รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพด้านเครื่องสำอางของสารสกัดยางมะละกอ

Cosmetic bioactivity of *Carica papaya* latex extract

โดย

ดร. ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพด้านเครื่องสำอางของสารสกัดยางมะละกอ

Cosmetic bioactivity of *Carica papaya* latex extract

โดย

ดร. ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ประจำปีงบประมาณ 2552 ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการผลักดันให้งานวิจัยนี้บรรลุผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ได้แก่ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ผู้เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย คณะอนุกรรมการติดตามและประเมินผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ผู้คอยให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ คุณชลธิชา บรรดาศักดิ์ ผู้ช่วยนักวิจัย และคุณวิไล ดวงใจ ผู้ช่วยติดต่อประสานงานและจัดทำเอกสารต่างๆ

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ต้องการศึกษาหาความรู้ในเรื่องที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้วิจัยขอน้อมรับ

ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

ธันวาคม 2557

บทสรุปผู้บริหาร

งานวิจัยนี้ที่จะมุ่งศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่มีประโยชน์สำหรับการประยุกต์ในทางเครื่องสำอาง ได้แก่ โปรติเอสแอคติวิตีสำหรับพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์หลุดลอกเซลล์ผิวหนังชั้นนอกเพื่อความกระจ่างใส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อต้านริ้วรอย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อผิวกระจ่างใสหรือลดจุดด่างดำหรือลดฝ้า และความสามารถในการดูดกลืนรังสียูวีสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดด หากผลการศึกษาเป็นที่น่าพอใจจะทำให้ต้นมะละกอมีบทบาทที่สำคัญในทางเครื่องสำอางนอกเหนือไปจากการบริโภคและการผลิตเอนไซม์ปาเปนซึ่งมีค่อนข้างน้อยในปัจจุบัน ที่สุดจะเป็นการเพิ่มมูลค่าผลไม้เศรษฐกิจของไทย

โดยการศึกษาวิจัยมีแนวคิดจากองค์ความรู้ที่ทราบว่ายางมะละกอถูกขับออกมาหลังจากที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นมะละกอเกิดบาดแผลซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตัวเองตามธรรมชาติจากศัตรูต่างๆ เช่น สภาวะแวดล้อมที่รุนแรง เชื้อจุลินทรีย์ แมลงและสารเคมีต่างๆ โดยต้นมะละกอจะมีกลไกการขับน้ำยางคือเมื่อแรกเริ่มเกิดบาดแผลจะขับน้ำยางในรูปของเหลวและจากนั้นน้ำยางเหลวจะเกิดการแข็งตัวอย่างรวดเร็วเพื่อปิดบาดแผล ในยางมะละกอประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ หลายชนิด สารชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน สารยับยั้งเอนไซม์ โปรตีนมวลโมเลกุลต่ำ และกลูทาไธโอน นอกจากนั้นยังประกอบด้วยสารอีกหลายชนิดที่ยังไม่ถูกค้นพบและทำการศึกษา สารเหล่านี้มีบทบาททางชีวภาพที่สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูทาไธโอนนั้นมีประสิทธิ ภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารยับยั้งไทโรซิเนส ส่วนเอนไซม์ SOD มีความสามารถในการกำจัด oxygen free radical ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง นอกจากนั้นการที่น้ำยางถูกขับออกมาแล้วเกิดการแข็งตัวปิดบาดแผลนั้นอย่างรวดเร็วก่อนที่จะมีการซ่อมแซมเซลล์บริเวณดังกล่าว จึงคาดว่าในน้ำยางน่าจะมีสารสำคัญที่ช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากในทางเครื่องสำอางในแง่การช่วยกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนและอีลาสตินใต้ผิวหนัง

ผลการวิจัยพบว่ายางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลมะละกอซ้ำให้ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของโปรติเอสสูงกว่ายางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลครั้งแรก สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >30 kDa มีความเข้มข้นของโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีสูงที่สุด โดยมีค่าโปรตีนในช่วง 139.96-144.82 mg/mL และแอคติวิตีของโปรติเอส 372.67-4,334.65 units ในขณะที่แทบไม่พบค่าปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีในสารละลายแยกส่วนที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 30 kDa

สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >10-30 kDa, >3-10 kDa และ ≤3 kDa ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.11-1.66, 1.28-1.85 และ 1.13-1.64 mg/mL

ตามลำดับ โดยให้ฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน BHT การศึกษาประสิทธิภาพการดูดกลืนรังสียูวีพบว่าสารสกัดยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >30 kDa สามารถดูดกลืนยูวีซีและยูวีบีได้สูงกว่าสารสกัดยางมะละกออื่นๆ แต่ไม่มีตัวอย่างใดสามารถดูดกลืนช่วงยูวีเอได้ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอส่วนใหญ่สูงกว่าฤทธิ์ของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยฤทธิ์ของส่วนส่วนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เกิดจากเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นองค์ประกอบเกิดการย่อยไทโรซิเนสจึงเกิดการยับยั้งที่ดีในขณะที่ส่วนที่มีโมเลกุลเล็กเกิดจากสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรติเอส

จากผลการทดลองสามารถวิเคราะห์ได้ว่าสารละลายแยกส่วนยางมะละกอสามารถนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ในเครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยส่วนที่เป็นโปรติเอสซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่สามารถประยุกต์เป็นสารช่วยหลุดลอกเซลล์ผิวชั้นนอกของผิวหนังในสภาวะที่อ่อนโอนต่อผิวมากกว่าสารประเภทกรดผลไม้ นอกจากนั้นยังลดการระคายเคืองเมื่อเปรียบเทียบกับกรดผลไม้ เนื่องจากเอนไซม์มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถซึมเข้าสู่ผิวหนังชั้นลึกลงไปได้ ในขณะที่สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีโมเลกุลเล็กสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยให้ฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน จึงสามารถประยุกต์ได้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวบำรุงผิวประเภทลดริ้วรอยและลดสีผิวได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายแยกส่วนจากยางมะละกอไม่สามารถดูดกลืนรังสียูวีได้จึงไม่สามารถพัฒนาเป็นสารกันแดดได้

ผลการศึกษาวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับชาติจำนวน 1 เรื่อง และได้รับการนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 1 เรื่อง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเครื่องสำอางของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอ ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ได้จากการกรีดครั้งแรกและการกรีดซ้ำจะได้ผลผลิตน้ำยาง 4 ชนิดคือ น้ำยางเหลว (FL) และยางที่แข็งตัว (FC) ที่ได้จากการกรีดครั้งแรก น้ำยางเหลว (RL) และยางแข็งตัว (RC) ที่ได้จากการกรีดซ้ำ ตัวอย่างยางมะละกอถูกแยกส่วนตามขนาดโมเลกุลโดยใช้เทคนิคปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงจะทำให้ได้สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ ตามขนาดรูพรุนของแผ่นกรอง

ยางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลมะละกอซ้ำให้ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของโปรติเอสสูงกว่ายางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลครั้งแรก สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >30 kDa มีความเข้มข้นของโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีสูงที่สุด โดยมีค่าโปรตีนในช่วง 139-144 mg/mL และแอคติวิตีของโปรติเอส 372-4,334 units ในขณะที่แทบไม่พบค่าปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีในสารละลายแยกส่วนที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 30 kDa สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >10-30 kDa, >3-10 kDa และ ≤3 kDa ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.11-1.85 mg/mL โดยให้ฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน BHT สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >30 kDa สามารถดูดกลืนยูวีซีและยูวีบีได้สูงกว่าสารสกัดยางมะละกออื่นๆ แต่ไม่มีตัวอย่างใดสามารถดูดกลืนช่วงยูวีเอได้ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอส่วนใหญ่สูงกว่าฤทธิ์ของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยค่า IC_{50} ต่ำที่สุดพบได้ในตัวอย่างแยกส่วนขนาดโมเลกุล >30 kDa คือ 25.11 μg/mL เปรียบเทียบกับของกรดโคจิก 40.02 μg/mL การใช้HPLC คอลัมน์ C18 ไม่สามารถตรวจสอบองค์ประกอบของสารในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอได้ ในขณะที่ SDS-PAGE สามารถยืนยันขนาดโมเลกุลของโปรตีนตามช่วงโมเลกุลของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ: สารละลายแยกส่วน/ ยางมะละกอ/ ฤทธิ์ทางเครื่องสำอาง/ ขนาดโมเลกุล

Abstract

This research aimed to study cosmetic bioactivity of fractionated papaya latex extract. When wounding, the papaya fruit immediately secretes liquid latex and then the liquid form becoming clotted within a few minutes. Therefore, the latex sample collected in this study can be categorized into 4 types liquid first time tapping latex (FL), clotted first time tapping latex (FC), liquid repeated tapping latex (RL) and clotted repeated tapping latex (RC).

The samples were fractionated into 4 molecular weight ranges depend upon the molecular weight cut-off of the membrane pore. The repeated tapping latex showed higher proteolytic activity and protein content than those of the first time tapping. When fractionated, the >30 kDa sample size provided the highest proteolytic activity ranging 372-4,334 units/mL and protein ranging 139-144 mg/mL. The fractionated papaya latex size >10-30 kDa, >3-10 kDa and ≤3 kDa showed greater radical scavenging activity (IC_{50} ranging 1.11-1.85 mg/mL) than the standard BHT. The papaya latex fractionation of MW >30 kDa was superior absorbability for UVC and UVB to others fractionation. However, all samples of fractionated papaya latex were not able to absorb UVA ray. Most of the papaya latex fractionation exhibited greater tyrosinase inhibitory activity when compared to standard kojic acid (IC_{50} 40.02 μg/mL) which the lowest IC_{50} value of 25.11 μg/mL was found in the >30 kDa size sample. SDS-PAGE analysis verified that molecular size of the fractionated papaya latex composition corresponded to the molecular weight cut-off of the used membrane.

Keywords: fractionate/ papaya latex/ cosmetic bioactivity/ molecular weight

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง

หน้า

สารบัญภาพ

อักษรย่อและสัญลักษณ์

FL	น้ำยางมะละกอเหลวที่ได้จากการกรีดผลมะละกอในครั้งแรก
FC	ยางมะละกอที่แข็งตัวแล้วที่ได้จากการกรีดผลมะละกอในครั้งแรก
RL	น้ำยางมะละกอเหลวที่ได้จากการกรีดซ้ำผลมะละกอลูกเดิม
RC	ยางมะละกอที่แข็งตัวแล้วที่ได้จากการกรีดซ้ำผลมะละกอเดิม
>30 kDa	สารสกัดยางมะละกอซึ่งค้างอยู่บนเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 30 กิโลดาลตันจากการกรอง papaya crude extract ด้วยกระบวนการ ultrafiltration จึงเป็นสารที่ละลายที่มีอนุภาคขนาดโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน
>10-30 kDa	สารสกัดยางมะละกอที่ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 30 กิโลดาลตัน จากการกรอง papaya crude extract ด้วยกระบวนการ ultrafiltration แต่ไม่ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 10 กิโลดาลตัน จึงเป็นสารละลายที่มีอนุภาคขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วงมากกว่า 10 กิโลดาลตัน แต่ไม่เกิน 30 กิโลดาลตัน
>3-10 kDa	สารสกัดยางมะละกอที่ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 10 กิโลดาลตัน จากการกรอง >10-30 kDa ด้วยกระบวนการ ultrafiltration แต่ไม่ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 3 กิโลดาลตัน จึงเป็นสารละลายที่มีอนุภาคขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง มากกว่า 3 กิโลดาลตัน แต่ไม่เกิน 10 กิโลดาลตัน
≤3 kDa	สารสกัดยางมะละกอผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 3 กิโลดาลตัน จากการกรอง >3-10 kDa ด้วยกระบวนการ ultrafiltration จึงเป็นสารละลายที่มีอนุภาคขนาดโมเลกุลน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 กิโลดาลตัน

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่นำไปสู่การค้นคว้าวิจัย

ปัจจุบันผู้บริโภคมีแนวโน้มที่จะใช้เครื่องสำอางเพิ่มมากขึ้นเพราะนอกจากวัตถุประสงค์เพื่อความน่ามอง ดูดีแล้ว ปฏิเสธไม่ได้เลยว่ารูปลักษณ์ภายนอกมีส่วนสำคัญในการเสริมสร้างความมั่นใจในสังคมและการทำงาน เครื่องสำอาง 3 อันดับแรกที่มีมูลค่าการตลาดสูงสุดได้แก่ ผลิตภัณฑ์ลดเลือนหรือต่อต้านริ้วรอย ผลิตภัณฑ์เพื่อผิวกระจ่างใส และผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดด โดยมีแนวโน้มการตลาดสูงมากขึ้นทุกปีและเป็นแนวโน้มเดียวกันทั่วโลก สารออกฤทธิ์สำคัญที่บริษัทผู้ผลิตเครื่องสำอางนิยมใช้เพื่ออ้างสรรพคุณของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารที่สามารถสะท้อนหรือดูดกลืนรังสียูวี ตามลำดับ ปัจจุบันวงการอุตสาหกรรมทั้งอาหารและเครื่องสำอางได้ให้ความสนใจผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอยและผลิตภัณฑ์เพื่อผิวกระจ่างใสต่างๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากเหตุผลด้านความปลอดภัยและความเป็นธรรมชาติ ดังนั้นงานวิจัยและพัฒนาหาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญเพื่อใช้ในเครื่องสำอางและอาหารเสริมจึงแทบจะมุ่งไปทางเดียวคือการพัฒนาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไม่ว่าจะเป็น พืช สัตว์ และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค

ยางมะละกอถูกขับออกมาหลังจากที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นมะละกอเกิดบาดแผลซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตัวเองตามธรรมชาติจากอันตรายต่างๆ เช่น สภาวะแวดล้อมที่รุนแรง เชื้อจุลินทรีย์ แมลงและสารเคมีต่างๆ ในยางมะละกอประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ หลายชนิด สารชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน สารยับยั้งเอนไซม์ โปรตีนมวลโมเลกุลต่ำ และกลูทาไธโอน นอกจากนั้นยังประกอบด้วยสารอีกหลายชนิดที่ยังไม่ถูกค้นพบและทำการศึกษาสารเหล่านี้มีบทบาททางชีวภาพที่สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูทาไธโอนนั้นมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารยับยั้งไทโรซิเนส ส่วนเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ นอกจากนั้นการที่น้ำยางถูกขับออกมาแล้วเกิดการแข็งตัวปิดบาดแผลอย่างรวดเร็วก่อนที่จะมีการซ่อมแซมเซลล์บริเวณดังกล่าว คาดว่าในน้ำยางน่าจะมีสารสำคัญที่ช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากในทางเครื่องสำอางในแง่การช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์คอลลาเจนและอีลาสตินที่ผิวหนัง

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่จะมุ่งศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่มีประโยชน์สำหรับการพัฒนาต่อไปในทางเครื่องสำอาง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อต้านริ้วรอย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อผิวกระจ่างใสหรือลดจุดด่างดำหรือลดฝ้า และความสามารถในการดูดกลืนรังสียูวีสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดด หากผลการศึกษาเป็นที่น่าพอใจจะทำให้ต้นมะละกอมีบทบาทที่สำคัญในทางเครื่องสำอาง นอกเหนือจากการผลิตเอนไซม์ปาเปนและการรับประทานเป็นอาหาร เป็นการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรของไทยได้อีกมาก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และความสามารถในการดูดกลืนรังสียูวีของสารสกัดจากยางมะละกอ

1.2 เพื่อศึกษาแนวทางการนำยางมะละกอไปใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง

1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

1. เก็บรวบรวมน้ำยางมะละกอจากต้นมะละกอพันธุ์แขกดำในพื้นที่ อ. เมือง จ. เชียงราย
2. หาปริมาณสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในน้ำยางมะละกอ
3. แยกสารละลายน้ำยางตามช่วงขนาดโมเลกุลของสารองค์ประกอบในน้ำยาง
4. หาปริมาณสารชีวโมเลกุลในแต่ละส่วนของสารละลายยางมะละกอ
5. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส และดูดกลืนรังสียูวีของสารละลายส่วนต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้สารสกัดยางมะละกอที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสและความสามารถการดูดกลืนรังสียูวี
2. ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดยางมะละกอที่มีฤทธิ์ทางเครื่องสำอาง
3. ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการ

บทที่ 2

แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิด ของโครงการวิจัย

น้ำยางมะละกอที่ถูกขับออกมาจากทุกส่วนของต้นมะละกอหลังจากที่เกิดบาดแผลเป็นกลไกการป้องกันตัวเองจากอันตรายและศัตรูต่างๆ เช่น สภาวะแวดล้อมที่รุนแรง แมลง เชื้อจุลินทรีย์ สารเคมี ฯลฯ จากการศึกษาพบว่าในน้ำยางประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทั้ง โปรติเอส ไลเปส กลูคาเนส ไคติเนส ไลโซไซม์ กลูตามีนไซโคลทรานสเฟอเรส และยังมีสารที่ไม่ใช่เอนไซม์เช่น คาร์โบไฮเดรท กลูทาไธโอน ฯลฯ นอกจากนั้นในการกรีดผลมะละกอจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส รวมทั้งเพปไทด์และโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็กอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่ามีหน้าที่ใดที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัว จึงคาดว่าในน้ำยางมะละกอน่าจะมีสารสำคัญต่างๆ ทั้งที่เคยศึกษามาแล้วข้างต้นและยังไม่เคยศึกษาหรือค้นพบมาก่อนที่ออกฤทธิ์ในการป้องกันต้นมะละกอได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านเครื่องสำอางจากสารสกัดยางมะละกอจึงมีความน่าสนใจ และเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่จะมุ่งศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่มีประโยชน์สำหรับการพัฒนาต่อไปในทางเครื่องสำอาง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อต้านริ้วรอย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อผิวกระจ่างใสหรือลดจุดด่างดำหรือลดฝ้า และความสามารถในการดูดกลืนรังสียูวีเพื่อเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดด โดยการรวบรวมน้ำยางมะละกอมาแล้วจะทำการแยกส่วนตามขนาดโมเลกุลของสารที่ละลายอยู่ภายใน จากนั้นจึงทำการศึกษาหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลายน้ำยางแยกส่วน และคาดว่าจะพบฤทธิ์ทางชีวภาพทางเครื่องสำอางที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาต่อไป

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลหรือสารที่ไม่มั่นคงเนื่องจากประจุอิเล็กตรอนไม่ครบจำนวน โดยปกติธาตุทั้งหลายจะมีประจุอยู่วงรอบเป็นจำนวนคู่ ซึ่งจะทำให้โมเลกุลนั้นคงตัวหรือมีเสถียรภาพ ในกรณีที่มีการสูญเสียอิเล็กตรอนหรือมีอิเล็กตรอนเกินมา 1 ตัวจะทำให้โมเลกุลนั้นไม่

มั่นคง มีความว่องไวในการไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ โดยการไปแย่งประจุจากโมเลกุลอื่นมาเพื่อให้อนุภาคของอนุมูลอิสระนั้นคงตัวอยู่ได้แต่ก็ทำให้โมเลกุลที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนไปนั้นกลายเป็นอนุมูลอิสระแทน และปฏิกิริยาเช่นนี้จะเกิดเป็นลูกโซ่ไปเรื่อยๆ จนอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงก่อให้เกิดความเสียหายกับโมเลกุล เยื่อบุผนังเซลล์ และโมเลกุลของไขมัน ที่อนุมูลอิสระไปจับ (Denisov and Afanas'ev, 2005) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเป็นสารพิษต่อเซลล์ร่างกาย ถ้าในเซลล์มีอนุมูลอิสระมากจะไปทำลายดีเอนเอ เยื่อหุ้มเซลล์และอื่นๆ เป็นที่ยอมรับกันว่าอนุมูลอิสระมีผลต่อการอักเสบและการทำลายเนื้อเยื่อทั้งในระยะสั้นและระยะยาวซึ่งอาจมีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ และอาจเป็นสารก่อมะเร็ง และกระตุ้นให้ผู้ที่มีอาการของโรคหัวใจมีอาการที่รุนแรงขึ้น เป็นต้น (Diaz et al., 1997) สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่ 2 ประเภทได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (SOD), คะตะเลส (CAT), กลูทาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (GPX), กลูทาไธโอน รีดักเทส (GR), กลูทาไธโอน ทรานสเฟอเรส (GST) เป็นต้น (Denisov and Afanas'ev, 2005; Dixon *et al.*, 1998)

2. สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น tocopherols, carotenoids, ascorbic acid, steroids, gallic acid, flavonoids, cysteine, glutathione เป็นต้น (Denisov and Afanas'ev, 2005; Webb, 2006)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase, EC 1.14.18.1) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของ polyphenol oxidase (PPOs) เกี่ยวข้องในกระบวนสร้างเม็ดสีหรือเมลานิน (melanin) ในสิ่งมีชีวิต โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะใช้กรดอะมิโนไทโรซีนเป็นสับสเตรทแล้วเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนไทโรซีนเป็น แอล-โดพา (L-DOPA) แอล-โดพาควิโนน (L-DOPA quinone) และโดพาโครม (dopachrome) ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เป็นเมลานินต่อไป โดยขั้นตอนการเปลี่ยนไทโรซีนให้เป็นแอล-โดพานั้นเป็นขั้นตอนกำหนดปฏิกิริยา (Schurink, 2007) กระบวนการสังเคราะห์เมลานินที่ผิดปกติทำให้เกิดเมลานินที่มากเกินเฉพาะจุดเป็นสาเหตุของ ฝ้า ไฝ กระ ฯลฯ (Schurink, 2007) ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางนั้นผลิตภัณฑ์ที่อ้างสรรพคุณเพื่อลดสีผิวหรือผิวกระจ่างใสจึงนิยมใช้สารออกฤทธิ์ที่ไปยับยั้งไทโรซิเนสซึ่งมีทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์และได้จากธรรมชาติ อย่างไรก็ตามสารยับยั้งไทโรซิเนสที่มาจากการสังเคราะห์แม้จะมีประสิทธิภาพดี ราคาถูก แต่ทำให้เกิดผลข้างเคียงค่อนข้างมาก เช่นไฮโดรควิโนน กรดวิตามินเอ ฯลฯ ดังนั้นในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยจึงประกาศห้ามใช้สารสังเคราะห์เหล่านี้ในเครื่องสำอาง ด้วยเหตุดังกล่าวผู้บริโภคจึงหันมาใช้เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมจากธรรมชาติมากขึ้น ทำให้แนวโน้มการตลาดของเครื่องสำอางจากธรรมชาติและเครื่องสำอางสมุนไพรเติบโตอย่างต่อเนื่อง นั่นคือการศึกษาสารยับยั้งไทโรซิเนสรวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดยางมะละกอจึงมีความน่าสนใจทั้งในแง่ความปลอดภัยและเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติ นอกจากนั้นยังเป็นแนวทางการเพิ่มมูลค่าแก่มะละกออีกทางหนึ่ง

น้ำยางมะละกอประกอบด้วยน้ำเป็นหลักคือ 85% (w/w) และส่วนที่ไม่ใช่น้ำ 15% (w/w) (Moussaoui *et al.*, 2001; Azarkan *et al.*, 2006) ซึ่งส่วนนี้จะมีทั้งสารที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำผสมกันอยู่ สารที่ไม่ละลายน้ำนั้นประกอบด้วยสารประเภทคาร์โบไฮเดรทและเอนไซม์ไลเปสเป็นหลัก (Moussaoui *et al.*, 2001) ในขณะที่สารละลายน้ำนั้น ประกอบด้วย ซีสเทอีนโปรติเอส 4 ชนิด (~30-40%) ได้แก่ ปาเปน ไคโมปาเปน คาริเคน และไกลซิล เอนโดเพปทิเดส คาร์โบไฮเดรท (~10%) เกลือ (~10%) ไขมัน (~5%) โปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่โปรติเอส (~10%) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น ไลโซไซม์ (Redina *et al.*, 1997) ไคติเนส (Azarkan *et al.*, 1997) กลูตามีนไซโคลทรานส์เฟอเรส (Zerhouni *et al.*, 1997; Gololobov *et al.*, 1996) เบต้า 1,3-กลูคาเนส (Wilson, 1974) กลูทาไธโอน ทรานสเฟอเรส (Dixon *et al.*, 1998) รวมถึงสารยับยั้งโปรติเอส 2 ชนิด ได้แก่ Kunizt-type inhibitor (Moussaoui *et al.*, 2001; Azarkan *et al.*, 2006a; Odani *et al.*, 1996) และ cystatin (Moussaoui *et al.*, 2001; Song *et al.*, 1995) นอกจากนั้นยังประกอบด้วยสารทุติยภูมิอื่นๆ รวมทั้งกลูทาไธโอน (Moussaoui *et al.*, 2001) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไตรเพปไทด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยธรรมชาติ แล้วยังพบว่ากลูทาไธโอนสามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้เช่นเดียวกับซีสเทอีน (Schurink, 2007; Benjakul *et al.*, 2006) ยางมะละกอนั้นมีอยู่ทั่วทุกส่วนของลำต้นมะละกอยกเว้นส่วนที่เป็นรากแต่พบที่ผลดิบมากที่สุด โดยน้ำยางถูกสร้างโดยเซลล์พิเศษที่เรียกว่า laticifers ซึ่งเรียงต่อกันเป็นร่างแหและผนังเซลล์เชื่อมต่อกันอยู่ภายใต้ผิวส่วนนอกของต้นมะละกอลึกประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (Moussaoui *et al.*, 2001; Azarkan *et al.*, 2003)

หลังจากเกิดบาดแผลต้นมะละกอจะขับน้ำยางออกมาเพื่อป้องกันตัวเองจากอันตรายและศัตรูต่างๆ เช่น สภาวะแวดล้อมที่รุนแรง สารเคมี แมลง เชื้อจุลินทรีย์ ฯลฯ ดังนั้นในน้ำยางจึงมีสารชีวโมเลกุลต่างๆ นอกเหนือจากเอนไซม์ดังกล่าวมาแล้วที่จำเป็นต่อการป้องกันตัวเอง มีรายงานว่าหลังจากการกรีดผลมะละกอใหม่ๆ น้ำยางที่ถูกขับออกมาจะมีแอคติวิตีของโปรติเอสต่ำมาก แต่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อมกับการแข็งตัวของน้ำยางเพื่อปิดบาดแผล (Moutim *et al.*, 1999; Azarkan *et al.*, 2006b) ผลมะละกอที่ถูกกรีดยางซ้ำหลายๆ ครั้ง จะพบการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดเมื่อเทียบกับผลมะละกอที่ถูกกรีดครั้งแรกโดยเฉพาะ ไคติเนส กลูตามีนไซโคลทราสเฟอเรส และ สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน Kunitz-type inhibitor (Azarkan *et al.*, 2006b; Azarkan *et al.*, 2004) นอกจากนั้นยังพบโปรตีนหรือเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 10-18 kDa หรือต่ำกว่านั้นในปริมาณสูง อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าเป็นโปรตีนชนิดใดและมีหน้าที่ใดในกลไกการป้องกันตัวเองของต้นมะละกอ (Moutim *et al.*, 1999; Azarkan *et al.*, 2006b; Azarkan *et al.*, 2004) ทั้งนี้มีรายงานว่าเพปไทด์และโปรตีนไฮโดรไลเสทจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ มีประสิทธิภาพสูงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Wu *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008; Pena-Ramos and Xiong, 2002) และยับยั้งไทโรซิเนส ((Schurink, 2007; Schurink *et al.*, 2007)

