



การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผงโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคา



สุมิตรา สุขพิทักษ์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมี  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผงโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคา



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมี  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผงโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอิน

คา "

ของ สุมิตรา สุขพิทักษ์

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

### คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ตามรศมน สุรางกูร)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ตันตนะรัตน์)

อนุมัติ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

<b>ชื่อเรื่อง</b>	การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผงโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกากถั่วดาวอินคา
<b>ผู้วิจัย</b>	สุมิตรา สุขพิทักษ์
<b>ประธานที่ปรึกษา</b>	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ตามรัศมน สุรางกูร
<b>กรรมการที่ปรึกษา</b>	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา
<b>ประเภทสารนิพนธ์</b>	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2564
<b>คำสำคัญ</b>	ถั่วดาวอินคา, โปรตีนไฮโดรไลเสท, ฤทธิ์ทางชีวภาพ

### บทคัดย่อ

โปรตีนไฮโดรไลเสทเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันและกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพ ซึ่งโปรตีนได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น รวมถึงโปรตีนจากถั่วดาวอินคา (Sachainchi) โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคา และศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคาโดยใช้เอนไซม์ Alcalase (PH-A) และ Papain (PH-P) ผลิตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของทั้งสองเอนไซม์ คือ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง โดยมีค่า %DH สูงถึง 80% เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH Assay พบว่า PH-A และ PH-P มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างจาก Uncut ส่วน FRAP Assay พบว่า PH-A และ PH-P มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเพอริกได้สูงกว่า Uncut และจากศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 โดยวิธี MTT assay ผลการทดลองพบว่า PH-P มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ โดยหาค่า IC50 ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 985, 645 และ 465 µg/ml ตามลำดับ ส่วน PH-A และ Uncut กลับพบว่า มีฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ และการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคา และพบว่า โปรตีน Uncut PH-A และ PH-P เข้มข้น 5 µg/ml สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *IL-1* และ *IL-6* ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ จากผลการทดลองข้างต้นผู้วิจัยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก

ถั่วดาวอินคาที่ทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Papain มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด เหมาะสำหรับนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในอนาคตต่อไป



<b>Title</b>	BIOLOGICAL EFFECT OF SACHA INCHI PROTEIN POWDER AND PROTEIN HYDROLYSATE
<b>Author</b>	SUMITRA SUKPITAK
<b>Advisor</b>	Assistant Professor Damratsamon Surangkul, Ph.D.
<b>Co-Advisor</b>	Assistant Professor Amnat Phetrungnapha, Ph.D.
<b>Academic Paper</b>	M.S. Thesis in Biochemistry, Naresuan University, 2021
<b>Keywords</b>	Sacha inchi, Protein hydrolysates, Biological properties

### ABSTRACT

Protein hydrolysate involves the hydrolysis of peptide bonds by enzymes into polypeptides and amino acid that plays an important role in health benefits. Protein hydrolysates and food-derived biopeptides including protein from sacha inchi has been increasingly applied in the food industry. The objectives of this study were to prepare protein powder from sacha inchi and its hydrolysates by using papain and alcalase enzymes. In addition, the derived protein samples were also determined for biological properties. The optimal conditions for hydrolysis of protein by papain (PH-P) and alcalase (PH-A) was found at temperature 50°C, pH 7.5, 5 hours with degree of hydrolysis (%DH) 80%. DPPH assay was found that PH-A, PH-P and Uncut had dose dependent antioxidant activity. FRAP assay was found that PH-A and PH-P has ability to reduce ferric higher than Uncut. Antiproliferative activity in colorectal cancer HCT116 cell lines was studied by MTT assay. The results, found that PH-P showed antiproliferation with an IC50 at 24, 48 and 72 hours were 985, 645 and 465 ug/ml respectively. On the other hand, PH-A and Uncut promoted cell proliferation on HCT116 cell line. The study cytotoxicity of PH-P, PH-A and Uncut on macrophages RAW264.7 cell line was determined by MTT assay. The results showed that cell viability increased with time and dose dependent. PH-P, PH-A and Uncut 5 µg/ml was inhibited the increase in production of the inflammatory cytokines *IL-1* and *IL-6* in RAW264.7 macrophage cells induced by LPS. In conclusion, it was found that

digested proteins from Sacha inchi by Papain enzyme have the best biological activity and suitable for developed as a future dietary supplement.



## ประกาศขอบคุณการ

การทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนั้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ตามรัศมณ สุรางกูร ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ตลอดเวลาที่ผ่านมาได้ให้ความเอาใจใส่ดูแลและให้คำแนะนำในการทำงาน ทั้งในส่วนของการทำงานในห้องปฏิบัติการและในส่วนของงานเขียนเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ รวมถึง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ต้นตวันรัตน์ กรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในและ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ในการทำวิจัย รวมทั้งเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณในทุกความช่วยเหลือ คำแนะนำ และกำลังใจอันดีของคณาจารย์ทุกท่าน เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ บัณฑิตศึกษาภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ทุกท่าน

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจต่อไป

สุมิตรา สุขพิทักษ์



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ.....	ฑ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย.....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
บทที่ 2.....	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ถั่วดาวอินคา.....	5
องค์ประกอบในเมล็ดถั่วดาวอินคา.....	6
ฤทธิ์ทางชีวภาพของเมล็ดถั่วดาวอินคา.....	7
เปปไทด์ชีวภาพ.....	9

โปรตีนไฮโดรไลเซต.....	10
การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	11
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์.....	12
การใช้ประโยชน์โปรตีนไฮโดรไลเซต.....	15
อนุโมลิสระและสารต้านอนุโมลิสระ.....	16
กระบวนการอักเสบ.....	18
Cytokine.....	20
IL-1 (Interleukin-1).....	20
Interleukin-6 (IL-6).....	21
มะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก.....	21
การวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่.....	22
เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116.....	23
เซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7.....	24
บทที่ 3.....	25
วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
ประชากร และกลุ่มตัวอย่าง.....	25
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	25
วัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	26
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	27
วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
การกำจัดไขมันออกจากกากโปรตีนถั่วดาวอินคาสำเร็จรูป.....	28
การสกัดโปรตีนจากถั่วดาวอินคา.....	28

การผลิตรีโพรตีนไฮโดรไลเซสโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์.....	28
การหาค่า Degree of hydrolysate (%DH).....	29
การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซส .....	29
DPPH Radical Scavenging Activity Assay.....	29
Ferric reducing antioxidant power.....	29
การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งหลังได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซส .....	30
การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเซสจากถั่วดาวอินคาใน เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay .....	30
การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบหลังได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซส.....	30
การศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเซสจากถั่วดาวอินคาในเซลล์ เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 โดยวิธี MTT reduction assay .....	30
การศึกษาการแสดงออกระดับยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบของเซลล์ เพาะเลี้ยง แมคโครฟาจ RAW264.7 โดยวิธี qRT-PCR.....	31
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
บทที่ 4.....	32
ผลการวิจัย.....	32
ผลการผลิตรีโพรตีนไฮโดรไลเซสจากถั่วดาวอินคา .....	32
ผลการศึกษา pattern ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซสด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE.....	33
ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผงโปรตีนไฮโดรไลเซสจากถั่วดาวอินคา ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Activity Assay.....	34
ผลการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกของโปรตีนไฮโดรไลเซสจากถั่วดาว อินคาด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay).....	35

ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจาก ถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay .....	36
ผลการศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาในเซลล์ เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 โดยวิธี MTT reduction assay.....	40
ผลการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการลดระดับการแสดงออกของยีนที่ เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ <i>IL-1</i> และ <i>IL-6</i> ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโคร ฟาจ RAW264.7 โดยวิธี qRT-PCR.....	43
บทที่ 5.....	46
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย .....	46
อภิปรายผล .....	46
ผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสโดยใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย .....	46
การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผงโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคา ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Activity Assay .....	46
การศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาว อินคาด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay).....	47
การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจาก ถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116.....	49
การศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาในเซลล์ เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 .....	50
ผลการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการลดระดับการแสดงออกของ ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ <i>IL-1</i> และ <i>IL-6</i> ในเซลล์เพาะเลี้ยง แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยวิธี qRT-PCR.....	51
สรุปผลการทดลอง.....	53

บรรณานุกรม.....55

ภาคผนวก.....66

ประวัติผู้วิจัย .....75



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในกระบวนการ อักเสบ .....	31
ตารางที่ 2 แสดงผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับ โปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง .....	39
ตารางที่ 3 สรุปผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ ของโปรตีนจากถั่วดาวอินคา .....	54



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 Flow chart แสดงภาพรวมงานวิจัย.....	3
ภาพที่ 2 ลำต้นและใบ (ซ้าย) ผลและเมล็ด (ขวา) ของต้นถั่วดาวอินคา.....	6
ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเปปไทด์.....	9
ภาพที่ 4 Histopathology of colorectal cancer.....	22
ภาพที่ 5 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่สายพันธุ์ HCT116.....	24
ภาพที่ 6 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่สายพันธุ์ HCT116.....	24
ภาพที่ 7 แสดงระดับการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคา โดยใช้เอนไซม์ Alcalase (PH-A) และเอนไซม์ Papain (PH-P) ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส.....	32
ภาพที่ 8 แสดง pattern ของผงโปรตีน และโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) และเอนไซม์ (PH-A) ย่อยในสภาวะที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE (16% gel separating).....	33
ภาพที่ 9 กราฟแสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Uncut, PH-P และ PH-A.....	35
ภาพที่ 10 กราฟแสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Uncut, PH-P และ PH-A.....	36
ภาพที่ 11 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Mean±SD).....	37
ภาพที่ 12 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (Mean±SD).....	38

ภาพที่ 13 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (Mean±SD).....39

ภาพที่ 14 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Mean±SD).....40

ภาพที่ 15 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (Mean±SD).....41

ภาพที่ 16 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (Mean±SD).....42

ภาพที่ 17 แสดงผลการแสดงออกของยีน IL-1 ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อได้รับสาร LPS, Uncut, PH-P, PH-A เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง รวมทั้งได้รับ Uncut, PH-P, PH-A ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วย LPS เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ด้วยวิธี qRT-PCR (Mean±SD)...44

ภาพที่ 18 แสดงผลการแสดงออกของยีน IL-6 ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อได้รับสาร LPS, Uncut, PH-P, PH-A เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง รวมทั้งได้รับ Uncut, PH-P, PH-A ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วย LPS เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ด้วยวิธี qRT-PCR (Mean±SD)...45



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ เป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็น สารอาหารจากโปรตีนนั้นมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพ เมื่อรับประทานอาหารประเภท โปรตีนจะเกิดการย่อยในระบบทางเดินอาหารให้ได้เปปไทด์ (peptide) และกรดอะมิโน สามารถ ดูดซึมผ่านเนื้อเยื่อได้ดีเนื่องจากมีโมเลกุลขนาดเล็ก ในปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ ในอาหารมีเพิ่มขึ้น ซึ่งเปปไทด์นั้นได้จากการย่อยโปรตีนในหลอดทดลองโดยใช้เอนไซม์ หรือสารเคมี ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสท (Protein hydrolysate) โดยโปรตีนไฮโดรไลเสท หรือเปปไทด์ที่ได้จาก โปรตีนในอาหารหลายชนิดได้รับการรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายรวมถึงฤทธิ์ทางด้าน ภูมิคุ้มกัน, ด้านมะเร็ง, ลดความดันโลหิต, ด้านอนุมูลอิสระ, ด้านการอักเสบ, และด้านแบคทีเรีย (Bhat et al., 2015) ซึ่งคุณสมบัติของเปปไทด์นั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบลำดับกรดอะมิโนและความ ยาวของกรดอะมิโนที่เรียงต่อกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือเปปไทด์ที่ได้ จากอาหารได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร มีการวิจัยจำนวนมาก เพื่อพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลเสท หรือเปปไทด์จากแหล่งอาหารโปรตีนหลากหลายชนิดเพื่อศึกษาฤทธิ์ ทางชีวภาพ จากรายงานการศึกษาในปี 2010 ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการแยกเปปไทด์จากรำข้าว และ ศึกษาคุณสมบัติในการต้านมะเร็งชนิดต่าง ๆ จากผลการวิจัยพบว่า เปปไทด์จากรำข้าว สามารถยับยั้ง การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งตับ และเซลล์มะเร็ง ปอดได้ (Kannan et al., 2010) และในปี 2017 สามารถแยกเปปไทด์ HVLSRAPR โดยการทำให้ โปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย *S. platensis* ซึ่งพบว่าเปปไทด์ที่ได้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน ของเซลล์มะเร็งตับ HT-29 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ส่งผลต่อเซลล์ตับปกติเพียงเล็กน้อย (Wang & Zhang, 2017) และในปีเดียวกันกันนั้น Zielińska และคณะศึกษาการทำโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก แมลง *S. gregaria* แล้วนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยดูการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoyxygenase (LOX) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยผลการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไล เสทที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้ง LOX และ COX-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zielińska et al., 2017) และจาก การศึกษาเปปไทด์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนต่อกัน เช่น Trp-Tyr-Met และ Cys-His-Phe จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง (Dávalos et al., 2004) ดังนั้น โปรตีนไฮโดรไลเสท หรือเปปไทด์จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับการป้องกัน และรักษาโรคเพิ่มมากขึ้น

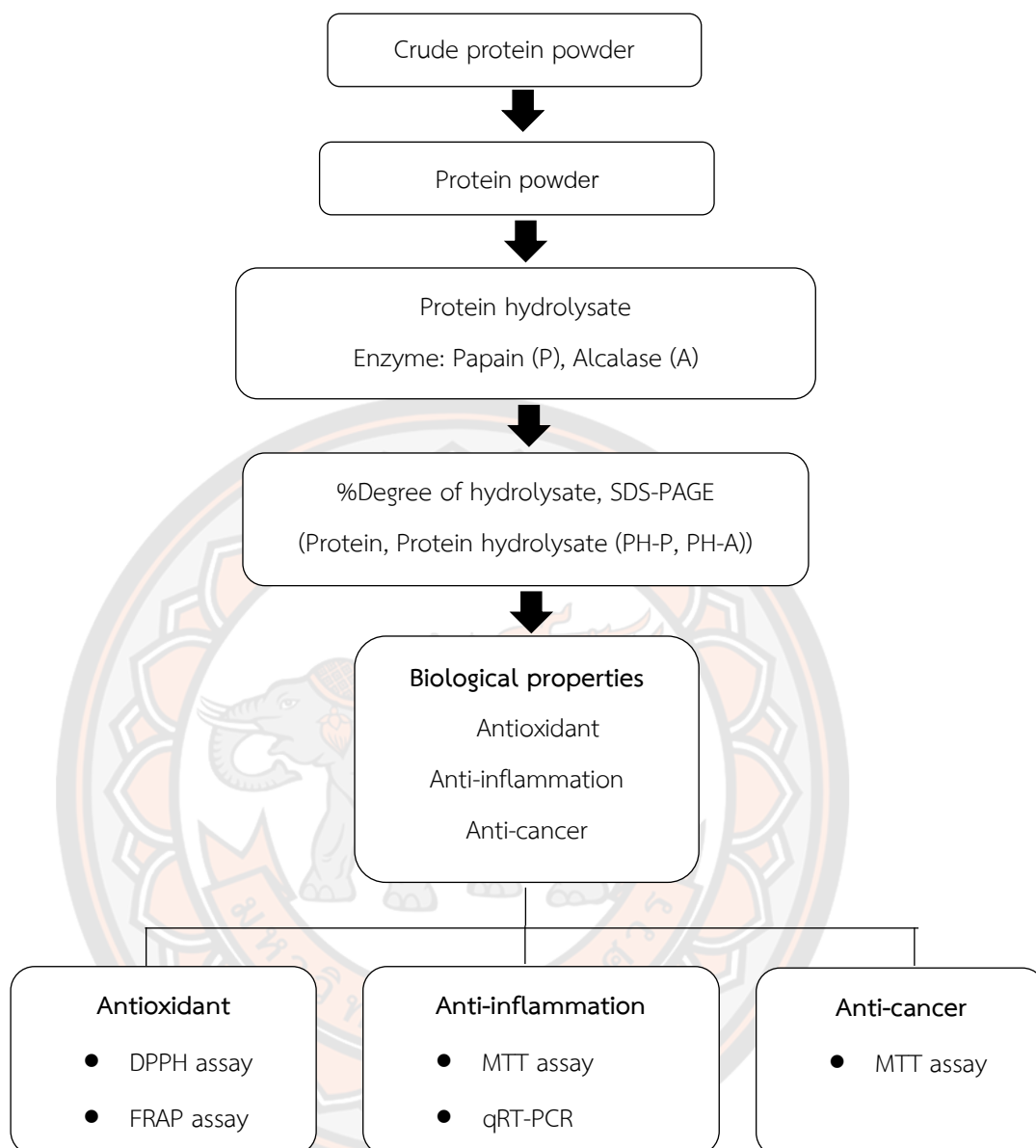
ถั่วดาวอินคา (*Plukenetia volubilis*) จัดเป็นพืชที่ให้น้ำมัน อยู่ในตระกูลของ Euphorbiaceae ซึ่งมีปริมาณน้ำมัน 33-54% และมีโปรตีน 24.2-27% เมล็ดของถั่วดาวอินคานั้น ประกอบด้วยกรดไขมันจำเป็นปริมาณมากได้แก่ โอเมกา 3, 6, 9 เป็นปริมาณ 82% ของปริมาณน้ำมันทั้งหมด (Chirinos et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นแหล่งของธาตุอาหารหลัก และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Nascimento et al., 2013) ดังนั้นเมล็ดถั่วดาวอินคาจึงถูกนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงการนำเมล็ดมาสกัดน้ำมัน ส่งผลให้มีเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมากขึ้น ซึ่งกากโปรตีนถั่วดาวอินคาที่สกัดน้ำมันโอเมกา 3, 6, 9 ออกแล้วนั้นจะมีปริมาณโปรตีนสูง และมีกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด (Rawdkuen et al., 2018) ดังนั้นเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับกากโปรตีนที่เหลือในโรงงานผลิตน้ำมันจากถั่วดาวอินคางานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของของผงโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคา

#### จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคา
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผงโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคา

#### ขอบเขตการวิจัย

เตรียมผงโปรตีนจากโปรตีนกากถั่วดาวอินคาที่จะใช้ในการศึกษา ได้แก่ กลุ่ม Protein (ทำการสกัดโปรตีน) และกลุ่ม Protein hydrolysate (ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยกระบวนการทางเอนไซม์) โดยใช้เอนไซม์ papain และ alcalase นำมาหาค่า %DH และตรวจสอบด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE ซึ่งงานวิจัยนี้จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสท ได้แก่ 1) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay 2) ศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยดูความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ ด้วยเทคนิค MTT assay และดูการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Pro-Inflammatory cytokine ด้วยเทคนิค qRT-PCR และ 3) ศึกษาฤทธิ์ของผงโปรตีนต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ด้วยเทคนิค MTT assay แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Flow chart แสดงภาพรวมงานวิจัย

### นิยามศัพท์เฉพาะ

ถั่วดาวอินคา (Sacha inchi), โปรตีนไฮโดรไลเสท (Protein hydrolysates), ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) , ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation), ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer)

### สมมติฐานของการวิจัย

ถ้าดาวอินคาจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และยับยั้งเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ โดยคาดว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจะมีฤทธิ์ดีกว่าผงโปรตีน



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ถั่วดาวอินคา

ถั่วดาวอินคา มีชื่อสามัญคือ Sacha inchi, Inca peanut, Wild peanut, Sacha peanut และมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Plukenetia volubilis* Linneo จัดเป็นพืชที่ให้น้ำมัน อยู่ในตระกูลของ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับยางพารา สบู่ดำ หรือมันสำปะหลัง ถั่วดาวอินคาเป็นพืชพื้นเมืองในเขตร้อน (Tropical Weather Conditions) แถบ Andean ของอเมริกาใต้ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในป่าเมซอนของชาวเปรู ถูกนำมาเพาะปลูกกันในประเทศโคลัมเบีย และกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย จากการสำรวจพื้นที่เพาะปลูกถั่วดาวอินคาในประเทศไทยปี 2559 พบว่า มีพื้นที่เพาะปลูกจำนวน 15 จังหวัด โดยพิจญ์โลกมีพื้นที่เพาะปลูกมากที่สุดที่ 178 ไร่ และมีผลผลิตรวมที่ 365 ตัน (กรมวิชาการเกษตร, 2560)

