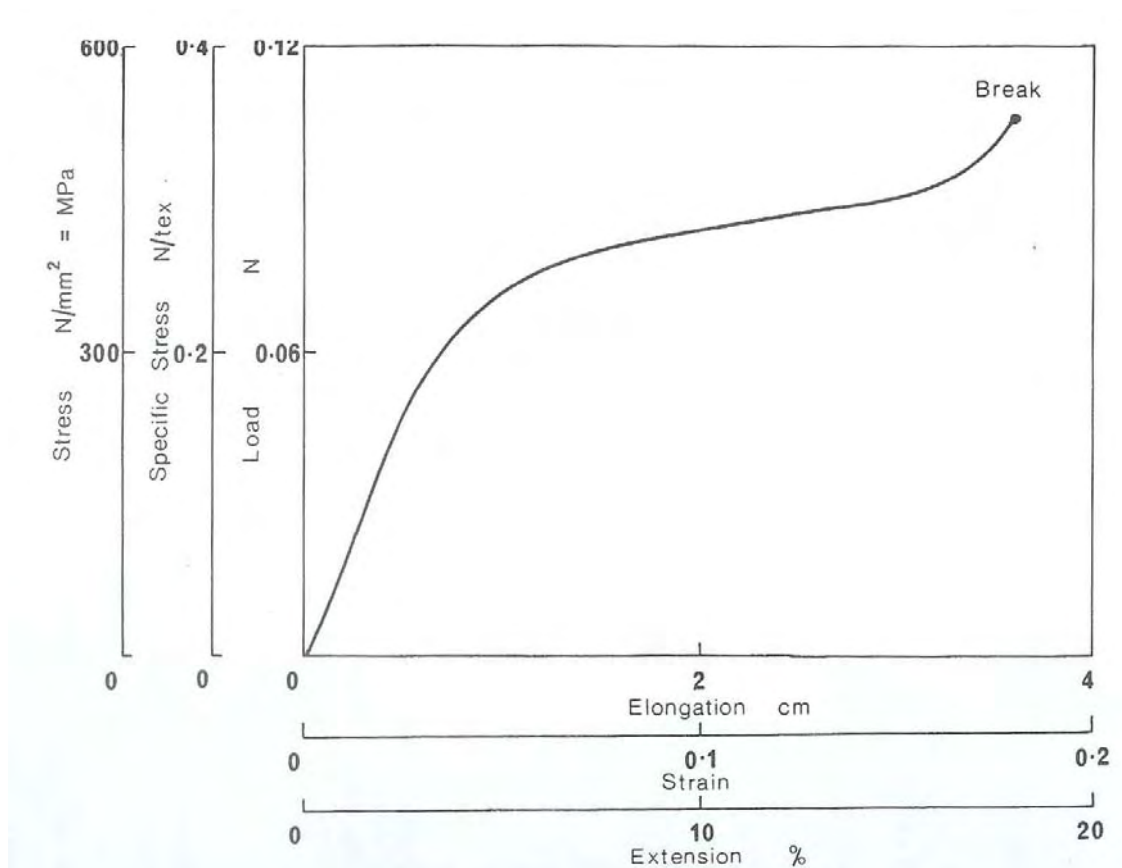
$$\sigma^* = \frac{F}{M / L^*}$$

เมื่อ σ^* คือ ความเค้นจำเพาะ มีหน่วยเป็นนิวตันเมตรต่อกิโลกรัมหรือปาสคาลลูกบาศก์เมตรต่อกิโลกรัม

F คือแรงดึง มีหน่วยเป็นนิวตัน

M คือน้ำหนักเส้นใยหรือเส้นด้ายมีหน่วยเป็นกิโลกรัม

L^* คือความยาวของเส้นใยหรือเส้นด้ายหนึ่งหน่วย (unit length) มีหน่วยเป็นเมตร



รูปที่ 1.16 กราฟของแรงดึง-การยืดตัวของเส้นใยขนาด 30 เซนติเมตร ความละเอียด 0.3 เท็กซ์ และความหนาแน่น 1.5 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

เพื่อความสะดวกจากการทราบความละเอียดหรือความหนาแน่นเชิงเส้นตรง (linear density) ของเส้นด้าย มีหน่วยเป็นเท็กซ์ ความเค้นจำเพาะจะมีหน่วยเป็นนิวตันต่อเท็กซ์ ซึ่งมีค่าสูงกว่านิวตันเมตรต่อกิโลกรัมถึงล้านเท่า แต่ถ้าความเค้นจำเพาะมีค่าน้อย หน่วยของความเค้นจำเพาะอาจจะเปลี่ยนเป็นมิลลินิวตันต่อเท็กซ์ หรือถ้าความละเอียดของเส้นใยหรือเส้นด้ายมีหน่วยเป็นดีเนียร์ หน่วยของความเค้นจำเพาะก็อาจจะใช้กรัมต่อดีเนียร์ (g/den หรือ gf/tex หรือ g-wt/tex) ได้

โดย

$$\sigma = \rho \sigma^*$$

เมื่อพิจารณาความยาวของตัวอย่าง การยืดตัว คือ ความเครียดของการยืดตัว (tensile strain, γ) หรือเปอร์เซ็นต์ของการยืดตัว (percentage of extension) โดยที่

$$\gamma = \frac{\Delta L}{L}$$

เมื่อ γ คือความเครียดของการยืดตัว

ΔL คือการยืดตัวหรือความยาวที่เปลี่ยนแปลง

L คือความยาวเริ่มต้น

$$\% \gamma = \frac{\Delta L}{L} \times 100$$

เมื่อ $\% \gamma$ คือเปอร์เซ็นต์ของการยืดตัว

ความแข็งแรง (strength) ของเส้นใย จะเป็นค่าแรงมากที่สุดที่ทำให้เส้นใยขาด อาจเรียกว่า แรงฉีก จุดขาด (breaking load) ดังนั้นความเค้นจำเพาะ ณ จุดขาด (specific stress at break) จึงเป็นค่าความแข็งแรงจำเพาะ (specific strength) หรือความเหนียว (tenacity)

งานของการแยก (work of rupture, W) บางครั้งเรียกว่า ความเหนียว (toughness) หมายถึง พลังงานที่ใช้ในการทำให้เส้นใยขาด มีหน่วยเป็นจูล จากการดึงเส้นใยด้วยแรง F ความยาวเส้นใยที่เพิ่มขึ้นจากการถูกดึงเป็น dl จะได้

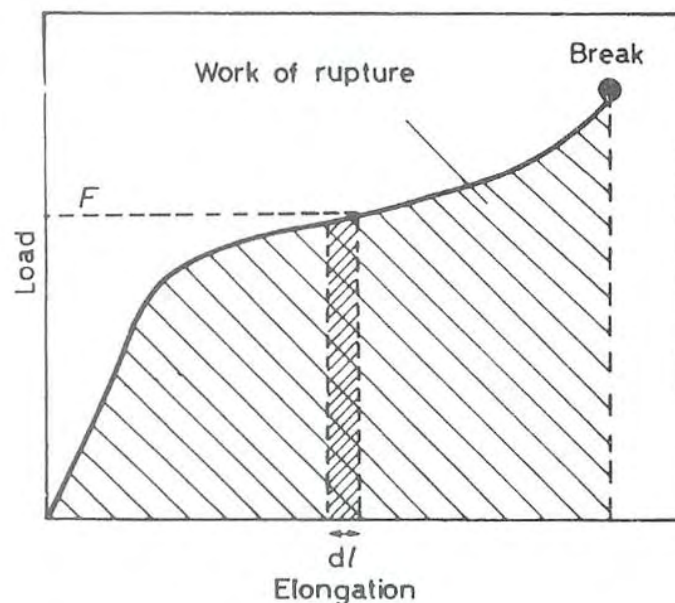
งานที่ทำ = แรงดึง x ความยาวเส้นใยที่เพิ่มขึ้น

ดังนั้น $W = F \cdot dl$

ดังนั้น งานที่จะทำให้เส้นใยขาด คือ งานของการแยก

$$W = \int_0^{\text{break}} F \cdot dl$$

นั่นคือ พื้นที่ใต้กราฟของแรงดึง-การยืดตัว ดังแสดงดังรูปที่ 1.17



รูปที่ 1.17 งานของการแยกหาได้จากพื้นที่ใต้กราฟของแรงดึง-การยืดตัว

$$\text{specific work of rupture} = \frac{\text{work of rupture}}{(\text{mass/unit length}) \times \text{initial length}}$$

$$W^* = \frac{W}{M \times L}$$

เมื่อ W^* คือ งานการแยกจำเพาะ มีหน่วยเป็นนิวตันต่อเทกซ์ หรือกิโลจูลต่อกรัม
 W คือ งานการแยก
 M คือ น้ำหนักเส้นใยต่อหนึ่งหน่วยความยาว
 L คือ ความยาวเริ่มต้นของเส้นใย

ในงานวิจัยนี้ได้แช่เส้นใยไหมในตัวทำละลายต่างๆ เพื่อศึกษาการบวมตัวและได้ดึงเส้นใยไหมในตัวทำละลายต่างๆ เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของโมเลกุล และศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเชิงกลที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของเส้นใยไหม

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

งานวิจัยนี้ได้ใช้สารเคมี วัสดุและเครื่องมือดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2

ตารางที่ 2.1 สารเคมีในงานวิจัย

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ความบริสุทธิ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1) Acetone	CH_3COCH_3	99.8 %	Merck	Germany
2) Bovine Serum Albumin	-	97.0 %	Fluka	Switzerland
3) Calcium chloride	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	98.0-103.0 %	Univar	Australia
4) Chymotrypsin	-	-	Merck	Germany
5) Copper (II) sulphate pentahydrates	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	99.0 %	Univar	Australia
6) Dichloromethane	CH_2Cl_2	99.9 %	Merck	Germany
7) Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	99.9 %	Merck	Germany
8) Folin- Ciocolteau reagent	-	-	Merck	Germany
9) Hexane	C_6H_{14}	99.9 %	Fisher	U.S.A.
10) Lithium bromide	LiBr	99.0 %	Sigma	U.S.A.
11) Lithium thiocyanate	LiSCN	-	Aldrich	U.S.A.
12) Magnesium chloride	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	98.0 %	Fluka	Switzerland
13) 2-Mercaptoethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	99.0 %	Acros	U.S.A.
14) Methanol	CH_3OH	99.9 %	Merck	Germany
15) Sodium azide	NaN_3	99.0 %	Univar	Australia
16) Sodium carbonate	Na_2CO_3	99.9 %	Merck	Germany
17) Sodium dodecyl sulfate	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$	-	Sigma	U.S.A.
18) Disodium hydrogen orthophosphate	Na_2HPO_4	98.0-100.5 %	Fisher	U.K.
19) Sodium dihydrogen orthophosphate	NaH_2PO_4	99.0 %	Fisher	U.K.

ตารางที่ 2.1 สารเคมีในงานวิจัย (ต่อ)

20) Sodium hydroxide	NaOH	99.0 %	Fisher	U.K.
21) Sodium potassium tartrate	NaKC ₄ H ₄ O ₆	99.0 %	Fisher	U.K.
22) Standard protein สำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิส			Biorad	U.S.A.
23) Standard protein สำหรับไซสเทอซคลูซันโคร มาโทกราฟี			Biorad	U.S.A.

หมายเหตุ – ไม่ระบุ

ตารางที่ 2.2 วัสดุและเครื่องมือ

วัสดุ-เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
1) เครื่องชั่งวิเคราะห์ละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Metler Toledo รุ่น AB 204	Switzerland
2) เครื่องเจลเพอร์มิเอชันโครมาโทกราฟี (Gel Permeation Chromatograph)	Hewlett Packard	U.S.A.
3) Injector	Rheodyne	U.S.A.
4) ปั๊ม (pump)	Hewlett Packard	U.S.A.
5) เครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต (UV detector)	Hewlett Packard	U.S.A.
6) คอลัมน์	Waters รุ่น Bio Suit SEC 175	U.S.A.
7) เครื่องให้ความร้อนของคอลัมน์	Timberline Instrument	U.S.A.
8) ชุดกรองสารละลาย ขนาด 0.45 ไมครอน	Hewlett Packard	U.S.A.
9) แผ่นกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน	Hewlett Packard	U.S.A.
10) Syringe ขนาด 25 ไมโครลิตร	Hewlett Packard	U.S.A.
11) Ultrasonic bath	Metason รุ่น 120	U.S.A.
12) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Thermo spectronic	England

ตารางที่ 2.2 วัสดุและเครื่องมือ (ต่อ)

13) เครื่องทดสอบสมบัติเชิงกล (Texture analyzer)	Stable Micro Systems รุ่น TA.XT.plus	U.K.
14) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH/Ion Analyzer)	Metler Toledo รุ่น MA 235	Switzerland
15) เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (pH-ISC-conductivity meter)	Denver Instrument รุ่น 250	U.S.A.
16) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert	Germany
17) เครื่องให้ความร้อน (Hot plate stirrer)	Fisher Scientific	U.S.A.
18) ตู้อบ (Isotemp oven)	Heraeus	Germany
19) Dialysis membranes	Cellu Sep	U.S.A.

2.2 การเก็บตัวอย่างรังไหม

ตัวอย่างรังไหมได้มาจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดเชียงใหม่ ศรีสะเกษ ชัยภูมิ และจังหวัดสุรินทร์ ศ.ดร.ทิพย์วิดี อรรถธรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

2.3 การศึกษาลักษณะเฉพาะด้านน้ำหนักโมเลกุลของไหม

2.3.1 การเตรียมสารละลายเซรีซินและสารละลายไฟโบรอิน

1) การสกัดกาวไหมเซรีซินโดยนำรังไหม 5 รัง ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเติมน้ำ Ultra Pure ปริมาตร 20 mL นำแล้วต้มที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นระเหยแห้งเพื่อให้ได้ผงเซรีซิน ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเซรีซินด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสจะเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 4 และ 6 g/L ส่วนการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเซรีซินด้วยเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี จะนำกาวไหมมาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.7 ปริมาตร 0.5 mL แล้วกรองสารละลายเซรีซินด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 µm ก่อนการวิเคราะห์

2) การทำความสะอาดเส้นไหมไฟโบรอิน โดยนำไหมดิบแต่ละพันธุ์มาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาล้างกาวไหมที่ยังเหลืออยู่ด้วยสารละลายผสมของ 0.3 %(w/v) โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต และ 0.02 M โซเดียมคาร์บอเนต ในอัตราส่วน 1 g : 50 mL ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเส้นไหมไฟโบรอินไปล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นเส้นไหมไฟโบรอินน้ำหนัก 10 mg มาละลายในลิเทียมโบรไมด์เข้มข้น 9.0 M ส่วนไหมอีรีนำมาละลายใน 9.0 M ลิเทียมไทโอไซยานาต ที่ 80 °C จนกว่าเส้นไหมจะละลายหมด (ใช้เวลา 3-4 วัน) เนื่องจากไฟโบรอินมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก จึงได้

เตรียมเป็นโปรตีนแฟรกชัน 3 ชนิด ด้วยการทำปฏิกิริยา 3 แบบ ดังนี้ คือ (1) การรีดิวซ์ไฟโบรอินด้วย 2-เมอร์แคปโทเอทานอล 2 % (v/v) ของสารละลายทั้งหมด ที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารละลายไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 (2) การไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยเติมเอนไซม์ไคโมทริปซิน 0.2 mg/ml ลงในสารละลายไฟโบรอิน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารละลายไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 (3) รีดิวซ์ไฟโบรอินด้วย 2-เมอร์แคปโทเอทานอล 2 % (v/v) ของสารละลายทั้งหมด ที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเติมเอนไซม์ไคโมทริปซิน 0.2 mg/ml ลงในสารละลายไฟโบรอิน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้ไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3 จากนั้นทำให้สารละลายไฟโบรอินปราศจากลิเทียมโบรไมด์และลิเทียมไทโอไซยาเนตด้วยวิธีไดอะไลซิส โดยใช้ cellulose membrane และใช้ dialysis buffer เป็น Milli-Q water จะใช้ปริมาณ 1 ลิตร ต่อ 1 ครั้ง ในการทำไดอะไลซิส และต้องเปลี่ยน Milli-Q water ทุกครั้งหลังจากไดอะไลซิสจนกว่าในสารละลายไม่มีลิเทียมโบรไมด์หรือลิเทียมไทโอไซยาเนตปนอยู่ โดยทดสอบค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง pH-ISC-conductivity meter ซึ่งค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า 20 μ S แล้วนำสารละลายหน่วยโปรตีนของไฟโบรอินไประเหยจนแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C

2.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเลาว์รี

สารละลายเซรีซินและสารละลายไฟโบรอินที่เตรียมได้ ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเลาว์รี

1) เตรียมสารละลายอัลคาไลน์ โดยผสม 0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ 49 mL กับ 4 % (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต 49 mL แล้วเติม 1 % (w/v) คอปเปอร์ซัลเฟต 1 mL จากนั้นจึงใส่ 2 % (w/v) โซเดียมโปแตส เซียมทาร์เทรต 1 mL ซึ่งสารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง

2) เจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่น

3) เตรียมสารละลายของไฟโบรอินที่ผ่านการไดอะไลซิสมาวิเคราะห์หาโปรตีน โดยการเติมสารต่างๆ ตามตารางที่ 2.3 เพื่อหาปริมาณโปรตีน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ตารางที่ 2.3 การเตรียมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยเลาว์รีย์

หลอดที่	สารเคมี				
	1.0 g/ml	หน่วยโปรตีน	น้ำปราศจาก	สารละลาย	dil.Folin
	BSA	ไฟโบรอินที่ผ่านการ	ไอออน	อัลคาไลน์	Ciocalteu
	(mL)	ไดอะไลซิส (mL)	(mL)	(mL)	(mL)
1	-	-	1.0	5.0	5.0
2	0.1	-	0.9	5.0	5.0
3	0.2	-	0.8	5.0	5.0
4	0.3	-	0.7	5.0	5.0
5	0.4	-	0.6	5.0	5.0
6	0.5	-	0.5	5.0	5.0
7	0.6	-	0.4	5.0	5.0
8	0.7	-	0.3	5.0	5.0
9	0.8	-	0.2	5.0	5.0
10	0.9	-	0.1	5.0	5.0
11	1.0	-	-	5.0	5.0
12	-	1.0	-	5.0	5.0

หมายเหตุ เมื่อทำการเติมสารละลายอัลคาไลน์แล้วให้ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเมื่อเติมสารละลาย Folin - Ciocalteu reagent แล้วให้เขย่าหลอดทดลองให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

4) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารละลายไฟโบรอิน ก่อนที่จะวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินและเซรีซินด้วยสองเทคนิค ดังต่อไปนี้

2.3.3 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินและไฟโบรอินด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินและไฟโบรอินด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส SDS-PAGE ทำได้ดังนี้

- 1) การเตรียม Acrylamide/bis (30%T, 2.67%C)

ชั่ง Acrylamide 29.2 กรัม และ N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bis) 0.8 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำมาผสมกัน สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานที่อุณหภูมิ 4 °C

2) การเตรียม 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ชั่ง Tris base 18.15 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 60 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 6 M HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีด 100 มิลลิลิตร

3) การเตรียม 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

ชั่ง Tris base 6 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 60 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 6 M HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีด 100 มิลลิลิตร

4) การเตรียมสารละลาย 10% w/v SDS

ชั่ง SDS 10 กรัม และละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 90 มิลลิลิตร กวนเบาๆ แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีด 100 มิลลิลิตร

5) Running buffer, pH 8.3

ชั่ง Tris base 9 กรัม, SDS 3 กรัม ผสมกับ glycine 43.2 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีด 100 มิลลิลิตร (หากจะนำมาใช้งาน ต้องเจือจาง 5 เท่า)

6) Sample buffer (SDS reducing buffer)

เตรียมสารละลาย 4.0 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารดังนี้

Deionized water	1.9 มิลลิลิตร	
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.5 มิลลิลิตร	
Glycerol	0.4 มิลลิลิตร	
10% (w/v) SDS	0.8 มิลลิลิตร	
2-mercaptoethanol	0.2 มิลลิลิตร	
1% (w/v) bromophenol blue	0.2 มิลลิลิตร	(รวมทั้งหมด 4.0 มิลลิลิตร)

7) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายเซรีซินเข้มข้น 4 และ 6 ppb ปริมาตรต่างๆ แล้วเติม Sample buffer ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้น เติม 0.2% w/v urea ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในทุกๆ สารละลายตัวอย่าง

8) การเตรียมสารละลายที่ใช้ตรึงและย้อม

ใช้ตรึง 12.5% w/v TCA

ใช้ย้อม 1% w/v Coomassie Brilliant Blue R250 : 12.5% TCA เป็น 1 : 20

9) สารละลาย Destaining

25% v/v ethanol, 10% v/v acetic acid และ 65% v/v Deionized water

10) สารเพิ่มความถ่วงจำเพาะ 10% v/v glycerol

การเตรียม Separating gel และ Stacking gel แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 สารเคมี และปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียม Separating gel และ Stacking gel

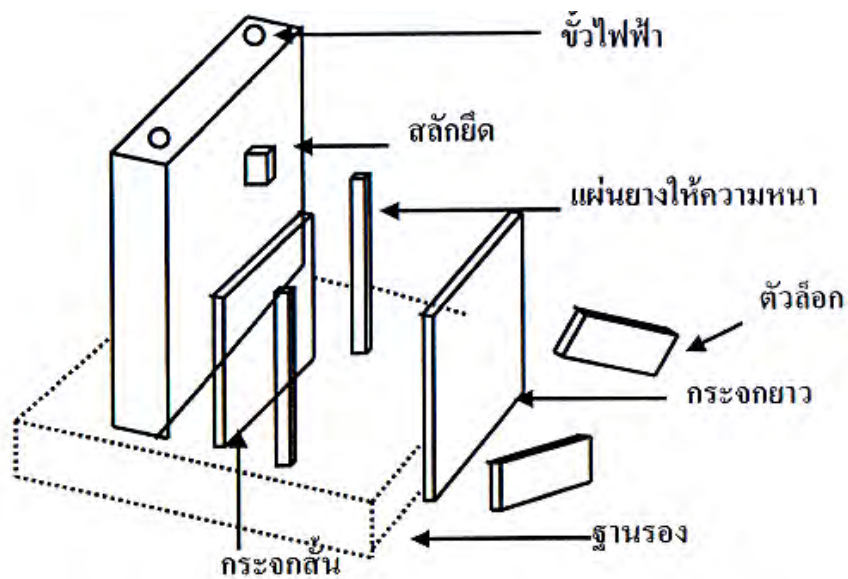
SDS-PAGE			
สารเคมี	Separating gel	Stacking gel	หมายเหตุ
	12%T	3.9%T	
Acrylamide/Bis (30%T, 2.67%C)	8.00 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	-
Deionized water	6.80 มิลลิลิตร	6.4 มิลลิลิตร	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	5.00 มิลลิลิตร		-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	2.5 มิลลิลิตร	-
10% Ammonium persulphate (APS)	0.2 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร	เพิ่มปริมาณได้ ถ้า gel เกิดไม่ดี
TEMED	13.20 ไมโครลิตร	13.20 ไมโครลิตร	ใส่สุดท้าย

11) ขั้นตอนการใส่เจล

- เตรียมเจลให้มีปริมาตรตามความหนาของสเปซเซอร์ที่ต้องการ ดังเช่นตัวอย่าง

ความหนาของสเปซเซอร์	ปริมาตร
0.50 นาโนเมตร	2.8 มิลลิลิตร
0.75 นาโนเมตร	4.2 มิลลิลิตร
1.0 นาโนเมตร	5.6 มิลลิลิตร
1.5 นาโนเมตร	8.4 มิลลิลิตร

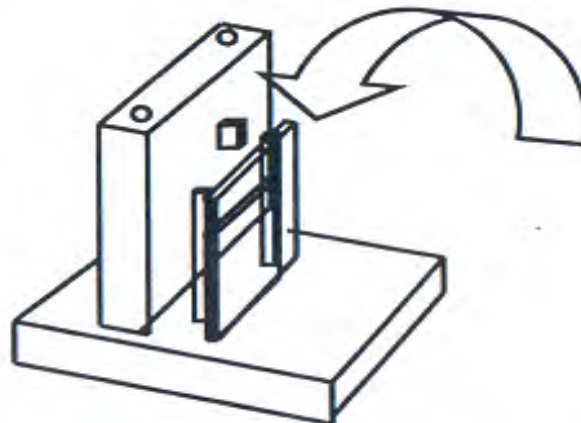
การประกอบแผ่น slab gel ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การประกอบแผ่น slab gel

