



รายงานการวิจัย

การพัฒนารวมวิธีการผลิตฟิล์มจากไฟโบรอินเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์

(Method development of fibroin films for medical products)

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนากกรรมวิธีการผลิตฟิล์มจากไฟโบรอินเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์

(Method development of fibroin films for medical products)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาโนชญ์ สุธีรพัฒนานนท์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนารวมวิธีการผลิตฟิล์มจากไฟโบรอินเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์

(Method development of fibroin films for medical products)

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนารวมวิธีการผลิตฟิล์มจากไฟโบรอินเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์
(Method development of fibroin films for medical products)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาโนชญ์ สุนิวัฒน์นานนท์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgments)

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ 1, 3 และ 5 ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ อุปกรณ์และเครื่องมือทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 3 ที่ให้บริการอำนวยความสะดวก ช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี



บทที่

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูปภาพ	viii
1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	2
2. ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไหมคืออะไร	3
2.2 โครงสร้างทางกายภาพของเส้นใยไหม	5
2.3 เส้นใยไหมต่อปฏิกิริยาต่างๆ	6
2.4 ไฟโบรอิน	7
2.4.1 คุณสมบัติที่เป็นสาร antigenotoxic ของสารไฟโบรอิน	9
2.5 การใช้ประโยชน์จากไฟโบรอิน	11
2.5.1 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง	11
2.5.2 อุตสาหกรรมอาหาร	12
2.5.3 เยื่อเลือกผ่าน	12
2.5.4 วัสดุชีวภาพทางการแพทย์	13
2.6 การละลายไหม	15
2.6.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโบรอิน	15
2.6.2 การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน	16
2.7 ผิวหนัง	16
2.8 เซลล์ที่มีส่วนสำคัญในการสร้างเนื้อเยื่อ	18
2.8.1 เซลล์ไฟโบรบลาสต์และการสมานบาดแผล	20

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า	
2.9	ขนาดแผล	20
2.10	ตัวอย่างสาร Polymer ที่ใช้ในการผสมเป็นสารเชื่อมกับโปรตีนใหม่ ในการผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์	22
2.10.1	Polyvinyl alcohol (PVA)	22
2.10.2	Sodium alginate (AG)	25
2.10.3	Polyethylene oxide (PEO)	26
3.	วิธีการดำเนินงานวิจัย	27
3.1	การจัดหาตัวอย่างเส้นไหม	27
3.1.1	ตัวอย่างเส้นไหมในประเทศไทย	27
3.1.2	การเตรียมตัวอย่างไฟโบรอินเบื้องต้นและการวิเคราะห์ปริมาณเกลือ	27
3.2	การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มผสมพอลิเมอร์	28
3.3	การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	29
3.3.1	การวัดลักษณะ Mechanical testing	29
3.3.2	การตรวจวัดคุณสมบัติ Scanning Electron Microscope (SEM)	29
3.3.3	การตรวจวัดคุณสมบัติ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	30
3.4	การวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบทางสถิติ	33
3.5	การตรวจวัดประสิทธิภาพการเลี้ยงเซลล์ (Pre-cell culture test)	33
3.5.1	การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นฟิล์ม (Cell culture test)	34
3.5.2	วิธีการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์บนแผ่นฟิล์ม	35
3.5.3	การศึกษาเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิค MTT assay	37
3.5.4	การศึกษารูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม	37

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	38
4.1 การจัดหาตัวอย่างเส้นไหมขาว	38
4.2 ผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	40
4.2.1 การตรวจลักษณะแผ่นฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	41
4.2.2 ผลการตรวจวัดแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ด้วยวิธี FTIR spectroscopy	45
4.2.2.1. ผลค่า FTIR ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสม PVA	45
4.2.2.2. ผล FTIR ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสม PEO	48
4.2.2.3. ผล FTIR ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสม AG	49
4.2.3 ผลการวัดค่า Mechanical testing และเปรียบเทียบสูตรผสมของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสมโดยการคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS	50
4.2.4 การตรวจวัดประสิทธิภาพการเลี้ยงเซลล์ (Pre-cell culture test)	64
4.2.4.1 การศึกษาการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์บนแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิค MTT assay	65
4.2.4.2 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม	67
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	73
5.1 สรุปผลการทดลอง	73
5.2 ข้อเสนอแนะ	74
อ้างอิง	76
ภาคผนวก	83
ส่วนที่ 1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS	83
- ค่าทดสอบแรง Tensile	83
- ค่าทดสอบ % elongation	90
ส่วนที่ 2 ผลการเลี้ยงเซลล์ tissue culture plate (TCP)	96
ประวัติผู้วิจัย	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติและคุณประโยชน์ของกรดอะมิโนในโปรตีนไฟโบรอินที่มีต่อร่างกาย	9
2.2	ปริมาณสาร Polyvinyl alcohol ที่กำหนดให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร	24
3.1	แสดง Vibrational band assignments for the amide I region of silk fibroin	31
3.2	ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ของโปรตีนไฟโบรอิน	31
3.3	ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ของโปรตีนไฟโบรอิน	32
3.4	ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ของโปรตีนไฟโบรอิน	32
3.5	ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ของโปรตีนไฟโบรอิน	32
4.1	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ PEO ผสม Fibroin	51
4.2	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ AG ผสม Fibroin	53
4.3	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ PVA ผสม Fibroin	55
4.4	เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ PEO ผสม Fibroin	57
4.5	เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ AG ผสม Fibroin	58
4.6	เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ PVA ผสม Fibroin	60
4.7	สรุปผลการวิเคราะห์ค่า Tensile strength ทั้งสามพอลิเมอร์ในสูตรแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม (PEO, AG, PVA)	61
4.8	สรุปผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด (PEO, AG, PVA)	63
4.9	แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่บน substrates แต่ละชนิดที่ระยะเวลาต่างๆ	69-72
ภาคผนวก		
1A	การเจริญเติบโตของเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (TCP)	96
2A	การเจริญของเซลล์บนแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน/Polyethylene oxide (90:10)	97
3A	การเจริญของเซลล์บนแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน/Polyethylene oxide (85:15)	98
4A	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ตั้งต้นของการเลี้ยงเซลล์บน TCP และแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO	99
5A	การเจริญเติบโตของเซลล์ในงานอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (TCP)	100
6A	การเจริญเติบโตของเซลล์บนแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน/Polyethylene oxide (90:10)	100
7A	การเจริญเติบโตของเซลล์บนแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน/Polyethylene oxide (85:15)	101

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	เส้นใยธรรมชาติและเส้นใยสังเคราะห์	5
2.2	โครงสร้างพันธะของกรดอะมิโนของไฟโบรอินแบบ beta-pleated sheet	7
2.3	โครงสร้างลักษณะของ การจับกันของกรดอะมิโนในไฟโบรอิน ยึดเกาะกันด้วยแรง dipole และ พันธะไฮโดรเจน	8
2.4	Glycine structure	10
2.5	Alanine structure	10
2.6	Serine structure	10
2.7	ชั้นผิวหนังมนุษย์	17
2.8	ตัวอย่างรูปเซลล์ไฟโบรบลาสต์และองค์ประกอบภายในเซลล์	19
2.9	ตัวอย่างภาพถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์	19
2.10	ลักษณะแผลฟกช้ำที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับการกระทบ	21
2.11	สูตรโครงสร้างของ Sodium Alginate	25
3.1	แสดงตัวอย่างในการทดสอบ pre-cell culture โดยดูลักษณะการเปื่อยยุ่ยของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ต่างๆ	34
3.2	แสดงรูปถ่ายของแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรที่ตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร	36
3.3	แสดงรูปถ่ายของแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรที่ผ่านการแช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 30 นาทีและล้างด้วย sterile water 2 ครั้งและถูกนำมาวางไว้ในหลุมของ 24 well plate เพื่อที่จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป	36
4.1	เส้นไหมขาวที่ใช้ในการทำงานทดลอง	38
4.2	สารละลายไหม	38
4.3	ผงโปรตีนไฟโบรอิน	39
4.4	ตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์	39
4.5	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน SEM ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินและแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C (a) FB 100: PVA 0, (b) FB 70: PVA 30, (c) FB 50: PVA 50, (d) FB 30: PVA 70, (e) FB 0: PVA 100	40
4.6	ภาพถ่าย SEM (a) ภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์ม polyvinyl alcohol (PVA) เข้มข้น 1.5% (b) ภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินเข้มข้น 1.5%	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.7	ภาพถ่าย SEM ของแผ่นฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินกับ Polyvinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน (a) อัตราส่วน PVA 30: FB 70 (b) อัตราส่วน PVA 50: FB 50 (c) อัตราส่วน PVA 70: FB 30	42
4.8	แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Sodium alginate (AG) อัตราส่วน (a) AG 100: FB 0 (b) AG 30: FB 70 (c) AG 50 : FB 50 (d) AG70 : FB 30	43
4.9	แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Poly (ethylene) oxide อัตราส่วน (a) PEO 100: FB 0 (b) PEO 30: FB 70 (c) PEO 50: FB 50 (d) PEO 70: FB 30	44
4.10	เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40 °C (FB 05-03-10, 29-03-10) และอุณหภูมิห้อง (FB 05-03-10)	46
4.11	เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40 °C ซ้ำมึน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ PVA เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง	47
4.12	เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40 °C ซ้ำมึน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ PEO เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง	48
4.13	เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม (Sodium alginate) AG ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40 °C ซ้ำมึน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ AG เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง	50
4.14	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Polyethylene oxide (PEO) ตามอัตราส่วน PEO:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	51
4.15	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Sodium Alginate (AG) ตามอัตราส่วน AG:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	52
4.16	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Polyvinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน PVA:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.17	เปรียบเทียบค่า % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Polyethylene oxide (PEO) ตามอัตราส่วน PEO:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	56
4.18	เปรียบเทียบค่า % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Sodium alginate (AG) ตามอัตราส่วน AG:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	58
4.19	เปรียบเทียบค่า % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Polyvinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน PVA:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	59
4.20	แสดง formazan crystal ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ reduction ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บน substrate ชนิดต่างๆ	65
4.21	แสดงสารละลายสีม่วงที่เกิดขึ้นภายหลังจากเติม DMSO ลงไปละลาย formazan crystal ที่เกิดจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน	66
4.22	กราฟแท่งแสดงเซลล์มีชีวิตที่เกาะอยู่บน TCP, FB/PEO (90:10) และ FB/PEO (85:15) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2, 8 ชั่วโมง 1, 3, 5 และ 7 วัน โดยที่เซลล์ที่เกาะอยู่บน TCP ที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังจากการ seeding ได้ถูกใช้เป็นค่า reference เพื่อคำนวณหา %เซลล์ที่มีชีวิตที่ยึดเกาะอยู่บนแผ่นฟิล์ม FB/PEO ที่ระยะเวลาต่างๆ	67



บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญ

ไหมเป็นวัตถุดิบที่ผลิตขึ้นในประเทศ โดยเฉพาะในแถบตะวันออกเฉียงเหนือหรืออีสาน การผลิตจะเน้นการทำเป็นงานอดิเรกเสริมรายได้ของเกษตรกรหลังฤดูการเก็บเกี่ยว ทำให้มีผลผลิตไม่ต่อเนื่อง อีกประการหนึ่งคือ ราคาของรังไหมดิบและเส้นไหมดิบค่อนข้างเคลื่อนไหวมาก แต่ส่วนใหญ่ราคาต่ำ จึงไม่จูงใจให้เกษตรกรสนใจที่จะผลิตเส้นไหมเป็นอาชีพหลัก และการใช้เส้นไหมยังคงจำกัด แต่เฉพาะอุตสาหกรรมการทอผ้า ซึ่งในปัจจุบันการวิจัยคุณสมบัติของไหมได้แพร่หลายออกไปอย่างกว้างขวาง ทำให้เกิดประดิษฐ์กรรมจากไหมเกิดขึ้นอยู่เสมอมา และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นที่ทำให้เส้นไหมมีมูลค่าที่สูงขึ้น มีความต้องการในตลาดที่มากขึ้น เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหาร และเวชภัณฑ์ เส้นไหมได้ถูกแปรรูปไปเป็นผงไหม ไหมละลาย และแผ่นฟิล์ม ซึ่งอาจอยู่ในรูปไหม 100% หรือผสมกับสารอื่นเพื่อให้เกิดคุณสมบัติตามต้องการได้ แล้วแต่ ลักษณะของการนำไปใช้งานวิจัยด้านการใช้ประโยชน์จากไหมในอุตสาหกรรมอื่นนอกเหนือจากอุตสาหกรรมเสื้อผ้ายังอยู่ในวงจำกัด เป็นผลให้ผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับธุรกิจไหมหันไปสนใจประกอบอาชีพอื่นที่ให้รายได้ที่สูงกว่า แต่ในต่างประเทศได้มีการวิจัยและจดสิทธิบัตรผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับไหมอยู่ตลอดเวลา ซึ่งเป็นที่ได้รับความสนใจอย่างมาก ถึงประโยชน์ที่ได้รับจากไหม ดังนั้นการวิจัยเพื่อพัฒนาไหมสำหรับอุตสาหกรรมอื่น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะช่วยสร้างศักยภาพในการแข่งขันทางด้านตลาดสินค้าไหมของไทย และช่วยให้ไทยรอดพ้นจากการเป็นเกษตรกรผู้ผลิตไหมเพื่อส่งโรงงานในต่างประเทศ และนำผลิตภัณฑ์ไหมที่แปรรูปแล้วเข้ามาในราคาที่สูงมาก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อพัฒนากรรมวิธีการผลิตฟิล์มจากไฟโบรอินแบบใหม่ สำหรับใช้เป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์
- 1.2.2 เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางด้านเคมีฟิสิกส์และกายภาพของฟิล์มที่ผลิตได้จากไฟโบรอิน
- 1.2.3 เพื่อนำไปศึกษาเพิ่มเติมในการทดสอบกับเซลล์สิ่งมีชีวิต และอาจเป็นประโยชน์ในการรักษาบาดแผลต่อไปในอนาคต

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จะเน้นการค้นหาคำอธิบายวิธีการผลิตแผ่นฟิล์มจากเส้นไหมหรือไฟโบรอินแบบใหม่ให้ได้ ใช้เส้นไหมที่มีอยู่ในประเทศไทยแล้วนำมาทดลองสกัดสารไฟโบรอิน และการผลิตฟิล์มโดยจะอาศัยการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลจากงานวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว รวมทั้ง สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับไหมที่ย่นจดไว้ในต่างประเทศ หลังจากนั้น นำมาหาคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี และเชิงหน้าที่ และจะศึกษาเพิ่มเติม โดยทดสอบกับเซลล์สิ่งมีชีวิต เพื่อที่จะนำไปพัฒนาในระดับสูงสำหรับอุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- 1.4.1 หาวิธีสกัดสารไฟโบรอินจากเส้นไหมขาวโดยใช้วิธีทำลายเส้นไหมที่เหมาะสมและทำบริสุทธิ์ไฟโบรอินด้วยวิธี Dialysis
- 1.4.2 เป็นพื้นฐานในการประดิษฐ์แผ่นฟิล์มปิดแผล เพื่อนำไปใช้ประโยชน์และพัฒนาในอนาคตต่อไป
- 1.4.3 เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ทำธุรกิจเกี่ยวกับไหม ศูนย์วิจัยเกี่ยวกับหม่อนไหม และเกษตรกรผู้เลี้ยงไหม



บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไหม คืออะไร

กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ให้นิยามคำว่า ”ไหม” ดังนี้

ไหม คือ เส้นใยที่พ่นออกมาจากปากของตัวหนอนไหมที่โตเต็มวัย เพื่อมาห่อหุ้มตัว ป้องกันศัตรูทางธรรมชาติในขณะที่หนอนไหมลอกคราบจากหนอนไหมเป็นตัวดักแด้ และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ หนอนไหมเป็นแมลงชนิดหนึ่งซึ่งมีการเจริญเติบโตจากไข่ไหม (ขนาดเท่าเมล็ดงา) และเป็นตัวหนอนไหม ในขณะที่เป็นตัวหนอนไหมจะเจริญเติบโตโดยการลอกคราบประมาณ 3-4 ครั้งในระยะเวลาประมาณ 20-22 วัน และจะมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 10,000 เท่า โดยการกินอาหารเพียงอย่างเดียว คือใบหม่อน และเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จะหยุดกินอาหาร แล้วพ่นเส้นใยออกมาห่อหุ้มตัวเอง ที่เราเรียกว่ารังไหม ซึ่งมีลักษณะกลมรีคล้ายเมล็ดถั่ว และหากเรานำรังไหมมาต้มในน้ำที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 80°C ขึ้นไป จะสามารถทำให้กากไหม (sericin) อ่อนตัวและดึงออกมาเป็นเส้นยาวได้ ความยาวของเส้นใยจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และการดูแลในช่วงที่เป็นหนอนไหม

สายพันธุ์ไหมในโลกนี้มีการแบ่งตามมาตรฐานของนักวิทยาศาสตร์ได้หลายอย่าง เช่น แบ่งตามจำนวนครั้งในการลอกคราบของหนอนไหม แบ่งตามสีของรังไหม แบ่งตามรูปร่างของรังไหม แบ่งตามถิ่นกำเนิด และแบ่งตามจำนวนครั้งในการฟักของไข่ไหมใน 1 ปี การแบ่งตามจำนวนครั้งในการฟักไข่ใน 1 ปี อาจจะมี 1 ครั้งหรือหลายครั้งซึ่งลักษณะของสายพันธุ์ที่มีการฟักของไข่ไหมที่ต่างกัน ก็บ่งบอกถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันไปด้วย รวมทั้งผลจากสภาพแวดล้อมก็จะแตกต่างกันไปด้วยตามสายพันธุ์ ในปัจจุบันสามารถใช้เทคโนโลยีเข้ามาช่วยในการฟักของไข่ไหมสายพันธุ์ที่ฟักปีละ 1 ครั้ง เราสามารถฟักได้หลายครั้งขึ้นตามความต้องการ แต่ประเด็นของการแบ่งในลักษณะนี้ คือ พันธุกรรมที่อยู่ในแต่ละสายพันธุ์ที่ไม่เหมือนกัน คือ (คลังปัญญาไทย, การเลี้ยงไหม, 2549)

1. Monovoltine (ฟักปีละ 1 ครั้ง) เป็นพันธุ์ที่อยู่ในแถบอากาศหนาว เช่น ประเทศในแถบยุโรป หนอนไหมจะมีอายุยาวกว่าสายพันธุ์อื่น หนอนไหมมีขนาดตัวใหญ่ให้เส้นไหมมีคุณภาพดีแต่หนอนไหมไม่แข็งแรง โดยเฉพาะในสภาพอากาศร้อนขึ้นความยาวเส้นไหมต่อรังประมาณ 1,200-1,500 เมตร

2. Bivoltine (ฟักปีละ 2 ครั้ง) เป็นพันธุ์ที่อยู่ในแถบอากาศอบอุ่นเช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี หนอนไหมมีอายุสั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ Monovoltine หนอนไหมแข็งแรง แต่เส้นไหมมีคุณภาพด้อย

กว่า Monovoltine ดังนั้นจึงนิยมนำมาผสมกับ Monovoltine เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ ที่มีคุณภาพเส้นไหมที่ดีขึ้น รังไหมมีสีขาว เหมาะสำหรับเลี้ยงในประเทศเขตอบอุ่น และนิยมเลี้ยงในฤดูร้อนของประเทศในเขตอบอุ่น ความยาวเส้นไหมต่อรังประมาณ 1,000 -1,200 เมตร

3. Polyvoltine (ฟักปีละหลายครั้ง) เป็นพันธุ์ใหม่ที่อยู่ในแถบอากาศร้อนชื้นเช่น ไทย ลาว หนองไหมมีอายุสั้นกว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ข้างต้น และมีความแข็งแรงมาก รังมีขนาดเล็ก รังไหมมีทั้งสีขาวและสีเหลือง สามารถสาวเป็นเส้นไหมได้ปริมาณน้อย แต่เส้นไหมมีความมันเงาสูง แต่จะมีปมปมมาก และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถ Hiberate (จำศีล) ได้เหมือน 2 สายพันธุ์ข้างต้น ดังนั้นไขไหมจึงไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้ ต้องใช้ไขไหมต่อเนื่องทั้งปี ความยาวเส้นไหมต่อรังประมาณ 200-400 เมตร

ดังนั้นสายพันธุ์ใหม่ที่ใช้ในอุตสาหกรรมปัจจุบัน จึงมีการนำสายพันธุ์ต่างๆ มาผสมกัน เพื่อให้ได้ลูกผสมที่ตรงตามความต้องการ และลูกผสมที่ได้รับความนิยมในการพัฒนาสายพันธุ์คือ ลูกผสมของพันธุ์จีนกับพันธุ์ญี่ปุ่น ซึ่งอาจจะเป็น Bivoltine อย่างเดียวกัน หรือมีการผสมโดยเลือดของ Monovoltine เข้าไปบ้างเพื่อให้รังไหมมีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นไหมมีความยาวมากขึ้น และคู่ที่ผสมที่นำจับตามองอีกคู่หนึ่งก็คือ การนำสายพันธุ์ Polyvoltine ไปผสมกับสายพันธุ์ Bivoltine จนสามารถได้ลูกผสมที่มีความยาวเส้นไหมต่อรังที่ 900-1,200 เมตร รังมีขนาดใหญ่หนองไหมแข็งแรง สามารถเลี้ยงได้ในสภาพอากาศร้อนชื้น รังไหมที่ได้อาจมีทั้งสีขาวหรือสีเหลือง แล้วแต่ความต้องการในการพัฒนา และที่สำคัญ เส้นไหมที่ได้จะมีความมันเงาสูง เส้นเรียบสม่ำเสมอ เมื่อเทียบกับเส้นไหมจากพันธุ์ลูกผสมอื่นๆ จึงน่าจะเป็นอนาคตของอุตสาหกรรมไทย ที่จะหันมาพัฒนาสายพันธุ์และส่งเสริมการใช้เส้นไหม ที่เป็นทั้งพันธุ์ไทยพื้นเมือง ที่มีเอกลักษณ์ดั้งเดิมของไทย และการส่งเสริมการใช้เส้นไหมที่มีการพัฒนาจากพันธุ์ไทยที่เป็นลูกผสมที่จะสามารถนำมาทำเป็นสินค้าได้หลากหลาย สามารถใช้เป็นเส้นยืนได้ ทำให้สร้างความแตกต่างให้กับสินค้าไหมไทยได้อีกด้วย

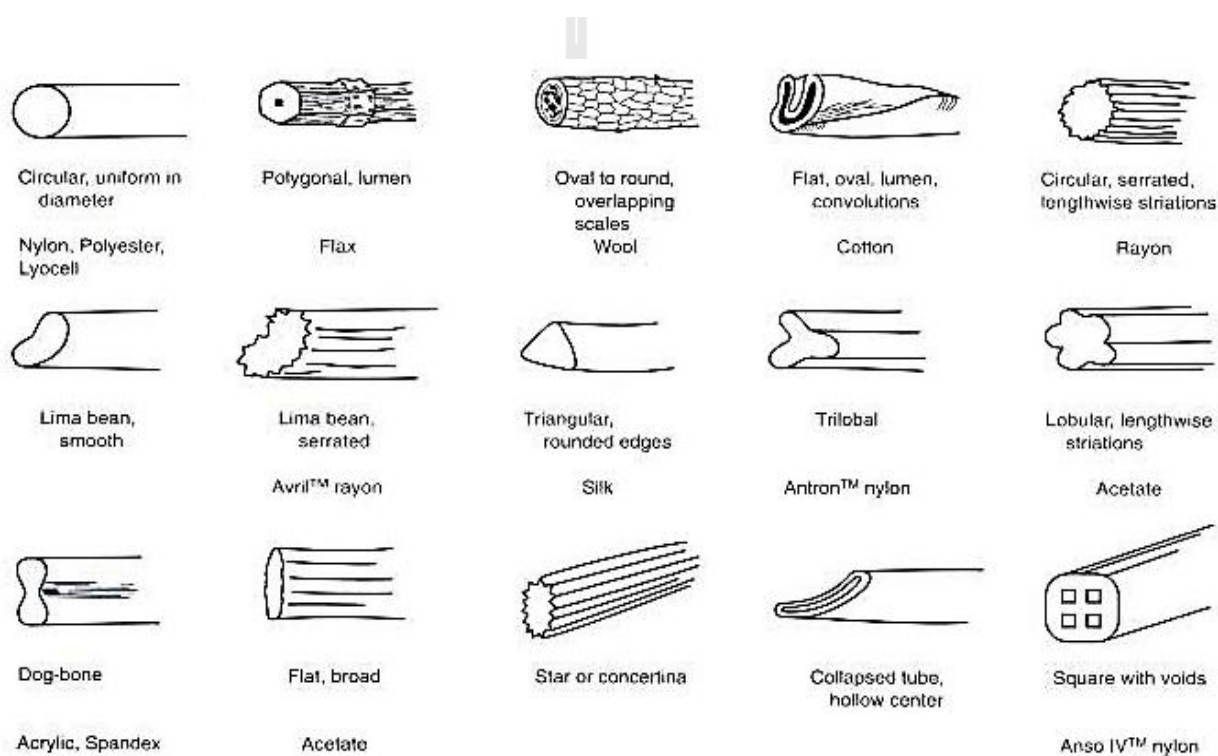
พันธุ์ไทยพื้นบ้าน เป็นพันธุ์ไหมดั้งเดิมของไทยที่มีการอนุรักษ์สืบทอดกันมา รวมทั้งพันธุ์ใหม่ที่มีการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติดีขึ้น โดยมีการพัฒนาพันธุ์ในประเทศไทยที่ใช้เฉพาะพันธุ์ไหมไทยดั้งเดิมเป็นเชื้อพันธุ์เท่านั้น (สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติฯ, 2549) คุณลักษณะรังไหมมีสีเหลืองรูปร่างคล้ายกระสวย ให้เส้นใยยาวประมาณ 250 – 350 เมตรต่อรัง ได้แก่ พันธุ์นางเหลือง, พันธุ์นางลาย, พันธุ์ตำโรง, พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 และ พันธุ์ตำโรง x นางน้อย ศรีสะเกษ 1 เป็นต้น

พันธุ์ไทยปรับปรุงเป็นพันธุ์ไหมพันธุ์ใหม่พันธุ์ใหม่ที่พัฒนาหรือปรับปรุงขึ้นในประเทศไทย โดยมีเชื้อพันธุ์ทั้งหมด หรือบางส่วนมาจากพันธุ์ไหมที่มีใช้พันธุ์ไทยพื้นบ้าน (สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติฯ, 2549)

พันธุ์ต่างประเทศเป็นพันธุ์ไหมที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ส่วนใหญ่นำเข้ามาจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

2.2 โครงสร้างทางกายภาพของเส้นใยไหม

เส้นไหม เป็นเส้นใยที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว คือมีลักษณะเป็นเส้นยาว ซึ่งต่างจากเส้นใยธรรมชาติชนิดอื่นที่มีลักษณะเส้นใยสั้น องค์ประกอบของเส้นไหม จะประกอบไปด้วยโปรตีนไฟโบรอิน (72-81%) และโปรตีนกาวไหมที่อยู่บริเวณรอบนอก ที่เรียกว่า ชิรีซิน (19-28%) (Lee et al., 1999) ซึ่งความแตกต่างของเส้นใยไหมกับเส้นใยอื่นๆสามารถสังเกตได้จากภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 เส้นใยธรรมชาติและเส้นใยสังเคราะห์

ที่มา: <http://sciencekws.igetweb.com>

นอกจากนี้ในเส้นไหมจะมีไขมัน และน้ำมันอยู่ประมาณ 0.5-1% และสารสีธรรมชาติประมาณ 1-1.4% ปริมาณของกาวไหมจะขึ้นกับพันธุ์ไหม (สิริรัตน์ จารุจินดา, 2548) ส่วนชนิดเส้นใยไหมที่ยังไม่ผ่านการเอากาวไหมออก จะมีผิวหยาบ ขรุขระ รูปร่างด้านหน้าตัดขวางจะเป็นรูปสามเหลี่ยมมุมมน ความยาวโดยวัดจากการสาวไหมหนึ่งรัง จะยาวประมาณ 1,000-1,300 หลา และบางเส้นอาจยาวถึง 3,000 หลา

มีความกว้าง หรือเส้นผ่านศูนย์กลางโดยประมาณ 9-11 ไมครอน เส้นใยเรียบเสมอกันดี มีความมันตามธรรมชาติ ซึ่งอาจมีสีขาวหรือสีครีม หรือสีเหลือง และกรณีพันธุ์ไหมผสม จะมีความยาวเส้นไหมต่อรัง 900 – 1,200 เมตร (จุลไหมไทย, 2548) ยกเว้นเส้นไหมป่าจะมีเส้นใยไม่เรียบ มีสีน้ำตาลและมีความมันน้อย (ศรีนวล แก้วแพรง, 2532) ความเหนียวของเส้นใยไหมเมื่อแห้งจะมีความเหนียว 2.4 – 5.1 กรัมต่อเดนิเยร์ เมื่อเส้นไหมเปียกจะมีความเหนียวลดลง 15- 20% การยืดหยุ่นและการยืดได้ของเส้นไหม จะยืดหยุ่นได้ดี และสามารถยืดได้มากเมื่อเส้นไหมเปียก ประมาณ 33 – 35% เมื่อดึงเส้นไหมออก 2% จะหดกลับเข้าที่เดิมเพียง 92% การดูดความชื้น เส้นใยไหม สามารถดูดความชื้นได้ที่สภาวะมาตรฐาน 11% และเมื่อมีอากาศชื้นมากจะสามารถดูดความชื้นได้มากถึง 25-35% คุณสมบัตินี้ทำให้เส้นไหมสามารถดูดซับกลิ่นได้ง่าย แต่มีข้อเสีย คือ เส้นไหมสามารถดูดซึมของเหลวที่ไม่บริสุทธิ์ได้ เช่น สารจำพวกเกลือของโลหะ ซึ่งเป็นสารที่ทำลายเส้นใยไหม ทำให้เส้นใยไหมแยกตัวและลดความแข็งแรงของเส้นไหมลงได้ (ศรีนวล แก้วแพรง, 2532)

2.3 เส้นใยไหมต่อปฏิกิริยาต่าง ๆ

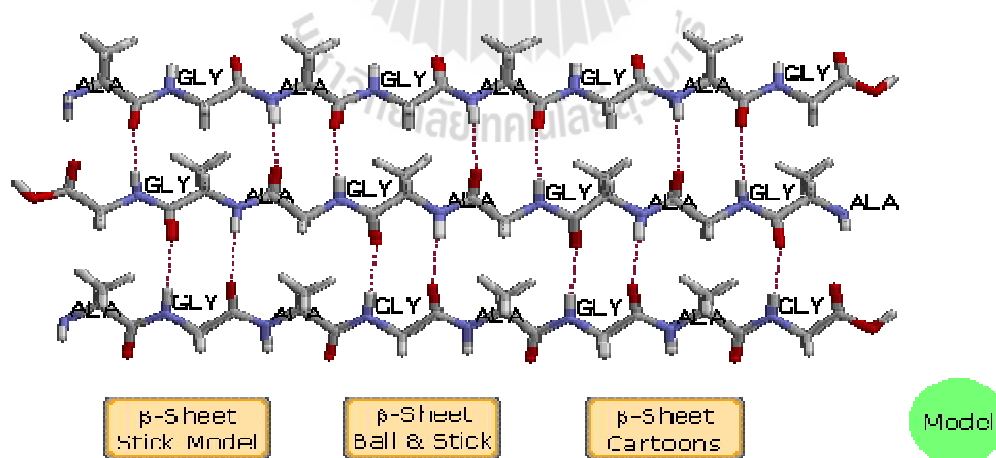
ปฏิกิริยาต่อกรด – เส้นไหมไม่ทนต่อกรดโลหะเข้มข้น จะทำให้ไหมเสื่อมคุณภาพ ส่วนกรดเกลือเข้มข้น จะทำให้เส้นไหมละลายเพราะ โครงสร้างโมเลกุลของเส้นไหมจะดูดเอากรดเข้าไปอย่างรวดเร็ว และกรดจะเกาะจับกันแน่น กรดจะไปทำลายโปรตีนไฟโบรอิน แต่กรดอินทรีย์จะไม่ไปทำอันตรายต่อเส้นไหมซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในการตกแต่งผ้าไหม (จุลไหมไทย, 2548)

ปฏิกิริยาต่อด่าง – ไหมไม่ทนต่อด่างแก่ อย่างเช่น สบู่บอแรกซ์และแอมโมเนีย ถ้าไหมสัมผัสกับด่างไม่มาก หรือนานจนเกินไปจะไม่เป็นอันตรายจากโครงสร้างของโมเลกุลของเส้นไหมที่ยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิก และ แรงแวนเดอวาลส์ เท่านั้น จึงทำให้เส้นไหมเกิดการไฮโดรไลซ์ได้ด้วยด่าง และถ้าปล่อยให้เส้นไหมอยู่ในสารละลายด่างเป็นเวลานาน ๆ ก็จะมีผลทำให้พันธะเปปไทด์ของเส้นไหมเกิดการไฮโดรไลซ์และเส้นไหมก็จะถูกทำลายในที่สุด ความแข็งแรงและความเงามันก็จะลดลง ส่วนการลบรอยเปื้อนของผ้าไหมสามารถใช้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (สิริรัตน์ จารุจินดา, 2548)