ดาวอินคาเป็นพืชที่ผลมีรูปร่างคล้ายดาว ภายในผลดาวอินคาจะมีเมล็ดคล้ายถั่ว จึงนิยมเรียกว่า ถั่วดาวอินคา ดาวอินคาเป็นไม้เลื้อยที่มีลำต้นสูงกว่า 2 เมตร กิ่งและยอดแผ่เลื้อยพันไปตามกิ่งไม้หรือโครงสร้างเลื้อยพันอื่น ๆ ดาวอินคาเป็นพืชที่มีอายุยืนโดยเฉลี่ยต้นดาวอินคาจะมีอายุได้นาน 10-50 ปี ใบดาวอินคาเป็นใบเดี่ยว ยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตรและมีความกว้างประมาณ 8-10 เซนติเมตร ส่วนของก้านของใบจะยาวประมาณ 2-7 เซนติเมตร ปลายใบมีรูปรตรงเรียวยแหลม เรียงสลับกันเป็นรูปหัวใจ ส่วนขอบใบหยักเป็นรูปร่างคล้ายเลื้อย ดอกดาวอินคาเป็นดอกช่อลักษณะเดียวกับช่อกระจะ (raceme) ดอกดาวอินคามีการแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน ดอกเพศผู้จะมีขนาดเล็ก สีออกขาวเรียงเป็นกระจุกตลอดความยาวของช่อ ส่วนดอกเพศเมียจะมีประมาณ 2 ดอกอยู่ที่โคนช่อดอก ผลดาวอินคาจะมีรูปร่างคล้ายดาว ลักษณะผลเป็นแบบแคปซูลเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 เซนติเมตร ผลมี 4-7 แฉก น้ำหนัก 0.8-1.4 กรัม เมื่อยังโตไม่เต็มที่ ผลอ่อนดาวอินคาจะมีสีเขียวและสีจะค่อย ๆ เข้มขึ้นตามอายุ เมื่อผลแก่จะกลายเป็นสีน้ำตาลออกดำ มีเนื้อนุ่มสีดำหุ้มอยู่อีกชั้นซึ่งเป็นส่วนที่รับประทานไม่ได้ โดยปกติจะทิ้งให้ผลดาวอินคาแห้งคั่วก่อนเก็บเกี่ยว และเมื่อเก็บเกี่ยวแล้วจะต้องนำมาตากแดดอีก 1 วัน จึงจะนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เมล็ดดาวอินคาที่ยังดิบอยู่ไม่ควรนำมารับประทาน เพราะมีสารกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitor) แต่หากนำไปคั่วหรือทำให้สุกแล้วสามารถรับประทานได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2560)



ภาพที่ 2 ลำต้นและใบ (ซ้าย) ผลและเมล็ด (ขวา) ของต้นถั่วดาวอินคา

ที่มา: <https://puechkaset.com/wp-content/uploads/2016.jpg>

### องค์ประกอบในเมล็ดถั่วดาวอินคา

ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีแต่ละชนิดแตกต่างกันไปในส่วนต่าง ๆ โดยในเมล็ดถั่วดาวอินคาพบว่ามีลิพิด ซึ่งรวมถึงกรดไขมัน  $\omega$ -3, 6, 9 พบโปรตีนและมีกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น cysteine, tyrosine, threonine และ tryptophan นอกจากนี้ยังพบวิตามิน สารพอลิฟีนอล และแร่ธาตุ เป็นต้น ในเมล็ดถั่วดาวอินคาพบองค์ประกอบหลักคือสารประเภทลิพิด (lipid) ประมาณ 33-54% เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid และ monounsaturated fatty acids) 77.5-84.4% และ 8.4-13.2% ตามลำดับ (Chirinos et al., 2013)  $\alpha$ -Linolenic acid ( $\omega$ -3) มี 46.8-50.8% เป็นกรดไขมันจำเป็นที่พบในถั่วดาวอินคามากที่สุด ลำดับต่อมาคือ linoleic acid ( $\omega$ -6) มี 33.4-36.2% และ oleic acid ( $\omega$ -9) มี 8.7-9.6% (Guillén et al., 2003)

โปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบในเมล็ดถั่วดาวอินคามีปริมาณ 24.2-27% เมื่อสกัดไขมันออกจากเมล็ดแห้งพบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น (dry basis) 27-59.1% (Chirinos et al., 2016) ซึ่งปริมาณโปรตีนของเมล็ดถั่วดาวอินคา คือ 27% ซึ่งต่ำกว่าถั่วเหลืองเล็กน้อย (28%) แต่สูงกว่าเมล็ดทานตะวัน (24%) และถั่วลิสง (23%) กรดอะมิโนที่พบมากที่สุดคือ leucine มี 64% ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น รองลงมาคือ isoleucine, lysine, threonine และ valine คือ 55, 50, 43, 43, และ 40 mg/g ตามลำดับ กรดอะมิโน methionine และ cysteine ประมาณ 37 mg/100 g และพบกรดอะมิโน phenylalanine 9mg/g (Hamaker et al., 1992) ผงโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากเมล็ดถั่วดาวอินคาโดยใช้เฮกเซน (hexane-defatted) ทำให้ได้โปรตีน albumin ซึ่งละลายน้ำได้ ประมาณ 43.7% รองลงมาคือ glutelin 31.9%, globulin 27.3%, และ prolamin 3.0%

ซึ่งผงโปรตีนที่ละลายน้ำจะมีขนาดของ monomeric polypeptides ที่พบเท่ากับ 32–35 kDa และ ~60–62 kDa ค่า pi ของโปรตีน albumin มีค่าประมาณ 9.4 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อมนุษย์ (Sathe et al., 2002)

คาร์โบไฮเดรตที่พบในเมล็ดถั่วดาวอินคา มีประมาณ 13.4-30.9% ซึ่งเป็น dietary fiber ที่ไม่ละลายน้ำถึง 72.4% และมีส่วนที่ละลายได้เพียง 9% นอกจากนี้เมล็ดถั่วดาวอินคายังพบองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น Tocopherol, carotenoid, phytosterol, Polyphenol และแร่ธาตุต่าง ๆ ในเมล็ดถั่วดาวอินคาพบว่ามีสาร Tocopherol อยู่ในช่วง 78.6-137 mg/100 g พบปริมาณ carotenoid จากเมล็ดถั่วดาวอินคา 17 สายพันธุ์ ในช่วง 0.07–0.09 mg ของ  $\beta$ -carotene ต่อน้ำหนักเมล็ด 100 กรัม และพบ Sitosterol ในเมล็ดถั่วดาวอินคา มีปริมาณ 45.2–53.3 mg/100 g พบสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds), แคโรทีนอยด์ (carotenoids), hydrophilic และ lipophilic ที่มีฤทธิ์ต้านการออกซิเดชัน (antioxidant capacity) รวมมีค่าเทียบเท่ากับ Gallic acid 64.6-80 mg/100g ซึ่งมีปริมาณ Gallic acid สูงกว่าใน almonds และ macadamias (Chirinos et al., 2013) นอกจากนี้พบว่าแร่ธาตุในเมล็ดถั่วดาวอินคา มีธาตุ potassium มากที่สุด คือปริมาณ 5563.5 mg/kg รองลงมาคือ magnesium ปริมาณ 3210 mg/kg พบ calcium, iron, zinc, sodium และ copper ปริมาณ 2406, 103.5, 49.0, 15.4 และ 12.9 mg/kg ตามลำดับ (Gutiérrez et al., 2011)

### ฤทธิ์ทางชีวภาพของเมล็ดถั่วดาวอินคา

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในปี 2017 ของเมล็ดถั่วดาวอินคา โดยเทคนิค DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging จากการศึกษาพบว่าสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ ซึ่งมีค่า 241  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$  (Štěrbová et al., 2017) จากรายงานการศึกษาในปี 2005 พบว่าเมล็ดถั่วดาวอินคาดิบ เมล็ดที่ผ่านกระบวนการแปรรูป และน้ำมันที่ได้จากเมล็ดถั่วดาวอินคา จะมีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ได้แก่ phenolics,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , tocopherols และ carotenoids การศึกษาน้ำมันจากเมล็ดถั่วดาวอินคาพบว่าสามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีเมื่อนำถั่วดาวอินคาไปผ่านกระบวนการคั่วโดยให้ความร้อน ซึ่งจะทำให้ได้สาร tocopherols เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Cisneros et al., 2014) กรดไขมันจำเป็นที่พบในเมล็ดถั่วดาวอินคานั้นตัวกลางในการสังเคราะห์สารสำคัญในร่างกายมนุษย์ เช่น prostaglandin E1 และอนุพันธ์ (Fanali et al., 2011) ป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ ต้านการอักเสบของข้อ ต้านมะเร็งและป้องกันไวรัส (Maurer et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคูสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกเมล็ดถั่วดาวอินคา โดยใช้เทคนิค ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic

acid)) radical scavenging เทคนิค FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power), และ เทคนิค ORAC antioxidant assays พบว่าสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.1–93.9  $\mu\text{mol/TE g}$ , 45.0–114.0  $\mu\text{mol mol/TE g}$  และ 92.5–192.6  $\mu\text{mol mol/TE g}$  ตามลำดับ (Chirinos et al., 2016) การศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย โดยการใช้ น้ำมันที่สกัดจากเมล็ดถั่วดาวอินคา พบว่าสามารถป้องกันการ attachment ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่บริเวณผิวหนังของมนุษย์ได้ (Gonzalez et al., 2015) ซึ่ง *S. aureus* เป็นเชื้อที่สำคัญต่อการเกิดโรคที่ผิวหนังและก่อโรคในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านภาวะไขมันในเลือดผิดปกติในสัตว์ทดลอง โดยให้น้ำมันจากเมล็ดถั่วดาวอินคาเป็นเวลา 60 วัน จากผลการศึกษาพบว่าสามารถลดระดับ cholesterol และ triglycerides ได้ และยังเพิ่มระดับ high-density lipoprotein (HDL) (Gorriti et al., 2010)

ในปี 2017 มีรายงานวิจัยในสัตว์ทดลองพบว่าน้ำมันจากเมล็ดมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยใช้น้ำมันถั่วดาวอินคา 1 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 4 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถลดขนาดของเนื้องอกในหนู และลดการแสดงออกของ COX-2 ในเนื้อเยื่อได้ (Wang et al., 2018) และการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดจากใบถั่วดาวอินคา สามารถกระตุ้น apoptosis (early และ late) ของเซลล์มะเร็งได้ โดยสารสกัดจากใบถั่วดาวอินคาสามารถยับยั้งเซลล์ HeLa (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) และเซลล์ A549 (เซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อปอด) โดยการสกัดจากใบด้วยเมทานอลให้ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดี ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบในใบถั่วดาวอินคาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการต้านเซลล์มะเร็งบางชนิด ได้แก่ Terpenoids, saponins และ phenolics เป็นต้น (Nascimento et al., 2013)

การศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ (Clinical trial) โดยอาสาสมัคร 30 คนรับประทานน้ำมันจากเมล็ดถั่วดาวอินคา และน้ำจากเมล็ดทานตะวัน 10-15 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 เดือน จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่รับประทานน้ำมันจากเมล็ดถั่วดาวอินคา และน้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน มีระดับคอเลสเตอรอลรวม และคอเลสเตอรอลชนิด LDL ลดลง และกลุ่มที่รับประทานน้ำมันจากเมล็ดถั่วดาวอินคา มีระดับคอเลสเตอรอลชนิด HDL ในเลือดเพิ่มขึ้น มากกว่ากลุ่มที่รับประทานน้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน นอกจากนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าทางชีวเคมีในเลือดที่ใช้ตรวจสอบความผิดปกติของการทำงานของตับและไต (hepatic and kidney function) โดยผลข้างเคียงที่พบมากที่สุดในช่วงสัปดาห์แรกคือ อาการคลื่นไส้อาเจียน (Srichamnong et al., 2018)

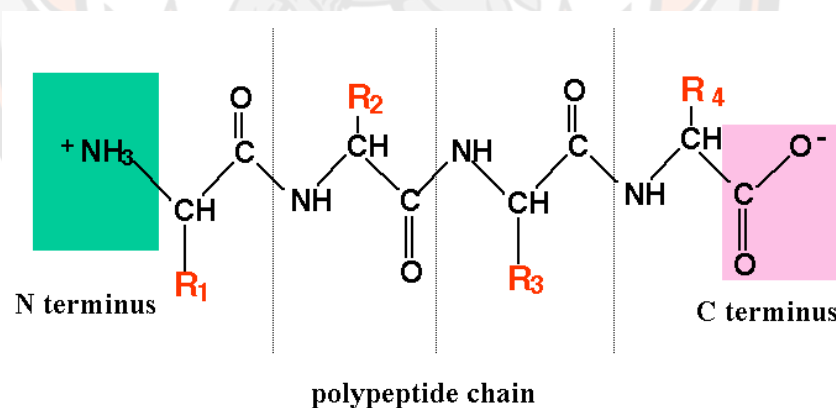
เมล็ดถั่วดาวอินคาสด และใบถั่วดาวอินคาสด มีสารพิษที่เรียกว่า phytotoxins เช่น alkaloids, saponins และ lectins การบริโภคเมล็ดถั่วดาวอินคาสด และใบถั่วดาวอินคาสดในปริมาณสูงและติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ควรหาวิธีลดความเสี่ยงของอันตรายจากสารพิษนั้น การอบเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการลดสารพิษของ phytotoxins ได้ ดังนั้นจึงควรนำเมล็ดถั่วดาวอินคา



สด และใบถั่วดาวอินคาสดมาผ่านกระบวนการให้ความร้อนก่อนนำไปบริโภคจึงจะปลอดภัย (ศิริรักษา, 2562)

### เปปไทด์ชีวภาพ

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีหน้าที่หลากหลายมากที่สุด นอกเหนือจากการเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต โปรตีนหลายชนิดทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ เป็นตัวขนส่งสาร ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงเป็นฮอร์โมนและเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ส่วนสำคัญของโปรตีนคือลำดับของกรดอะมิโน ซึ่งเรียกว่า เปปไทด์ (peptide) การที่โปรตีนทำหน้าที่ได้หลากหลายนั้นมาจากความแตกต่างของสายเปปไทด์ ลำดับของกรดอะมิโน ความยาวของสาย และการแต่งเติมโมเลกุลหลังจากแปลรหัสจากลำดับเบสบนเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) มาเป็นสายเปปไทด์ ความแตกต่างนี้ทำให้สายเปปไทด์รวมเป็นโครงสร้างสองมิติ และโครงสร้างสามมิติ ส่งผลให้โครงสร้างนั้นมีความเหมาะสมกับโครงสร้างของโมเลกุลชนิดต่าง ๆ และทำงานได้อย่างเหมาะสม (Elliott et al., 1997) เปปไทด์ส่วนใหญ่มักมีกรดอะมิโนมากกว่า 100 หน่วยเรียงต่อกันเป็นสายพอลิเปปไทด์ ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเปปไทด์ จะมีปลายด้านที่มีหมู่อะมิโนอิสระ (-NH<sub>2</sub>) เรียกว่าปลายเอ็น (N-terminal) ส่วนปลายที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (-COOH) จะเรียกว่าปลายซี (C-terminal) การเรียกชื่อเปปไทด์จะเรียกตามลำดับกรดอะมิโนจากปลายเอ็นไปหาปลายซี ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเปปไทด์

ที่มา: Chong & Leong, 2012

เปปไทด์ชีวภาพ (bioactive peptide) เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นสายพอลิเปปไทด์ของกรดอะมิโนสายยาวให้กลายเป็นกรดอะมิโนสายสั้นๆ มีคุณสมบัติในการช่วยส่งเสริมสุขภาพและป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ ในมนุษย์ ในปัจจุบันได้มีการผลิตเปปไทด์ชีวภาพเพื่อจำหน่ายในทางการค้าเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่นิยมจำหน่ายในแง่ของอาหารเสริมสุขภาพ ยกตัวอย่างเช่น เปปไทด์คอลลา

เจนที่มีส่วนช่วยด้านผิวพรรณ นอกจากนี้ยังมีเปปไทด์ที่ช่วยป้องกันโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและสมอง ระบบทางเดินอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน โรคหลอดเลือดและหัวใจ ลดความดันโลหิต ลดการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Udenigwe & Howard, 2013)

เปปไทด์ทางชีวภาพสามารถผลิตได้โดยการนำโปรตีนมาย่อยสลาย ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการผลิตเปปไทด์ทางชีวภาพอาจแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น วัตถุประสงค์ตั้งต้นหรือแหล่งที่มาของโปรตีนที่จะถูกย่อย แหล่งของโปรตีนส่วนใหญ่มักจะมาจากพืชหรือสัตว์ที่มีปริมาณโปรตีนสูง แหล่งโปรตีนจากพืชที่นิยมนำมาผลิตเปปไทด์ ได้แก่ ถั่วชนิดต่างๆ ข้าวโอ๊ต รำข้าว ข้าวโพด และสาหร่าย เป็นต้น ส่วนแหล่งโปรตีนจากสัตว์ ได้แก่ นม ไข่ เนื้อสัตว์ หอยนางรม ปลา กุ้ง ปู เป็นต้น รวมไปถึงโปรตีนที่สกัดได้จากอาหาร เช่น กลูเตน เวย์ แลคโตเฟอริน และเคซีน เป็นต้น นอกจากนี้ชนิดของโปรตีนแล้วยังมีชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน เช่น อัลคาเลส ปาเปน ฟลาโวไซม์ นิวเทรส โปรตาแมกซ์ และโบรมิเลน เป็นต้น และยังสามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น *Aspergillus oryzae* และ *Bacillus licheniformis* สำหรับสภาวะการย่อยอื่น ๆ ได้แก่ ระดับการย่อย อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส การเตรียมโปรตีนสำหรับการย่อย ซึ่งกระบวนการผลิตเปปไทด์มีความสำคัญต่อคุณสมบัติของเปปไทด์ชีวภาพ ส่งผลโดยตรงต่อลำดับ ชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์ชีวภาพ ขนาดของเปปไทด์ ความสามารถในการดูดซึม ประจรรวม และความสามารถในการละลายน้ำ เป็นต้น กระบวนการย่อยสลายโปรตีนทำให้คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพแตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามสมบัติทางยาของเปปไทด์จะขึ้นอยู่กับลำดับและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายเปปไทด์ (Udenigwe & Aluko, 2012)

### โปรตีนไฮโดรไลเสท

โปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate) ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ โอลิโกเปปไทด์ และกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากแหล่งต่าง ๆ เช่น เนื้อสัตว์ ปลา นม ไข่ และธัญพืชต่าง ๆ ด้วยกระบวนการทางเคมี การใช้จุลินทรีย์ และการใช้เอนไซม์โปรตีเอส ทำให้สายพอลิเปปไทด์ของโปรตีนถูกตัดเป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้นๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างคุณค่าทางโภชนาการ และสมบัติเชิงหน้าที่

โปรตีนไฮโดรไลเสทมีบทบาทสำคัญในการนำไปใช้ในด้านต่าง ๆ ทั้งการเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลาย การเกิดโฟม การเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติการเกิดเจล การนำไปเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส เพราะโปรตีนไฮโดรไลเสทมีผลต่อกลิ่นรส ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีและมีความเฉพาะตัว อีกทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสทยังมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพ ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคบางชนิด ได้แก่ โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ป้องกันการเกิดมะเร็ง เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ด้านการอักเสบ ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ควบคุมระดับคอเลสเตอรอล และลดโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ เป็นต้น (ทิพย์วาลี และ ศศิธร, 2562) ซึ่งการออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับลำดับ ขนาดและความยาวของกรดอะมิโน โดยโปรตีนไฮโดรไลสที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพนั้น ต้องประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 2–20 พันธะ (Chalamaiah et al., 2018) ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอาหารกันอย่างแพร่หลาย รวมไปถึงการศึกษาแหล่งโปรตีนที่จะนำมาใช้ วิธีการในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลส ตลอดจนสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เพื่อนำไปเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์สุขภาพอีกด้วย

### การผลิตโปรตีนไฮโดรไลส

#### การย่อยสลายโปรตีนโดยใช้สารเคมี

การทำให้พันธะเปปไทด์ของโปรตีนแตกออกโดยใช้สารละลายกรดหรือเบส ซึ่งเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำแต่ควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีนได้ยากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายกรดเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างต่ำสามารถย่อยสลายโปรตีนได้รวดเร็วและให้กลิ่นรสที่ดี แต่จะทำให้ ทริปโตเฟน และซิสเตอีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถูกทำลายไปจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโปรตีน อุณหภูมิ ระยะเวลา และความเข้มข้นของโปรตีนในการย่อย สารละลายที่นิยมในการย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ กรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริก โปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดทั้งสองชนิดนี้มีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลาง (Neutralization) เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดที่มีความเข้มข้นสูงรวมกับการใช้อุณหภูมิสูงก่อให้เกิดสาร 3-monochloro-propanediols (3-MCPD) ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อโรคมะเร็ง (ณัฐวุฒิ, 2550) การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายต่าง จะทำลายกรดอะมิโนบางชนิด เช่น อาร์จินีน ซีรีน ทรีโอนีน ซีสทีน และซิสเตอีน จึงมีการใช้อยู่ในวงจำกัด สารละลายต่างที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาของกรดอะมิโน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนจาก L-form ไปเป็น D-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี (Kristinsson & Rasco, 2000)