Karakurt และคณะ (2007; 2003) พบว่าการตัดหรือทำให้ผลมะละกอมีบาดแผลจะทำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์หลายชนิดเมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่เกิดบาดแผล ที่สำคัญคือ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้คาดว่ามะละกอสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นมาเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากความเครียดจากการเกิดบาดแผล การศึกษาในเนื้อผลมะละกอดิบพบว่ามีสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะวิตามินซีในปริมาณสูง (Lim *et al.*, 2007) การนำผลมะละกอดิบไปหมักพบว่าสารที่สกัดได้จากการหมักมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Sala, 2007) นอกจากนั้นยังพบว่าใบและเปลือกลำต้นมะละกอยังประกอบด้วยสารอัลคาลอยด์ในปริมาณสูง (Khuzhaev and Aripova, 2000) ในขณะที่เนื้อผลจะประกอบด้วยซาโปนิน (saponin) และ คาร์ดิโนไลด์ (cardenolides) (Oloyede, 2005) คาดว่าสารเหล่านี้มีส่วนช่วยให้ ใบเปลือกลำต้นและเนื้อผลของมะละกอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สารเคมี และเครื่องมือ

สารเคมี	บริษัท
Absolute ethyl alcohol	Labscan (AR, UK)
2,2'-Azino-bis(3-ethybenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)	Fluka (AR, Switzerland)
Butylated hydroxyltoluene (BHT)	Fluka (AR, Switzerland)
Bovine serum albumin (BSA)	Fluka (AR, Switzerland)
Dipotassium hydrogenphosphate	BDH (AR, USA)
DPPH	Sigma (AR, USA)
Casein	Sigma (AR, USA)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck (AR, Germany)
L-Cysteine	Sigma (AR, USA)
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA·2Na)	Lancaster (AR, UK)
Ethyl alcohol 95%	Labscan (AR, UK)
Folin Ciocalteu reagent	Merck (Germany)
Gallic acid	Sigma-Aldrich (AR, USA)
Phosphoric acid 85%	Carlo-Erba (AR, Italy)
Potassium dihydrogenphosphate	BDH (AR, USA)
Sodium carbonate	Ajax Finechem (AR, Australia)
L-Tyrosine	Sigma (AR, USA)
Trichloroacetic acid	Sigma (AR, USA)

เครื่องมือ อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท
Centrifuge	Mikro/BA300	Mikron
Digital Balance	BT 2245	Sartorious

Hot plate stirrer	HS-350SP	V-Tech
pH meter	pH 510	Eutech
Ultrafiltration tube	Vivaspin 500	Sartorious
UV-Vis Spectrophotometer	Libra S22	Biochrome
Vortex mixer	-	Scientific Industry
Water bath	WNB 29	Memmert

3.2 การเก็บยางมะละกอ

เก็บยางมะละกอโดยการกรีดยางจากผลมะละกอดิบพันธุ์แขกดำอายุ 3 เดือน จากพื้นที่ ต. บ้านดู่ ต. นางแล และ ต. ท่าสุด อ. เมือง จ. เชียงราย ในช่วงเวลาเช้า 5.00-7.30 น. โดยวิธีการเก็บตัวอย่างดำเนินการตามวิธีการของ Chaiwut *et al.* (2007) และ Theppakorn *et al.* (2003) หลังจากที่ผลมะละกอถูกกรีดนั้น น้ำยางจะไหลออกจากผลทันทีแต่เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 3 นาที น้ำยางจะเกิดการแข็งตัว (clotting) ดังนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างยางมะละกอจำนวน 4 ตัวอย่าง คือ น้ำยางที่ได้จากการกรีดผลครั้งแรก (first time tapping liquid latex, FL) น้ำยางที่แข็งตัวแล้วจากการกรีดผลครั้งแรก (first time tapping clotting latex, FC) น้ำยางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลซ้ำ (repeated tapping liquid latex, RL) และ น้ำยางที่แข็งตัวแล้วจากการกรีดผลซ้ำ (repeated tapping clotting latex, RC) เก็บตัวอย่างยางมะละกอไว้ที่ -20 °C สำหรับทำการทดลองต่อไป

3.3 การเตรียมสารละลายแยกส่วนของยางมะละกอ

วิธีการเตรียมตัวอย่างดัดแปลงจากวิธีการของ Chaiwut *et al.* (2007) โดยผสมตัวอย่างยางมะละกอกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (w/v) จากนั้นทำการกวนตัวอย่างเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออกไป สารละลายใสจากน้ำยางที่ได้หลังจากปั่นเหวี่ยงเรียกว่า crude papaya latex ในการทดลองนี้นำ crude papaya latex ไปแยกออกเป็น 4 ส่วนตามขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิค ultrafiltration โดยการนำไปกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาดต่างๆ กันคือ 30 kDa, 10 kDa และ 3 kDa เพื่อแยกสารละลายตัวอย่างตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่มีขนาด >30 kDa, >10-30 kDa, >3-10 kDa และ ≤ 3 kDa จากนั้นทำแห้งด้วย lyophilizer แล้วเก็บตัวอย่างสารสกัดจากยางมะละกอไว้ที่อุณหภูมิ – 20°C สำหรับการทดลองต่อไป

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารชีวโมเลกุลในสารละลายแยกส่วนของยางมะละกอ

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนในสารสกัดตัวอย่างวัดโดยวิธีการของ Bradford (1976) โดยผสมตัวอย่างกับ Bradford reagent จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.4.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส

การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอสในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอทำตามวิธีการของ Chaiwut *et al.* (2010a) โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรทและคำนวนค่าแอคติวิตีของโปรตเอสโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

3.5 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทำตามวิธีการของ Chaiwut *et al.* (2010b) คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid และแสดงผลในรูป mg gallic acid equivalent per mg sample (mg GAE/mg)

3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

การหาฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS ดัดแปลงจากวิธีการของ Re *et al.* (1999) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ด้วย UV-Vis Spectrophotometer (Biochrom/Libra S22) คำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูล ABTS ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

เมื่อ $A_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ไม่มีสารสกัดตัวอย่าง

A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสารสกัดตัวอย่าง

แสดงผลของการต้านอนุมูลอิสระในรูปความเข้มข้นของตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) ซึ่งคำนวณได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของตัวอย่าง

3.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอทำได้โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Chaiwut *et al.* (2010a) โดยใช้ kojic acid เป็นสารมาตรฐาน แสดงผลของยับยั้งในรูป

ความเข้มข้นของตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้ 50% (IC_{50}) ซึ่งคำนวณได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของตัวอย่าง

3.8 การวิเคราะห์การดูดกลืนรังสียูวีของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอ

การวิเคราะห์ความสามารถการดูดกลืนยูวีของสารสกัดยางมะละกอ ทำได้โดยเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเหมาะสม (5.0 μg/mL) แล้วทำการสแกนค่าการดูดกลืนแสงช่วงยูวีตั้งแต่ 200-400 nm ด้วย UV-spectrophotometer (Biochrom/Libra S22) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน oxybenzone ที่ความเข้มข้นเท่ากัน

3.9 การวิเคราะห์รูปแบบองค์ประกอบสารละลายแยกส่วนยางมะละกอด้วย HPLC

วิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนและเพปไทด์องค์ประกอบในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 (Water spherisorb, 4.6x250 mm) สารละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย สารละลาย TFA 0.01% และ acetonitrile อัตราส่วน 20:80 ตรวจสอบตัวอย่างที่ถูกชะด้วย photo diode UV detector 280 nm

3.10 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนองค์ประกอบสารละลายแยกส่วนยางมะละกอด้วย SDS-PAGE

การวิเคราะห์หารูปแบบโปรตีนองค์ประกอบในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอด้วย SDS-PAGE ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemli (1970)

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

4.1 แอคติวิตีของโปรติเอสและปริมาณโปรตีนในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอ

ตัวอย่างน้ำยางมะละกอแบ่งเป็น 4 ชนิด คือ น้ำยางมะละกอเหลวที่ได้จากการกรีดผลมะละกอในครั้งแรกเรียกว่า FL (first time tapping liquid latex) ยางมะละกอที่แข็งตัวแล้วที่ได้จากการกรีดผลมะละกอในครั้งแรก เรียกว่า FC (first time tapping clotting latex) น้ำยางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลมะละกอซ้ำเมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์ เรียกว่า RL (repeated tapping liquid latex) และยางมะละกอที่แข็งตัวแล้วที่ได้จากการกรีดผลมะละกอซ้ำเรียกว่า RC (repeated tapping clotting latex) น้ำยางทั้ง 4 ตัวอย่าง ถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วนด้วยกระบวนการ ultrafiltration โดยแยกตามน้ำหนักโมเลกุลคือขนาด >30 kDa, >10-30 kDa, >3-10 kDa และขนาดเล็กสุด ≤3 kDa ตามลำดับ

ตารางที่ 4-1 แสดงให้เห็นว่าน้ำยางจากผลมะละกอที่ถูกกรีดครั้งแรก (FL และ FC) กับผลที่ถูกกรีดซ้ำ (RL และ RC) ให้ปริมาณโปรติเอสแอคติวิตีต่างกันมาก โดยแอคติวิตีในยางจากผลที่ถูกกรีดซ้ำมีค่าอยู่ในช่วง 1,079-1,198 units/mg (U/mL) ในขณะที่ยางจากผลเดียวกันที่ถูกกรีดครั้งแรกมีค่าอยู่ในช่วง 256-365 U/mL สอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่าน้ำยางมะละกอที่ถูกขับออกมาหลังกรีดผลใหม่ๆ จะมีโปรติเอสแอคติวิตีต่ำแต่เมื่อทำการกรีดซ้ำจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมาก (Moutim, 1999) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าจำนวนซ้ำของการกรีดยางมะละกอไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนรวม เนื่องจากมีค่าใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่างของ crude papaya latex กระบวนการขับน้ำยางเมื่อมีบาดแผลเป็นกลไกการป้องกันตัวเองของต้นมะละกอจากแมลงและเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (Moutim, 1999; Azarkan *et al.*, 2006) ดังนั้นในน้ำยางมะละกอจึงประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ต่างๆ หลายชนิด รวมทั้งสารที่ให้ฤทธิ์ช่วยสร้างเซลล์ใหม่และสมานแผลด้วย จึงน่าจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง

ส่วนของตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 kDa แสดงค่าความเข้มข้นของโปรตีนและแอคติวิตีของโปรติเอสสูงสุดและยังมีปริมาณมากกว่าใน crude papaya latex เนื่องจากกระบวนการแยกส่วนของสารละลายยางมะละกอเป็นการทำให้ตัวอย่างในแต่ละส่วนมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจึงทำให้มีความเข้มข้นของโปรติเอสและโปรตีนสูง เมื่อทำการแยกส่วนสารละลายโดยการกรองด้วยเมมเบรนที่มีรูปพรุนขนาดเล็กลงคือ 30 10 และ 3 kDa ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าขนาด

โมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์และโปรตีนโมเลกุลใหญ่ถูกกักไว้เหนือเมมเบรนขนาด 30 kDa ดังนั้นส่วนของตัวอย่างที่ผ่านการกรองหลังจากนั้นจะมีโปรติเอสแอคติวิตีและโปรตีนต่ำ โดยคาดว่าองค์ประกอบของตัวอย่างส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง >10-30 kDa, >3-10 kDa และขนาดเล็กสุด ≤3 kDa จะเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ และเพปไทด์ต่างๆ เช่นกลูทาไธโอน (Moussaoui *et al.*, 2001)

ตารางที่ 4-1 แอคติวิตีของโปรติเอสและความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลต่างๆ

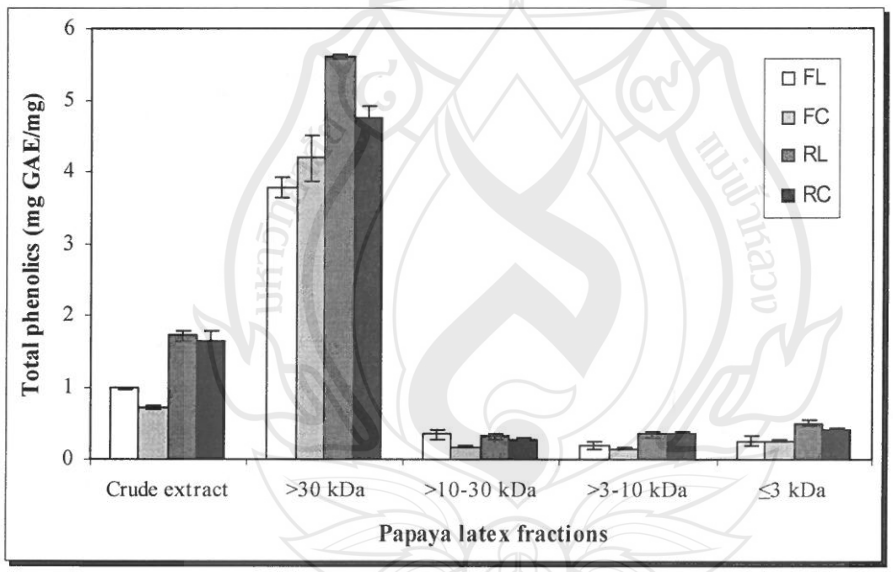
Fraction	Sample*	Protease activity** (U/mL)	Protein** (mg/mL)
Crude papaya latex	FL	365.34 ± 62.13^{b}	33.40 ± 1.41^{c}
	FC	256.13 ± 47.23^{a}	32.94 ± 0.81^{bc}
	RL	1,198.77 ± 12.62^{c}	32.65 ± 1.62^{ab}
	RC	1,079.75 ± 32.31^{c}	31.79 ± 0.40^{a}
> 30 kDa	FL	988.32 ± 9.95^{b}	141.25 ± 1.82^{b}
	FC	372.67 ± 17.4^{a}	144.82 ± 2.22^{c}
	RL	4,334.65 ± 27.35^{c}	140.69 ± 2.02^{b}
	RC	4,024.72 ± 22.36^{c}	139.96 ± 1.01^{a}
>10-30 kDa	FL	8.69 ± 0.31^{c}	1.37 ± 0.11^{c}
	FC	6.31 ± 0.03a^{b}	0.47 ± 0.08^{a}
	RL	6.10 ± 0.06^{a}	1.03 ± 0.12^{b}
	RC	6.32 ± 1.05^{ab}	1.03 ± 0.07^{b}
>3-10 kDa	FL	1.70 ± 0.23^{d}	0.22 ± 0.01^{b}
	FC	0.66 ± 0.03^{a}	0.10 ± 0.00^{a}
	RL	1.12 ± 0.11^{b}	0.10 ± 0.00^{a}
	RC	1.41 ± 0.03^{c}	0.31 ± 0.04^{c}
≤ 3 kDa	FL	0.23 ± 0.47^{b}	0.08 ± 0.02^{a}
	FC	0.45 ± 0.11^{c}	0.10 ± 0.01^{b}
	RL	0.96 ± 0.03^{d}	0.10 ± 0.01^{b}
	RC	0.18 ± 0.19^{a}	0.08 ± 0.01^{a}