การทนต่อแสงแดด – แสงแดดอาจมีผลทำให้ผ้าไหมเปื่อยขาดเร็วขึ้นได้ และเส้นใยไหมเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ไม่ดีนัก จึงสะสมประจุไฟฟ้าสถิตได้ ออกซิเจนในอากาศทำให้ไหมแยกตัวและลดความเหนียวลงได้ ดังนั้นจึงควรเก็บผ้าไหมไว้ในที่มิดชิด หรือใส่ถุงพลาสติกชนิดอย่างดี ใยไหมนำความร้อนได้ช้ากว่าใยเซลลูโลส เมื่อเวลาสวมใส่ผ้าไหมจะให้ความอบอุ่นดีกว่าในเซลลูโลส (ศรีนวล แก้วแพรง, 2532)

2.4 ไฟโบรอิน

สารไฟโบรอิน เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเส้นไหม โดยมีขนาดโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ของกรดอะมิโนประมาณ 15 ชนิด ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 3 สาย คือ H-chain มีขนาดโมเลกุลประมาณ 350 kDa L-chain มีขนาดโมเลกุลประมาณ 25 kDa และ P25 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 30 kDa L-chain จะเชื่อมกับ H-chain ด้วยการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ ส่วน P25 จะเชื่อมกับ H-L complex ด้วยแรง hydrophobic interaction (Tanaka et al.,1999) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ของโปรตีนไฟโบรอินประกอบด้วยกรดอะมิโนคือ ไกลซีน (Glycine) อะลานีน (Alanine) เซอรีน (Serine) และไทโรซีน (Tyrosine) ซึ่งเรียงต่อกัน เป็นสายยาว G-Arg-G-T...G-A-G-A-G-S-G-A-G-A-G-A.....G-T-Arg-G. มีปริมาณไนโตรเจน (N) 17-19% จึงทำให้เส้นไหมแตกต่างจากเส้นใยขนสัตว์ที่เป็นเส้นใยโปรตีนเหมือนกัน (สิริรัตน์ จารุจินดา, 2548) โครงสร้างโปรตีนไฟโบรอินส่วนใหญ่ร้อยละ 60-80 เป็นส่วนของผลึกหรือ Crystalline จึงทำให้ไฟโบรอินไม่ละลายน้ำ หรือคิดเป็น 62% ของ amino acid residue เป็นส่วนของโครงร่างผลึก และส่วนที่ถูกกระจายตัวเป็นโครงร่างที่ไม่เป็นระเบียบ (Non crystalline) มี 40% หลังจากที่แยกส่วนประกอบของไฟโบรอินเป็น large subunit และ small subunit ซึ่งส่วนที่เป็นเปอร์เซ็นต์ของโครงร่างผลึกใน large subunit เป็น 55:45 (ratio of amino acid residue) ในส่วนที่เป็น Non crystalline จะมีองค์ประกอบที่ซับซ้อนกว่า ของ amino acid รวมทั้ง acidic amino acid และ basic amino acid ซึ่งมีส่วนของ glycine, alanine และ serine (Hojo, 2000)

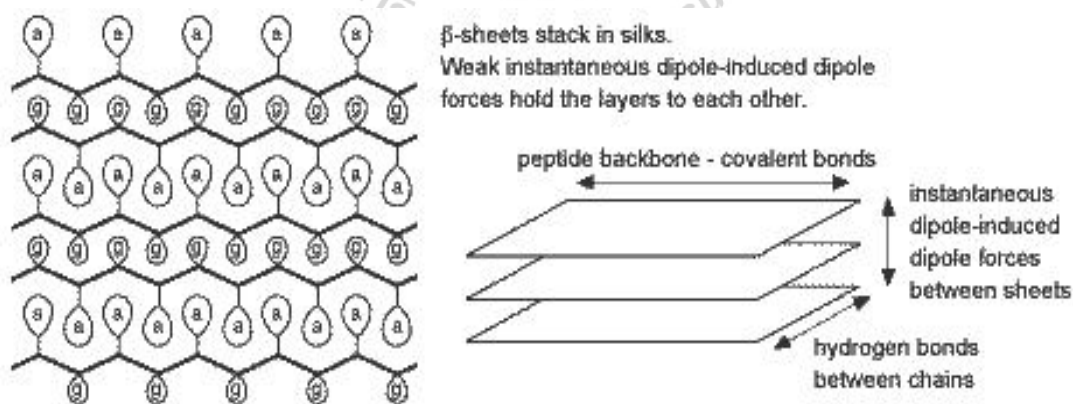


ภาพที่ 2.2 โครงสร้างพันธะของกรดอะมิโนของไฟโบรอิน แบบ beta-pleated sheet

ที่มา : Natural product chemistry, e-book of Michigan state university department of chemistry,

<http://www.cem.msu.edu>.

ไฟโบรอิน เป็นโปรตีนที่พบในเส้นใยไหม ซึ่งไฟโบรอินเกิดจากต่อมผลิตเส้นใยไหม เมื่ออยู่ในต่อม โปรตีนจะอยู่ในรูปของสารละลาย และเมื่อผลิตออกมาจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ และมีการเรียงตัวกันแบบอสัณฐาน (amorphous structure) และมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นกาวให้โครงสร้างนั้นคงรูปได้ เรียกว่า ซีริซิน (sericin) และสามารถเอาซีริซินออกได้ด้วยการต้มกับน้ำสบู่ที่มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนได้ จะเหลือเพียง ไฟโบรอินซึ่ง มี polypeptides หลายเส้นเป็นองค์ประกอบ แต่ละเส้นมีการจัดเรียงตัวให้มีโครงสร้างเป็นแบบ β -sheet มีกรดอะมิโนขนาดเล็กจำพวกไกลซีนและอะลานีน ซึ่งในโปรตีนไฟโบรอินมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนซ้ำ ๆ กัน คือ (-gly-ser-gly-ala-gly-ala) $_n$ แต่ละตัวมีการเรียงตัวกันอยู่แบบไม่ขนาน (antiparallele) โดยหันหมู่แทนที่ของอะลานีนเข้าหากัน ในขณะที่เดียวกันก็หันหมู่แทนที่ของไกลซีนเข้าหากัน ทำให้ความห่างของ β -stand เป็น 3.5 \AA เมื่อหมู่แทนที่ไกลซีนหันหน้าเข้าหากัน และเป็น 5.7 \AA เมื่อหมู่แทนที่อะลานีนหันหน้าเข้าหากัน โดยระหว่าง β -stand เชื่อมกันอยู่ด้วยพันธะไฮโดรเจน โครงสร้างแบบนี้เป็นโครงสร้างที่มีความยืดหยุ่นได้น้อย ต่างจากโครงสร้างแบบ α -helix พันธะไฮโดรเจนที่ยึดระหว่าง β -stand นี้เรียกว่า intra hydrogen bond โครงสร้างแบบ β -sheet เมื่อมีปริมาณมากขึ้นเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ชั้น โดยแต่ละชั้นจะยึดกันด้วยแรง dipole force ดังภาพที่ 2.2 และภาพที่ 2.3 เป็นสาเหตุให้ผ้าไหมมีลักษณะลื่น และสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนได้ด้วยการใช้สารเคมีประเภทรุนแรงเช่น โซดาไฟ ที่มีฤทธิ์เป็นด่างมาก ดังนั้น ความเป็นด่างสูง หรือเอนไซม์จำพวก proteinase หรือความร้อนสูงอาจทำให้มีการทำลายพันธะไฮโดรเจนและแรง dipole มาก และทำให้เกิดการหดตัวและจัดเรียงตัวใหม่อย่างไม่มีระเบียบ (ปวีณา พงษ์คนตรี, 2549)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างลักษณะของ การจับกันของกรดอะมิโนในไฟโบรอิน ยึดเกาะกันด้วยแรง dipole และ พันธะไฮโดรเจน

ที่มา : ปวีณา พงษ์คนตรี (2549)

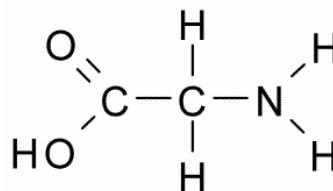
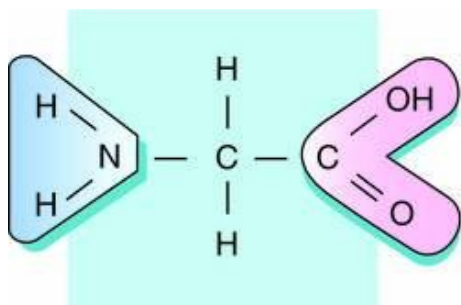
2.4.1 คุณสมบัติที่เป็นสาร antigenotoxic ของสารไฟโบรอิน

Park, Jin and Hyun (2002) ได้วิเคราะห์หองค์ประกอบภายใน fibroin hydrolysate ด้วยกรดออกซาลิก หรือกรดไฮโดรโครลิก และทำปฏิกิริยา hydrolysis ด้วยเอนไซม์ actinase หรือเอนไซม์ alcalase หรือ เอนไซม์ protease อื่น ๆ พบว่าสามารถย่อยไฟโบรอิน ได้กรดอะมิโนจำพวก Alanine, Glycine , Serine, Valine เป็นต้น ซึ่งพบมาก และกรดอะมิโนกลุ่มนี้อาจจะใช้เป็นสาร antigenotoxic อย่างเดี่ยวๆ ได้ ซึ่งสารไฟโบรอิน hydrolysate นั้นอาจจะอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Protein hydrolysate อื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นสาร antigenotoxic หรือสาร antimutagenic ได้แต่ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดเท่าที่ควร ถึงอย่างไรแล้วโปรตีนไฟโบรอินที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งของ antigenotoxic peptide และสามารถนำไปพัฒนาต่อในอนาคตได้ ซึ่งคุณสมบัติของกรด อะมิโนชนิดต่างๆที่พบในโปรตีนไฟโบรอินจะมีประโยชน์ และเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นร่างกายได้ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติและคุณประโยชน์ของกรดอะมิโนในโปรตีนไฟโบรอินที่มีต่อร่างกาย

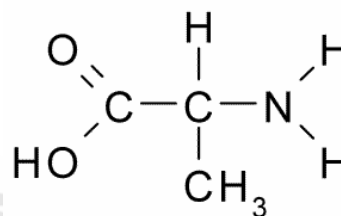
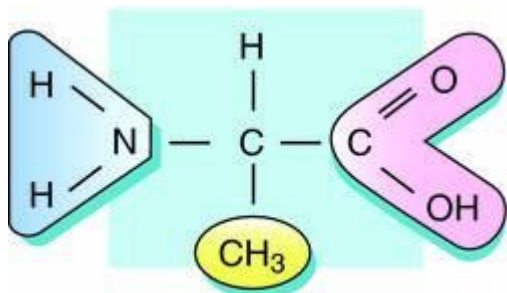
ชนิดกรดอะมิโนในผงไหม	หน้าที่และคุณสมบัติ
Glycine	<ul style="list-style-type: none"> - ควบคุมระดับคอเลสเตอรอล - ป้องกันและรักษาความดันโลหิตสูง - ช่วยเสริมสร้างการทำงานของตับและช่วยสร้างฮอร์โมนที่เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง
Alanine	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นแหล่งพลังงานสำคัญต่อเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ,สมองและระบบประสาทส่วนกลาง - ผลิต antibodies ที่ช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น - ช่วยในกระบวนการทำงานของน้ำตาลและกรดอินทรีย์
Serine	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นแหล่งในการสะสมน้ำตาล glucose ในตับ และกล้ามเนื้อ จึงช่วยส่งเสริมระบบการทำงานของ Insulin เป็นการลดน้ำตาลในเลือดซึ่งช่วยในการเผาผลาญไขมันที่สะสมในร่างกาย - ช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันแข็งแรงขึ้น - สังเคราะห์กรดไขมันล้อมรอบ nerve fibers
Aspartic acid	<ul style="list-style-type: none"> - ช่วยขับไล่อาการบาดเจ็บและสารพิษแอมโมเนียออกจากร่างกาย

ที่มา : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, <http://www.moac.go.th/builder/mu/index.php>.



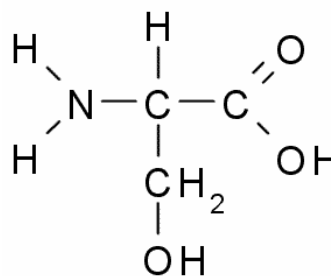
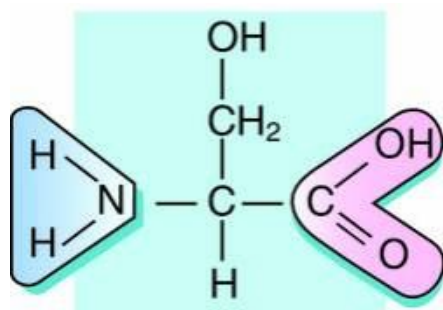
ภาพที่ 2.4 Glycine structure

ที่มา : <http://psychology.wikia.com>; <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>



ภาพที่ 2.5 Alanine structure

ที่มา : <http://psychology.wikia.com>; <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>



ภาพที่ 2.6 Serine structure

ที่มา : <http://psychology.wikia.com>; <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>

2.5 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฟโบรอิน

จากองค์ประกอบภายในของไหม ทำให้ทราบว่าไหม สามารถนำมาประยุกต์ใช้จากคุณสมบัติที่ได้จากการรวบรวมข้อมูล สามารถแบ่งประโยชน์การนำไปใช้ได้ดังนี้

2.5.1. อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Cosmetic materials)

เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของผงโปรตีนไฟโบรอิน หรือ fibroin powder ได้มีการวางขายในท้องตลาดแห่งแรกมาแล้วกว่า 30 ปีและปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดต่างๆ ได้นำเอาผงโปรตีนไฟโบรอินเข้าร่วมเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ อาทิเช่น ครีม โลชั่น แป้งแป้ง แป้งฝุ่น hair cream, hair rinse (Nasuno and Otoi, 1983; Grillier, 1999) ซึ่งคุณสมบัติของเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฟโบรอินจะช่วยให้เนื้อแป้งหรือ เนื้อครีมเกาะติดกับผิวหนังได้ดี ติดทนนานไม่หลุดลอกเมื่อสัมผัสกับเหงื่อ สามารถช่วยรักษาความชุ่มชื้นของผิวไว้ได้นานและมีความคงตัวดีเยี่ยม (Kiyoshi and Osami, 1990) ป้องกันผิวจากรังสี ช่วยให้เม็ดสีเมลานินกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ทำให้ผิวเรียบเนียนและดูสว่างใสอย่างเป็นธรรมชาติ ช่วยรักษากลิ่นน้ำหอมของเครื่องสำอางให้คงทน และยังสามารถเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีสีสำหรับ eye color, eye liner และ powder brush (Ichiro et al., 1999) และผสมไฟโบรอินในลิปสติก (Toru, 1992) ซึ่งสารไฟโบรอินจะจับตัวกับเม็ดสีหรือสารสีเพื่อให้โทนสีมีความคงตัว สีสวย กระจ่างใสทนต่อความร้อน แสง เกาะติดผิวได้ดี ไม่หลุดออกเมื่อเหงื่อออก นอกจากนี้ สามารถเพิ่ม amorphous silk fibroin ในสารจำพวก emulsifier เพิ่มสามารถปรับปรุงคุณสมบัติ emulsifying force ซึ่งจะช่วยให้ในเรื่องลักษณะเนื้อสัมผัสของเครื่องสำอางและ ช่วยในเรื่องการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้ดี ซึ่งจะสามารถผสมระหว่างเฟสของน้ำและไขมันในเครื่องสำอาง ซึ่งมีผลดีเยี่ยมในการดูแลผิวพรรณ (Kozo and Shiyouko, 2005) ส่วนคุณสมบัติการเกิดเจลของไฟโบรอินในสถานะที่เป็นกรด สามารถที่จะผสมรวมตัวกันกับ polyol และทำให้ได้เจลที่มีความกระด้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเจลทั่วไป ซึ่งเหมาะที่จะใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เพราะสามารถกระจายตัวและ ยึดเกาะผิวหนังและเส้นผมได้ดี และมีกรรมวิธีที่ผลิตที่ง่ายและลงทุนต่ำ (Toshio and Kazuo, 2005)

นอกจากนี้บริษัท Kanebo จำกัด มีการพัฒนาเครื่องสำอางหลากหลายที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหนัง จากผงโปรตีนไฟโบรอิน ทั้งนี้เพิ่มเพิ่มพาลักษณ์ที่เลิศจนให้แก่ไหม ซึ่งโดยปกติแล้วสิ่งสกปรกที่เป็นโปรตีนจากผิวหนังที่ตายแล้วไม่สามารถถูกกำจัดได้ด้วยสบู่ แต่สามารถกำจัดได้ด้วยเอนไซม์ โปรติเอสทำการไฮโดรไลส์สิ่งสกปรกจากโปรตีนดังกล่าว โดยความเป็นจริงแล้ว เครื่องสำอางแบบเดิมก็มีส่วนผสมของเอนไซม์โปรติเอส แต่เมื่อเวลาผ่านไป แอคติวิตีของ โปรติเอสก็จะเปลี่ยนแปลง

ไปด้วย โดยเฉพาะเมื่อปล่อยให้โปรตีนอยู่กับสารลดแรงตึงผิวในภาวะเปียก บริษัท Kanebo จำกัด จึงได้พัฒนาเทคนิคการตรึงเอนไซม์โปรตีนในไฟโบรอินของไหม ซึ่งจะมีความคงตัวต่อความร้อนและแอคติวิตีต่อการไฮโดรไลส์ก็จะมี ความคงทนเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากไฟโบรอินจะป้องกันโปรตีนจากความร้อนและความชื้นนั่นเอง โดยแอคติวิตีต่อการไฮโดรไลส์ของโปรตีนจะเปลี่ยนแปลงไปเพียง 10% หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 300 วัน Fresh-up powder ผลิตได้จาก granules ของของผสมระหว่าง proteinase-encapsulated fibroin powder และสารลดแรงตึงผิว

2.5.2. วัสดุอาหาร (Food material)

ในอุตสาหกรรมอาหาร โปรตีนไฟโบรอินมีส่วนช่วยในการเกิดโฟมและเพิ่มความคงตัวของอาหารที่มีลักษณะโฟม (Yoshiharu, 1998) ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีลักษณะ sponge cake foam ได้มีการผลิตสารละลายไฟโบรอินจากไหมเพื่อใช้เป็น Foamed food material และในกระบวนการผลิต Thin Japanese noodles ได้เพิ่มไฟโบรอินเพื่อให้ลักษณะความยืดหยุ่นของเส้นดีขึ้นและรสชาติที่ดีขึ้น (Yasuko, 1998) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยการเติมสารละลายไฟโบรอินลงไปในการผลิตกัมและในกรณีที่ต้องการให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะคล้ายเจลจะต้องปรับค่า pH ของส่วนผสมที่ค่าใกล้เคียง 4 ซึ่งเป็นจุด isoelectric point ทำให้ได้เจลของไฟโบรอิน ซึ่งนำมาทดลองผลิตเครื่องดื่มนุ่มชนิด extremely soft เช่น น้ำผลไม้ ชุป และเครื่องดื่มธัญญาหารเพื่อสุขภาพอื่นๆ รวมทั้งอาหารเสริมสุขภาพ และให้ลักษณะตามที่ผู้บริโภคต้องการ (Kiyoshi, 1989) นอกจากผสมลงในอาหารแล้ว ยังสามารถผลิตเป็นฟิล์มเคลือบเพื่อรักษาความสดในอุตสาหกรรมประมง ได้ เมื่อเทียบกับสารต่าง ๆ เช่น สารพอลิเมอร์ ฝ้าย ป่าน ปอ ประดาชเคลือบไข และสารละลายเกลือ พบว่า การเคลือบด้วยฟิล์มไหม สามารถรักษาความสดของกุ้งสดได้นานถึง 9 วันดีกว่าวัสดุชนิดอื่น และดีกว่าน้ำแข็งที่รักษาความสดไว้ได้เพียง 7 วัน (กรมหม่อนไหม, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552)

2.5.3. เยื่อเลือกผ่าน (Membrane Materials)

เยื่อเลือกผ่านซึ่งสามารถที่จะผลิตได้จากโปรตีนไฟโบรอินเพื่อใช้ในกระบวนการแยกสารประกอบที่ผสมกันอยู่ได้ เช่นการศึกษาของ Hirotsu and Nakajima (1994) ได้นำโปรตีนไฟโบรอินมาผลิตเป็นเยื่อเลือกผ่าน เพื่อใช้ในกระบวนการแยกสารประกอบที่ผสมกันอยู่ เช่น การศึกษาของ Hirotsu and Nakajima (1994) ได้นำโปรตีนไฟโบรอินชนิดที่ไม่ละลายน้ำ ผลิตเป็นเยื่อเลือกผ่าน พบว่าเยื่อเลือกผ่านที่ได้มีคุณสมบัติ แยกของผสมระหว่างน้ำและแอลกอฮอล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่จะผลิตเยื่อเลือกผ่านจากโปรตีนไฟโบรอินบริสุทธิ์ เนื่องจากกรดอะมิโนที่ประกอบในโครงสร้างของ

ไฟโบรอินจะมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีหมู่ฟังก์ชันเป็น neutral polar ดังนั้น จึงต้องนำเอาโปรตีนไฟโบรอินมาผสมกับ crosslink agent เพื่อก่อให้เกิดการ copolymerized กับสารประกอบตัวอื่น ซึ่งจะส่งผลต่อเยื่อเลือกผ่านที่ผลิตขึ้นจากโปรตีน ไฟโบรอินมีคุณสมบัติในการชอบน้ำ (Hydrophilic) เยื่อเลือกผ่านที่ผลิตได้จะมีความสามารถในการแยกน้ำออกจากสารละลายอินทรีย์ได้

2.5.4. วัสดุชีวภาพทางการแพทย์ (Medical biomaterials)

Tsubouchi (1999a) ได้พัฒนาวัสดุปิดแผล (wound dressing) ใช้โปรตีนทั้งส่วนที่เป็นโปรตีนซีรีซินและโปรตีนไฟโบรอิน พบว่ามีส่วนช่วยให้แผลหายสนิทโดยไม่ก่อให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนังเมื่อเปิดวัสดุปิดปากแผลออก ซึ่งเริ่มจากการศึกษาวัสดุปิดปากแผลที่เป็น non-crystalline fibroin film ที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 3 -16% และมีความหนาที่ประมาณ 10 – 100 μm จากนั้นทำการศึกษาวัสดุปิดปากแผลที่มีส่วนผสมระหว่างโปรตีนไฟโบรอิน และโปรตีนซีรีซิน (Tsubouchi, 1999b) โดยฟิล์มดังกล่าวมีระดับความเป็น crystalline < 10% และความหนา 10 – 30 μm มีความหนาแน่น 1,100 – 1,400 kg/m^2 ซึ่งวัสดุปิดปากแผล ดังกล่าว สามารถละลายน้ำได้น้อยกว่า 10% ที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ที่มีการผลิตแผ่นฟิล์มที่ใช้เป็นฟิล์มผสมเคลือบบาดแผลที่เลือกใช้สารพอลิเมอร์ผสมกับโปรตีนไฟโบรอิน จะสามารถปรับปรุงให้อยู่ในระดับโมเลกุลที่จะยึดติด หรือสามารถที่จะเคลือบบนผิวหนังได้ดีทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้สารพอลิเมอร์ด้วย (Um and Park, 2007)

จากการศึกษาวิจัยของกลุ่มนักวิจัยต่างประเทศได้ทำการจดสิทธิบัตรกรรมวิธีการผลิตเวชภัณฑ์ทางการแพทย์จากไฟโบรอิน ได้แก่ การผลิตที่นำเอาโปรตีนไฟโบรอินและไฟบริโนเจนของมนุษย์ผสมกันเพื่อใช้ในการศัลยกรรม ผลของการวิจัยพบว่าเวชภัณฑ์ที่ผลิตได้สามารถเข้ากันได้ดีกับเซลล์ (living organism) และยึดเกาะกับผิวได้ (Iwatsuki et al., 1989) นอกจากนี้ยังผลิตเป็นที่ปิดบาดแผล (wound dressing material) บริเวณผิวหนังที่เกิดจากการไหม้ (Sugihara et al., 2000) ช่วยในการปกป้องผิวสำหรับคนที่แพ้เครื่องสำอาง ชุดชั้นในและถุงเท้า ด้วยการนำเอาโปรตีนไฟโบรอินและซีรีซินมาผสมกันทำให้เกิดการเป็นฟิล์ม โดยฟิล์มที่ผลิตได้ไม่ทำให้เกิดการระคายเคือง สามารถยืดหยุ่นพอเพียงกับการเคลื่อนไหวของผิวหนัง (Tsubouchi, 2001) การใช้เป็นวัสดุปิดกระตุ้นในการเพิ่มเซลล์ของหนังกำพร้า โดยการนำไฟโบรอินมาผลิตเป็นฟิล์ม แล้วปรับความชื้นของฟิล์มที่ได้จากไฟโบรอินให้ได้ความชื้น 40% เติม human epidermal cell แล้วทำการบ่มเซลล์หนังกำพร้า ซึ่งจากการวิจัยได้ผลว่า เซลล์หนังกำพร้าที่ได้มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ 98% (Tsubouchi et al., 2002)

วัสดุปิดแผลจะเป็นวัสดุที่ใช้ปิดแผลเพื่อบรรเทาความเจ็บปวด หรือดูดซับสิ่งคัดหลั่งที่ออกมาจากบาดแผลของผู้ป่วย และป้องกันสิ่งปนเปื้อนจากภายนอกที่จะสัมผัสกับบาดแผลได้ ซึ่งวัสดุปิดแผลที่

ใช้ส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับลักษณะของบาดแผล ความลึก การฉีกขาดของเนื้อเยื่อ ซึ่งวัสดุปิดแผลที่ใช้มีหลายชนิด อย่างเช่น กาวสังเคราะห์ทางการแพทย์หรือกาวติดเนื้อเยื่อ (Medical adhesive/tissue adhesive) คือ กาวไซยาโนอะคริเลต (cyanoacrylate) เกรดที่ใช้ทางการแพทย์ เพื่อนำมาใช้ติดเนื้อเยื่อ แทนการเย็บแผล หรืออาจจะใช้ร่วมกันกับการเย็บแผล เมื่อกาวได้รับความชื้นหรือน้ำ จะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันสร้างฟิล์มที่ยึดหยุ่นขึ้นมาเชื่อมเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างใต้ผิวหนัง หรือบาดแผล เพื่อสมานปิดแผล ป้องกันการปนเปื้อนของจุลชีพได้ด้วย (มาริสา คุณชนวงศ์, 2552)

นอกจากนี้ยังมีการใช้โปรตีนไฟโบรอินผสมเป็น fibroin membrane สามารถที่จะสร้าง guided bone ใหม่ โดยที่ศึกษาค่าของ biocompatibility ของ silk fibroin nanofiber membrane และตรวจผลของการงอกของกระดูก ใน rabbit calvarial model ซึ่งในระยะเวลา 8 สัปดาห์จะเริ่มเห็นความเปลี่ยนแปลงของการรวมกันของเนื้อเยื่อกระดูก และที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์จะเห็นผลของการสมานตัวของกระดูกใหม่ได้ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์ได้ในอนาคต (Kim et al., 2005) และได้มีการศึกษาการประดิษฐ์เส้นประสาทเทียมโดยที่ผสมโปรตีนไฟโบรอิน เพื่อใช้ในการเชื่อมเส้นประสาทเทียม เข้ากับเส้นเลือด และ fiber scaffold ซึ่งจะช่วยในการเชื่อมยึดติดของเนื้อเยื่อระหว่างท่อเส้นประสาทได้ (Gu et al., 2008)

นอกจากนี้ พบว่ากรดอะมิโนที่พบในไฟโบรอินคือ glycine จะช่วยให้คอเลสเตอรอล และระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ และ alanine จะช่วยดับทำงาน เช่น ช่วยให้อาการเมาค้างกลับสู่ภาวะปกติได้เร็วขึ้น ขณะเดียวกัน serine จะกระตุ้นทำงานของสมองในผู้สูงอายุ ไฟโบรอินจากไหมยังมีศักยภาพในการพัฒนา เป็น biosensors เพื่อตรวจจับ antibodies ซึ่งใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งและโรคเอดส์ได้ ไหมได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้นเรื่อย ๆ จนได้รับการขนานนามอีกอย่างหนึ่งว่า “เส้นใยสุขภาพ(health fiber)” (กรมหม่อนไหม, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552).

ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีกระบวนการผลิตฟิล์มจากไฟโบรอินสำหรับใช้เป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์มากเท่าที่ควร ส่วนใหญ่จะเน้นการผลิตเพื่อเป็นวัตถุดิบส่งออก ทำให้ไม่ครอบคลุมการใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ รวมทั้งทางด้านการแพทย์ เป็นเหตุให้ประเทศไทยต้องนำเข้าเวชภัณฑ์ดังกล่าวมาจากต่างประเทศและสูญเสียเงินจำนวนมาก ดังนั้นจำเป็นต้องมีการคิดค้นกรรมวิธีการผลิตที่นำวัตถุดิบที่มีอยู่ในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด และเหมาะสมกับการนำไปใช้ในด้านการใช้เป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์ ไม่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

2.6 การละลายไหม

เนื่องจากไหมเป็นเส้นใยธรรมชาติที่มีความแข็งแรงมาก กรรมวิธีการละลายไหม จึงเป็นเรื่องที่ท้าทาย สำหรับนักวิจัยจึงมีการทดลองและศึกษา กรรมวิธีละลายเส้นไหม เพื่อจะนำสารละลายไหมไปใช้ในการศึกษาองค์ประกอบ หรือนำไปพัฒนาเป็นส่วนหนึ่งของผลิตภัณฑ์ต่างๆได้ ดังนั้น

2.6.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโบรอิน

สามารถเตรียมได้หลายวิธี ซึ่งเส้นไหมหรือ ไหมนั้น เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นฟลิกไม่ละลายน้ำ มีแรงดึงสูง จับกับไขมันได้ดี มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิด ยิ่งกว่านี้ไหมเป็นโปรตีนที่เข้ากับร่างกายของมนุษย์ได้ดี การแพ้น้อยมาก ดังนั้นเราจึงพบว่าไหมถูกนำมาใช้เป็นวัสดุเย็บแผล และอื่นที่ต้องสัมผัสกับอวัยวะของเรา จากการศึกษาข้อมูลในต่างประเทศพบว่ามีวิธีการคิดค้นวิธีการละลายไหมแบบต่าง ๆ ได้บ้าง ซึ่งในแต่ละวิธีก็มีข้อจำกัดแตกต่างกัน งานวิจัยนี้จะพยายามลดข้อด้อยของวิธีที่ค้นพบมาก่อนหน้านี้แล้ว ทำให้ได้ผลผลิตที่สูง เหมาะสมที่จะนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป โดยจะทำออกมาในรูปของฟิล์มที่มีคุณสมบัติช่วยเร่งการหายของแผลที่ผิวหนังเป็นเบื้องต้นก่อน โดยที่ Yamada et al. (2001) ใช้สารละลาย Ajisawa's reagent ผสมกับเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวไหมออกแล้ว ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C พร้อมกับคนให้เข้ากันจนได้สารละลายใส จากนั้นทำ dialysis ผ่าน cellulose tube ด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนหรือน้ำกลั่น และตรวจสอบผลสารละลายที่ผ่าน dialysis ด้วยสารละลาย AgNO_3 ให้ผล negative จะได้สารละลายไฟโบรอินบริสุทธิ์ หรือ

วิธีตามที่ Miyaguchi and Hu (2004) ทำละลายเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวไหมออกแล้วด้วยสารละลาย CaCl_2 ผสมกับสารละลาย Ethanol 20% (v/v) โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C นาน 1-5 ชั่วโมง จากนั้นทำ dialysis ผ่าน cellulose ด้วยน้ำกลั่น หรือน้ำที่ปราศจากไอออน 4°C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ผ่าน dialyzed ไป centrifuged ที่ 8000 g นาน 15 นาที จะได้สารละลายใสของไฟโบรอินอยู่ส่วนบน หรือ

วิธีจาก Kino et al. (2007) ทำละลายเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวไหมโดยใช้ Marseilles soap (Alkaline soap) ด้วยสารละลาย LiBr ความเข้มข้น 9 M ที่อุณหภูมิ 40°C จากนั้นทำ dialysis ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จะได้สารละลายไฟโบรอินใส หรือ

ตามวิธีของ Lin et al. (2008) ได้นำเส้นใยไหมที่ผ่านการลอกกาวไหมออกแล้ว ผสมกับสารละลายผสมต่อโมล $\text{CaCl}_2 : \text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:8:2) ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที จากนั้นกรองแล้วทำ dialysis กับน้ำบริสุทธิ์โดยผ่านเมมเบรนเป็นเวลา 3 วัน จะได้สารละลายไฟโบรอิน จากนั้นนำ

สารละลายที่ได้มาทำแห้งด้วยวิธี freeze dry จะได้ผงไฟโบรอินหรือ fibroin powder ที่มีมวลโมเลกุล 5,000 – 30,000 Mw จะเห็นว่าสารละลายไฟโบรอิน สามารถเตรียมได้หลายแบบจากที่ได้กล่าวข้างต้น

2.6.2 การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน

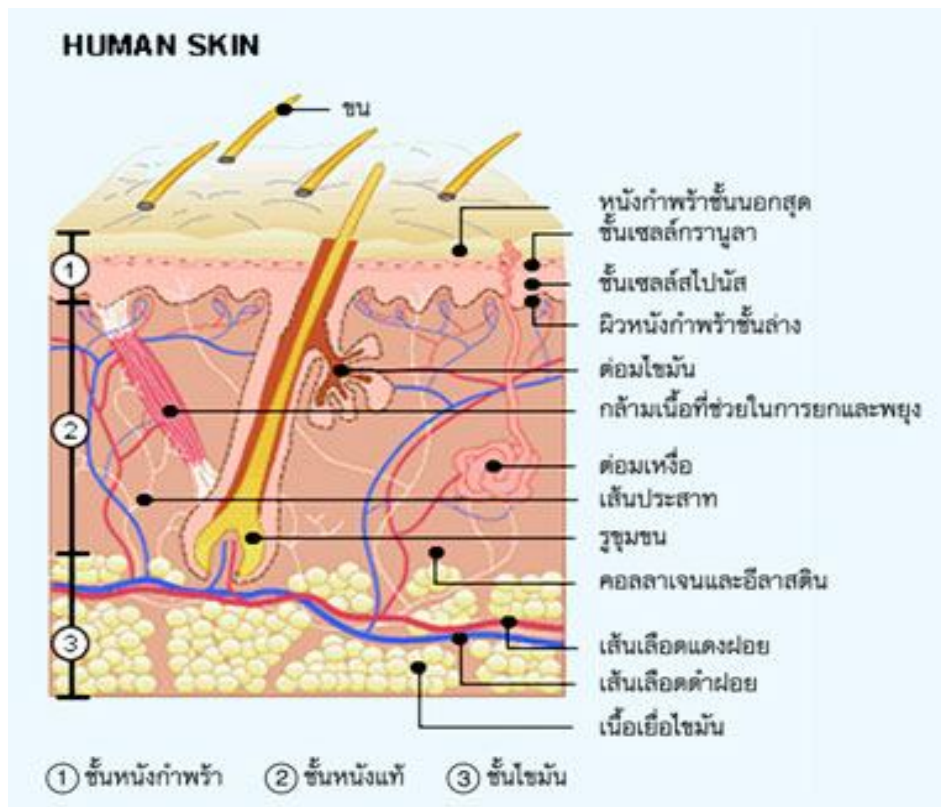
ในส่วนของการเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินสามารถเตรียมได้หลายแบบ ยกตัวอย่างเช่น การเตรียมโดยใช้สารละลายไฟโบรอินบริสุทธิ์ และจากสารละลายผสมโดยเอาสารละลายไฟโบรอินบริสุทธิ์ผสมกับสาร polymer ตัวอื่นๆ เพื่อใช้ในการขึ้นรูปของแผ่นฟิล์ม ตามที่ US Patent 5951506 (1999) เตรียมแผ่นฟิล์มไฟโบรอินโดย นำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ (เข้มข้น 7% โดยน้ำหนัก) มาเทเคลือบลงบน flat plastic plate จากนั้นทำแห้งด้วยวิธีใช้ลมเป่าที่อัตราเร็วลม 20-40 cm/sec. ใน chamber ที่มีอุณหภูมิ 20°C ความชื้น 65% RH จะได้แผ่นฟิล์มที่มีความหนาที่ 10µm หรือนำสารละลายไฟโบรอินบริสุทธิ์ มาเทเคลือบลงบน poly styrene plate แล้วระเหยตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องหรือทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (Tohru et al., 2007) หรือทำแห้งแผ่นฟิล์มโดยอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว จัดเก็บแผ่นฟิล์มที่ vacuum ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง (Jinwei et al., 2002) ส่วนแผ่นฟิล์มที่ได้จากผสมของสาร polymer และไฟโบรอินบริสุทธิ์ อย่างเช่น ผสมสารละลายไฟโบรอินเข้มข้น 10% กับตัว cross-linked agent (a water soluble epoxy resin) 20% กับสารละลาย PVA (Poly vinylalcohol) 10% ตามสัดส่วนต่างๆ แล้ว เทลงบน Stainless steel dish ทำแห้งด้วยวิธี freeze dry สลับกับตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Mingzhong et al., 2002) เป็นต้น

2.7 ผิวหนัง

ผิวหนังเป็นส่วนที่ใหญ่ที่สุดในการปกคลุมอวัยวะของร่างกาย ประกอบไปด้วยชั้น epidermis ชั้นหนังกำพร้า (หรือชั้น ectodermal ของตัวอ่อนในครรภ์) และชั้น dermis หนังแท้ (ชั้น mesodermal ของตัวอ่อน) สองชั้นของผิวหนังมีชั้นที่เกี่ยวกับ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันหลวมๆ เนื้อเยื่อไฟโบรบลาสต์ เซลล์ เต้านม เซลล์ macrophages และชั้นที่ไว้วางกันประกอบด้วยความผิดปกติของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีเส้นใยหนาแน่นมากขึ้น และเซลล์น้อยลงซึ่งมอบความยืดหยุ่นให้กับผิว ซึ่งโครงสร้างของผิวหนัง จะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาโดยผิวหนัง แบ่งได้เป็น 3 ชั้นดังภาพที่ 2.7

1. ชั้นบนสุด เรียกว่า หนังกำพร้า (epidermis) เป็นชั้นที่เรามองเห็นอยู่ด้านนอกสุด หนังกำพร้า (Epidermis) เป็นชั้นของ ผิวหนังที่ปกคลุมอยู่บนสุดจะประกอบไปด้วย เยื่อบุผิว เซลล์ ที่มีการเรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ และเกิดใหม่ โดยที่เซลล์ใหม่จะถูกสร้างจากชั้นล่างสุดติดกับหนังแท้ และเจริญเติบโตขึ้น

แล้วค่อยๆเคลื่อนตัวมาทดแทนเซลล์ที่อยู่ชั้นบน จนถึงชั้นบนสุดแล้วก็กลายเป็นคีโตน (keratin) หลุดลอกออกไป นอกจากนี้ในชั้นหนังกำพร้ายังมีเซลล์ เรียกว่า เมลานิน ปะปนอยู่รอบๆด้วย เมลานิน มีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับบุคคลและเชื้อชาติ จึงทำให้สีผิวของคนแตกต่างกันไปในชั้นของหนังกำพร้าไม่มีหลอดเลือด เส้นประสาทและต่อมต่างๆ นอกจากเป็นทางผ่านของรูเหงื่อ เส้นขนและ ไขมันเท่านั้น (Harrist et al., 1999)



ภาพที่ 2.7 ชั้นผิวหนังมนุษย์

ที่มา : <http://www.atmthailand.com>

2. ชั้นกลาง เรียกว่า หนังแท้ (dermis) เป็นผิวหนังที่อยู่ชั้นล่างถัดจากหนังกำพร้าแต่หนากว่าหนังกำพร้ามาก จะประกอบด้วยโปรตีนหลัก 2 ชนิด คือ เนื้อเยื่อ คอลลาเจน (collagen) และเนื้อเยื่ออีลาสติก (elastic) คอลลาเจน(Collagen) ช่วยให้ความแข็งแรงแก่ ผิวหนัง และช่วยในการซ่อมแซม ผิวหนัง ที่บาดเจ็บ ซึ่งถ้าสร้างในปริมาณมากก็เกิดเป็น แผลเป็น นั่นเอง ส่วน อีลาสติน(Elastin) สร้าง ความยืดหยุ่น

ให้กับ ผิวหนัง และใน ชั้นหนังแท้ นี้ยังเป็นที่อยู่ของ หลอดเลือด เส้นประสาท กล้ามเนื้อเกาะเส้นขน ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ และขุม ขนกระจายอยู่ทั่วไป (Urmacher, 1992; Harrist et al., 1999)

3. ชั้นล่างสุดเป็น ชั้นใต้ผิวหนัง (hypodermis, subcutaneous tissue) หรือ ชั้นไขมัน (subcutaneous) ประกอบด้วยเซลล์ไขมัน เป็นหลัก ความหนาขึ้นกับปริมาณไขมันของแต่ละบุคคล ชั้นนี้ทำหน้าที่ให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย คล้ายจนวนกันความร้อนช่วยลดแรงกระทบกระเทือนจากภายนอก และชั้นไขมันที่มีมากโดยเฉพาะบริเวณสะโพก เอว ต้นขา ที่เรียกว่า cellulite คือ ไขมัน ที่มีเนื้อเยื่อคล้ายพังผืดแทรกอยู่ ทำให้เกิดการดึงรั้งผิวหนังเห็นเป็นลอนๆจากภายนอกการเกิด celluliteไม่ขึ้นกับปริมาณของไขมัน ในร่างกายคนพอมสามารถพบ celluliteได้ (Harrist et al., 1999)

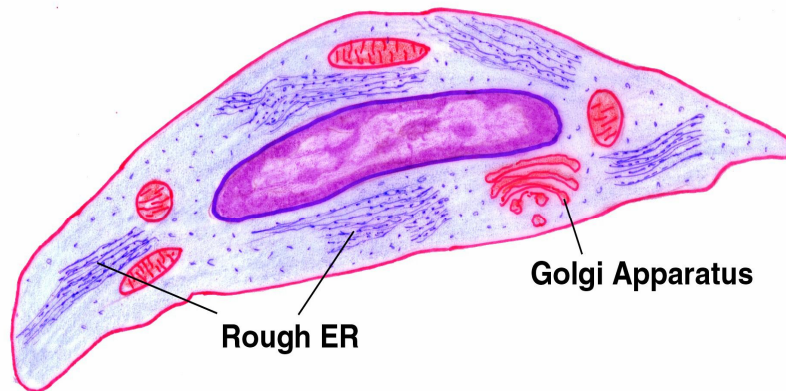
2.8 เซลล์ที่มีส่วนสำคัญในการสร้างเนื้อเยื่อ

เซลล์ที่มีส่วนช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อ ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถเคลื่อนที่จากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง ผ่าน extracellular matrix นั้น ได้โดยที่ เซลล์ Fibroblast เป็นเซลล์ differentiate กล่าวคือ กระบวนการที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะ (specialized cells) มาจาก undifferentiated mesenchymal cells ถ้ามัน active จะมีรูปร่างเป็นกระสวยยาว ไม่มี basal lamina มีนิวเคลียสรูปไข่มี ribosome และ ER จำนวนมากเพื่อสร้างโปรตีนเส้นใย เช่น collagen fiber, elastic fiber และ reticular fiber Extracellular matrix เป็นสารที่ถูกสร้างออกมาอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ support, adhesion, movement และ regulation ให้แก่เซลล์ที่ประกอบไปด้วยไกลโคโปรตีนหลัก 3 ชนิด คือ proteoglycan, collagen และ fibronectin. เส้นใยคอลลาเจนฝังตัวอยู่ใน proteoglycan complex ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ proteoglycan ต่อขยายด้วยสายยาวของคาร์โบไฮเดรต ทำให้มีลักษณะคล้ายกิ่งไม้ Fibronectin จะมีลักษณะ คล้ายกาวยึด ECM ให้ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ตรงตำแหน่งของเมมเบรนโปรตีน "integrins"องค์ประกอบและโครงสร้างของ ECM จะแตกต่างกันในเซลล์แต่ละชนิด

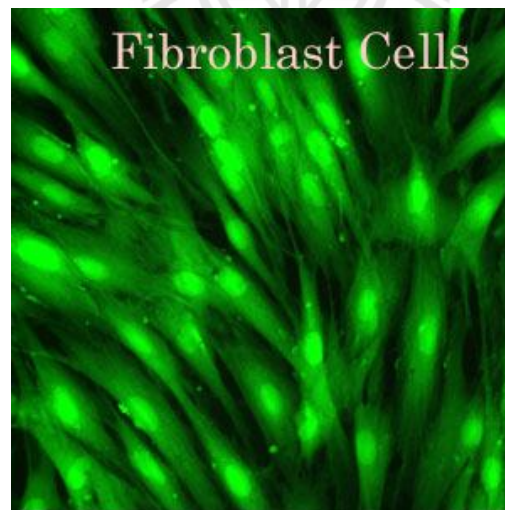
เซลล์ในตัวอย่างที่แสดงนี้ ECM ประกอบด้วยสารพวก glycoprotein 3 ชนิด ได้แก่

1. collagen fiber ที่ฝังตัวอยู่ในร่างแหของ proteoglycans ซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 95 %
2. fibronectin เป็น glycoprotein ที่เกาะอยู่กับ receptor protein ที่อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (integrin)
3. integrin จะเชื่อมโยงระหว่าง ECM กับ microfilament ใน cytoplasm ซึ่งมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการนำสัญญาณการถูกกระตุ้นระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกกับภายในเซลล์ได้การเคลื่อนที่ของ fibroblast สามารถเคลื่อนที่จากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง ผ่าน Extracellular matrix จะอาศัย fibronectins - ทำให้เซลล์เกาะติดกับ extracellular matrix ทุกชนิด ยกเว้นชนิดที่มี collagen type IV -ช่วยในการ

กำหนดรูปร่าง การเคลื่อนที่ และการ differentiate ของเซลล์-ประกอบไปด้วย dimer ของ fibronectin subunits บน โมเลกุลจะพบ 6 domains ซึ่งเป็น binding site ของ cell surface receptors หรือกล่าวได้ว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์หลักในการสร้าง Collagen และ Elastin ให้กับผิวหนังรวมทั้งโมเลกุลอื่นๆ ของในโครงสร้างของชั้นผิว (เจริญ เตชะ, 2554)



ภาพที่ 2.8 ตัวอย่างรูปเซลล์ไฟโบรบลาสต์และองค์ประกอบภายในเซลล์
ที่มา: <http://education.vetmed.vt.edu>



ภาพที่ 2.9 ตัวอย่างภาพถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์
ที่มา: <http://fibroblast-transfection.com>

2.8.1 เซลล์ไฟโบร بلاสต์และการสมานบาดแผล

ไฟโบร بلاสต์ สามารถที่จะพบไฟโบรไซท์ที่มีชีวิต ซึ่งจะสามารถทำให้ไฟโบร بلاสต์ทำงานได้ช้าลงได้ ซึ่งคำว่าบลาสต์ที่ต่อท้ายเซลล์ต่าง ๆ นั้น จะหมายถึงความสามารถในการกระตุ้นกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ได้ ลักษณะเฉพาะของไฟโบร بلاสต์ พบ endoplasmic reticulum ค่อนข้างมาก และไม่เป็นระเบียบ และทำให้ไฟโบรไซท์ทำงานได้น้อย และนอกจากนี้ไฟโบรไซท์ ยังมีค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับไฟโบร بلاสต์ ไฟโบรไซท์จะถูกกระตุ้นด้วย เนื้อเยื่อที่ถูกทำลายเสียหาย และทั้งไฟโบร بلاสต์และไฟโบรไซท์ จะช่วยกันทำหน้าที่ซ่อมแซม สมานบาดแผล ถ้าบุคคลได้รับบาดเจ็บเกิดขึ้นไฟโบร بلاสต์จะทำหน้าที่แบ่งเซลล์ และกระตุ้นการหลั่งคอลลาเจนออกมา เยื่อหุ้มไฟโบร بلاสต์สามารถสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาได้ในกระบวนการนี้ บทบาทของไฟโบร بلاสต์ ในการบำบัดมีความสำคัญต่อสุขภาพส่วนบุคคลและไฟโบร بلاสต์ยังมีข้อบกพร่อง หรือกระบวนการ EMT ที่มีลักษณะเป็นจำนวนของโรค ตัวอย่างเช่น กระบวนการ fibrosis การสร้างเนื้อเยื่อ จะเกี่ยวข้องกับการผลิตคอลลาเจนในปริมาณมากเกินไปโดยไฟโบร بلاสต์ ซึ่งจะส่งผลในการทำให้เกิดแผลเป็นและภาวะแทรกซ้อนในอวัยวะต่างๆของร่างกาย และอาจทำให้เกิดปัญหาเช่น ตับแข็งในตับ, Crohn ของโรคในลำไส้และโรคหัวใจได้ ถ้ามีปริมาณคอลลาเจนมากเกินไปความเหมาะสม

2.9 บาดแผล

บาดแผลของคนเรานั้นสามารถเกิดได้หลายสาเหตุ และมีลักษณะของบาดแผลแตกต่างกัน สามารถจำแนกบาดแผลออกเป็นประเภทต่างๆ ได้หลายวิธีอย่างเช่น จำแนกตามความสะอาดของบาดแผล แบ่งตามลักษณะของการรักษาของผิวหนัง แบ่งตามระยะเวลาที่เกิดแผล เป็นต้น เนื่องจากบาดแผลที่พบทั่วไป มักจะเกิดจากการรักษาของเนื้อเยื่อหรือผิวหนัง ดังนั้นประเภทของบาดแผลในที่นี้จะกล่าวถึงลักษณะของแผลปิด และแผลเปิด

ลักษณะแผลปิด (closed wound) บาดแผลที่บริเวณผิวหนังหรือบริเวณเยื่อไม่รักษาออกจากกันแต่ เนื้อเยื่อที่อยู่บริเวณภายใต้ชั้นผิวหนังจะได้รับการรักษาของเนื้อเยื่อและเลือดฝอยบริเวณรอบๆ นั้นจึงเกิดการรวมตัวของเลือดเป็นก้อน (hematoma) ทำให้เกิดการเจ็บปวด ลักษณะของแผลปิดเช่นนี้ มักจะเกิดจากการกระแทก คีจิ้งหรือถูกกระตุกอย่างแรง เช่น แผลฟกช้ำ(contusion bruise) กระตุกหัก โดยไม่มีแผลภายนอก แผลไหม้พอง สมองได้รับความกระทบกระเทือน (concussion of brain) เป็นต้น (วิรัตน์ ศรีรินพคุณ และ ศรี ศรีรินพคุณ, 2553)



ภาพที่ 2.10 ลักษณะแผลฟกช้ำที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับการกระทบ
ที่มา : www.tongkatsu.com

ส่วนลักษณะของบาดแผลเปิด (opened wound) เป็นแผลที่เกิดจากผิวหนังบางส่วนฉีกขาด ซึ่งแบ่งเป็น 4 ลักษณะคือ

1. แผลถลอก (abrasion) ลักษณะแผลตื้น มีรอยเปิดเพียงชั้นนอกของผิวหนัง หรือเยื่อหุ้มเลือดซึมเล็กน้อย สาเหตุมักจะเกิดจากอุบัติเหตุ เกิดเป็นรอยขีดข่วน ลื่นไถลบนพื้นที่มีผิวขรุขระ (กันยารัตน์ อุบลวรรณ, 2551)

2. แผลฉีกขาด (laceration wound) ลักษณะของบริเวณรอบๆ ขอบแผลจะฉีกขาดมีการทำลายเนื้อเยื่อแผลมาก แผลอาจลึก เสี่ยงต่อการติดเชื้อ สาเหตุมักเกิดจากอุบัติเหตุ เช่น รถล้ม ถูกสิ่งมีคมเกี่ยว ถูกสะเก็ดระเบิด (explosive wound) แผลถูกบดขยี้ (crush wound) จากเครื่องจักร เป็นต้น (กันยารัตน์ อุบลวรรณ, 2551)

3. แผลถูกตัด (incision wound) ลักษณะของบาดแผลจะเป็นผิวเรียบซึ่งเกิดจากของมีคมตัดผ่านเข้าผิวหนัง เช่น แผลถูกมีดบาด ถูกแทง (puncture wound) ลักษณะปากแผลแคบลึกซึ่งเกิดจากวัตถุมีคมปลายแหลมทะลุผ่านชั้นผิวหนังเข้าไป เช่น แผลตะปูตำ ถูกมีดแทง ซึ่งแผลเหล่านี้เสี่ยงต่อการเกิดการติดเชื้อโรคที่ไม่ใช่ออกซิเจน เช่น เชื้อบาดทะยัก (กันยารัตน์ อุบลวรรณ, 2551)

4. แผลทะลุทะลวง (penetration wound) ลักษณะของบาดแผลมีการฉีกขาดและบดทำลายของเนื้อเยื่อ ซึ่งเกิดจากวัตถุแทงทะลุผ่านผิวหนังเข้าไปถึงเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกลงใน หรือถึงอวัยวะภายในทำให้เกิดการตกเลือด เช่น แผลถูกยิง (gun shot wound) ซึ่งลักษณะกระสุนวิ่งผ่านเนื้อเยื่อเข้าไปภายในชั้นผิวหนัง เนื้อเยื่อที่อยู่ใต้ผิวหนังเกิดการฉีกขาด (laceration) การบดทำลาย (crushing) เกิดคลื่น (shock wave) และ

เกิดช่องว่างชั่วคราว (temporary cavitation) ตามรอยแนวที่กระสุนผ่านเข้าไปซึ่งจะขึ้นอยู่กับอัตราเร็วและความแรงของกระสุน(วิรัตน์ ศรีนพคุณ และ ศรี ศรีนพคุณ, 2553)

2.10 ตัวอย่างสาร Polymer ที่ใช้ในการผสมเป็นสารเชื่อมกับโปรตีนใหม่ในการผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์

โดยปกติแล้ว โปรตีนใหม่ หรือไฟโบรอินนั้นจะมีความแข็งแรง แต่เปราะง่าย เมื่อทำการขึ้นรูปเป็นวัสดุทางการแพทย์ จึงต้องมีการผสมสารประกอบพอลิเมอร์บางชนิดลงไป เพื่อเพิ่มลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งานทางด้านศัลยศาสตร์ ทางการแพทย์ ซึ่งนักวิจัยบางท่าน ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมดังกล่าว เช่น Um and Park (2007) ได้มีการนำเอาโปรตีนไฟโบรอินมาผสมกับสารพอลิเมอร์ เช่น Polyvinyl alcohol (PVA) เพื่อใช้ผลิตเป็นแผ่นฟิล์มผสม เพื่อประยุกต์ใช้เป็นวัสดุปิดแผล และสามารถที่จะปรับปรุงคุณภาพของแผ่นฟิล์มได้โดยการ เลือกตัว co-solvent ที่ใช้ในการผสมขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม หรือในการผลิตไฮโดรเจลจากไฟโบรอินสามารถเกิดจากการผสมระหว่างสารไฟโบรอินกับสารพอลิเมอร์ที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น polyethylene glycol, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, และ polyacrylic acid ได้ (WO/2003/022909) และนอกจากนี้ยังมีใช้ในการประดิษฐ์ bioscaffold หรือวัสดุทดแทนกระดูกอ่อน ในเชิงวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ที่ต้องผสมสารพอลิเมอร์เพื่อช่วยในการขึ้นรูปเช่นเดียวกัน (WO/2008/069919)

2.10.1 Polyvinyl alcohol (PVA)

ในปี 1942 Polyvinyl alcohol ถูกค้นพบโดย Hermann และ Haehnel จากการเตรียม hydrolyzing Polyvinyl acetate ใน ethanol กับ potassium hydroxide ซึ่ง Polyvinyl alcohol ถูกผลิตขึ้นเพื่อให้อยู่ในรูปของ Polyvinyl acetate มักถูกนำไปใช้ใน continuous process ในส่วนของ acetate group จะถูก hydrolyze ด้วยการแลกเปลี่ยนสาร ester กับ methanol ในสถานะของ anhydrous sodium methylate หรือ สารละลาย sodium hydroxide ลักษณะโครงสร้างและลักษณะฟังก์ชันจำเพาะขึ้นอยู่กับ degree of polymerization และ degree of hydrolysis สาร Polyvinyl alcohol สามารถจัดแบ่งประเภทได้เป็นสองประเภท ส่วนแรกเป็น hydrolyzed และ full hydrolyzed อีกส่วนจะเป็น hydrolyzed PVA ที่ใช้ในอาหาร (Saxena, 2004)

ลักษณะโดยทั่วไปของ Polyvinyl alcohol

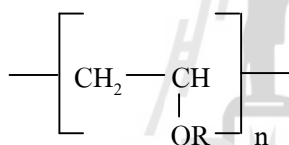
Polyvinyl alcohol สำหรับที่ใช้ในอาหาร ไม่มีกลิ่นรส แสงสามารถผ่านได้น้อย มีลักษณะผลึกเป็นสีขาวครีม คุณสมบัติการละลายสามารถละลายน้ำได้ และละลายได้ใน Ethanol เล็กน้อย แต่ไม่ละลายใน

organic solvent อื่นๆ ซึ่งค่า pH ของสารละลาย Polyvinyl alcohol 5% จะมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.0 – 6.5 จุดหลอมเหลว 180-190 °C น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 26,300- 30,000 และค่า Degree of hydrolysis 86.5-89 % (Saxena, 2004)

กระบวนการผลิต Polyvinyl alcohol

อันดับแรกของการผลิต Polyvinyl alcohol เป็น vinyl acetate monomer ซึ่งจะถูกผลิตโดยปฏิกิริยา polymerization ของ vinyl acetate ซึ่งยอมให้บางส่วนถูก hydrolysis ซึ่งกระบวนการ hydrolysis เป็นส่วนหนึ่งพื้นฐานบนการทำหน้าที่แทนของ ester group ใน vinyl acetate กับ hydroxyl group และสมบูรณ์ในการอยู่ในสถานะของ aqueous sodium hydroxide ตามที่ aqueous เกิดขึ้นที่ละลายกลายเป็น saponification agent สาร Polyvinyl alcohol จะตกตะกอน และจากนั้นนำไปล้างและทำแห้ง ส่วนระดับของ hydrolysis จะถูกกำหนดโดยที่ time point ที่ปฏิกิริยา saponification หยุดปฏิกิริยา (Saxena, 2004)

ลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบของ Polyvinyl alcohol ที่สามารถจำแนกออกเป็นส่วนย่อยดังโครงสร้าง ดังนี้



โดยที่ค่า R = H or COCH₃

การนำ Polyvinyl alcohol ไปใช้งาน มีการนำไปประยุกต์ใช้ในหลายด้านในอุตสาหกรรมอาหารที่สัมพันธ์กับสารเคลือบ ซึ่งเป็น สารเคลือบแผ่นฟิล์มเฉพาะที่กั้นความชื้นหรือป้องกันคุณสมบัติตามที่ต้องการ อย่างเช่น องค์ประกอบของสารเคลือบยาเม็ดที่ผลิตขึ้นรวมไปถึงผลิตอาหารเสริมชนิดเม็ด สาร Polyvinyl alcohol จะป้องกันการทำงานขององค์ประกอบจาก ความชื้น ก๊าซออกซิเจน และสารอื่นๆจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ขณะที่เวลาเดียวกันจะทำให้เกิดกลิ่นและรสได้ จะช่วยให้ขึ้นรูปง่ายของผลิตภัณฑ์ที่เสร็จสมบูรณ์และสะดวกในการกลืนเข้าไปในร่างกาย ความเหนียวของ Polyvinyl alcohol จะถูกนำไปใช้เป็นสารเคลือบยาเม็ด แคปซูล หรือในรูปแบบของฟิล์มเคลือบอื่นๆ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสารที่มีองค์ประกอบของแข็งที่สูงได้

ระดับปริมาณการใช้ Polyvinyl alcohol ในหมวดอาหารต่างๆ

Polyvinyl alcohol อาจจะถูกใช้ในอาหารที่มีความชื้นสูงเพื่อเก็บรวบรวมรสชาติที่ดี เนื้อสัมผัสและคุณภาพของอาหาร ผลิตภัณฑ์ลูกกวาดยังมี Polyvinyl alcohol เพื่อที่จะช่วยป้องกันความชื้นได้ ระดับปริมาณการใช้ของ Polyvinyl alcohol จะถูกพัฒนาให้ใช้ 2.3 mg PVA/cm² ในน้ำละลายเคลือบฟิล์ม ส่วนระดับปริมาณ Polyvinyl alcohol มากสุดมักใช้สำหรับผลิตภัณฑ์สุดท้าย final food โดยที่จะเลือก

ผลิตภัณฑ์ประเภทที่ไวต่อความชื้นมาก โดยประเมินค่าพื้นที่ผิวหน้าต่อองค์ประกอบ และเป็นที่น่าสนใจว่าการเคลือบของพื้นที่ผิวหน้าทั้งหมดประกอบด้วย Polyvinyl alcohol ดังแสดงตามตารางที่ 2.2 ปริมาณของ PVA ที่กำหนดให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสาร Polyvinyl alcohol ที่กำหนดให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Saxena, 2004)

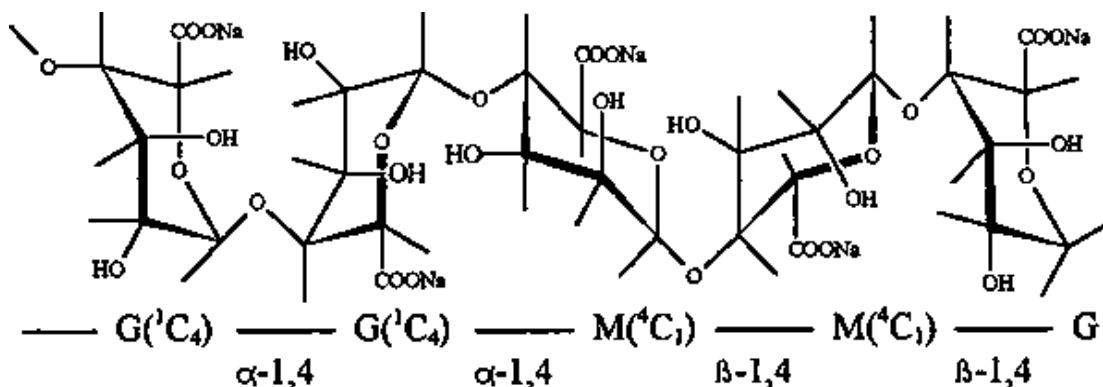
ระดับปริมาณการใช้ Polyvinyl alcohol		
หมวดของอาหาร	ประเภทอาหารที่นำมาใช้	ปริมาณการใช้ Polyvinyl alcohol (%)
Dairy-based desserts	Ice cream and frozen yogurt with inclusions	0.2
Confectionery	Multi-component chocolate Bars	1.5
Cereals and cereal products	Ready to eat breakfast cereals with dried fruits	0.5
Food supplements	Food supplement tablets	1.8
Ready to eat savories	Nut and fruit mixtures	1.5

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาในอาหาร

ผลิตภัณฑ์อาหารที่มี Polyvinyl alcohol จะถูกเตรียมไว้เพื่อใช้ จะมีค่า pH เป็นกลางและเก็บที่สภาวะอุณหภูมิต่ำหรือที่อุณหภูมิห้อง จะไม่ทำให้ไม่มีผลต่อองค์ประกอบของ PVA ในทำนองเดียวกัน ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ Polyvinyl alcohol ที่มีค่า pH ช่วงเป็นกลางและไม่ส่งผลกระทบต่อระบบใด ๆ และต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เพราะว่า สารละลาย Polyvinyl alcohol จะมีความเสถียร อยู่ด้วยนั่นเอง โครงสร้างของ Polyvinyl alcohol จะไม่สามารถเป็นสื่อหรือมีพลังงานเพียงพอในการทำปฏิกิริยา hydrolysis ของกลุ่ม ester ที่เหลืออยู่ หรือเกิดปฏิกิริยากับ esterification โดย secondary alcohols กับไฮดรอกซิลที่ประจุลบ หรือโมเลกุลเป็นกลางที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว อย่างน้อย 1 คู่ (relatively strong nucleophiles) ภายใต้อุณหภูมิที่แสดงถึงการใช้และการเก็บรักษา จะเป็นปฏิกิริยาที่ไม่สำคัญระหว่าง Polyvinyl alcohol และ องค์ประกอบของอาหาร (Saxena, 2004)

2.10.2 Sodium Alginate (โซเดียมแอลจิเนต)

มีสูตรโครงสร้างเป็น $(C_6H_7NaO_6)_n$ มีรูปแบบการจับตัวของโครงสร้างภายในเป็นดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของ Sodium Alginate (Phillips et al, 1990)