ที่มา: ชุตติมา คงเจริญ, เอกสารประกอบการสอนวิชา คม 322 ชีวเคมี, 2541

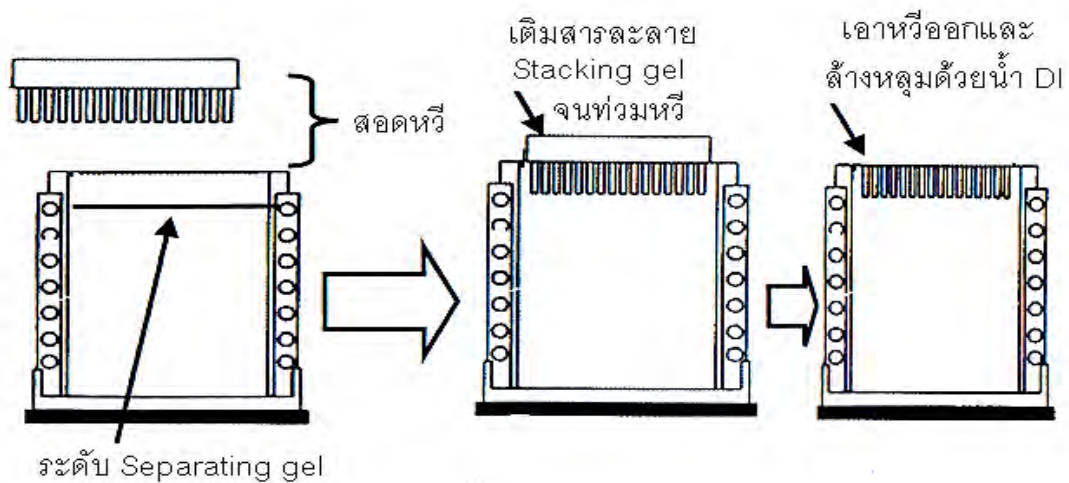
- ทดสอบการรั่วโดยเติมการเติมน้ำลงไปในห้องของแผ่นกระจกประมาณ 5 มิลลิลิตร



รูปที่ 2.2 การเติมน้ำเพื่อทดสอบการรั่วของแผ่น slab gel

ที่มา: ชุตติมา คงเจริญ, เอกสารประกอบการสอนวิชา คม 322 ชีวเคมี, 2541

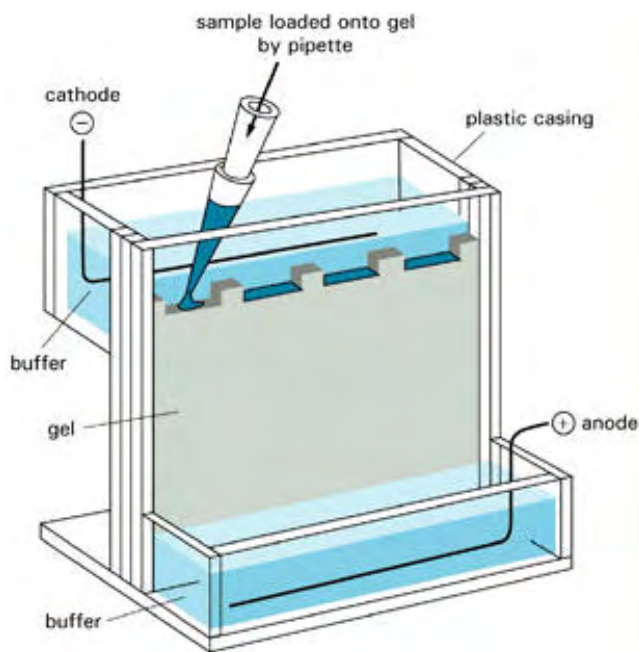
- วัดจากปลายหัว ลงมา 1 cm พร้อมกับทำเครื่องหมายไว้ จากนั้นเตรียม Separating gel แล้วนำไปใส่ลงไปถึงระดับปลายหัวที่ทำเครื่องหมายไว้
- ปิดผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการผสมกับ Stacking gel รอให้เจลเกิด polymerization ประมาณ 1 ชั่วโมง
- เตรียม Stacking gel จากนั้น ดูดน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจลให้หมด แล้วนำไปใส่ลงไปในท่อมหัว รอให้เจลเกิด polymerization 1 ชั่วโมง



รูปที่ 2.3 การเตรียม Stacking gel

ที่มา: ชุตินา คงจรูญ, เอกสารประกอบการสอนวิชา คม 322 ชีวเคมี, 2541

หยอดตัวอย่างลงในช่อง ดังรูปที่ 2.4



ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย
ตัวอย่าง หยอดลงไป 40
ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่อง

รูปที่ 2.4 หยอดตัวอย่างลงในช่อง

- ต่อ Power supply เข้าไป ดังรูป โดยต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่าง และขั้วลบเข้า chamber บนและเปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสที่ 30 mA, ความต่างศักย์ 150 volt ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสประกอบด้วยเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าและSDS-PAGE

- ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อเห็นสีของสียติดตาม (tracking dye, bromophenol blue) เคลื่อนมาถึงปลายล่างของเจล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง

- หลังจากสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายที่ใช้ตรึง และย้อม โดยตรึง 115 นาที แล้วย้อมเจล 330 นาที เมื่อย้อมเสร็จนำเจลออกมาล้างด้วย 40% v/v เมทานอล 7% v/v กรดอะซิติก 53% v/v น้ำปราศจากไอออน นาน 3 ชม.

- นำเจลมาวัดระยะทางของสียติดตาม จากบริเวณเริ่มต้นก่อนการย้อมสี หลังจากย้อมสี แล้วจึงวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อเขียนกราฟมาตรฐาน ด้วยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน โดยวัดตรงกึ่งกลางของแถบที่ปรากฏให้เห็น นำระยะทางการเคลื่อนที่มาคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสียติดตาม}}$$

- นำค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานและค่า $\log_{10}$ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานมาเขียนกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำค่า R_f ที่วัดได้จากตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจะสามารถทราบมวลโมเลกุลของโปรตีนใหม่ที่เราทำการวิเคราะห์ได้

2.3.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินและเซรีซินด้วยเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี

- 1) การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ โดยชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 16.68XX กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) และชั่งไคโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.95XX กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) นำมาละลายด้วยน้ำ Ultra pure พอประมาณ แล้วเทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำ Ultra pure จนถึงขีดบอกระดับ

2) ชั่งโซเดียมเฮกซะไซต์ 0.5000 กรัม ละลายด้วยสารละลายในข้อ 1) และนำสารละลายไปปรับค่า pH ให้ได้มี pH อยู่ในช่วง 6.3-6.7 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองโดยผ่านชุดกรองสารละลาย ซึ่งใช้แผ่นกรองขนาด 0.45 μm แล้วนำไปใส่ฟองอากาศด้วยเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลา 30 นาที เก็บในขวดที่มีฝาปิด

3) เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2 ชนิด คือ สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลเข้มข้น 0.1% w/v และสารละลายโปรตีนมาตรฐานซึ่งเตรียมขึ้นโดยใช้คำแนะนำจากผู้ผลิต คือ เติมน้ำ Ultra pure 0.5 mL ลงใน vial ที่บรรจุสารมาตรฐานที่เป็นโปรตีน แล้วเขย่าให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 2-3 นาที แล้วเขย่าอีกครั้ง จากนั้นปิดฝา vial แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °C (เก็บไว้ได้นาน 2 สัปดาห์)

4) การเตรียมสารละลายหน่วยของโปรตีนไฟโบรอิน โดยนำหน่วยโปรตีนไฟโบรอินบริสุทธิ์ที่ระเหยจนแห้งมาละลายด้วยเฟสเคลื่อนที่ 0.5 mL แล้วกรองสารละลายด้วยชุดกรองสารตัวอย่าง ขนาด 0.45 ไมครอน

5) การทำกราฟมาตรฐานและการหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยโปรตีน โดยเปิดเครื่องไฮสเควนซ์โครมาโทกราฟี โดยมีคอลัมน์ยี่ห้อ Waters รุ่น Bio Suit SEC 175 อุณหภูมิของคอลัมน์ 30 °C และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.7 ผสม 0.05 % โซเดียมเฮกซะไซต์ ฉีดสารละลายมาตรฐานสองชนิดได้แก่ พอลิเอทิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da โดยวิเคราะห์ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.5 และ 1.0 มิลลิตรต่อนาที และอุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 28 และ 30 องศาเซลเซียส และสารละลายมาตรฐานโปรตีนชนิดต่างๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 1,350 Da ถึง 670 kDa ปริมาตร 25 ไมโครลิตร รอจนพีคสุดท้ายออกหมดแล้วจึงหยุดการวิเคราะห์ จากนั้นนำข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลและเวลาคงค้างที่ได้ไปคำนวณเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง $\log M_w$ กับเวลาคงค้าง (t_R) แล้วฉีดสารละลายตัวอย่างใหม่ที่เป็นหน่วยโปรตีนไฟโบรอิน และเชรีซินเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน แต่นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้ววิเคราะห์หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยโปรตีน

2.4 การวิเคราะห์ความเป็นผลึกของไฟโบรอิน

วิเคราะห์ความเป็นผลึกของไฟโบรอินด้วยเทคนิค X-ray diffraction ตามแนวเส้นไหมไฟโบรอินโดยใช้เครื่อง X-ray diffractometer ยี่ห้อ Bruker รุ่น D5005

2.5 การวิเคราะห์สมบัติทางทางเชิงกลของเส้นไหม

ศึกษาสมบัติทางกายภาพของเส้นไหมไฟโบรอิน ด้วยการวัดความทนต่อแรงดึงด้วยเครื่อง Texture Analyzer รุ่น TA.XT.plus โดยใช้เส้นไหมพันธุ์ชัยภูมิ ไหมพันธุ์บุรีรัมย์ ไหมพันธุ์นางนวลแพงพวย ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางน้อย ไหมพันธุ์ดอกบัว1 ไหมพันธุ์ดอกบัว2 (สาวจากโรง

ไหมชั้นใน) และไหมพันธุ์ดอกบัว2 (สาวจากรังไหมชั้นนอก) ตัวอย่างละ 20 เส้น โดยใช้เครื่องทดสอบสมบัติเชิงกล (Texture analyzer) โดยใช้สภาวะที่ Test Mode คือ Tension, Test speed เท่ากับ 1.0 mm/sec, Target Mode คือ Distance, Distance เท่ากับ 40 mm และระยะห่างระหว่างหัวจับตัวอย่าง เท่ากับ 5 cm

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ลักษณะภายนอกของรังไหม

จากการเก็บตัวอย่างรังไหมไทยพันธุ์ต่างๆ จากสถานีหม่อนไหมแหล่งต่างๆ แหล่งที่ได้ ชื่อพันธุ์ และลักษณะเบื้องต้นของรังไหม แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พันธุ์ แหล่งตัวอย่างและลักษณะของรังไหม

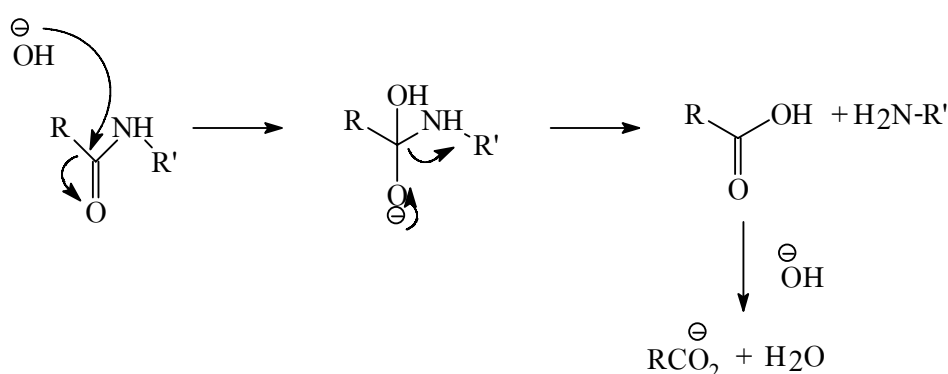
ลำดับ	ชื่อพันธุ์	พันธุ์แท้/ พันธุ์ปรับปรุง	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะ
1	รังไหมพันธุ์ชัยภูมิ 3	พันธุ์แท้	จังหวัดศรีสะเกษ	สีเหลืองทอง รังมีขนาดเล็ก
2	รังไหมพันธุ์นางเหลือง	พันธุ์แท้	ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ พระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดศรีสะเกษ	สีเหลืองทอง รังมีขนาดเล็ก
3	รังไหมพันธุ์สำโรง	พันธุ์พื้นเมือง	ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ พระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดสุรินทร์	สีเหลืองทอง รังมีขนาดเล็ก
4	รังไหมพันธุ์ยूपิ	พันธุ์ปรับปรุง	ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ พระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่	สีขาว รังมีขนาดใหญ่
5	รังไหมอีรี	พันธุ์แท้	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม	สีขาว มีขนาดใหญ่
6	รังไหมพันธุ์นางนวล แพงพวย		ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ พระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดศรีสะเกษ	สีเหลือง รังมีขนาดใหญ่
7	รังไหมพันธุ์เหลือง สุรินทร์	พันธุ์พื้นเมือง	ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ พระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดสุรินทร์	สีเหลืองทอง รังมีขนาดเล็ก

ตารางที่ 3.1 พันธุ์ แหล่งตัวอย่างและลักษณะของรังไหม (ต่อ)

8	รังไหมพันธุ์นางน้อย	พันธุ์แท้	ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ พระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่	สีเหลืองทอง รังมี ขนาดเล็ก
9	รังไหมพันธุ์ดอกบัว	พันธุ์ปรับปรุง	ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ พระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดสุรินทร์	สีขาว รังมีขนาดใหญ่
10	รังไหมพันธุ์บุรีรัมย์	พันธุ์ปรับปรุง	ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ พระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดศรีสะเกษ	สีเหลือง รังมีขนาด เล็ก

3.2 สมบัติการละลายของโปรตีนไหม

กากไหมเชริซิน สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อน ส่วนเส้นใยไหมไฟโบรอินจากไหมทุกพันธุ์ไม่ละลายน้ำและสารละลายบัฟเฟอร์ แต่สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือเข้มข้น เช่น สารละลายลิเทียมโบรไมด์เข้มข้น 9 โมลาร์ ยกเว้นเส้นใยไหมพันธุ์รีที่ละลายได้ในสารละลายลิเทียมไทโอไซยานาตเข้มข้น 9 โมลาร์ การนำเส้นใยไหมไปต้มในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ และสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้เกิดการละลายเช่นเดียวกัน แต่การละลายนี้เกิดขึ้นเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโมเลกุลโปรตีน กลายเป็นพอลิเปปไทด์ หรือกรดอะมิโน ดังปฏิกิริยาในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโมเลกุลโปรตีนในสารละลายเบส

ที่มา : Bailey, 1990

การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริก อาจทำให้สารที่ได้มีสีดำ เนื่องจากการเกิดเป็นสารประกอบซัลไฟด์ของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Bailey, 1990)

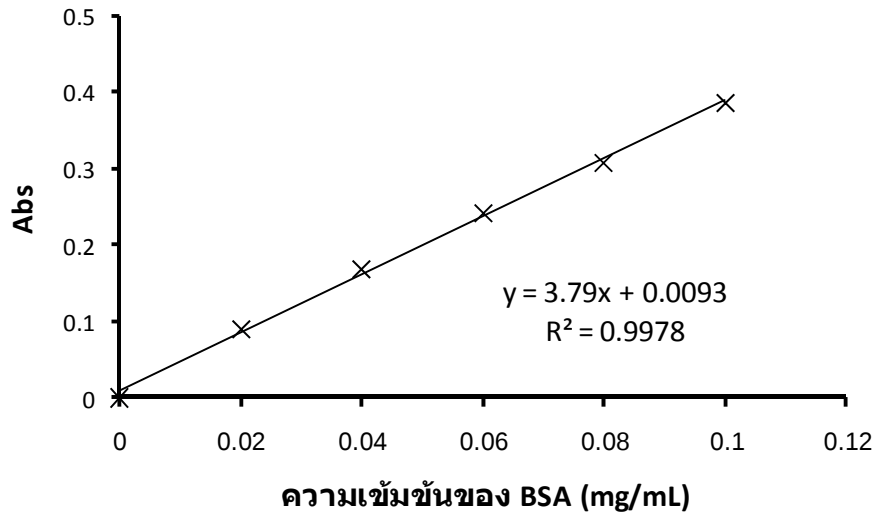
3.3 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไหมไทยพันธุ์ต่างๆ

3.3.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

ก่อนนำไหมเซรีซินไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสได้ทำการหาความเข้มข้นโปรตีนก่อนด้วยวิธีเลาว์รีซ์ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ 750 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นในช่วง 0 - 0.1 มก.ต่อมล. แสดงดังตารางที่ 3.2 และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ 750 นาโนเมตร สัมพันธ์กับความเข้มข้นเป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9978 เมื่อนำสารละลายตัวอย่างของเซรีซินที่ได้จากไหมพันธุ์ต่างๆ มาหาความเข้มข้นได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ 750 นาโนเมตร ในช่วงความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล.

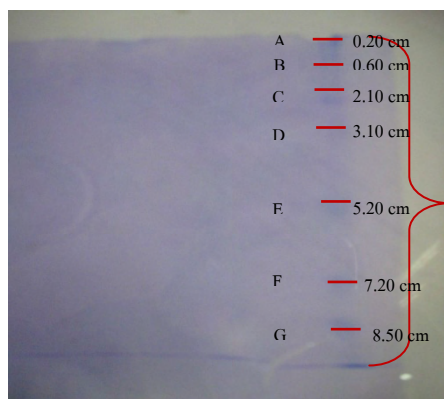
ความเข้มข้นของ BSA (มก.ต่อมล.)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 750 นาโนเมตร	พันธุ์ไหม	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 750 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของเซรีซิน (มก./มล.)
0	0	ดอกบัว	0.120	0.04
0.02	0.090	นางเหลือง	0.288	0.08
0.04	0.168	นางน้อย	0.575	0.19
0.06	0.242	ยูปี	0.403	0.13
0.08	0.308	ลำโรง	0.648	0.22
0.10	0.385			



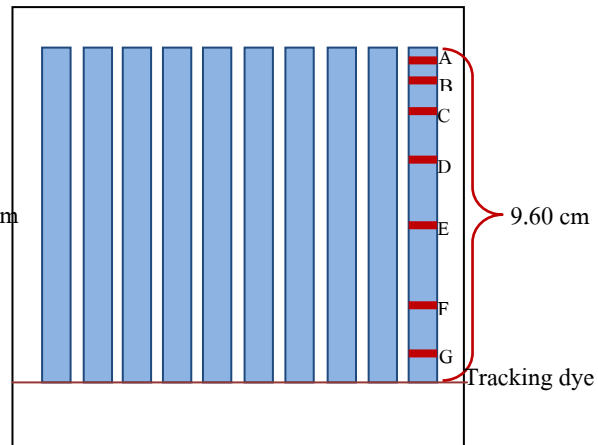
รูปที่ 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA

จากการนำสารละลายเซรีซินที่สกัดออกจากรังไหมพันธุ์ต่างๆ เพื่อหาปริมาณโปรตีนเบื้องต้นโดยวิธีเลาว์รีย์ก่อนการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 3.2

ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจล ที่ความเข้มข้นเจล 30%T, 2.67%C กระแสไฟฟ้า 0.03 แอมแปร์ ความต่างศักย์ 150 โวลต์ ของเซรีซินเข้มข้นของเซรีซิน 1 และ 2 g/L ไม่ปรากฏแถบโปรตีนใดๆ บนแผ่นเจล นั่นอาจเป็นเพราะว่าสารละลายมีโปรตีนน้อยเกินไปและโปรตีนนั้นกระจายอยู่บนแผ่นเจลปริมาณโปรตีนจึงเจือจางลง ทำให้ไม่สามารถย้อมติดสีได้ อย่างไรก็ตามพบแถบโปรตีนมาตรฐานที่ประกอบไปด้วย Myosin, Phosphorylase B, BSA, Ovalbumin, Carbonic anhydrase, Trypsin inhibitor และ Lysozyme ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 17.3 – 224 kDa ข้อมูลระยะทางของแถบโปรตีนมาตรฐานบนแผ่นเจลแสดงได้ในรูปที่ 3.3



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.3 SDS-PAGE แผ่นที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 17.3 – 224 kDa ของเจลแผ่นที่ 1 (ก) สแกนจากแผ่นเจล (ข) สเก็ทซ์มาจากรูปสแกน (A; Myosin, B; Phosphorylase B, C; BSA, D; Ovalbumin, E; Carbonic anhydrase, F; Trypsin inhibitor และ G; Lysozyme)

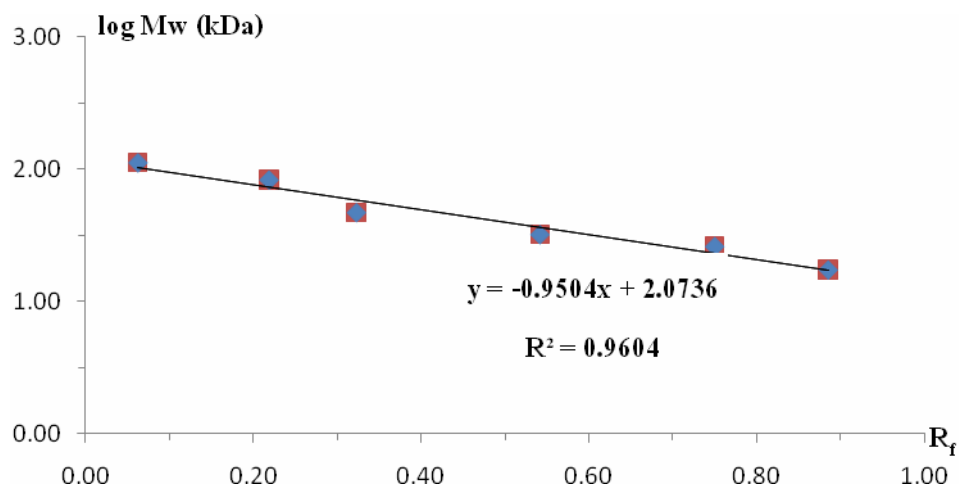
ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล โปรตีนมาตรฐานใดมีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะเคลื่อนที่ได้ช้า ซึ่งตรงกันข้ามกับโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งจะเคลื่อนที่ได้เร็วเนื่องจากเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างของเจลได้ดีกว่า จึงได้ระยะทางการเคลื่อนที่สูงกว่า การหาค่า relative mobility (R_f) จากระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนนั้นๆ หาค่าด้วยระยะทางการเคลื่อนที่ทั้งหมด คือ 9.6 ซม. ได้ค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ระยะทางในการเคลื่อนที่และค่า relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานชนิดต่างๆ ของเจลแผ่นที่ 1

ชนิดโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	log Mw	ระยะทางการเคลื่อนที่ (cm)	R_f
Myosin	224	2.3502	0.20	0.02
Phosphorylase B	112	2.0492	0.60	0.06
BSA	83	1.9191	2.10	0.22
Ovalbumin	47	1.6721	3.10	0.32
Carbonic anhydrase	32	1.5051	5.20	0.54
Trypsin inhibitor	26	1.4150	7.20	0.75
Lysozyme	17.3	1.2380	8.50	0.89

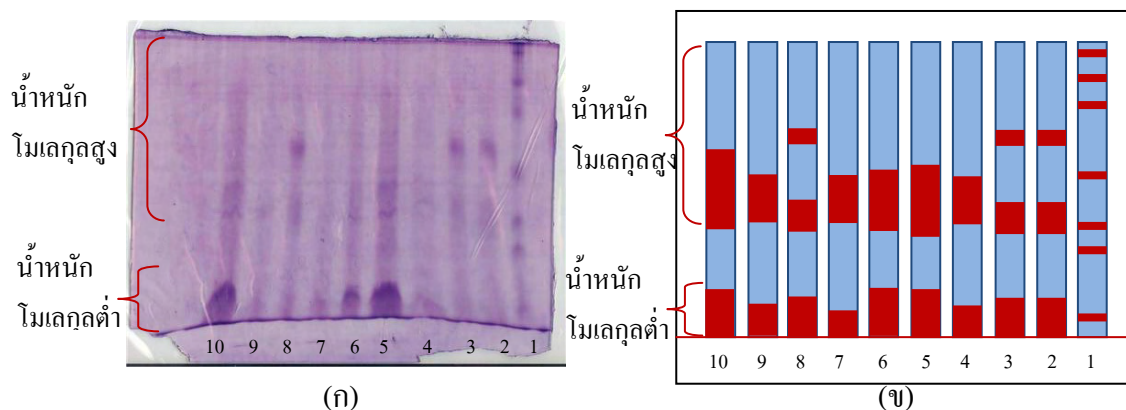
หมายเหตุ ระยะทางในการเคลื่อนที่ของสารทั้งหมดเท่ากับ 9.60 cm

เมื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log Mw กับค่า R_f จะได้เป็นกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง log Mw กับค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 1

จากกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 17.3 – 224 kDa ได้สมการเส้นตรง $y = -0.950x + 2.073$ และได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มีค่าเท่ากับ 0.9604 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซรีซินเป็น 4,000 และ 6,000 มก.ต่อมล. ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าหลังย้อมสีแผ่นเจล ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ ดังแสดงในรูปที่ 3.5