* FL; first time tapping liquid latex, FC; first time tapping clotting latex, RL; repeated tapping liquid latex and RC; repeated tapping clotting latex

**ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันเฉพาะขนาดโมเลกุลเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลต่างๆ แสดงดัง**ภาพที่ 4-1** สารตัวอย่างที่มีช่วงขนาดโมเลกุล >30 kDa ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด โดยมีค่าตั้งแต่ 3.79-5.61 mg GAE/mg ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่ได้จากน้ำยางเหลวจากการกรีดซ้ำ (RL) มีค่าสูงสุดคือ 5.61 mg GAE/mg และตัวอย่างจากน้ำยางเหลวจากการกรีดครั้งแรก (FL) มีค่าต่ำสุดคือ 3.79 mg GAE/mg ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีค่าลดลงอย่างมากในตัวอย่างที่มีขนาดของโมเลกุลในสารตัวอย่างต่ำกว่า 30 kDa โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.18-0.56 mg GAE/mg อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้นี้สัมพันธ์กันโดยตรงกับปริมาณโปรตีนใน**ตารางที่ 4.1** ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี Bradford อาจเป็นไปได้ว่าค่าปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากการทดสอบโดย Folin-Ciocalteu method ในการทดลองนี้ ส่วนหนึ่งเป็นผลจากการรบกวนของปริมาณโปรตีนในตัวอย่างด้วย เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธีอื่นเช่น Lowry assay นั้นใช้ Folin reagent ในสภาวะเบสเช่นกัน



ภาพที่ 4-1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ (FL; first time tapping liquid latex, FC; first time tapping clotting latex, RL; repeated tapping liquid latex and RC; repeated tapping clotting latex)

4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอ

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอทุกช่วงขนาดโมเลกุลนั้น ใช้วิธี ABTS assay ซึ่งผลการทดลองแสดงใน **ภาพที่ 4-2** โดยพบว่า crude papaya

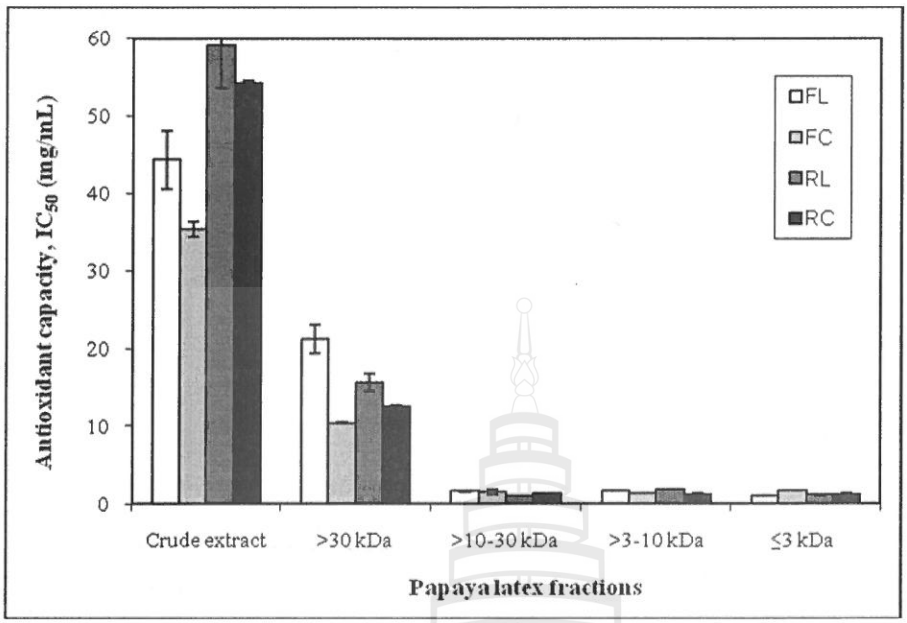
latex ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 35.31-59.15 mg/mL รองลงมาได้แก่ตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุล ≥30 kDa ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า IC_{50} อยู่ในช่วง 10.39 mg/mL ใน FC ถึง 21.31 mg/mL ใน FL แม้ว่าจะให้ปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีสูงกว่าก็ตาม นั่นคือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างไม่มีความสัมพันธ์กับโปรติเอสแอคติวิตีและปริมาณโปรตีน

สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 30 kDA ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีค่าสูง โดยตัวอย่าง >10-30 kDa, >3-10 kDa และ ≤3 kDa ให้ค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.11-1.66, 1.28-1.85 และ 1.13-1.64 mg/mL ตามลำดับ โดยทุกค่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ที่ทดสอบด้วยวิธีเดียวกันของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ BHT พบว่ามีค่า 350 mg/mL แสดงให้เห็นว่าสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ถูกแยกโปรตีนโมเลกุลใหญ่และโปรติเอสเช่นปาเปนออกไปแล้ว สามารถให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง มีความน่าสนใจที่จะศึกษาแนวทางการประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางต่อไป

คาดว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในยางมะละกอเกิดจากสารชีวโมเลกุล เพปไทด์ และสารทุติยภูมิอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบ มีรายงานว่าการเกิดบาดแผลก่อให้เกิดความเครียดทำให้มะละกอหลั่งเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระคือ superoxide dismutase ออกมาพร้อมกับสารทุติยภูมิอื่นๆ (Karakurt and Huber, 2007; 2003) นอกจากนั้นยังมีผลการวิจัยพบว่า carenolides (Oloyede, 2005) กลูทาไธโอนและสารรีดิวซ์อื่นๆ ในยางมะละกอยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูงอีกด้วย (Moussaoui *et al.*, 2001) ซึ่งผลการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานที่ได้ตั้งไว้ว่าสารละลายแยกส่วนของยางมะละกอที่แยกส่วนของโปรติเอสออกไปแล้วเหลือแต่สารโมเลกุลที่เล็กกว่าจะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

4.4 ค่าการดูดกลืนรังสียูวีของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอ

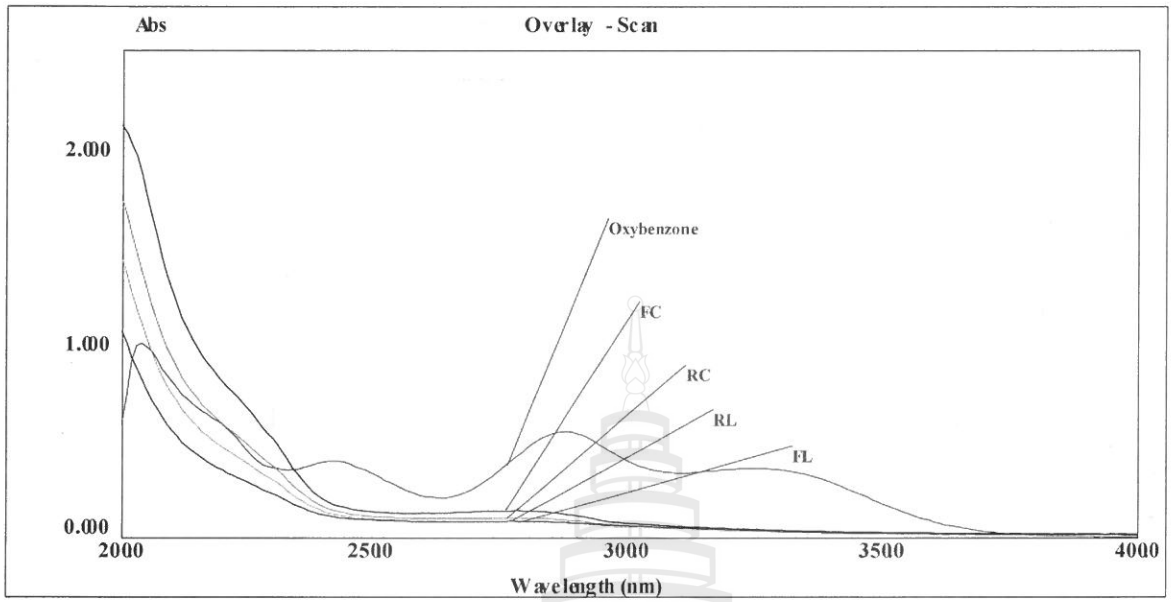
การตรวจสอบความสามารถในการดูดกลืนรังสียูวีในสารตัวอย่าง มีประโยชน์สำหรับการประยุกต์เป็นสารกันแดดในผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดด ผลการทดสอบใน**ภาพที่ 4-3 ถึง 4-4** แสดงค่าการดูดกลืนรังสียูวีของ crude papaya latex และสารสกัดที่มีขนาดโมเลกุล >30 kDa ตามลำดับ ในส่วนของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลเล็กกว่านี้ไม่มีความสามารถในการดูดกลืนยูวีจึงไม่แสดงผลการทดลอง จาก**ภาพที่ 4-3** พบว่าสารละลายแยกส่วนยางมะละกอสามารถดูดกลืนยูวีที่ช่วงความยาวคลื่น 200-280 nm ซึ่งเป็นช่วงของยูวีซี (UVC, 200-280 nm) ในขณะที่สารมาตรฐานoxybenzone สามารถแสดงผลการดูดซับยูวีในช่วงกว้างกว่าคือตั้งแต่ 200-360 nm และผลการทดลองใน**ภาพที่ 4-4** ชี้ว่าตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุล >30 kDa ให้ค่าการดูดกลืนยูวีสูงกว่า



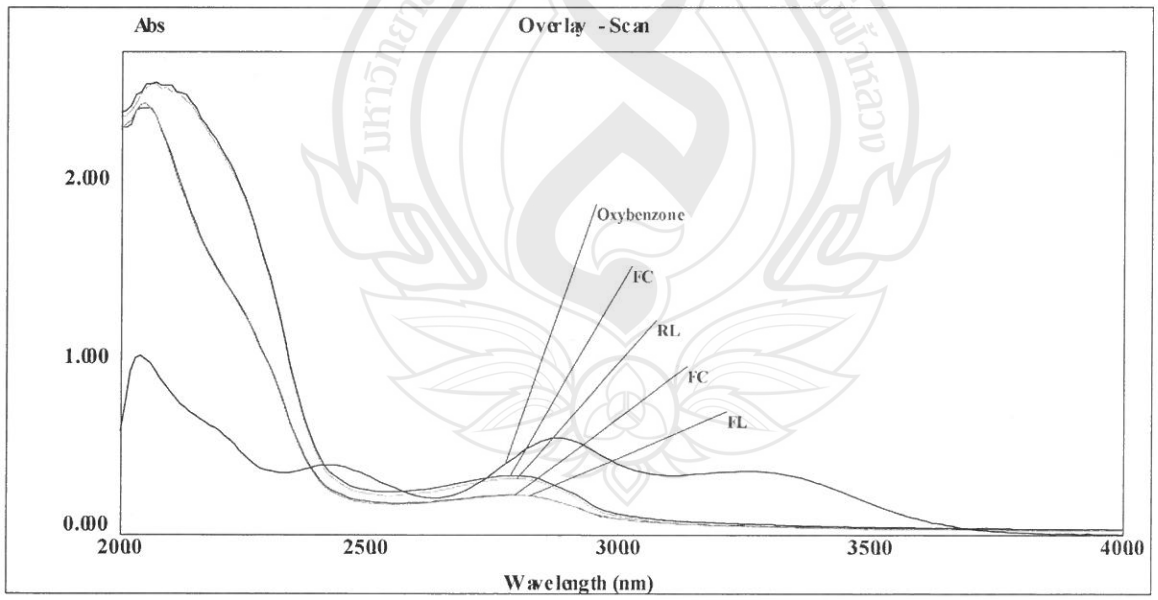
ภาพที่ 4-2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ (FL; first time tapping liquid latex, FC; first time tapping clotting latex, RL; repeated tapping liquid latex and RC; repeated tapping clotting latex) เปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT คือ 350 mg/mL

crude papaya latex ที่ช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนและเอนไซม์สูงกว่าดังที่ได้อธิบายไว้แล้ว ในขณะที่สารสกัดที่ขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 30 kDa ไม่แสดงผลการดูดกลืนยูวี ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการดูดกลืนยูวีของตัวอย่างสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตี โดยกรดอะมิโนที่มีหมู่อะโรมาติกเป็นองค์ประกอบในโปรตีนส่วนใหญ่สามารถดูกกลืนแสงยูวีซีได้โดยดูดกลืนสูงสุดช่วง 260-280 nm