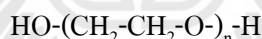
โซเดียมแอลจิเนต จะเป็นเกลือโซเดียมของกรดแอลจินิก ซึ่งสูตรโมเลกุลเป็น $NaC_6H_7O_6$ ซึ่ง dry stuffs โซเดียมแอลจิเนตเป็น กัม ชนิดหนึ่งที่สกัดจากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาล โซเดียมแอลจิเนตเป็นกัมที่ไม่มีรสชาติ หรือมีรสชาติอ่อนมันใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อเพิ่มความหนืด และเป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ มักใช้ในงานทันตกรรม เป็นรอยพิมพ์ของฟัน และใช้ทำยาเม็ดที่ร่างกายไม่สามารถย่อยสลายได้ หลักสำคัญของการประยุกต์ใช้โซเดียมแอลจิเนต คือประยุกต์ใช้เป็นการพิมพ์ปฏิบัติการย้อมสี และค่าความเหนียว สำหรับตัวอิมัลซิไฟเออร์ อย่างเช่น สีย้อมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับผ้าฝ้ายในการย้อมสีสิ่งทอ และการย้อมสีบนพรม สารแอลจิเนตจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารย้อมสีนี้ และสามารถล้างออกได้ง่าย ซึ่งแตกต่างจาก starch based thickeners (Wang et al., 2007)

โซเดียมแอลจิเนต เป็นสารที่สามารถรวมตัวกับสารจำพวกสารพิษจากปฏิกิริยาได้ อย่างเช่น สารไอโอดีน 131 กับสารสตรอนเทียม 90 จากร่างกาย ที่มีการดูดซับไว้ภายในร่างกายและ ในส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยา มักจะนำโซเดียมแอลจิเนตครึ่งออนซ์ใหม่โดยรวมในสารเติมแต่งอาหาร sodium alginate ใช้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตอาหารเจล เช่น bakers Chellies มักจะให้ลักษณะเป็นแยม alginate นอกจากนี้เครื่องเทศบรรจุในมะกอกก็อกเทล มักจะฉีดแอลจิเนตเป็นของผสมในเวลาเดียวกัน ส่วนอีกตัวอย่างหนึ่ง ของของผสมเป็นชุดต่อมาโดย immersing มะกอกในสารละลายเกลือแคลเซียมซึ่งทำให้เกิดเจล รวดเร็วโดยไฟฟ้าสถิต cross - เชื่อมโยงกัน ในกระบวนการที่คล้ายกันนี้สามารถนำมาใช้เพื่อให้เกิดลักษณะ chunks ของอาหารแมว เช่น "แฮม" ที่ขึ้นรูปใหม่หรือผลิตภัณฑ์จากปลา หรือ ชิ้นของผลไม้

พายที่มี E number – 401 ปัจจุบันใช้ในการทดสอบทางชีวภาพสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์อื่นๆ ในปีล่าสุดสารโซเดียมอัลจินเตถูกนำมาใช้ในการผสมลงในอาหาร ที่ร้านอาหารระดับโลกเช่น Ferran Adria บุกเบิกเทคนิคและได้รับตั้งเต้ใช้พ่อครัว Grant Achatz และ Heston Blumenthal โดยใช้โซเดียม อัลจินเต ร่วมกับแคลเซียมแลกเตต หรือสารที่คล้ายกันเพื่อสร้างทรงกลมของของเหลว ล้อมรอบด้วยเยื่อแผ่นบาง นอกจากนี้สารอัลจินเตจัดอยู่ในกลุ่มองค์ประกอบ ถือเป็นว่ามีความปลอดภัยโดยปกติทั่วไป ตามที่องค์การอาหารและยากำหนด (GRAS by FDA) และสารอัลจินเตไม่ได้มีการแสดงความเป็นพิษ หรือมีการกระตุ้นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (Espevik et al., 1993)

2.10.3 Polyethylene oxide (พอลิเอทิลีน ออกไซด์)

มีหลายชื่อเรียก epoxyethane, ethylene oxide, dimethylene oxide, oxacyclopropane สูตรโมเลกุล C_2H_4O มีมวลโมเลกุล 4.05 g mol^{-1} , จุดเดือด $10.7 \text{ }^\circ\text{C}$ และจุดหลอมเหลว $-111.3 \text{ }^\circ\text{C}$ Poly ethylene oxide (PEO) เป็นโพลิโเมอร์หรือพอลิเมอร์ของ Ethylene oxide ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ $20,000 \text{ g/mol}$ ถ้ามีมวลโมเลกุลต่างกัน ก็จะทำให้ การนำไปประยุกต์ใช้ต่างกัน และคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกันด้วย อย่างเช่น ค่าความหนืด ตามความยาวของพันธะ ซึ่งคุณสมบัติทางเคมี มีโครงสร้างดังนี้



PEO สามารถที่จะเป็นตัวกั้นและนำอิเล็กตรอนตัวทำละลายในเซลล์ polymer lithium ซึ่งจะต้องใช้อุณหภูมิสูง ในขณะที่การตกผลึกของพอลิเมอร์สามารถที่จะ degrade performance เช่น เกิดจำนวนมากสามารถที่จะทำให้เกิด kinetic barrier เป็นผลึกได้ เอทิลีนออกไซด์จัดเป็นสารก่อมะเร็งกับมนุษย์โดย International Agency for Research on Cancer (IARC) (Zimakova and Dymenta, 1967) และปริมาณระหว่าง 250 และ 700 ppm จะเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สารอันตรายนี้ห้ามใช้ในโรงงานตามข้อกำหนดของรัฐบาลสหภาพยุโรป (Lefort, 1935)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การจัดหาตัวอย่างเส้นไหม

3.1.1 ตัวอย่างเส้นไหมในประเทศไทย ซึ่งสามารถแยกออกเป็น 2 ชนิด คือ เส้นไหมเหลืออง และเส้นไหมขาว ซึ่งเส้นไหมขาวจะตรงกับวัตถุประสงค์ในการเลือกใช้มากกว่าเส้นไหมเหลืออง โดยที่งานทดลองนี้ใช้เพียงเฉพาะเส้นไหมดิบขาว ซึ่งพันธุ์ไหมที่ใช้เป็นพันธุ์ไหมผสมไทย – จีน ความหนาของเส้นไหม 21 Dinier จากบริษัท บดินทร์ไหมไทย-โคราช อ.ปักธงชัย จ. นครราชสีมา

3.1.2 การเตรียมตัวอย่างไฟโบรอินเบื้องต้น และการวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

ในการทดลองครั้งนี้เตรียมตัวอย่างไฟโบรอิน โดยนำเส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวไหม ทำละลายด้วยสารละลายผสมคัดแปลงจากวิธีของ Ajisawa (CaCl_2 : H_2O : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ในอัตราส่วน 8:9:1:4 ตามลำดับ) (Yamada et al., 2001) ซึ่งอัตราส่วนในการทำละลายเส้นไหมต่อสารทำละลายเป็น 9:100 โดยน้ำหนัก ให้ความร้อนด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ที่มีความถี่ในช่วง 1.6 -30 GHz และมีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 187- 10 mm.หรือเทียบเท่า จะได้สารละลายไฟโบรอินใส จากนั้นทำการกำจัดเกลือโดยใช้วิธี dialysis ผ่านเยื่อกรองเมมเบรนที่มีขนาดรู 10,000 MW ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นทำแห้งโดยวิธี freeze dry จะได้ผงไฟโบรอิน หรือ fibroin powder ตามที่ต้องการ จัดเก็บในถุงที่ปิดสนิท (ดัดแปลงจาก: Lin et al., 2008)

การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

วิเคราะห์ปริมาณเกลือตามวิธี AOAC (2000)

โกลใช้สารละลายเส้นไหมธรรมชาติที่ผ่านการกำจัดเกลือออกแล้ว ปริมาตร 5.0 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml. เติม 0.1 N AgNO_3 ปริมาตร 15.0 ml. แกว่งผสมให้เข้ากัน และเติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 10.0 ml. ต้มให้เดือด จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50.0 ml. เติม ferric alum indicator 5.0 ml. แกว่งผสมให้สารละลายเข้ากัน นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N Potassium thiocyanate (KSCN) จนได้จุดยุติสีน้ำตาลอ่อน และคำนวณปริมาณเกลือจากสูตร

$$\text{ปริมาณเกลือคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(A - B) \times N \times 0.05845 \times 100}{W}$$

W

- เมื่อ A = ปริมาตร AgNO_3 ที่ใช้ (ml)
 B = ปริมาตร KSCN ที่ใช้ (ml)
 N = ความเข้มข้นของ KSCN (N)
 0.05845 = factor
 W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (g)

3.2 การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มผสมพอลิเมอร์

การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินด้วยผงไฟโบรอิน จากวิธีการดัดแปลงจาก Um and Park (2007) ; Li et al. (2002) ; US5951506 (2004).

จากการที่ได้ผงโปรตีนไฟโบรอินละลายเป็นสารละลายไฟโบรอิน 1.5% ผสมสารพอลิเมอร์เข้มข้น 3% จำนวน 3 ชนิดคือ Polyvinyl alcohol (PVA), Poly ethylene oxide (PEO) และ Sodium alginate (AG) ในส่วนผสมของแผ่นฟิล์มผสมโดยใช้อัตราส่วนผสมสารพอลิเมอร์ต่อโปรตีนไฟโบรอิน 100:0, 70:30, 50:50 และ 30:70 ตามรายละเอียด ดังนี้

PEO 100: 0 Polyethylene oxide 100 ส่วน: Fibroin 0 ส่วนโดยน้ำหนัก

PEO 70: 30 คือ Polyethylene oxide 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก

PEO 50: 50 คือ Polyethylene oxide 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก

PEO 30: 70 คือ Polyethylene oxide 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก

AG 100: 0 คือ Sodium alginate 100 ส่วน: Fibroin 0 ส่วนโดยน้ำหนัก

AG 70: 30 คือ Sodium alginate 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก

AG 50: 50 คือ Sodium alginate 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก

AG 30: 70 คือ Sodium alginate 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก

PVA 100: 0 คือ Polyvinyl alcohol 100 ส่วน: Fibroin 0 ส่วนโดยน้ำหนัก

PVA 70: 30 คือ Polyvinyl alcohol 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วนโดยน้ำหนัก

PVA 50: 50 คือ Polyvinyl alcohol 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วนโดยน้ำหนัก

PVA 30: 70 คือ Polyvinyl alcohol 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วนโดยน้ำหนัก

จากนั้นเมื่อผสมเข้ากันแล้วตามแต่ละอัตราส่วน นำสารละลายเทลงบน Polystyrene plate ให้มีความหนาประมาณ 2-3 mm. จากนั้นนำ plate ที่ได้ทำการเคลือบสารละลายผสม ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40-50 °C เป็นเวลา ข้ามคืน จากนั้นทำการลอกแผ่นฟิล์มแล้วนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพต่อไป และเพื่อคัดเลือกสูตรที่คิดว่าเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นแผ่นฟิล์มปิดแผลในสัตว์ทดลองต่อไป

3.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

3.3.1 การวัดลักษณะ Mechanical testing

เมื่อได้แผ่นฟิล์มที่ต้องการ นำมาวัดค่า Mechanical testing ซึ่งประกอบไปด้วย Yong's modulus tensile strength และ % elongation โดยตัดแปลงวิธีการจาก Biman, et al. (2009); Li et al. (2002); และมาตรฐานการทดสอบพอลิเมอร์ ASTM D882.

โดยที่ ตัดแผ่นฟิล์มในรูปของ dumbbell โดยตัดที่ช่วงกลางแผ่น ให้ได้ขนาด 30 mm x 10 mm หนา 1 mm และกำหนดค่าตัวจับยึดระหว่างตำแหน่งที่จับ 2 ด้านเป็นค่า distance 10 mm ใช้อัตราในการวัดเป็น 20 mm/min ทำ 3 ซ้ำ บันทึกค่า

การคำนวณค่า Strain rate (ASTM - D882, Thin Plastic Sheeting) ดังนี้

$$A = BC$$

A = อัตรา grip separation, mm (or in)/ min

B = กำหนดค่า distance ระหว่าง grip, mm (or in)

C = กำหนดค่า Strain rate, mm/mm·min (or in/in·min)

$$\begin{aligned} \text{ค่า \% elongation} &= \text{ค่าความยืด ณ จุดขาด จะแสดงเป็นค่าร้อยละของความยาวเดิม} \\ &= \frac{\text{ค่า Final length} - \text{ค่า Initial Length}}{\text{ค่า Initial Length}} \times 100\% \end{aligned}$$

3.3.2 การตรวจวัดคุณสมบัติด้วย SEM (Scanning Electron Microscope)

การวัดตัวอย่างฟิล์มโปรตีนผสมที่ได้จาก ไฟโบรอิน และสารพอลิเมอร์อื่น ๆ ที่ใช้เป็น ส่วนผสมของแผ่นฟิล์ม สามารถสังเกตได้จากภาพถ่ายของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยาย ให้เห็นถึงโครงสร้างภายในของวัตถุได้ โดยที่สามารถใช้กำลังขยายสูง ๆ ได้ โดยที่ตรวจวัดคุณสมบัติ บนพื้นผิวของแผ่นฟิล์มและลักษณะการตัดขวางของแผ่นฟิล์ม (cross section) ซึ่งเครื่องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน รุ่น JSM-6400 Scanning Microscope ใช้คลื่นลำอิเล็กตรอน 10 kV ที่กำลังขยาย 500x บนพื้นผิวและกำลังขยาย 2,000x ของภาพตัดขวางของฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสมเพื่อดูลักษณะของ โครงสร้างของการรวมตัวระหว่างสารพอลิเมอร์ และ โปรตีนไฟโบรอิน ที่มีความหนาเฉลี่ยอยู่ที่

0.044 mm (อยู่ระหว่าง 0.03-0.06 mm) จากการเตรียมแผ่นฟิล์ม 15 ml/plate โดยเคลือบบน polystyrene plate ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C ขำมคั้นและเก็บไว้ที่ตู้ความชื้นก่อนนำตัวอย่างไปตรวจวัดด้วย SEM (Um and Park, 2007)

3.3.3 การตรวจวัดคุณสมบัติ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ใช้เครื่องตรวจวัด Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รุ่น Perkin Elmer model Spectrum GX ใช้ รังสีอินฟราเรด wave number ในช่วง 4,000 – 400 cm^{-1} ซึ่งอยู่ในช่วง Middle Infrared คือช่วง wave number 4,000 – 200 cm^{-1} ที่สามารถให้ค่าการวัดที่ดีที่สุด การวัดค่า FTIR ของ SF powder ที่มีการวัดรูปแบบโครงสร้างสามรูปแบบ (random coil, α -helix and β -sheet) ของไฟโบรอิน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ สภาวะการเตรียมของตัวอย่างด้วย แต่ละโครงสร้างพันธะภายในของไฟโบรอินจะมีค่าการดูดกลืน FTIR spectrum ต่างกัน คือ ในรูปแบบโครงสร้าง β -sheet จะมีค่า การดูดกลืน FTIR spectrum ที่ 1630, 1530, 1265 และ 700 cm^{-1} ส่วนรูปแบบโครงสร้าง random coil / α -helix นั้นจะมีค่า 1660,1540,1265 และ 650 cm^{-1} ซึ่งค่า spectrum ของไฟโบรอิน ที่แสดงค่า strong absorption band ของ β -sheet ที่ 1630 cm^{-1} (amide I, CO ,and CN stretching), 1530 cm^{-1} (amide II), 1265 cm^{-1} (amide III, predominantly NH bending and CN stretching, plus other minor vibration modes), and 700 cm^{-1} (amide V,CN torsion, and NH bending) (พรพิมล ฮวดสุวรรณ, 2553) หรือตามตารางสรุปค่า Spectrum ได้จาก FTIR ของโปรตีนไฟโบรอินดังตารางที่ 3.1 และตารางสรุปค่า spectrum ที่ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ที่รวบรวมจากงานวิจัยต่าง ๆ (ตามตารางที่ 3.2 เป็นต้นไป) ซึ่งจะให้เห็นค่าที่บ่งบอกความเหมือนกันของรูปแบบโครงสร้างตามค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 3.1 แสดง Vibrational band assignments for the amide I region of silk fibroin

Wave number range (cm-1)	Secondary structure assignment
1,605-1,615	(Try) side chains/aggregated strands
1,616-1,621	Aggregate β -strand/sheet (weak) ^a
1,622-1,627	β -sheets (strong) ^a
1,628-1,637	β -sheets (strong) ^b
1,638-1,646	Random coils/extended chains
1,647-1,655	Random coils
1,656-1,662	α - Helix
1,663-1,670	Turns
1,671-1,685	Turns
1,686-1,695	Turns
1,697-1,703	β -sheets (weak) ^a

^a Intermolecular β -sheets; ^b Intramolecular β -sheets

ที่มา: Lawrence ,Omenetto , Chui , and Kaplan (2008)

ตารางที่ 3.2 ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy

Wave number range (cm-1)	Structure assignment
1229	Functional group of silk protein in solid state (Amide III)
1514	Functional group of silk protein in solid state (Amide II)
1620-1622	β -sheets (Amide I)
1646	Random coils (Amide I)
1662	α - Helix (Amide I)
1680	Turns (Amide I)
1697-1698	β -sheets (weak) ^a (Amide I)
3278	Functional group of silk protein in solid state (N-H stretching)

ที่มา: กาญจนา อุทัยฉาย, สอนอง เอกสิทธิ์ และ ชูชาติ ธรรมเจริญ (2550)

ตารางที่ 3.3 ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy

Wave number range (cm-1)	Structure assignment
650	Random coils (Amide V)
1235	Random coils (Amide III)
1265	β -from or silk II (Amide III)
1530	β -from or silk II (Amide II)
1540	Random coils (Amide II)
1630	β -from or silk II (Amide I)
1658	Random coils or silk I from (Amide I)

ที่มา : Yang, Zhang, and Park (2000)

ตารางที่ 3.4 ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy

Wave number range (cm-1)	Structure assignment
1235	Non-crystalline (Amide III)
1540	Non-crystalline (Amide II)
1655	Non-crystalline (Amide II)

ที่มา : Um and Park (2007)

ตารางที่ 3.5 ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy

Wave number range (cm-1)	Structure assignment
671	(Amide V) β -from
987	Gly-Ala
1014	Gly-Gly
1230	α - Helix (Amide III, C-N, N-H bond)
1521	β -from (Amide II, C-N, N-H bond)
1624	β -from (Amide I, C=O)

ที่มา : Sashina, Vnuchkin, and Novoselov (2006)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ค่าข้อมูลและเปรียบเทียบทางสถิติ (ANOVA) ใช้วิเคราะห์ค่า Tensile strength และ % elongation จะใช้โปรแกรมการคำนวณ SAS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range ที่ $p < 0.05$ (Acharya and Kundu., 2009)

3.5 การตรวจวัดประสิทธิภาพการเลี้ยงเซลล์ (Pre-cell culture test)

ทดสอบแผ่นฟิล์มไฟโบรอินสูตรต่างๆ โดยการจุ่มกับ Methanol 30 นาทีเพื่อเหนี่ยวนำโครงสร้างของไฟโบรอิน silk I (random coil, Crankshaft model) ไปเป็น silk II (antiparallel β -sheet structure) หรือเป็นลักษณะ water-insoluble และให้มีสภาพคงทน (Li et al., 2008) ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนแช่ทดสอบด้วย Phosphate buffer เป็นเวลา 1-7 วัน ดังภาพที่ 3.1 เพื่อดูลักษณะการคงสภาพของแผ่นฟิล์มก่อนนำไปใช้ในการเลี้ยงเซลล์ โดยทดสอบแผ่นฟิล์มตามสูตร ดังนี้

PEO 70: 30 คือ Polyethylene oxide 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วน โดยน้ำหนัก

PEO 50: 50 คือ Polyethylene oxide 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วน โดยน้ำหนัก

PEO 30: 70 คือ Polyethylene oxide 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วน โดยน้ำหนัก

AG 70: 30 คือ Sodium alginate 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วน โดยน้ำหนัก

AG 50: 50 คือ Sodium alginate 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วน โดยน้ำหนัก

AG 30: 70 คือ Sodium alginate 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วน โดยน้ำหนัก

PVA 70: 30 คือ Polyvinyl alcohol 70 ส่วน: Fibroin 30 ส่วน โดยน้ำหนัก

PVA 50: 50 คือ Polyvinyl alcohol 50 ส่วน: Fibroin 50 ส่วน โดยน้ำหนัก

PVA 30: 70 คือ Polyvinyl alcohol 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วน โดยน้ำหนัก

ซึ่งผลที่ได้ในการทดสอบขั้นต้น พบว่า แผ่นฟิล์มที่สามารถคงสภาพได้ดีในสารละลาย Phosphate buffer คือ แผ่นฟิล์ม PEO 30:70 ที่คงตัวได้ดีที่สุด เพราะแผ่นฟิล์มสูตรอื่นๆ ไม่คงสภาพ มีลักษณะยุ่ยและ ละลายน้ำได้เมื่อถูกแช่อยู่ใน Phosphate buffer นานอยู่ในช่วง 7 วัน ดังนั้นจึงทำการปรับเปลี่ยนสูตรอัตราส่วนในการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มโดยเลือกใช้ อัตราส่วนที่ต่ำกว่า ดังนี้

PEO 5: 95 คือ Polyethylene oxide 5 ส่วน: Fibroin 95 ส่วน โดยน้ำหนัก

PEO 10: 90 คือ Polyethylene oxide 10 ส่วน: Fibroin 90 ส่วน โดยน้ำหนัก

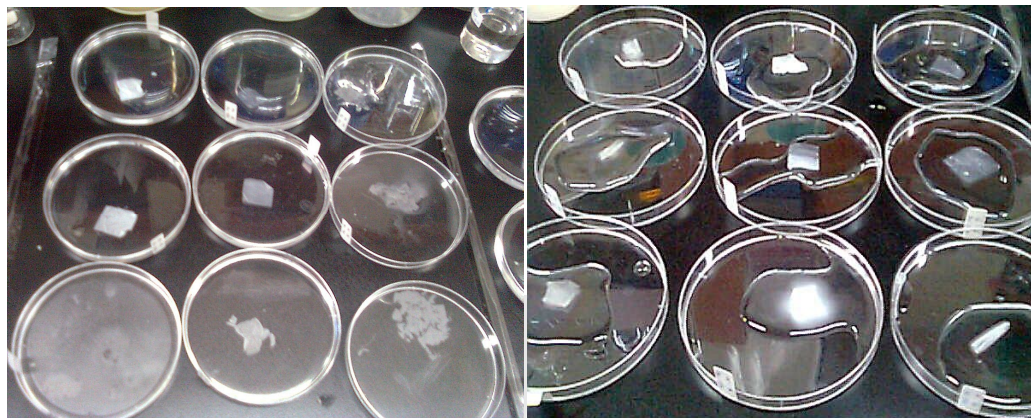
PEO 15: 85 คือ Polyethylene oxide 15 ส่วน: Fibroin 85 ส่วน โดยน้ำหนัก

PEO 20: 80 คือ Polyethylene oxide 20 ส่วน: Fibroin 80 ส่วน โดยน้ำหนัก

PEO 25: 75 คือ Polyethylene oxide 25 ส่วน: Fibroin 75 ส่วน โดยน้ำหนัก

PEO 30: 70 คือ Polyethylene oxide 30 ส่วน: Fibroin 70 ส่วน โดยน้ำหนัก

จากนั้นนำไปทดสอบจุ่มกับ Methanol 30 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนแช่ด้วย Phosphate buffer เป็นเวลา 7 วันเพื่อดูลักษณะการคงสภาพของแผ่นฟิล์มก่อนนำไปใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต่อไป



ภาพที่ 3.1 แสดงตัวอย่างในการทดสอบ pre-cell culture โดยดูลักษณะการเปื่อยยุ่ยของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ต่างๆ

3.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นฟิล์ม (cell culture test)

สูตรตำรับแผ่นฟิล์มที่ใช้ในการทดสอบ (จากการทดสอบในขั้นที่สองและเลือกเฉพาะสูตรที่สามารถคงตัวได้นานที่สุด) คือ

1. FB/PEO (90:10)
2. FB/PEO (85:15)

เซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

Human foreskin fibroblast (HFF-1, ATCC#SCRC-1041, American Types Culture collection, VA, USA)

สารเคมี

1. DMEM (high glucose, product number D5648, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
2. Fetal bovine serum (Gibco, Carifornia, USA)
3. Penicillin/streptomycin (Gibco, Carifornia, USA)
4. Ethanol (AR grade, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
5. Methanol (AR grade, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
6. Glutaraldehyde solution (25%, Grade II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
7. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, Ultra pure grade, Amesco®, Ohio, USA)
8. Dimethyl sulfoxide (AR grade, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)

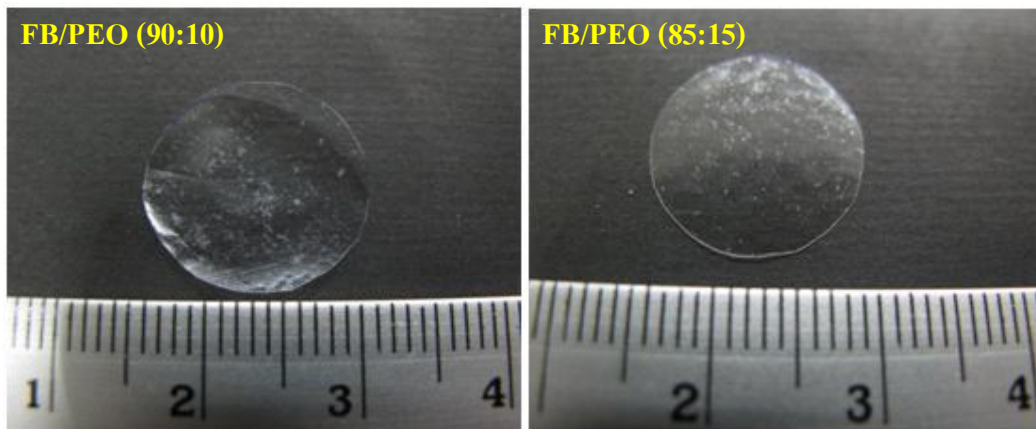
เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

1. Tissue culture flask (nuncTM, NUNC A/S, Roskilde, Denmark)
2. 24 well plate (Costar®, Corning Incorporated, NY, USA)
3. Cover glasses (Menzel-Glaser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Germany)
4. Microplate spectrophotometer (Multimode detector DTX 880, Bectan Coulter Inc., Fullerton, USA)
5. Scanning Electron Microscopy (1455VP, LEO Electron microscopy Ltd., Cambridge, UK)
6. CO₂ incubator (Forma series II, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)
7. Laminar flow hood (Heal force®, HF safe 1200/c+, Shanghai, China)

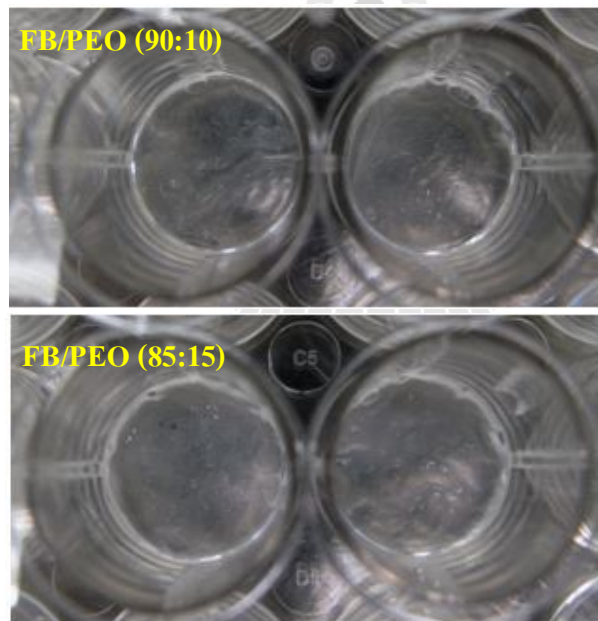
3.5.2 วิธีการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์บนแผ่นฟิล์ม

ในการทดลองเบื้องต้นสำหรับการเตรียมแผ่นฟิล์มก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น ต้องนำแผ่นฟิล์มมาทำการตัดให้มีขนาดพอดีกับภาชนะที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งในการทดลองนี้ ตัดแปลงวิธีจาก Sangsanoh et al. (2010) โดยภาชนะที่เลือกใช้ในการทดสอบคือ 24 well tissue culture plate ซึ่งแต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะของแผ่นฟิล์ม FB/PEO ทั้งสองสูตร คือ 90:10 และ 85:15 ที่ตัดให้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ซึ่งแผ่นฟิล์มทั้งสองชนิดมีลักษณะอ่อนนุ่มและยืดหยุ่นหลังจากได้แผ่นฟิล์มขนาดตามที่ต้องการแล้วจึงนำไปแช่ใน 100% methanol เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเหนียวน้ำให้แผ่นฟิล์มสามารถคงตัวอยู่ในน้ำได้ (water stable) จากนั้นจึงให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยแผ่นฟิล์มที่ผ่านขั้นตอนนี้มีลักษณะค่อนข้างแข็งมากขึ้น ต่อมาจึงนำแผ่นฟิล์มนั้นมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการแช่ในสารละลาย 70% ethanol เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงล้าง ethanol ออก 2 ครั้งด้วยน้ำ sterile แล้วใช้ forceps คีบแผ่นฟิล์มไปวางในหลุมของ 24 well tissue culture plate ดังที่แสดงในภาพที่ 3.3 ซึ่งแผ่นฟิล์มมีลักษณะอ่อนนุ่มและแนบสนิทพอดีกับก้นหลุมของ 24 well plate จากนั้น

1. เติม DMEM free serum ลงไป 500 μ L แล้วนำไป incubate ในตู้ CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C, 5%CO₂ ซ้ำมคืน
2. ทำการ trypsinized cells โดยใช้ 0.05% trypsin EDTA จากนั้นจึงทำการนับจำนวนเซลล์
3. เติม cell suspension ปริมาตร 1 mL ลงใน 24 well plate ที่มีแผ่นฟิล์มอยู่ โดยให้มีเซลล์จำนวน 40,000 cells/well
4. นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂
5. เปลี่ยน medium ใหม่ ทุกๆ 2 วัน



ภาพที่ 3.2 แสดงรูปถ่ายของแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรที่ตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร



ภาพที่ 3.3 แสดงรูปถ่ายของแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรที่ผ่านการแช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย sterile water 2 ครั้งและถูกนำมาวางไว้ในหลุมของ 24 well plate เพื่อที่จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3.5.3 การศึกษาเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิค MTT assay (Method modified from Brunot et al., 2008)

1. เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ครบกำหนดเวลา 2, 8, 24 ชั่วโมง, 3, 5 และ 7 วัน จึงทำการล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะอยู่บนแผ่นฟิล์มออก 2 ครั้ง ด้วย sterile PBS pH 7.4
2. จากนั้นใช้ forceps คีบเอาแผ่นฟิล์มออกไปใส่ในหลุมของ 24 well plate หลุมใหม่ เพื่อให้แน่ใจว่ามีแต่เซลล์ที่สามารถเกาะและเจริญอยู่บนฟิล์มเท่านั้น
3. เตรียมสารละลาย MTT ในอาหาร DMEM ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 mg/mL
4. เติมสารละลาย MTT ที่เตรียมไว้ลงในหลุม 24 well plate ปริมาตร 500 μ L/well
5. นำไป incubate ในตู้ CO₂ incubator อุณหภูมิ 37°C, 5%CO₂ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. ใช้ pipette ดูดสารละลาย MTT ที่ทิ้งไป และเติม DMSO ลงไป 500 μ L เพื่อละลายตะกอน formazan ที่เกิดขึ้น สุดท้ายจะได้สารละลายสีม่วง
7. ใช้ pipette ดูดสารละลายสีม่วงที่เกิดขึ้นไปย้ายไปใส่ใน 96 well plate โดยใส่ปริมาตร 150 μ L/well จากนั้นนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm

3.5.4 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม (Method modified from Sangsanoh et al., 2010)

1. เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ครบกำหนดเวลา 2, 8, 24 ชั่วโมง, 3, 5 และ 7 วัน จึงทำการ fix cells บนแผ่นฟิล์มด้วย 3%glutaraldehyde เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน cover glass
2. เมื่อครบกำหนดเวลาจึงล้างแผ่นฟิล์มและ cover glass อีกครั้งด้วย sterile water
3. จากนั้นจึงนำแผ่นฟิล์มและ cover glass มาผ่านกระบวนการ dehydration ด้วยการแช่ใน 30%, 50%, 70%, 90% และ 100% ethanol ตามลำดับ โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 2 นาที
4. ทิ้งให้แผ่นฟิล์มและ cover glass แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry)
5. นำชิ้นตัวอย่างที่แห้งเรียบร้อยแล้วไปติดบน aluminum stub แล้วนำไป coat ด้วยทอง สุดท้ายจึงนำไปตรวจดูรูปร่างลักษณะและการยึดเกาะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การจัดหาตัวอย่างเส้นไหมขาว (ดูลักษณะภายนอก)