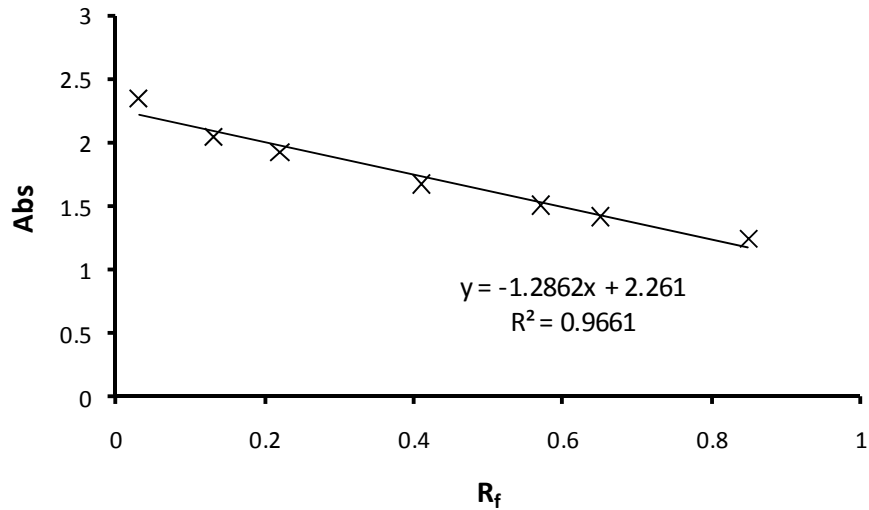
รูปที่ 3.5 แถบโปรตีนเซรีซินของไหมแต่ละพันธุ์ที่ความเข้มข้นต่างกันบนเจลแผ่นที่ 2 (ก) สแกนจากเจล (ข) สเก็ทซ์มาจากรูปสแกน

หมายเหตุ (เลน 1) = โปรตีนมาตรฐาน, (เลน 2) = นางน้อย 4 g/L (เลน 3 และเลน 8) = นางน้อย 6 g/L, (เลน 4) = ดอกบัว 4 g/L, (เลน 5) = ยूपิ 4 g/L (เลน 6 และเลน 10) = ยूपิ 6 g/L, (เลน 7 และเลน 9) = ดอกบัว 6 g/L

จากรูปวิเคราะห์ได้ว่าเซรีซินเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักรโมเลกุลอยู่ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มน้ำหนักรโมเลกุลต่ำและกลุ่มน้ำหนักรโมเลกุลสูง และแผ่นเจลที่ 2 ปรากฏแถบโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งให้ค่า R_f ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และให้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 3.6

ตารางที่ 3.4 ระยะทางในการเคลื่อนที่ และค่า relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 2

ชนิดของโปรตีนมาตรฐาน	น้ำหนักรโมเลกุล (kDa)	Log Mw	ระยะทางการเคลื่อนที่ (cm)	ค่า R_f
Myosin	224	2.3502	0.35	0.03
Phosphorylase B	112	2.0492	1.45	0.13
BSA	83	1.9191	2.45	0.22
Ovalbumin	47	1.6721	4.50	0.41
Carbonic anhydrase	32	1.5051	6.30	0.57
Trypsin inhibitor	26	1.4150	7.20	0.65
Lysozyme	17.3	1.2380	9.30	0.85



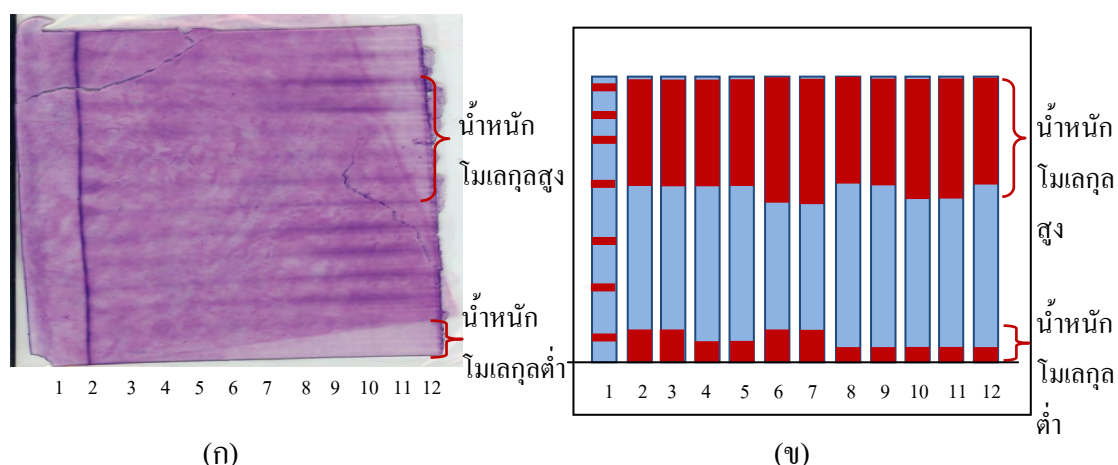
รูปที่ 3.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอกลำดับโมเลกุลกับค่า R_f ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 2

จากการใช้โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 17.3-224 กิโลดาลตัน พบว่าค่าลอกลำดับโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = -1.286x + 2.261$ และได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มีค่าเท่ากับ 0.966 เมื่อนำไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ประกอบกันในเซรีซินจากไหมทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลแสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในเซรีซินจากไหมพันธุ์ต่างๆ โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานบนเจลแผ่นที่ 2

พันธุ์ไหม	น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชัน	
	น้ำหนักโมเลกุลสูง	น้ำหนักโมเลกุลต่ำ
	(kDa)	(kDa)
นางน้อย	1.88	1.23
	1.61	
ดอกบัว	1.62	1.21
ยูปี	1.67	1.25

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในเซรีซินจากไหมพันธุ์นางน้อย ดอกบัว และยูปี ข้าง พร้อมผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในเซรีซินจากไหมพันธุ์นางเหลือง และอีรี ได้ผลการวิเคราะห์บนแผ่นเจลแผ่นที่ 3 ดังแสดงดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 แถบโปรตีนเซรีซินของไหมพันธุ์ต่างๆ บนเจลแผ่นที่ 3 (a) สแกนจากแผ่นเจล (b) สเก็ทซ์มาจากรูปสแกน

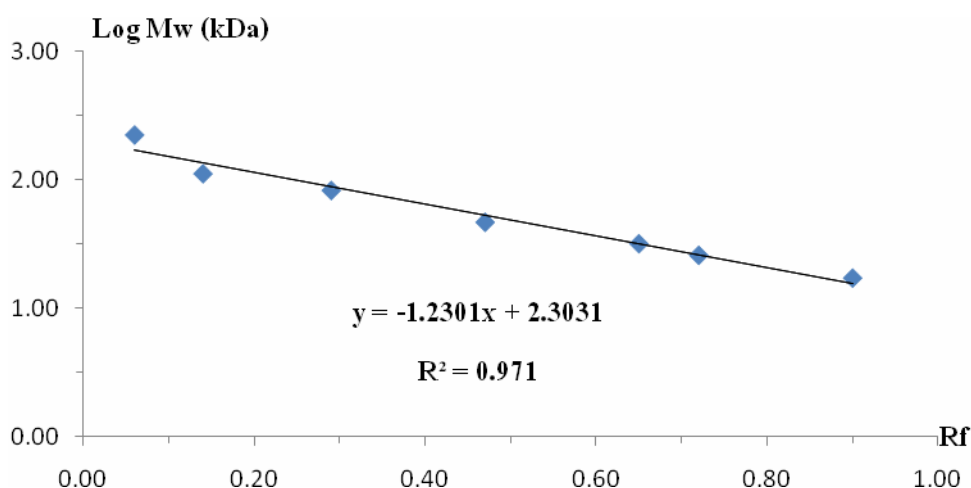
หมายเหตุ (เลน 1) = โปรตีนมาตรฐาน, (เลน 2) = นางน้อย 4 g/L, (เลน 3) = นางน้อย 6 g/L, (เลน 4) = ดอกบัว 4 g/L, (เลน 5) = ดอกบัว 6 g/L, (เลน 6) = ยूपี่ 4 g/L, (เลน 7) = ยूपี่ 4 g/L, (เลน 8) = นางเหลื่อง 4 g/L, (เลน 9) = นางเหลื่อง 6 g/L, (เลน 10) = อีรี 4 g/L และ(เลน 11 และเลน 12) = อีรี 6 g/L

ระยะทางในการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานบนแผ่นเจลที่ 3 สัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ นั้นมีความสัมพันธ์กับ ค่า R_f ดังแสดงในตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.8

ตารางที่ 3.6 ระยะทางในการเคลื่อนที่ และค่า relative mobility (R_f) โปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 3

ชนิดของโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ลือกน้ำหนักโมเลกุล	ระยะทาง (cm)	ค่า R_f
Myosin	224	2.3502	0.35	0.03
Phosphorylase B	112	2.0492	1.45	0.13
BSA	83	1.9191	2.45	0.22
Ovalbumin	47	1.6721	4.50	0.41
Carbonic anhydrase	32	1.5051	6.30	0.57
Trypsin inhibitor	26	1.4150	7.20	0.65
Lysozyme	17.3	1.2380	9.30	0.85

แถบโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 17.3-224 kDa สารมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย myosin, phosphorylase B, BSA, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor และ lysozyme ที่ได้จากเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจล มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอกล็อกของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า R_f ได้กราฟดังรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอกล็อกของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานบนเจลแผ่นที่ 3

จากกราฟสารมาตรฐานโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 17.3-224 kDa ได้สมการเส้นตรง คือ $y = -1.230x + 2.303$ และได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มีค่าเท่ากับ 0.971 เมื่อนำไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันจากไหมทั้ง 5 สายพันธุ์ แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันในไหมพันธุ์ต่างๆ โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานของเจลแผ่นที่ 3

พันธุ์ไหม	น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชัน	
	น้ำหนักโมเลกุลสูง	น้ำหนักโมเลกุลต่ำ
	(kDa)	(kDa)
นางน้อย	1.84	1.22
ดอกบัว	1.65	1.22
ยูบี	1.68	1.26
นางเหลือง	1.82	1.23
อีรี	1.84	1.24

จากการทดลองแผ่นเจลทั้งหมด 10 แผ่น ได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโปรตีนใน เซรีซินในไหมพันธุ์ต่างๆ โดยการใช้กราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล และค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานที่ปรากฏบนแผ่นเจลในแต่ละแผ่น ได้ค่าแสดงดังตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเซรีซินแฟรกชันในไหมพันธุ์ต่างๆ โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานของเจลแต่ละแผ่น

พันธุ์ไหม	น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชัน	
	น้ำหนักโมเลกุลสูง (kDa)	น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (kDa)
ดอกบัว	41.69	17.78
นางน้อย	70.79	19.05
	40.74	
ยู่ปี	43.65	18.20
อีรี	44.16	17.38
นางเหลือง	67.61	16.98

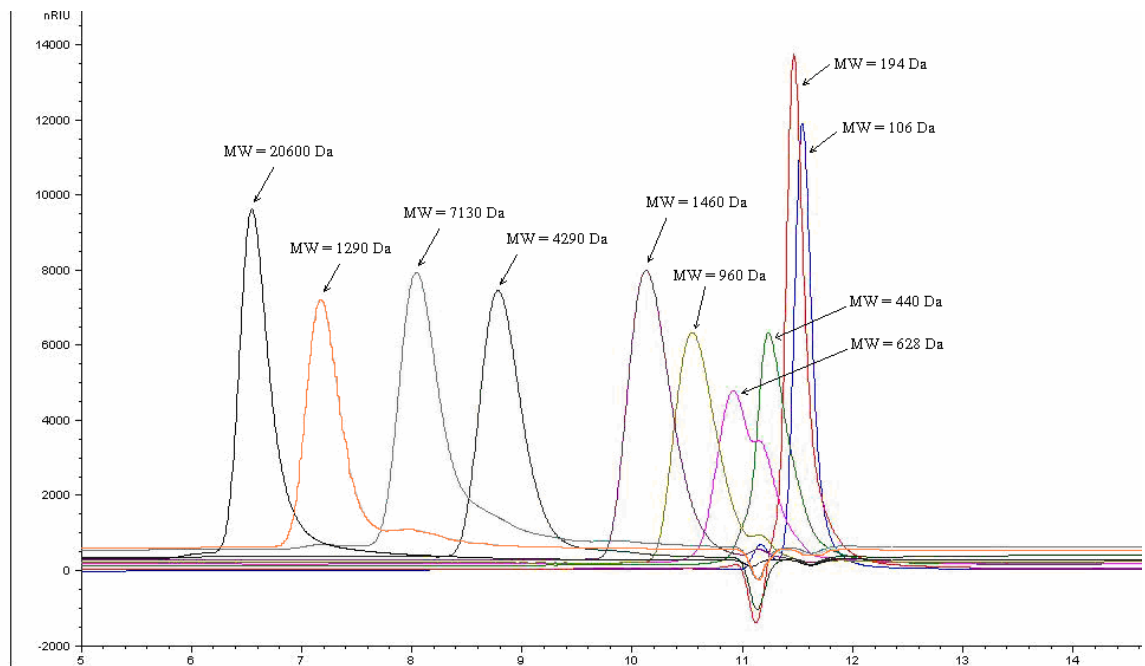
3.3.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลไหมด้วยเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี

3.3.2.1 น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน

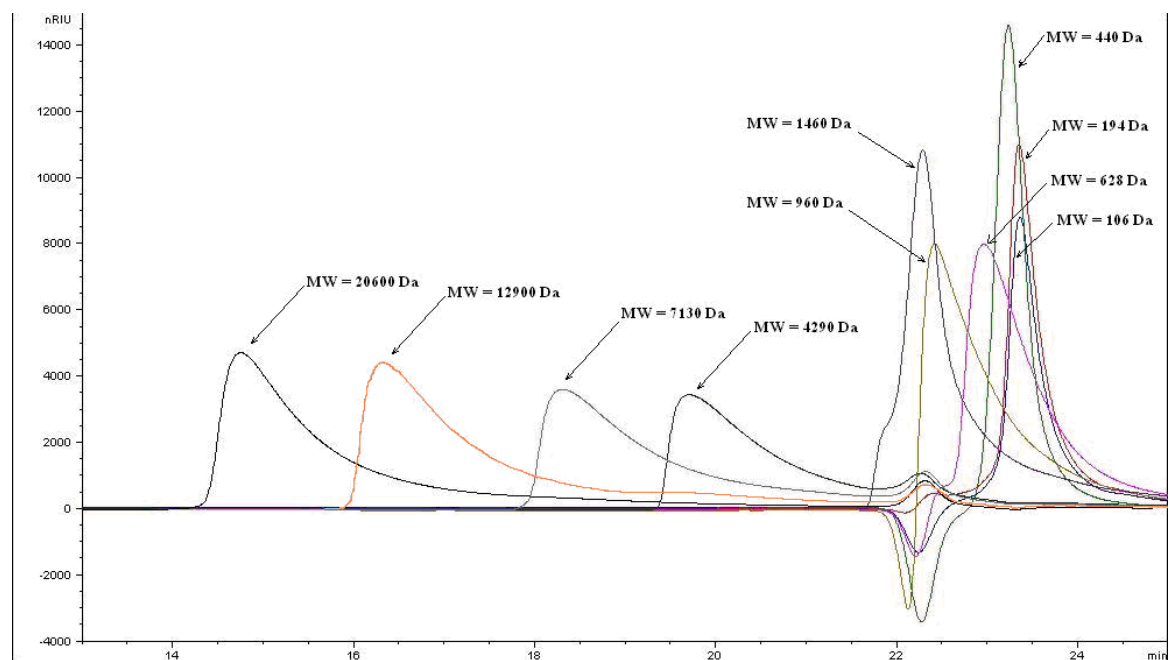
จากการนำเอารังไหมจากไหมพันธุ์ต่างๆ มาลอกเส้นใยออกแล้วตัดเป็นเส้นสั้นๆ จากนั้นเติมน้ำน้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วนรังไหม 1 กรัม ต่อน้ำปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกออกเส้นใยไหมไฟโบรอินและสารละลายเซรีซินออกจากกัน เพื่อนำเส้นใยไหมไฟโบรอิน และสารละลายเซรีซินไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลต่อไป

- การใช้พอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นสารมาตรฐาน

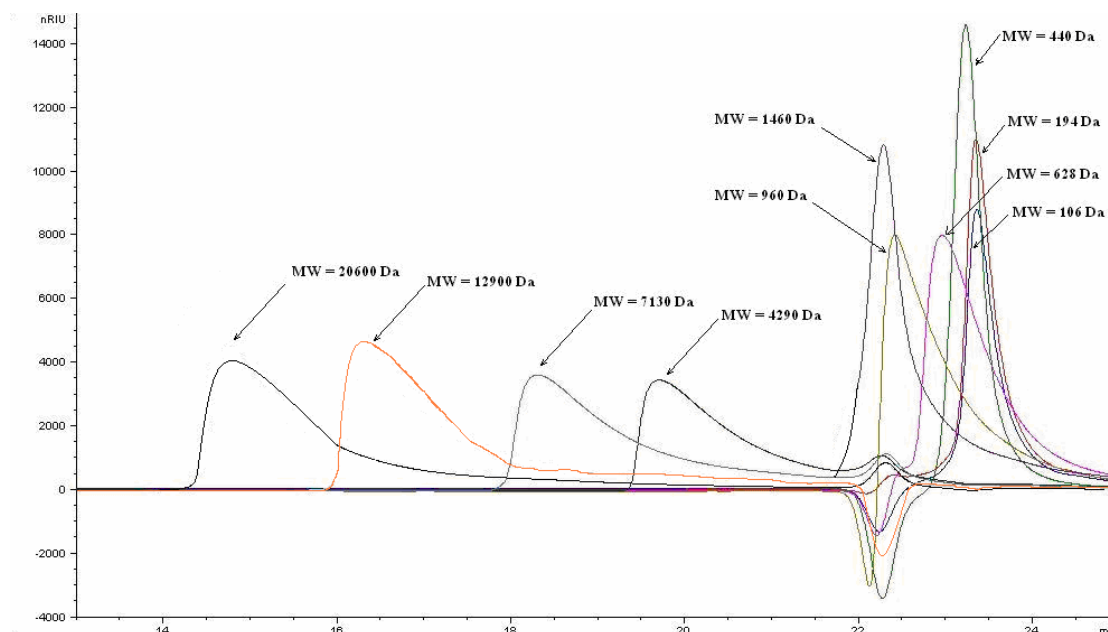
จากการพอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นสารมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟีที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.5 และ 1.0 มล.ต่อนาที ที่ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.9 ถึงรูปที่ 3.11



รูปที่ 3.9 โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์และเครื่องตรวจจับ 28 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.10 โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่อัตราการไหล 0.5 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์และเครื่องตรวจจับ 28 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.11 โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ที่อัตราการไหล 0.5 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 30 °C

ตารางที่ 3.9 ถึงตารางที่ 3.10 แสดงข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่ใช้เป็นสารมาตรฐานและเวลาคงค้างของโมเลกุลของพอลิเอทิลีนไกลคอลในคอลัมน์ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จาก 1.0 mL/min เป็น 0.5 mL/min ที่อุณหภูมิในคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.9 เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da ที่อัตราการไหล 1.0 mL/min อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส

น้ำหนักโมเลกุล (Da)	log Mw (Da)	เวลาคงค้าง (min)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
106	2.0253	11.537	11.546	11.542
194	2.2878	11.469	11.466	11.468
440	2.6435	11.240	11.231	11.236
628	2.7980	11.152	11.153	11.153
960	2.9823	10.548	10.549	10.549
1460	3.1644	10.126	10.127	10.127
4290	3.6325	8.785	8.783	8.784
7130	3.8531	8.045	8.038	8.042

ตารางที่ 3.9 เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da ที่ อัตราไหล 1.0 mL/min อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส (ต่อ)

น้ำหนักโมเลกุล (Da)	ลือน้ำหนักโมเลกุล (Da)	เวลาคงค้าง (min)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
12900	4.1106	7.177	7.175	7.176
20600	4.3139	6.552	6.553	6.553

ตารางที่ 3.10 เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da ที่อัตราไหล 0.5 mL/min อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส

น้ำหนักโมเลกุล (Da)	ลือน้ำหนักโมเลกุล (Da)	เวลาคงค้าง (min)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
106	2.0253	23.361	23.362	23.362
194	2.2878	23.245	23.244	23.245
440	2.6435	23.235	23.236	23.236
628	2.7980	22.962	22.965	22.964
960	2.9823	22.436	22.436	22.436
1460	3.1644	22.286	22.288	22.287
4290	3.6325	19.708	19.705	19.707
7130	3.8531	18.308	18.309	18.309
12900	4.1106	16.321	16.323	16.322
20600	4.3139	14.751	14.752	14.752

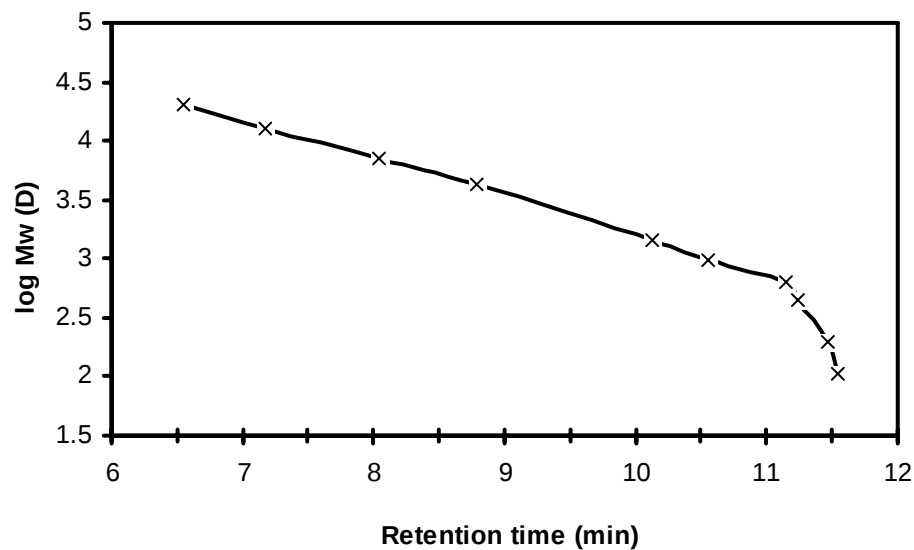
จะเห็นได้ว่า เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จาก 1.0 mL/min เป็น 0.5 mL/min ทำให้พอลิเอทิลีนไกลคอลเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ช้าลงประมาณ 2 เท่า เนื่องจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์เคลื่อนที่ช้าลง โมเลกุลของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่ละลายอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์จึงมีเวลาอยู่ในรูพรุนของวัสดุบรรจุคอลัมน์มากขึ้น ทำให้เวลาคงค้างในคอลัมน์มากขึ้น นอกจากนี้ยังจะเห็นได้ว่าลักษณะของโครมาโทแกรมของพอลิเอทิลีนไกลคอลมีขนาดกว้างขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของพอลิเอทิลีนไกลคอลมีการแพร่เข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดต่างๆ กันได้ดีขึ้น

เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดจาก 28 องศาเซลเซียสเป็น 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการไหล 0.5 ml/min เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ แสดงได้ดังตารางที่ 3.11 จะเห็นได้ว่าเวลาคงค้างของโมเลกุลพอลิเอทิลีนไกลคอลมีค่าแตกต่างจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.11 เวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 106 – 20600 Da ที่อัตราไหล 0.5 ml/min อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

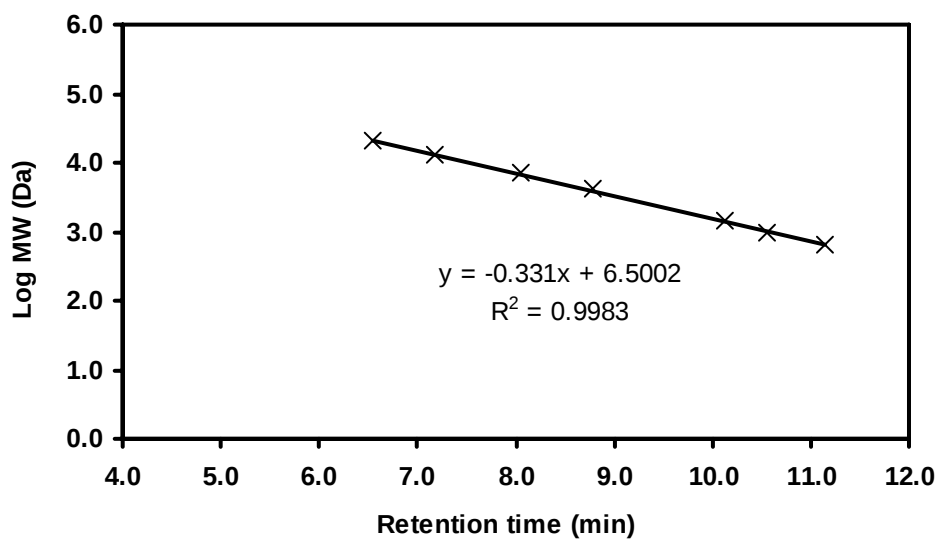
น้ำหนักโมเลกุล (Da)	ลือน้ำหนัก โมเลกุล (Da)	เวลาคงค้าง (min)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
106	2.0253	23.451	23.453	23.452
194	2.2878	23.321	23.322	23.322
440	2.6435	23.125	23.127	23.126
628	2.7980	22.980	22.989	22.985
960	2.9823	22.542	22.549	22.546
1460	3.1644	22.256	22.259	22.255
4290	3.6325	19.954	19.955	19.955
7130	3.8531	18.674	18.678	18.676
12900	4.1106	16.557	16.553	16.555
20600	4.3139	14.971	14.976	14.974