โดยปกติรังสียูวีช่วงยูวีซีจะถูกกระเจิงโดยโอโซนในชั้นบรรยากาศก่อนที่จะตกกระทบพื้นผิวโลก นั่นคือหากพิจารณาแล้วจะมีอันตรายต่อผิวหนังมนุษย์น้อยกว่ายูวีเอหรือยูวีบีแม้จะมีพลังงานมากกว่าก็ตาม เมื่อพิจารณาผลการทดลองจะเห็นว่าสารละลายตัวอย่างสามารถดูดกลืนยูวีได้แค่ช่วงยูวีซีเท่านั้น จึงไม่สามารถนำตัวอย่างไปพัฒนาเป็นสารกันแดดได้ ต่างจากสารมาตรฐาน oxybenzone ที่ปริมาณ 5 μg/mL เท่ากัน แม้จะดูดกลืนยูวีซีได้ต่ำกว่าแต่มีช่วงการดูดกลืนกว้างกว่าครอบคลุมทั้งยูวีซี บี และเอ (200-400 nm)



ภาพที่ 4-3 ค่าการดูดกลืนรังสียูวีของ crude papaya latex ที่ความเข้มข้น 5.0 μg/mL เปรียบเทียบกับ oxybenzone ที่ความเข้มข้นเท่ากัน
(FL; first time tapping liquid latex, FC; first time tapping clotting latex, RL; repeated tapping liquid latex and RC; repeated tapping clotting latex)



ภาพที่ 4-4 ค่าการดูดกลืนรังสียูวีของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมลกุล >30 kDa ความเข้มข้น 5.0 μg/mL เปรียบเทียบกับ oxybenzone ที่ความเข้มข้นเท่ากัน
(FL; first time tapping liquid latex, FC; first time tapping clotting latex, RL; repeated tapping liquid latex and RC; repeated tapping clotting latex)

4.5 ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอ

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลต่างๆ แสดงดัง**ตารางที่ 4-2** พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ที่ดีเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพของสารมาตรฐานกรดโคจิกซึ่งให้ค่า IC_{50} 40.02 μg/mL โดยสารที่ให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารลดสีผิวหรือทำให้ผิวกระจ่างใสได้เนื่องจากไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำให้เกิดการสร้างเมลานินบนผิวหนัง

ทั้งนี้สามารถพิจารณาฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของตัวอย่างได้เป็นสองส่วน โดยส่วนแรกคือตัวอย่างที่ขนาดโมเลกุลมากกว่า 30 kDa ซึ่งให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ที่สูงเนื่องจากองค์ประกอบของตัวอย่างในส่วนนี้เป็นโปรติเอสที่มีประสิทธิภาพสูง จึงทำการย่อยเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งถือว่าเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ทำให้ลดการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสลง การนำตัวอย่างส่วนนี้ไปใช้ในเครื่องสำอางจะทำให้ได้ประโยชน์อย่างน้อยสองอย่างคือโปรติเอสช่วยหลุดลอกเซลล์ผิวเก่าที่อยู่ชั้นนอกสุดของผิวหนังและโปรติเอสยังช่วยย่อยไทโรซิเนสทำให้กระบวนการสร้างเมลานินเกิดน้อยลง อย่างไรก็ตามอาจเกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้เช่นกันหากใช้ในปริมาณมากเนื่องจากโปรติเอสมีประสิทธิภาพสูงอาจจะย่อยเซลล์ผิวหนังชั้นลึกลงไป

ตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 30 kDa มีความสามารถยับยั้งไทโรซิเนสแปรตามขนาดโมเลกุลที่เล็กลงนั่นคือสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ ≤ 3 kDa ให้ฤทธิ์สูงสุดและสูงกว่าฤทธิ์ของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยคาดว่าฤทธิ์จากตัวอย่างในส่วนเหล่านี้ได้จากสารโมเลกุลเล็กต่างๆ ที่ไม่ใช่โปรติเอสที่สามารถยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าคือสารกลุ่มเดียวกับที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากผลการทดลองก่อนหน้า

4.6 รูปแบบองค์ประกอบของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอ

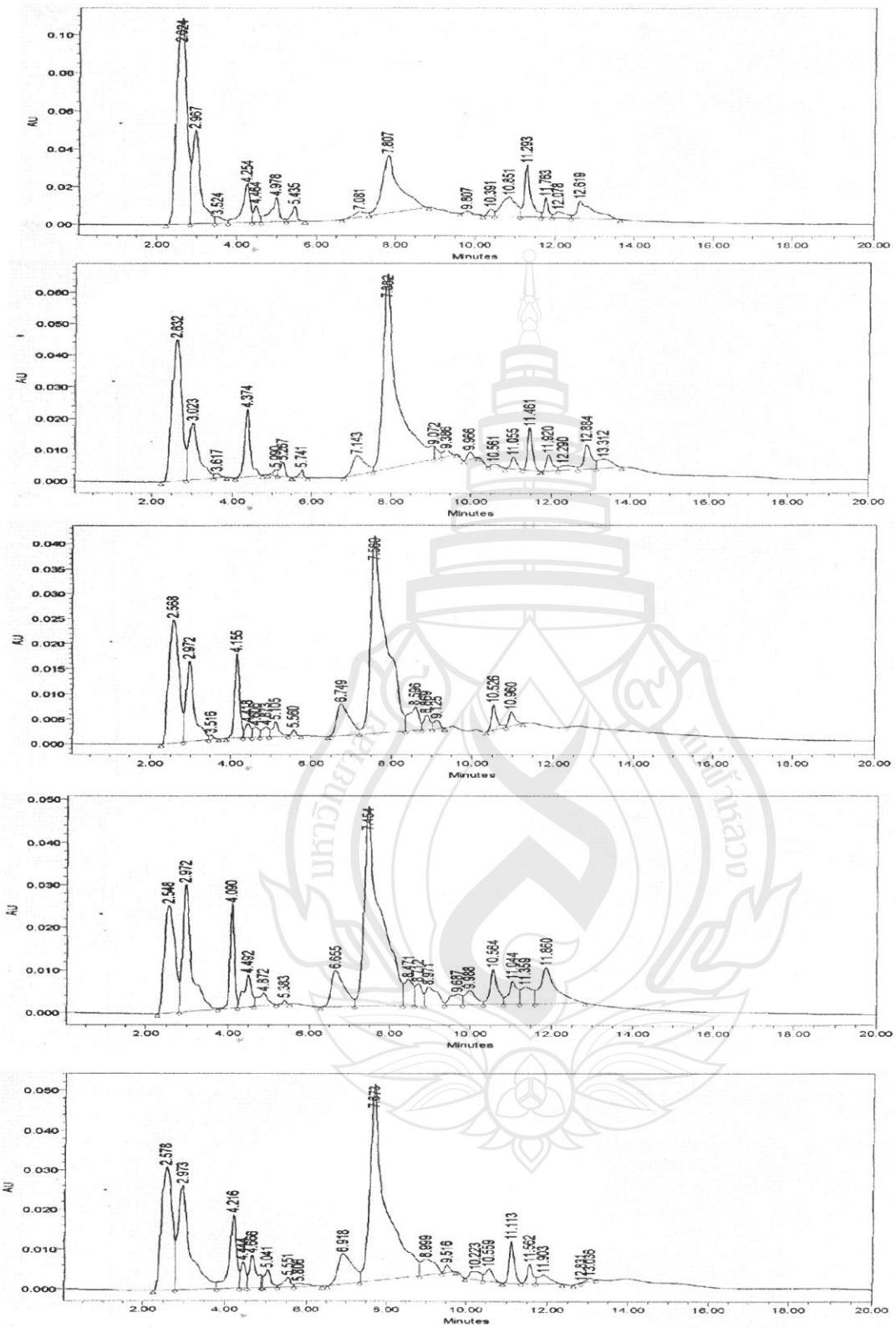
การตรวจสอบรูปแบบองค์ประกอบของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอด้วยเทคนิค HPLC ผ่านคอลัมน์ C18 แสดงดัง**ภาพที่ 4-5 ถึง 4-8** สำหรับ FL, FC, RL และ RC ตามลำดับ พบว่าสารละลายแยกส่วนยางมะละกอทั้ง 4 ชนิดในทุกช่วงโมเลกุลมีรูปแบบการชะของสารองค์ประกอบที่คล้ายกัน โดยมีพีคหลักอยู่ที่ประมาณ 2.5, 2.9, 4.2 และ 7.5 นาที ทั้งนี้งานศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโครมาโตกราฟีของยางมะละกอที่ผ่านมาจะใช้คอลัมน์ประเภทแลกเปลี่ยนประจุหรือประเภทแยกโมเลกุลตามขนาดโมเลกุลของโปรตีนซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาการแยกหรือทำบริสุทธิ์เอนไซม์ (Thomas *et al.*, 2009; Chaiwut *et al.*, 2007; Oloyede, 2005; Azarkan *et al.*, 2004; Moussaoui *et al.*, 2001) แต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้คอลัมน์ประเภท C18 เพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการชะของสารองค์ประกอบในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลช่วงต่างๆ ซึ่งไม่ได้มีแต่เฉพาะโปรตีนแต่รวมทั้งสารประกอบอื่นเช่นสารประกอบฟีนอลิกและสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ

จากผลการทดลองพบว่าทุกตัวอย่างมีรูปแบบการชะสารองค์ประกอบคล้ายๆ กัน เนื่องจากคอลัมน์นี้ไม่ได้แยกสารตามขนาดโมเลกุลจึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างมีลักษณะความเป็นขั้วของสารองค์ประกอบคล้ายกัน โดยประเภทของสารที่น่าจะเป็นไปได้มีทั้งกลุ่มโปรตีน เพปไทด์ และสารประกอบฟีนอลิกต่างๆ ซึ่งดูดกลืนยูวีที่ 280 nm ได้

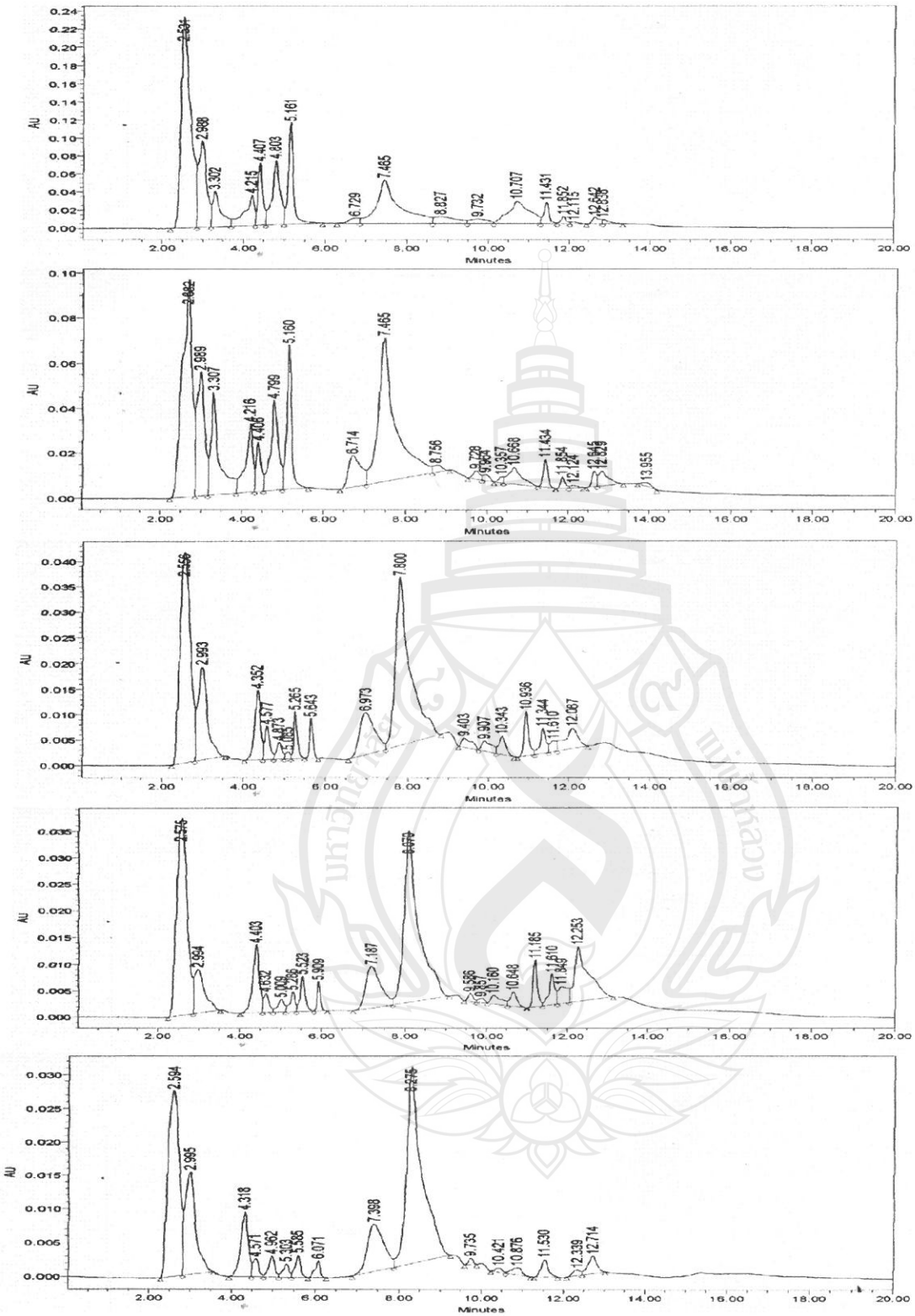
ตารางที่ 4-2 ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลต่างๆ