เส้นไหมมีลักษณะความขาว เส้นเล็ก น้ำหนักใจละประมาณ 90 – 100 กรัม



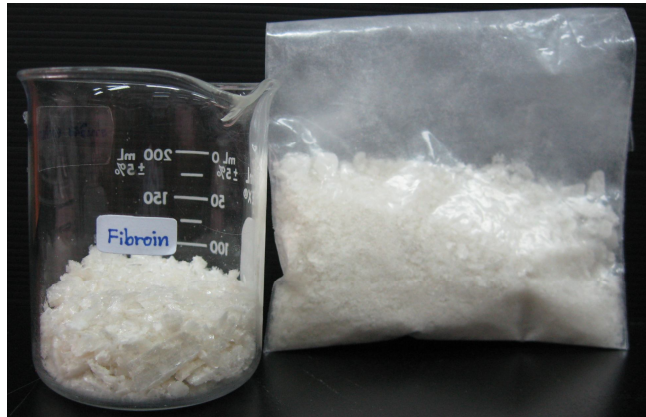
ภาพที่ 4.1 เส้นไหมขาวที่ใช้ในการทำงานทดลอง

เพื่อสกัดเอาสารซิริซินออกจากเส้นไหม ให้เหลือเพียงเฉพาะไฟโบรอินสำหรับนำไปทำการละลายด้วยสารละลายเกลือผสมจะได้สารละลายไหม (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 สารละลายไหม

สารละลายสีน้ำตาลเหลืองอ่อนขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีค่า conductivity หรือค่าการนำไฟฟ้าที่แสดงว่ามีประจุของสารละลายเกลือผสมอยู่ อยู่ที่ประมาณ 36-37 ms/cm และเมื่อทำการdialysis ด้วยน้ำบริสุทธิ์ และวัดค่า conductivity หลังจากผ่านการทำ dialysis อยู่ที่ประมาณ 328-360 μ s/cm หรือ น้อยกว่า จากนั้นทำแห้งด้วยวิธี Freeze drying จะได้ลักษณะผงไฟโบรอินสีขาว ดังภาพที่ 4.3 ก่อนนำผงไฟโบรอินไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มผสมกับสารพอลิเมอร์ต่าง ๆ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.3 ผงโปรตีนไฟโบรอิน



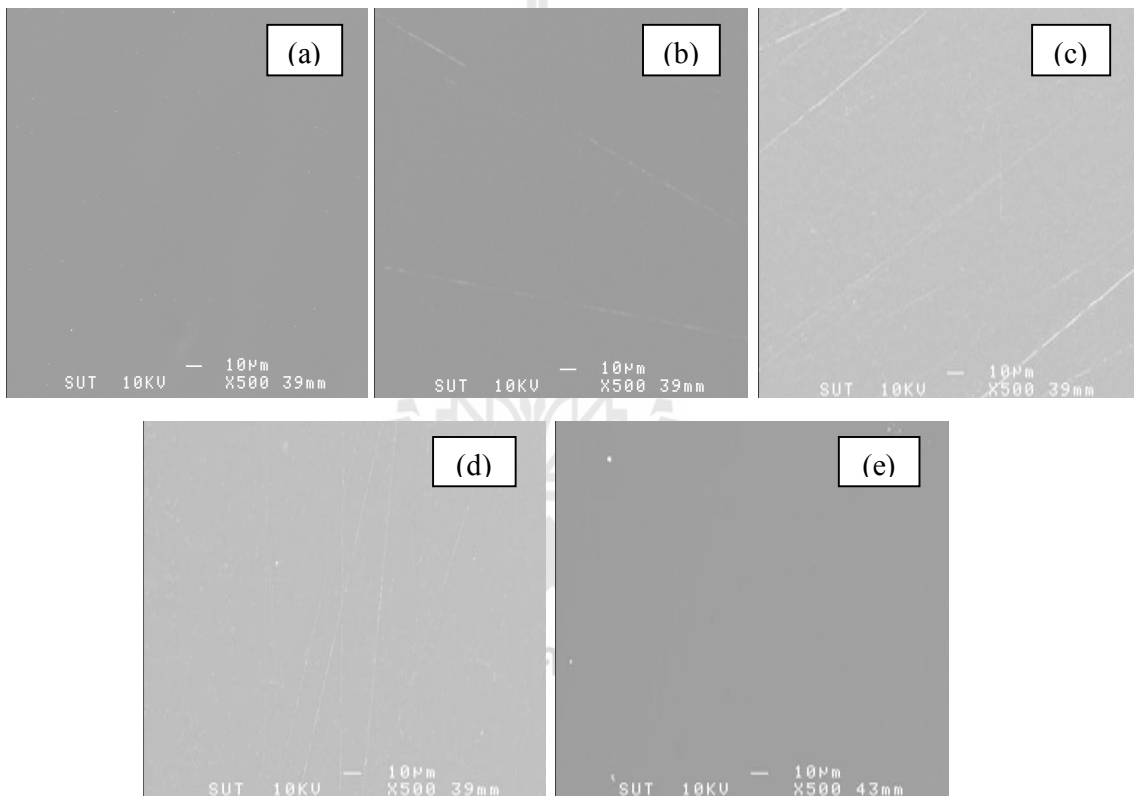
ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์

เมื่อได้แผ่นโปรตีนไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์แล้ว นำไปทดสอบทางกายภาพต่อเช่น SEM, FTIR spectroscopy, Mechanical testing เป็นต้น

4.2 ผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

4.2.1 การตรวจลักษณะแผ่นฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

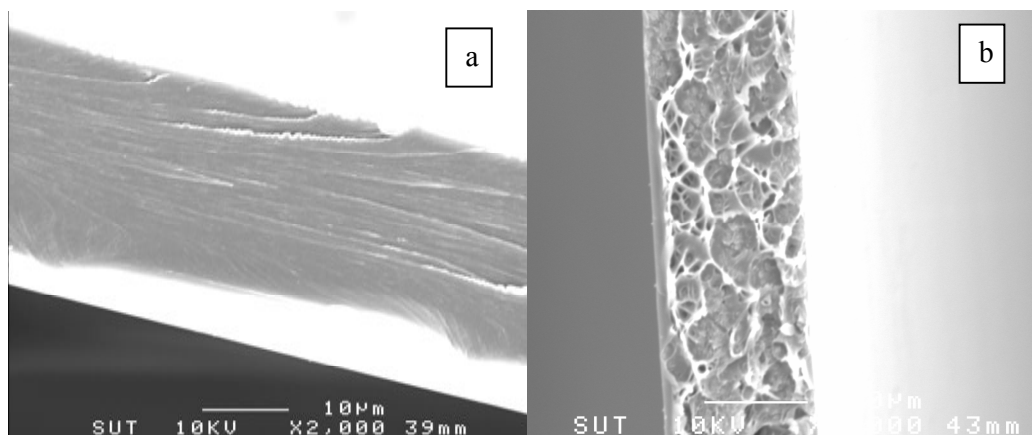
จากการศึกษาภาพพื้นผิวของแผ่นฟิล์มและภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน วัลด์ด้วยเครื่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนรุ่น JSM-6400 Scanning Microscope ใช้คลื่นลำอิเล็กตรอน 10 kV ที่กำลังขยาย 500x บนพื้นผิว ซึ่งให้ค่าไม่แตกต่างกัน คือจากภาพที่ 4.5 จะแสดงให้เห็นว่าพื้นผิวของแผ่นฟิล์มมีลักษณะผิวเรียบไม่พบรูอากาศ ทั้งแผ่นฟิล์มที่ผลิตขึ้นจากไฟโบรอินและฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินกับ PVA



ภาพที่ 4.5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน SEM ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินและแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C (a) FB 100: PVA 0, (b) FB 70: PVA 30, (c) FB 50: PVA 50, (d) FB 30: PVA 70, (e) FB 0: PVA 100

ส่วนการศึกษาภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์ม จะสามารถสังเกตลักษณะโครงสร้างของแผ่นฟิล์มที่กำลังขยาย 2,000x ของภาพตัดขวาง ของฟิล์ม โปรตีนไฟโบรอินและฟิล์ม โปรตีน

ไฟโบรอินผสม PVA จะเห็นว่า แผ่นฟิล์มที่มีเฉพาะ PVA จะมีลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวภายในเรียบสม่ำเสมอ ส่วนแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอิน จะมีลักษณะโครงสร้างภายในคล้ายร่างแห เป็นชั้นๆ ตามภาพที่ 4.6



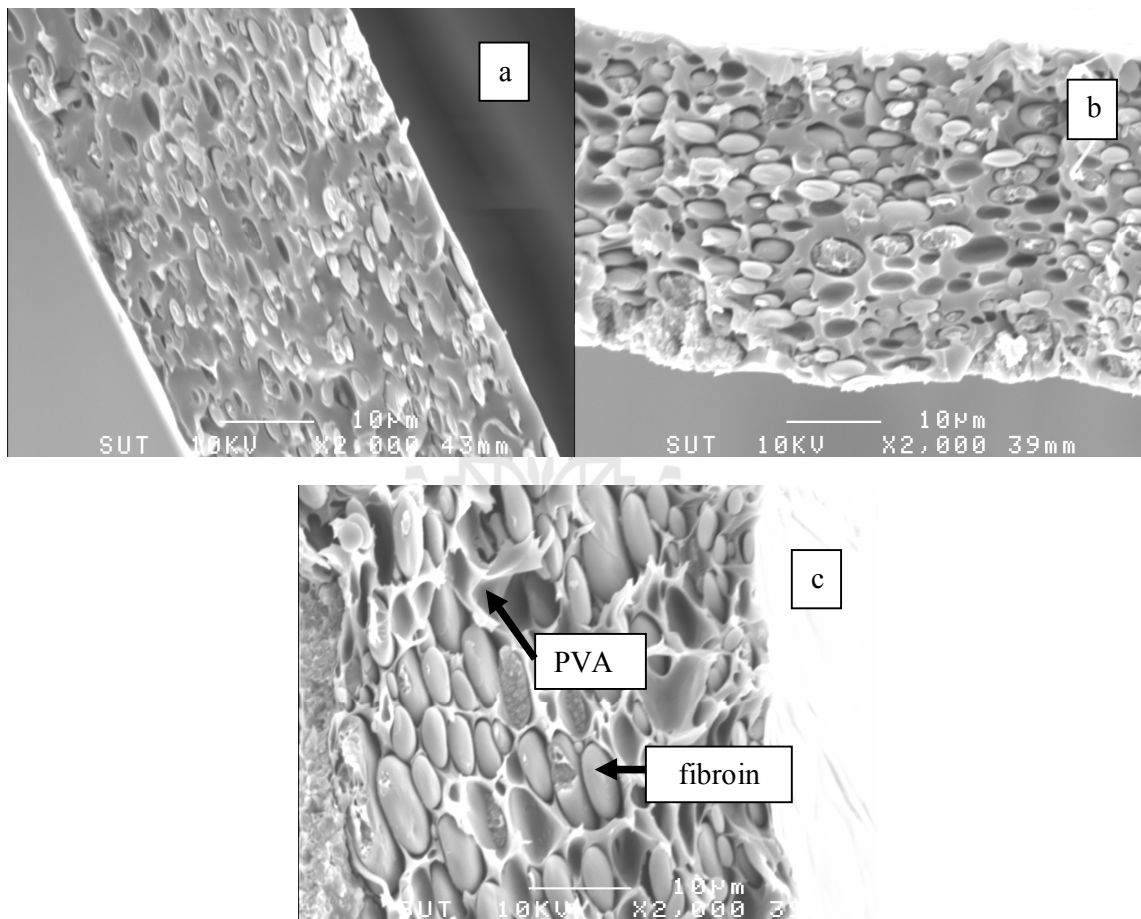
ภาพที่ 4.6 ภาพถ่าย SEM (a) ภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์ม polyvinyl alcohol (PVA) เข้มข้น 1.5% (b) ภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินเข้มข้น 1.5%

ส่วนของแผ่นฟิล์มผสมโปรตีนไฟโบรอิน กับ PVA ตามอัตราส่วน จะสังเกตเห็นว่า ลักษณะโครงสร้างของแผ่นฟิล์มจะคล้ายกับโมเลกุลของพันธะไฮโดรเจนของกรดอะมิโนในโปรตีน ยึดจับกับพันธะไฮโดรเจนของสาร PVA จึงเกิดลักษณะที่โอบล้อมโมเลกุลของไฟโบรอินให้อยู่ด้านในจากภาพถ่าย SEM ภาพที่ 4.7 พบว่าโอกาสการเกิดการแยกเฟสของสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินและ PVA จะสังเกตเห็นว่าเป็นสองลักษณะ อันดับแรกเห็น ลักษณะการกระจายตัวของไฟโบรอินและอีกเฟสจะเป็นเฟสต่อเนื่องของ PVA ตามภาพที่แสดงให้เห็น พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของสาร PVA จะทำให้การแยกของเฟสลดลง เนื่องจากการลดลงของขนาดโดเมนไฟโบรอิน (Um and Park, 2007) สามารถอธิบายได้ว่าสารละลายที่แสดงลักษณะเด่นส่วนใหญ่ จะเป็นตัวกำหนดการแยกเฟสว่าสามารถเกิดขึ้นได้หรือไม่ ซึ่งสามารถอธิบายเป็นสองลักษณะ คือ โมเลกุลของ SF มีความเสถียรในสารละลายผสม และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินและโมเลกุลของ PVA

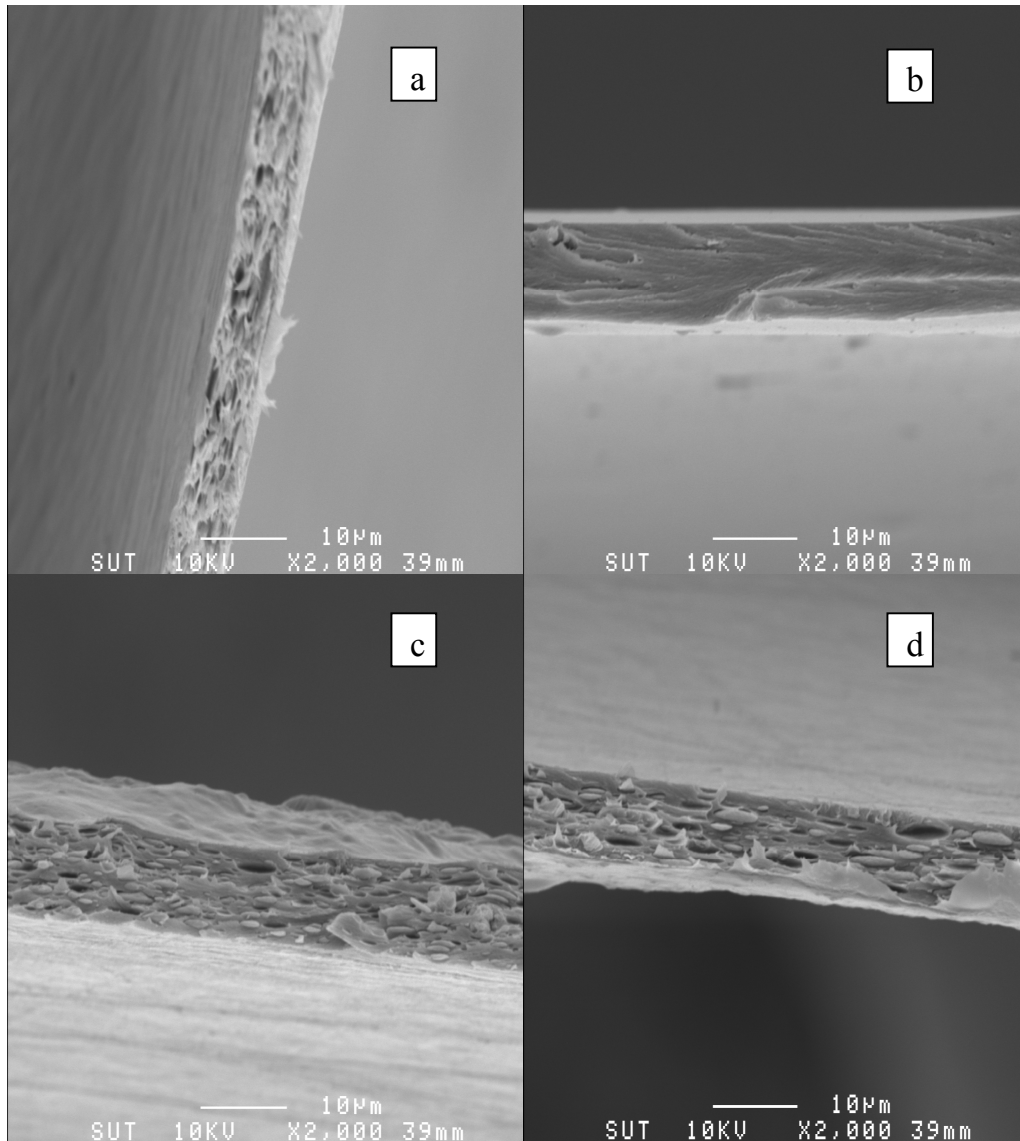
จากรายงานของ Um และคณะ (2001) พบว่า โมเลกุลของไฟโบรอิน ไม่เสถียรและเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำของกรดอะมิโน (hydrophobic amino acids) ของโมเลกุลไฟโบรอินในระบบคอลลอยด์ ก่อให้เกิดการรวมตัวกันและเกิดเจลขึ้น ในทางตรงกันข้าม โมเลกุลของ PVA ที่ละลายน้ำ จะพบเป็น

สารละลายที่เสถียรในระบบคอลลอยด์ จากความแตกต่างของความเสถียรของสององค์ประกอบในระบบคอลลอยด์ โมเลกุลของไฟโบรอินจะมีแนวโน้มที่จะรวมตัวกันและแยกออกจากกันในโดเมนของ PVA เมทริกซ์ และโมเลกุลของไฟโบรอินมี C=O และ N-H บ่งบอกความมีขี้้วของพันธะ มีความเป็นไปได้ที่จะมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มโมเลกุลมีขี้้วของอีกพอลิเมอร์หนึ่งได้

จากภาพทำให้เห็นว่าลักษณะของทรงกลมเป็นลักษณะของไฟโบรอิน ส่วนโมเลกุลที่ล้อมรอบเป็นโมเลกุลของ PVA (Um and Park, 2007)



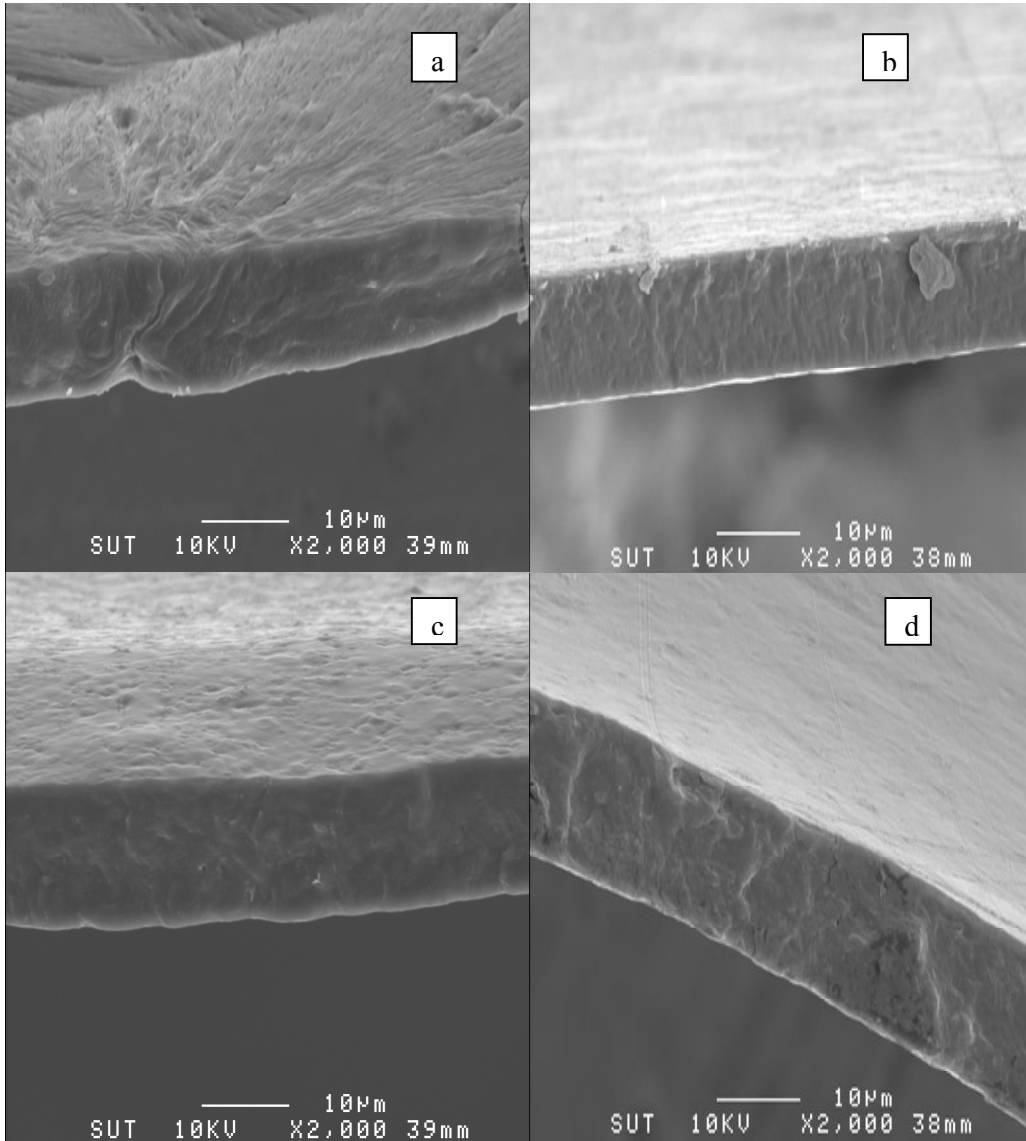
ภาพที่ 4.7 ภาพถ่าย SEM ของแผ่นฟิล์ม ผสมระหว่างไฟโบรอินกับ Poly vinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน (a) อัตราส่วน PVA 70: FB 30 (b) อัตราส่วน PVA 50: FB 50 (c) อัตราส่วน PVA 30: FB 70



ภาพที่ 4.8 แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Sodium alginate (AG) อัตราส่วน (a) AG 100: FB 0 (b) AG 70: FB 30 (c) AG 50 : FB 50 (d) AG30 : FB 70

จากภาพ SEM ที่ 4.8 จะพบว่า ลักษณะของพื้นผิวหน้าตัดของแผ่นฟิล์ม pure AG (Sodium alginate) นั้น จะมีลักษณะเรียบเป็นเนื้อเดียวกัน แสดงว่า Sodium alginate 3% นั้นมีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลมาก เพราะเมื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มผสมกับสารละลายไฟโบรอิน 1.5% และศึกษาพื้นที่หน้าตัดแล้ว พบว่า พื้นผิวเรียบ ลักษณะโครงสร้างไฟโบรอินถูกล้อมรอบด้วย sodium alginate ซึ่งจะคาดได้ว่า เกิดจาก

พันธะไฮโดรเจนหรือ แรง dipole ที่เกิดการจับกันของ H อะตอมระหว่างโครงสร้างของโปรตีนกับ sodium alginate และจากผลของ FTIR ให้ผลที่แสดงได้ถึงการรวมกันของพันธะ (Roh et al., 2006)



ภาพที่ 4.9 แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Poly (ethylene) oxide อัตราส่วน (a) PEO 100: FB 0 (b) PEO 30: FB 70 (c) PEO 50: FB 50 (d) PEO 70: FB 30

จากภาพที่ 4.9 จะสังเกตเห็นว่าลักษณะภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินกับสารละลาย PEO วัดที่ค่ากล้องขยาย 2,000x มีพื้นผิวเรียบเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่มีเพียงสาร

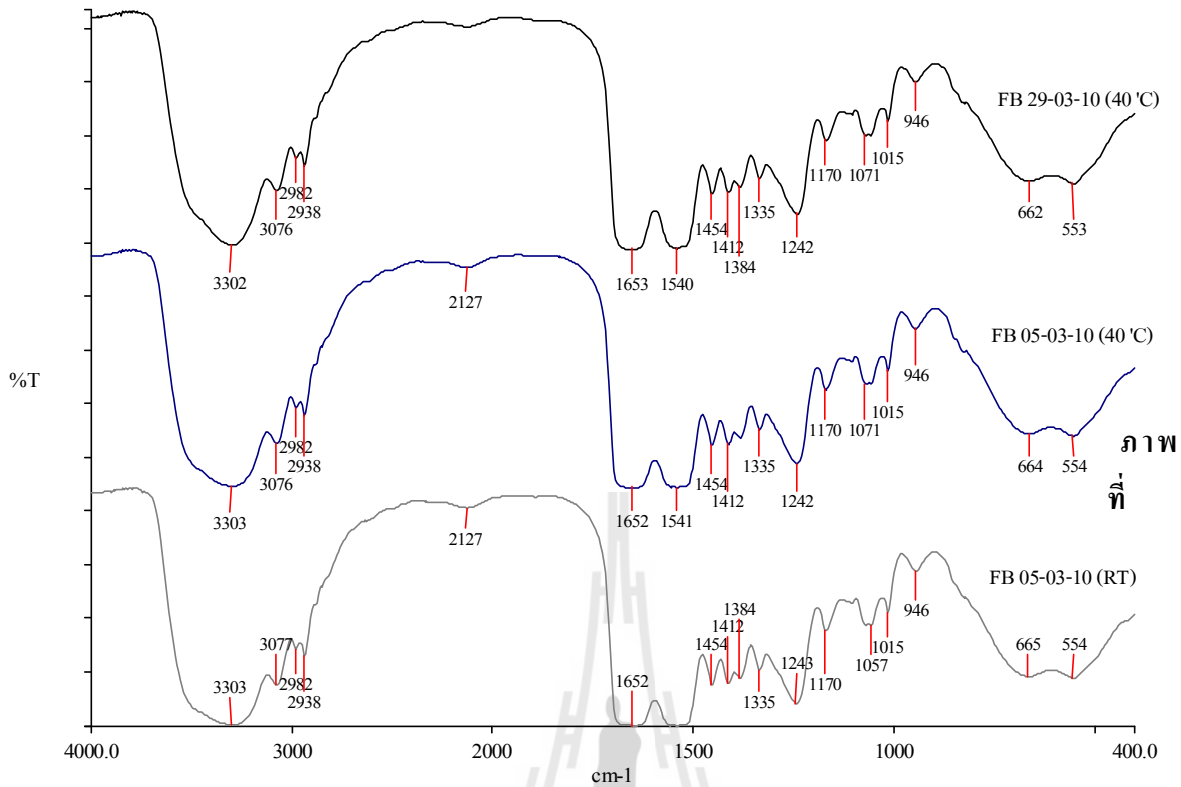
Poly (ethylene) oxide ซึ่งลักษณะที่ได้ นั้น เป็นลักษณะเนื้อเรียบเช่นเดียวกัน ทั้งอัตราส่วน PEO 70: FB 30 ที่มีปริมาณของ PEO มากกว่าไฟโบรอินซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าโปรตีนไฟโบรอินสามารถที่จะรวมตัวกับ Poly (ethylene) oxide ได้ดีทำให้เกิดลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งจะทำให้แผ่นฟิล์มผสมมีความเรียบ และเมื่อสังเกตลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มจากภาพ สามารถเห็นลักษณะความเรียบของผิวหน้าได้ด้วยเช่นกัน เนื่องจากแผ่นฟิล์มมีขนาดบางมาก ขณะทำการทดลองจึงใช้กำลังขยาย 2,000x อาจทำให้ลักษณะภาพของแผ่นฟิล์มตัดขวางมีขนาดเล็กกว่าได้

4.2.2 ผลการตรวจวัดแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ ด้วยวิธี FTIR Spectroscopy

จากการวัดที่ค่าใช้จ่ายเครื่องตรวจวัด Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รุ่น Perkin Elmer model Spectrum GX ใช้ รังสีอินฟราเรด wave number ในช่วง $4,000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่ง

4.2.2.1. ผลค่า FTIR ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสมกับ Polyvinyl alcohol (PVA)

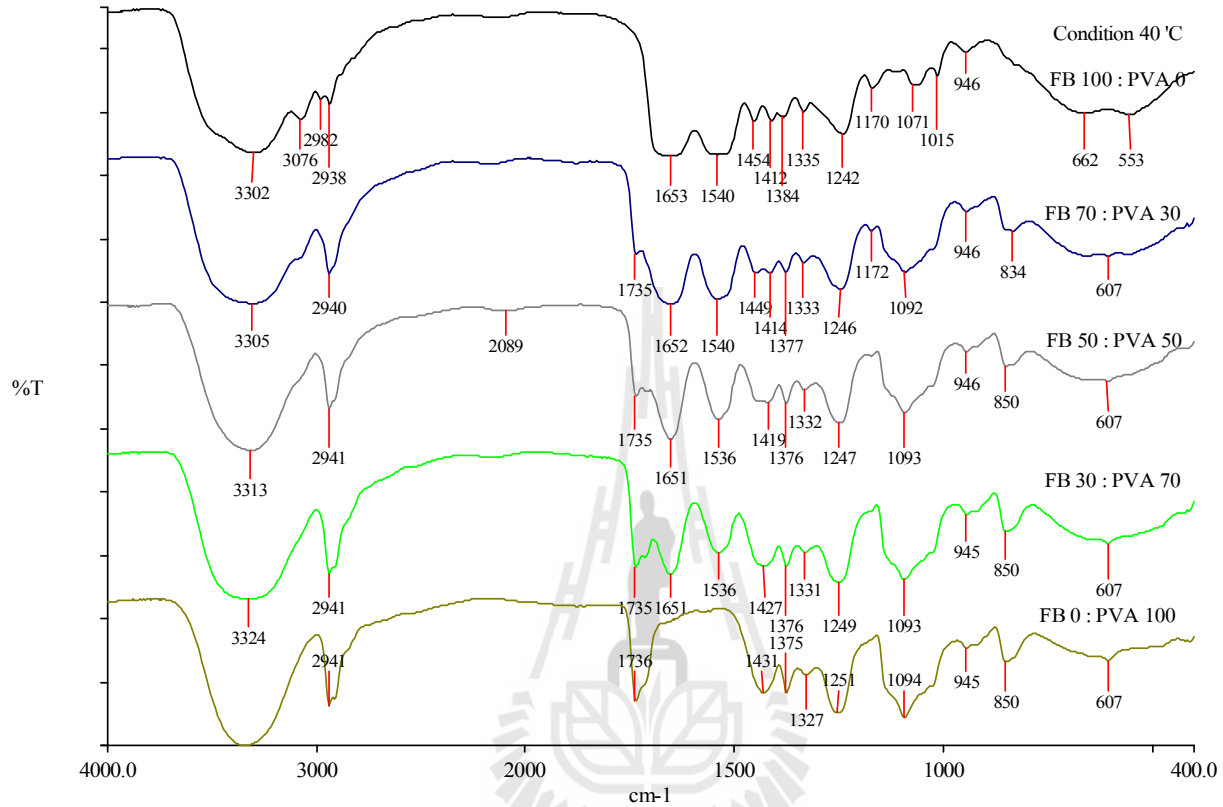
วัดค่าแผ่นฟิล์ม Pure fibroin 1.5% ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40°C และที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเปรียบเทียบลักษณะ โครงสร้างของ Fibroin จากตัวอย่างสารละลายไฟโบรอินที่ได้จากไหมเดียวกันแต่ทำการละลายคนละรอบ No.20-03-10 และ No.05-03-10 เพื่อเปรียบเทียบว่าเมื่อเป็นสารละลายไฟโบรอินแล้วจะให้ค่า Spectra แตกต่างกันหรือไม่เมื่อทำการละลายไหมคนละรอบ และผลที่ได้จากค่า Spectra แสดงผลค่า 1653 cm^{-1} (amide I), 1540 cm^{-1} (amide II), 1242 cm^{-1} (amide III), 662 cm^{-1} (amide V) ของ random coil ของ Fibroin ที่อุณหภูมิ 40°C No. 29-03-10 ส่วนค่า spectra ที่อุณหภูมิเดียวกัน No. 05-03-10 ได้ค่า 1652 cm^{-1} (amide I), 1541 cm^{-1} (amide II), 1242 cm^{-1} (amide III), 664 cm^{-1} (amide V) ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างเป็นลักษณะ random coil เช่นเดียวกัน และเมื่อทดสอบทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง ให้ค่า Spectra เป็น 1652 cm^{-1} (amide I), 1538 cm^{-1} (amide II), 1243 cm^{-1} (amide III), 665 cm^{-1} (amide v) ซึ่งแสดงผลเป็น random coil เช่นเดียวกันนอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่แสดงถึง พันธะของ (-Gly-Gly-) ที่ตำแหน่ง 1015 cm^{-1} ด้วย ดังนั้นเมื่อทำการเอาเกลือออก จากการทำให้ Dialysis แล้วผ่านกระบวนการ Freeze drying จะได้ไฟโบรอินที่มีลักษณะโครงสร้างเป็น random coil ทั้งในกรณีที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40°C และที่อุณหภูมิห้อง ดังภาพที่ 4.10 แสดงเส้นกราฟ FTIR ของไฟโบรอินที่ทำแห้งด้วยตู้อบเปรียบเทียบกับตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง



4.10 เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40 °C (FB 05-03-10, 29-03-10) และอุณหภูมิห้อง (FB 05-03-10)