#### การย่อยสลายโปรตีนโดยใช้จุลินทรีย์

กระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ในการหมักระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อจะหลั่ง proteolytic enzymes ออกมาเพื่อย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์ ดังนั้นจึงสามารถสร้าง bioactive peptides ในระหว่างการหมักได้ ซึ่งวิธีการหมักโดยใช้จุลินทรีย์เป็นกระบวนการหนึ่งในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสในระดับอุตสาหกรรม ข้อดีของการใช้จุลินทรีย์คือโปรตีนจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรตีเอสของจุลินทรีย์ที่ผลิตออกมาและสามารถนำเปปไทด์ไปทำบริสุทธิ์ต่อได้โดยไม่ต้องผ่าน

กระบวนการย่อย อย่างไรก็ตามข้อเสียของกระบวนการใช้จุลินทรีย์คือให้ผลผลิตในปริมาณที่ต่ำ (Castellano et al., 2012)

### **การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์**

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก และทำให้ได้ปริมาณเปปไทด์สูงสุด เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น มีค่าความเป็นกรด-ด่าง มีความคงทนต่อความร้อน และมีความจำเพาะต่อตัวกระตุ้นและยับยั้ง จึงทำให้สามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์ได้ตามความเหมาะสม การย่อยสลายโปรตีนด้วยวิธีนี้จะมีผลดีกว่าการใช้กรดหรือด่าง เนื่องจากเอนไซม์จะทำปฏิกิริยาบริเวณพันธะเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแต่ละชนิดจับกันอยู่ โดยไม่ทำลายกรดอะมิโนและไม่พบเกลือปริมาณมากที่เกิดจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลางหลังจากการทำปฏิกิริยา แต่อาจมีข้อเสีย คือโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้อาจมีรสขม ซึ่งรสขมที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทนั้นเกิดจากกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น Isoleucine, Phenylalanine, Tryptophan, Tyrosine และ Valine กรดอะมิโนที่อยู่รวมกันเป็นเปปไทด์จะให้รสขมมากกว่ากรดอะมิโนอยู่อิสระ ความเข้มข้นของรสขมที่เกิดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์และชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ อย่างไรก็ตามรสขมที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทอาจแก้ปัญหาได้โดยการบ่งรสขมในผลิตภัณฑ์ เช่น การเติมน้ำตาลซูโครส หรือโดยการกำจัดรสขมที่เกิดขึ้น เช่น การใช้เอนไซม์โปรตีเอสชนิดอื่นร่วมกับเอนไซม์เอนโดเพพทิเดสในการย่อยสลายโปรตีน (Kristinsson & Rasco, 2000)

### **ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์**

#### **แหล่งโปรตีน**

แหล่งโปรตีนที่สำคัญได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ถั่วต่าง ๆ เนื้อสัตว์ เมล็ดทานตะวัน และเมล็ดต่าง ๆ ที่สกัดน้ำมันออก เป็นต้น ซึ่งแหล่งโปรตีนเหล่านี้มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง และมีกรดอะมิโนที่เป็นจำเป็นต่อร่างกาย สามารถนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทได้ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกชนิดของโปรตีน คือ ราคา องค์ประกอบทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพและการยอมรับของผู้บริโภค (Olsman, 1979) แหล่งของโปรตีนที่ต่างชนิดกันให้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้มีคุณสมบัติในการให้กลิ่นรสหรือเสริมกลิ่นรสของอาหารแตกต่างกันด้วย

#### **ปริมาณไขมันและคาร์โบไฮเดรต**

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์ ปริมาณไขมันในวัตถุดิบควรมีในปริมาณต่ำ เนื่องจากไขมันจะไปขัดขวางกระบวนการไฮโดรไลซ์ของโปรตีน โดยไขมันจะเกิด cross link กับโมเลกุลของโปรตีน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไขมันและโปรตีน (lipo-protein complex) ซึ่งโครงสร้างดังกล่าว เป็นตัวต้านการไฮโดรไลซ์โปรตีนของเอนไซม์ นอกจากนี้ไขมันยังเกิด

sponification และเกิดปฏิกิริยา oxidation ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นหืนได้ ส่วนคาร์โบไฮเดรตสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโปรตีน และทำให้เกิดปฏิกิริยา Maillard และ Strecker degradation ทำให้ได้สารระเหยที่มีกลิ่นในโปรตีนไฮโดรไลเสท (Manley & Fagerson, 1970) และถ้าปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากเกินไปจะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสทมีปริมาณต่ำ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสที่ไม่ดีและมีสีเข้ม (วันชัย, 2524)

#### เวลา

ระยะเวลาในการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น จะทำให้ได้ปริมาณของอะมิโนที่ถูกย่อยสลายเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากโปรตีนจะถูกย่อยสลายมากขึ้นทำให้ได้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์ ซึ่งเปปไทด์บางชนิดมีความคงตัวจึงไม่ถูกย่อยสลายต่อไป กรดอะมิโนและเปปไทด์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อการให้กลิ่นรส ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสทมีกลิ่นรสที่ดี ทั้งนี้ถ้าวัตถุดิบมีปริมาณของโปรตีนสูง ระยะเวลาที่ใช้ย่อยสลายควรนานขึ้น เนื่องจากระยะเวลาในการย่อยสลายนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบที่ใช้ย่อยสลาย (Manley & Fagerson, 1971)

#### อุณหภูมิ

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์ โดยเพิ่มอุณหภูมิให้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ให้กับระบบทำให้สารที่ถูกกระตุ้นมีพลังงานสูง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่การเพิ่มอุณหภูมินั้นมีข้อจำกัด เนื่องจากถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะส่งผลให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ ทำให้โครงสร้างเปลี่ยน และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในที่สุด

#### ปริมาณของเอนไซม์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เอนไซม์จับกับโมเลกุลของโปรตีนมากขึ้น ส่งผลให้ค่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้นจนกระทั่งปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เพียงพอกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่พบว่าค่าระดับการย่อยสลายจะคงที่ แม้ว่า会增加ปริมาณเอนไซม์มากขึ้นอีกก็ไม่ทำให้ค่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น

#### พีเอช (pH)

พีเอชมีผลต่อค่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสท เนื่องจากเอนไซม์จัดเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ดังนั้นเมื่อค่า pH สูงหรือต่ำเกินไป จะส่งผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลายและลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ได้ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานแตกต่างกัน

กระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์ในการตัดแปลงโปรตีนมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดให้ผลในการย่อยสลายที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดแปลงโปรตีนมีหลายประเภท ขึ้นกับการทำงานของ

เอนไซม์แต่ละชนิด (ปราณี, 2547) โปรติเอส เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส (Hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยจะตัดพันธะเปปไทด์ของพอลิเปปไทด์ได้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเปปไทด์ได้เป็น 2 แบบ คือ

1. เอกซ์โซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโนเรียกว่า Aminopeptidase ขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่า Carboxypeptidase

2. เอ็นโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เอ็นโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูงเนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมยังนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสลายโปรตีน โดยเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์และพืชบางชนิด ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ปาเปน

#### **เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase)**

เอนไซม์อัลคาเลส หรือ Subtilopeptidase A หรือ Subtilisin Carlsberg มีรหัส EC number คือ 3.4.21.14 จัดว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase ซึ่งจะย่อยสลายพันธะเปปไทด์เป็นหลัก ถ้าจัดกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการทำงานพบว่าอัลคาเลสจัดอยู่ในกลุ่ม Serine peptidase มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) อยู่ที่ Active site โดยเอนไซม์นี้เป็นประเภทเอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) เนื่องจากมีการย่อยภายในโมเลกุลของโปรตีน มีตำแหน่งการย่อยแบบสุ่ม โดยสารตั้งต้นจะเกิดพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ที่ Active site เอนไซม์อัลคาเลสผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ทำงานดีที่ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.5-8.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 50-70°C

#### **เอนไซม์ปาเปน (Papain)**

ปาเปนเป็นเอนไซม์ที่พบมากในยางมะละกอในส่วนของใบ ก้านและผลดิบ ได้จากการกรีดเอายางมะละกอออกมาเพื่อสกัดเอนไซม์ปาเปน สายพันธุ์มะละกอที่สามารถผลิตน้ำยางสดได้สูงสุดคือสายพันธุ์จำปาด้าและแขกด้า ปาเปนเป็นเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส (Protease) ที่มีรหัส EC number คือ EC 3.4.22.2 เป็น Proteolytic enzyme สามารถย่อยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้อาจเรียกว่าเป็น Vegetable pepsin ปาเปนจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่มีกิจกรรมหลากหลายรวมไปถึงอะมิ

โนเปปทีเดส ไดเปปทีเดส และเอนไซม์ปาเปนจัดอยู่ในประเภททั้งเอกซีโซเปปติเดส และเอนโดเปปติเดส

จากการศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเมล็ดถั่วดาวอินคา เพื่อเปรียบเทียบการตัดด้วยเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 54.2°C ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 5.6% อัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวอย่าง คือ 50:1 (v/w), pH 9.0, 40.4 นาที ซึ่งให้ผลผลิตโปรตีนประมาณ 44.7% ในทางตรงกันข้ามผลผลิตของโปรตีนจากการตัดที่อุณหภูมิ 54.2°C โดยตัดด้วยอัลคาไลน์ อัตราส่วนตัวทำละลายต่อตัวอย่าง คือ 42:1 (v/w), 1.65 M NaCl , pH 9.5, 30 นาที ซึ่งให้ผลผลิตโปรตีนปริมาณ 29.7% จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จะขึ้นอยู่กับวิธีการในการโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเมล็ดถั่วดาวอินคา (Chirinos et al., 2016) ดังนั้นเมล็ดถั่วดาวอินคา เป็นแหล่งสารอาหารประเภทโปรตีนที่สามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร และเป็นวัตถุดิบที่สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มได้ทั้งในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยา และอาหารได้อย่างดีเยี่ยม

#### การใช้ประโยชน์โปรตีนไฮโดรไลเสท

ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมบริโภคอาหารที่มีสารอาหารที่จำเป็น และส่งผลดีต่อสุขภาพมากขึ้น การใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเสทในแง่ของการใช้เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นส่วนประกอบอาหารสอดคล้องกับแนวคิดทางด้านอาหารเพื่อสุขภาพ (Functional food) เป็นนวัตกรรมอาหารที่กำลังมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนจะได้เปปไทด์หลายชนิดที่มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งส่งผลดีต่อสุขภาพและส่งผลต่อการควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคบางชนิดได้ เช่น ความดันโลหิตสูง ภาวะเครียด เบาหวาน มะเร็ง การอักเสบ และภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น (Bigliardi & Galati, 2013) อุตสาหกรรมอาหารจึงให้ความสนใจในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดี กล่าวคือสมบัติทางเคมีหรือทางกายภาพที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนและนำโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายหรือโปรตีนไฮโดรไลเสทมาเป็นส่วนประกอบในอาหารอย่างแพร่หลาย เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสทมีผลต่อคุณลักษณะของอาหาร ช่วยปรับปรุงคุณภาพ เนื้อสัมผัสของอาหาร และเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร (Kristinsson & Rasco, 2000)

ปัจจุบันมีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเมล็ดพืชมากขึ้น โดยเฉพาะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากวัสดุเศษเหลือที่ได้จากเมล็ดพืชน้ำมัน จึงทำให้มีงานวิจัยที่มุ่งศึกษาถึงผลและประโยชน์ในเชิงสุขภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสทมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น โปรตีนไฮโดรไลเสทช่วยลดความดัน (Yoshie-Stark & Wäsche, 2004) ผลของโปรตีนไฮโดรไลเสทต่อการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Hou et al., 2016) ผลของโปรตีนไฮโดรไลเสทต่อการต้านภาวะคลอเลสเทอรอลสูงและการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Siow et al., 2016) และผล

ของโปรตีนไฮโดรไลสเทในการเป็นสารต้านมะเร็ง (Hung et al., 2014) เป็นต้น โดยโปรตีนไฮโดรไลสเทนั้นเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่เหมาะสมจะนำมาเป็นองค์ประกอบในอาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์

ในปี 2018 มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสเทจากเมล็ดถั่วดาวอินคา พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสเทที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ papain และ calotropis proteases สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 27.46  $\mu\text{mol Trolox/g}$  และ 23.15  $\mu\text{mol Trolox/g}$  ตามลำดับ (Rawdkuen et al., 2018) เปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลสเทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ แต่ขึ้นอยู่กับขนาดและการเรียงตัวของกรดอะมิโนของเปปไทด์ (Chen et al., 1998) ซึ่งในปัจจุบันนี้ โปรตีนไฮโดรไลสเทจากสัตว์และพืชเป็นที่น่าสนใจมาก ตัวอย่างเช่น เปปไทด์ที่ได้มาจากการย่อยของโปรตีน ในสัตว์ เช่น ปลาคอด (cod) (Girgih et al., 2015) และไข่ไก่ (Chen et al., 2012) นอกจากนี้โปรตีนจากพืชก็เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีเช่นกัน เช่น เปปไทด์จากเมล็ดถั่ว (López-Barrios et al., 2014) และกลูเตนจากข้าวโพด (Zhuang et al., 2013)

### อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ มีทั้งที่อยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) อนุมูลอิสระจะไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดอนุมูลอิสระตลอดเวลาและเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ในสิ่งมีชีวิตที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน แหล่งผลิตอนุมูลอิสระเกิดได้จากหลายแหล่ง ยกตัวอย่างเช่น เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune system cells) เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวระหว่างที่เกิดกระบวนการอักเสบ ซึ่งจะผลิตอนุมูลอิสระออกมาในรูปของ ROS เป็นส่วนมากนอกจากนี้ยังผลิตได้จากกระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์ ภาวะความเครียด (stress) มลภาวะ (pollution) เช่น มลภาวะอากาศและทางน้ำ สารพิษต่าง ๆ ได้แก่ แร่ใยหิน (asbestos) เบนซีน (benzene) คาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) คลอรีน (chlorine) ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ยาสูบ (tobacco smoke) ยาฆ่าแมลง (pesticides) คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbon tetrachloride) รวมถึงแอลกอฮอล์ สารเติมแต่งอาหาร กาแฟ และอาหารปิ้งย่าง (Sarma et al., 2010)

สภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสภาวะขาดความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและการจัดการของระบบต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ส่งผลให้ปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายสูงเกินไป อนุมูลอิสระในภาวะเครียดออกซิเดชันก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายมากมาย สามารถทำปฏิกิริยากับสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) ในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ DNA ด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น hydrogen atom transfer reaction, addition, aromatic substitution, beta-scission และ coupling reactions เป็นต้น (Nogushi & Niki,



1999) รายงานการศึกษางานวิจัยพบว่าอนุมูลอิสระในสภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นสาเหตุหรือสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม (degenerative diseases) และการแก่ (aging) ของร่างกาย ตัวอย่างโรคเหล่านี้ ได้แก่ โรคหัวใจและหลอดเลือด (atherosclerosis) การหดตัวของหลอดเลือด (vasospasm) มะเร็ง การเกิดบาดแผล (trauma) โรคหลอดเลือดสมองตีบตัน (stroke) หอบหืด (asthma) ภาวะเป็นพิษเนื่องจากมีออกซิเจนมากเกินไป (hyperoxia) โรคไขข้ออักเสบ (arthritis) โรคหัวใจ (heart attack) ผิวน้ำอักเสบ (dermatitis) และการบาดเจ็บของตับ (liver injury) การชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis รวมทั้งโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเมตาบอลิซึม (metabolic disorder) เช่น โรคเบาหวาน โรคกล้ามเนื้อสลาย เป็นต้น (Rahman et al., 2012)

สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน ซึ่งมีทั้งเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น กำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร่างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น (เจนจิรา และ ประสงค์, 2554) แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propyl gallate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ tertiary butylhydroquinone (TBHQ) สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorny et al., 2001) ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ซึ่งเป็นที่ที่ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งมีหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน  $O_2^-$  เป็น  $H_2O_2$  ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ vitamin C, vitamin E,

glutathione, carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์

ปัจจุบันมีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเมล็ดพืชมากขึ้น โดยเฉพาะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากวัสดุเศษเหลือที่ได้จากเมล็ดพืชน้ำมันจึงทำให้มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงผลและประโยชน์ในเชิงสุขภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซต มีรายงานถึงการให้โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมนำมาเป็นองค์ประกอบในอาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติในด้านการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งได้รับความสนใจเนื่องจากสามารถนำมาทดแทนสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบสังเคราะห์ เช่น BHA, BHT และ TBHQ ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ได้ (Mut-Salud et al., 2016)

การทดสอบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจมูกข้าวสาลีที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจมูกข้าวสาลีที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1500 Da มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Auto-oxidation) ของไขมันได้ใกล้เคียงกับ  $\alpha$ -tocopherol และเมื่อใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้น 1.5 mg/ml มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีเทียบเท่า BHT ความเข้มข้นเท่ากัน (Zhu et al., 2006) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนจากข้าวบาร์เลย์ และโปรตีนรำข้าว พบว่าโปรตีนข้าวบาร์เลย์และโปรตีนรำข้าวที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมทรูปซินมีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลเซต นอกจากนี้จากการแยกชนิดโปรตีนรำข้าวทั้งหมด 4 ชนิด คือ Albumin, Globulin, Prolamin และ Glutelin พบว่าโปรตีนชนิด Globulin มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบจำลองกรดลิโพลิกได้ดีที่สุด และจากการทดสอบความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริก ( $Fe^{3+}$ ) ของโปรตีนข้าวบาร์เลย์และโปรตีนรำข้าว พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปปซินมีความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริก ( $Fe^{3+}$ ) ให้เปลี่ยนเป็นเฟอร์รัส ( $Fe^{2+}$ ) ได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (Chanput et al., 2009)

### กระบวนการอักเสบ

การอักเสบ (Inflammatory) เป็นกระบวนการหรือปฏิกิริยาการตอบสนองเมื่อมีตัวกระตุ้น (stimulus) ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพได้ โดยที่ตัวกระตุ้นอาจมาจากสิ่งแวดล้อม (environmental factors) หรือภายในร่างกาย (endogenous factors) ตัวอย่างของตัวกระตุ้น ได้แก่ การติดเชื้อ (infection) และการบาดเจ็บ (injury) ของเนื้อเยื่อ เป็นต้น ในกระบวนการอักเสบนั้น พบว่าระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุล (homeostasis) ของร่างกาย โดยตัวกระตุ้นต่าง ๆ จะส่งสัญญาณอันตราย (danger signal) ต่อระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อให้เกิดการ

ตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบต่อไป (Mogensen, 2009) เมื่อร่างกายถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบพบว่า neutrophils จะเป็นเซลล์กลุ่มแรกที่จะถูกกระตุ้นให้ไปรวมตัวกันที่บริเวณที่มีการอักเสบเพื่อกำจัดสารหรือสิ่งแปลกปลอมที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น เชื้อโรค โดย neutrophils จะกำจัดด้วยการกลืนกิน (phagocytosis) เขาไปในเซลล์แล้วทำลายด้วย lysosomal enzyme และ superoxide radicals ที่ถูกปล่อยเขาไปใน phagosome นอกจากนี้ neutrophils ยังถูกกระตุ้นให้สร้างและหลั่ง inflammatory mediators ออกมา นอกจากนี้จะทำลายสิ่งแปลกปลอมแล้วยังทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อที่อยู่รอบ ๆ บริเวณที่มีการอักเสบ ซึ่งทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง ร้อนและอาการอักเสบนั้นเกิดอย่างเรื้อรังจะส่งผลให้หวัวยวะที่เกิดการอักเสบเสบสูญเสียนาที่ใต้ หรืออาจเหนียวน้ำให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมาได้ (พิศมัย, 2547)

การอักเสบมีความสัมพันธ์กับกระบวนการซ่อมแซมของร่างกาย ซึ่งการอักเสบเป็นตัวทำลายขณะเดียวกันก็ซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับอันตราย โดยการสร้างเนื้อเยื่อชนิดเดิม (regeneration) หรือแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแล้วเกิดแผลเป็นขึ้น (repair) หรือเกิดร่วมกันทั้งสองอย่าง การซ่อมแซมเกิดขึ้นตั้งแต่ระยะแรกของการอักเสบ และเสร็จสมบูรณ์เมื่อสาเหตุของการอักเสบหมดไปแล้วเท่านั้น (วิญญู, 2540) โดยทั่วไปการอักเสบแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) โดยการอักเสบแบบเฉียบพลันจะเกิดขึ้นภายในระยะเวลาสั้นๆ หลังจากที่มีการบาดเจ็บระยะเวลาไม่เกิน 7 วัน ซึ่งจะมีการบวมของเนื้อเยื่อ (edema) และเกิดการหลั่งสารน้ำและโปรตีนภายในเนื้อเยื่อนั้น (exudate) ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรังนั้นจะเกิดขึ้นนานกว่าและอาจเกิดขึ้นภายหลังจากมีการอักเสบแบบเฉียบพลันแล้วโดยจะมีลักษณะเด่นคือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น (fibrosis) และในขณะที่มีการอักเสบจะมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด จึงเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านหลอดเลือด เป็นผลให้สารน้ำและเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากหลอดเลือดมายังบริเวณที่มีการอักเสบ เป็นผลให้เกิดการบวม แดง ร้อนของบริเวณที่มีการอักเสบ เม็ดเลือดขาวที่ออกมาออกหลอดเลือด เช่น นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจจะถูกกระตุ้นโดยสิ่งแปลกปลอม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลังสารสื่อกลางในการอักเสบ (Pro-inflammatory mediators) ชนิดต่าง ๆ เช่น แบรดดีไคนิน (bradykinin), ฮีสตามีน (histamine), ไนตริกออกไซด์ และ พรอสตาแกลนดิน เป็นต้น รวมทั้ง pro-inflammatory cytokines เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) และ interleukin-6 (IL-6) ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ (Kumar et al., 2015) ซึ่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines เหล่านี้ที่ถูกหลั่งมากเกินไป หลังต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานต่อเนื่องหรือเกิดขึ้นซ้ำ ๆ แบบเรื้อรังก็จะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดพยาธิสภาพ ส่งผลให้มีความเสี่ยง