นำข้อมูลในตารางที่ 3.9 มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการพล็อตความสัมพันธ์ระหว่างลือน้ำหนักโมเลกุลและเวลาคงค้างในคอลัมน์ของพอลิเอทิลีนไกลคอล ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 3.12



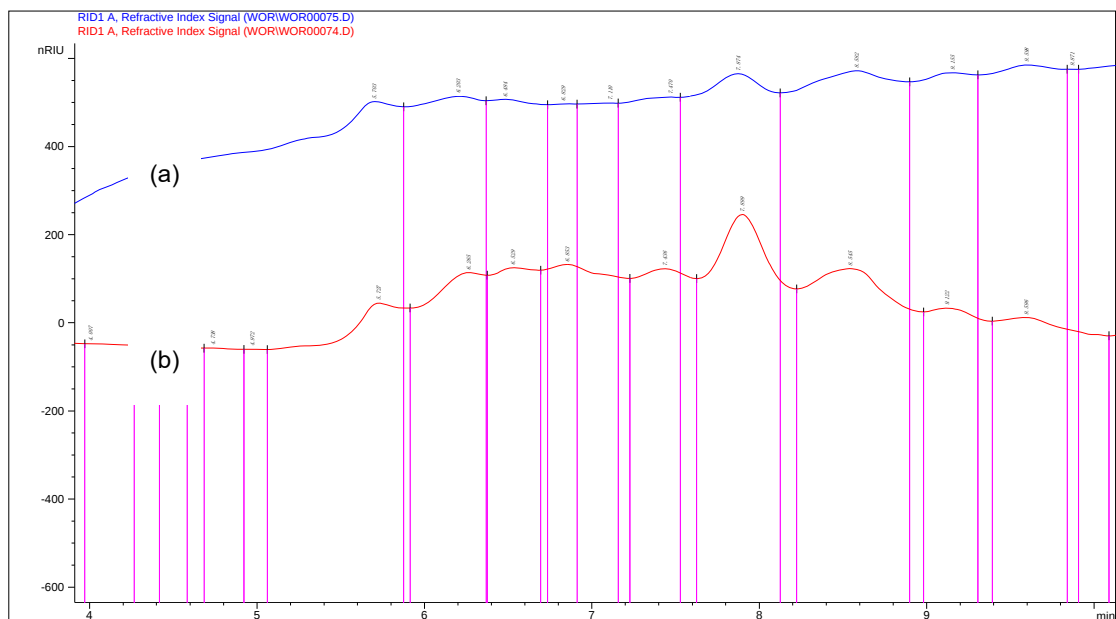
รูปที่ 3.12 ความสัมพันธ์ระหว่างลอกล้านน้ำหนักโมเลกุลกับเวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอล

จากรูปที่ 3.12 จะเห็นได้ว่า สามารถใช้พอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นพอลิเมอร์มาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลใหม่ได้ เมื่อน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 628 – 20600 Da เนื่องจากเป็นช่วงที่เป็นเส้นตรง ซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างลอกล้านน้ำหนักโมเลกุลกับเวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอล ดังรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 ความสัมพันธ์ระหว่างลอกล้านน้ำหนักโมเลกุลกับเวลาคงค้างของพอลิเอทิลีนไกลคอลในช่วงที่เป็นเส้นตรง

ส่วนรูปที่ 3.14 แสดงโครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันจากไหมตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้



รูปที่ 3.14 โครมาโทแกรมของโปรตีนแฟรกชันจากไฟโบรอิน (a) พันธุ์เหลืองสุรินทร์ (b) พันธุ์สำโรง
ตารางที่ 3.12 น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันจากไหมพันธุ์สำโรง

พีค	เวลาคงค้าง (นาที)	ถือน้ำหนักโมเลกุลของ พอลิเอทิลีน ไกลคอล (Da)	น้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนแฟรกชัน (Da)
1	5.737	4.60	39907
2	6.271	4.42	26564
3	6.537	4.34	21690
4	6.851	4.23	17073
5	7.434	4.04	10948
6	7.898	3.89	7687
7	8.539	3.67	4716
8	9.119	3.48	3031
9	9.588	3.33	2120
10	10.213	3.12	1317
11	10.734	2.95	885
12	11.471	2.70	505
13	12.005	2.53	336
14	13.806	1.93	85

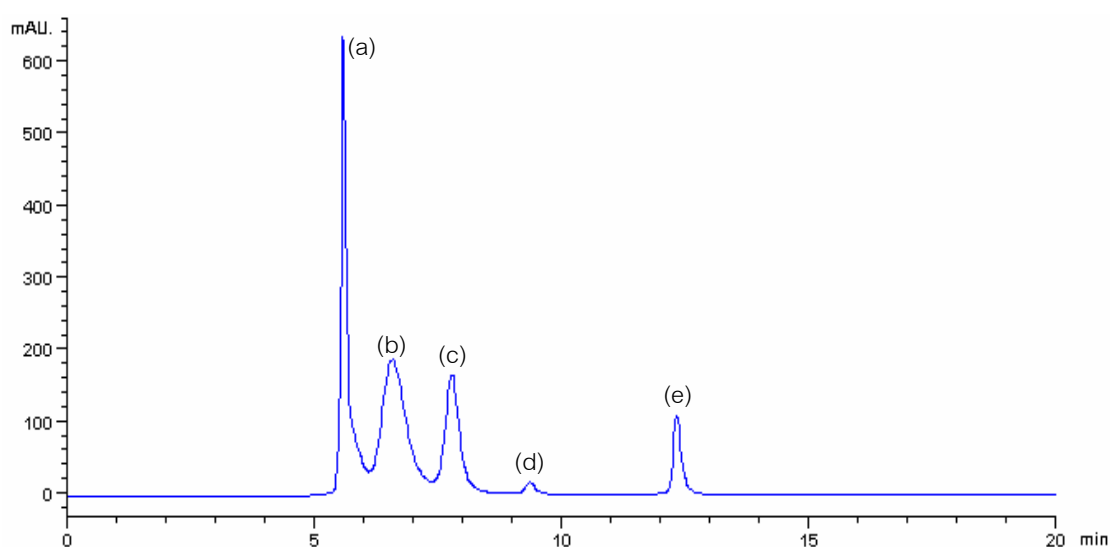
ตารางที่ 3.13 น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันจากไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์

พีค	เวลาคงค้าง (นาท)	ลือกน้ำหนักโมเลกุลของ พอลิเอทิลีนไกลคอล (Da)	น้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนแฟรกชัน (Da)
1	5.713	4.61	40644
2	6.207	4.45	27892
3	6.482	4.35	22618
4	7.872	3.89	7841
5	8.583	3.66	4561
6	9.153	3.47	2954
7	9.604	3.32	2094
8	10.744	2.94	878
9	11.418	2.72	526
10	12.005	2.53	336
11	12.642	2.32	207

จากโครมาโทแกรมในรูปที่ 3.14 จะเห็นได้ว่าโครมาโทแกรมของไฟโบรอินจากไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์และพันธุ์สำโรงมีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือมีหลายแฟรกชัน และปรากฏพีคที่ตำแหน่งเวลาคงค้างใกล้เคียงกัน แต่ให้น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากมีพีคของโปรตีนแฟรกชันกว้างแคบไม่เท่ากัน จึงมีผลต่อเวลาคงค้างที่จะนำไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชันนั้น น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนแฟรกชันในไฟโบรอินจากไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์และพันธุ์สำโรง แสดงดังตารางที่ 3.12 และ ตารางที่ 3.13 จะเห็นว่าโปรตีนแฟรกชันของไหมทั้งสองพันธุ์มีหลายแฟรกชัน และค่าน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 200 – 40,000 Da แต่พันธุ์สำโรงมีโปรตีนแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมาก คือ 85 Da ซึ่งเป็นค่าที่ไม่อยู่ใน selectivity range ของคอลัมน์ที่ใช้ การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชันในไฟโบรอิน ด้วยการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นสารมาตรฐาน อาจได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลคลาดเคลื่อนไปได้ เนื่องจากพอลิเอทิลีนไกลคอลมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างจากโปรตีน การเกิดอันตรกิริยากับตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่จึงแตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อขนาดโมเลกุลของพอลิเอทิลีนไกลคอลและโปรตีนแฟรกชันของไฟโบรอิน เนื่องจากโมเลกุลที่เกิดอันตรกิริยากับตัวทำละลายน้อยจะมีลักษณะเป็น random coil แต่ถ้าโมเลกุลที่เกิดอันตรกิริยากับตัวทำละลายมากจะทำให้โมเลกุลยืดตัวออก ทำให้มีรูปร่างแบบ rod

- การใช้โปรตีนเป็นสารมาตรฐาน

จากการนำสารละลายโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย vitamin B₁₂, myoglobin, ovalbumin, γ -globulin และ thyroglobulin มีน้ำหนักโมเลกุล 1350 Da, 17, 44, 158 และ 670 kDa ฉีดเข้าเครื่องเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี ปริมาตร 25 μ L อัตราการไหล 1.0 mL/min ใช้ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.7 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อุณหภูมิของคอลัมน์และเครื่องตรวจจับ 30 องศาเซลเซียส ตรวจจับการดูดกลืนแสงด้วยยูวีเครื่องตรวจจับที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ได้โครมาโทแกรมของสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 3.15



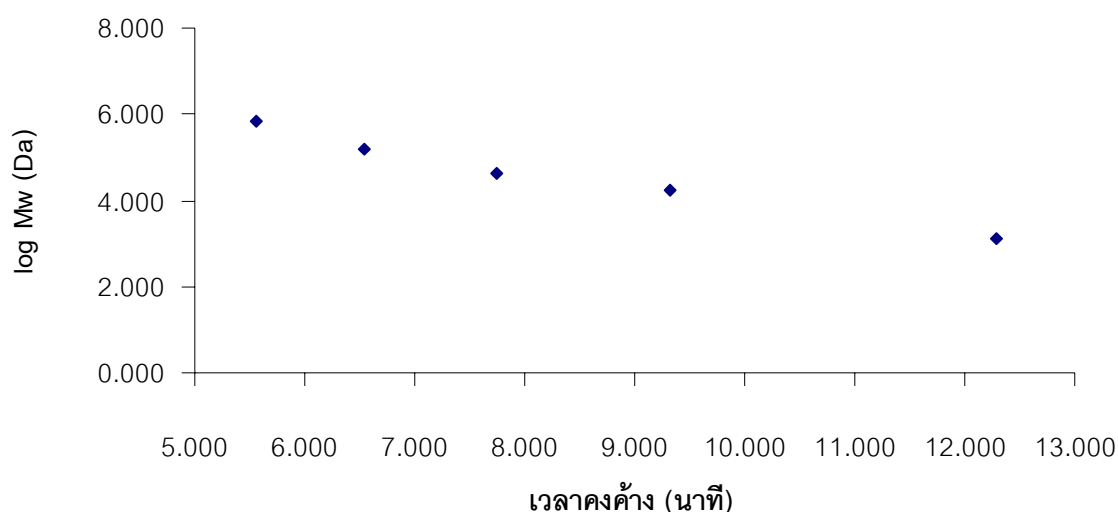
รูปที่ 3.15 โครมาโทแกรมของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (a) thyroglobulin (b) γ -globulin (c) ovalbumin (d) myoglobin (e) vitamin B₁₂

จากโครมาโทแกรมในรูปที่ 3.15 จะเห็นได้ว่ากลไกการแยกสารมาตรฐานและโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ด้วยเทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟีเป็นไปตามทฤษฎี คือ มีการแยกตามขนาดของโปรตีน โดย vitamin B₁₂ มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โมเลกุลขนาดเล็กจะมีเวลาคงค้างมากกว่า thyroglobulin ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งค่าเวลาคงค้างของสารมาตรฐานแต่ละชนิดจะแสดงดังตารางที่ 3.14

ตารางที่ 3.14 เวลาคงค้างของโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 1,350 Da-670 kDa

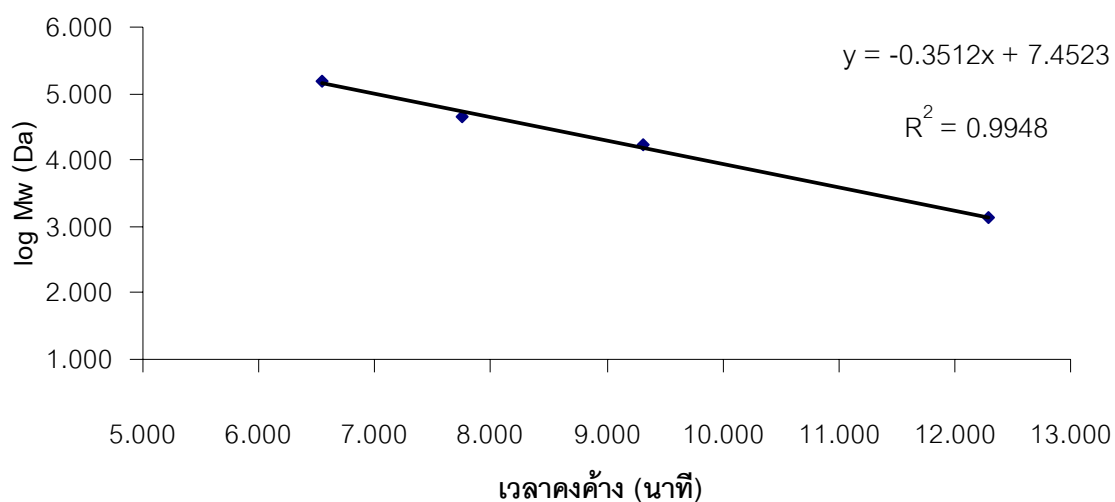
สารมาตรฐาน	น้ำหนักโมเลกุล (Da)	ลือกน้ำหนักโมเลกุล (Da)	เวลาคงค้าง (min)		
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Thyroglobulin	670,000	5.8261	5.551	5.552	5.552
γ -globulin	158,000	5.1987	6.539	6.539	6.539
Ovalbimin	44,000	4.6435	7.749	7.748	7.749
Myoglobin	17,000	4.2304	9.314	9.314	9.314
Vitamin B ₁₂	1,350	3.1303	12.287	12.291	12.289

นำค่าเวลาคงค้างของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดออกมา แล้วพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างลือกน้ำหนักโมเลกุล (Da) กับเวลาคงค้าง (นาท) ซึ่งจะไดักราฟดังรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างลือกน้ำหนักโมเลกุลกับเวลาคงค้างของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

จากกราฟในรูปที่ 3.16 ได้นำค่าเวลาคงค้างช่วงที่มีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด คือ ช่วงเวลาคงค้าง 6.54-12.29 นาท มาพล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างลือกน้ำหนักโมเลกุลกับเวลาคงค้าง ซึ่งจะไดักราฟดังรูปที่ 3.17 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชันจากไฟโบรอินและเซรีซินจากไหมพันธุ์ต่างๆ ต่อไป



รูปที่ 3.17 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

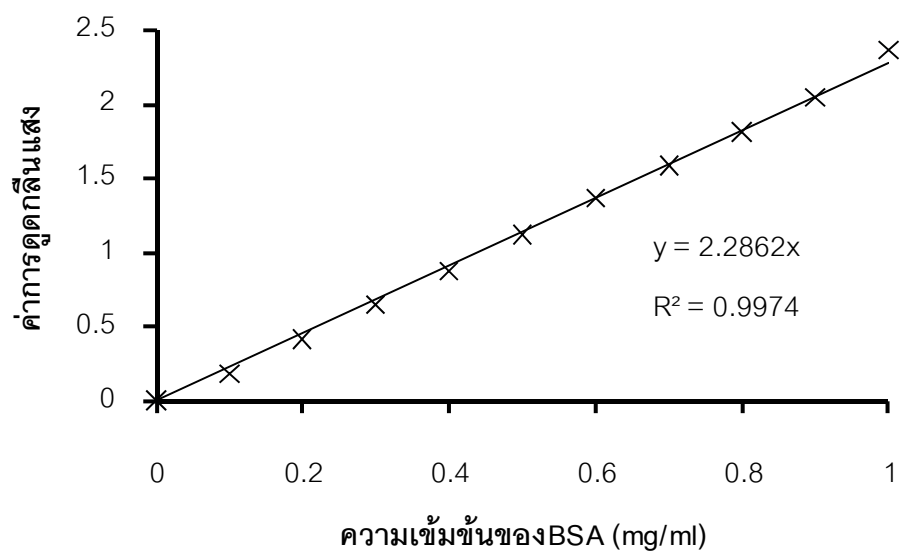
จากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 3.17 ได้สมการเส้นตรง คือ $y = -0.3512x + 7.4523$ และได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9948 ซึ่งสมการเส้นตรงสามารถนำไปคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชันต่อไป

- การหาปริมาณโปรตีนในโปรตีนไหมโดยวิธีเลาว์รี่

โดยวิธีเลาว์รี่ การดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่ 750 นาโนเมตร สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ BSA ดังข้อมูลในตารางที่ 3.15 ซึ่งเมื่อนำมาพล็อตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นแล้ว สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.18

ตารางที่ 3.15 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของ BSA

หลอดที่	ความเข้มข้นของBSA (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง
1	0.000	0
2	0.100	0.179
3	0.200	0.413
4	0.300	0.645
5	0.400	0.878
6	0.500	1.122
7	0.600	1.367
8	0.700	1.586
9	0.800	1.815
10	0.900	2.047
11	1.000	2.371



รูปที่ 3.18 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ BSA

ผลจากการดูดกลืนแสงของสารละลายกาวยไหมเซรีซิน สามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นได้ผลดังตารางที่ 3.16

ตารางที่ 3.16 ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายเซรีซิน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

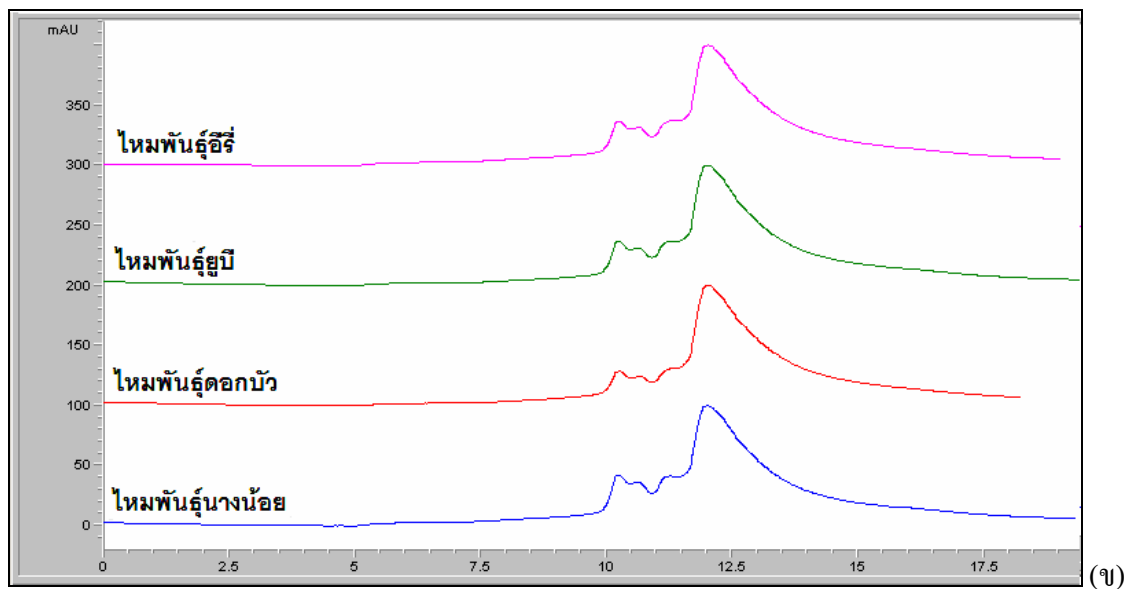
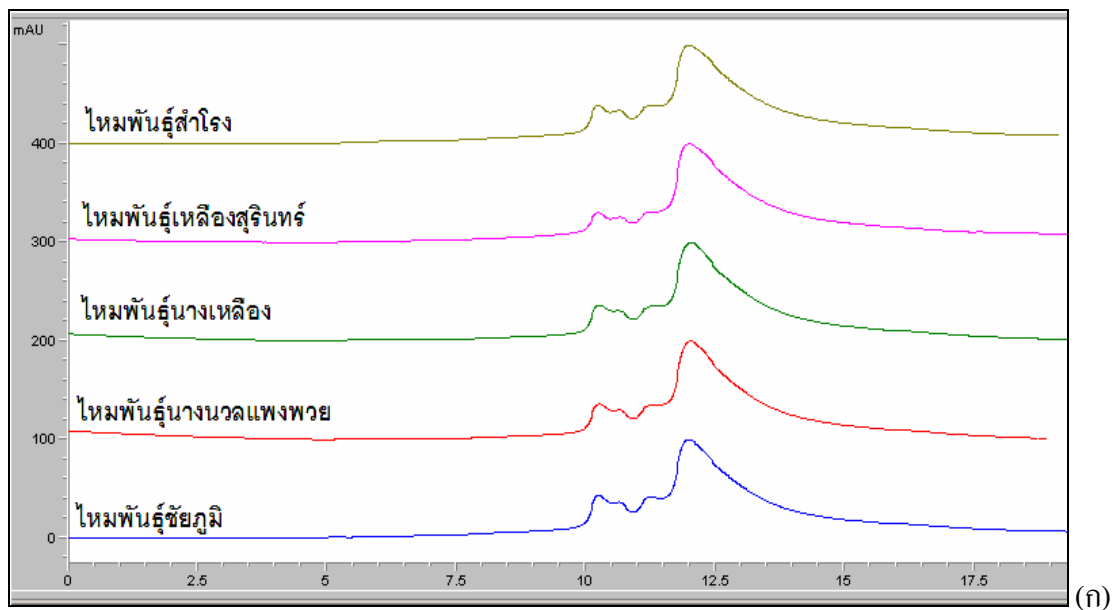
พันธุ์ไหม	BSA	
	เซรีซิน	
	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (mg/ml)
ลำโรง	0.832	0.364
เหลืองสุรินทร์	0.433	0.189
นางเหลือง	0.559	0.245
นางนวลแพงพวย	0.620	0.271
ชัยภูมิ	0.775	0.339
อีรี	1.602	0.701
ยูบี	0.435	0.190
ดอกบัว	1.885	0.825
นางน้อย	0.741	0.324

ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโบรอินมีค่าน้อยกว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเซรีซิน ซึ่ง เมื่อนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนได้ค่าแสดงดังตารางที่ 3.17

ตารางที่ 3.17 ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA

พันธุ์ไหม	ไฟโบรอิน	
	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (mg/ml)
ชัยภูมิ	0.124	0.054
นางนวลแพงพวย	0.095	0.041
นางเหลียง	0.201	0.088
เหลียงสุรินทร์	0.110	0.048
ลำโรง	0.211	0.092
นางน้อย	0.153	0.067
ดอกบัว	0.059	0.026
ยูปี	1.643	0.719
อีรี	2.120	0.927

สารละลายเชรีชินและสารละลายไฟโบรอินดังกล่าว นำไปรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล แล้ววิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคไซส์เอกซclusion โครมาโทกราฟี ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.7 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 จากการรีดิวซ์ไฟโบรอินจากไหมพันธุ์ต่างๆ แสดงได้ดังรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 จากการรีดิวซ์ไฟโบรอินด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลของ (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ (ข) ไหมพันธุ์อูรี ไหมพันธุ์ยู่บี ไหมพันธุ์ดอกบัว และไหมพันธุ์นางน้อย

หมายเหตุ พีกที่ประมาณ 5-6 นาที มีความสูงต่ำมาก ไม่สามารถมองเห็นได้ในรูป

จะเห็นว่าโครมาโทแกรมของโปรตีนแฟรกชันชนิดที่ 1 จากการรีดิวซ์ไฟโบรอินของไหมทุกสายพันธุ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล มีลักษณะคล้ายกัน คือให้แฟรกชันที่มีหลายขนาดเหมือนกัน เนื่องจากมีจำนวนพีกใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแต่ละโปรตีนแฟรกชันแต่ละแฟรกชันให้เวลาคง

ค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าโปรตีนแต่ละแฟรกชันมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 แสดงได้ดังตารางที่ 3.18

ตารางที่ 3.18 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1

พีคที่	พันธุ์สำโรง		พันธุ์เหลืองสุรินทร์		พันธุ์นางเหลือง	
	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	5.760	268.77	6.103	203.67	5.724	276.71
2	10.218	7.31	10.217	7.31	10.217	7.31
3	10.619	5.28	10.628	5.25	10.628	5.25
4	11.972	1.77	11.967	1.78	11.967	1.78
พีคที่	พันธุ์นางนวลแพงพวย		พันธุ์ชัยภูมิ		พันธุ์สีวี	
	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	6.075	208.33	5.370	368.43	6.003	220.82
2	10.245	7.15	10.234	7.21	10.228	7.25
3	10.615	5.30	10.612	5.31	10.620	5.23
4	12.007	1.72	11.238	3.20	11.996	1.77
5			11.969	1.77		

ตารางที่ 3.18 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 (ต่อ)