ค่า FTIR spectra ของแผ่นฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอิน 1.5% และ Polyvinyl alcohol (PVA) 3% ที่ได้ 1652 cm⁻¹ (amide I), 1540 cm⁻¹ (amide II), 1246 cm⁻¹ (amide III) ของอัตราส่วน FB 70 : PVA 30 ให้ค่าลักษณะโครงสร้างเป็น random coil ส่วนแผ่นฟิล์มในอัตราส่วน FB 50 : PVA 50 ให้ค่า 1651 cm⁻¹ (amide I), 1540 cm⁻¹ (amide II), 1247 cm⁻¹ (amide III) ซึ่งบ่งบอกลักษณะโครงสร้างของแผ่นฟิล์มเป็น random coil และที่อัตราส่วน FB 30: PVA 70 จะได้ค่า spectra เป็น 1651 cm⁻¹ (amide I), 1536 cm⁻¹ (amide II), 1249 cm⁻¹ (amide III) ซึ่งแสดงลักษณะโครงสร้างของแผ่นฟิล์มเป็น random coil นอกจากนี้ ค่า peak บางค่าได้แสดงถึงพันธะต่างๆของโมเลกุลไฟโบรอินจับกับโมเลกุลของPVA ด้วย เช่น 3302 cm⁻¹ (N-H stretching) ของไฟโบรอินและเกิดการ shift ของค่า spectra ได้ เมื่อโมเลกุลของไฟโบรอินจับกับโมเลกุลของ PVA, 1735 cm⁻¹ (C=O) แสดงค่าβ-sheet weak ของไฟโบรอิน, 1427 cm⁻¹ (CH₂ bending), 1249 cm⁻¹ (C-O) ,1093 cm⁻¹ (OH blending) ซึ่งจากภาพที่ 4.11 จะสังเกตได้ว่า ค่าของ spectra จะเลื่อนออกจากค่าเดิมของ Pure PVA หรือ สังเกตจาก pure FB เนื่องจากอาจเกิดการจับกันใหม่ของพันธะไฮโดรเจนซึ่งจะอยู่ในช่วง 1655-1640 cm⁻¹ (1650 cm⁻¹, 1° amide H-bond ;1655-1640 cm⁻¹, 2° amide, H-bond) หรืออาจเกิดจากการ shift ของ spectra เมื่อโมเลกุลของทั้งสองจับกัน แต่ยังคง

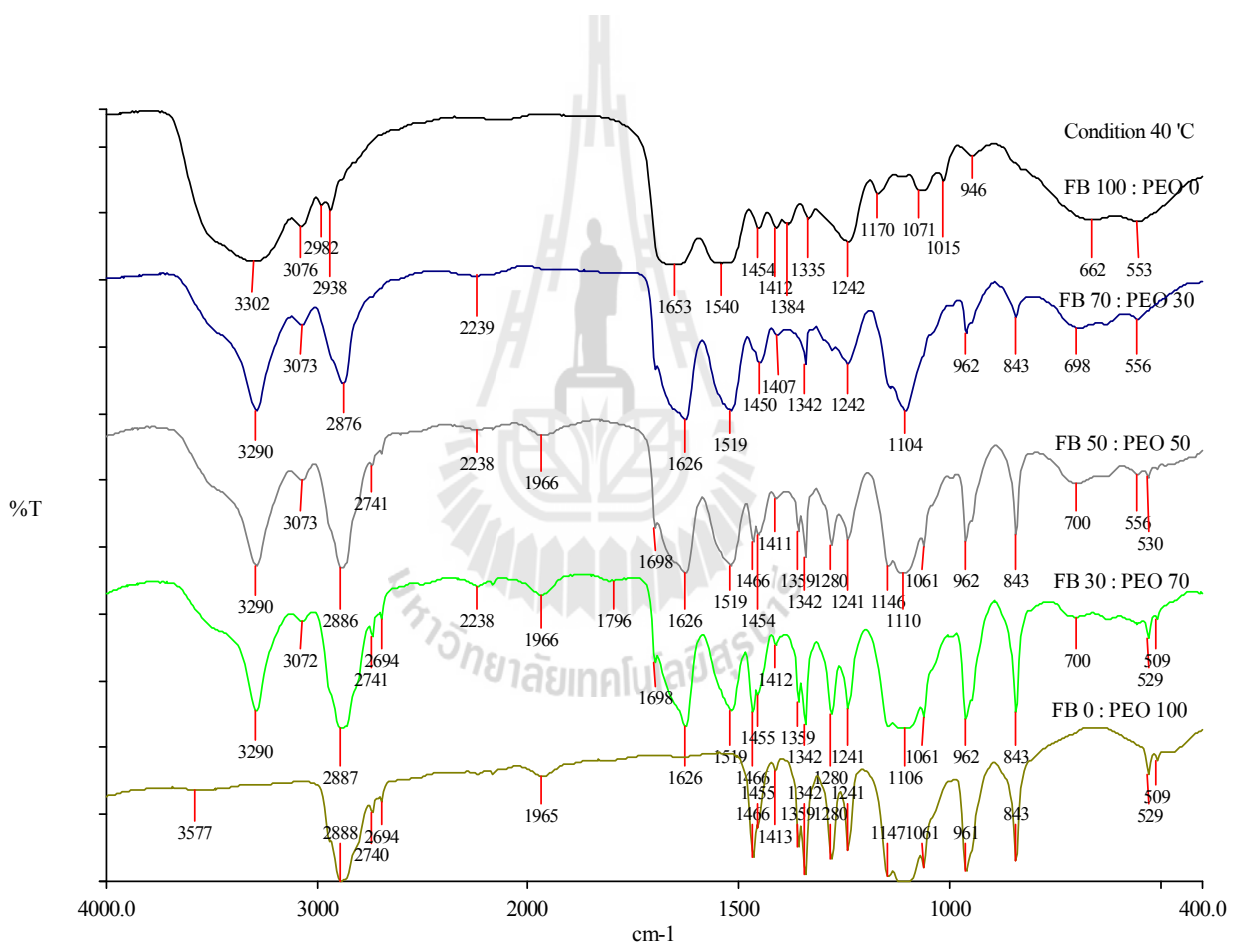
แสดงออกของโครงสร้างที่จับกับแบบหลวมขึ้นกว่าเดิม จึงเกิดลักษณะดังกล่าวขึ้น ดังนั้น แผ่นฟิล์มไฟโบรอินที่ผสม PVA นี้จะให้ลักษณะโครงสร้างภายในของแผ่นฟิล์มเป็นแบบ random coil (Um and



Park, 2007)

ภาพที่ 4.11 เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40 °C ซ้ำกัน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ PVA เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง

4.2.2.2. ผลค่า FTIR ของแผ่นฟิล์มโพรตีนไฟโบรอินผสมกับ Polyethylene oxide (PEO) ค่า spectraของแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน 1.5 % ผสม Polyethylene oxide (PEO) 3% ค่าเส้น spectra ของแผ่นฟิล์มอัตราส่วน FB 70 : PVA 30 ได้ดังภาพที่ 4.12 คือ 1626 cm^{-1} (amide I, C-O, CN), 1519 cm^{-1} (amide II), 1242 cm^{-1} (amide III) , 1104 cm^{-1} (C-O-C stretch) ซึ่งค่าที่ได้ในส่วนของ Amide I และ Amide II นั้น มีโครงสร้างเป็นแบบ β -sheet และ random coil ที่amide III และอัตราส่วนที่ FB 50 : PEO 50 ให้ค่า 1698 cm^{-1} (amide I), 1626 cm^{-1} (amide I, C-O, CN) , 1519 cm^{-1} (amide II) ซึ่งรูปแบบโครงสร้างเป็นแบบ β -sheet ส่วน 1241 cm^{-1} (amide III) มีโครงสร้างเป็นแบบ random coil, 700 cm^{-1} (amide V, NH bending) โครงสร้างเป็นแบบ β -sheet (Yang, Zhang and Park, 2000)

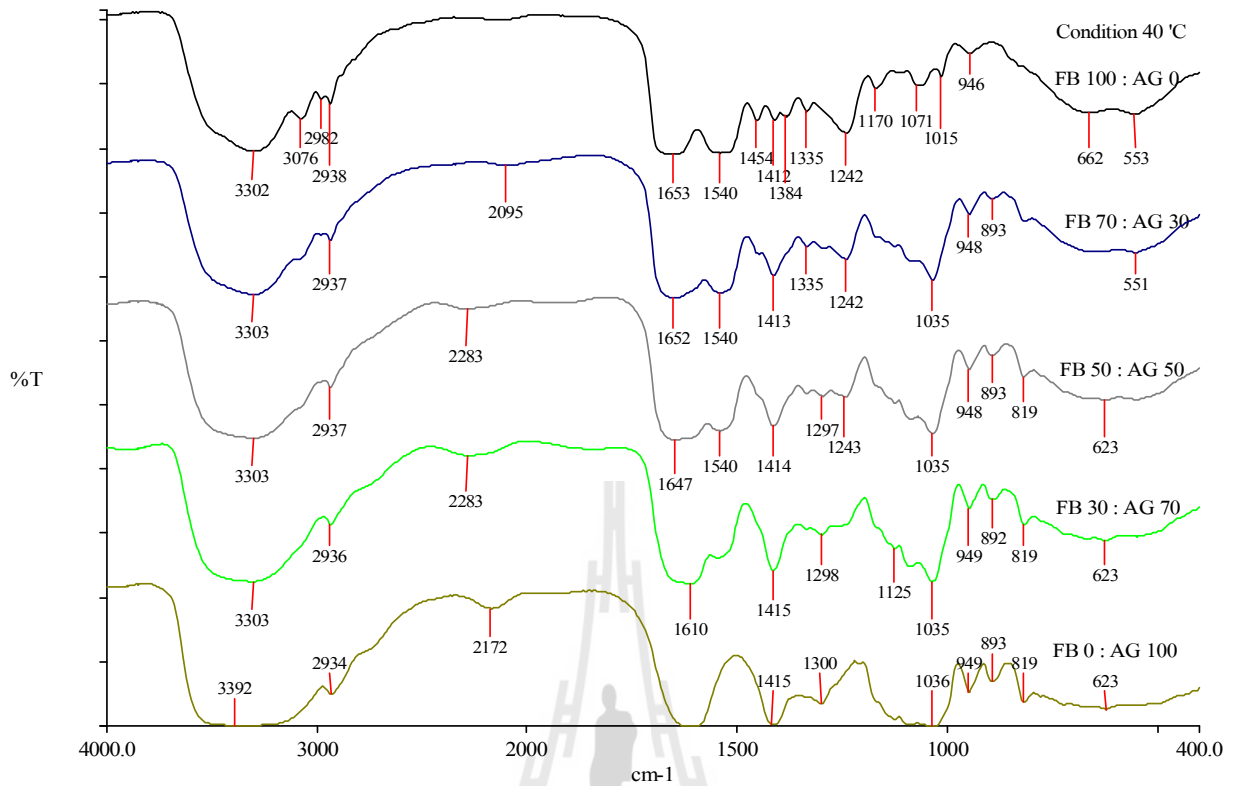


ภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40 °C ซ้ำกัน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ PEO เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง

และในอัตราส่วนแผ่นฟิล์มไฟโบรอินที่ผสม PEO อัตราส่วน 70:30 ได้ค่า 1698 cm^{-1} (amide I), 1626 cm^{-1} (amide I, C-O, CN), 1519 cm^{-1} (amide II) ซึ่งมีรูปแบบโครงสร้างเป็นแบบ β -sheet ส่วน 1241 cm^{-1} (amide III) มีโครงสร้างเป็นแบบ random coil, 700 cm^{-1} (amide V, NH bending) ดังนั้น แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมกับ PEO มีโครงสร้างภายในส่วนใหญ่เป็น β -sheet และมีส่วนที่เป็นโครงสร้างแบบ random coil ด้วยบางส่วน แสดงว่า โมเลกุลเกาะกันในรูปแบบซ้อนทับกันหนาแน่นขึ้น ซึ่งจะสังเกตได้จากการภาพตัดขวางของ SEM ที่มีลักษณะเหมือนเป็นเนื้อเดียวกัน อาจเกิดการยึดเกาะกันระหว่างพันธะให้อยู่ชิดกันมากขึ้น ระหว่างพันธะอาจจะมีการแลกเปลี่ยนกันระหว่างพันธะไฮโดรเจนของ C-O ได้ (Yang, Zhang and Park, 2000)

4.2.2.3. ผลค่า FTIR ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสมกับ Sodium alginate (AG)

ค่า FTIR spectra ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน 1.5% ผสม Sodium alginate (AG) 3% ในอัตราส่วน FB 70: AG 30 ได้ค่า spectra เป็น 1652 cm^{-1} (amide I), 1540 cm^{-1} (amide II), 1242 cm^{-1} (amide III) ซึ่งโครงสร้างเป็น random coil และที่อัตราส่วน FB 50: AG 50 ได้ค่า spectra เป็น 1657 cm^{-1} (amide I), 1540 cm^{-1} (amide II), 1243 cm^{-1} (amide III) ซึ่งโครงสร้างเป็น random coil ส่วนแผ่นฟิล์มผสมที่มีอัตราส่วน FB 30 : AG 70 จะแสดงค่า peak ที่ใกล้เคียงกับค่า peak ของ Sodium alginate ซึ่งมีค่า 1610 cm^{-1} (COO^- , asymmetric) แต่เมื่อดูค่า peak ของไฟโบรอินจะมีค่าใกล้เคียงกันกับ amide I (β -sheet) ที่มีค่า spectra เป็น 1620 cm^{-1} แต่เมื่อสังเกตลักษณะโดยรวมของ peak แล้ว ค่าสัดส่วนของ Sodium alginate มีมากกว่าไฟโบรอิน อาจทำให้เกิดการจับกันใหม่ของโครงสร้างซึ่งยังคงลักษณะของโครงสร้างในแบบของ Sodium alginate ได้ตามภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม (Sodium alginate) AG ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40 °C ซ้ำกัน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ AG เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง

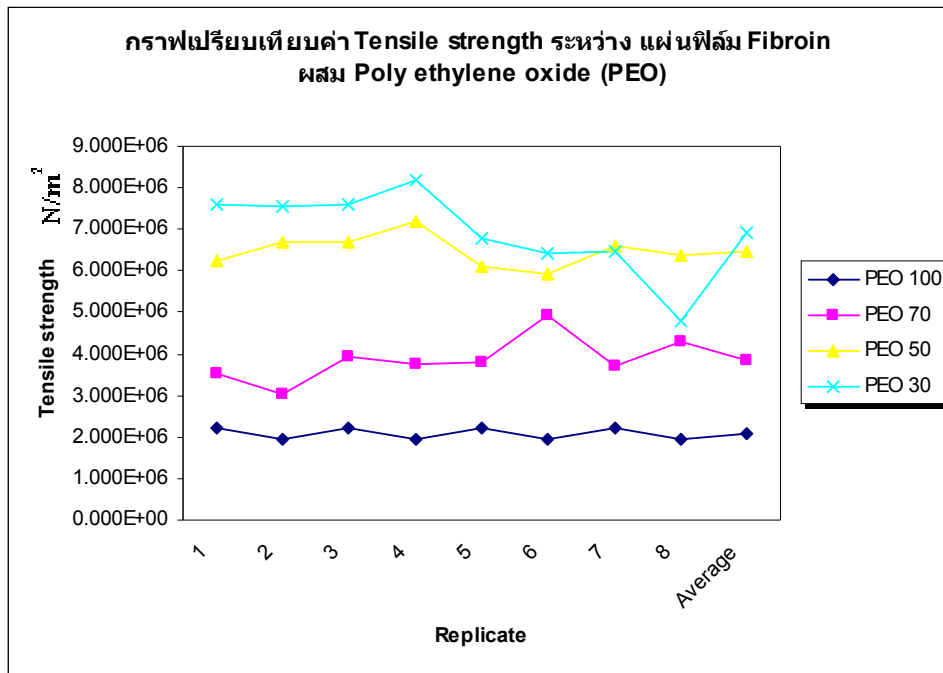
4.2.3 ผลการวัดค่า Mechanical Testing (Tensile strength และ % elongation) และเปรียบเทียบสูตรผสมของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสมโดยคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS

จากนิยามค่า Tensile strength หมายถึง ความแข็งแรงของวัสดุ หรือ ระดับความเค้นสูงสุดที่ชิ้นงานสามารถรับได้ก่อนที่จะเสียรูปอย่างถาวรแบบไม่คงที่สม่ำเสมอ (non-uniform deformation) และค่า % elongation หมายถึง ระยะการยืดตัวของวัสดุ หรือ อัตราการเปลี่ยนแปลงความยาวของชิ้นงาน ณ จุดแตกหักเมื่อได้รับแรงกระทำจากภายนอกต่อหนึ่งหน่วยความยาวเริ่มต้น

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติหลังจากทำการทดลอง

1. เปรียบเทียบค่า Tensile strength ของแผ่นฟิล์มผสม

จากภาพที่ 4.14 จะเห็นว่า แนวโน้มค่า Tensile strength ของ PEO 30 จะมีค่าสูงสุด และที่ PEO 100 จะมีค่า Tensile strength ต่ำสุด แสดงให้เห็นว่า เมื่อมีปริมาณของของผสม (โปรตีนไฟโบรอิน) ในสัดส่วนที่มากกว่าโดยน้ำหนักจะมีแนวโน้มของ Tensile strength อยู่ในช่วงที่สูงกว่า



ภาพที่ 4.14 เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Polyethylene oxide (PEO) ตามอัตราส่วน PEO:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ และเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SAS พบว่า ที่ระดับ $\alpha = 0.05$, ค่า % CV = 13.16, p-value (Pr > F) = 0.0001 ให้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ PEO ผสม Fibroin

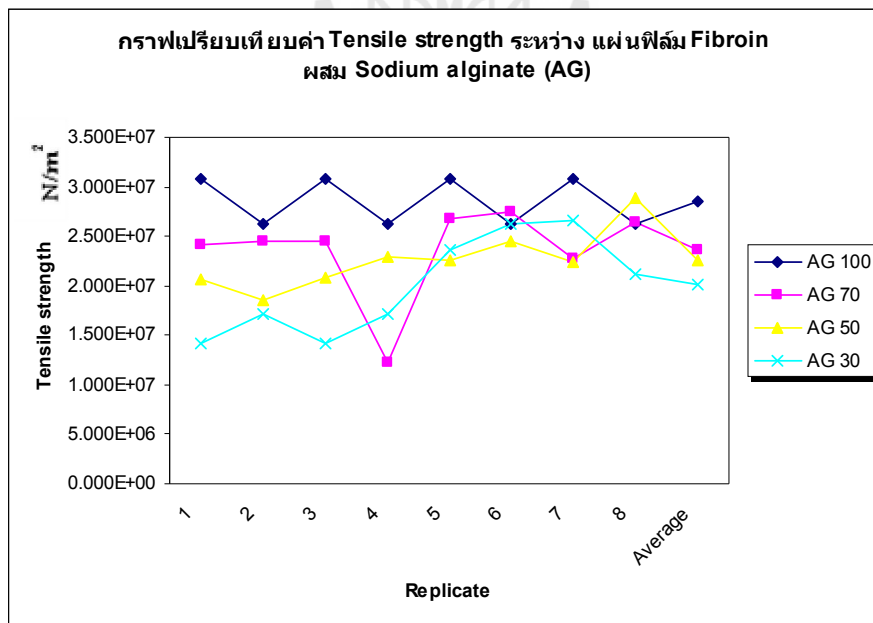
Data	Tensile strength (N/m ²)			
Replicate	PEO 100	PEO 70	PEO 50	PEO 30
1	2.233x10 ⁶	3.517 x10 ⁶	6.237 x10 ⁶	7.578 x10 ⁶
2	1.938 x10 ⁶	3.027 x10 ⁶	6.680 x10 ⁶	7.531 x10 ⁶
3	2.233 x10 ⁶	3.913 x10 ⁶	6.680 x10 ⁶	7.578 x10 ⁶
4	1.938 x10 ⁶	3.755 x10 ⁶	7.171 x10 ⁶	8.169 x10 ⁶
5	2.233 x10 ⁶	3.788 x10 ⁶	6.101 x10 ⁶	6.773 x10 ⁶
6	1.938 x10 ⁶	4.917 x10 ⁶	5.904 x10 ⁶	6.431 x10 ⁶
7	2.233 x10 ⁶	3.703 x10 ⁶	6.614 x10 ⁶	6.454 x10 ⁶
8	1.938 x10 ⁶	4.277 x10 ⁶	6.394 x10 ⁶	4.772 x10 ⁶
Average	2.086 x10 ⁶ ^C	3.862 x10 ⁶ ^B	6.473 x10 ⁶ ^A	6.911 x10 ⁶ ^A

จากตารางที่ 4.1 สามารถสรุปได้ว่า p-value ($Pr > F$) = 0.0001 ($P < 0.05$) มีค่า Tensile strength เฉลี่ยของตัวอย่างฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO อย่างน้อย 1 คู่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าเฉลี่ย Tensile strength ในกลุ่มตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO ตามอัตราส่วน PEO 100, PEO 70, PEO 50, PEO 30 มีค่า $2.086 \times 10^6 \text{ N/m}^2$, $3.862 \times 10^6 \text{ N/m}^2$, $6.473 \times 10^6 \text{ N/m}^2$, $6.911 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ ตามลำดับ

สรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO สูตร PEO 100 ให้ค่าเฉลี่ย Tensile strength ต่ำสุด และแตกต่างจากแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO สูตร PEO 70, PEO 50 และ PEO 30 ซึ่ง แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO สูตร PEO 50 และสูตร PEO 30 ให้ผลค่า Tensile strength เฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สูตร PEO 30 ให้ผลค่า Tensile strength เฉลี่ยสูงสุด

จากการทดสอบค่า Tensile strength ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Sodium alginate (AG) พบว่า แนวโน้มค่า Tensile strength ของข้อมูลที่ได้ ลดลงตามปริมาณของอัตราส่วนโดยน้ำหนักของโปรตีนไฟโบรอินที่ผสมลงไป กล่าวคือ แผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินที่ผสม AG ที่มีอัตราส่วนของสารพอลิเมอร์ AG มาก จะทำให้แผ่นฟิล์มผสมมีค่า Tensile strength มีแนวโน้มมากขึ้นด้วย ดังภาพที่ 4.15 อาจเป็นเพราะสัดส่วนของปริมาณ AG มีมากกว่าไฟโบรอิน ส่งผลให้แนวโน้มค่า Tensile strength ของแผ่นฟิล์มผสมลดลงตามอัตราส่วนของปริมาณไฟโบรอินที่เพิ่มขึ้นได้



ภาพที่ 4.15 เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Sodium Alginate (AG) ตามอัตราส่วน AG:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ

และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SAS พบว่าค่า Tensile strength ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Sodium alginate (AG) พบว่าได้ค่าที่ระดับ $\alpha = 0.05$, ค่า % CV = 17.01, p-value = 0.0025 ให้ผลดังตารางที่ 4.2

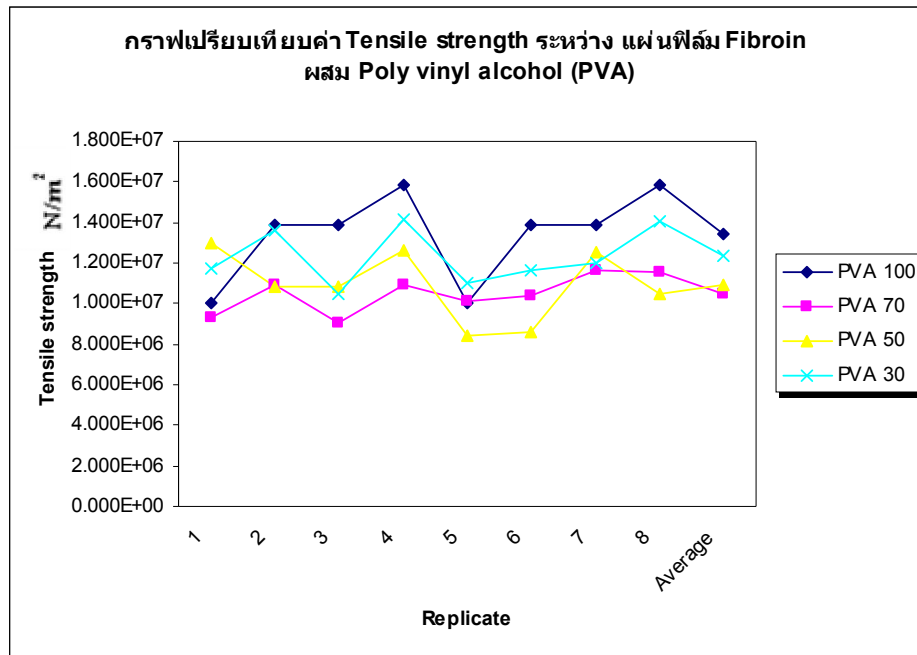
ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ AG ผสม Fibroin

Data	Tensile strength (N/m ²)			
Replicate	AG 100	AG 70	AG 50	AG 30
1	3.082 x10 ⁷	2.415 x10 ⁷	2.070 x10 ⁷	1.416 x10 ⁷
2	2.616 x10 ⁷	2.446 x10 ⁷	1.847 x10 ⁷	1.722 x10 ⁷
3	3.082 x10 ⁷	2.446 x10 ⁷	2.077 x10 ⁷	1.416 x10 ⁷
4	2.616 x10 ⁷	1.229 x10 ⁷	2.296 x10 ⁷	1.722 x10 ⁷
5	3.082 x10 ⁷	2.671 x10 ⁷	2.263 x10 ⁷	2.365 x10 ⁷
6	2.616 x10 ⁷	2.752 x10 ⁷	2.448 x10 ⁷	2.628 x10 ⁷
7	3.082 x10 ⁷	2.267 x10 ⁷	2.237 x10 ⁷	2.661 x10 ⁷
8	2.616 x10 ⁷	2.642 x10 ⁷	2.883 x10 ⁷	2.118 x10 ⁷
Average	2.849 x10 ⁷ ^A	2.358 x10 ⁷ ^B	2.265 x10 ⁷ ^B	2.006 x10 ⁷ ^B

จากตารางพบว่า p-value (Pr > F) มีค่าเท่ากับ 0.0025 (p < 0.05) แสดงว่า มีค่า Tensile strength เฉลี่ยของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG อย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าเฉลี่ย Tensile strength ในกลุ่มตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG ตามอัตราส่วน AG 100, AG 70, AG 50, AG 30 มีค่า 2.849 x 10⁷ N/m², 2.358 x 10⁷ N/m², 2.265 x 10⁷ N/m², 2.006 x 10⁷ N/m² ตามลำดับ

สรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG สูตร AG 100 ให้ค่าเฉลี่ย Tensile strength สูงสุด และแตกต่างจากแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG สูตร AG 70, AG 50 และ AG 30 ซึ่ง แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG สูตร AG 70, สูตร AG 50 และสูตร AG 30 ให้ผลค่า Tensile strength เฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (AG 70 > AG 50 > AG 30) จากการเปรียบเทียบแนวโน้มค่า Tensile strength ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Polyvinyl alcohol (PVA) พบว่าค่าแนวโน้ม ค่า Tensile strength ของข้อมูลที่ได้ จะเห็นว่าแผ่นฟิล์ม PVA100 ให้ค่าแนวโน้มที่สูงที่สุด รองลงมาคือ แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA สูตร PVA 30, PVA 50 และ PVA 70 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.16 ดังนี้



ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Poly vinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน PVA:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วย SAS พบว่า เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Tensile strength แล้วพบว่าค่า Tensile strength ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Polyvinyl alcohol (PVA) พบว่าได้ค่าที่ระดับ $\alpha = 0.05$, ค่า % CV = 14.151, p-value = 0.0054 ให้ผลดังตารางที่ 4.3

ค่าเฉลี่ย Tensile strength ในกลุ่มตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ตามอัตราส่วน PVA 100, PVA 70, PVA 50, PVA 30 มีค่า $1.341 \times 10^7 \text{ N/m}^2$, $1.048 \times 10^7 \text{ N/m}^2$, $1.089 \times 10^7 \text{ N/m}^2$, $1.234 \times 10^7 \text{ N/m}^2$ ตามลำดับ

สรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA สูตร PVA 100 ให้ค่าเฉลี่ย Tensile strength ไม่แตกต่างทางสถิติกับแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA สูตร PVA 30 และแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA สูตร PVA 30 และ PVA 50 ให้ผลค่า Tensile strength เฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA สูตร PVA 50 และ สูตร PVA 70 ให้ผลค่าเฉลี่ย Tensile strength ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

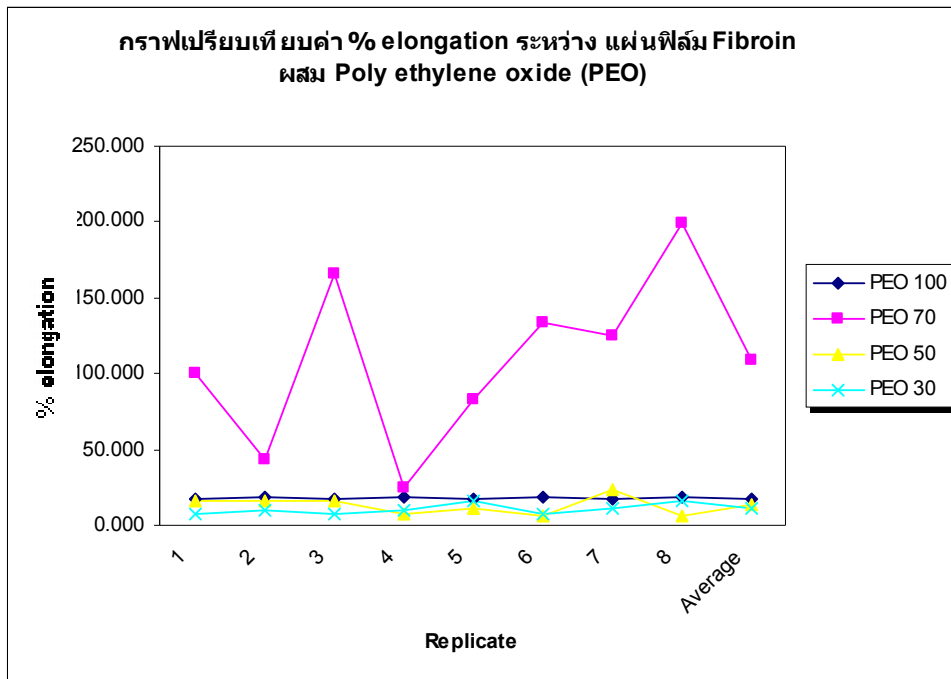
ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ PVA ผสม Fibroin

Data	Tensile strength (N/m ²)			
Replicate	PVA 100	PVA 70	PVA 50	PVA 30
1	1.002 x10 ⁷	9.293 x10 ⁶	1.295 x10 ⁷	1.170 x10 ⁷
2	1.387 x10 ⁷	1.088 x10 ⁷	1.081 x10 ⁷	1.362 x10 ⁷
3	1.387 x10 ⁷	9.002 x10 ⁶	1.083 x10 ⁷	1.052 x10 ⁷
4	1.588 x10 ⁷	1.095 x10 ⁷	1.258 x10 ⁷	1.412 x10 ⁷
5	1.002 x10 ⁷	1.014 x10 ⁷	8.398 x10 ⁶	1.102 x10 ⁷
6	1.387 x10 ⁷	1.035 x10 ⁷	8.581 x10 ⁶	1.168 x10 ⁷
7	1.387 x10 ⁷	1.164 x10 ⁷	1.250 x10 ⁷	1.203 x10 ⁷
8	1.588 x10 ⁷	1.158 x10 ⁷	1.047 x10 ⁷	1.404 x10 ⁷
Average	1.341 x10 ^{7A}	1.048 x10 ^{7C}	1.089 x10 ^{7BC}	1.234 x10 ^{7AB}

จากตารางที่ 4.3 พบว่า p-value (Pr > F) มีค่าเท่ากับ 0.0054 (p < 0.05) แสดงว่า มีค่า Tensile strength เฉลี่ยของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA อย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. เปรียบเทียบค่า % elongation ของแผ่นฟิล์มผสม

จากภาพที่ 4.17 จะเห็นว่า แนวโน้มค่า % elongation ของ PEO 70 จะมีค่าสูงสุด และที่ PEO 100, PEO 50 และ PEO 30 จะมีค่า % elongation เกาะกลุ่มกันและสูตร PEO 30 จะให้แนวโน้มค่า % elongation ต่ำสุด



ภาพที่ 4.17 เปรียบเทียบค่า % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Poly ethylene oxide (PEO) ตามอัตราส่วน PEO:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ

นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย % elongation ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO ด้วยโปรแกรม SAS พบว่าได้ค่าที่ระดับ $\alpha = 0.05$, ค่า % CV = 78.85, p-value = 0.0001 ให้ผลดังตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย % elongation ของตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO ที่อัตราส่วน PEO100, PEO 70, PEO 50, PEO 30 มีค่า 17.60, 109.45, 13.00 และ 10.87 ตามลำดับ