Fraction	Sample*	IC_{50} (μg/mL)
-	Kojic acid	40.02 ± 1.01
Crude papaya latex	FL	32.24 ± 0.08
	FC	33.61 ± 0.16
	RL	31.21 ± 0.26
	RC	34.42 ± 0.22
> 30 kDa	FL	26.14 ± 0.19
	FC	24.17 ± 0.07
	RL	27.26 ± 1.24
	RC	25.11 ± 0.74
>10-30 kDa	FL	176.92 ± 0.11
	FC	179.43 ± 1.14
	RL	168.70 ± 1.27
	RC	171.14 ± 2.33
>3-10 kDa	FL	93.28 ± 0.24
	FC	110.28 ± 2.71
	RL	99.16 ± 2.03
	RC	104.04 ± 1.02
≤ 3 kDa	FL	28.67 ± 1.96
	FC	29.48 ± 1.78
	RL	27.61 ± 0.49
	RC	27.02 ± 2.01

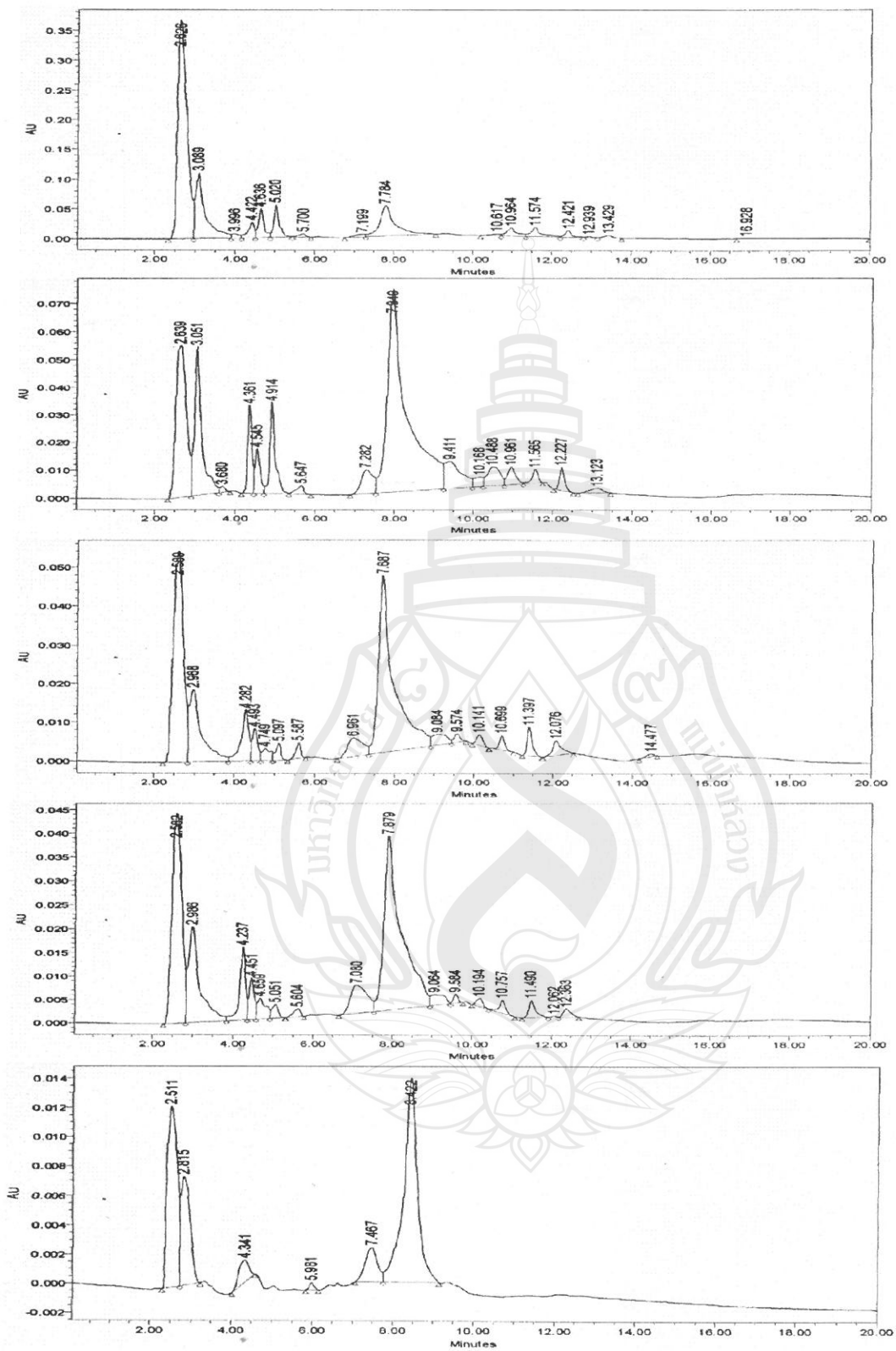
* FL; first time tapping liquid latex, FC; first time tapping clotting latex, RL; repeated tapping liquid latex and RC; repeated tapping clotting latex



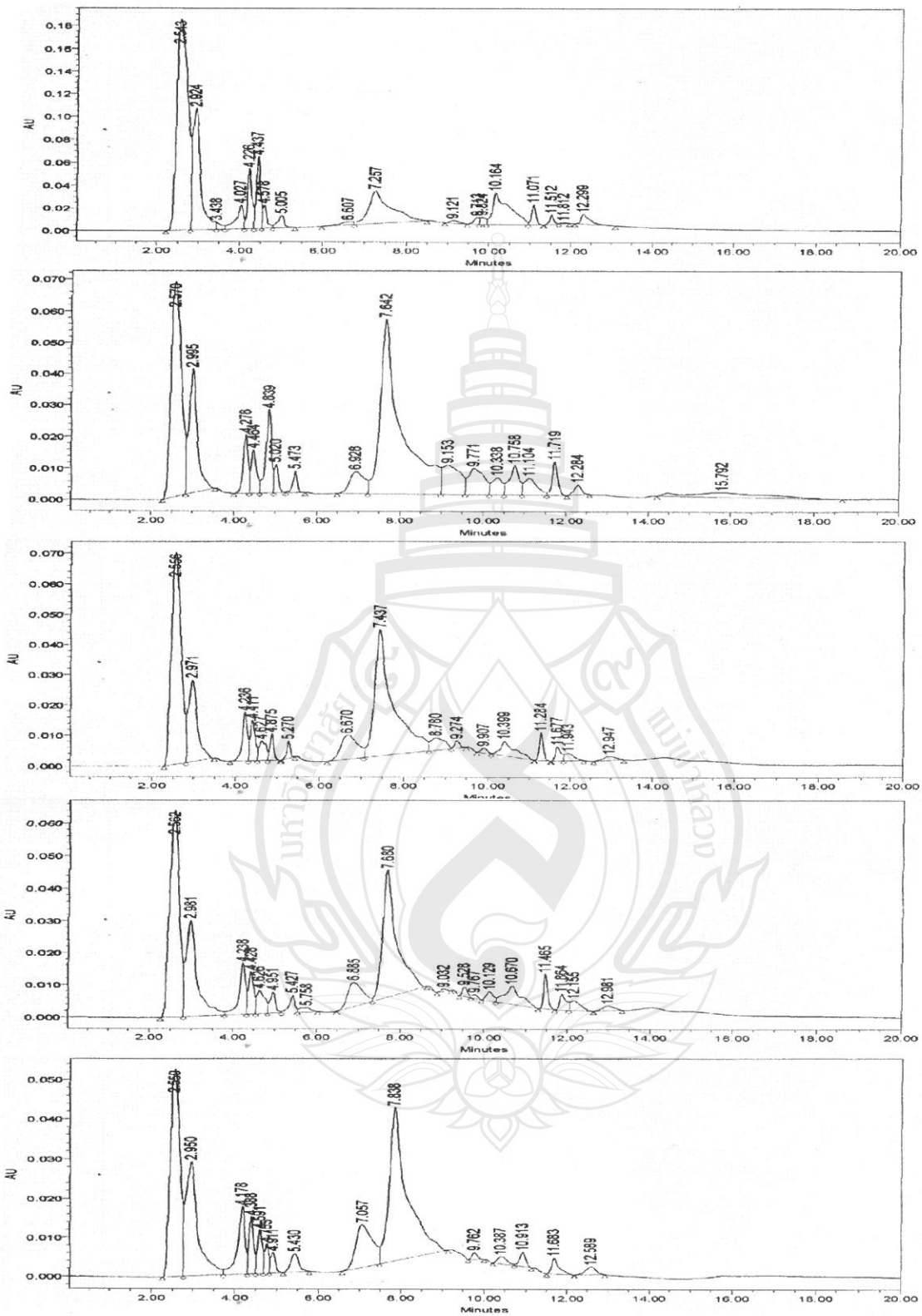
ภาพที่ 4-5 รูปแบบสารองค์ประกอบของสารสกัดแยกส่วนยางมะละกอ FL วิเคราะห์โดย C18 column HPLC



ภาพที่ 4-6 รูปแบบสารองค์ประกอบของสารสกัดแยกส่วนยางมะละกอ FC วิเคราะห์โดย C18 column HPLC



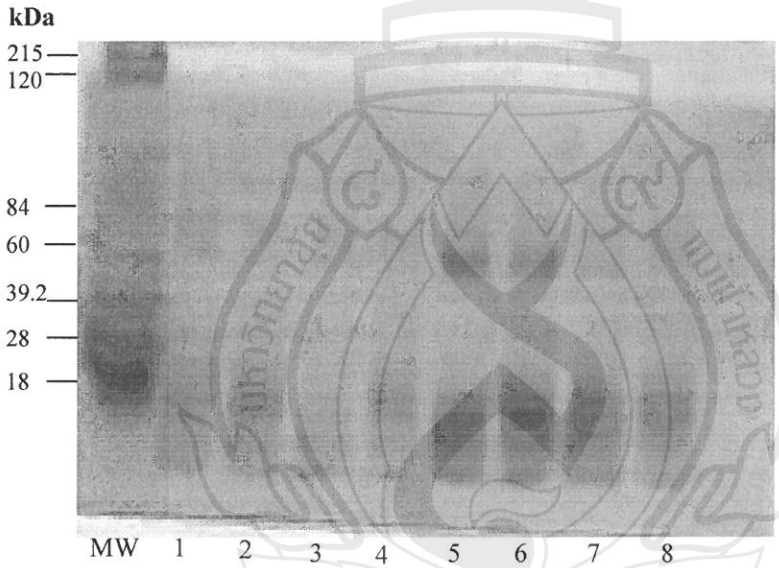
ภาพที่ 4-7 รูปแบบสารองค์ประกอบของสารสกัดแยกส่วนยางมะละกอ RL วิเคราะห์โดย C18 column HPLC



ภาพที่ 4-8 รูปแบบสารองค์ประกอบของสารสกัดแยกส่วนยางมะละกอ RC วิเคราะห์โดย C18 column HPLC

4.7 การหาขนาดโปรตีนของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอด้วย SDS-PAGE

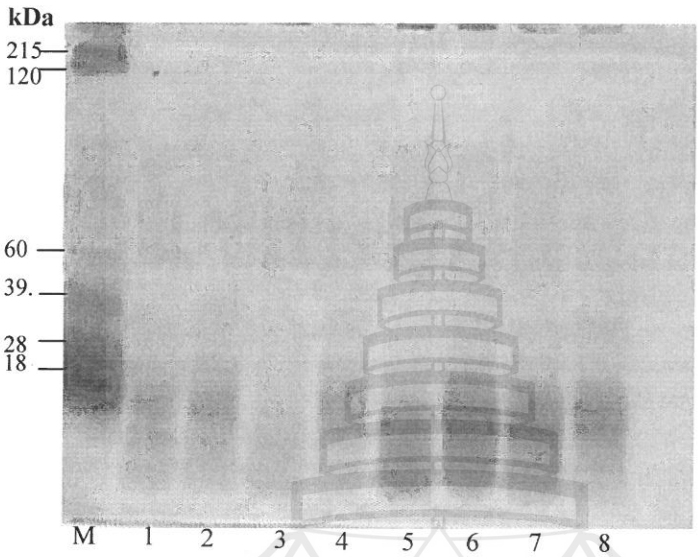
การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของสารองค์ประกอบในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอด้วยเทคนิค SDS-PAGE แสดงดัง**ภาพที่ 4-9 ถึง 4-11** พบว่าสารสกัดยางมะละกอ หรือ crude papaya latex มีองค์ประกอบโปรตีนหลายชนิดในช่วงโมเลกุลกว้าง และรูปแบบโปรตีนองค์ประกอบจะคล้ายกันในทุกตัวอย่างทั้งน้ำยางเหลวและน้ำยางแข็งตัวที่ได้จากการกรีดครั้งแรกและการกรีดซ้ำ (**ภาพที่ 4-9** แถวที่ 1-4) ในขณะที่สารละลายแยกส่วนยางมะละกอช่วงขนาดโมเลกุล >30 kDa (แถวที่ 5-8) จะให้แถบโปรตีนที่เข้มกว่า สะท้อนให้เห็นว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนมากกว่า crude ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองใน**ตารางที่ 4-1** และรูปแบบการเคลื่อนที่ของโปรตีนองค์ประกอบในยางมะละกอยังสอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้าซึ่งพบว่าโปรตีนองค์ประกอบส่วนใหญ่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 18 kDa (Chaiwut *et al.*; 2007; Chaiwut *et al.*, 2010a; Thomas *et al.*, 2009)