ต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง หรือกลุ่มโรคเรื้อรัง โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

## Cytokine

Cytokine เป็นโปรตีนที่เป็นสารเคมีสำคัญในขบวนการอักเสบและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (inflammation and immunity) สร้างโดยเซลล์หลายชนิดเพื่อส่งสัญญาณให้เซลล์อื่น ๆ หรือระบบต่าง ๆ ของร่างกายตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือการบาดเจ็บทั้งแบบเฉพาะที่และแบบทั่วร่างกาย การค้นพบ cytokine เริ่มจากการศึกษาถึง pathogenesis ของการเกิดไข้ จากนั้นเริ่มมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไข้กับการติดเชื้อและการอักเสบ cytokine มีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบซึ่งตอบสนองต่อการบาดเจ็บ โดยเฉพาะที่จะคงการเกิดการอักเสบที่ตอบสนองต่อการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางระบบหลายอย่างกับร่างกายผู้ป่วย (systemic change) cytokine สำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่อการบาดเจ็บของร่างกาย ได้แก่ IL-1 $\beta$ , IL-6 และ TNF- $\alpha$

### IL-1 (Interleukin-1)

IL-1 $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  เป็น cytokine ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่ต่อต้านการติดเชื้อ (infection) สร้างโดยเซลล์ macrophage, monocyte, fibroblasts และ dendritic cells เป็นส่วนสำคัญของการตอบสนองในกระบวนการอักเสบของร่างกายต่อการติดเชื้อ IL-1 ในร่างกายที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กันอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ IL-1 $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  ซึ่งจัดเป็นสารก่อการอักเสบ (proinflammatory cytokine) และสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับ IL-1 (endogenous IL-1 receptor antagonist; IL-1Ra) โครงสร้างของ IL-1 $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  พบว่าใกล้เคียงกัน จัดเป็นตัว agonist ที่จับกับตัวรับแล้วก่อให้เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยออกฤทธิ์ผ่านตัวรับบนผิวเซลล์ชนิดเดียวกัน (IL-1 receptor; IL-1R) จึงก่อให้เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนกัน มีบทบาทสำคัญในการต้านการติดเชื้อของร่างกาย ส่วน IL-1Ra เป็นสารออกฤทธิ์ต้านตัวรับ IL-1 ที่ร่างกายสร้างขึ้น มีลักษณะโครงสร้างที่สัมพันธ์กับ IL-1 แต่เมื่อจับกับ IL-1R แล้วไม่ก่อให้เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ส่งผลให้จำนวน IL-1R ที่พร้อมให้ IL-1 เขาจับมีจำนวนลดลง IL-1 $\beta$  ที่สร้างที่เนื้อเยื่อจะทำให้เกิดการปวด เมื่อเกิดการตอบสนองเฉียบพลันขึ้น จะมีการหลั่ง IL-1 เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับดับในการสร้างสารหลายชนิด ซึ่งรวมเรียกว่า acute phase reactant (Dinarello, 2011)

### Interleukin-6 (IL-6)

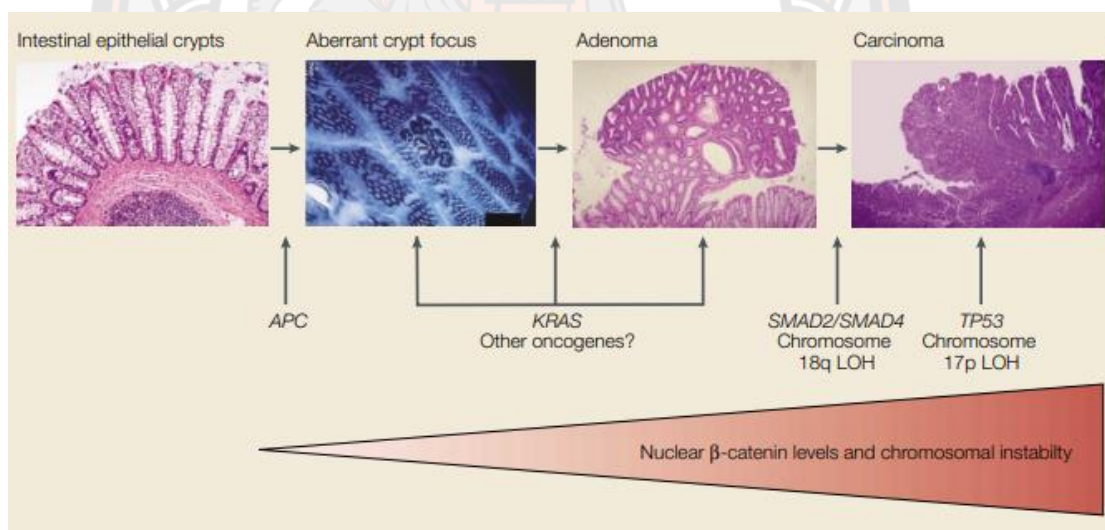
IL-6 เป็น cytokine ชนิดหนึ่งที่ได้จากเซลล์หลายชนิดเช่น เซลล์ macrophages, fibroblasts, endothelial cells และ activated T-helper cells โดย IL-6 จัดเป็น multifunctional cytokine เนื่องจากมีหน้าที่ควบคุมการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน acute phase reactions และกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือด IL-6 มีบทบาทต่อการสร้าง immunoglobulin (Ig) ของ B-cell โดย IL-6 จะเหนี่ยวนำให้ B-cell ที่ถูกกระตุ้นมีการสร้าง Ig ชนิด IgM, IgG และ IgA นอกจากนี้ IL-6 ยังสามารถทำให้มีการแสดงออกของตัวรับ (receptor) ของ IL-6 บน T-cell ได้ (Le et al., 1988) อีกทั้ง IL-6 ยังสามารถทำงานส่งเสริมกันกับ IL-3 ในการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดให้มีการแบ่งตัวในหลอดทดลอง (Ikebuchi et al., 1987) อีกทั้งยังพบว่าทำหน้าที่เป็น growth factor ของเซลล์มะเร็งชนิด plasma cell ในหนู (murine plasmacytoma cells) และเซลล์มะเร็งในคน (myeloma cell) (Arden, 1985)

### มะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก

การเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) และทวารหนักนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ในปัจจุบันนี้มีหลักฐานและข้อมูลทางการแพทย์ที่ชี้บ่งว่ามะเร็งลำไส้ใหญ่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยที่อาจเป็นมาตั้งแต่กำเนิด (Genetic/Familial) หรือเกิดจากสิ่งแวดล้อม (Environmental Factors) รวมทั้งจากโรคบางอย่างของลำไส้ใหญ่ ได้แก่ Inflammatory Bowel Diseases (Rider et al., 1977) มะเร็งลำไส้ใหญ่จะเกิดขึ้นที่ผิวเยื่อผนังลำไส้ใหญ่ก่อน โดยมักจะมีการเปลี่ยนแปลงมาจากรอยโรคก่อนมะเร็ง (Premalignant Lesion) ที่เรียกว่า Polyp แล้วจึงเปลี่ยนเป็นก้อนมะเร็งในที่สุด การแพร่กระจายของมะเร็งลำไส้ใหญ่ไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนักเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก มีผู้เสียชีวิตประมาณ 1.8 ล้านคน ซึ่งมากที่สุดเป็นอันดับสองของโลกในปี 2018 (Bray et al., 2018) และมีผู้ป่วยรายใหม่เกิดขึ้นเกือบ 2 ล้านคน อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาที่ใช้วิถีชีวิตแบบตะวันตก และในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักสูงถึง 14.3 ต่อแสนประชากร อัตราป่วยตาย 7.9 ต่อแสนประชากร (Rawla et al., 2019) สำหรับประเทศไทยปีพ.ศ. 2561 พบผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมากที่สุดเป็นอันดับ 3 โดยช่วงอายุที่พบมากที่สุดคือ 55 ปีขึ้นไปและมีอัตราป่วยเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่อายุ 40 ปีขึ้นไป เนื่องจากพฤติกรรมการดำเนินชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไป ความเร่งรีบ ความเครียด การรับประทานอาหารประเภทไขมันและเนื้อสัตว์ที่เพิ่มสูงขึ้น และการไม่ออกกำลังกายล้วนแต่เป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดโรคได้เพิ่มมากขึ้น (Athaphinan & Lueboonthavatchai, 2017)

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่จะกลายเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้นั้น ส่วนใหญ่ต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงถึง 4 ขั้นตอนและมียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีน เริ่มจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน *APC* ที่อยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 5 (5q21) ซึ่งยีน *APC* เป็น tumor suppressor gene มีบทบาทสำคัญในการควบคุมระดับของโปรตีน  $\beta$ -Catenin ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการยึดติดกันของเซลล์ การเคลื่อนย้ายของเซลล์ หากระดับของโปรตีนชนิดนี้สูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการคัดลอก (transcription) ดีเอ็นเอสูงผิดปกติไปด้วย ทำให้เกิดการสร้างเซลล์ใหม่จำนวนมาก เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่แบ่งเซลล์มากกว่าปกติเกิดเป็นก้อนเนื้ออ่อน (benign adenoma) ตามด้วยการกลายพันธุ์ของยีน *k-ras* ซึ่งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 12 (12p) และ ยีน *DCC* ซึ่งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 18 (18q) ก้อนเนื้ออ่อนจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้องอกที่มีผิวยื่นขรุขระของ villi ซึ่งเป็นลักษณะที่ร้ายแรงขึ้นมาอีก (mild, moderate และ severe dysplasia) ร่วมกับการสูญเสียการทำงานของยีน *p53* บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 17 ซึ่งเป็นยีนควบคุมการเปลี่ยนสถานะ G1/S transition ของวัฏจักร เซลล์ก้อนเนื้ออ่อนนั้นจึงกลายเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ การดำเนินโรคนี้นี้จาก adenoma to carcinoma sequence ใช้เวลา 5-10 ปี



ภาพที่ 4 Histopathology of colorectal cancer

ที่มา: [http://www.nature.com/nrc/journal/v1/n1/box/nrc1001-055a\\_BX1.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v1/n1/box/nrc1001-055a_BX1.html)

### การวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

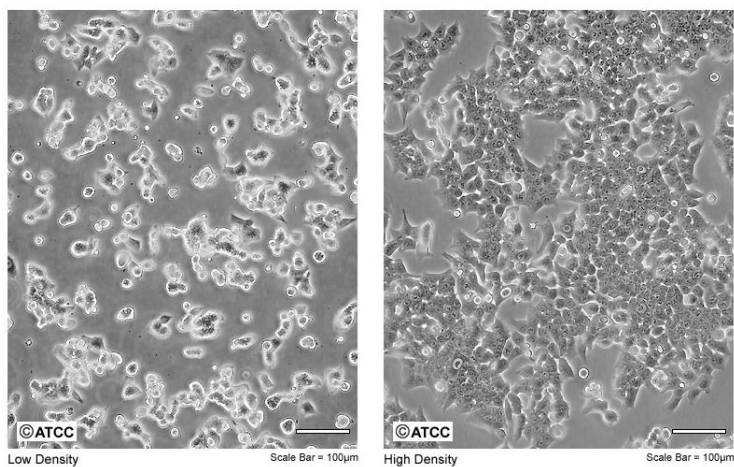
การวินิจฉัยโรคพบว่าร้อยละ 92 ต้องอาศัยการตัดชิ้นเนื้อจากปฐมภูมิมาตรวจ และมากกว่าร้อยละ 60 ของผู้ป่วยที่มาพบแพทย์เพื่อทำการรักษาพบว่าอยู่ในระยะที่ 3 และ 4 ของโรคเป็นมะเร็ง ในระยะลุกลาม และระยะแพร่กระจาย ซึ่งร้อยละ 20-25 มีการแพร่กระจายตั้งแต่เริ่มวินิจฉัยพบโรค

และร้อยละ 50 พัฒนาในช่วงของการได้รับการรักษา (Vera et al., 2020) การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในทุกระยะส่วนใหญ่เป็นการผ่าตัด แต่หากมีการลุกลามหรือแพร่กระจายของโรค หรือมีการลุกลามหรือแพร่กระจายไปในอวัยวะที่ผ่าตัดได้ การรักษาจะเป็นผ่าตัดตามด้วยการให้ยาเคมีบำบัดหรือผ่าตัดตามด้วยการใช้รังสีรักษา หรือให้ยาเคมีบำบัดหลังการผ่าตัด ทั้งนี้ขึ้นกับตำแหน่งและระยะของโรค (National Cancer Institute, 2015) การรักษาและการแพร่กระจายของโรคสามารถทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนได้หลายอย่างขึ้นกับหลาย ๆ ปัจจัยไม่ว่าจะเป็นชนิดของเซลล์มะเร็งระยะของโรค วิธีการรักษาการตอบสนองของร่างกายต่อการรักษา และปัจจัยอื่น ๆ เช่น ภาวะเลือดออก อาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องอืด เหนื่อยล้า เบื่ออาหาร จากการใช้ยาเคมีบำบัด หรือการได้รับรังสีรักษา เป็นต้น จากการศึกษายาเคมีบำบัดสามารถกระจายไปได้ทุกส่วนของร่างกาย โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยานั้นจะสามารถออกฤทธิ์เฉพาะเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเท่านั้น ไม่ออกฤทธิ์กับเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก (เซลล์ปกติในร่างกายมนุษย์) และยาบางตัวจะออกฤทธิ์เฉพาะบางระยะของการแบ่งตัวเท่านั้น เช่น ระยะ M หรือ S ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดกระบวนการตายของเซลล์ (Cell Death) (รังสีรักษาและมะเร็งวิทยา, 2551)

### **เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116**

Human colon cancer cells (HCT116) เป็นเซลล์มะเร็งที่ได้จากผู้ป่วยด้วยมะเร็งของระบบลำไส้ใหญ่ (Colorectal carcinoma) จากผู้ป่วยเพศชาย ซึ่งเซลล์ HCT116 เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิดที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน Ras proto-oncogene นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของเคราติน เมื่อทำการทดสอบโดยการย้อม immunohistochemistry และมีการแสดงออกของยีน transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) และ beta 2 (TGF beta 2) โดยเป็นเซลล์ที่มีลักษณะเกาะติดกับพื้นผิว (Adhere) (ภาพที่ 5)

ATCC Number: **CCL-247**  
Designation: **HCT 116**



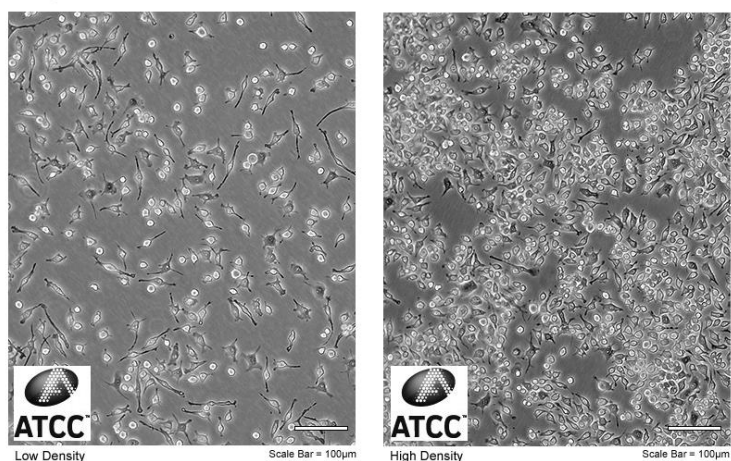
ภาพที่ 5 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่สายพันธุ์ HCT116

ที่มา: <http://www.atcc.org/~media/Attachments/6/C/D/4/1762.ashx>

#### เซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7

เซลล์เพาะเลี้ยง RAW264.7 เป็นเซลล์แมคโครฟาจที่ได้จากสร้างขึ้นของมะเร็งที่เกิดจาก Abelson murine leukemia virus ในหนูทดลองตัวผู้ (mouse) สายพันธุ์ BALB/c มีการแสดงออกของ lysozyme และ H-2d เป็นเซลล์ที่มีลักษณะเป็น Monolayer และเกาะติดกับพื้นผิว (adherent) (ภาพที่ 6)

ATCC Number: **TIB-71**™  
Designation: **RAW 264.7**



ภาพที่ 6 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่สายพันธุ์ HCT116

ที่มา: <http://www.atcc.org/~media/Attachments/6/C/D/4/1762.ashx>



### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### ประชากร และกลุ่มตัวอย่าง

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle Medium) ที่เติม 10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic-antimycotic (100 units/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 0.25 µg/mL of amphotericin B) ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO<sub>2</sub>

เซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7) เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle Medium) ที่เติม 10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic-antimycotic (100 units/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 0.25 µg/mL of amphotericin B) ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO<sub>2</sub>

##### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	บริษัทที่ผลิต
Autoclave	TOMY, Japan
Biosafety cabinet	FASTER, Italy
Centrifuge	HERAEUS, Germany
CO2 incubator	SANYO, Japan
Deep freezer, -20°C	SANYO, Japan
Deep freezer, -80°C	Thermo Scientific, USA
Light inverted microscope	OLYMPUS, Japan
pH meter	METTLER TOLEDO
Refrigerated centrifuge	Hettich, Germany
Water bath	Julab, Germany
Microplate reader	Labsystems, Finland
Nanodrop	Thermo Scientific, USA
Power supply	GE Healthcare, Sweden
Thermocycler	Bio-Rad, USA
Electrophoresis power supply	GE Healthcare, Sweden

### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

เครื่องมือ	บริษัทที่ผลิต
Heat box	Labnet International Inc, USA
SDS-PAGE apparatus	Invitrogen, USA
Shaker	Major Science, Taiwan
Spin down centrifuge	BIOSAN, Latvia
Heat box	Labnet International Inc, USA
SDS-PAGE apparatus	Invitrogen, USA
Shaker	Major Science, Taiwan
Spin down centrifuge	BIOSAN, Latvia

### วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุ	บริษัทที่ผลิต
0.22 sterile filter	Millex, Ireland
15 ml centrifuge tube	NEST Biotechnology, China
50 ml centrifuge tube	SPL Life Sciences, Korea
25 cm <sup>3</sup> cell culture flask, filter cap	SPL Life Sciences, Korea
500 ml bottle top filter, 0.22 $\mu$ m	Corning Inc., USA
Cryogenic vial	Corning Inc., USA
Glass bottle	Duran, Germany
Micropipette	Corning Inc., USA
Pipette aid	Corning Inc., USA
96-well plate	SPL Life Sciences, Korea
6-well plate	SPL Life Sciences, Korea
35 mm culture well	SPL Life Sciences, Korea
PCR tube	KIRGEN, Shanghai
Microcentrifuge tube	KIRGEN, Shanghai
Neubauer hemocytometer	BOECO, Germany

### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Amphotericin B solution (250 mg/L)	Caisson, USA
Penicillin-Streptomycin solution (100X)	HIMEDIA, India
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Caisson, USA
Heat inactivated fetal bovine serum	HIMEDIA, India
Trypsin 0.5% (10X), with EDTA	Gibco, USA
Sodium bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	Ameresco, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Ameresco, USA
Trypan blue	Gibco, USA
MTT	Ameresco, USA
Chloroform	RCI LAB-SCAN, Thailand
cDNA synthesis kit	Toyobo, Japan
CAPITAL™ qPCR Green Mix,4x	Biotechrabbit, Germany
Ethanol	RCI LAB-SCAN, Thailand
Isopropanol	RCI LAB-SCAN, Thailand
Guanidine thiocyanate	Bio Basic Canada Inc, Canada
Nuclease-free water	Thermo Scientific, USA
Phenol	Bio Basic Canada Inc, Canada
Trisaminomethane (Tris) base	LOBAL Chemie, India
Acrylamide	Bio Basic Canada Inc, Canada
Coomassie brilliant blue	SIGMA-ALDRICH, USA
Glycine	BIO-RAD, USA
Protein ladder	GeneDirex, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio Basic Canada Inc, Canada

### วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาเพื่อดูผลของโปรตีนจากผงโปรตีนถั่วดาวอินคา (ได้รับจากบริษัท โอเมกา 3.6.9 แอนด์ โลโคปิ่น จำกัด) ได้แก่ กลุ่ม Protein และกลุ่ม Protein hydrolysate โดยใช้เอนไซม์ Papain และเอนไซม์ Alcalase