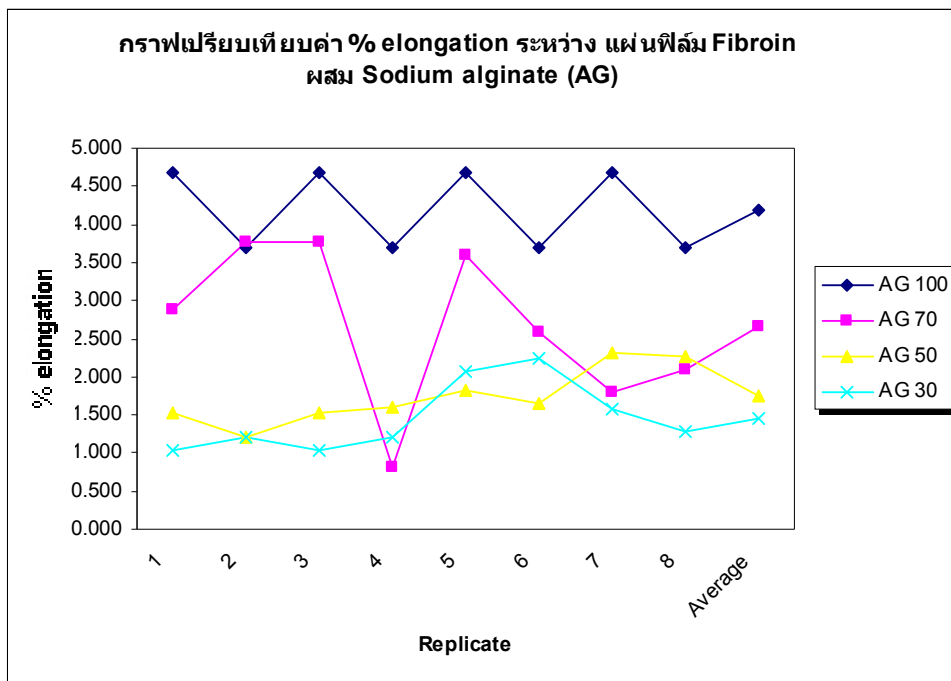
สรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO สูตร PEO 70 ให้ค่าเฉลี่ย % elongation สูงสุด และแตกต่างจากกลุ่มแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO สูตร PEO 100, PEO 50 และ PEO 30 ซึ่งแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO สูตร PEO 100, PEO 50 และสูตร PEO 30 ให้ผลค่า % elongation เฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สูตร PEO 30 ให้ผลค่า Tensile strength เฉลี่ยต่ำสุด

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ PEO ผสม Fibroin

Data	% elongation			
Replicate	PEO 100	PEO 70	PEO 50	PEO 30
1	17.023	99.760	16.210	7.083
2	18.177	43.070	16.533	10.307
3	17.023	166.420	16.533	7.083
4	18.177	25.307	7.177	10.010
5	17.023	83.133	11.163	16.493
6	18.177	133.137	6.747	7.730
7	17.023	125.390	22.923	11.593
8	18.177	199.397	6.710	16.640
Average	17.600 ^B	109.452 ^A	13.000 ^B	10.868 ^B

จากตารางที่ 4.4 สามารถสรุปได้ว่า p-value ($Pr > F$) = 0.0001 ($P < 0.05$) มีค่า % elongation เฉลี่ยของตัวอย่างฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO อย่างน้อย 1 คู่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ จากภาพที่ 4.18 จะเห็นว่า แนวโน้มค่า % elongation ของ AG 100 จะมีค่าสูงสุด และที่ AG 70, AG 50 และ AG 30 จะมีค่าแนวโน้ม % elongation ต่ำลงมาตามลำดับจากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย % elongation ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG ด้วยโปรแกรม SAS พบว่าได้ค่าที่ระดับ $\alpha = 0.05$, ค่า % CV = 26.41, p-value = 0.0001 ให้ผลดังตารางที่ 4.5 สามารถสรุปได้ว่า p-value ($Pr > F$) = 0.0001 ($P < 0.05$) มีค่า % elongation เฉลี่ยของตัวอย่างฟิล์มไฟโบรอินผสม AG อย่างน้อย 1 คู่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ AG 100, AG 70, AG 50 และ AG 30 มีค่าเฉลี่ย % elongation ดังนี้ 4.177, 2.668, 1.743 และ 1.459 ตามลำดับ



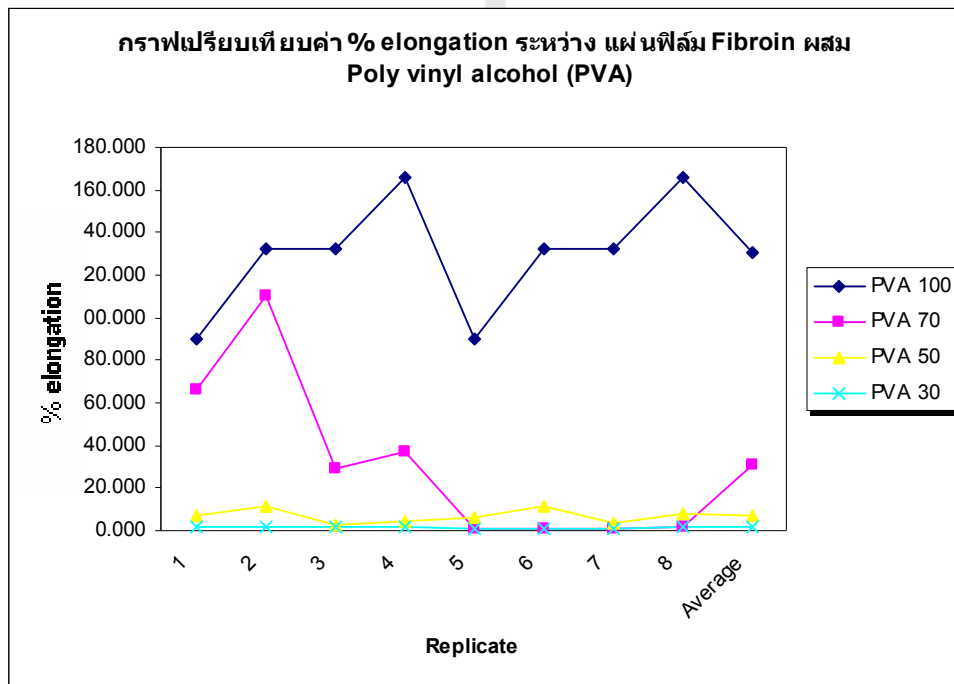
ภาพที่ 4.18 เปรียบเทียบค่า % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Sodium alginate (AG) ตามอัตราส่วน AG:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ AG ผสม Fibroin

Data	% elongation			
Replicate	AG 100	AG 70	AG 50	AG 30
1	4.670	2.883	1.533	1.033
2	3.683	3.767	1.213	1.207
3	4.670	3.767	1.533	1.033
4	3.683	0.817	1.597	1.207
5	4.670	3.607	1.817	2.077
6	3.683	2.590	1.657	2.237
7	4.670	1.810	2.320	1.587
8	3.683	2.100	2.273	1.290
Average	4.177 ^A	2.668 ^B	1.743 ^C	1.459 ^C

สรุปได้ว่า ค่าเฉลี่ย % elongation ของตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG ที่อัตราส่วน AG 100 มีค่ามากที่สุด และมีค่าเฉลี่ย % elongation แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG สูตร AG 70, AG 50 และ AG 30 และในส่วนของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม AG สูตร AG 50 และ AG 30 ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

และเมื่อทำการวัดแสดงค่าแนวโน้มของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ของฟิล์มผสมสูตร PVA 100 มีค่าแนวโน้มของ % elongation สูงสุด ส่วนค่าแนวโน้มของ แผ่นฟิล์มผสมในกลุ่ม PVA 70, PVA 50 และ PVA 30 จะอยู่ใน ช่วงเดียวกันและมีแนวโน้มลดลงตาม อัตราส่วน PVA ที่ลดลง ดังภาพที่ 4.19



ภาพที่ 4.19 เปรียบเทียบค่า % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Poly vinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน PVA:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ

นำข้อมูลผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย % elongation ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ด้วยโปรแกรม SAS พบว่าได้ค่าที่ระดับ $\alpha = 0.05$, ค่า % CV = 58.07, p-value = 0.0001 ให้ผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ PVA ผสม Fibroin

Data	% elongation			
Replicate	PVA 100	PVA 70	PVA 50	PVA 30
1	90.370	66.460	7.350	1.883
2	132.747	110.587	11.817	2.103
3	132.747	28.987	2.843	2.010
4	166.150	37.363	4.643	1.437
5	90.370	1.040	5.823	1.040
6	132.747	1.163	11.810	1.163
7	132.747	1.303	3.230	1.303
8	166.150	1.383	7.677	1.383
Average	130.503 ^A	31.036 ^B	6.899 ^{BC}	1.540 ^C

จากตารางที่ 4.6 สามารถสรุปได้ว่า p-value ($Pr > F$) = 0.0001 ($P < 0.05$) มีค่า % elongation เฉลี่ยของตัวอย่างฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA อย่างน้อย 1 คู่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

PVA 100, PVA 70, PVA 50 และ PVA 30 มีค่าเฉลี่ย % elongation ดังนี้ 130.503, 31.036, 6.899 และ 1.540 ตามลำดับ

สรุปได้ว่า ค่าเฉลี่ย % elongation ของตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ที่อัตราส่วน PVA 100 มีค่ามากที่สุด และมีค่าเฉลี่ย % elongation แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับกลุ่มแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA สูตร PVA 70, PVA 50 และ PVA 30 และในส่วนของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA สูตร PVA 70 และ AG 50 ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ และในส่วนของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA สูตร PVA 50 และ AG 30 ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

และเมื่อเปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างสูตรแผ่นฟิล์มทั้งสามพอลิเมอร์ Polyethylene oxide (PEO), Sodium alginate (AG), Polyvinyl alcohol (PVA) ให้ผลดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 สรุปผลการวิเคราะห์ค่า Tensile strength ทั้งสามพอลิเมอร์ในสูตรแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม (PEO, AG, PVA)

Data Replication	Tensile strength (N/m ²)											
	Poly ethylene oxide (PEO) : Fibroin (FB)				Sodium alginate (AG) : Fibroin (FB)				Poly vinyl alcohol (PVA) : Fibroin (FB)			
	100 : 0	70 : 30	50 : 50	30 : 70	100 : 0	70 : 30	50 : 50	30 : 70	100 : 0	70 : 30	50 : 50	30 : 70
1	2.233x10 ⁶	3.517 x10 ⁶	6.237 x10 ⁶	7.578 x10 ⁶	3.082 x10 ⁷	2.415 x10 ⁷	2.070 x10 ⁷	1.416 x10 ⁷	1.002 x10 ⁷	9.293 x10 ⁶	1.295 x10 ⁷	1.170 x10 ⁷
2	1.938 x10 ⁶	3.027 x10 ⁶	6.680 x10 ⁶	7.531 x10 ⁶	2.616 x10 ⁷	2.446 x10 ⁷	1.847 x10 ⁷	1.722 x10 ⁷	1.387 x10 ⁷	1.088 x10 ⁷	1.081 x10 ⁷	1.362 x10 ⁷
3	2.233 x10 ⁶	3.913 x10 ⁶	6.680 x10 ⁶	7.578 x10 ⁶	3.082 x10 ⁷	2.446 x10 ⁷	2.077 x10 ⁷	1.416 x10 ⁷	1.387 x10 ⁷	9.002 x10 ⁶	1.083 x10 ⁷	1.052 x10 ⁷
4	1.938 x10 ⁶	3.755 x10 ⁶	7.171 x10 ⁶	8.169 x10 ⁶	2.616 x10 ⁷	1.229 x10 ⁷	2.296 x10 ⁷	1.722 x10 ⁷	1.588 x10 ⁷	1.095 x10 ⁷	1.258 x10 ⁷	1.412 x10 ⁷
5	2.233 x10 ⁶	3.788 x10 ⁶	6.101 x10 ⁶	6.773 x10 ⁶	3.082 x10 ⁷	2.671 x10 ⁷	2.263 x10 ⁷	2.365 x10 ⁷	1.002 x10 ⁷	1.014 x10 ⁷	8.398 x10 ⁶	1.102 x10 ⁷
6	1.938 x10 ⁶	4.917 x10 ⁶	5.904 x10 ⁶	6.431 x10 ⁶	2.616 x10 ⁷	2.752 x10 ⁷	2.448 x10 ⁷	2.628 x10 ⁷	1.387 x10 ⁷	1.035 x10 ⁷	8.581 x10 ⁶	1.168 x10 ⁷
7	2.233 x10 ⁶	3.703 x10 ⁶	6.614 x10 ⁶	6.454 x10 ⁶	3.082 x10 ⁷	2.267 x10 ⁷	2.237 x10 ⁷	2.661 x10 ⁷	1.387 x10 ⁷	1.164 x10 ⁷	1.250 x10 ⁷	1.203 x10 ⁷
8	1.938 x10 ⁶	4.277 x10 ⁶	6.394 x10 ⁶	4.772 x10 ⁶	2.616 x10 ⁷	2.642 x10 ⁷	2.883 x10 ⁷	2.118 x10 ⁷	1.588 x10 ⁷	1.158 x10 ⁷	1.047 x10 ⁷	1.404 x10 ⁷
Average	2.086 x10 ^{6G}	3.862 x10 ^{6FG}	6.473 x10 ^{6FE}	6.911 x10 ^{6E}	2.849 x10 ^{7A}	2.358 x10 ^{7B}	2.265 x10 ^{7BC}	2.006 x10 ^{7C}	1.341 x10 ^{7D}	1.048 x10 ^{7D}	1.089 x10 ^{7D}	1.234 x10 ^{7D}

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน ผสมสารพอลิเมอร์ทั้งสามชนิด PEO, AG และ PVA มีค่า p -value ($P_r > F$) = 0.8686 > 0.05 แสดงว่า ค่าอิทธิพลของชนิดของพอลิเมอร์ที่ต่างชนิดกัน และระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน นั้น ไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ($p > 0.05$)

เมื่ออ่านผลจากการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DUNCAN ที่ความเชื่อมั่น 95 % ใน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของพอลิเมอร์ พบว่าพอลิเมอร์ Sodium alginate (AG) มีผลต่อค่าเฉลี่ย Tensile strength เท่ากับ 1.358×10^7 N/m² ดีกว่า Polyvinyl alcohol (PVA) 1.346×10^7 N/m² และ Polyethylene oxide (PEO) 1.327×10^7 N/m² และเมื่อเปรียบเทียบสูตรผสม โปรตีนไฟโบรอินกับสารพอลิเมอร์ในแผ่นฟิล์ม ตามอัตราส่วนพอลิเมอร์ ต่อ โปรตีนไฟโบรอิน 100:0, 70:30, 50:50 และ 30:70 ตามลำดับให้ผล ดังนี้ แผ่นฟิล์มผสม AG 100:0 ให้ผลค่าเฉลี่ย Tensile strength สูงที่สุด ส่วนแผ่นฟิล์มผสม AG 70:30, AG 50:50 ให้ผลดีรองลงมาและผลค่า Tensile strength ที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ AG 70:30 ให้ผลที่ดีกว่า และแผ่น ฟิล์มผสมสูตร AG 50:50 ให้ผล Tensile strength ไม่แตกต่างกันกับแผ่นฟิล์มสูตร AG 30:70 แผ่นฟิล์มผสมในกลุ่มของ Polyvinyl alcohol (PVA) นั้นให้ผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราส่วน PVA 100:0 ให้ผลดีกว่า PVA 30:70, PVA 50:50 และ PVA 70:30 ตามลำดับ และแผ่นฟิล์มผสม PEO 30:70 ให้ผลดีกว่า แผ่นฟิล์มสูตร PEO 50:50, PEO 70:30 และ PEO 100:0 ตามลำดับ แต่แผ่นฟิล์มสูตร PEO 30:70 ให้ผลค่าเฉลี่ย Tensile strength ไม่แตกต่างกันกับแผ่นฟิล์มสูตร PEO 50:50 ส่วนแผ่นฟิล์มสูตร PEO 50:50 ให้ผลค่าเฉลี่ย Tensile strength ไม่แตกต่างกับสูตร PEO 70:30 ในส่วนของ PEO 70:30 นั้นให้ผลค่าเฉลี่ย Tensile strength ไม่แตกต่างกับสูตร PEO 100:0 ทางสถิติ

จากการทดลอง เมื่อเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์บางชนิดทำให้ค่า Tensile strength ลดลง เช่น พอลิเมอร์ PEO และ PVA แต่ในกรณีของพอลิเมอร์ AG ทำให้ค่า Tensile strength เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารพอลิเมอร์แต่ละชนิด เมื่อรวมกับสารพอลิเมอร์ต่างชนิดกัน อาจทำให้คุณสมบัติทางกายภาพแสดงลักษณะความแข็งแรง ความเหนียวของแผ่นฟิล์มที่แตกต่างกัน จึงทำให้เมื่อวัดค่า Tensile strength หรือค่าความเค้นดึงสูงสุดที่ดึงชิ้นงานจนขาดมีค่าแตกต่างกันได้ เช่นเดียวกับ %elongation หรือระยะดึงยืดของความยาวที่ขึ้นทดสอบขาด ณ จุดขาด อาจแตกต่างกันได้ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารพอลิเมอร์

และเมื่อเปรียบเทียบ % Elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ 3 ชนิด Polyethylene oxide (PEO), Sodium alginate (AG), Polyvinyl alcohol (PVA) ให้ผลดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 สรุปผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด (PEO, AG, PVA)

Data Replication	% Elongation											
	Polyethylene oxide (PEO) : Fibroin (FB)				Sodium alginate (AG) : Fibroin (FB)				Polyvinyl alcohol (PVA) : Fibroin (FB)			
	100 : 0	70 : 30	50 : 50	30 : 70	100 : 0	70 : 30	50 : 50	30 : 70	100 : 0	70 : 30	50 : 50	30 : 70
1	17.023	99.760	16.210	7.083	4.670	2.883	1.533	1.033	90.370	66.460	7.350	1.883
2	18.177	43.070	16.533	10.307	3.683	3.767	1.213	1.207	132.747	110.587	11.817	2.103
3	17.023	166.420	16.533	7.083	4.670	3.767	1.533	1.033	132.747	28.987	2.843	2.010
4	18.177	25.307	7.177	10.010	3.683	0.817	1.597	1.207	166.150	37.363	4.643	1.437
5	17.023	83.133	11.163	16.493	4.670	3.607	1.817	2.077	90.370	1.040	5.823	1.040
6	18.177	133.137	6.747	7.730	3.683	2.590	1.657	2.237	132.747	1.163	11.810	1.163
7	17.023	125.390	22.923	11.593	4.670	1.810	2.320	1.587	132.747	1.303	3.230	1.303
8	18.177	199.397	6.710	16.640	3.683	2.100	2.273	1.290	166.150	1.383	7.677	1.383
Average	17.600 ^{BC}	109.452 ^A	13.000 ^{BC}	10.868 ^{BC}	4.177 ^{BC}	2.668 ^C	1.743 ^C	1.459 ^C	130.503 ^A	31.036 ^B	6.899 ^{BC}	1.540 ^C

จากตารางที่ 4.8 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน ผสมสารพอลิเมอร์ทั้งสามชนิด PEO, AG และ PVA มีค่า p -value ($Pr > F$) = 0.9808 > 0.05 แสดงว่า ค่าอิทธิพลของชนิดของพอลิเมอร์ที่ต่างชนิดกัน และระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน นั้นไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ($p > 0.05$)

เมื่ออ่านผลจากการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DUNCAN ที่ความเชื่อมั่น 95 % ใน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของพอลิเมอร์ พบว่าพอลิเมอร์ Polyvinyl alcohol (PVA) มีผลต่อค่าเฉลี่ย % elongation เท่ากับ 29.473 ดีกว่า Sodium alginate (AG) 28.343 และ Polyethylene oxide (PEO) 25.548 และเมื่อเปรียบเทียบสูตรผสมโพรตีนไฟโบรอินกับสารพอลิเมอร์ในแผ่นฟิล์ม ตามอัตราส่วนพอลิเมอร์ต่อโพรตีนไฟโบรอิน 100:0, 70:30, 50:50 และ 30:70 ตามลำดับให้ผล ดังนี้ แผ่นฟิล์มโพรตีนไฟโบรอินผสมสารพอลิเมอร์ สูตร PVA 100:0 ให้ค่าเฉลี่ย % elongation สูงที่สุด แต่ให้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติไม่แตกต่างกันกับสูตร PEO 70:30 ในกลุ่ม % elongation ที่ดีรองลงมาคือ แผ่นฟิล์มสูตร PVA 70:30, PEO 100:0, PEO 50:50, PEO 30:70, PVA 50:50 และ AG 100:0 ตามลำดับ และในกลุ่มสุดท้ายคือ แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์สูตร AG 70:30, AG 50:50, PVA 30:70 และ AG 30:70 ตามลำดับ ซึ่งแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมในสูตร PEO 100:0, PEO 50:50, PEO 30:70, PVA 50:50 ให้ผลค่าเฉลี่ย % elongation ของข้อมูลไม่แตกต่างจากกลุ่มที่สอง และกลุ่มสุดท้าย

4.2.4 การตรวจวัดประสิทธิภาพการเลี้ยงเซลล์ (Pre-cell culture test)

ก่อนนำตัวอย่างแผ่นฟิล์มไปทดสอบการเลี้ยงเซลล์ จะนำแผ่นฟิล์มผสมมาซึบกับ Methanol เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย Phosphate buffer พบว่า เมื่อทดสอบสูตร ในขั้นตอนแรก พบว่าแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของ PVA และส่วนผสม AG หลังจากจุ่มในสารละลาย phosphate buffer แล้วแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของ PVA จะพอง ยุ่ยและ ภายในเวลา 10 นาทีถึง 24 ชั่วโมง และแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของ AG จะพอง ยุ่ยและภายใน 12-24 ชั่วโมง ส่วนแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนผสมของ PEO สูตร PEO 50:50, PEO 30:70 จะยุ่ยและได้ช้ากว่า แผ่นฟิล์มสูตรอื่นๆ ตามอัตราส่วนผสมของแผ่นฟิล์มที่มีปริมาณของไฟโบรอินน้อยไปมาก คือ ถ้ามีปริมาณของไฟโบรอินมากหลังจากแผ่นฟิล์มจุ่มใน Methanol 30 นาที โครงสร้างของไฟโบรอินจะถูกเปลี่ยนเป็น water-insoluble ซึ่งจะทำให้ถูกย่อยสลายในสารละลาย phosphate buffer ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้ยากกว่า

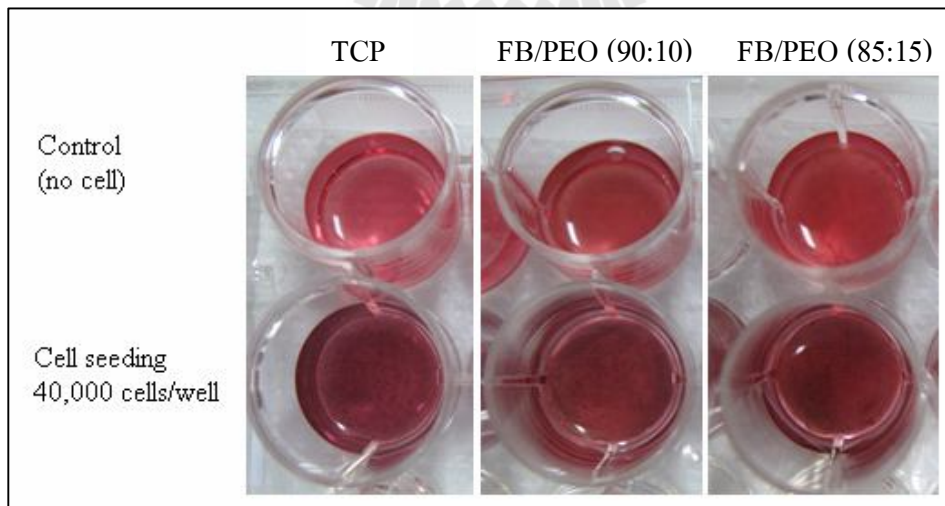
ดังนั้นอัตราส่วนผสมของแผ่นฟิล์มที่มีความสามารถและเหมาะสมที่สุดในการนำไปทดสอบการเลี้ยงเซลล์ต่อไป คือ PEO 15:85 และ PEO 10:90

4.2.4.1. การศึกษาการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์บนแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิค

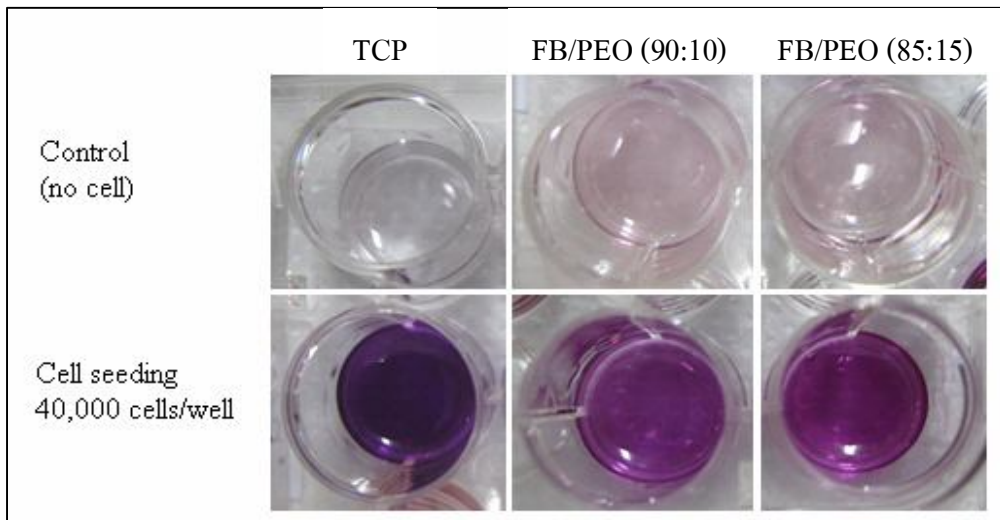
MTT assay

ความสามารถในการสนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์เป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญที่สุดของวัสดุรองรับเซลล์ (scaffolds) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวของแผ่นฟิล์ม FB/PEO ที่ได้ผลิตขึ้นด้วยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้และอาศัยหลักการในการวัด mitochondria's activity ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนวัสดุรองรับเซลล์ที่พัฒนาขึ้น โดยทำการวัดเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนแผ่นฟิล์ม FB/PEO เปรียบเทียบกับที่ทำการเพาะเลี้ยงในหลุมของ tissue culture plate (TCP) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม(positive control) การเจริญของเซลล์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง, 8 ชั่วโมง, 1, 3, 5 และ 7 วัน ซึ่งช่วงระยะเวลาตั้งแต่ seeding จนถึง 24 ชั่วโมงหรือ 1 วัน นั้นถือเป็นช่วงที่เซลล์มีการยึดเกาะ(cell attachment) กับ substrate และช่วงเวลาตั้งแต่ 1 วันเป็นต้นไป เซลล์ก็จะเริ่มมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น (cell proliferation)

จากผลการทดลองในภาพที่ 4.20 แสดง ผลึกของ formazan สีน้ำตาลอมม่วงที่ถูกผลิตขึ้นจากเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนผิวของ TCP, FB/PEO (90:10) และ FB/PEO (85:15) จากนั้นเมื่อทำการดูด medium ทิ้งไป และละลายตะกอน formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO ดังภาพที่ 4.21 ก็จะได้สารละลาย product ที่มีสีม่วง โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนผิววัสดุ นั้นๆ ซึ่งจากภาพจะเห็นได้ว่าสีม่วงที่เกิดขึ้นในหลุมที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บน substrates ชนิดต่างๆ มีความแตกต่างจาก control ที่ไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างชัดเจน และสีที่เกิดขึ้นในหลุมที่เพาะเลี้ยงบน TCP มีความเข้มกว่าหลุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์บนแผ่นฟิล์ม FB/PEO



ภาพที่ 4.20 แสดง formazan crystal ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ reduction ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บน substrate ชนิดต่างๆ

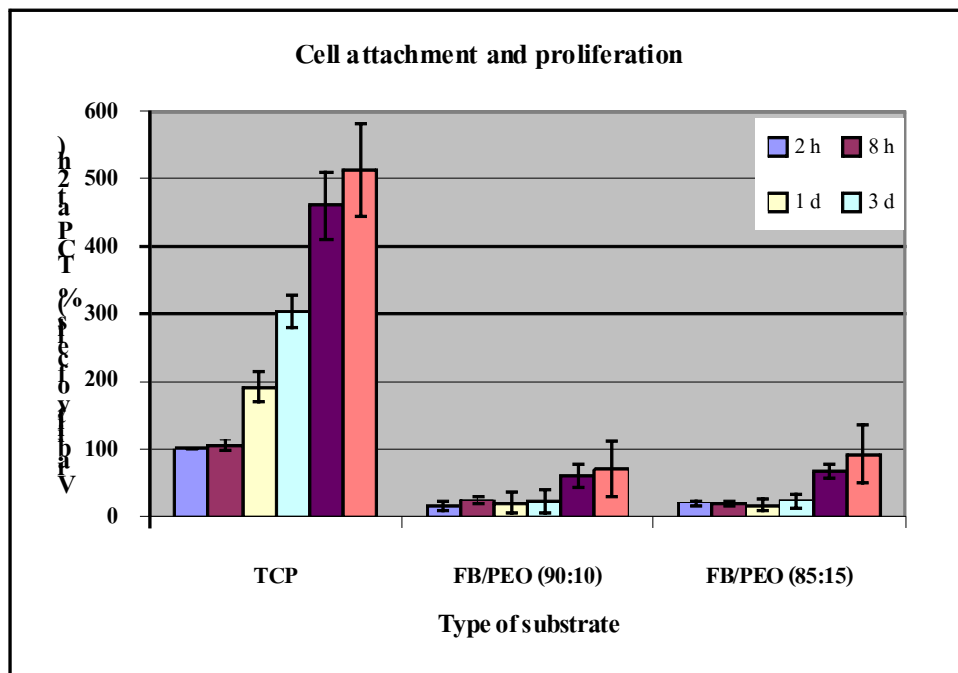


ภาพที่ 4.21 แสดงสารละลายสีม่วงที่เกิดขึ้นภายหลังจากเติม DMSO ลงไปละลาย formazan crystal ที่เกิดจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

เพื่อเปรียบเทียบผลในเชิงปริมาณจึงนำสารละลายสีที่ได้มาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และคำนวณเป็น % การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ผลที่ได้รับแสดงในกราฟแท่งในภาพที่ 4.22 โดยที่ เซลล์ที่เกาะอยู่บน TCP ที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังจากการ seeding ได้ถูกใช้เป็นค่า reference เพื่อคำนวณหา % เซลล์ที่มีชีวิตที่ยึดเกาะอยู่บนแผ่นฟิล์ม FB/PEO ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยจะเห็นได้ว่าปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตและเจริญอยู่บน substrates ทุกชนิดที่ทำการทดลองค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น

จากกราฟที่แสดงพบว่า ตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เกาะอยู่บน TCP ที่เป็น positive control มีจำนวนมากกว่าเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่บนแผ่นฟิล์ม FB/PEO ทั้งสองสูตร โดยจะเห็นได้ว่าที่เวลา 2 และ 8 ชั่วโมง เซลล์ที่เกาะอยู่บน TCP มีปริมาณไม่แตกต่างกัน แต่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงไปจนถึง 7 วัน เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ซึ่งถือเป็นเรื่องปกติของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน TCP อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเซลล์ที่เกาะบนแผ่นฟิล์ม FB/PEO พบว่า ที่เวลาการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 2 ชั่วโมงไปจนถึง 3 วัน ปริมาณของเซลล์ที่เกาะอยู่บนแผ่นฟิล์มมีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ยังอยู่ในช่วงระยะพักและปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่เมื่อเจริญอยู่บนผิวของแผ่นฟิล์ม เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 5 วัน และ 7 วัน พบว่าเซลล์ที่เกาะอยู่บนแผ่นฟิล์มเริ่มมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดทั้งบน FB/PEO (90:10) และ FB/PEO (85:15) โดยปริมาณเซลล์ที่เจริญบน FB/PEO (85:15) มีแนวโน้มมากกว่าที่เจริญบน FB/PEO (90:10) เล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้ถึงแม้ว่า

เซลล์ที่เจริญอยู่บนแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรมีการเจริญเพิ่มจำนวนช้ากว่าที่เพาะเลี้ยงใน TCP แต่ก็แสดงให้เห็นว่าฟิล์ม FB/PEO ทั้งสองสูตรที่ผลิตขึ้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์



ภาพที่ 4.22 กราฟแท่งแสดงเซลล์มีชีวิตที่เกาะอยู่บน TCP, FB/PEO (90:10) และ FB/PEO (85:15) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2, 8 ชั่วโมง 1, 3, 5 และ 7 วัน โดยที่เซลล์ที่เกาะอยู่บน TCP ที่เวลา 2 ชั่วโมง หลังจากการ seeding ได้ถูกใช้เป็นตัว reference เพื่อคำนวณหา %เซลล์ที่มีชีวิตที่ยึดเกาะอยู่บนแผ่นฟิล์ม FB/PEO ที่ระยะเวลาต่างๆ