ฟิลาที่	พันธุ์ยูบี		พันธุ์ดอกบัว		พันธุ์นางน้อย	
	เวลาคงค้าง (นาที่)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาที่)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาที่)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	5.984	224.24	6.261	179.24	6.121	200.73
2	10.222	7.28	10.234	7.21	10.218	7.31
3	10.620	5.28	10.641	5.19	10.613	5.31
4	11.991	1.74	12.000	1.73	11.985	1.75

โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 ของไหมทุกสายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน เหมือนกัน คือ ส่วนน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งแสดงด้วยฟิลาจำนวน 1 ฟิลา ที่มีเวลาคงค้างในช่วง 5.7 ถึง 6.1 นาที่ (ฟิลาที่มีความสูงต่ำมาก ไม่ปรากฏในรูป) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 179 ถึง 368 กิโลดาลตัน และส่วนของน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งปรากฏ 3-4 ฟิลาที่มีเวลาคงค้างในช่วง 10.2 ถึง 11.9 นาที่ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 1,000 ถึง 7,000 ดาลตัน ถ้าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 จากการรีดิวซ์ไฟโบรอิน อยู่ในช่วง 368.43-1.73 kDa ซึ่งสามารถจัดเรียงลำดับและแยกช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 จากการรีดิวซ์ไฟโบรอินจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้ดังใน ตารางที่ 3.19

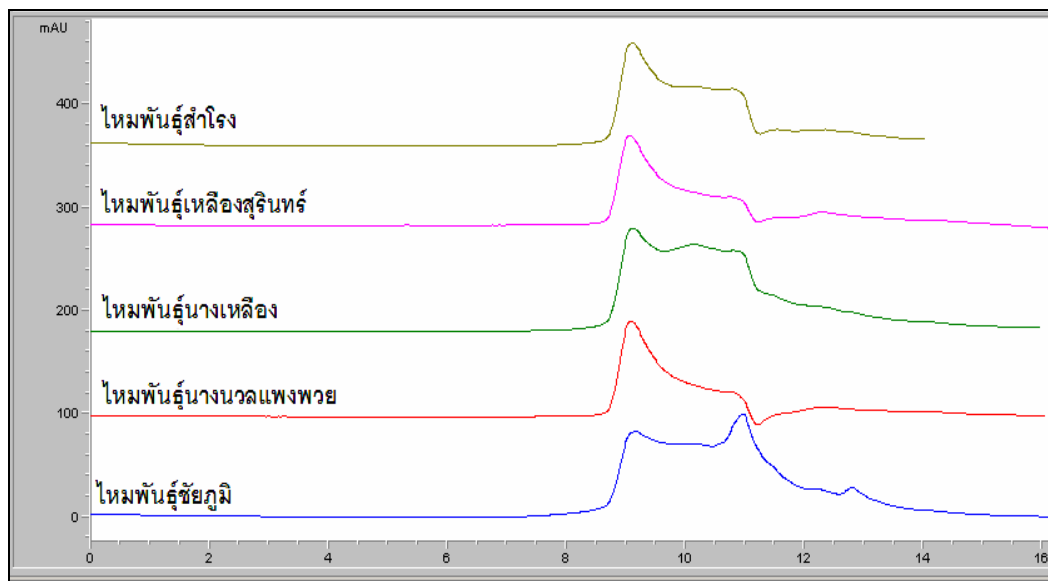
ตารางที่ 3.19 ลำดับและแยกช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 จากการรีดิวซ์ไฟโบรอินจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์

พันธุ์ไหม	ช่วงน้ำหนักโมเลกุล (kDa)
ชัยภูมิ	368.43-1.77
นางเหลือง	276.71-1.78
ลำโรง	268.77-1.77
ยูบี	224.24-1.74
อีรี	220.82-1.77
นางนวลแพงพวย	208.33-1.72
เหลืองสุรินทร์	203.67-1.78
นางน้อย	200.73-1.75
ดอกบัว	179.24-1.73

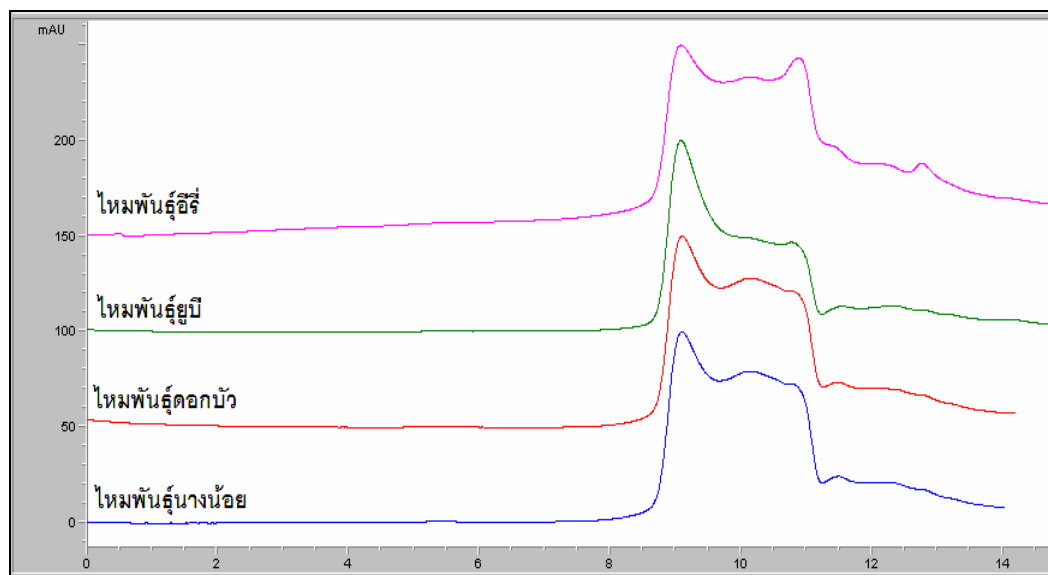
จากผลการทดลองแสดงว่า ไฟโบรอินจากไหมทุกสายพันธุ์มีลำดับของกรดอะมิโนซิสทีนเหมือนกัน โปรตีนแต่ละสายโซ่จึงเกิดการขาดออกที่ตำแหน่งเดียวกันเมื่อถูกรีดิวซ์ กลายเป็นโปรตีนแฟรกชันที่มีความยาวเท่ากัน และซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน เนื่องจากแต่ละแฟรกชันให้เวลาคงค้างใกล้เคียงกัน เนื่องมาจากมีขนาดของโมเลกุลใกล้เคียงกัน จึงมีผลให้น้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันด้วย

โปรตีนไฟโบรอินแฟรกชันที่มีขนาดเล็กที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1700 Da จากเทคนิค ไซสอิเล็กทริกโครมาโทกราฟีโดยการไฮโดรเจลโครมาโทกราฟีโปรตีนชนิดต่างๆ เป็นสารมาตรฐาน ทำให้สามารถวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชันจากไฟโบรอิน ได้ค่าที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่าการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นสารมาตรฐาน ทั้งนี้เนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับเฟสเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันกับอันตรกิริยาระหว่างพอลิเอทิลีนไกลคอลกับเฟสเคลื่อนที่ ผลการวิเคราะห์ สอดคล้องกับ Robson (Robson, 1998) ซึ่งได้กล่าวว่าการหาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินทำได้ยาก เนื่องจากทำให้ไฟโบรอินบริสุทธิ์ยาก การสลายตัวของไฟโบรอินในขณะที่เตรียมเป็นสารละลายด้วยตัวทำละลายต่างๆ ปัจจัยดังกล่าวนี้มีผลต่อค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน ค่าที่ได้มีหลายค่าและอยู่ในช่วงกว้าง และสรุปว่าโมเลกุลของไฟโบรอินประกอบไปด้วย 2 ส่วน ที่เรียกว่า H-chain และ L-chain ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 350,000 และ 25,000 ดาลตัน ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินอาจเปลี่ยนแปลงไปได้ตามสายพันธุ์เนื่องจากเหตุผลในเรื่องยีน มีรายงานว่าจากการใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส พบน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินอยู่ในช่วง 340,000 ถึง 380,000 ดาลตัน Hakimi และคณะ (Hakimi et al., 2007) อธิบายเช่นเดียวกันว่า ไฟโบรอินจากไหมประกอบไปด้วย P25 ซึ่งทำหน้าที่เป็น chaperone ซึ่งช่วยในการเคลื่อนย้ายและจับถ่าย และส่วนที่เรียกว่า H-chain (High) และ L-chain (Light) ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ นอกจากนี้ยังกล่าวว่า พันธะไดซัลไฟด์ ยังประกอบอยู่ภายใน L-chain ด้วย Datta และคณะ (Datta et al., 2001) ได้สกัดไฟโบรอินจากต่อมส่วนหลังของหนอนไหม *Antheraea mylitta* ด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต แล้ววิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่า มีแถบโปรตีน 1 แถบ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 395 kDa เมื่อไม่รีดิวซ์ แต่เมื่อรีดิวซ์ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 197 kDa

จากการนำไฟโบรอินจากไหมพันธุ์ต่างๆ ไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 แล้ววิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคไซสอิเล็กทริกโครมาโทกราฟี ซึ่งตรงกับเครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.7 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 3.20



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.20 โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 จากการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ (ข) ไหมพันธุ์อีร์ ไหมพันธุ์ยี่ ไหมพันธุ์ดอกบัว และ ไหมพันธุ์นางน้อย

จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 โดยการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน จากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี จะเห็นได้ว่า ไม่ปรากฏพีคที่ประมาณ 5 นาที ของแฟรกชันที่มีน้ำหนัก

โมเลกุลสูง ซึ่งแตกต่างจากกับโครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 1 ที่ได้จากการรีดิวซ์ แสดงว่าการไฮโดรไลซ์ทำให้โมเลกุลโปรตีนขาดออกเป็นสายโซ่สั้นกว่าการรีดิวซ์ เนื่องจากเกิดการตัดสายโซ่โปรตีนจำเพาะที่ตำแหน่งกรดอะมิโนฟีนีลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟน ดังปฏิกิริยาที่แสดงในรูปที่ 1.13

นอกจากนี้จากโครมาโทแกรมยังพบว่า จำนวนแฟรกชันของโปรตีนที่ไฮโดรไลซ์ได้ให้แฟรกชันที่มีหลายขนาดเหมือนกัน เนื่องจากมีจำนวนพิกเท่ากับ และยังพบว่าโปรตีนแฟรกชันแต่ละแฟรกชันให้เวลาคงค้างใกล้เคียงกัน แสดงว่าโปรตีนแต่ละแฟรกชันมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชันนั้น แสดงดังตารางที่ 3.20

ตารางที่ 3.20 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 โดยการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน

พิกที่	พันธุ์สำโรง		พันธุ์เหลืองสุรินทร์		พันธุ์นางเหลือง	
	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	9.086	18.25	9.050	18.79	9.094	18.13
2	10.106	8.00	10.602	5.36	10.096	8.06
3	10.826	4.47	11.514	2.56	10.869	4.32
4	11.429	2.74	12.321	1.33	11.483	2.63
5	12.501	1.15			12.352	1.30
พิกที่	พันธุ์นางพลพวงพวย		พันธุ์ชัยภูมิ		พันธุ์อีรี	
	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	9.077	18.38	9.071	18.47	9.108	17.93
2	10.807	4.54	10.082	8.16	10.156	7.68
3	12.364	1.29	10.907	4.19	10.902	4.20
4			12.689	0.99	11.419	2.77
5			12.811	0.89	11.751	2.12
6					12.623	1.04

ตารางที่ 3.20 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 โดยการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน (ต่อ)

พีคที่	พันธุ์ยูบี		พันธุ์ดอกบัว		พันธุ์นางน้อย	
	เวลาคงค้าง (นาทีก)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาทีก)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาทีก)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	9.046	18.85	9.046	18.85	9.053	18.75
2	10.755	4.73	10.142	7.78	10.764	4.70
3	11.466	2.66	10.764	4.70	10.866	4.33
4	12.500	1.15	11.364	2.89	11.433	2.74
5			12.329	1.33	11.994	1.74

ค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 จากการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน ที่ได้อยู่ในช่วง 18.85–1.04 kDa ซึ่งสามารถจัดเรียงลำดับ และแยกช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์

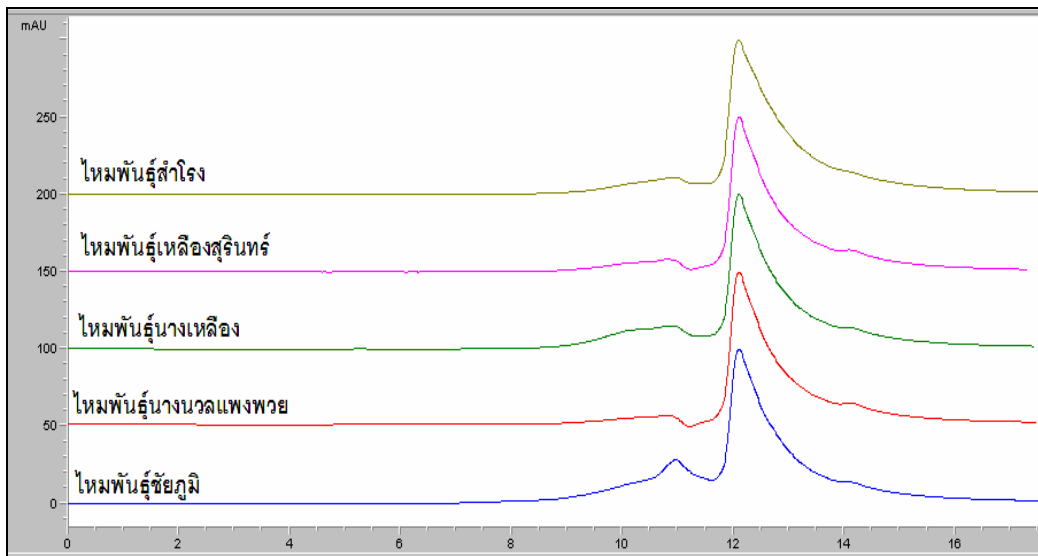
ตารางที่ 3.21 ลำดับและแยกช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 จากการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน

พันธุ์ไหม	ช่วงน้ำหนักโมเลกุล (kDa)
นางเหลื่อง	18.13-1.30
เหลื่องสุรินทร์	18.79-1.33
ยูบี	18.85-1.15
นางน้อย	18.75-1.74
ดอกบัว	18.85-1.33
นางนวลแพงพวย	18.38-1.29
ลำโรง	18.25-1.15
ชัยภูมิ	18.47-0.89
อีรี	17.93-1.04

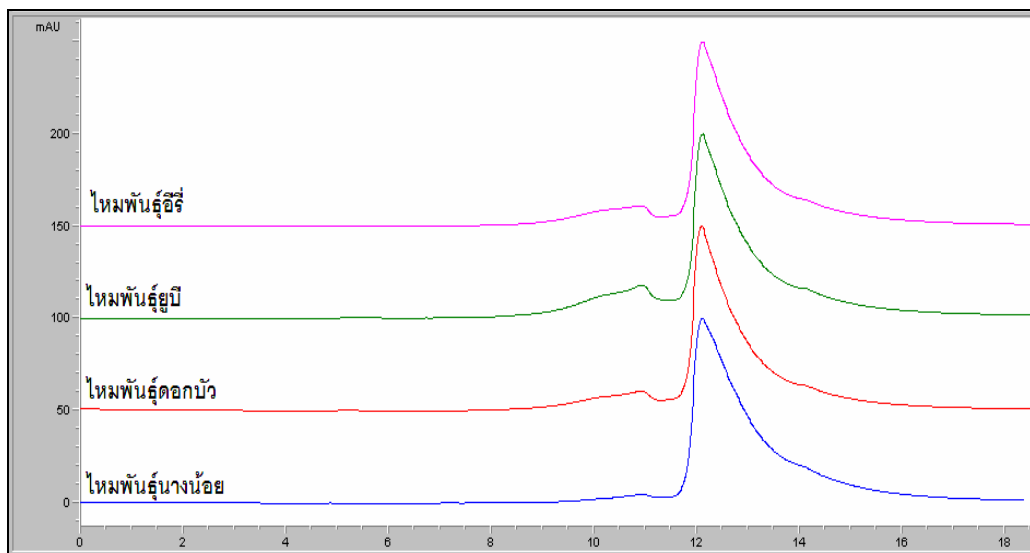
จากโครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 จะเห็นว่าไหมทุกสายพันธุ์ให้ไฟโบรอินแฟรกชันที่มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกัน เนื่องจากแต่ละฟิสิกของไฟโบรอินแฟรกชันจากไหมคนละพันธุ์ใช้เวลาคงค้างใกล้เคียงกัน แสดงว่าการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซินขนาดโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชันมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกัน

อย่างไรก็ตาม พบว่า ความสูงของพีคที่เวลาคงค้างประมาณ 10.0 และ 10.1 นาที ของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 2 จากไหมพันธุ์สำโรง นางเหลียง ชัยภูมิ อีรี ยูบี และนางน้อย มีค่าสูง นั่นแสดงว่าแฟรกชันมีปริมาณสูงด้วย

จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3 โดยรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล และไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน จากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.7 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 3.21



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.21 โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3 จากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล และไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ(ข) ไหมพันธุ์อู่รี ไหมพันธุ์อุบล ไหมพันธุ์ดอกบัว และไหมพันธุ์นางน้อย

โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3 จากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล และไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซินของไหมทุกสายพันธุ์มีลักษณะคล้ายกัน ให้จำนวนพีคไม่มาก และพีคเหล่านี้มีเวลาคงค้างสูงขึ้น อีกทั้งยังไม่พบพีคที่เวลาคงค้างที่ 5-6 นาที (H-chain) เช่นเดียวกับไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซินอย่างเดียว นั่นแสดงว่าการรีดิวซ์และการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินทำให้ได้โปรตีนแฟรกชันที่ยูนิฟอร์มมากขึ้น ให้เวลาคงค้างที่ 10-12 นาที ดังแสดงในตารางที่ 3.22

ตารางที่ 3.22 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3

ฟิสิกส์	พันธุ์สำโรง		พันธุ์เหลืองสุรินทร์		พันธุ์นางเหลือง	
	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	10.061	8.30	10.124	7.88	10.177	7.55
2	10.931	4.11	10.796	4.58	10.896	4.22
3	12.115	1.58	12.099	1.60	12.097	1.60
4	14.047	0.33	14.153	0.30	14.126	0.31
ฟิสิกส์	พันธุ์นางนวลแพงพวย		พันธุ์ชัยภูมิ		พันธุ์อีรี	
	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	10.231	7.23	10.187	7.49	10.168	7.61
2	10.770	4.68	10.957	4.02	10.930	4.11
3	12.098	1.60	12.101	1.59	12.131	1.56
4	14.099	0.32	14.168	0.30	14.088	0.32
ฟิสิกส์	พันธุ์ยूपิ		พันธุ์ดอกบัว		พันธุ์นางน้อย	
	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาท)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	10.080	8.17	10.044	8.41	10.967	3.99
2	10.892	4.24	10.915	4.16	12.179	1.50
3	12.136	1.55	12.107	1.59	13.919	0.37
4	14.066	0.33	14.195	0.29		

จะเห็นได้ว่า ไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3 ซึ่งผ่านการรีดิวซ์ไฟโบรอินจากไหมพันธุ์ต่างๆ ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลและไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซินมีจำนวนฟิสิกส์ลดลง เหลือแค่ 4 ฟิสิกส์ ยกเว้นไหมพันธุ์นางน้อยที่มี 3 ฟิสิกส์ แสดงว่า การรีดิวซ์และการไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินทำให้ได้โปรตีน แฟรกชันที่มี

ขนาดใกล้เคียงกันมากขึ้น โดยแฟรกชันที่มีเวลาคงค้างที่ 12.0 และ 12.1 นาที มีความสูงพีคมากที่สุด แสดงว่าโมเลกุลของไฟโบรอินเริ่ม uniform มากขึ้น มีความยาวของโมเลกุลใกล้เคียงกันมากขึ้น ทำให้โมเลกุลส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1.55–1.60 kDa

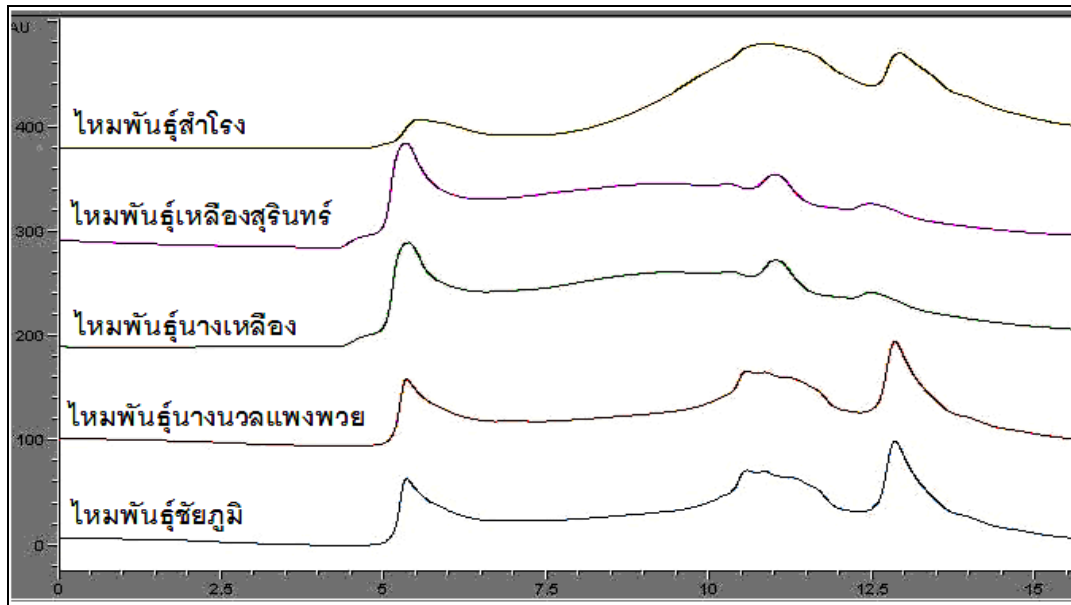
ค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยโปรตีนไฟโบรอินจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลและไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน ที่ได้ในช่วง 8.41–0.29 kDa ซึ่งสามารถจัดเรียงลำดับและแยกช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยโปรตีนไฟโบรอินจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลและไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน ดังตารางที่ 3.23

ตารางที่ 3.23 ลำดับและช่วงน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแฟรกชันชนิดที่ 3

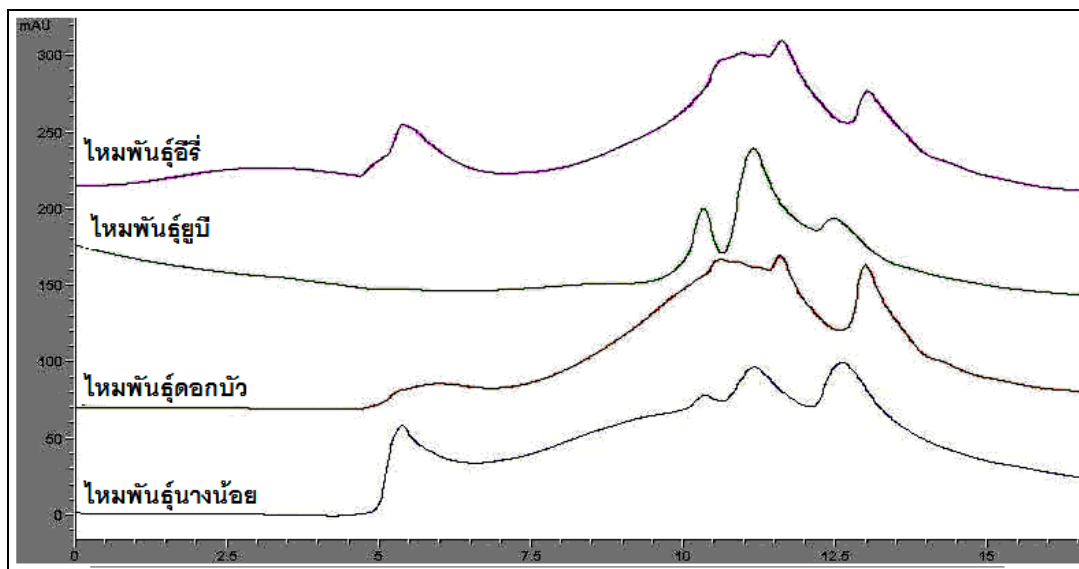
พันธุ์ไหม	ช่วงน้ำหนักโมเลกุล (kDa)
ดอกบัว	8.41-0.29
ลำโรง	8.30-0.33
ยูบี	8.17-0.33
เหลืองสุรินทร์	7.88-0.30
อีรี	7.61-0.32
นางเหลือง	7.55-0.31
ชัยภูมิ	7.49-0.30
นางนวลแพงพวย	7.23-0.32
นางน้อย	3.99-0.37

3.3.2.2 น้ำหนักโมเลกุลของเซรีซิน

เนื่องจากเซรีซินสามารถละลายน้ำได้ จึงละลายได้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำให้สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟีได้โดยไม่ต้องผ่านการรีดิวซ์ ผลการวิเคราะห์เซรีซินได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 3.22



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.22 โครมาโทแกรมของเซรีซิน (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ(ข) ไหมพันธุ์อีรี ไหมพันธุ์ยู่ปี ไหมพันธุ์ดอกบัว และไหมพันธุ์นางน้อย

