

การศึกษาโปรตีนบ่งชี้เอกลักษณ์ในน้ำผึ้งจากดอกลำไยเปรียบเทียบกับน้ำผึ้งจากดอกไม้ชนิดอื่นด้วยแนวทางโปรตีโอมิกส์

CHARACTERIZATION OF IDENTITY MARKER PROTEINS IN LONGAN FLORAL HONEY COMPARED TO OTHER MONOFLORAL HONEY PRODUCTS VIA A PROTEOMIC APPROACH

อัจฉรา แกล้วกล้า¹, สุภาภรณ์ แสงจินา¹, เอกวิทย์ ตรีเนตร^{1*}, สิริวัฒน์ บุญชัยศรี², วินัย วิริยะอลงกรณ์³ และวัชรินทร์ จันทวรรณ⁴

Achara Kleawkla¹, Supaporn Saengjina¹, Ekawit Threenet^{1*}, Siriwat Boochaisri², Winai Wiriyaalongkorn³ and Watcharin Jantawan⁴

¹ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

² สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

³ สาขาวิชาไม้ผล คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

⁴ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน: เอกวิทย์ ตรีเนตร อีเมล: ekawit73@hotmail.com

บทคัดย่อ:

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของผลิตภัณฑ์น้ำผึ้งจากดอกไม้จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ น้ำผึ้งจากดอกลำไย น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ น้ำผึ้งจากดอกสะเดา น้ำผึ้งจากดอกกาแฟ น้ำผึ้งจากดอกอะคาเซีย น้ำผึ้งจากดอกสาบเสือ น้ำผึ้งจากดอกแมคคาเดเมีย น้ำผึ้งจากดอกทานตะวัน น้ำผึ้งจากดอกคอแลน และน้ำผึ้งจากดอกส้ม ผลการวิเคราะห์ด้านสีพบว่า น้ำผึ้งจากดอกสะเดา (ยี่ห้อดอยผาผึ้ง และไทฮันนี่ควีน) มีค่าสีอยู่ในช่วง water white น้ำผึ้งจากดอกอะคาเซีย (ยี่ห้อแลงนีส และลูนดอไมล์) และน้ำผึ้งจากดอกสาบเสือ (ยี่ห้อฟอร์อาบี และบิกบี) มีค่าสีอยู่ในช่วง extra white น้ำผึ้งจากดอกแมคคาเดเมีย (ยี่ห้อรักบ้านเกิด) และน้ำผึ้งจากดอกทานตะวัน (ยี่ห้อบิกบี) มีค่าสีอยู่ในช่วง extra light white ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เหลือมีค่าสีอยู่ในช่วง white ผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีพบว่า ค่าพีเอช มีค่าอยู่ในช่วง 4.3–6.7 ค่าการนำไฟฟ้าอยู่ในช่วง 111.73–796.93 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ค่าความชื้นอยู่ในช่วง 14.04–17.41% และค่าความหวานอยู่ในช่วง 76.0–79.5 %Brix โดยน้ำผึ้งจากทุกผลิตภัณฑ์มีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

การศึกษาปริมาณโปรตีนเชิงปริมาณในผลิตภัณฑ์น้ำผึ้งโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ พบว่าปริมาณโปรตีนมีค่าอยู่ในช่วง 10.01–17.20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ โดยไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาโปรตีนเชิงคุณภาพโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ สภาวะเจลนอน-เนทีฟที่ความเข้มข้น 15% เจล ในสภาวะตัวอย่างรีดิวซิง โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 180 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$ พบแถบโปรตีนทั้งสิ้น 12 แถบ ได้แก่ ขนาด 21.6, 34.2, 37.9, 39.8, 44.9, 50.7, 57.7, 64.6, 72.9, 81.2, 128.2 และ 159.5 kDa ตามลำดับ โดยพบแถบโปรตีนที่มีแนวโน้มเป็นลักษณะร่วมกัน 7 แถบ ได้แก่ ขนาด 37.9, 50.7, 57.7, 64.6, 72.9, 128.2 และ 159.5 kDa ตามลำดับ ยกเว้นตัวอย่างน้ำผึ้งจากดอกสะเดา ซึ่งแทบไม่ปรากฏแถบโปรตีนร่วมกับน้ำผึ้งจากดอกไม้ชนิดอื่น เมื่อพิจารณาแถบโปรตีนที่เป็นเอกลักษณ์ของน้ำผึ้งจากดอกไม้แต่ละชนิด พบว่าแถบโปรตีนขนาด 21.6 kDa เป็นแถบโปรตีนที่เป็นเอกลักษณ์ร่วมกันระหว่างน้ำผึ้งจากดอกแมคคาเดเมียและน้ำผึ้งจากดอกลำไย ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 44.9 kDa เป็นแถบโปรตีนที่เป็นเอกลักษณ์ร่วมกันระหว่างน้ำผึ้งจากดอกแมคคาเดเมียและน้ำผึ้งจากดอกทานตะวัน นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของน้ำผึ้งจากดอกลำไยที่ขนาด 34.2, 39.8 และ 81.2 kDa ตามลำดับ

การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนจากตัวอย่างน้ำผึ้ง 18 ตัวอย่าง โดยการระบุชนิดโปรตีนด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (LC-MS/MS) พบว่าจากแถบโปรตีนที่ส่งตรวจวิเคราะห์ทั้งสิ้น 8