4.2.4.2. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม


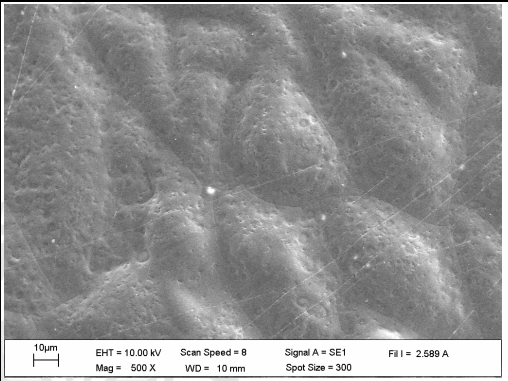
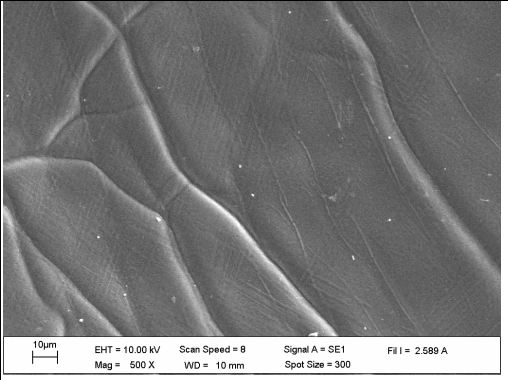
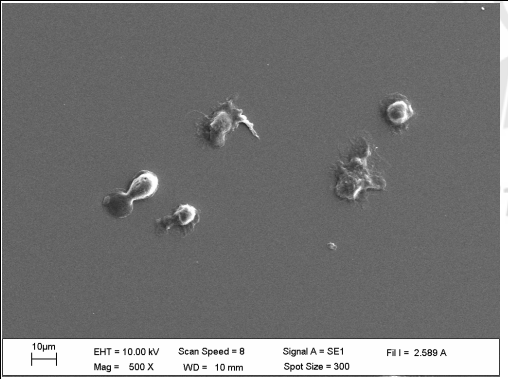
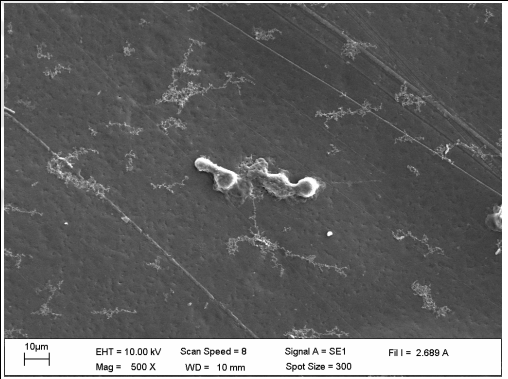
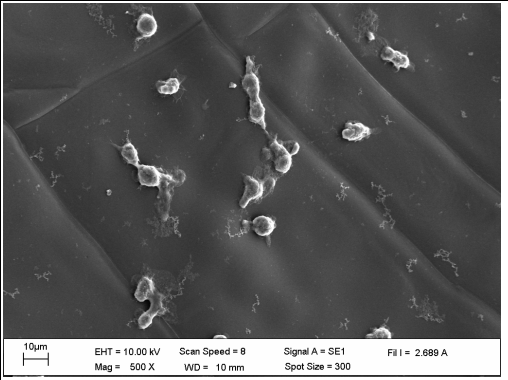
การประเมินประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มในการสนับสนุนให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญเพิ่มจำนวนนั้นนอกจากวิธีการ MTT assay แล้ว การศึกษาการเจริญของเซลล์ด้วยเทคนิค SEM เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเนื่องจาก MTT assay เป็นการศึกษาผลของ mitochondria's activity ที่เกิดจากเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บนวัสดุที่เพาะเลี้ยงเพียงอย่างเดียว ซึ่งการศึกษาการเจริญของเซลล์ด้วย SEM นั้นนอกจากจะสามารถดูการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้แล้ว ยังสามารถสังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุหรือภาชนะที่ใช้ทดสอบได้อีกด้วย ซึ่งสามารถบอกได้ถึงลักษณะ phenotype ของเซลล์ การเกิด interaction กันระหว่างเซลล์ และความเป็นไปได้ในการเกิด interaction ระหว่างเซลล์และ substrates ที่เซลล์ยึดเกาะอยู่ จากตารางที่ 4.9 แสดงภาพถ่ายจาก SEM

ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts: HFF-1) ที่เจริญอยู่บนผิวของแผ่นฟิล์ม FB/PEO และ cover glasses เป็นเวลา 2 ชั่วโมง, 8 ชั่วโมง, 1, 3, 5 และ 7 วัน

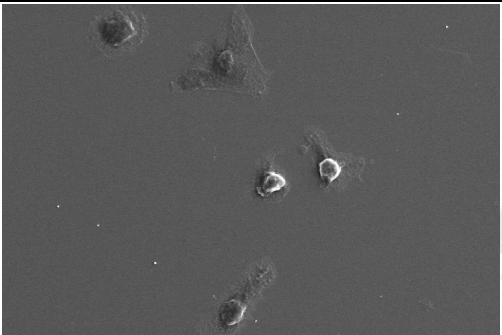

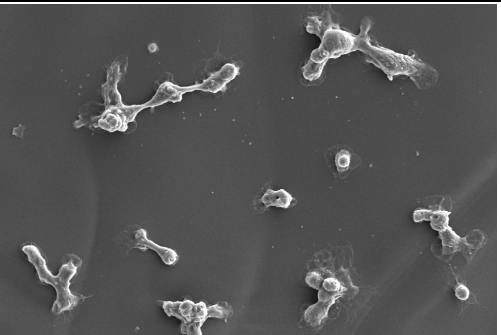
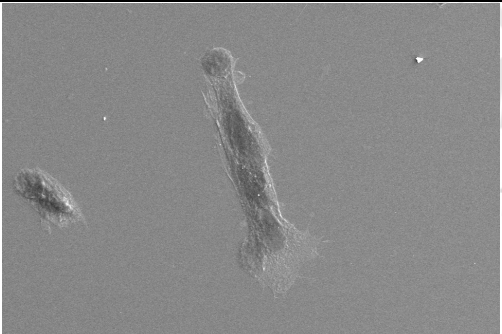
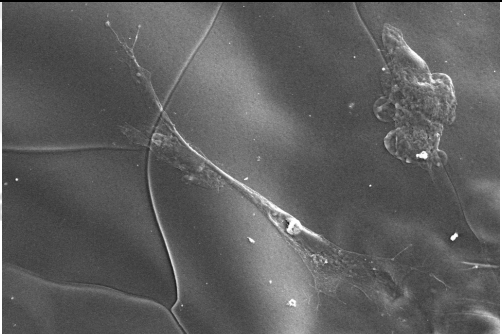
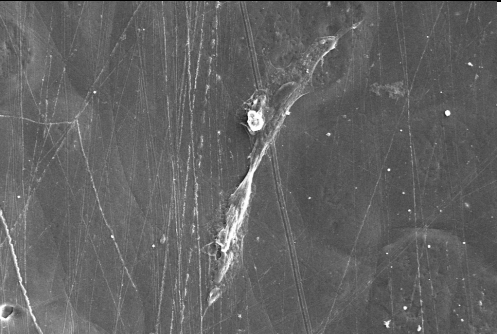
จากตารางที่ 4.9 เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงลงบน substrates ทุกชนิดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมและมีขนาดของเซลล์ประมาณ 10 ไมครอน (μm) และจากการสังเกตพบว่า FB/PEO ฟิล์ม สูตร 85:15 มีปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะบนผิวมากกว่าสูตร 90:10 หลังจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไป 8 ชั่วโมง เซลล์เริ่มมี lamellipodia ที่ยื่นออกมาจากตัวเซลล์เพื่อยึดเกาะกับแผ่นฟิล์มทั้งสองอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการเริ่มต้นการขยายขนาดของเซลล์แล้ว (cell expansion) ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ก็พบได้ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน cover glass เช่นเดียวกัน เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 24 ชั่วโมงหรือ 1 วัน พบว่าเซลล์ที่เจริญอยู่ที่บน cover glass และแผ่นฟิล์มแสดงรูปร่างคล้ายรูปกระสวย (spindle morphology) อย่างชัดเจน ซึ่งแสดงถึงลักษณะรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เจริญเติบโตเต็มที่

ภาพถ่าย SEM ของเซลล์ในวันที่ 3, 5 และ 7 หลังจากการเพาะเลี้ยงพบว่า เซลล์ที่เจริญอยู่บน cover glass มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็วและมีการเกิด interaction กันระหว่างเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้พบว่าเซลล์มีขนาดใหญ่และมีรูปร่างแบนมากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไปจนกระทั่งถึงวันที่ 7 ซึ่งรูปร่างที่สังเกตเห็นนี้แสดงถึงการเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ส่วนการสังเกตเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เจริญบนแผ่นฟิล์ม FB/PEO ทั้งสองสูตร พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับบน cover glass คือ เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นและมีการเกิด interaction กันระหว่างเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์ที่เจริญบนแผ่นฟิล์ม FB/PEO ส่วนใหญ่ยังคงมีรูปร่างลักษณะคล้ายกระสวยเจริญอยู่บนผิวของแผ่นฟิล์ม ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของ substrates ที่สนับสนุนให้เซลล์สามารถรักษารูปร่างปกติของเซลล์เอาไว้ได้ และถึงแม้ว่าการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์บนแผ่นฟิล์มจะค่อนข้างช้ากว่าบน cover glass แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าแผ่นฟิล์ม FB/PEO มีความสามารถในการช่วยกระตุ้นให้เซลล์สร้างและหลั่ง extra cellular matrix (ECM) ออกมามากกว่า จะเห็นว่าความสามารถของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมสามารถที่จะช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ คล้ายกับการนำ ไฟโบรอินจากไหมป่า(ไหมที่ไม่ได้กินใบหม่อนเป็นอาหาร) ซึ่งให้ผลดีใกล้เคียงกันกับไฟโบรอินที่ได้จากหนอนไหมบ้าน (Acharya, G, and Kundu, 2009) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่มีลักษณะคล้ายกัน แต่กรรมวิธีการผลิตแผ่นฟิล์มแตกต่างกันโดยใช้ electrospinning (Sugihara, 2000; Min et al., 2004) หรือนำสารไฟโบรอินมาประดิษฐ์เป็นแผ่นฟิล์ม เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานบาดแผลในสัตว์ทดลอง เช่น สุนัข หนูที่มีการดูความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภูมิคุ้มกัน(Roh et al, 2006) เป็นต้น

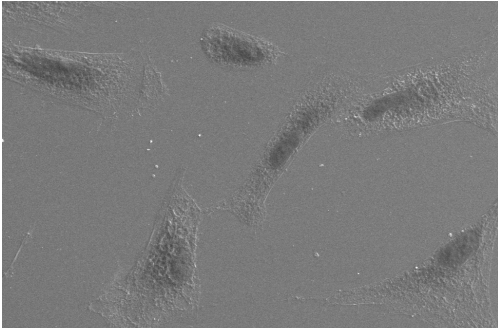
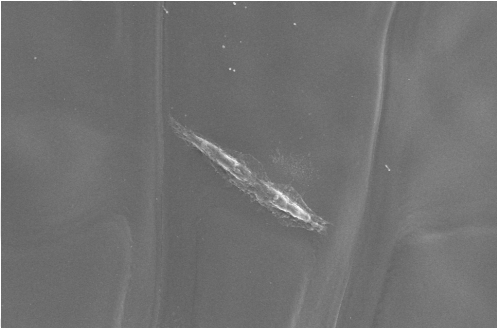
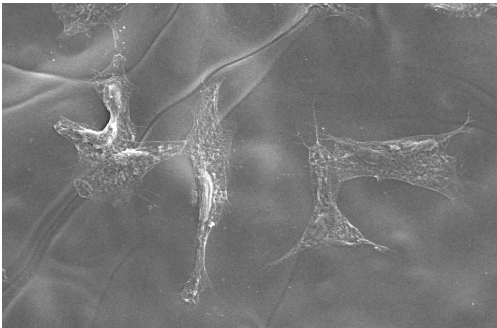
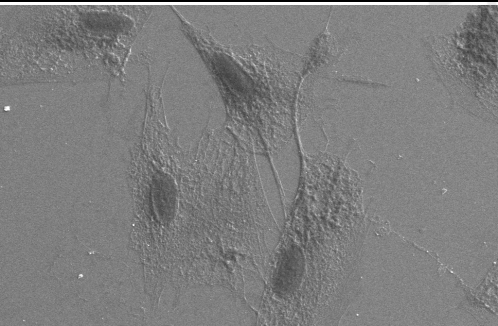
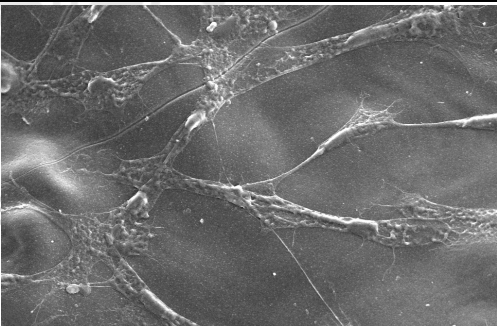
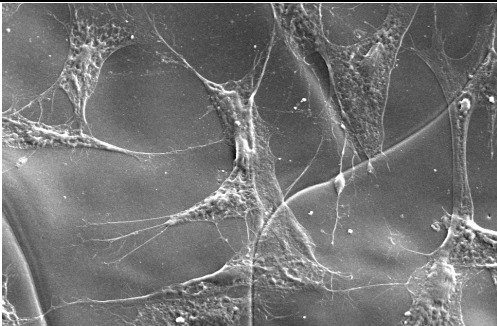
ตารางที่ 4.9 แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่บน substrates แต่ละชนิดที่ระยะเวลาต่างๆ

Cell seeding/ culturing time point	Type of substrate		
	Cover glass	Film FB/PEO (90:10)	Film FB/PEO (85:15)
Control (no cell seeding)			
2 h			

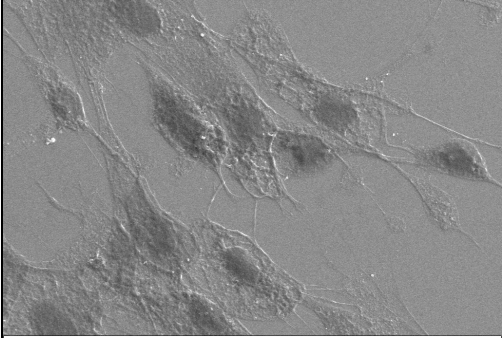
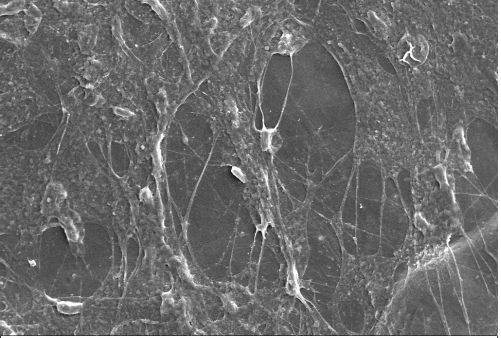
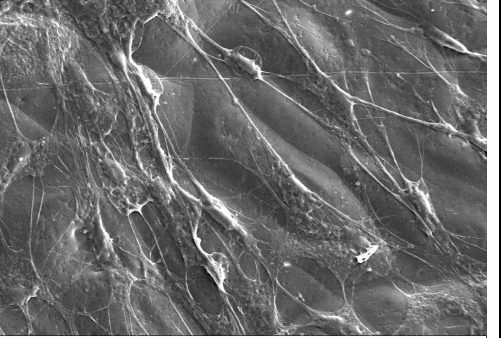
ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

Cell seeding/ culturing time point	Type of substrate		
	Cover glass	Film FB/PEO (90:10)	Film FB/PEO (85:15)
8 h	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.689 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.689 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.689 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>
24 h or 1 d	 <p>20µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.689 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>20µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.689 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.689 A Mag = 500 X WD = 11 mm Spot Size = 300</p>

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

Cell seeding/ culturing time point	Type of substrate		
	Cover glass	Film FB/PEO (90:10)	Film FB/PEO (85:15)
3 d	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>
5 d	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

Cell seeding/ culturing time point	Type of substrate		
	Cover glass	Film FB/PEO (90:10)	Film FB/PEO (85:15)
7 d	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>	 <p>10µm EHT = 10.00 kV Scan Speed = 8 Signal A = SE1 Fil I = 2.589 A Mag = 500 X WD = 10 mm Spot Size = 300</p>





บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

โครงสร้างส่วนใหญ่ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินที่ผสมจากพอลิเมอร์ต่างๆ ได้แก่ แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Polyethylene oxide (PEO) บ่งบอกลักษณะโครงสร้างภายในเป็นแบบ β -sheet กรณีของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมสาร Sodium alginate (AG) พบโครงสร้างภายในเป็นแบบ random coil และแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมสาร Polyvinyl alcohol(PVA) พบโครงสร้างภายในแบบ random coil

แผ่นฟิล์มที่ผลิตขึ้นจากโปรตีนไฟโบรอินและแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมสารพอลิเมอร์ต่างชนิดกัน จะทำให้ค่าโครงสร้างพันธะภายในของแผ่นฟิล์มแตกต่างกันรวมทั้งความสามารถทาง Mechanical testing ด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของพันธะภายในของสารพอลิเมอร์แต่ละชนิด และ การจับตัวกันใหม่ของพันธะไฮโดรเจนอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนลักษณะจากแบบ random coil ไปเป็นโครงสร้างแบบ β -sheet

จากการประดิษฐ์แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมสารพอลิเมอร์ต่างๆ ซึ่งสารพอลิเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองนี้คือ Polyethylene oxide (PEO) เข้มข้น 3% ซึ่งอัตราส่วนไฟโบรอิน(เข้มข้น1.5%) ต่อสาร PEO เป็น 85:15 โดยน้ำหนัก มีคุณสมบัติไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มีลักษณะโครงสร้างภายในเป็นแบบ β -sheet และนอกจากนี้ช่วยให้คุณลักษณะของแผ่นฟิล์มมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการประยุกต์ทางการแพทย์ และมีคุณสมบัติในการช่วยให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ หรือเซลล์เนื้อเยื่อเจริญได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถ้านำไปใช้เป็นวัสดุปิดบาดแผล จะสามารถช่วยให้บาดแผลหายเร็วยิ่งขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาทดลองผลิตฟิล์มไฟโบรอิน ทำให้ทราบว่าโครงสร้างของไฟโบรอินและโครงสร้างของพอลิเมอร์เมื่อนำมาผสมกัน ทำให้โครงสร้างของไฟโบรอินเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่แตกต่างกันอาจจะเป็นการเหนี่ยวนำของพันธะระหว่างโมเลกุลของสารสองชนิดได้ (สารไฟโบรอินกับสารพอลิเมอร์ตัวอื่น) ซึ่งโครงสร้างภายในของแผ่นฟิล์ม มีผลต่อการนำไปใช้งานต่อ เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม และค่าที่ทดสอบแรงดึง ความเค้นความเครียดของแผ่นฟิล์มมีค่าที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับว่าใช้สารพอลิเมอร์ต่างกัน และค่าเหล่านั้น อาจมีผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพแตกต่างกันได้

การประยุกต์นำเอาแผ่นฟิล์มไปทดสอบการเลี้ยงเซลล์และเปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์กับตัวอย่างควบคุม TCP (tissue culture plate) เป็นตัวอ้างอิงการทดสอบการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนเซลล์ (positive control) เพื่อดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์ปกติที่ไม่ได้มีแผ่นให้ยึดเกาะซึ่งให้ผลจำนวนเซลล์ที่มากกว่าและแตกต่างจากแผ่นฟิล์ม ซึ่งในขณะเดียวกันแผ่นฟิล์มอาจมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ช้ากว่า เพราะคาดว่าเซลล์กำลังปรับปรุงตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมกับแผ่นฟิล์มที่ยึดเกาะหรือมีการสร้างกระบวนการภายในเซลล์และพัฒนาโครงสร้างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ให้เซลล์สามารถทำหน้าที่ได้เต็มที่และดีกว่า (สังเกตจากภาพถ่าย SEM)

จากเหตุการณ์ดังกล่าว แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมสามารถที่จะช่วยให้เซลล์เจริญเติบโตได้ซึ่งอัตราส่วนของสารผสมภายในแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของสารพอลิเมอร์ต่างชนิดกันเป็นส่วนที่สำคัญ เพราะจะมีผลต่อการคงตัวของแผ่นฟิล์ม เมื่อนำไปผ่านกระบวนการต่างๆ ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งในบางสูตรไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ จำเป็นต้องมีการตัดสัดส่วน และไม่ใช้สารพอลิเมอร์บางชนิด อาจจะทำให้ต้องใช้เวลาในการทดสอบนานและทำให้แผ่นฟิล์มบางสูตรที่คุณภาพในการเลี้ยงเซลล์อาจจะดีกว่าแผ่นฟิล์มไฟโบรอินที่ผสม PEO (สูตร FB/PEO 90:10, 85:15) และไม่ได้นำมาทดสอบ เพราะเนื่องจากลักษณะการคงตัวของแผ่นฟิล์มไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ต่อ (การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์)

จากคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินดังกล่าว ทำให้ทราบว่า แผ่นฟิล์มที่ผลิตขึ้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุปิดแผลหรือวัสดุทางแพทย์ ที่สามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ (extracellular matrix) ในระดับหนึ่ง ซึ่งอาจจะทำให้ระยะเวลาการรักษาบาดแผลให้หายได้เร็วยิ่งขึ้นกว่าการรักษาด้วยวัสดุปิดแผลแบบปกติ และในปัจจุบันเริ่มมีการพัฒนาแผ่นฟิล์มที่สามารถช่วยกระตุ้นให้เซลล์สร้าง extracellular matrix หรือว่าโปรตีนที่สร้างเหมือนกับเซลล์เนื้อเยื่อปกติ จะเหมาะสำหรับคนที่ผิวหนังเกิดการเสียหาย และซ่อมแซมตัวเองได้ช้า โดยที่แผ่นฟิล์มในอุดมคติที่พึงไว้คือ ต้องมีลักษณะยึดหยุ่นคล้ายผิวหนังมนุษย์ และสามารถเข้ากับเซลล์ผิวหนังของมนุษย์

ได้โดยที่ไม่เกิดความเป็นพิษ ควรที่จะสามารถย่อยสลายได้ง่าย (ควรจะค่อยๆย่อยสลาย แล้วถูกแทนที่ด้วยเซลล์หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เซลล์สร้างมา ทำให้เกิดเป็นผิวหนังใหม่ทดแทนบริเวณที่เสียหายไป) ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารหรือ polymer ที่นำมาใช้ผลิตฟิล์มด้วย

ดังนั้นการทดสอบคุณสมบัติ ลักษณะโครงสร้าง และการนำไปใช้ทดสอบในการเลี้ยงเซลล์ จึงเป็นการทดสอบ เก็บข้อมูลพื้นฐาน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่นำสารไฟโบรอินจากไหม ไปพัฒนาต่อในอุตสาหกรรมทางการแพทย์ และส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตใหม่ให้เพิ่มมูลค่ายิ่งขึ้น ต่อไป



ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายมานะ โนนชัญญ์ นามสกุล สุธีร์วัฒนานนท์
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Manote Sutheerawattananonda
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน
3100601383242
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
สำนักเทคโนโลยีการเกษตร
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์/โทรสาร 044-224-230/044-224-150
E-mail : msutheera@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา

การศึกษา:

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี	หัวข้อวิทยานิพนธ์
Post-doc*	Food Science	University of Minnesota	2542	UF Cheddar cheese
Ph.D.*	Food Science	University of Minnesota	2541	Physicochemical properties of process cheese: Influence on meltability
MS*	Food Science	University of Minnesota	2537	Physical properties and microstructure of extruded wheat
BS	Food Technology	Oregon State University	2534	-

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ระบุสาขาวิชาการ

Food Microstructure, Food Processing

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

หัวหน้าโครงการ

- 7.1.1 คุณลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างภายในของพาสต้าข้าวเจ้าที่ได้จากการอัดพอง (Physical characteristics and microstructure of extruded rice pasta) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 7.1.2 ผลกระทบของสภาวะการทำเอ็กทรูชันต่อคุณสมบัติของเนื้อสัมผัสและโครงสร้างภายในของผลิตภัณฑ์ข้าวเจ้าที่พองตัวและไม่พองตัว (Influences of extrusion parameters on textural properties and microstructure of expanded and non-expanded products) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 7.1.3 การพัฒนากรรมวิธีการเคลือบเส้นใยสังเคราะห์ด้วยชิรีซิน (Surface modification of synthetic and natural fibers for protein coating) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 7.1.4 การพัฒนาเกมแอนิเมชันด้านความปลอดภัยของอาหาร (Food Safety 3-D animation game) (ระยะเวลาดำเนินการ 6 เดือน) แหล่งทุน กองทุนนวัตกรรม สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
- 7.1.5 คุณภาพและปริมาณของ CLA (conjugated linoleic acid) ในน้ำนมหลังผ่านขบวนการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรเซชันและแบบ UHT (Qualities and contents of CLA (conjugated linoleic acids) in cow milk after pasteurization and UHT process) (ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 7.1.6 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของผง fibroin และ sericin ที่ผลิตได้จากรังไหมและน้ำต้มไหม (Physicochemical properties of fibroin and sericin powders

- produced from silk cocoons and silk water) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี)
แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 7.1.7 การศึกษาความเป็นไปได้ในการสกัดสาร phytoestrogens จากมันมือเสือในประเทศไทยเพื่อทดแทนการใช้ premarin (Possibility of using phytoestrogens extracted from native yams in Thailand to substitute Premarin) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 7.1.8 ปลาสำเร็จรูป (Ready-to-eat Pla-Som) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.1.9 การศึกษากรรมวิธีการสกัดและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ Lutein จากรังไหมเหลือของ *Bombyx mori* เพื่อใช้เป็นเครื่องสำอางและยา (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย
- 7.1.10 ความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรไทยเป็นยาแก้ไขอาการไร้สมรรถภาพในชาย (Possibility of using Thai herbal medicine to correct male incompetence) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 7.1.11 การศึกษาการทำเข้มข้นโปรตีนซีรีซินด้วยวิธีการ Ultrafiltration และ Falling-film evaporation (ระยะเวลาดำเนินการ 3 เดือน) แหล่งทุน Industrial Technology Assistance Program (ITAP) สวทช
- 7.1.12 ความคงตัวของโปรตีนซีรีซินบนผ้า polyester และ cotton ต่อการซักตามมาตรฐานของกลุ่มประเทศยุโรป (ระยะเวลาดำเนินการ 9 เดือน) แหล่งทุน Industrial Technology Assistance Program (ITAP) สวทช
- 7.1.13 การศึกษาวิธีการสกัดและความคงตัวของสารป้องกันอนุมูลอิสระ DNJ และคลอโรฟิลล์จากชาหม่อน (ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน) แหล่งทุน Industrial Technology Assistance Program (ITAP) สวทช
- 7.1.14 อาหารเสริมโปรตีนไหม sericin-chromium ต่อการดูดซึม chromium ในลำไส้หนูและการลดระดับ LDL (Silk Protein, Sericin-Chromium Supplement elevates intestinal absorption of chromium and reduces LDL

level in rats) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
สุรนารี

7.1.15 การศึกษาฤทธิ์ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักและโรคหลอดเลือด
หัวใจของซีรีซินเมื่อเป็นอาหารเสริม (Study of sericin as dietary
supplement for colorectal cancer and coronary artery disease (CAD
prevention) ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี แหล่งทุน สำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

7.1.16 การวิเคราะห์คุณภาพซาก องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของไก่กระเทง
ไก่พื้นเมืองและไก่เพศผู้ (A comparative study of characteristics, chemical
composition and sensory qualities of hybrid native chicken, commercial
broilers and laying male chicks) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

7.1.17 เรื่อง โปรแกรมฐานข้อมูลอุตสาหกรรมอาหารของไทย (ระยะเวลา
ดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุนศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
แห่งชาติ

7.1.18 การพัฒนาน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังภายหลังการบำบัดให้มี
คุณภาพเทียบเท่าน้ำประปา (Development of wastewater from cassava
starch plant to obtain tap water quality) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่ง
ทุน กองทุนนวัตกรรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

7.1.19 การคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิต PHAs การสกัดและการแยกให้บริสุทธิ์
สำหรับการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (ระยะเวลาดำเนินการ 2
ปี) แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ

7.1.20 การผลิตกรดแล็กติกเพื่อใช้ผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแล็กติกใน
ประเทศไทย (ระยะเวลาดำเนินการ 10 เดือน) แหล่งทุน สำนักงาน
นวัตกรรมแห่งชาติ

สิทธิบัตร

- 1) กรรมวิธีการผลิตพาสต้าข้าวเจ้า ได้รับสิทธิบัตรเมื่อวันที่ 22 ธันวาคม 2549
- 2) กรรมวิธีการเคลือบฝืนเส้นใยด้วยโปรตีนชิริซิน
- 3) กรรมวิธีการเคลือบโปรตีนชิริซินบนฝืนเส้นใย
- 4) สูตรน้ำยาโปรตีนชิริซิน เคลือบฝืนเส้นใย
- 5) การผลิตสารละลายไฟโบรอินเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบอุตสาหกรรม
- 6) กรรมวิธีการเพิ่ม CLA ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก
- 7) กรรมวิธีการผลิตปลาต้มด้วยก๊อแล็กซีแบคทีเรียกรดแล็กติก
- 8) กรรมวิธีการผลิตน้ำส้มและน้ำมะนาวผงด้วยวิธีการพ่นฝอยแบบแห้งเยือกแข็ง
- 9) กรรมวิธีการผลิต Sericin – Lutien Complex และ Lutein จากไหม
- 10) Method for extracting silk extract containing lutein. PCT Application Number: PCT/TH2010/000048 International Filing Date 30 December 2010
- 11) Silk-based bioactive oligopeptide compositions and manufacturing process therefor. PCT Application Number: PCT/TH2011/000037 International Filing Date 26 August 2011

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในต่างประเทศ:

- Kaewkorn, W., Limpeanchob, N., Tiyaboonchai, W., Pongcharoen, S.,
Sutheerawattananonda, M. (2011) Effects of silk sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Biological Research* (Accepted for publication August, 2011).
- Tiyaboonchai, W., Chomchalao, P., Pongcharoen, S., Sutheerawattananonda, M., and Sobhon, P. (2011) Preparation and characterization of blended Bombyx mori silk fibroin scaffolds for cartilage tissue engineering. *Fibers and Polymers* 12, 324-333.
- Limpeanchob, N., Trisat, K., Duangjai, A., Tiyaboonchai, W., Pongcharoen, S.,
Sutheerawattananonda, M. (2010) Sericin reduces serum cholesterol in rats and cholesterol uptake into Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12519-12522.

Sutheerawattananonda, M. and Bastian, E. D. Influence of pH on flow/meltability of process cheese. *J. Dairy Sci.* 1998, 81(Supplement 1), 24. Presented at the 93rd Annual meeting of the American Dairy Science Association, Denver, Colorado. July 1998.

Sutheerawattananonda, M. and Bastian, E. D. Monitoring process cheese meltability using dynamic stress rheometry. *J. Texture Studies.* 1997, 29, 169-183. Presented at the 92nd Annual meeting of the American Dairy Science Association, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. June 1997.

Sutheerawattananonda, M., Fulcher, R. G., Martin, F., and Bastian, E. D. Fluorescence image analysis of process cheese manufactured with trisodium citrate and sodium chloride. *J. Dairy Sci.* 1997, 80, 620-627.

Sutheerawattananonda, M., Bhattacharya, M., Moore, W., and Fulcher, R. G. Differences in physical properties and microstructure of wheat cultivar in extrusion qualities. *Cereal Chem.* 1994, 71, 627-631.

งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อแผนงานวิจัย และ/หรือโครงการวิจัยและสถานภาพในการทำวิจัย

- การพัฒนาอาหารที่เป็นยาและผลิตภัณฑ์จากลูทีนที่สกัดได้จากรังไหมเหลือ และอนุพันธ์ ขนาดเล็กของโปรตีนซีรีซิน (Development of nutraceutical and pharmaceutical products from lutein extracted from Bombyx mori cocoons and sericin derivatives) ปีสุดท้าย
- การสกัดและทำให้บริสุทธิ์กรดแล็กติกจากน้ำหมัก (Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth) แหล่งทุน บริษัท ปตท (มหาชน) จำกัด ปีสุดท้าย
- การเพิ่มปริมาณแป้งต้านทานการย่อยในผลิตภัณฑ์พาสต้าข้าวเจ้า (Increase of resistant starch in rice pasta products) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (เตรียมรายงานฉบับสมบูรณ์)
- การพัฒนาระบบการผลิต CLA ต้นแบบด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม (development of conjugated linoleic acid (CLA) production model using lactic acid bacteria (LAB) for industrial application) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (เตรียมรายงานฉบับสมบูรณ์)