#### การกำจัดไขมันออกจากกากโปรตีนถั่วดาวอินคาสำเร็จรูป

เตรียมผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคาสำเร็จรูป (crude protein powder) มาละลายในตัวทำละลาย Hexane ในอัตราส่วน 1:6 โดยใช้เครื่อง stirrer กวนสารเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm 10 นาที แล้วนำส่วนตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งโดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C (Muangrat et al., 2018)

#### การสกัดโปรตีนกากถั่วดาวอินคา

นำ Defatted protein powder (กำจัดไขมันออกจากผงโปรตีนกากถั่วดาวอินคาสำเร็จรูป) มาละลายใน 1M NaOH ในอัตราส่วน 1:10 โดยใช้เครื่อง stirrer กวนสารเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm 30 นาที แล้วจึงนำส่วน supernatant มาปรับ pH 4.5 แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ 3000 rpm 15 นาที แล้วจึงนำส่วนตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น และปรับ pH ให้เป็น 7 จากนั้นจึงนำไป Freeze dry และเก็บไว้ที่ -20 °C

#### การผลิตโปรตีนไฮโดรไลสทโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

นำ Protein powder จากกากถั่วดาวอินคา มาละลายบัฟเฟอร์และปรับ pH 7.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์สองชนิด ได้แก่เอนไซม์ Alcalase และ Papain ทำการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant ไป Freeze dry และเก็บไว้ที่ -20 °C นอกจากนี้ยังใช้ส่วน supernatant หาค่า Degree of hydrolysate (%DH) ด้วยเทคนิค OPA assay และการศึกษา pattern ของผงโปรตีนด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE

### การหาค่า Degree of hydrolysate (%DH)

เตรียมสารละลาย OPA ปริมาตร 30 ml (o-phthalaldehyde 15 mg, beta-2-mercaptoethanol 15 ul, ethanol 300 ul และ 50 mM sodium borate buffer pH8.5 29.685 ml) จากนั้นนำ supernatant ของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสที่ขยอยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A), Papain (PH-P) และผงโปรตีนที่ไม่ได้ขยอยสลายด้วยเอนไซม์ (uncut) ปริมาตร 5 ul ผสมกับสารละลาย OPA 195 ul แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง Fluorescence ที่ค่า emission 460 นาโนเมตร และค่า excited 360 นาโนเมตร

$$\% DH = (A_1 - A_0 / A_0) \times 100$$

หมายเหตุ :  $A_1$  คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ผ่านการขยอยสลายด้วยเอนไซม์แต่ละชั่วโมง  
 $A_0$  คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ไม่ได้ขยอยสลายแต่ละชั่วโมง

### การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังได้รับโปรตีนไฮโดรไลส

#### DPPH Radical Scavenging Activity Assay

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical ความเข้มข้น 0.1 mM ผสมกับสารละลายผงโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากกากถั่วดาวอินคาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที อุณหภูมิ 25°C แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหา % DPPH inhibition

$$\% DPPH inhibition = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม} - \text{ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

#### Ferric reducing antioxidant power

เตรียมสารละลาย FRAP reagent ผสมกับสารละลายผงโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากกากถั่วดาวอินคาที่มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งไว้เป็นระยะเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหา % FRAP inhibition

$$\% FRAP inhibition = \text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม} - \text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบ} \times 100$$

### การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งหลังได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสท

#### การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay

นำเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ  $5 \times 10^3$  cells/well ทำการเพาะเลี้ยงในตู้ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลี้ยงเซลล์ HCT116 ในสารละลายโปรตีนจากถั่วดาวอินคา ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในตู้ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นเติมสาร MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำไปบ่มในตู้ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายผลึก formazan ด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

$$\text{อัตราการรอดชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์กลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

### การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบหลังได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสท

#### การศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 โดยวิธี MTT reduction assay

นำเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264) มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ  $5 \times 10^3$  cells/well ทำการเพาะเลี้ยงในตู้ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเติมสารละลายโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคาที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในตู้ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นเติมสาร MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำไปบ่มในตู้ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลายผลึก formazan ด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

$$\text{อัตราการรอดชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์กลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

### การศึกษาการแสดงออกระดับยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 โดยวิธี qRT-PCR

เพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในสภาวะที่ป้องกันการตายของเซลล์ได้ จากนั้นทำการเก็บเซลล์มาสกัด total RNA วัดความเข้มข้น หาค่าความบริสุทธิ์ แล้วนำไปสังเคราะห์เป็น cDNA ก่อนนำไปศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยวิธี real time polymerase chain reaction (qPCR) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับ mRNA ของยีน *IL-6* และ *IL-1* ดังตารางที่ 1 และคำนวณหาระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (fold change)

$$\text{Fold change} = E^{-\Delta\Delta Cq}$$

ตารางที่ 1 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในกระบวนการอักเสบ

Gene		Primer sequence (5'→3')	PCR product	Annealing temperature
<i>IL-1</i>	F	GTTGACGGACCCCAAAGAT	190 bp	55
	R	CCTCATCCTGGAAGGTCCAC		
<i>IL-6</i>	F	GTCCTTCCTACCCCAATTTCCA	134 bp	59
	R	CGCACTAGGTTTGCCGAGTAG		

หมายเหตุ : F= Forward primer, R= Reverse primer

### วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

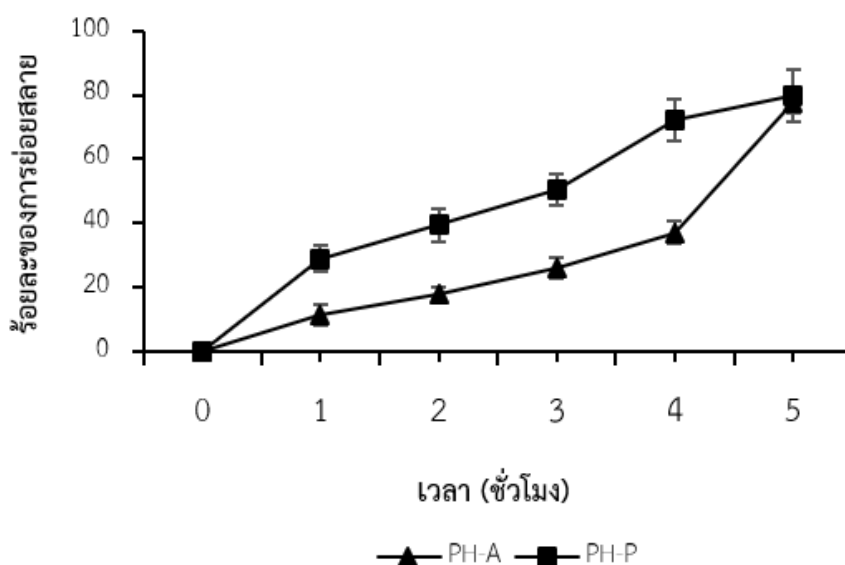
ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย  $p < 0.05$

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### ผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคา

ผลของระยะเวลาในการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วดาวอินคาโดยใช้เอนไซม์สองชนิด ได้แก่ Alcalase และ Papain ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ คือ pH 7.5 ควบคุมอุณหภูมิในการย่อย 50 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ได้แก่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงหยุดปฏิบัติการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant ไปหาค่า Degree of hydrolysate (%DH) ด้วยเทคนิค OPA assay จากการศึกษาพบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ papain จะมีร้อยละของการย่อยสลายที่สูงกว่าเอนไซม์ Alcalase แต่ที่ 5 ชั่วโมงจะพบว่าร้อยละของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกันดังที่แสดงในภาพ 7

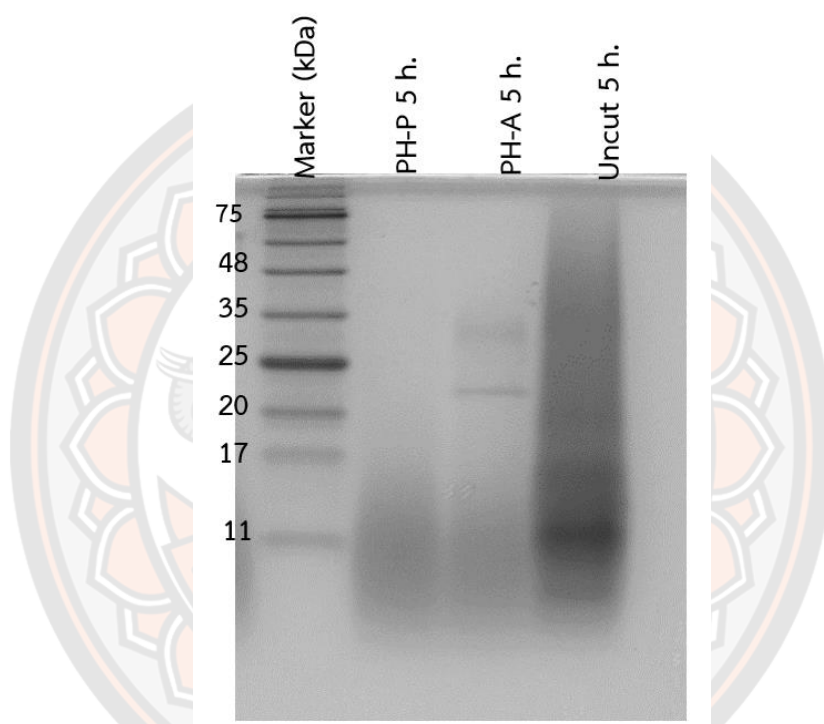


ภาพที่ 7 แสดงระดับการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วดาวอินคา โดยใช้เอนไซม์ Alcalase (PH-A) และเอนไซม์ Papain (PH-P) ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



### ผลการศึกษา pattern ของผงโปรตีนไฮโดรไลสด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE

ผลการศึกษาารูปแบบของแถบแบนโปรตีนด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ได้แก่ Papain (PH-P) และ Alcalase (PH-A) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ไม่ได้ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Uncut) จะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนโดยจะอยู่ในช่วง 11-17 kDa และพบแถบโปรตีนขนาดใหญ่เล็กน้อยมาก แสดงว่าโปรตีนเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ดังที่แสดงในภาพ 8



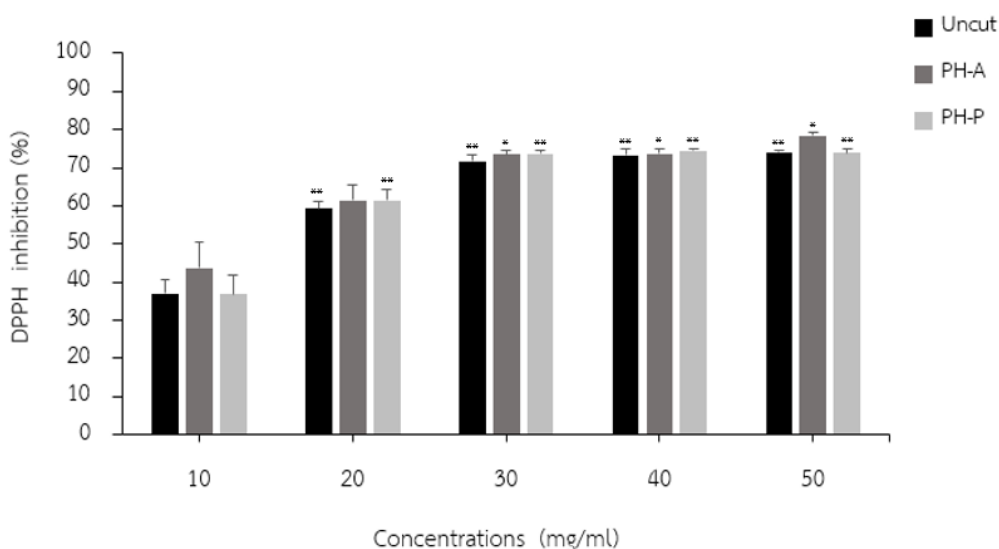
ภาพที่ 8 แสดง pattern ของผงโปรตีน และโปรตีนไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) และเอนไซม์ (PH-A) ย่อยในสภาวะที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE (16% gel separating)

สภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่บัฟเฟอร์ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 5 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่ใช้เตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาเพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพต่อไป

## ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผงโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคา ด้วยวิธี DPPH

### Radical Scavenging Activity Assay

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Uncut) โปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วดาวอินคาที่ทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Papain (protein hydrolysate by papain enzyme; PH-P) และเอนไซม์ Alcalase (protein hydrolysate by alcalase enzyme; PH-A) โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/ml และใช้ Trolox 1.25 mM เป็นสารมาตรฐาน ผู้วิจัยรายงานผลเป็นค่า % DPPH inhibition จากผลการศึกษาพบว่า Uncut, PH-P และ PH-A มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 10 mg/ml ของแต่ละกลุ่มโปรตีน ค่า % DPPH inhibition ของ PH-P เท่ากับ 36.8, 61.4, 73.6, 74.3, 73.8 ตามลำดับ ซึ่งส่งผลต่อการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*\* $p < 0.01$ ) ส่วน PH-A เท่ากับ 43.7, 61.4, 73.4, 73.6, 75.5, 80.0 ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นตั้งแต่ 30 mg/ml จะส่งผลต่อการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นที่ได้รับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\* $p < 0.05$ ) และ Uncut ค่า % DPPH inhibition เท่ากับ 37.0, 59.3, 71.6, 73.2, 74.1 ตามลำดับ ซึ่งส่งผลต่อการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*\* $p < 0.01$ ) จากผลการทดลองนี้พบว่าโปรตีนจากถั่วดาวอินคา และโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแบบ และค่า % DPPH inhibition ในแต่ละความเข้มข้นของโปรตีนทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน ดังที่แสดงในภาพ 9



ภาพที่ 9 กราฟแสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี DPPH assay (Mean±SD)

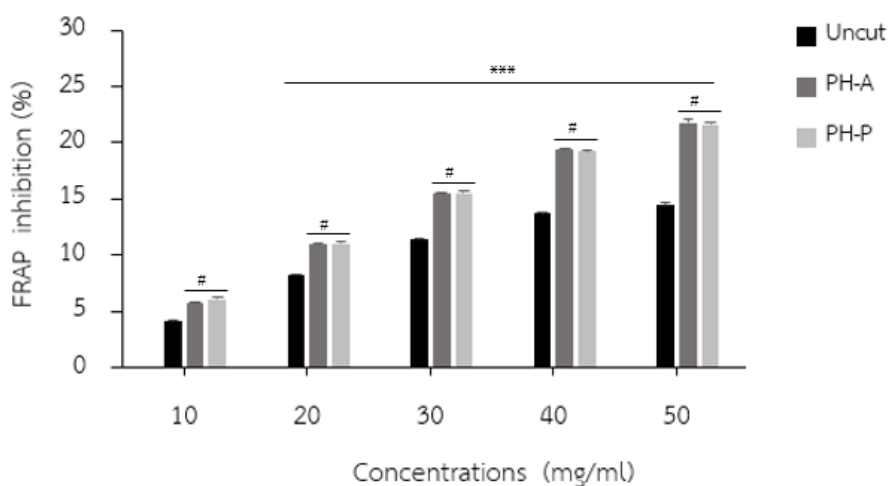
หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 10 mg/ml ของแต่ละกลุ่ม

\*\* $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 10 mg/ml ของแต่ละกลุ่ม

#### ผลการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

ผลการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกของโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย โปรตีนไฮโดรไลสที่ทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Papain และเอนไซม์ Alcalase โดยให้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/ml โดยมี Ascorbic acid 1 mM เป็นสารมาตรฐาน และรายงานผลเป็นค่า % FRAP inhibition ผลการศึกษาพบว่า Uncut, PH-P และ PH-A มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 10 mg/ml ของแต่ละกลุ่มโปรตีน ค่า % FRAP inhibition ของ PH-P เท่ากับ 6.1, 11.1, 15.5, 19.3 และ 21.7 ตามลำดับ และ PH-A เท่ากับ 5.8, 11.0, 15.5, 19.4 และ 21.8 ตามลำดับ ส่วน Uncut มีค่าเท่ากับ 4.1, 8.2, 11.4, 13.7 และ 14.5 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าโปรตีนแต่ละกลุ่มมีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกให้เป็น  $(Fe(II)(TPTZ)_2)^{2+}$  ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $***p < 0.001$ ) และเมื่อเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นของ Uncut กับ PH-P และ PH-A ผู้วิจัยพบว่า PH-P และ PH-A มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกที่สูงขึ้นกว่ากลุ่ม Uncut ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $#p < 0.001$ ) จะเห็นได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยด้วย

เอนไซม์ทั้งสองชนิด มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในการรีดิวซ์เหล็กเพอริคให้เป็น  $(\text{Fe(II)(TPTZ)}_2)^{2+}$  แบบ Dose-dependent ที่สูงกว่าโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย ดังแสดงในภาพ 10



ภาพที่ 10 กราฟแสดงผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี FRAP assay (Mean±SD)

หมายเหตุ: \*\*\* $p < 0.001$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 10 mg/ml ของแต่ละกลุ่ม

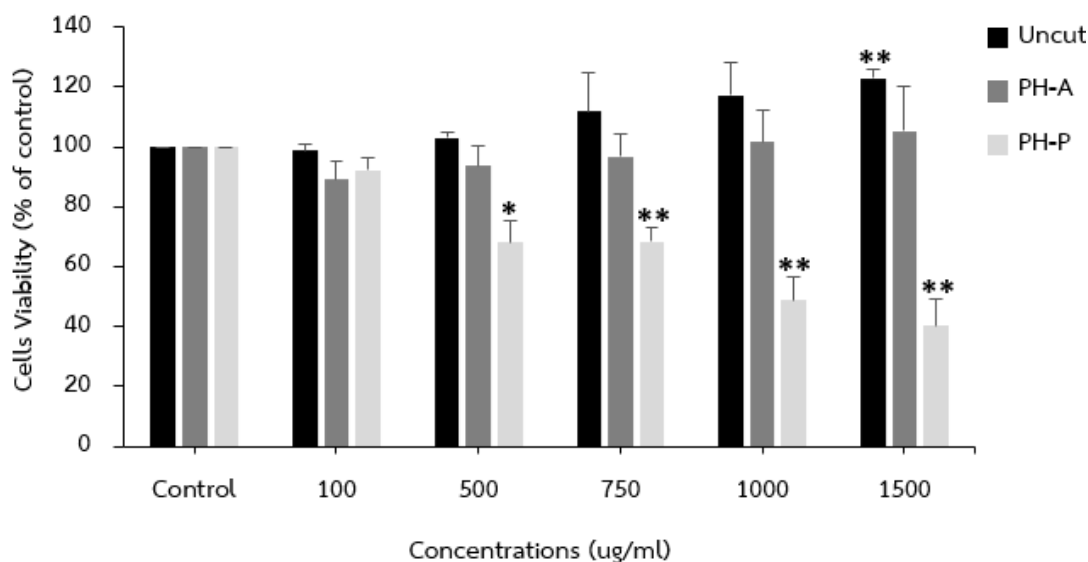
# $p < 0.001$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับแต่ละความเข้มข้นของกลุ่ม Uncut

#### ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay

การศึกษากฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 เมื่อได้รับโปรตีนจากถั่วดาวอินคา Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งเซลล์ HCT116 จะได้รับความเข้มข้นตั้งแต่ 100, 500, 750, 1000 และ 1500  $\mu\text{g/ml}$  เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ผลการศึกษาพบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับ PH-P ที่มีความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*p < 0.05$ ) และความเข้มข้นตั้งแต่ 750-1500  $\mu\text{g/ml}$  ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*\* $P < 0.01$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PH-A ที่ทุกความเข้มข้น ตั้งแต่ 100-1500  $\mu\text{g/ml}$  ไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

HCT116 และกลุ่มทดสอบที่ได้รับโปรตีน Uncut พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 1500  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มีการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*\* $p < 0.01$ ) ดังที่แสดงในภาพ 11

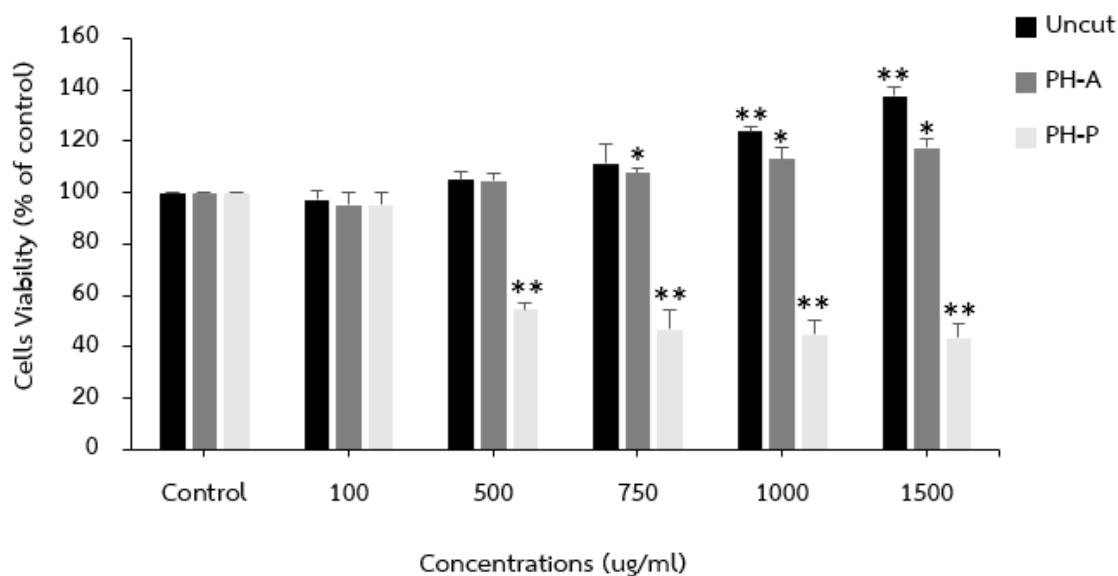


ภาพที่ 11 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

\*\* $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 48 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ได้รับ PH-P ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 500-1500  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*\* $p < 0.01$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PH-A ที่ได้รับความเข้มข้นตั้งแต่ 750-1500  $\mu\text{g/ml}$  มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\* $p < 0.05$ ) และโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคาที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Uncut) พบว่าที่ความเข้มข้น 1000 และ 1500  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*\* $p < 0.01$ ) ดังที่แสดงในภาพ 12