โครมาโทแกรมของเซรีซิน มีลักษณะคล้ายกับโครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันที่ถูกรีดิวซ์ คือมีแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่เวลาคงค้าง 3.0–5.9 นาที และแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เวลาคงค้างในช่วง 8.4–14.7 นาที โดยที่เซรีซินจากไหมพันธุ์อีรีมีแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง 2 แฟรกชัน ซึ่งให้

เวลาคงค้างที่ 3.0 และ 5.3 นาที จากโครมาโทแกรมที่ได้สามารถนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยละเอียด ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 3.24

ตารางที่ 3.24 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีน

พีคที่	ไหมพันธุ์สำโรง		พันธุ์เหลืองสุรินทร์		พันธุ์นางเหลือง	
	เวลาคงค้าง (นาที)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาที)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาที)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)
1	5.522	325.82	4.260	904.04	4.741	612.72
2	10.844	4.40	5.303	388.94	5.344	376.26
3	12.886	0.84	8.924	20.81	8.460	30.28
4	13.983	0.35	9.294	15.43	9.372	14.48
5	16.271	0.05	10.239	7.18	10.274	6.98
6			10.985	3.93	11.006	3.86
7			12.435	1.22	12.453	1.20
8					13.564	0.49
9					13.992	0.35
พีคที่	ไหมพันธุ์ดอกบัว		พันธุ์นางนวลแพงพวย		พันธุ์ชัยภูมิ	
	เวลาคงค้าง (นาที)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาที)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาที)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)
1	5.966	227.53	5.322	383.01	5.367	369.33
2	10.582	5.44	10.542	5.62	10.562	5.532
3	11.185	3.34	10.814	4.51	11.193	3.32
4	11.570	2.45	11.292	3.07	11.527	2.54
5	12.968	0.79	11.695	2.21	12.836	0.88
6	14.301	0.27	12.834	0.88	13.941	0.36
7			14.100	0.32		
8			14.746	0.19		
9						

ตารางที่ 3.24 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซิน (ต่อ)

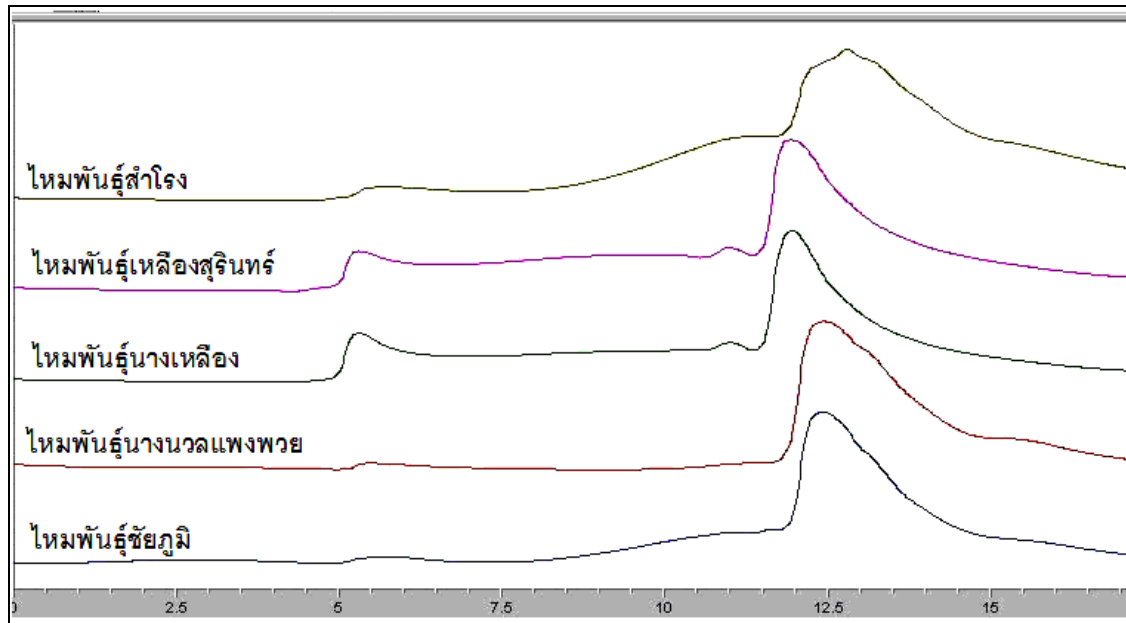
ฟิสิกส์	พันธุ์อูรี		พันธุ์ยูบี		พันธุ์นางน้อย	
	เวลาคงค้าง (นาทีก)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาทีก)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)	เวลาคงค้าง (นาทีก)	น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)
1	3.090	2,328.58	5.481	336.80	5.357	372.32
2	5.364	370.22	10.313	6.77	9.433	13.79
3	10.710	4.91	10.754	4.74	10.338	6.63
4	10.944	4.06	11.134	3.48	11.144	3.46
5	11.592	2.41	12.434	1.22	11.747	2.12
6	13.005	0.77	13.095	0.71	12.586	1.08
7	14.364	0.26			13.530	0.50
8					14.104	0.32

เซรีซินจากไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ และนางเหลือง มีลักษณะคล้ายกัน คือมีไหล์ฟิสิกส์เวลาคงค้างประมาณ 4 นาทีก ส่วนอูรีปรากฏฟิสิกส์กว้างที่เวลา 3 นาทีกด้วย ทำให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินที่ได้อยู่ในช่วง 2,328.58-0.05 kDa ซึ่งสามารถจัดเรียงลำดับและแยกช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์ แสดงดังในตารางที่ 3.25

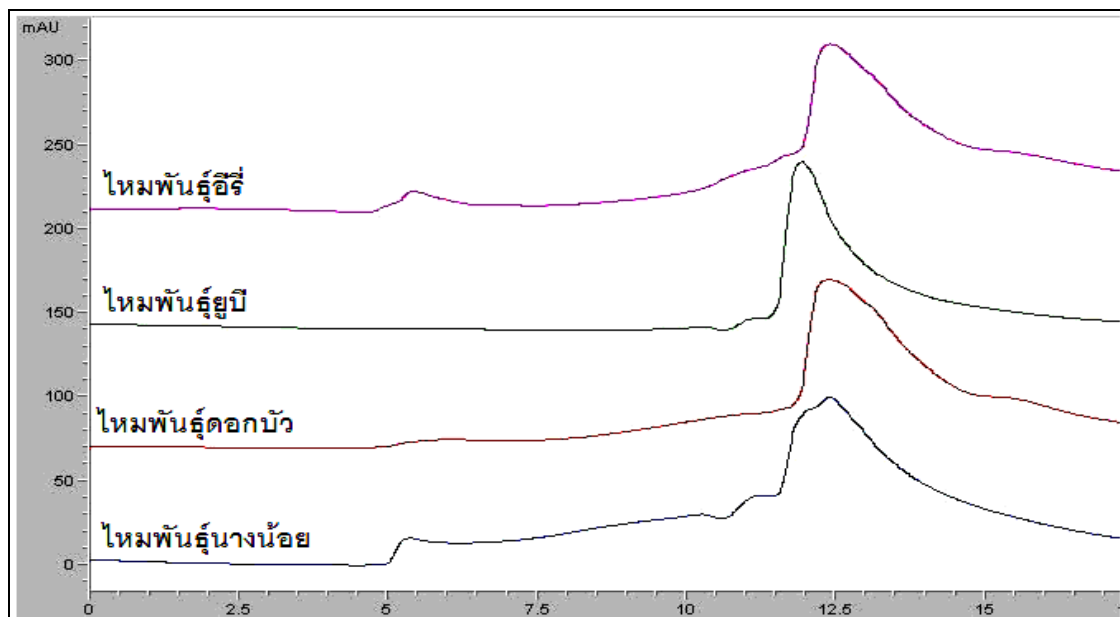
ตารางที่ 3.25 ช่วงน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์

พันธุ์ไหม	ช่วงน้ำหนักโมเลกุล (kDa)
อีรี	2,328.58-0.26
เหลืองสุรินทร์	904.04-1.22
นางเหลือง	612.72-0.35
นางนวลแพงพวย	383.01-0.19
นางน้อย	372.32-0.32
ชัยภูมิ	369.33-0.18
ยูบี	336.80-0.71
ลำโรง	325.82-0.05
ดอกบัว	227.53-0.27

ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันโดยการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ได้เซรีซินแฟรกชันแล้วนำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.7 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ได้โครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 3.23



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.23 โครมาโทแกรมของเชริซีนแฟรกชันจากการรีดิวซ์เชริซีนด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (ก) ไหมพันธุ์สำโรง ไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์ ไหมพันธุ์นางเหลือง ไหมพันธุ์นางวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ และ (ข) ไหมพันธุ์อีรี ไหมพันธุ์ยุปี ไหมพันธุ์ดอกบัว และไหมพันธุ์นางน้อย
หมายเหตุ พีกที่ 5.299 นาที ของเชริซีนแฟรกชันจากไหมพันธุ์ยุปี ต่ำมาก ไม่สามารถมองเห็นได้

โครมาโทแกรมของเซรีซินแฟรกชันยังคงปรากฏพีคที่ประมาณ 5 นาติ สำหรับไหมทุกสายพันธุ์ ยกเว้นเซรีซินแฟรกชันจากไหมพันธุ์ยูบี

จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชัน โดยการรีดิวซ์ ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลจากไหมทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี ได้เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุล ดังตารางที่ 3.26

ตารางที่ 3.26 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

พีคที่	ไหมพันธุ์สำโรง		พันธุ์เหลืองสุรินทร์		พันธุ์นางเหลือง	
	เวลาคง ค้าง (นาติ)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคง ค้าง (นาติ)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคง ค้าง (นาติ)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	5.686	285.35	5.293	392.10	5.269	399.79
2	10.823	4.48	8.054	42.05	5.949	230.68
3	12.669	1.01	9.488	13.19	8.063	41.74
4	12.979	0.78	10.272	6.99	9.386	14.32
5			10.976	3.96	10.959	4.01
6			11.932	1.83	11.904	1.87
7					12.077	1.63
8					13.023	0.76
9					14.046	0.33
พีคที่	พันธุ์อีรี		พันธุ์นางนวลแพงพวย		พันธุ์ชัยภูมิ	
	เวลาคง ค้าง (นาติ)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคง ค้าง (นาติ)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคง ค้าง (นาติ)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	6.095	204.99	5.585	309.63	5.987	223.70
2	10.971	3.97	11.056	3.71	10.804	4.55
3	12.469	1.18	12.505	1.15	11.601	2.39
4	16.441	0.47	15.360	0.15	12.394	1.26
5					15.634	0.09
6						

ตารางที่ 3.26 เวลาคงค้างและน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (ต่อ)

พีคที่	พันธุ์ยูบี		พันธุ์ดอกบัว		พันธุ์นางน้อย	
	เวลาคง ค้าง (นาทีก)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคง ค้าง (นาทีก)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เวลาคง ค้าง (นาทีก)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
1	5.299	390.20	5.533	322.93	5.342	376.87
2	10.276	6.97	10.823	4.48	9.4	14.16
3	10.054	8.34	12.528	1.13	10.242	7.17
4	11.169	3.39	15.994	0.07	11.186	3.34
5	11.91	1.86			11.099	3.58
6	12.557	1.10			11.904	1.87
7					12.35	1.30
8					14.104	0.32

จากโครมาโทแกรม จำนวนพีคลดน้อยลง นั้นแสดงว่า การรีดิวซ์ทำให้ได้เซรีซินแฟรกชันที่ uniform มากขึ้น จะเห็นได้ว่า พีคที่เวลาคงค้างประมาณ 5 นาทีกซึ่งเป็นของแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (H-chain) ยังคงปรากฏอยู่ ในขณะที่พีคของแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง (L-chain) ซึ่งมีเวลาคงค้างเวลาคงค้างที่ประมาณ 10-11 นาทีก มีความสูงลดลง ในขณะที่พีคที่เวลาคงค้างประมาณ 12.5 นาทีก มีความสูงเพิ่มขึ้น นั้นแสดงว่า H-chain ไม่เกิดการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล จึงมีขนาดของโมเลกุลเท่าเดิม นั้นแสดงว่าไม่มีส่วนของกรดอะมิโนซิสตีนเป็นองค์ประกอบ แต่ L-chain ที่ให้เวลาคงค้างที่ประมาณ 10-11 นาทีก ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนซิสตีนที่ถูกรีดิวซ์ให้มีสายโซ่โมเลกุลสั้นลง และมีจำนวนมากขึ้น จึงปรากฏพีคเวลาคงค้างประมาณ 12.5 นาทีก ที่มีความสูงมากขึ้น คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ที่ได้อยู่ในช่วง 399.79-0.09 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถแสดงได้ตามสายพันธุ์ใหม่ดังตารางที่ 3.27

ตารางที่ 3.27 ช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนแฟรกชันจากการรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลจากไหม

พันธุ์ไหม	ช่วงน้ำหนักโมเลกุล (kDa)
นางเหลือง	399.79-0.33
เหลืองสุรินทร์	392.10-1.83
ยูบี	390.20-1.10
นางน้อย	376.87-0.32
ดอกบัว	322.93-0.68
นางนวลแพงพวย	309.63-0.15
ลำโรง	285.35-0.78
ชัยภูมิ	223.70-0.09
อีรี	204.99-0.47

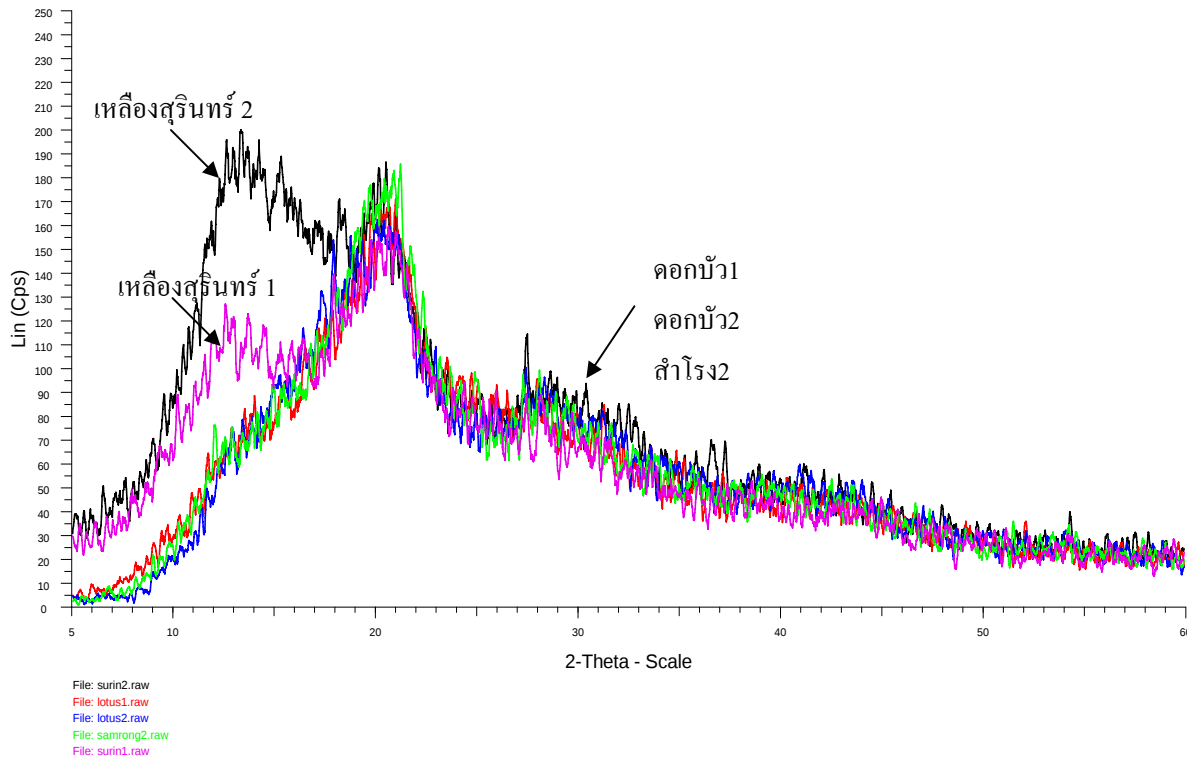
เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนแฟรกชันที่ได้จากการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสและเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี โดยที่แบ่งช่วงน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซีนแฟรกชันที่ได้จากการรีดิวซ์เป็น 2 ช่วง คือช่วงน้ำหนักโมเลกุลสูง (H-chain) และช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (L-chain) จะเห็นว่า เทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟีสามารถแยกเซรีซีนแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากสามารถแยกเซรีซีนแฟรกชันได้ตามขนาดของโมเลกุล ส่วนเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสจะเห็นเป็นแถบเจลที่มีขนาดกว้างขึ้น เมื่อวิเคราะห์โมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกัน H-chain ที่ได้จากเทคนิคนี้มีค่าสูงกว่า H-chain ที่ได้จากเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสถึง 3-9 เท่า ในขณะที่ให้ L-chain ที่มีน้ำหนักโมเลกุลหลายค่า กระจายอยู่ในช่วงเดียวกับค่าน้ำหนักโมเลกุลของ L-chain ที่ได้จากเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.28 การเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของเซรีซินแฟรกชันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟีและเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

พันธุ์ไหม	ช่วงน้ำหนักโมเลกุลวิเคราะห์จากเทคนิคไซส์เอกซคลูชันโครมาโทกราฟี (kDa)		ช่วงน้ำหนักโมเลกุลวิเคราะห์จากเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (kDa)	
	H-chain	L-chain	H-chain	L-chain
นางเหลือง	230.68, 399.79	0.33, 0.76, 1.63, 1.87, 4.01, 14.32, 41.74	67.61	16.98
เหลืองสุรินทร์	392.10	1.83, 3.96, 6.99, 13.19, 42.05		
ยูบี	390.20	1.10, 1.86, 3.39, 8.34, 6.97	43.65	18.20
นางน้อย	376.87, 14.16	0.32, 1.30, 1.87, 3.58, 3.34, 7.17	70.79 40.74	19.05
ดอกบัว	322.93	0.07, 1.13, 4.48	41.69	17.78
นางนวลแพงพวย	309.63	0.15, 1.15, 3.71		
ตำโรง	285.35	0.78, 1.01, 4.48		
ชัยภูมิ	223.70	0.09, 1.26, 2.39, 4.55		
อีรี	204.99	0.47, 1.18, 3.97	44.16	17.38

3.5 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของไหม – ความเป็นผลึก

การศึกษาสมบัติทางกายภาพของเส้นไหมพันธุ์ต่างๆ โดยการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องเอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรกโทมิเตอร์ได้ดิฟแฟรกโทแกรม ดังรูปที่ 3.24



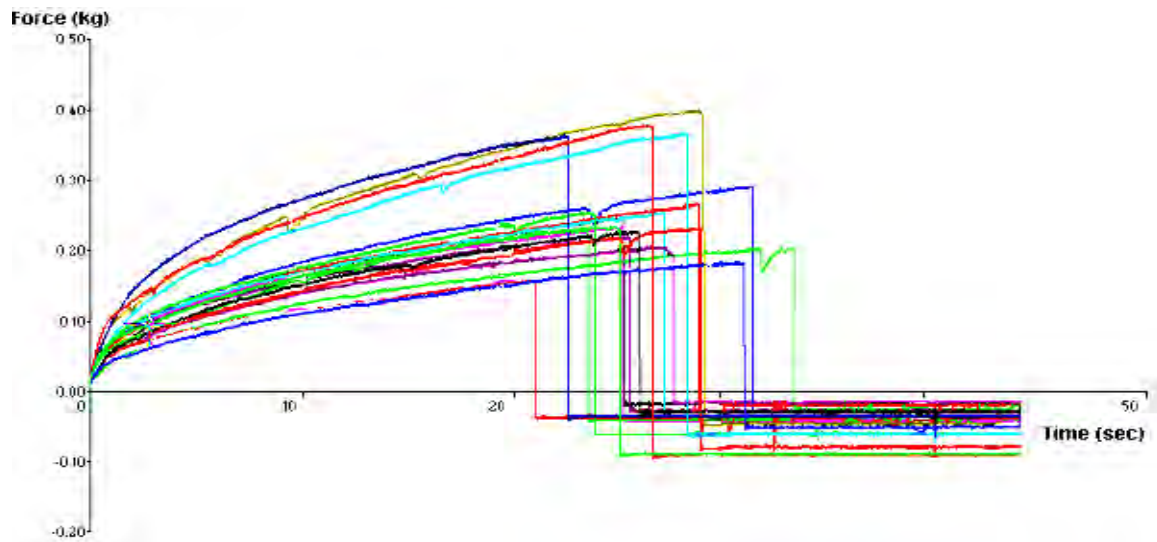
รูปที่ 3.24 ดิฟแฟร็กโทแกรมของไฟโพรอินจากไหมพันธุ์เหลือ้งสุรินทร์ ลำโรง และดอกบัว

หมายเหตุ 1 คือ ไฟโพรอินจากเปลือกกุ้ง 2 คือ ไฟโพรอินจากรังด้านใน

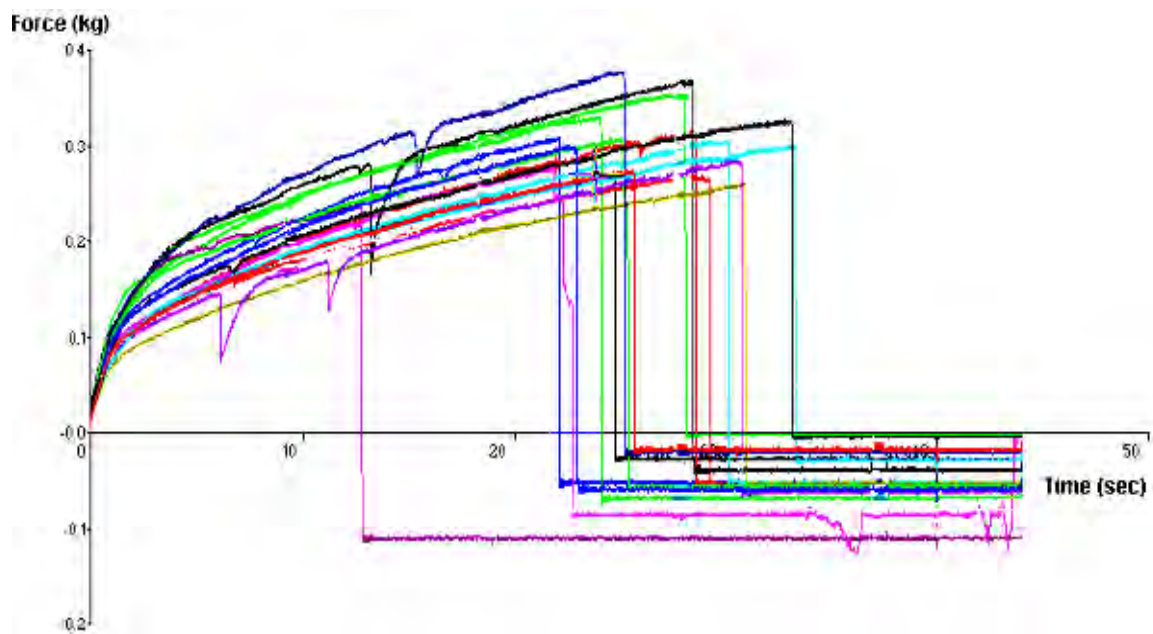
ดิฟแฟร็กโทแกรมในรูปที่ 3.24 ไม่ปรากฏพีกแหลมที่มีความเข้มสูง นั่นแสดงได้ว่า ไฟโพรอินเป็นวัสดุที่ประกอบด้วยส่วนอะมอร์ฟัสและส่วนผลึกปะปนกันอยู่ในโครงสร้าง จึงเรียกได้ว่าเป็น semi-crystalline polymer เฉพาะไฟโพรอินจากไหมพันธุ์เหลือ้งสุรินทร์ที่มีระนาบผลึกแตกต่างไปจากไหมพันธุ์อื่น และมีความเข้มของสัญญาณการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์สูงที่สุด บอกถึงความเป็นผลึกสูงที่สุดในบรรดาไหมทั้งสามพันธุ์นี้ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับความสามารถในการละลายในลิเทียมโบรไมด์ ซึ่งมีลำดับความง่ายในการละลายดังนี้ ดอกบัว > ลำโรง > เหลือ้งสุรินทร์ การที่ไหมมีระนาบผลึกแตกต่างกันนี้อาจจะมีสาเหตุมาจาก การจัดเรียงโครงสร้างของไฟโพรอินในไหมพันธุ์เหลือ้งสุรินทร์เป็นระเบียบมากกว่า นอกจากนี้ ดิฟแฟร็กโทแกรมของไฟโพรอินในไหมพันธุ์เหลือ้งสุรินทร์ที่วิเคราะห์จากเปลือกกุ้งและรังด้านใน ยังแสดงให้เห็นว่า ปริมาณความเป็นผลึกของไฟโพรอินจากรังด้านในมีค่ามากกว่า เนื่องจากให้ความเข้มของพีกที่ 2-theta เท่ากับ 13 มีค่าสูงกว่า

3.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของไฟโพรอิน – ความทนต่อแรงดึง