แถบ สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ครบทั้ง 8 แถบ และพบโปรตีนบ่งชี้ที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ (1) FAD-binding PCMH-type domain-containing protein (58.9 kDa) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้อาจทำหน้าที่เป็นโปรตีนบ่งชี้ทั่วไปสำหรับน้ำผึ้งจากดอกไม้ อย่างไรก็ตาม โปรตีนชนิดนี้ที่ตำแหน่ง 64.6 kDa พบได้เฉพาะในน้ำผึ้งจากดอกอะคาเซียเท่านั้น (2) Beta-galactosidase (93.0 kDa) ซึ่งพบการแสดงออกที่ตำแหน่งแถบโปรตีนขนาด 37.9 kDa และพบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในน้ำผึ้งจากดอกไม้ทุกชนิดทั่วไป และ (3) Assimilatory sulfite reductase (ferredoxin) (78.0 kDa) ซึ่งพบการแสดงออกที่ตำแหน่งแถบโปรตีนขนาด 21.6 kDa โดยพบเฉพาะในน้ำผึ้งจากดอกแมคคาเดเมีย ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นแถบโปรตีนบ่งชี้เอกลักษณ์ของน้ำผึ้งจากดอกแมคคาเดเมียได้ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยครั้งนี้เป็นเพียงการทดลองเบื้องต้น โดยในการศึกษาต่อไปจะดำเนินการกับตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผึ้งจากดอกไม้หลากหลายชนิดและเพิ่มจำนวนยี่ห้อของน้ำผึ้งจากดอกไม้แต่ละชนิดให้มากขึ้น เพื่อให้สามารถระบุโปรตีนบ่งชี้ที่ชัดเจนสำหรับการจำแนกชนิดของน้ำผึ้งจากดอกไม้เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำผึ้งจากดอกไม้ชนิดอื่นในอนาคต

คำสำคัญ : น้ำผึ้งจากดอกไม้, แถบโปรตีน, โปรตีโอมิกส์

Abstract:

This study aimed to investigate the physical and chemical characteristics of honey products derived from 10 floral sources: longan (*Dimocarpus longan*), lychee (*Litchi chinensis*), neem (*Azadirachta indica*), coffee (*Coffea* spp.), acacia (*Acacia* spp.), siam weed (*Chromolaena odorata*), macadamia (*Macadamia* spp.), sunflower (*Helianthus annuus*), colan, and orange (*Citrus sinensis*). Color analysis revealed that honey from neem flowers (Doi Pha Phueng and Thai Honey Queen brands) fell within the water white range; honey from acacia flowers (Langnese and Loon de Mile brands) and honey from siam weed flowers (Fora Bee and Big Bee brands) were classified in the extra white range; while honey from macadamia flowers (Rak Ban Kerd brand) and honey from sunflowers (Big Bee brand) were in the extra light white range. The remaining honey products were predominantly in the white range. Physicochemical analysis demonstrated that pH ranged from 4.3 to 6.7, electrical conductivity from 111.73 to 796.93 $\mu\text{S}/\text{cm}$, moisture content from 14.04 to 17.41%, and sweetness from 76.0 to 79.5 °Brix. All products met the established quality standards.

Quantitative proteomic analysis of honey products revealed total protein concentrations in the range of 10.01–17.20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, with no statistically significant differences observed among samples. Qualitative protein profiling by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed under optimized conditions using a non-native 15% gel under reducing sample conditions at a protein loading concentration of 180 $\mu\text{g}/\text{well}$. A total of 12 protein bands were detected at molecular weights of 21.6, 34.2, 37.9, 39.8, 44.9, 50.7, 57.7, 64.6, 72.9, 81.2, 128.2, and 159.5 kDa, respectively. Seven protein bands—37.9, 50.7, 57.7, 64.6, 72.9, 128.2, and 159.5 kDa—were identified as common bands across most floral honey samples, with the exception of neem honey, which exhibited minimal shared bands with other floral sources. Regarding species-specific protein bands, the 21.6 kDa band was identified as a shared identity band between macadamia honey and longan honey, whereas the 44.9 kDa band was shared between macadamia honey and sunflower honey. Unique protein bands specific to longan honey were observed at 34.2, 39.8, and 81.2 kDa. Protein expression analysis of 18 honey samples was subsequently performed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Of the 8 protein bands submitted for analysis, all 8 were successfully identified. Three key biomarker proteins were discovered: (1) FAD-binding PCMH-type domain-containing protein (58.9 kDa), which may function as a general protein marker for floral honey; notably, this protein at the 64.6 kDa position was detected exclusively in acacia honey; (2) Beta-galactosidase (93.0 kDa), expressed at the 37.9 kDa protein band

position and found across all general floral honey samples; and (3) Assimilatory sulfite reductase [ferredoxin] (78.0 kDa), expressed at the 21.6 kDa band and detected exclusively in macadamia honey, thus serving as a potential identity biomarker for macadamia floral honey authentication. This study represents a preliminary investigation into protein-based authentication of floral honey. Future studies should incorporate a broader range of floral honey samples and an increased number of commercial brands per floral source to enable more definitive identification of protein biomarkers capable of clearly distinguishing longan honey from other floral honey types.

Keywords: floral honey, protein bands, proteomics