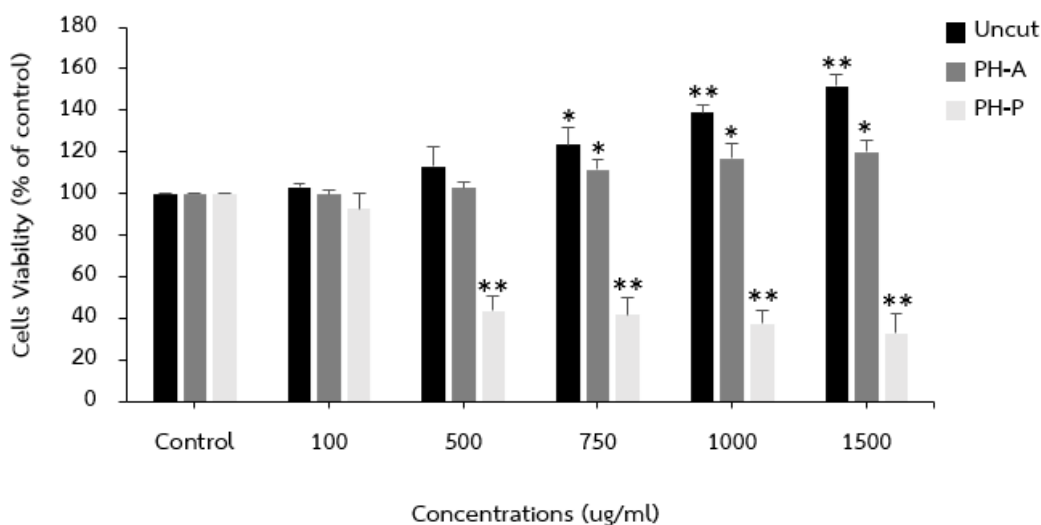


ภาพที่ 12 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (Mean±SD)

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

\*\* $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ได้รับ PH-P ที่ความเข้มข้น 500-1500  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*\* $p < 0.01$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ PH-A ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับที่เวลา 48 ชั่วโมง และกลุ่มที่ได้รับ Uncut ที่ความเข้มข้น 750  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (\* $p < 0.05$ ) และที่ความเข้มข้น 1000 และ 1500  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (\*\* $p < 0.01$ ) ดังที่แสดงในภาพ 13



ภาพที่ 13 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (Mean±SD)

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

\*\* $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2 แสดงผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay ที่ระยะเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง

ระยะเวลา	อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116		
	ยับยั้งการเจริญของเซลล์	ส่งเสริมการเจริญของเซลล์	
	IC50 ของ PH-P ( $\mu\text{g/ml}$ )	PH-A ( $\mu\text{g/ml}$ )	Uncut ( $\mu\text{g/ml}$ )
24 ชั่วโมง	985	>1500	1500
48 ชั่วโมง	645	1000	750
72 ชั่วโมง	465	750	750

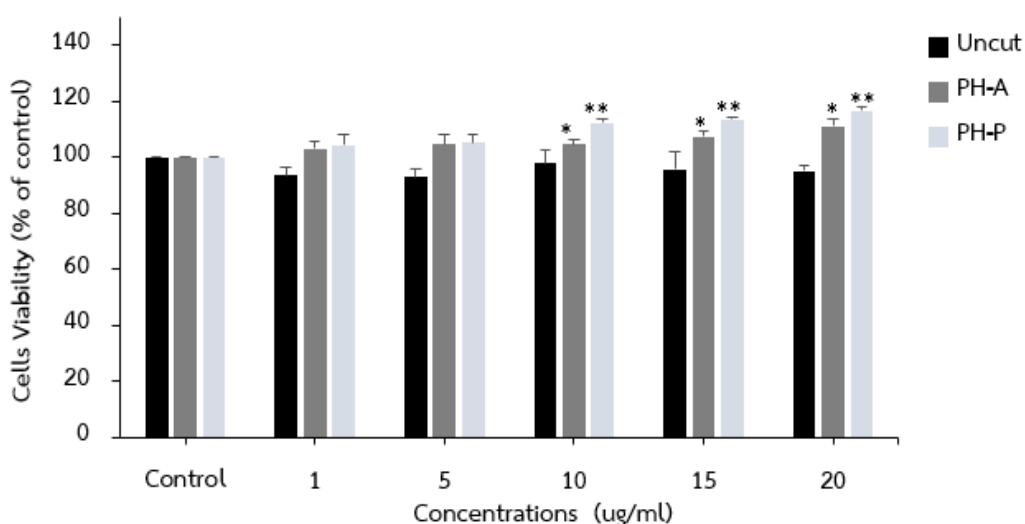
จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า PH-P มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิด HCT116 ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 500  $\mu\text{g/ml}$  ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผู้วิจัยสามารถหาค่า IC50 ของ PH-P ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 464, 645 และ 985  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ส่วน PH-A ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้น 1000  $\mu\text{g/ml}$  ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และ Uncut ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้นที่ความเข้มข้น 1500

$\mu\text{g/ml}$  ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นจะเห็นได้ว่ามีเฉพาะ PH-P ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HCT116 ดังตารางที่ 2

### ผลการศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 โดยวิธี MTT reduction assay

การศึกษาคือความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อได้รับโปรตีนจากถั่วดาวอินคา Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งเซลล์ RAW264.7 จะได้รับความเข้มข้นตั้งแต่ คือ 1, 5, 10, 15 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับ PH-P ที่มีความเข้มข้น 10, 15 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $**p < 0.01$ ) และจากผลการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับ PH-A พบว่าที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ Uncut ไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมดังที่แสดงในภาพ 14



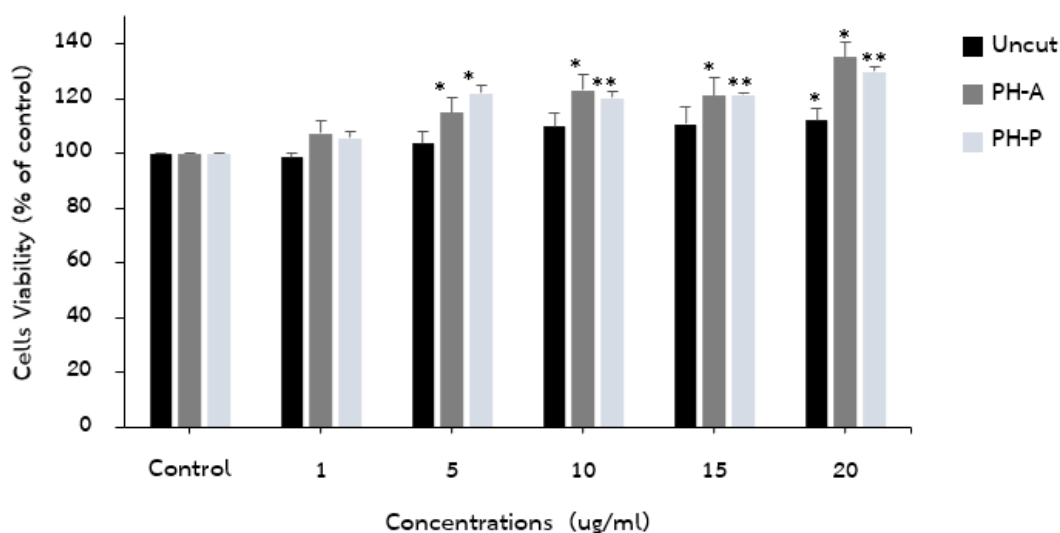
ภาพที่ 14 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ:  $*p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

$**p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 48 ชั่วโมงพบว่า PH-P ที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*p<0.05$ ) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10, 15 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $**p<0.01$ ) และจากผลการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับ PH-A พบว่าที่ความเข้มข้น 5 - 20  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*P<0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มที่ได้รับ Uncut พบว่าที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ให้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*P<0.05$ ) ดังที่แสดงในภาพ 15



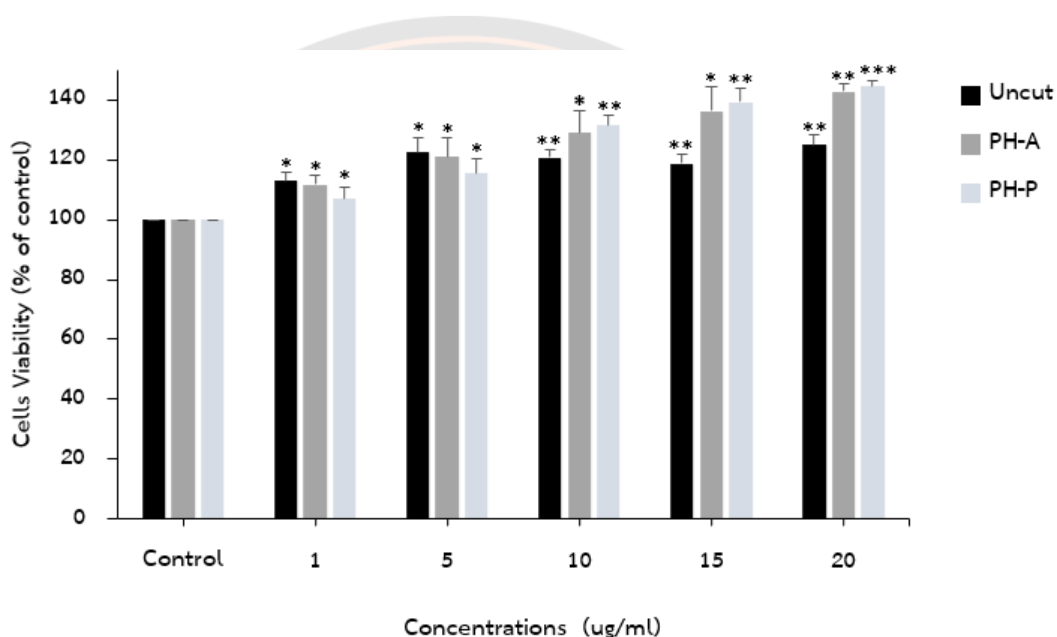
ภาพที่ 15 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ:  $*p<0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

$**p<0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ได้รับ PH-P ที่ทุกความเข้มข้นส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ 1–20  $\mu\text{g/ml}$  โดยที่ความเข้มข้น 1 และ 5  $\mu\text{g/ml}$  ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*p<0.05$ ) ที่ความเข้มข้น 10 และ 15  $\mu\text{g/ml}$  เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $**p<0.01$ ) และที่ความเข้มข้นสูงสุด 20  $\mu\text{g/ml}$  เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $***p<0.001$ ) และจากผลการศึกษา

อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับ PH-A พบว่าที่ความเข้มข้น 1-15  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*P<0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้นสูงสุดของ PH-A คือ 20  $\mu\text{g/ml}$  ให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $**p<0.01$ ) และเมื่อเซลล์ RAW264.7 ได้รับ Uncut เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 5  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $*p<0.05$ ) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 - 20  $\mu\text{g/ml}$  เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $**p<0.01$ ) ดังที่แสดงในภาพ 16



ภาพที่ 16 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 หลังได้รับโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ:  $*p<0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

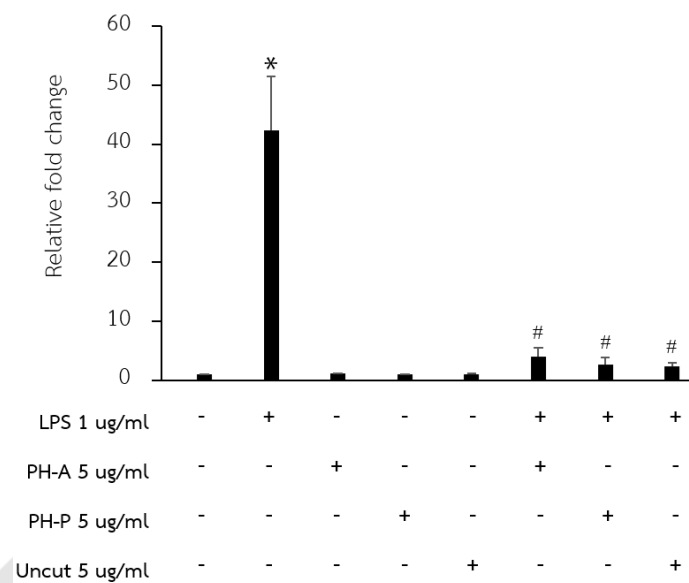
$**p<0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

$***p<0.001$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองจะเห็นว่าได้โปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  ไปศึกษาคุณสมบัติการลดระดับการแสดงออกของยีน Pro-inflammatory cytokine เนื่องจากเป็นค่าความเข้มข้นที่ไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสท์ในการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ *IL-1* และ *IL-6* ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 โดยวิธี qRT-PCR

การศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยวิธี real time polymerase chain reaction (qPCR) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับ mRNA ของ Pro-inflammatory cytokine gene ได้แก่ Interleukin-1; *IL-1* และ Interleukin-6; *IL-6* โดยใช้  $\beta$ -actin gene เป็นยีนอ้างอิง โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณสัมพัทธ์ (Relative quantification) ของอัตราส่วนของการแสดงออกของยีนที่สนใจต่อการแสดงออกของยีนอ้างอิง คำนวณได้จากการเปรียบเทียบค่า Threshold cycle (Ct) ที่ได้จากผล qPCR จากนั้นวิเคราะห์และรายงานค่าเป็นค่าจำนวนเท่า (fold change) ของการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS, Uncut, PH-P และ PH-A โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *IL-1* ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*P<0.05$ ) และเมื่อได้รับ Uncut, PH-P และ PH-A พบว่าการแสดงออกของยีน *IL-1* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อนำโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคา Uncut, PH-P และ PH-A ที่มีความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  พรีทรีตเมนต์เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยสาร LPS เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีน *IL-1* ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะสาร LPS ( $\#P<0.05$ ) ดังภาพที่ 17

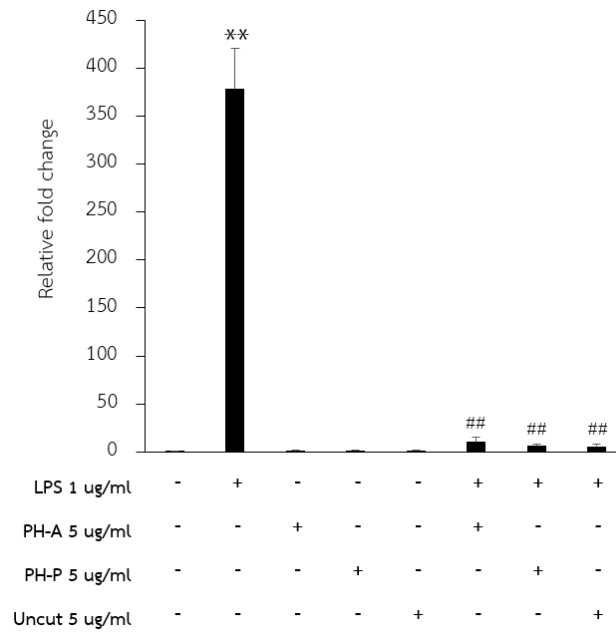


ภาพที่ 17 แสดงผลการแสดงออกของยีน *IL-1* ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อได้รับสาร LPS, Uncut, PH-P, PH-A เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง รวมทั้งได้รับ Uncut, PH-P, PH-A ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วย LPS เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ด้วยวิธี qRT-PCR (Mean±SD)

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

# $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับที่ได้รับเฉพาะ LPS

ผลการแสดงออกของยีน *IL-6* ในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (\*\* $P < 0.01$ ) และเมื่อได้รับ Uncut, PH-P และ PH-A พบว่าการแสดงออกของยีน *IL-6* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อนำโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคา Uncut, PH-P และ PH-A ที่มีความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  ปริที่รีดเมนต์เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วยสาร LPS เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีน *IL-6* ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะสาร LPS (## $P < 0.01$ ) ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แสดงผลการแสดงออกของยีน *IL-6* ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 เมื่อได้รับสาร LPS, Uncut, PH-P, PH-A เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง รวมทั้งได้รับ Uncut, PH-P, PH-A ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ตามด้วย LPS เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ด้วยวิธี qRT-PCR (Mean±SD)

หมายเหตุ: \*\* $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

## $p < 0.01$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับที่ได้รับเฉพาะ LPS

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

#### อภิปรายผล

##### ผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสัทโดยใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย

ระดับการย่อยสลายโปรตีนเป็นดัชนีที่ใช้อธิบายปริมาณการทำลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนด้วยเอนไซม์ การติดตามค่า DH สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้วิธี OPA assay กล่าวคือ OPA เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะสามารถทำให้วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนได้ด้วยวิธี Fluorometry ซึ่งวิธีนี้จะให้ความไวสูง ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วดาวอินคาโดยใช้เอนไซม์ Alcalase และ Papain ที่ pH 7.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย 50 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ Alcalase มีระดับการย่อยสลายที่ต่ำกว่า เอนไซม์ Papain ในช่วงแรก เนื่องจาก pH ที่ใช้ในการย่อยอาจจะไม่เหมาะสม ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ทำงานแตกต่างกัน โดยเอนไซม์ Alcalase จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มอัลคาไลโปรตีเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่ pH 6.5-8 อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส หากสูงเกินไปจะทำให้เกิดสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์เนื่องจากความร้อนสูง จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase คือการย่อยสลายที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายสูงถึง 70-80% ส่วนเอนไซม์ Papain เป็นเอนไซม์ที่ได้จากพืช จัดอยู่ในกลุ่ม Cysteine protease สามารถย่อยสลายได้ที่ pH 6-7.5 อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส การศึกษาในครั้งนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยด้วยเอนไซม์ Papain คือการย่อยสลายที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายสูงถึง 80% ดังนั้นจะเห็นว่าที่เวลา 5 ชั่วโมงเอนไซม์ทั้งสองมีระดับเปอร์เซ็นต์การย่อยสูงสุดและอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการทดลองถัดไปจะเลือกใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลา 5 ชั่วโมง

##### การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผงโปรตีนไฮโดรไลสัทจากถั่วดาวอินคา ด้วยวิธี DPPH

##### Radical Scavenging Activity Assay

ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสัทจากถั่วดาวอินคาขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยสลายที่สูง และกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน โดยความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีกรดอะมิโนจะมีหมู่โซ่ข้างที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น ซิสทีอีน และเมทไทโอนีน หรือมีหมู่โซ่ข้างที่มีวงแหวน (aromatic side chain) เช่น ทริปโตเฟน ฟีนิลอะลานีน และไทโรซีน ซึ่งมีไฮโดรเจนอะตอมที่สามารถถูกดึงออกได้ง่าย

นอกจากนี้หมู่อิมิดาโซล (imidazole groups) ของฮีสทีดีนก็มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน ดังนั้นเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจึงมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (Eckert et al., 2013) จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วดาวอินคา ที่ทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Papain และเอนไซม์ Alcalase โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/ml โดยเทียบกับ Trolox 1.25 mM ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน มีค่า % DPPH inhibition ที่เพิ่มสูงขึ้นและพบว่าโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ไม่ได้รับการย่อยด้วยเอนไซม์ (Uncut) ก็มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเช่นเดียวกัน อาจเป็นผลมาจากโปรตีนที่พบเป็นองค์ประกอบในเมล็ดถั่วดาวอินคา (Chirinos et al., 2016) และมีกรดอะมิโน leucine, isoleucine, lysine, threonine และ valine องค์ประกอบอยู่มาก นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโน methionine และ cysteine อีกด้วย (Hamaker et al., 1992) ดังนั้นจากการศึกษาโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain และ Alcalase จึงทำให้คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาด้วยวิธี DPPH Assay ไม่แตกต่างจากโปรตีนเดิม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ขึ้นอยู่กับลำดับเปปไทด์และขนาดของน้ำหนักรวมโมเลกุล ซึ่งเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กจะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน hydrophobic เป็นองค์ประกอบอยู่ก็จะมีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงเช่นกัน (Li et al., 2008) ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนถั่วดาวอินคามีความคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งพบว่าเมื่อระดับการย่อยสลายที่ระยะเวลาสูงสุดที่ระยะเวลา 5 ชั่วโมง จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH คงที่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jamdra และคณะ ที่พบว่าระดับการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วลิสงค์เพิ่มสูงขึ้น 40% จะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซตนั้นจะมีค่าคงที่ด้วย ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วลิสงค์ 2 mg/ml ส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลสูงสุด 50% (Jamdra et al., 2010) ซึ่งในการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วดาวอินคาที่ความเข้มข้น 30 mg/ml ส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระคงที่ โดยมีค่า % DPPH inhibition สูงกว่า 70%

#### การศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วดาวอินคา ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง  $(\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3)$  ( $\text{TPTZ} = 2,4,6\text{-tripyridyl-s-triazine}$ ) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารออกซิแดนซ์ กับสารต้านออกซิเดชั่น เมื่อสารต้านออกซิเดชั่นถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่  $(\text{Fe(III)(TPTZ)}_2)^{3+}$  แล้วเปลี่ยนเป็น  $(\text{Fe(II)(TPTZ)}_2)^{2+}$  ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วดาวอินคา ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

Papain และเอนไซม์ Alcalase มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ไม่ได้รับการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถในการรีดิวส์เฟอริก ( $Fe^{3+}$ ) ของโปรตีนข้าวบาร์เลย์และโปรตีนรำข้าว พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะมีความสามารถในการรีดิวส์เฟอริก ( $Fe^{3+}$ ) ให้เปลี่ยนเป็นเฟอร์รัส ( $Fe^{2+}$ ) ได้ดีกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย (Chanput et al., 2009) จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าประสิทธิภาพในการรีดิวส์เฟอริก ( $Fe^{3+}$ ) จะต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่างานวิจัยของคุณ Chanput และคณะ เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ (แยก fraction) ซึ่งใช้ความเข้มข้น 1.25 mg/ml ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามค่า FRAP เป็นค่าที่แสดงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้เกิดเป็นสารที่มีความคงตัวมากขึ้น มีการศึกษาว่าขนาดของเปปไทด์มีความสัมพันธ์กันในระหว่างผลการทดสอบ DPPH และ FRAP assay ว่าน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์อาจทำให้ประสิทธิภาพในการรีดิวส์มีความแตกต่างกัน (Wang et al., 2008) ซึ่งจากผลการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทนี้อาจทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2011 ของคุณ Zhao และคณะ ที่ศึกษาแล้วพบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กมีประสิทธิภาพในการรีดิวส์ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (Zhao et al., 2011) ดังนั้นโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain และ Alcalase จึงมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่สูงกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก จะมีความสามารถในการรีดิวส์ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งการย่อยสลายถั่วดาวอินคาทำให้ได้เปปไทด์ที่มีน้ำหนักต่ำกว่า 3 kDa อีกทั้งยังพบว่ามีค่าร้อยละการย่อยสลายที่ได้สอดคล้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการรีดิวส์ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระ มีขนาดเปปไทด์ที่แตกต่างไป มีการเปลี่ยนแปลงของระดับสัดส่วน องค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบในถั่วดาวอินคา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Wu, Cher, & Shiau, 2003) เมื่อระดับการย่อยสลายที่สูงที่สุดของการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน ส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยมีความสามารถในการจับกับโลหะไอออนสูงขึ้นไป จึงอาจกล่าวได้ว่าเปปไทด์ในถั่วดาวอินคาสามารถทำหน้าที่เป็นสารคีเลตที่สามารถจับสารอนุมูลอิสระ นำไปสู่การลดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งการจับกับธาตุที่มีประจุบวก เช่น เหล็ก สังกะสี หรือทองแดง ในระบบทางเดินอาหารจะช่วยลดอัตราการเกิด Autoxidation และชะลอการเกิดสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่จะส่งผลกระทบต่อกลิ่นและรสในอาหาร (Gordon, 2001)

จากการศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบในเมล็ดถั่วดาวอินคา พบว่ากรดอะมิโนหลักคือ lysine (110 g/kg) รองลงมาคือ leucine (76 g/kg), phenylalanine (73 g/kg) และ glutamic acid (69 g/kg) กรดอะมิโน glutamic และ aspartic เป็นกรดอะมิโนที่มีรายงานว่ามีคุณสมบัติใน



การต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ดี (Udenigwe & Aluko, 2011) นอกจากนี้กรดอะมิโนชนิดอื่นที่พบในถั่วดาวอินคา เช่น tyrosine (61 g/kg), leucine (76 g/kg), histidine (52 g/kg) และ Lysine (109 g/kg) ก็มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ส่วนกรดอะมิโน phenylalanine (73 g/kg), alanine (13 g/kg), isoleucine (25 g/kg), และ leucine (76 g/kg) ซึ่งเป็นกรดอะมิโน Hydrophobic ก็มีความสัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระ (Rawdkuen et al., 2018) ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธี จึงพบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระที่พบในเมล็ดถั่วดาวอินคานั้นส่งผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

### การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116

จากการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง HCT116 หลังได้รับสารละลายโปรตีนจากผงโปรตีนถั่วดาวอินคาทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผงโปรตีน (Uncut) กลุ่มโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) และกลุ่มโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) ซึ่งความเข้มข้นในการศึกษา คือ 100-1500  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นของกลุ่มทดสอบที่ได้รับ PH-P โดยสามารถหาค่า IC<sub>50</sub> ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 985, 645 และ 465  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ส่วนกลุ่มทดสอบที่ได้รับผงโปรตีน Uncut และ PH-A พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 แต่กลับส่งเสริมให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 48 และ 72 จากการศึกษเกี่ยวกับองค์ประกอบทางโภชนาการของถั่วดาวอินคา พบว่ามีกรดอะมิโนที่สำคัญ ได้แก่ Leucine ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มากที่สุด และมีกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ tyrosine, isoleucine, lysine, threonine และ valine นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนที่มี sulfur เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ methionine, cysteine (Wang et al., 2018) จากข้อมูลองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบในเมล็ดถั่วดาวอินคานั้นพบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน hydrophobic และกรดอะมิโนที่เป็น aromatic ที่พบในถั่วดาวอินคาที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ papain อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและเกิดความแตกต่างของเปปไทด์ ทำให้สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นการตายของเซลล์ เช่น apoptosis และยับยั้งวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) เมื่อนำไปผลิตโปรตีนไฮโดรไลสทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก รวมไปถึงกรดอะมิโนอิสระที่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดี และกรดอะมิโนและเปปไทด์เหล่านั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จึงทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้นำแหล่งโปรตีนจากถั่วถั่วลันทมามาผลิต

โปรตีนไฮโดรไลสเสทด้วยเอนไซม์ Papain แล้วศึกษาผลของการยับยั้งอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด Caco-2 ซึ่งมีค่า IC50 เท่ากับ  $650 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง (Ma et al., 2015) จากรายการการศึกษาของคุณ Hsu และคณะในปี 2011 พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยสลายปลาทูน่า ทำให้ได้เปปไทด์ Leu-Pro-His-Val-Leu-Thr-Pro-Glu-Ala-Gly-Ala-Thr ขนาด 1206 Da และเปปไทด์ Pro-Thr-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Tyr-Met-Val-Thr ขนาด 1124 Da ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้แบบ dose-dependent (Hsu et al., 2011) เมื่อพิจารณากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในถั่วดาวอินคาเมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์ papain จึงอาจทำให้ได้กรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ขนาดเล็กที่เรียงต่อกันแล้วมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ และการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่อได้รับ Uncut และ PH-A ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับผงโปรตีนที่ความเข้มข้นของสารที่เพิ่มสูงขึ้น โดยกลุ่มทดสอบที่ได้รับ Uncut มีอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่า PH-A เนื่องจากกลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ได้รับ serum-free media ดังนั้นในกลุ่มที่ได้รับผงโปรตีนที่ไม่มีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โปรตีนหรือเปปไทด์รวมทั้งกรดอะมิโนอิสระจึงเป็นแหล่งอาหารที่ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2008 ที่ได้นำถั่ว Chickpea มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase เพื่อใช้แทนซีรัมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสทที่ได้สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Girón-Calle et al., 2008) เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์สามารถส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตให้แก่เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ในขณะที่กลุ่มควบคุมได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและโปรตีน อย่างไรก็ตามอาจจะมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของอัตราการรอดชีวิตในเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติควบคู่ด้วย

### **การศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7**

จากการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 หลังได้รับโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากถั่วดาวอินคาทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Uncut) กลุ่มโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) และกลุ่มโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) ซึ่งความเข้มข้นในการศึกษา คือ 1 - 20  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับโปรตีนและโปรตีน

ไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคา จากผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2019 ที่ได้นำโปรตีนตากปลิงทะเล *Acaudina molpadioides* มาผลิตโปรตีนไฮโดรไลส โดยใช้ Alkaline protease ในการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งจากผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตในเซลล์ RAW264.7 เมื่อได้รับโปรตีนไฮโดรไลสแล้วพบว่าสามารถส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นโดยเทียบกับกลุ่มควบคุม (Li et al., 2019) และจากการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7 ของคุณ Zhang และคณะในปี 2019 ที่ได้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลส ซึ่งใช้แหล่งโปรตีนจากปลา *Nibeajaponica* โดยใช้เอนไซม์ Papain ในการย่อยโปรตีน จากผลการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7 หลังได้รับโปรตีนไฮโดรไลสด้วยเทคนิค MTT reduction assay พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสมีผลทำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนที่เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น คือ 6.25, 12.5, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Zhang et al., 2019) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับผลของการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ RAW264.7 เมื่อได้รับโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจาก sturgeon muscle โดยใช้เอนไซม์ Alcalase จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1  $\text{mg}/\text{ml}$  ส่งเสริมให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Gao et al., 2021) จากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ใช้ความเข้มข้นในปริมาณที่น้อยกว่างานวิจัยข้างต้นในการส่งเสริมให้เซลล์มีการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงแหล่งโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญเมื่อนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจึงทำให้ได้เปปไทด์ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

### ผลการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ *IL-1* และ *IL-6* ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยวิธี qRT-PCR

จากการศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยวิธี real time polymerase chain reaction (qPCR) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับ mRNA ของ Pro-inflammatory cytokine gene ได้แก่ Interleukin-1; *IL-1* และ Interleukin-6; *IL-6* โดยให้เซลล์ RAW264.7 ได้รับสาร LPS เพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีการแสดงออกของยีน *IL-1* และ *IL-6* เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง และให้เซลล์ได้รับ Uncut, PH-P, PH-A เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงเช่นกัน เพื่อดูว่าโปรตีนทั้งสามกลุ่มไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่สนใจ จากนั้นผู้วิจัยจึงทำการพรีทรีตเมนต์ Uncut, PH-P, PH-A เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วตามด้วย LPS เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลในการลดระดับการแสดงออกของยีน *IL-1* และ *IL-6* ด้วยวิธี qRT-PCR จากผลการศึกษาพบว่าโปรตีนทั้งสามกลุ่ม ได้แก่ Uncut, PH-P, PH-A

สามารถลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ *IL-1* และ *IL-6* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเกิดกระบวนการอักเสบนั้นจะพบว่าระบบภูมิคุ้มกันมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุล (homeostasis) ของร่างกาย โดยตัวกระตุ้นต่าง ๆ จะส่งสัญญาณอันตรายต่อระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อให้เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบต่อไป (Mogensen, 2009) และหลั่งสาร pro-inflammatory mediators และ pro-inflammatory cytokines ซึ่งหากหลั่งมากเกินไปจะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดพยาธิสภาพ ส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง หรือกลุ่มโรคเรื้อรัง โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น จากการศึกษา ILterleukin-1 หรือ *IL-1* ที่ถูกผลิตโดยเซลล์หลายชนิด เช่น monocyte และ macrophage เป็นต้น มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจาก *IL-1* และ Toll-like receptor (TLR) ที่มีการทำงานคล้ายคลึงกัน โดยโปรตีนในกลุ่ม *IL-1* ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการอักเสบเพื่อเพิ่มความต้านทานในการตอบสนองต่อการบาดเจ็บหรือการติดเชื้อแบบไม่จำเพาะเจาะจงและการพัฒนาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากแอนติเจนของสิ่งแปลกปลอม (Dinarello et al., 2011) และจากการศึกษา Interleukin-6 หรือ *IL-6* ที่เป็นสารสื่อตัวกลางที่ถูกผลิตขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นระยะเวลาสั้นๆ เพื่อตอบสนองต่อการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อและการติดเชื้อ ซึ่ง *IL-6* มีส่วนช่วยในการปกป้องโฮสต์เซลล์ผ่านการกระตุ้นให้มีการตอบสนองแบบเฉียบพลัน (acute phase responses), การสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (immune reaction) (Kishimoto, 1985) จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *IL-1* และ *IL-6* เป็นไซโตไคน์หลักที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 อีกทั้งยังพบว่ามีระดับการแสดงออกระดับ mRNA และโปรตีนที่เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่ายากกลุ่มที่ต้านการอักเสบส่วนใหญ่สามารถลดการสร้างไซโตไคน์จากการตอบสนองต่อการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ และส่งผลทำให้เซลล์สามารถอยู่รอดและควบคุมกลไกการทำงานได้อย่างปกติ และในงานวิจัยนี้พบว่าผงโปรตีน Uncut, PH-P และ PH-A มีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีน *IL-1* และ *IL-6* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2016 ที่ได้นำข้าวมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสท แล้วศึกษาความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของยีน interleukin-6 (*IL-6*), and interleukin-1 (*IL-1*) โดยจากผลการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากข้าวสามารถลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wen et al., 2016) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้นำข้าวกล้องมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสท โดยเปปไทด์ที่ได้มีขนาด 1.0–3.5 kDa จากผลการศึกษาพบว่าเปปไทด์ที่ได้สามารถลดการแสดงออกระดับ mRNA ของ *IL-1* และ *IL-6* ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ (Feng et al., 2021)

โดยการที่โปรตีนไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของยีน *IL-1* และ *IL-6* ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS อาจจะเนื่องมาจากผลของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการกระตุ้นวิถี NF- $\kappa$ B โดยดูจากงานวิจัยของคุณ Feng และคณะในปี 2021 และยังพบว่าคุณสมบัติในการต้านการอักเสบของโปรตีนไฮโดรไลเซสนี้อาจขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโนที่เรียงต่อกัน เช่น Leu-Asp-Ala-Val-Asn-Arg มีขนาด 686 Da และเปปไทด์ Met-Met-Leu-Asp-Phe ขนาด 655 Da โดยเปปไทด์สองชนิดนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการอักเสบในเซลล์ EA.hy926 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร histamine และไตรเปปไทด์ Pro-Ala-Tyr ขนาด 349.15 สามารถลดการหลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  ในเซลล์ RAW264.7 ที่เหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS ได้ (Ahn et al., 2015) จะเห็นได้ว่าเปปไทด์ที่มีลดระดับการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines นั้นมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบในถั่วดาวอินคาจึงทำให้มีคุณสมบัติในการลดการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ในระดับ mRNA ได้

### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซสจากผงโปรตีนจากถั่วดาวอินคา แล้วนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ และฤทธิ์การต้านมะเร็ง โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซส โดยใช้เอนไซม์สองชนิด ได้แก่ Alcalase และ Papain ผลิตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์คือค่า pH 7.5 ควบคุมอุณหภูมิในการย่อยที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง เนื่องจากผล Degree of hydrolysate มีค่าสูงที่สุด และเมื่อนำมาศึกษาารูปแบบของแถบแบนโปรตีนด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE ก็พบว่าโปรตีนที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดลดลงอยู่ในช่วง 11-17 kDa เมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่ไม่ได้ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ซึ่งสอดคล้องกับค่า %DH หลังจากนั้นจึงนำโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Assay พบว่า Uncut, PH-P และ PH-A มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ผู้วิจัยจึงศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assay พบว่า PH-P และ PH-A มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่สูงกว่า Uncut จากนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 โดยวิธี MTT reduction assay ซึ่งพบว่า PH-P ส่งผงให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น โดยสามารถหาค่า IC<sub>50</sub> ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 985, 645 และ 465  $\mu$ g/ml ตามลำดับ ส่วนกลุ่มทดสอบที่ได้รับ Uncut และ PH-A พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ แต่กลับส่งเสริมให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น และในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ผู้วิจัยได้

ทำการศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วดาวอินคาในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW264.7 ด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ Uncut, PH-P และ PH-A ซึ่งในที่สุดท้ายผู้วิจัยจึงเลือกค่าความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษและไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์เพาะเลี้ยง RAW264.7 คือความเข้มข้น 5 µg/ml ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มาศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ *IL-1* และ *IL-6* โดยวิธี qRT-PCR จากการศึกษาพบว่า Uncut, PH-P และ PH-A ไม่ส่งผลกระทบต่อแสดงออกของยีน *IL-1* และ *IL-6* และเมื่อนำมาทดลองโดยพรีทรีตเมนต์เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วตามด้วยสาร LPS เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนจากถั่วดาวอินคามีความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของยีน *IL-1* และ *IL-6* ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $^{#}p<0.05$  และ  $^{##}p<0.01$  ตามลำดับ

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าโปรตีนจากถั่วดาวอินคา Uncut มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และต้านการอักเสบได้ ส่วน PH-A มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, FRAP, ต้านการอักเสบ และโปรตีนจากถั่วดาวอินคาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดคือ PH-P เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างชัดเจน ดังตารางที่ 3 ซึ่งงานวิจัยนี้ควรนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพตามน้ำหนักโมเลกุล ศึกษาลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน (amino acid sequence) เพื่อให้ทราบโครงสร้างที่ชัดเจนของเปปไทด์ที่ผลิตได้ แล้วนำไปศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการย่อยในระบบทางเดินอาหาร โดยจำลองการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin และ trypsin เพื่อศึกษาเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมายซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการสังเคราะห์โปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารระดับอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 3 สรุปผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ ของโปรตีนจากถั่วดาวอินคา

โปรตีน	ฤทธิ์ทางชีวภาพ			
	DPPH inhibition	FRAP inhibition	Anticancer	Anti- inflammation
Uncut	✓	✓	-	✓
PH-A	✓	✓	-	✓
PH-P	✓	✓	✓	✓

# บรรณานุกรม



- กรมวิชาการเกษตร. (2562). ดาวอินคา พืชมหัศจรรย์ สูดยอดโภชนาการ. (อินเทอร์เน็ต). เข้าถึงได้จาก [http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n17/v\\_10-nov/rai.html](http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n17/v_10-nov/rai.html).
- เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหนาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา, ว.วิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ 1(1): 59-70. ฉบับสมบูรณ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ชมรมฟื้นฟูสุขภาพผู้ป่วยมะเร็ง.(2553). มะเร็งลำไส้ใหญ่. (อินเทอร์เน็ต). เข้าถึงได้จาก <http://www.siamca.com/knowledge-id396.html>
- ณัฐวุฒิ ส่งแสง. (2550). การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสทะเลจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกล้วยเขียวโดยเอนไซม์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทเทคโนโลยีชีวเคมี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ทิพย์วลี และ ศศิธร. (2562). สมบัติเชิงหน้าที่และการประยุกต์ใช้โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม, 14(1), 69-87.
- ปราณี อ่านเปรื่อง.(2547). เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (พิมพ์ครั้งที่ 4 ฉบับปรับปรุงเพิ่มเติม). หน้า 323 – 328
- พิศมัย เหล่าภัทรเกษม. (2547). ฤทธิ์ต้านอักเสบและอาการพิษเฉียบพลันของเถาเอ็นอ่อน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- รังสีรักษาและมะเร็งวิทยา. (2551). ความรู้เกี่ยวกับยาเคมีบำบัด. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. (อินเทอร์เน็ต).เข้าถึงจาก <http://www.chulacancer.net/patient-listpage>. =323.
- วันชัย สมชิต. (2524). ผลของการให้ความร้อนเพื่อทำให้สุกต่อกลิ่นของผักบางชนิด, วารสารเกษตร, 13, หน้า 186-191.
- วิญญู มิตรานันท์. (2540). พยาธิวิทยากายวิภาคพื้นฐาน. หน้า 57-83. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอเอส พริ้นติ้งเฮ้าส์.
- ศิริินภา เชียงหลิว. (2562). ถั่วดาวอินคา .กองการแพทย์ทางเลือก
- Aarden, L. (1985). A growth factor for B cell hybridomas produced by human monocytes. *Lymphokine Res.*, 10, 175-185.
- Ahn, C. B., Cho, Y. S., & Je, J. Y. (2015). Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 168, 151-156.
- Atthaphinan, C., & Lueboonthavatchai, P. (2017). Quality of life and associated factors in colorectal cancer patients with colostomy at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *Chulalongkorn Medical Journal*, 61(3), 387-400.