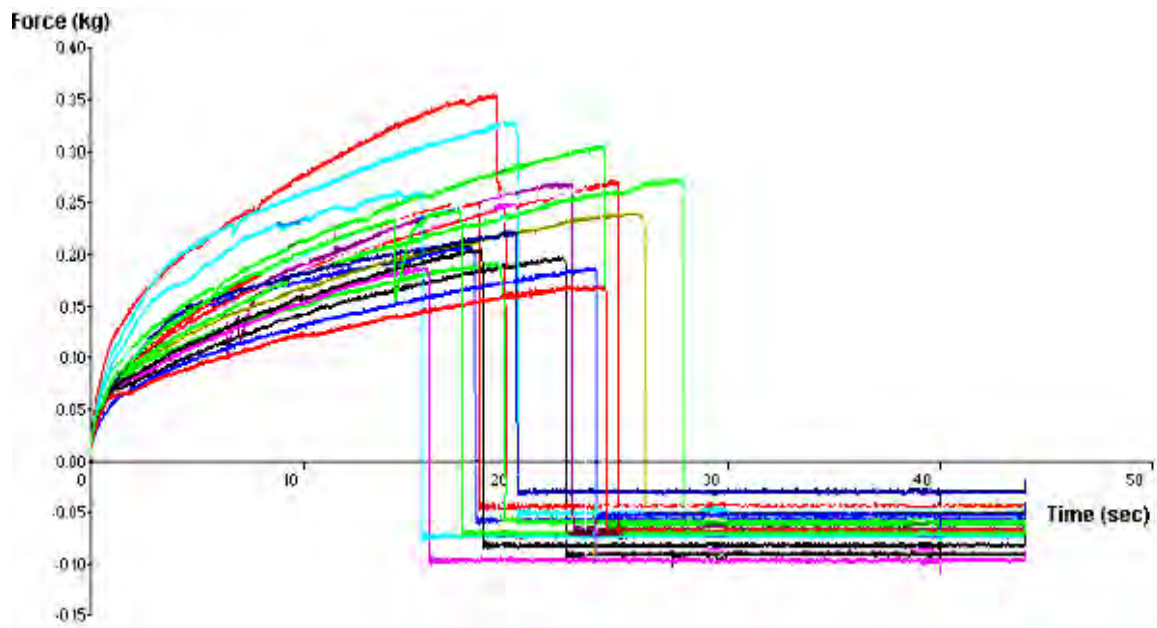
เมื่อนำเส้นใยไหมแต่ละพันธุ์ พันธุ์ละ 10 เส้น มาดึงด้วยแรงดึง 50 N gauge length 4 ซม. และ Crosshead 10 mm/min ตัวอย่างกราฟที่ได้จากการดึงเส้นใยไหมไฟโพรอิน แสดงได้ดังรูปที่ 3.25 – 3.31



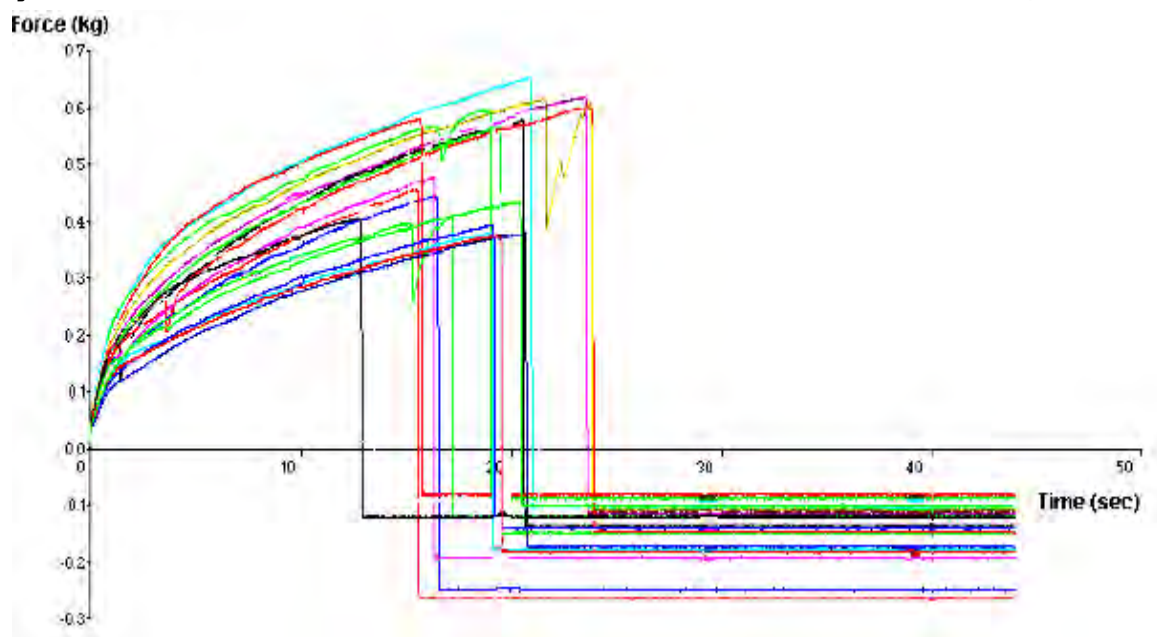
รูปที่ 3.25 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของเส้นไหมพันธุ์ชัยภูมิ



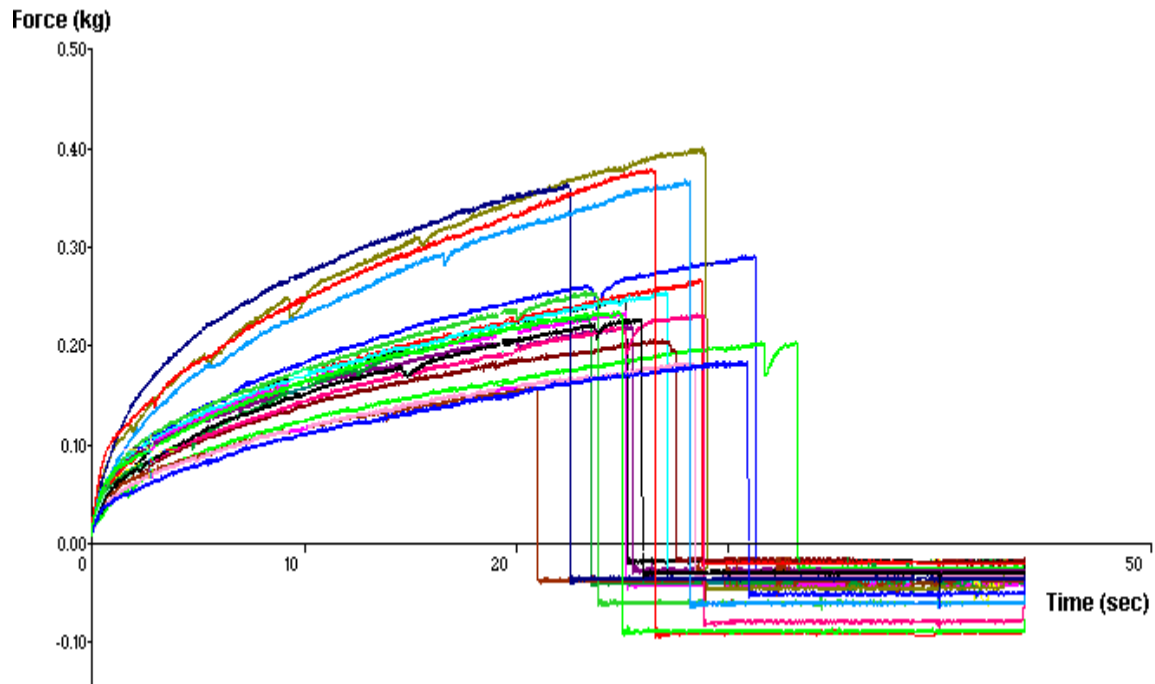
รูปที่ 3.26 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของเส้นไหมพันธุ์นางนวล
แพงพวย



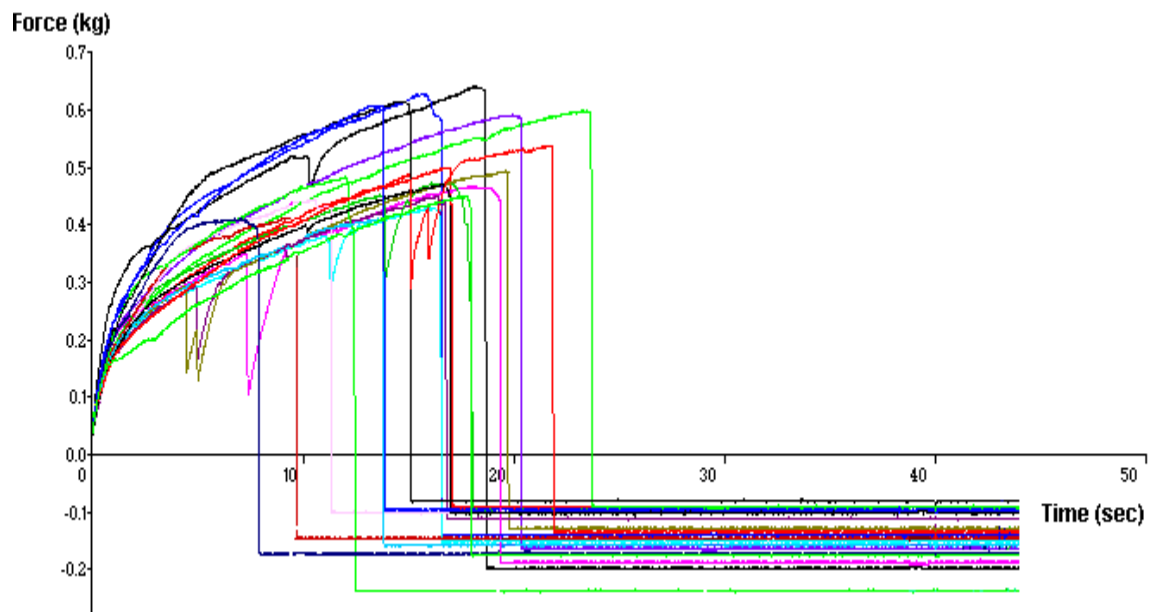
รูปที่ 3.27 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของเส้นไหมพื้นฐานหนัก



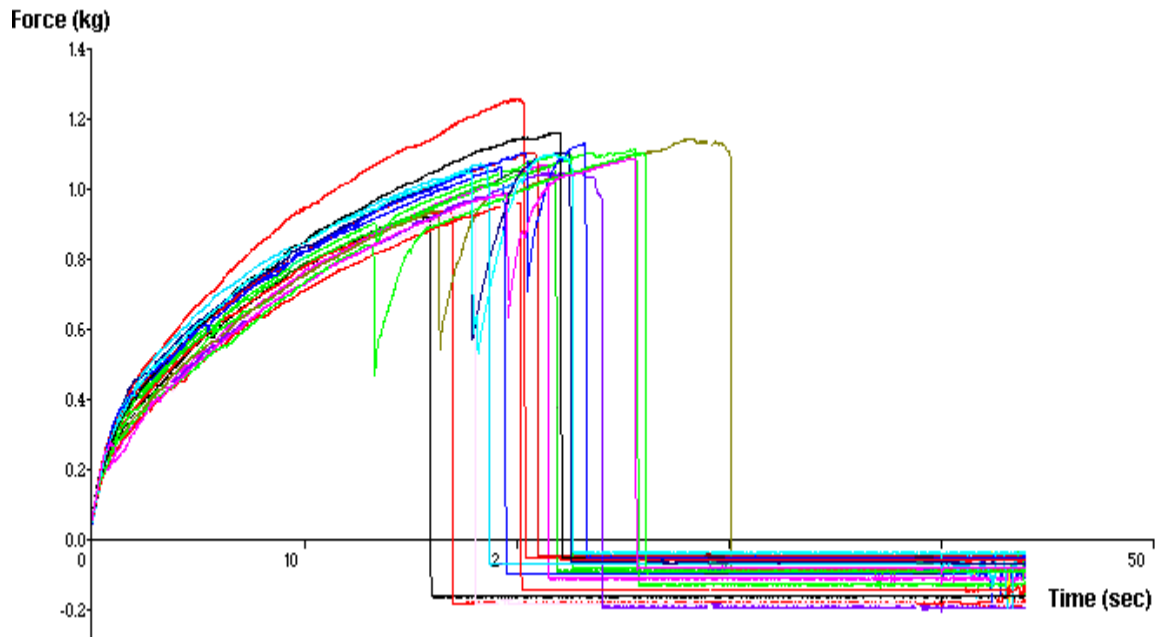
รูปที่ 3.28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของเส้นไหมพื้นฐานน้อย



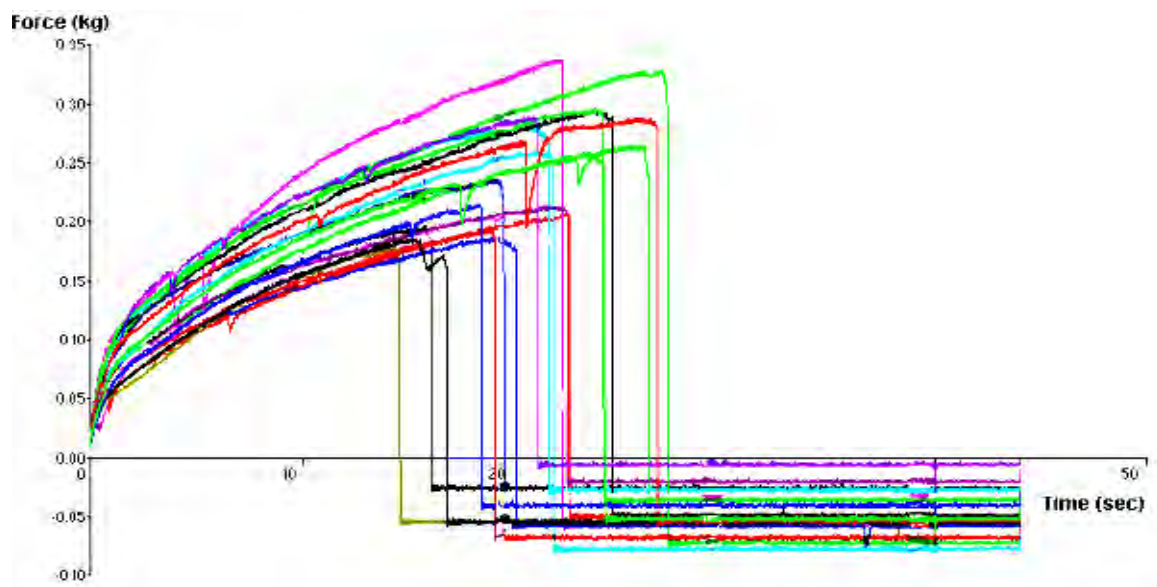
รูปที่ 3.29 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของเส้นไหมพันธุ์ดอกบัว1



รูปที่ 3.30 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของเส้นไหมพันธุ์ดอกบัว2
(สาวจากโรงไหมชั้นนอก)

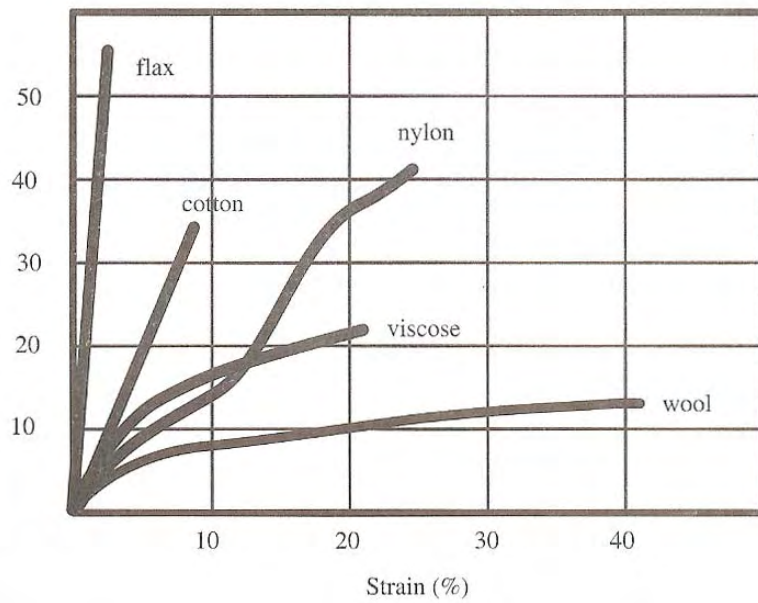


รูปที่ 3.31 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของเส้นไหมพันธุ์คอกบัว2 (สาวจากโรงไหมชั้นใน)



รูปที่ 3.32 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ในการดึงกับเวลาในการดึงของเส้นไหมพันธุ์บุรีรัมย์

จากลักษณะของกราฟ จะเห็นได้ว่า เส้นไหมจากทุกพันธุ์มีความแข็งแรงสูง นอกจากนี้ยังพบว่า เส้นไหมยังสามารถยืดออกได้อีกด้วย ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากเส้นใยสิ่งทอชนิดอื่นๆ ดังแสดงด้วยกราฟ stress-strain ในรูปที่ 3.33 เนื่องจากเส้นใยบางชนิดมีความแข็งแรงแต่ขาดความยืดหยุ่น เช่น แฟล็กซ์ คอตตอน และเส้นใยบางชนิดยืดตัวได้ดีแต่ความแข็งแรงต่ำ เช่น วิสคอส ขนแกะ



รูปที่ 3.33 กราฟ stress-strain ของเส้นใยบางชนิด

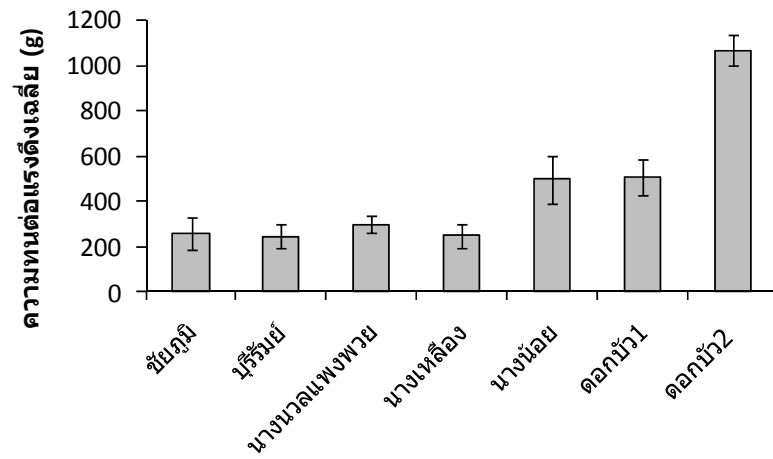
ที่มา : วิมลรัตน์ ศรีจรัสสิน, เทคโนโลยีสิ่งทอเบื้องต้น. 2551

ผลการดึงเส้นไหมในงานวิจัยนี้ พบว่าไหมแต่ละเส้นและแต่ละพันธุ์ทนต่อแรงดึงไม่เท่ากัน นั่นอาจเป็นเพราะเส้นไหมที่ได้จากการสาวมียามีขนาดเล็กใหญ่ไม่เท่ากัน ซึ่งมีผลต่อค่าความทนต่อแรงดึงของเส้นไหม จึงได้คำนวณค่าความทนต่อแรงดึงต่อความละเอียดของเส้นไหม ซึ่งจะให้เป็นค่าความทนต่อแรงดึงจำเพาะ เพื่อจะได้เปรียบเทียบความแข็งแรงของเส้นไหมแต่ละพันธุ์ได้ เมื่อลดปัจจัยจากขนาดของเส้นไหมไม่ให้เข้ามาเกี่ยวข้อง ตารางที่ 3.28 แสดงค่าความทนต่อแรงดึงเฉลี่ย และค่าความทนต่อแรงดึงจำเพาะเฉลี่ยของเส้นไหมพันธุ์ต่างๆ ให้เห็นผลอย่างชัดเจนในรูปที่ 3.34 และรูปที่ 3.35

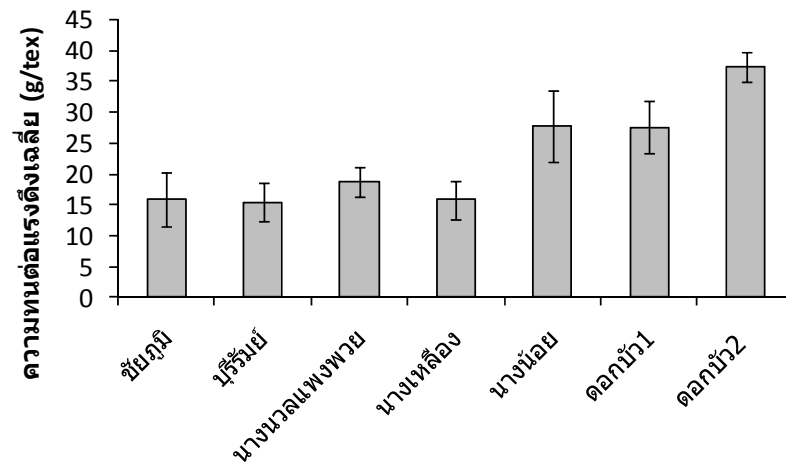
ตารางที่ 3.29 ค่าความทนต่อแรงดึงของเส้นไหมพันธุ์ต่างๆ

พันธุ์ไหม	น้ำหนักต่อความยาว 100 cm (g)	ความละเอียด (tex)	ค่าความทนต่อแรงดึงเฉลี่ย (g)	ค่าความทนต่อแรงดึงจำเพาะเฉลี่ย (g/tex)
ชัยภูมิ	0.0162	16.2	258.85 ± 69.37	15.98 ± 4.28
บุรีรัมย์	0.0160	16.0	247.85 ± 50.08	15.49 ± 3.13
นางนวลแพงพวย	0.0160	16.0	299.83 ± 39.37	18.74 ± 2.46
นางเหลือง	0.0157	15.7	248.55 ± 50.27	15.83 ± 3.20
นางน้อย	0.0179	17.9	496.42 ± 102.29	27.73 ± 5.71
ดอกบัว1 (สาวจากรังไหมชั้นนอก)	0.0184	18.4	508.14 ± 79.25	27.62 ± 4.31
ดอกบัว2 (สาวจากรังไหมชั้นใน)	0.0285	28.5	1067.35 ± 69.19	37.45 ± 2.43

รูปที่ 3.34 และรูปที่ 3.35 แสดงค่าความทนต่อแรงดึง พบว่าเส้นไหมจากไหมพันธุ์ดอกบัว2 ที่ได้จากการสาวรังไหมชั้นในมีค่าความทนต่อแรงดึงสูงที่สุด รองลงมาคือ ไหมพันธุ์ดอกบัว1 ที่ได้จากการสาวรังไหมชั้นนอก ไหมพันธุ์นางน้อย ไหมพันธุ์นางนวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ ไหมพันธุ์นางเหลือง และไหมพันธุ์บุรีรัมย์ ตามลำดับ เมื่อนำค่าความทนต่อแรงดึงและน้ำหนักของเส้นไหมความยาว 100 cm แล้วมาคำนวณหาความละเอียดของเส้นไหม พบว่าไหมพันธุ์ดอกบัว2 (สาวจากรังไหมชั้นใน) มีน้ำหนักของเส้นไหมสูงที่สุด รองลงมาคือ ไหมพันธุ์ดอกบัว1 ไหมพันธุ์นางน้อย ไหมพันธุ์ดอกบัว1 (สาวจากรังไหมชั้นนอก) ไหมพันธุ์นางนวลแพงพวย ไหมพันธุ์ชัยภูมิ ไหมพันธุ์นางเหลือง และไหมพันธุ์บุรีรัมย์ ตามลำดับ ดังนั้น จึงพบว่า ไหมพันธุ์ดอกบัว2 (สาวจากรังไหมชั้นใน) มีค่าความทนต่อแรงดึงจำเพาะ สูงที่สุด รองลงมาคือ แสดงว่ามีความแข็งแรงของเส้นไหมมากกว่าไหมพันธุ์อื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบความแข็งแรงของเส้นไหมพันธุ์ดอกบัว ที่ได้จากการสาวรังไหมชั้นในและชั้นนอก พบว่าเส้นไหมชั้นในมีความแข็งแรงมากกว่าเส้นไหมชั้นนอก อาจเกิดเนื่องจากเส้นไหมชั้นในมีการจัดเรียงโครงสร้างเป็นระเบียบมากกว่าเส้นไหมชั้นนอก



รูปที่ 3.34 ค่าความทนต่อแรงดึงเฉลี่ยของเส้นไหมพันธุ์ต่างๆ



รูปที่ 3.35 ค่าความทนต่อแรงดึงจำเพาะเฉลี่ยของเส้นไหมพันธุ์ต่างๆ

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

การใช้เทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟีและเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนใหม่คือ กาวไหมเซรีซินและเส้นใยไหมไฟโบรอินได้ โดยที่เทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟีวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลได้ละเอียดกว่า เพราะสามารถแยกโปรตีนแฟรกชันออกได้ตามขนาดจากการใช้วัสดุที่มีรูพรุนแตกต่างกันบรรจุในคอลัมน์ และการมีเครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลตที่คอยตรวจวัดโปรตีนแฟรกชันที่เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ อนึ่งเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสปรากฏเป็นแถบเจลที่มีลักษณะกว้างขึ้นเมื่อโปรตีนแฟรกชันประกอบด้วยโมเลกุลที่มีความยาวใกล้เคียงกัน