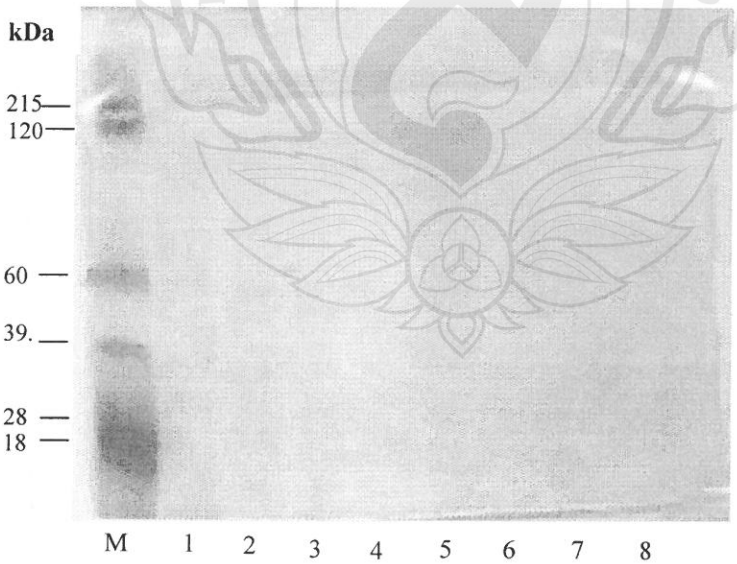
ภาพที่ 4-9 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนองค์ประกอบในสารสกัดยางมะละกอ crude papaya latex (แถวที่ 1: crude FL, 2: crude FC, 3: crude RL และ 4: crude RC) เปรียบเทียบกับสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลช่วง >30 kDa (แถวที่ 5: FL, 6: FC, 7: RL และ 8: RC)

โปรตีนองค์ประกอบในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลช่วง >10-30 kDa มีความเข้มของแถบสีต่ำ (**ภาพที่ 4-10** แถวที่ 1-4) แสดงว่ามีปริมาณโปรตีนต่ำในสารละลายส่วนนี้ ซึ่งอธิบายได้ว่าโปรตีนองค์ประกอบหลักในยางมะละกอซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าได้ถูกสกัดให้ไปอยู่ในช่วงโมเลกุล >3-10 แล้วจะเห็นได้จากความเข้มของแถบโปรตีนที่เข้มขึ้นในช่วงโมเลกุลดังกล่าว (**ภาพที่ 4-10** แถวที่ 5-8) ในขณะที่สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่โมลกุลเล็กกว่า 3 kDa จะไม่

สามารถเห็นแถบสีของโปรตีนได้ (**ภาพที่ 4-11**) อธิบายได้ว่าโปรตีนมีขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ได้ไวจนหลุดออกนอกแผ่นเจลและนอกจากนั้นโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลเล็กจะไม่สามารถให้ผลบวกหรือเกิดสีน้ำเงินกับโมเลกุลของสี Coomassie brilliant blue ที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้ (Bradford, 1976)



ภาพที่ 4-10 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนองค์ประกอบในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลช่วง >10-30 kDa (แถวที่ 1: FL, 2: FC, 3: RL และ 4: RC) และขนาดโมเลกุลช่วง >3-10 kDa (แถวที่ 5: FL, 6: FC, 7: RL และ 8: RC)



ภาพที่ 4-11 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนองค์ประกอบในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่ขนาดโมเลกุลช่วง ≤ 3 kDa (แถวที่ 1 และ 5: FL, 2 และ 6: FC, 3 และ 7: RL และ 4 และ 8: RC)

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ยางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลมะละกอซ้ำให้ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของโปรติเอสสูงกว่ายางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลครั้งแรก สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >30 kDa มีความเข้มข้นของโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีสูงที่สุด โดยมีค่าโปรตีนในช่วง 139.96-144.82 mg/mL และแอคติวิตีของโปรติเอส 372.67-4,334.65 units ในขณะที่แทบไม่พบค่าปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีในสารละลายแยกส่วนที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 30 kDa

สารละลายแยกส่วนยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >10-30 kDa, >3-10 kDa และ ≤3 kDa ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.11-1.66, 1.28-1.85 และ 1.13-1.64 mg/mL ตามลำดับ โดยให้ฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน BHT การศึกษาประสิทธิภาพการดูดกลืนรังสียูวีพบว่าสารสกัดยางมะละกอที่มีขนาดโมเลกุล >30 kDa สามารถดูดกลืนยูวีซีและยูวีบีได้สูงกว่าสารสกัดยางมะละกออื่นๆ แต่ไม่มีตัวอย่างใดสามารถดูดกลืนช่วงยูวีเอได้ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอส่วนใหญ่สูงกว่าฤทธิ์ของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยฤทธิ์ของส่วนส่วนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เกิดจากเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นองค์ประกอบเกิดการย่อยไทโรซิเนสจึงเกิดการยับยั้งที่ดีในขณะที่ส่วนที่มีโมเลกุลเล็กเกิดจากสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรติเอส

การใช้HPLC คอลัมน์ C18 สามารถตรวจสอบรูปแบบองค์ประกอบของสารในสารละลายแยกส่วนยางมะละกอได้ และ SDS-PAGE สามารถยืนยันขนาดโมเลกุลของโปรตีนตามช่วงโมเลกุลของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอได้อย่างชัดเจน

5.2 ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ในเครื่องสำอาง

สารละลายแยกส่วนยางมะละกอสามารถนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ในเครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยส่วนที่เป็นโปรติเอสซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่สามารถประยุกต์เป็นสารช่วยหลุดลอกเซลล์ผิวชั้นนอกของผิวหนังในสภาวะอ่อนโอนต่อผิวมากกว่าสารประเภทกรดผลไม้ นอกจากนั้นยังลดการระคายเคืองเมื่อเปรียบเทียบกับกรดผลไม้ เนื่องจากเอนไซม์มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถซึมเข้าสู่ผิวหนังชั้นลึกลงไปได้ ในขณะที่สารละลายแยกส่วนยางมะละกอโมเลกุลเล็กสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้ง

อนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยให้ฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน จึงสามารถประยุกต์ได้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวบำรุงผิวประเภทลดริ้วรอยและลดสีผิวได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายแยกส่วนจากยางมะละกอไม่สามารถดูดกลืนรังสียูวีได้จึงไม่สามารถพัฒนาเป็นสารกันแดดได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์หารูปแบบขององค์ประกอบของสารละลายแยกส่วนยางมะละกอสามารถใช้คอลัมน์ C18 ได้ แต่หากต้องการเน้นการทำบริสุทธิ์โมเลกุลโปรตีนหรือเอนไซม์ในยางะมะละกอแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบควรใช้เทคนิคที่เหมาะสมการแยกโปรตีนเช่น ร่วมกับเทคนิค FPLC โดยเลือกใช้คอลัมน์ประเภทแลกเปลี่ยนประจุหรือประเภทแยกขนาดโมเลกุล จะทำให้ได้โปรตีนที่มีความบรสุทธิ์สูง แต่อย่างไรก็ตามเป็นการสิ้นเปลืองเวลาและงบประมาณในแง่ของการนำไปประยุกต์ในเครื่องสำอางซึ่งไม่ต้องการความบริสุทธิ์ของสารมากนัก

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 13 พฤษภาคม 2551 **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง** กระทรวงสาธารณสุข [Cited: 30 พฤศจิกายน 2551] [Online:http://www.fda.moph.go.th/News50/DontInputCosmetic.pdf].

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 27 มิถุนายน 2550 **อย. แฉรายชื่อและภาพเครื่องสำอางอันตราย** กระทรวงสาธารณสุข [Cited: 30 พฤศจิกายน 2551] [Online:http://www.fda.moph.go.th/News50/BROCHURE.PDF].

Azarkan, M., Amrani, A., Nijs, M., Vandermeers, A., Zerhouni, S., Smolders, N. and Looze, Y. 1997. *Carica papaya* latex is a rich source of a class I chitinase. *Phytochem.,* 46: 1319-1325.

Azarkan, M., Dibiani, R., Baulard, C. and Baeyens-Volant, D. 2006a. Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity. *Phytochem.*, 65: 525-534.

Azarkan, M., Dibiani, R., Goormaghtigh, E., Raussens, V. and Baeyens-Volent, D. 2006b. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β-sheet glycoprotein. *Biochim. Biophysic. Acta,* 1764: 1063-1072.

Azarkan, M., Moussaoui, A.E., van Wuytswinkel, D., Dehon, G. and Looze, Y. 2003. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *J. Chromatograph. B,* 790: 229-238.

Azarkan, M., Wintjens, R., Looze, Y. and Baeyens-Volant, D. 2004. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Phytochem.*, 65: 525-534.

Benjakul, S., Visessanguan, W. and Yanaka, M. 2006. Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Food Chem.*, 98: 158-163.

Bradford, M.M 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Chaiwut, P., Arunwatcharapan, K., Chantana, A., Pintathong, P. and Rawdkuen, S. 2010a. Phenolic contents, DPPH radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory activity of Thai's mango seed kernels. The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010), Royal Mekhong NongKhai Hotel, Nong Khai, Thailand. March 4-6, 2010.

Chaiwut, P., Nitsawang, S., Shank, L. and Kanasawud, P. 2007. A comparative study on proteolytic components of papaya peel and latex proteases. *Chiang Mai J. Sci.*, 34: 109-118.

Chaiwut, P., Pintathong, P., and Rawdkuen, S. 2010b. Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Proc. Biochem.*, 45: 1172-1175.

Denisov, E.T. and Afanas'ev, I.B. 2005. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. CRC Press, New York.

Diaz, M.N., Frei, B., Vita, J.A. and Keaney, J.F. 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New Eng. J. Med.*, 337: 408-416.

Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J. and Edwards, R. 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opinion Plant Biol.*, 1: 258-266.

Gololobov, M.Y., Wang, W. and Bateman Jr, R.C. 1996. Substrate and inhibitor specificity of glutamine clyclotransferase (QC). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 377: 395-398.

Karakurt, Y. and Huber, D.J. 2007. Characterization of wound-regulated cDNA and their expression in fresh-cut and intact papaya fruit during low-temperature storage. *Postharv. Biol. Technol.*, 44: 179-183.

Karakurt, Y. and Huber, D.J. 2003. Activities of several membrane and cell-wall hydrolases, ethylene biosynthetic enzymes, and cell wall polyuronide degradation during low-temperature storage of intact and fresh-cut papaya (*Carica papaya*) fruit. *Postharv. Biol. Technol.*, 28: 219-229.

Khuzhaev, V.U. and Aripova, S.F. 2000. Pseudocarpaine from *Carica papaya*. *Chem. Nat. Comp.*, 36: 418.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriphage T4. Nature, 227: 680-685.

Lim, Y.Y., Lim, T.T. and Tee, J.J. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. *Food Chem.*, 103: 1003-1008.

Moussaoui, A.E., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M. and Looze, Y. 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58: 556-570.

Moutim, V., Silva, L.G., Lopes, M.T.P., Fernandes, G.W. and Salas, C.E. 1999. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Sci.*, 142: 115-121.

Odani, S., Yokokawa, Y., Yakeda, H., Abe, S. and Odani. S. 1996. The primary structure and characterization of carbohydrate chains of the extracellular glycoprotein proteinase inhibitor from latex of *Carica papaya.Eur. J. Biochem.*, 241: 77-82.

Oloyede, O. I. 2005. Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. Pakistan J. Nutri. 4: 379-381.

Pena-Ramos, E.A. and Xiong, Y.L. 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysate in a liposomal system. *J. Food Sci.*, 67: 2952-2956.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evan, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231–1237.

Redina, E.F., Mezhlum'yan, L.G., Bazhenov, L.G. and Yuldashev, P.K. 1997. Determination of lysozyme in papaya latex preparations. *Chem. Nat. Comp.*, 33: 600.

Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C et al. 2008. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. *LWT-Food Sci. Technol.*, 41: 1624-1632.

Sala, S. 2007. Cosmetic or pharmaceutical product for external use based on papaya. *US Patent*, 0 264 372 A1.

Schurink, M. 2007. Peptides as inhibitors of lipoxygenase and tyrosinase. *Ph.D. Thesis*, Wageningene University, Wageningen, The Netherlands.

Schurink, M., van-Berkel, W.J.H., Wichers, H.J. and Boeriu, C.G. 2007. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides*, 28: 485-495.

Song, I., Taylor, M., Baker, K. and Bateman Jr, R.C. 1995. Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. *Gene*, 162: 221-224.

Theppakorn, T., Kanasawud, P. and Halling, P.J. 2003. Effect of solid-state buffers on catalytic activity of papain in low water media. *Enz. Microb. Technol.*, 32: 828-836.

Thomas, G.E., Rodolfo, H.G., Juan, M.D., Geogina, S.F., Luis, C.G., Ingrid, R.B. et al. 2009. Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L. cv. Maradol harvest by products. Proc. Biochem., 44: 77-82.

Wilson, G. 1974. Some properties of an endo-1,3-beta-glucanase. *Biochem. Soc. Trans.*, 2: 1115-1116.

Wu, J.H., Wang, Z. and Xu, S.Y. 2008. Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater. *Proc. Biochem.*, 43: 480-487.

Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.*, 111: 370-376.

Zerhouni, S., Amrani, A., Nijs, M., Vandermeers, A. and Looze, Y. 1997. Purification and characterization of the plant glutamyl-peptide clyclotransferase isolated from papaya latex. *Int. J. Bio-Chromatogr.*, 3: 189-206.

ประวัตินักวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นาย ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Phanuphong Chaiwut

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

3. **สถานที่ติดต่อ** สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

   333 หมู่ 1 ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100

   E-mail: phanuphong@mfu.ac.th

   โทรศัพท์: 0-5391-6839

   โทรสาร: 0-5391-6831

4. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถาบัน	ปีที่จบ
ปริญญาเอก	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ม.ค. 2550
ปริญญาตรี	ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	พ.ค. 2544

5. ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยตีพิมพ์:

1. **Chaiwut, P.**, Kanasawud, P. and Halling, P. J. 2007. Solid-to-solid peptide synthesis by glycyl endopeptidase. *Enzyme Microb. Technol.*, 40: 954-960.
2. **Chaiwut, P.**, Nitsawang, S., Shank, L. and Kanasawud, P. 2007. Comparative study on properties and proteolytic components of papaya peel and latex proteases. *Chiang Mai J. Sci.*, 34: 109-118.
3. Ketnawa, S., Sai-Ut, S., Theppakorn, T., **Chaiwut, P.**, and Rawdkuen, S. 2009. Partitioning of bromelain from pineapple peel (*Nang Lae cultv.*) by aqueous two phase system. *Asian J. Food & Agro-Ind.* 2:457-468.
4. Sai-Ut, S., Ketnawa, S., **Chaiwut, P.**, and Rawdkuen. S. 2009. Biochemical and functional properties of legume proteins from the Royal Project Foundation. *Asian J. Food & Agro-Ind.* 2:493-504.
5. Khadpoon, N., Pintathong, P., **Chaiwut, P.**, and Rawdkuen, S. 2010. Aqueous two phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex. *Asian J. Food Agro-Ind.*, 3: 82-92.
6. **Chaiwut, P.**, Rawdkuen, S., and Benjakul, S. 2009. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethyleneglycol-salts biphasic system. *Proc. Biochem.*, 45:1148-1155.
7. **Chaiwut, P.**, Pintathong, P., and Rawdkuen, S. 2010. Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Proc. Biochem.*, 45: 1172-1175.
8. Rawdkuen, S., **Chaiwut, P.**, Pintathong, P., and Benjakul, S. 2010. Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex. *Biochem. Eng. J.*, 50: 145-149.
9. Ketnawa, S., Rawdkuen, S., and. **Chaiwut, P.** 2010. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae Cultivar. *Biochem. Eng. J.*, 52: 205-211.
10. Ketnawa, S., Chaiwut, P. and Rawdkuen, S. 2011. Aqueous Two-phase Extraction of Bromelain from Pineapple Peels ('Phu Lae' cultv.) and Its Biochemical Properties. *Food Sci. Biotechnol.* 20(5): 1219-1226.

11. Ketnawa, S., Chaiwut, P. and Rawdkuen, S. 2011. Extraction of Bromelain from Pineapple peels. *Food Sci. Technol. Inter.* 17(4): 394-402.
12. Rawdkuen, S., Pintathong, P., **Chaiwut, P.**, and Benjakul, S. 2011. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. *Food Bioprod. Process.* 89: 73-80.
13. Pintathong, P., Chanphithak, P., Sereetaveekul, P., Thitipramote, N., and **Chaiwut, P.** 2012. Use of response surface methodology for phenolic antioxidant extraction from Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) pod pericarb. *Adv. Mater. Res.* 506: 591-594.
14. Ketnawa, S., **Chaiwut, P.**, Rawdkuen, S. 2012. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food Bioprod Process.* 90(3): 385–391.
15. Sangthong, S., Pintathong, P. and **Chaiwut, P.** (2013). Microwave-assisted solid-liquid extraction of biological compounds from *Areca catechu* L. seed. Burapha Sci. J. 18: 195-202

ผลงานนำเสนอ(Proceeding):

1. Khadpoon, N., Pintathong, P., **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2009. Aqueous two phase partitioning of protease from Calotropis procera latex. Food Innovation Asia Conference 2009. BITEC, Bangkok, Thailand. June 18-19, 2009.
3. Rawdkuen, S., **Chaiwut, P.** and Pintathong, P. 2009. Three-phase partitioning of protease from papaya peel extract. The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology TSB 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. September 24-25, 2009.
4. **Chaiwut, P.**, Pintathong, P. and Rawdkuen, S. 2009. Extraction of protease from papaya peels. The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology TSB 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. September 24-25, 2009.
5. Pintathong, P., **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2009. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems. The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology TSB 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. September 24-25, 2009.
6. **Chaiwut, P.**, Pintathong, P. and Rawdkuen, S. 2009. Three-phase partitioning of protease from papaya latex. The 35th Congress on Science and Technology of Thailand (STT35), The Tide Resort (Bangsaen Beach), Chonburi, Thailand. October 15-17, 2009.
7. Rawdkuen, S., **Chaiwut, P.** and Pintathong, P. 2009. Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex. The 35th Congress on Science and Technology of Thailand (STT35), The Tide Resort (Bangsaen Beach), Chonburi, Thailand. October 15-17, 2009.
8. **Chaiwut, P.**, Arunwatcharapan, K., Chantana, A., Pintathong, P. and Rawdkuen, S. 2010. Phenolic contents, DPPH radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory activity of Thai's mango seed kernels. The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010), **Royal Mekhong NongKhai Hotel**, Nong Khai, Thailand. March 4-6, 2010.
9. Sai-Ut, S.,Jongjareonrak, A., **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2010. Optimization of the ethanolic extraction of phenolic antioxidants from lychee and longan seeds using response surface methodology. The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010), Royal Mekhong NongKhai Hotel, Nong Khai, Thailand. March 4-6, 2010.
10. Ketnawa, S., **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2010. Bromelain extraction from pineapple peel (Nang Lae cultv.) by aqueous two phase system. The 3rd Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010), Royal Mekhong NongKhai Hotel, Nong Khai, Thailand. March 4-6, 2010.
11. **Chaiwut, P.**, Dumrongphuttidecha, T., Maneewong, C., Pintathong, P. and Rawdkuen, S. 2010. Antioxidant and

tryrosinase inhibitory activities of RD6 and black glutinous rice soaking water. Food Innovation Asia Conference, Bitec, Bangkok, Thailand. June 17-18, 2010.

12. Pintathong, P., **Chaiwut, P.**, Pratumpho, N., Duangchit, P. and Rawdkuen, S. 2010. Comparative study on extraction of phenolic compounds from some edible Thai fruit seeds. Food Innovation Asia Conference, Bitec, Bangkok, Thailand. June 17-18, 2010.
13. Sai-Ut, S., Jongjareonrak, A., **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2010. Extraction optimization of antioxidant from passion fruit seeds using response surface methodology. Food Innovation Asia Conference, Bitec, Bangkok, Thailand. June 17-18, 2010.
14. Ketnawa, S. **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2010. Extraction and characterizations of bromelain from pineapple peels. Food Innovation Asia Conference, Bitec, Bangkok, Thailand. June 17-18, 2010.
15. Ketnawa, S. **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2010. Phase partitioning of bromelain from pineapple peel (Phu lae cultv.) and its biochemical properties. Food Innovation Asia Conference, Bitec, Bangkok, Thailand. June 17-18, 2010.
16. Sai-Ut, S., **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2010. Response surface optimization for extraction of antioxidant from mango seed kernel. Food Innovation Asia Conference, Bitec, Bangkok, Thailand. June 17-18, 2010.
17. Danai, N., Pintathong, P., Rawdkuen, S. and **Chaiwut, P.** 2010. Proteolytic activity of rhizome extracts from Zingiberaceae plants. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.
18. Pintathong, P., **Chaiwut P.**, Thitipramote, N. and Rawdkuen, S. 2010. Comparison of different methods for bioactive compounds extraction from Bombax ceiba L. flowers. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.
19. Arunwatcharapan, K., Chantana, A., Pintathong, P., Rawdkuen, S. and **Chaiwut, P.** 2010. Extraction of phenolic antioxidants from fruit seeds of papaya, sugarapple, watermelon and salacca. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.
20. Thitipramote, N., **Chaiwut, P.**, Pintathong, P. and Rawdkuen, S. 2010. Characteristics and bioactivities of gelatin hydrolysate from beef skin. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.
21. Rawdkuen, S., **Chaiwut, P.,** Pintathong, P. and Thitipramote, N. 2010. Three phase partitioning of proteases from viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*). The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.
22. Sai-Ut, S., **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2010. Optimization for extraction of bioactive compounds from mango peels using response surface methodology. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.
23. Sai-Ut, S., **Chaiwut, P.,** Jongjareonrak, A., and Rawdkuen, S. 2010. Response surface methodology for bioactive compounds extraction optimization of rambutan seeds. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.
24. Ketnawa, S. **Chaiwut, P.** and Rawdkuen, S. 2010. Application of bromelain extract for muscle foods tenderization. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.
25. Thitipramote, N., **Chaiwut, P.,** Pintathong, P. and Rawdkuen, S. 2010. Characteristics and bioactivities of gelatin hydrolysate from beef skin. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, October 20-22, 2010.

26. Sroimori, T., Srisunton, S., Rawdkuen, S., Pintathong, P. and **Chaiwut, P.** 2010. Extraction of phenolic antioxidants from peels and seeds of the Royal Project's fruits. International Conference on Agriculture and Agro-Industry, Mae Fah Luang University, November 19-20, 2010.
27. Bandasak, C., Rawkuen, S., Pintathong, P. and **Chaiwut, P.** 2010. Bioactivities of *Carica papaya* latex extract. International Conference on Agriculture and Agro-Industry, Mae Fah Luang University, November 19-20, 2010.
28. **Chaiwut, P.**, Sangthong, S., Thitilertdecha, N., Rawdkuen, S. and Pintathong, P. 2011. Bromelain extraction and stabilization in cosmetic product by polyethylene glycol. Chiang Mai International Conference on Biomaterials and Application, Chiang Mai, August 9-10, 2011.
29. Pintathong, P., Chanphithak, P., Sereetaveekul, P., Thitipromote, N. and **Chaiwut, P.** 2011. Use of response surface methodology for phenolic antioxidant extraction from lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) pod pericarp. Chiang Mai International Conference on Biomaterials and Application, Chiang Mai, August 9-10, 2011.
30. Vannabun, A., **Chaiwut, P.** and Rawdkeun, S. 2011. Effect of salts on three-phase partitioning of proteases from vscera of farmed giant catfish. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology.Bangkok. October 27-28, 2011.
31. Vannabun, A., **Chaiwut, P.** and Rawdkeun, S. 2011. Effect of crude extract to *t*-butanol ratio on partitioning of protease from farmed giant catfish. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
32. Sangthong, S., Pintathong, P., Rawdkeun, S., and **Chaiwut, P.** 2011. Pineapple waste as a potential source for bromelain extraction. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
33. Keonkeaw, N., Thiwongnoi, P., **Chaiwut, P.**, Thitipramote, N., and Pintathong, P. 2011. Evaluation of cosmetic bioactivities from Zingiberaceae rhizome extract. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
34. **Chaiwut, P.**, Keonkeaw, N., Thiwongnoi, P., Thitilertdecha, N., and Pintathong, P. 2011. Microwave-assisted extraction ad optimization of antioxidant and antityrosinase activities from *Zingiber officinale* rhizome. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
35. Lalitanan, N., Akuniwong, P., Pintathong, P., **Chaiwut, P.**, and Thitilertdecha, N. 2011. Phenolic content and antioxidant activity from Thai flower extracts: Effect of extraction conditions. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
36. Chuamsuk, S., Pintathong, P., Thitipramote, N., Wuttisin, N., and **Chaiwut, P.** 2011. Phenolic antioxidative activity of banana (*Musa Sapientum* L.) peel extract. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
37. Wijitkul, P., Junhasobhaga, P., Pintathong, P., and **Chaiwut, P.** 2011. Phenolic content and DPPH radical scavenging capacity in mung bean sprout extracts. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
38. Sangthong, S. Sompakdee, Z., Pintathong, P. Rawdkeun, S., and **Chaiwut, P.** 2011. Stabilization of bromelain extract by polyethylene glycol-salt biphasic system. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
39. Sangthong, S., Pintathong, P., and **Chaiwut, P.** 2011. Phenolic antioxidant activity from betel nut (*Areca catechu* L.) extract. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
40. Thitipramote, N., Krongsuksirichai, K., **Chaiwut, P.**, Pintathong, P. and Rawdkeun, S. 2011. Characterization and bioactivities of collagen hydrolysates from striped catfish and farmed giant catfish skins. The 37th Congress o Science and Technology of Thailand. Bangkok. October 10-12, 2011.
41. Sangthong, S., Pintathong, P., and **Chaiwut, P.** 2011. Extraction of phenolic compound from banana (*Musa sapientum*) peel and its formulation in sunscreen product. IFSCC 2011 Conference. Bangkok. October 31-November 2, 2011

42. Bonpnya, N., Takee, C., **Chaiwut, P.**, and Pintathong, P. 2011. Use of response surface methodology for extraction of phenolic antioxidant from betel nut (*areca catechu* L.). IFSCC 2011 Conference. Bangkok. October 31-November 2, 2011

43. Sangthong, S., Pintathong, P., and **Chaiwut, P.** 2011. Comparison of microwave-assisted and shaking methods on extraction of cosmetic bioactivities from *Areca catechu* L. Pure and applied chemistry international conference 2012. Chiang Mai, January 11-13, 2012.

44. Hayeedoloh, A., Charoenpong, N., Chainan, A., **Chaiwut, P.**, and Thitilertdecha, N. Phenolic content and antioxidant activity of *Nephelium lappceum* L. fruit residues: effects of drying treatments and extraction condition. Pure and applied chemistry international conference 2012. Chiang Mai, January 11-13, 2012.

45. **Chaiwut, P.**, Huttapasu, P., Prommuang, B., and Pintathong, P. 2012. Microwave-assisted extraction and comparison of phenolic antioxidants from six aerial parts of *Moringa olifera*. International Conference on Food and Applied Bioscience. Chiang mai. Febuary 6-7, 2012.

46. Pintathong, P., Keawkhao, W., Sirichot, O., and **Chaiwut, P.** 2012. Recovery of phenolic antioxidants from spent coffee grounds using microwave-asisted extraction. International Conference on Food and Applied Bioscience. Chiang mai. Febuary 6-7, 2012.

47. Tomusor, F., Pasuriyan, K., Sangthong. S., **Chaiwut. P.**, and Pintathong, P. 2012. Factors affecting phenolic antioxidants extraction from raw betel nut seed. The 2nd Current Drug Development Intrenational Conference. May 2-4, 2012.