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไหมทั้งเซรีซิน จะผ่านกระบวนการทำปฏิกิริยารีดักชันด้วย 2-เมอร์แคปโทเอทานอล และไฟโบรอินจะผ่านกระบวนการทำปฏิกิริยารีดักชันด้วย 2-เมอร์แคปโทเอทานอลแล้วผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซินก่อน เพื่อให้ได้โปรตีนแฟรกชันที่มีขนาดโมเลกุลสั้นที่สามารถละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ จากการใช้เทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟีวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชัน (ทั้งจากไฟโบรอินและเซรีซิน) จากไหม 9 สายพันธุ์ พบว่าโครมาโทแกรมมีแพทเทิร์นคล้ายกัน โครมาโทแกรมของไฟโบรอินแฟรกชันจากการรีดิวซ์ แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของไฟโบรอินประกอบด้วยแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่เรียกว่า H-chain และแฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เรียกว่า L-chain โดยที่ H-chain มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 203 – 368 kDa ส่วน L-chain มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงประมาณ 1 – 7 kDa การไฮโดรไลซ์ไฟโบรอินด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน ทำให้ H-chain หายไป เนื่องจากกลายเป็นแฟรกชันที่มีขนาดสั้นลง น้ำหนักโมเลกุลแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 ประมาณ 17 – 18 kDa และช่วงที่ 2 ประมาณ 1 – 8 kDa ไฟโบรอินที่ผ่านทั้งการรีดิวซ์และการไฮโดรไลซ์ให้โปรตีนแฟรกชันที่ยูนิฟอร์มมากขึ้น ได้แฟรกชันที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1 kDa จำนวนมากที่สุด เทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟีแสดงให้เห็นว่า เซรีซินที่ไม่ได้รีดิวซ์ประกอบด้วย H-chain และ L-chain เช่นเดียวกัน ซึ่ง H-chain มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 227 – 612 kDa สำหรับไหมพันธุ์พื้นบ้าน ส่วนเซรีซินจากไหมอีรี่ให้ H-chain ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก คือ 2,328 kDa ส่วน L-chain มีน้ำหนักโมเลกุลหลายค่าอยู่ในช่วง 0.05 – 30 kDa การรีดิวซ์เซรีซินไม่ทำให้ H-chain สั้นลง เนื่องจากยังคงปรากฏฟิสิกของ H-chain ที่ประมาณ 5 นาที่ อย่างไรก็ตาม การรีดิวซ์ทำให้เซรีซินกลายเป็นแฟรกชันของ L-chain ที่ยูนิฟอร์มมากขึ้น เนื่องจากจำนวนฟิสิกโครมาโทแกรมน้อยลง ซึ่ง L-chain มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.09 – 41 kDa

ผลจากงานวิจัย ทำให้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีการลดขนาดของโปรตีนไหมกลายเป็นโปรตีนแฟรกชันและการทำให้โปรตีนแฟรกชันยูนิฟอร์มมากขึ้นโดยการรีดิวซ์และการไฮโดรไลซ์เพื่อให้โปรตีนแฟรกชันมีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้เฉพาะด้าน เช่น ทางการแพทย์ อาหาร และเครื่องสำอาง

ส่วนเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิสสามารถแยกเซรีซินแฟรกชันจากการรีดิวซ์ออกเป็น H-chain และ L-chain ได้เช่นกัน แต่ให้น้ำหนักโมเลกุลต่างจากเทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโทกราฟี คือ H-chain อยู่ในช่วงประมาณ 41 – 70 kDa และ L-chain อยู่ในช่วง 16 – 19 kDa

ดิฟแฟรกโทแกรมจากเครื่อง XRD ปรากฏฟีกที่มีลักษณะไม่แหลม ไม่คม ทำให้ทราบว่าไฟโบรอินเป็น semi-crysaline polymer ที่มอร์โฟโลยีประกอบด้วยส่วนอะมอร์ฟัสและส่วนผลึก การนำเส้นไหมไฟโบรอินไปทดสอบความทนต่อแรงดึงพบว่า เส้นไหมไฟโบรอินมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่น ซึ่งแตกต่างจากเส้นใยสังเคราะห์อื่น นอกจากนี้ยังพบว่า เส้นไหมจากรังชั้นในมีความทนต่อแรงดึงจำเพาะสูงกว่าเส้นไหมจากเปลือกรัง

เอกสารอ้างอิง

- ชุติมา คงจัญญ. เอกสารประกอบการสอนวิชา คม 322 ชีวเคมี 2541, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.
- มณฑา จันทรเกตุเลียด. วิทยาศาสตร์สิ่งทอเบื้องต้น 2541. ห้างหุ้นส่วนจำกัด หอรัตนชัยการพิมพ์ กรุงเทพฯ.
- วิมลรัตน์ ศรีจิรัสสิน. เทคโนโลยีสิ่งทอเบื้องต้น พิมพ์ครั้งที่ 2. 2551. บริษัทกราฟแมนเพรส จำกัด กรุงเทพฯ.
- พรรณี ศรีบรรเทา. เทคนิคการเลี้ยงไหมสำหรับประเทศไทย 2530 คณะกรรมการส่งเสริมสินค้าไหมไทย กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กรุงเทพฯ.
- พัชรา วีระกะลัส. เอนไซม์ 2541 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.
- A. Datta, K. A. S. Ghosh and S. C. Kundu, Purification and characterization of fibroin from the tropical Saturniid silkworm, *Antheraea mylitta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31. (2001). 1013 - 1018.
- G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, , J. Richmond, D.L. Kaplan, (2003), Silk based materials, *Biomaterials* **24**, 401-416
- P. D. Bailey, *An Introduction to Peptide Chemistry*, John Wiley & Sons, NewYork (1990).
- O. Alexis, L. Matias, B.F. Jose, Comparative study of protein molecular by size exclusion chromatography and laser light scattering. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 25. 833-841.
- R. L. Horan, K. Antle, A. L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J. E. Moreau, V. Volloch, D. L. Kaplan, G. H. Altman (2005) *Biomaterials*, In vitro degradation of silk fibroin, **26**, 3385 – 3393.
- O. Hakimi, D. P. Knight, F. Vollrath, P. Vadgama, Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials, *Composites: Part B* 38 (2007) 324–337
- C. Woodheads, *Regenerated cellulosic fibres* Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, USA (2001).
- K. Mizoguchi, T. Iwatsubo, N. Aisaka, (1991), Japan Patent, 03-284337A.
- M. Yoshikawa, A. Murakami, Y. Okushita, (2001), Japan Patent, 2001-129371A.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ครั้งที่ 1 ในรูปแบบโปสเตอร์ วันที่ 23 – 24 สิงหาคม 2549 ณ โรงแรมตักศิลา จังหวัดมหาสารคาม

มีบทคัดย่อต่อไปนี้

การวิเคราะห์น้ำหนักของโปรตีนแฟรกชันในเส้นใยไหมไฟโบรอิน

อรุณี คงดี เอกวิทย์ ตรีเนตร และมยุรี สมบูรณ์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

ได้มีการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะด้านน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแฟรกชันของไหมไทยพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ พันธุ์สำโรง พันธุ์นางน้อย พันธุ์ดอกบัว และพันธุ์UB1 ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-polyacrylamide gel โดยการละลายเส้นใยไหมไฟโบรอินใน 9 โมลาร์ ลิเทียมโบรไมด์แล้วรีดิวซ์ด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ก่อนที่จะนำสารละลายไหมไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า 2-เมอร์แคปโตเอทานอลสามารถรีดิวซ์ไหมไฟโบรอินในส่วนของซิสเทอีนได้ และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า เส้นใยไหมไฟโบรอินทุกพันธุ์ประกอบด้วยโปรตีนแฟรกชัน 2 ส่วนที่มีขนาดแตกต่างกันเช่นกัน ซึ่งอาจจะเรียกว่าเป็นหน่วยย่อยขนาดหนัก (high chain) และหน่วยย่อยขนาดเบา (light chain) โดยที่พันธุ์นางน้อย พันธุ์ดอกบัว และพันธุ์UB1 มีหน่วยย่อยขนาดเบาเหมือนกัน คือหนัก 26 kDa แต่พันธุ์สำโรงมีหน่วยย่อยขนาดเบาหนัก 24 kDa และไหมทุกพันธุ์มีหน่วยย่อยขนาดหนักซึ่งหนักมากกว่า 75 kDa เช่นเดียวกัน

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ครั้งที่ 2 ในรูปแบบโปสเตอร์
งานประชุมวิชาการประจำปี สกว. นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 6
วันที่ 12 – 14 ตุลาคม 2549 ณ โรงแรมรีเจนท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

CHARACTERIZATION AND COMPOSITION ANALYSIS OF THAI SILK: MOLECULAR WEIGHT OF PROTEIN FRACTION OF FIBER

Arune Kongdee^{a*}, Ekawit Threeneta and Nanthaya Yanumet^b

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290 Thailand

^bPetroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, Bangkok, 50290 Thailand

ABSTRACT

Thai silk shares a small part of world textile market among Asian countries. In order to increase the market share, high quality and good properties of silk products must be produced in Thailand. As fiber structure affects fiber properties and later quality, this research is, thus, aimed to characterize fiber structure and analyze fiber composition. Relationship between fiber molecular structure and some properties such as strength and adsorption will be investigated. Molecular weight is a structural parameter that plays the role in fiber physical properties, molecular weight of silk fibers i.e. native silks; Dokbua, Nangnoi and Samrong, and hybrid; UB1) was characterized using sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After dissolving the fibers in lithium bromide, dialyzing silk protein solution against Milli-Q water and reducing with 2-mercaptoethanol, molecular weight of silk protein solution was subsequently analyzed by SDS-PAGE, two different chain length fractions were investigated in all samples. Short chain of 26 kDa composed in the fibers of all silk varieties, except Samrong which showed molecular weight of 24 kDa. Whereas long chain of molecular greater than 75 kDa was observed in all samples. The correlation between molecular weight and properties of silk fibers will be further studied.

INTRODUCTION



Microstructure of fiber plays the role in some properties such as strength, stiffness and adsorption. As molecular weight and sequence of amino acids comprising of silk fiber are parameters affecting tensile fracture. This investigation, thus, intensively studied on structure/property relationship of fibers from Thai silk, in order to improve properties and qualities of silk products.

EXPERIMENTAL



DEGUMMING

Silk fibers were cut into small pieces. Silk glue was removed from the fibers by boiling the fibers in mixed solution of sodium dodecylsulphate and sodium carbonate for 1 h, the fibers were dried in an oven. Silk fibers from UB1, Nangnoi, Dokbua and Samrong were used in the experiment.

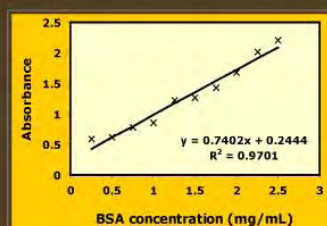


PREPARATION OF SOLUTION OF PROTEIN FRACTION

Silk fibers were dissolved in 9 M lithium bromide solution at room temperature for 24 h. Prior to analysis, the solution was dialyzed against Milli-Q water for 24 h in order to remove lithium bromide and subsequently reduced by 2-mercaptoethanol.

DETERMINATION OF PROTEIN CONCENTRATION OF SILK SOLUTION

Absorbance of protein solution from silk was spectrometrically determined at 750 nm according to Lowry method. Calibration curve for the determination of protein concentration was constructed by defined amount of albumin standard solution (BSA).



DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT OF PROTEIN FRACTION BY ELECTROPHORESIS TECHNIQUE



Molecular weights of protein fractions of silk solution were determined by SDS-PAGE at 150 Volt, 30 mA for 1-2 h. Graph of relationship between relative migration (R_f) of protein

standards and their log MW was constructed using protein marker of which molecular weight from 10 -250 kDa.

RESULTS AND DISCUSSION

SDS-PAGE of all samples show two separated bands (light and heavy chains). Lower bands show rather low diffusion whereas the upper bands are broad. An analyzed protein SDS-PAGE and relationship between R_f and log MW of protein standard are shown as below.

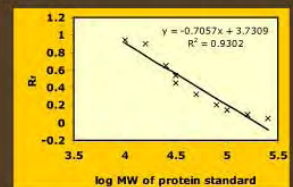
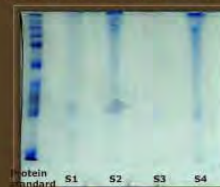


Table shows average and standard deviation of molecular weight of silk fibers under reducing condition.

Silk	Average molecular weight of protein fraction	Standard deviation
UB1	26,765	703
Nangnoi	26,765	703
Dokbua	26,765	703
Samrong	24,392	243

CONCLUSION

Two molecular chains called heavy and light chains combined to silk fibers. Molecular weights of light chain from UB1, Nangnoi, Dokbua and Samrong were 26 kDa, except Samrong that was 24 kDa. Heavy chains of greater than 75 kDa were investigated in all samples. As they show high diffusion of migration band, technique for the determination should be developed. The correlation between fiber molecular weight and fiber properties must be further studied.

REFERECE

Abnik Datta, Ananta K. Gholh, Subhas C. Kundu. 2001. Purification and characterization of fibroin from the tropical Saturniid silkworm, *Antheraea mylitta* *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31. 1013-1018.

ACKNOWLEDGEMENT

The author wish to thank the Thailand Research Fund for providing financial support.

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ครั้งที่ 3 ในรูปแบบบรรยาย
งานประชุมวิชาการประจำปี สกว. นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัย ครั้งที่ 7
วันที่ 11 – 13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี
ปรากฏบทคัดย่อ ดังต่อไปนี้

**Molecular weight determination of protein fractions of silks
by size exclusion chromatography**

Arune Kongdee^{a*}, Waraprapa Sriyotai^a, Nanthaya Yanumet^b

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290 Thailand

^bPetroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

Abstract— Molecular weight of protein fractions from native Thai silks (Sam-rong, Lueang-surin and Nang-lueang), a breeding silk (Dok-bua) and a wild silk (Eri), were determined using size exclusion chromatography as follows. Silk fibers were degummed in 0.3 % sodium dodecyl sulphate solution mixed 0.02 M sodium carbonate at 80 °C for 1 h, silk sericin powder was received by drying degummed solution. Silk fibers from the degumming process were dissolved in 9 M LiBr at 70 °C and subsequently reduced by 0.2 mg/ml 2-mercaptoethanol at 70 °C for 48 h, the protein fractions were purified using dialysis bag. Solutions of the reduced protein fractions of Dok-bua, Sam-rong, Lueang-surin were injected into size exclusion chromatography (SEC) equipped with RI detector at a flow rate of 1.0 ml/min using phosphate buffer as mobile phase, molecular weight (MW) of protein fraction were received using calibration curve of log MW of polyethylene glycol as a function of its retention. The results showed that there was no difference in retention time of protein fractions among different types of silk and there were many overlapped peaks. Hydrolysis silk fibers with α -chymotrypsin might be alternative method to distribute size of protein fraction of different silk types. Silk fibers of Dok-bua, Sam-rong, Lueang-surin and Nang-lueang and Eri, thus, were dissolved in 9 M LiBr and hydrolysed with 0.1 % α -chymotrypsin at 37 °C for 48 h. After dialysis, hydrolysed protein fractions were analysed by SEC, SEC chromatograms showed differences in number of protein fractions from type to type of silk. Chromatograms of protein fractions from Sam-rong, Lueang-surin and Nang-lueang were similar, but different from those of Dokua and Eri. Chromatograms of sericin from different types of silk are in similar manner as fibers. Interestingly, a technique to characterize molecular weight or size of polymers, like SEC, can be used to differentiate species of silk. Differences in molecular weight and number of protein fractions from different living organisms/cell might be recognized by this technique.

Keywords— silk fiber, sericin, size exclusion chromatography, molecular weight

* Corresponding author. Tel.; 0-5387-3544-5; Fax: 0-5387-8252; E-mail: arune.k@mju.ac.th

4. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ครั้งที่ 2 ในรูปแบบโปสเตอร์
การประชุมวิชาการหม่อนไหม ระดับชาติ ครั้งที่ 1 วันที่ 22-23 กันยายน 2551 ณ ภาควิชาชีวเคมี คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความแข็งแรงและความเหนียวของเส้นใยไหม พันธุ์ดอกบัวในดักกลางบางชนิด

อรุณี คงดี¹, ขนิษฐา สุวรรณ², นิตยา มุลมณี¹

¹ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ. เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย
จ.เชียงใหม่ 50290

วิธีการทดลอง

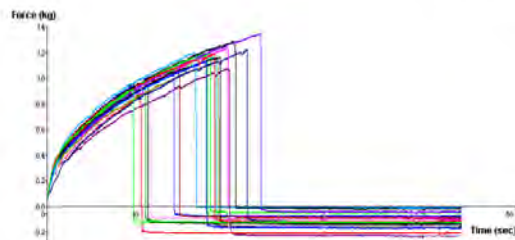
1. การหรีดไหมเส้นใยไหม

แขวนเช็ดของเส้นใยไหมพันธุ์ดอกบัวน้ำหนัก 0.5 g ด้วยด้ามไม้หนีบก้น
148 กริมในตัวหาละลายต่างๆ 8 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน อะ
ซิโตน ไดคลอโรมีเทน 1 %(w/v) แมกนีเซียมคลอไรด์ และ 1 %(w/v)
แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเอาด้ามไม้หนีบก้น
แล้วตากเส้นใยไหมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

- Distance เท่ากับ 40 mm
- ระยะห่างระหว่างหัวจับตัวอย่าง เท่ากับ 5 cm

3. การวัดความเหนียวของเส้นใยไหม

- 3.1 ชั่งน้ำหนักของเส้นใยไหมที่มีความยาว 100 cm เพื่อใช้ในการ
คำนวณหาความละเอียด ซึ่งใช้ในการคำนวณหาความเหนียวต่อไป
- 3.2 คำนวณค่าความเหนียวของเส้นใยไหมโดยนำค่าความทนต่อแรงดึงของ
เส้นใยหารด้วยค่าความละเอียด



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ดึงเส้นใยไหมที่แช่ในเอทานอลกับเวลา

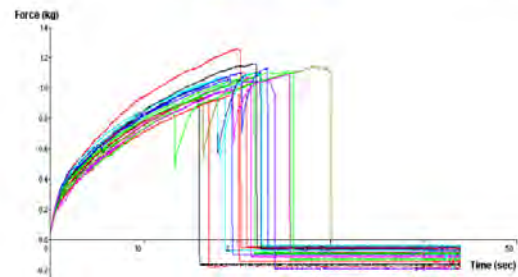
บทคัดย่อ

ความแข็งแรงของเส้นใยไหมขึ้นอยู่กับการจัดเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีน จน
กลายเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง ได้มีการศึกษาสมบัติทางกายภาพของเส้นใย
ประดิษฐ์จากไหมที่ได้จากการปั่นเส้นใยในตัวกลางต่างชนิดกัน พบว่ามีผลต่อ
โครงสร้างทางกายภาพและสมบัติทางเชิงกลของเส้นใยไหม งานวิจัยนี้จึงได้
ศึกษาถึงผลของชนิดตัวกลาง ที่มีต่อความแข็งแรงและความเหนียวของเส้นใย
ไหมพันธุ์ดอกบัวที่ผ่านการแช่ในตัวกลางมีขั้ว และไม่มีความขั้วที่อุณหภูมิ
ห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้วทำให้แห้ง จากผลการวิจัยพบว่า น้ำ เมทานอล เอทานอล
อะซิโตน และไดคลอโรมีเทน ทำให้ความแข็งแรงของเส้นใยไหมพันธุ์
ดอกบัวลดลง ในขณะที่เฮกเซน แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ทำ
ให้ความแข็งแรงของเส้นใยเพิ่มขึ้น ส่วนด้านความเหนียว เส้นใยไหมที่ผ่านการ
แช่น้ำ เฮกเซน แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ มีความเหนียวลดลง
ในขณะที่ผ่านการแช่ในเมทานอล เอทานอล อะซิโตน และไดคลอโรมีเทนมีความ
เหนียวเพิ่มขึ้น

2. การวัดค่าทนต่อแรงดึงของเส้นใยไหม

- 2.1 เตรียมเส้นใยไหมพันธุ์ดอกบัวให้ความยาวประมาณ 30 cm จำนวน 20
เส้น
- 2.2 นำเส้นใยไหมที่เตรียมไว้ไปวัดค่าทนต่อแรงดึง โดยใช้เครื่องทดสอบ
สมบัติเชิงกล (Texture analyzer) ที่สภาวะ
 - Test Mode คือ Tension
 - Test speed เท่ากับ 1.0 mm/sec
 - Target Mode คือ Distance

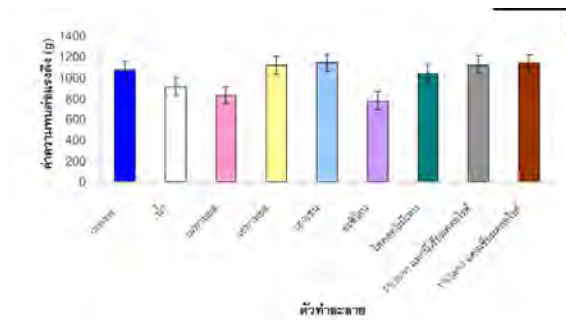
ผลการทดลอง



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้ดึงเส้นใยไหม (control) กับเวลา

ตารางแสดงค่าความทนต่อแรงดึงของเส้นใยไหมหลังจากแช่ในตัวกลาง
ต่างๆ

ตัวหาละลาย	น้ำหนักต่อความยาว 100 cm (g)	ความละเอียด (tex)	ค่าความทนต่อแรงดึง (g)	ความเหนียว (g/tex)
Control*	0.0285	28.5	1067.35 ± 69.19	37.45 ± 2.43
น้ำ	0.0253	25.3	916.56 ± 88.11	36.23 ± 3.48
เมทานอล	0.0205	20.5	831.71 ± 64.79	40.57 ± 3.16
เอทานอล	0.0294	29.4	118.73 ± 139.02	38.05 ± 4.73
เฮกเซน	0.0312	31.2	1144.91 ± 79.71	36.70 ± 2.55
อะซิโตน	0.0191	19.1	774.88 ± 121.14	40.57 ± 6.34
ไดคลอโรมีเทน	0.0264	26.4	1039.96 ± 63.33	39.39 ± 2.40
1 %(w/v)	0.0318	31.8	1121.75 ± 57.88	35.28 ± 1.82
แมกนีเซียมคลอไรด์	0.0327	32.7	1136.19 ± 61.97	34.75 ± 1.90
แคลเซียมคลอไรด์				



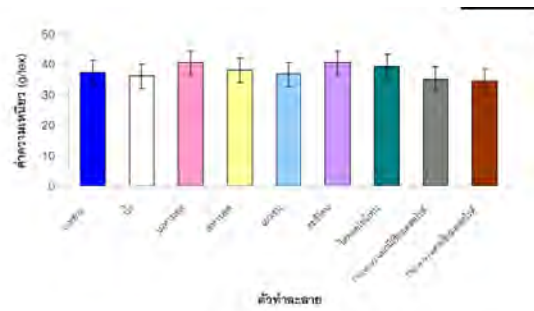
กราฟแสดงค่าความทนต่อแรงดึงของเส้นใยใหม่ที่แชในตัวทำละลายต่างๆ

9

สรุปผลการทดลอง

การแชเส้นใยใหม่พันชุดอกบัวในตัวทำละลายต่างๆ ในสภาวะที่มีแรงดึงอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางกายภาพของเส้นใยใหม่พันชุดอกบัว เนื่องจากความสามารถในการทนต่อแรงดึง และความเหนียวของเส้นใยใหม่เปลี่ยนไป เส้นใยใหม่ที่แชในเอทานอล เฮกเซน 1 %(w/v) แมกนีเซียมคลอไรด์ และ 1 %(w/v) แคลเซียมคลอไรด์ มีค่าความทนต่อแรงดึงเพิ่มขึ้น ส่วนเส้นใยใหม่ที่แชในน้ำ เมทานอล อะซิโตน และไดคลอโรมีเทน มีค่าความทนต่อแรงดึงลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยใหม่พันชุดอกบัวที่ยังไม่ได้แชในตัวทำละลาย

11



กราฟแสดงค่าความเหนียวเส้นใยใหม่ที่แชในตัวทำละลายต่างๆ

10

สำหรับความเหนียวนั้น เส้นใยใหม่ที่แชในเมทานอล อะซิโตน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล มีค่าความเหนียวเพิ่มขึ้น และเส้นใยใหม่ที่แชในเฮกเซน น้ำ 1 %(w/v) แมกนีเซียมคลอไรด์ และ 1 %(w/v) แคลเซียมคลอไรด์ มีค่าความเหนียวลดลง ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างทางกายภาพของไฟเบอร์อินเกิดการเปลี่ยนแปลง เมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่มีขั้วหรือไม่มีขั้วต่างกัน โมเลกุลของไฟเบอร์อินเกิดการบวมตัว (swell) ได้ในตัวทำละลายบางชนิด แล้วเกิดการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ได้เมื่อมีแรงดึง จึงมีผลให้ความแข็งแรงและความเหนียวเพิ่มมากขึ้น

12