- Bhat, Z. F., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377-5392.
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Castellano, P., Aristoy, M. C., Sentandreu, M. A., Vignolo, G., & Toldrá, F. (2012). *Lactobacillus sakei* CRL 1862 improves safety and protein hydrolysis in meat systems. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1407-1416.
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*, 245, 205-222.
- Chanput, W., Theerakulkait, C., & Nakai, S. (2009). Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *Journal of Cereal Science*, 49(3), 422-428.
- Chen, C., Chi, Y. J., Zhao, M. Y., & Lv, L. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino acids*, 43(1), 457-466.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(1), 49-53.
- Chirinos, R., Necochea, O., Pedreschi, R., & Campos, D. (2016). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell: an alternative source of phenolic compounds and antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(4), 986-993.
- Chirinos, R., Zorrilla, D., Aguilar-Galvez, A., Pedreschi, R., & Campos, D. (2016). Impact of roasting on fatty acids, tocopherols, phytosterols, and phenolic

- compounds present in *Plukenetia huayllabambana* seed. Journal of Chemistry, 2016.
- Chirinos, R., Zuloeta, G., Pedreschi, R., Mignolet, E., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. Food chemistry, 141(3), 1732-1739.
- Cisneros, F. H., Paredes, D., Arana, A., & Cisneros-Zevallos, L. (2014). Chemical composition, oxidative stability and antioxidant capacity of oil extracted from roasted seeds of Sacha-inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Journal of agricultural and food chemistry, 62(22), 5191-5197.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC– fluorescein) assay. Journal of agricultural and food chemistry, 52(1), 48-54.
- Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 117(14), 3720-3732.
- Eckert, E., Zambrowicz, A., Pokora, M., Polanowski, A., Chrzanowska, J., Szoltysik, M., ... & Trziszka, T. (2013). Biologically active peptides derived from egg proteins. World's Poultry Science Journal, 69(2), 375-386.
- Elliott, W. H., Elliott, D. C., & Jefferson, J. R. (1997). Biochemistry and molecular biology (Vol. 2001, p. 586). Oxford: Oxford University Press.
- Fanali, C., Dugo, L., Cacciola, F., Beccaria, M., Grasso, S., Dacha, M., ... & Mondello, L. (2011). Chemical characterization of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. Journal of agricultural and food chemistry, 59(24), 13043-13049.
- Feng, M., Wang, X., Xiong, H., Qiu, T., Zhang, H., Guo, F., ... & Sun, Y. (2021). Anti-inflammatory effects of three selenium-enriched brown rice protein hydrolysates in LPS-induced RAW264. 7 macrophages via NF- $\kappa$ B/MAPKs signaling pathways. Journal of Functional Foods, 76, 104320.
- Gao, R., Shu, W., Shen, Y., Sun, Q., Jin, W., Li, D., ... & Yuan, L. (2021). Peptide fraction from sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in

LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages via MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Food Science and Human Wellness*, 10(1), 103-111.

- Girgih, A. T., He, R., Hasan, F. M., Udenigwe, C. C., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food chemistry*, 173, 652-659.
- Girón-Calle, J., Vioque, J., Pedroche, J., Alaiz, M., Yust, M. M., Megías, C., & Millán, F. (2008). Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. *Cytotechnology*, 57(3), 263-272.
- Gordon, M. (2001). Antioxidants and food stability. *Antioxidant in food*, 7-21.
- Gonzalez-Aspajo, G., Belkhelifa, H., Haddioui-Hbabi, L., Bourdy, G., & Deharo, E. (2015). Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.), effect on adherence of *Staphylococcus aureus* to human skin explant and keratinocytes in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, 171, 330-334.
- Gorriti, A., Arroyo, J., Quispe, F., Cisneros, B., Condorhuamán, M., Almora, Y., & Chumpitaz, V. (2010). Oral toxicity at 60-days of sachá inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) and linseed (*Linum usitatissimum* L.), and determination of lethal dose 50 in rodents. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, 27(3), 352-360.
- Guillén, M. D., Ruiz, A., Cabo, N., Chirinos, R., & Pascual, G. (2003). Characterization of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil by FTIR spectroscopy and  $^1\text{H}$  NMR. Comparison with linseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(8), 755-762.
- Gutiérrez, L. F., Rosada, L. M., & Jiménez, Á. (2011). Chemical composition of Sachá Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y aceites*, 62(1), 76-83.
- Hamaker, B. R., Valles, C., Gilman, R., Hardmeier, R. M., Clark, D., Garcia, H. H., ... & Lescano, M. (1992). Amino acid and fatty acid profiles of the Inca peanut (*Plukenetia volubilis*). *Cereal Chem*, 69(4), 461-463.
- Hou, H., Fan, Y., Wang, S., Si, L., & Li, B. (2016). Immunomodulatory activity of Alaska pollock hydrolysates obtained by glutamic acid biosensor–Artificial neural

network and the identification of its active central fragment. *Journal of functional foods*, 24, 37-47.

- Hsu, K. C., Li-Chan, E. C., & Jao, C. L. (2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food chemistry*, 126(2), 617-622.
- Hung, C. C., Yang, Y. H., Kuo, P. F., & Hsu, K. C. (2014). Protein hydrolysates from tuna cooking juice inhibit cell growth and induce apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. *Journal of Functional Foods*, 11, 563-570.
- Ikebuchi, K., Wong, G. G., Clark, S. C., Ihle, J. N., Hirai, Y., & Ogawa, M. (1987). Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 9035-9039.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food chemistry*, 121(1), 178-184.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N. S., Lay, J. O., & Liyanage, R. (2010). Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 31(9), 1629-1634.
- Kishimoto, T. (1985). Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annual review of immunology*, 3(1), 133-157.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(1), 43-81.
- Kumar, A., Abbas, A. K., & Jon, C. (2015). *Aster: Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Professional Edition.
- Le, J. M., Fredrickson, G., Reis, L. F., Diamantstein, T., Hirano, T., Kishimoto, T., & Vilcek, J. (1988). Interleukin 2-dependent and interleukin 2-independent pathways of regulation of thymocyte function by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(22), 8643-8647.

- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food chemistry*, 106(2), 444-450.
- Li, Y., Li, J., Lin, S. J., Yang, Z. S., & Jin, H. X. (2019). Preparation of antioxidant peptide by microwave-assisted hydrolysis of collagen and its protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage of RAW264. 7 cells. *Marine drugs*, 17(11), 642.
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *Journal of food science*, 79(3), R273-R283.
- Ma, S., Huang, D., Zhai, M., Yang, L., Peng, S., Chen, C., ... & Xu, M. (2015). Isolation of a novel bio-peptide from walnut residual protein inducing apoptosis and autophagy on cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-14.
- Manley, C. H., & Fagerson, I. S. (1970). Major volatile neutral and acid compounds of hydrolyzed soy protein. *Journal of Food Science*, 35(3), 286-291.
- Manley, C. H., & Fagerson, I. S. (1971). Aroma and taste characteristics of hydrolyzed vegetable protein. *Flavour Ind*, 2(12), 686-90.
- Maurer, N. E., Hatta-Sakoda, B., Pascual-Chagman, G., & Rodriguez-Saona, L. E. (2012). Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food chemistry*, 134(2), 1173-1180.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22(2), 240-273.
- Muangrat, R., Veeraphong, P., & Chantee, N. (2018). Screw press extraction of Sacha inchi seeds: Oil yield and its chemical composition and antioxidant properties. *Journal of food processing and preservation*, 42(6), e13635.
- Mut-Salud, N., Álvarez, P. J., Garrido, J. M., Carrasco, E., Aránega, A., & Rodríguez-Serrano, F. (2016). Antioxidant intake and antitumor therapy: toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

- Nascimento, A. K. L., Melo-Silveira, R. F., Dantas-Santos, N., Fernandes, J. M., Zucolotto, S. M., Rocha, H. A. O., & Scortecci, K. C. (2013). Antioxidant and antiproliferative activities of leaf extracts from *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- National Cancer Institute. (2015). Guidelines for screening, diagnosis and treatment of colorectal cancer. Bangkok: Kosit Press Company Limited
- Nogushi, N., & Niki, E. (1999). Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: Antioxidant status, Diet, Nutrition, and Health (edited by Papas, AM) CRC Press. Washington, DC, 3-19.
- Olsman, H. (1979). Hydrolyzed and autolyzed vegetable proteins as functional food ingredients. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 375-376.
- Park, P. J., Jung, W. K., Nam, K. S., Shahidi, F., & Kim, S. K. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 651-656.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001). Antioxidants in food: practical applications. CRC press.
- Rahman, T., Hosen, I., Towhidul Islam, M. M., & Uddin Shekhar, H. (2012). Oxidative Stress and Human Health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 997-1019.
- Rawdkuen, S., Rodzi, N., & Pinijsuwan, S. (2018). Characterization of sachal inchi protein hydrolysates produced by crude papain and *Calotropis proteases*. *LWT*, 98, 18-24.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd gastroenterologiczny*, 14(2), 89.
- Rider, W. D., Palmer, J. A., Mahoney, L. J., & Robertson, C. T. (1977). Preoperative irradiation in operable cancer of the rectum: report of the Toronto trial. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie*, 20(4), 335-338.

- Sarma, A. D., Mallick, A. R., & Ghosh, A. K. (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3), 185-192.
- Sathe, S. K., Hamaker, B. R., Sze-Tao, K. W. C., & Venkatachalam, M. (2002). Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4906-4908.
- Siow, H. L., Choi, S. B., & Gan, C. Y. (2016). Structure–activity studies of protease activating, lipase inhibiting, bile acid binding and cholesterol-lowering effects of pre-screened cumin seed bioactive peptides. *Journal of functional foods*, 27, 600-611.
- Srichamnong, W., Ting, P., Pitchakarn, P., Nuchuchua, O., & Temviriyankul, P. (2018). Safety assessment of *Plukenetia volubilis* (Inca peanut) seeds, leaves, and their products. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 962-969.
- Štěřbová, L., Hlásná Čepková, P., Viehmannová, I., & Huansi, D. C. (2017). Effect of thermal processing on phenolic content, tocopherols and antioxidant activity of sacha inchi kernels. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), e12848.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3148-3161.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of food science*, 77(1), R11-R24.
- Udenigwe, C. C., & Howard, A. (2013). Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Research International*, 54(1), 1021-1032.
- Vera, R., González-Flores, E., Rubio, C., Urbano, J., Camps, M. V., Ciampi-Dopazo, J. J., ... & Suarez-Artacho, G. (2020). Multidisciplinary management of liver metastases in patients with colorectal cancer: a consensus of SEOM, AEC, SEOR, SERVEI, and SEMNIM. *Clinical and Translational Oncology*, 22(5), 647-662.

- Wang, J. Z., Zhang, H. A. O., Zhang, M., YAO, W. T., MAO, X. Y., & REN, F. Z. (2008). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of porcine plasma albumin and globulin. *Journal of Food Biochemistry*, 32(6), 693-707.
- Wang, S., Zhu, F., & Kakuda, Y. (2018). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. *Food chemistry*, 265, 316-328.
- Wang, Z., & Zhang, X. (2017). Isolation and identification of anti-proliferative peptides from *Spirulina platensis* using three-step hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 918-922.
- Wen, L., Chen, Y., Zhang, L., Yu, H., Xu, Z., You, H., & Cheng, Y. (2016). Rice protein hydrolysates (RPHs) inhibit the LPS-stimulated inflammatory response and phagocytosis in RAW264. 7 macrophages by regulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Rsc Advances*, 6(75), 71295-71304.
- Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research international*, 36(9-10), 949-957.
- Yoshie-Stark, Y., & Wäsche, A. (2004). In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chemistry*, 88(2), 179-184.
- Zhang, Z., Hu, X., Lin, L., Ding, G., & Yu, F. (2019). Immunomodulatory activity of low molecular-weight peptides from *Nibeia japonica* in RAW264. 7 cells via NF- $\kappa$ B pathway. *Marine drugs*, 17(7), 404.
- Zhao, L., Luo, Y. C., Wang, C. T., & Ji, B. P. (2011). Antioxidant activity of protein hydrolysates from aqueous extract of velvet antler (*Cervus elaphus*) as influenced by molecular weight and enzymes. *Natural product communications*, 6(11), 1934578X1100601130.
- Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.
- Zhuang, H., Tang, N., & Yuan, Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1810-1821.



Zielińska, E., Baraniak, B., & Karaś, M. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hydrolysates and peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis of selected heat-treated edible insects. *Nutrients*, 9(9), 970.





ภาคผนวก

## การเตรียมสารเคมี

### งาน Cell culture

#### Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) completed media

DMEM	100	μl
Heat inactivated Fetal bovine serum	10	μl
Antimycotic-antibiotic	1	μl

#### Freezing media

Completed media	9.5	μl
5% DMSO	0.5	μl

#### 5 mg/ml MTT

MTT	5	mg
PBS	1	ml

ละลายให้เข้ากันแล้วกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 μm เก็บไว้ที่ 2-8°C

### งานโปรตีน

#### 2.5 M Tris-HCl pH 8.8 (1000 ml)

Tris base	302.85	g
Distill water	600	ml
ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ 8.8		
ปรับปริมาตรด้วย distill water ให้ได้	1000	ml

#### 3% APS

Ammonium persulfate	0.03	g
Distill water	1	ml

**1X Tricine SDS-PAGE running buffer (1000 ml)**

Tris base	12.1	g
Tricine	17.9	g
SDS	1	g
ปรับปริมาตรด้วย distill water ให้ได้	1000	ml

**Coomassie brilliant blue (R) staining (100 ml)**

Coomassie brilliant blue (R)	0.25	g
Methanol	45	ml
Distill water	45	ml
Glacial acetic acid	10	ml

**Destaining (100 ml)**

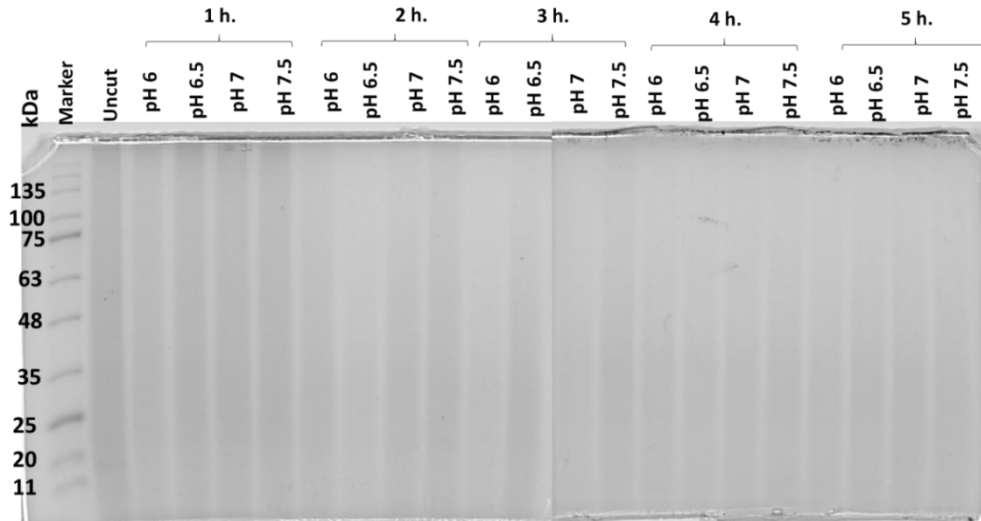
Methanol	45	ml
Distill water	45	ml
Glacial acetic acid	10	ml

**Polyacrylamide gel**

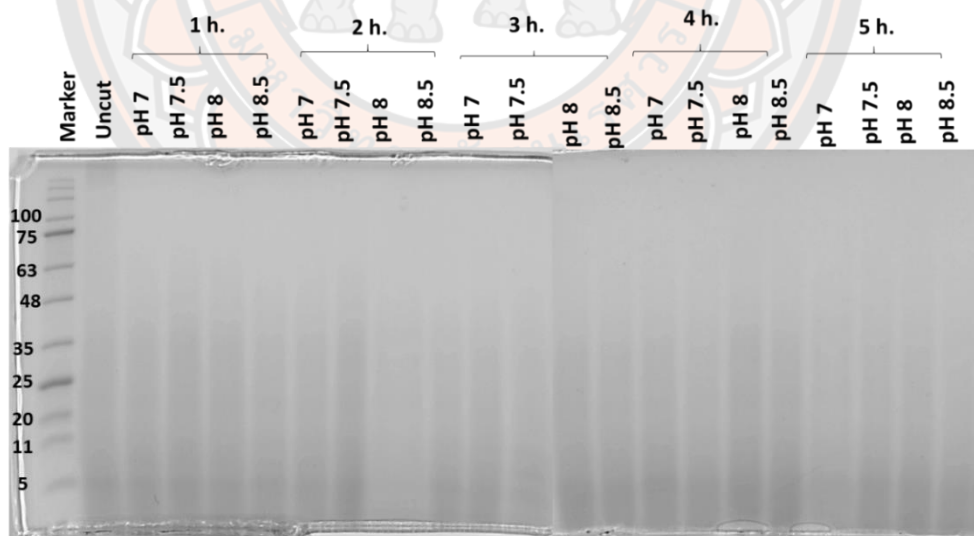
Chemicals	4% gel	10% gel	16% gel
Distill water	3.42 ml	0.9 ml	0.22 ml
Tris 8.8	0.76 ml	5.6 ml	4.3 ml
30% acrylamide	0.66 ml	3.33 ml	5.33 ml
3% APS	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l

## ผลการทดลอง

### 1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเอนไซม์



ภาพแสดง pattern ของผงโปรตีน และโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) ในสภาวะที่ pH 6-7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมงด้วยเทคนิค SDS-PAGE (10% gel separating)



ภาพแสดง pattern ของผงโปรตีน และโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase (PH-A) ในสภาวะที่ pH 7-8.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมงด้วยเทคนิค SDS-PAGE (10% gel separating)

2. การหา % yield ของโปรตีนถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) และ alcalase (PH-A)

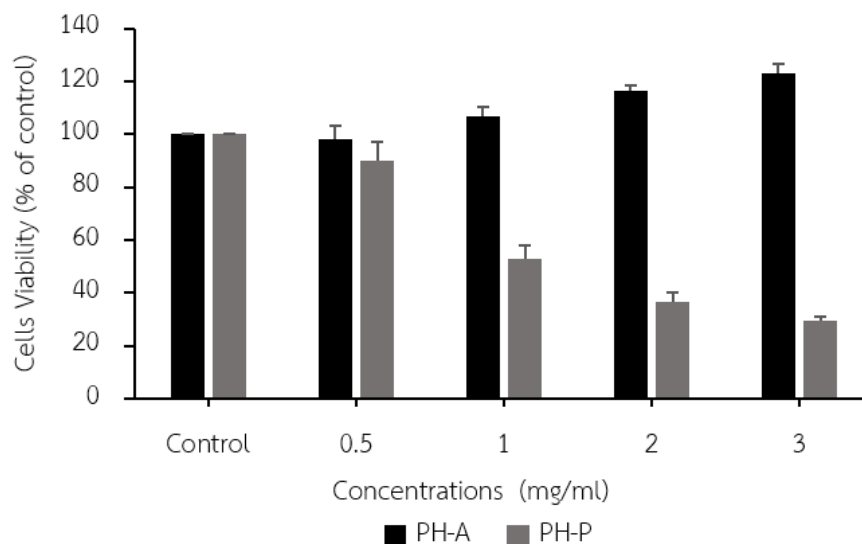
sample	น้ำหนักที่ชั่ง (mg)		% yield	%DH
	ก่อนย่อย	หลังย่อย		
Uncut	600	470	78.3	-
PH-A	600	540	90	77
PH-P	600	573	95.5	79

ตารางแสดง % yield ของโปรตีนถั่วดาวอินคาที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Papain (PH-P) และ alcalase (PH-A) พร้อมแสดงค่าร้อยละการย่อยสลาย (% DH) ที่ระยะเวลา 5 ชั่วโมง โดยคำนวณ % yield ได้ดังนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์}} \times 100$$

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซสที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ alcalase (PH-A) และ papain (PH-P) ปริมาณ 1 mg จะต้องชั่งโปรตีนจากถั่วดาวอินคาตั้งต้นปริมาณ 1.79 และ 1.68 mg เนื่องจากเมื่อนำไปผ่านขั้นตอน defatted และตกตะกอนจึงทำให้น้ำหนักของโปรตีนลดลง

### 3. การศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลซิส (PH-P) และ (PH-A) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.5 mg



ภาพแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 หลังได้รับโปรตีน PH-P และ PH-A ด้วยวิธี MTT reduction assay ที่ความเข้มข้น 0.5-3 mg/ml โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Mean  $2n \pm SD$ )

### 4. ตารางการคำนวณหาระดับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (fold change)

#### 4.1 การแสดงออกของยีน interleukin-1 (*IL-1*) ในเซลล์ RAW264.7 (No.1)

sample	Actin (Mean Ct)	IL-1 (Mean Ct)	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$1.98^{\Delta\Delta Ct}$	S.D.
Control	23.27	28.97	5.70	0.00	1.00	1.00
LPS 1 $\mu g/ml$	20.47	20.74	0.27	-5.43	40.75	0.01
PH-A 5 $\mu g/ml$	20.97	26.36	5.39	-0.31	1.23	0.05
PH-P 5 $\mu g/ml$	20.59	26.48	5.89	0.19	0.88	0.13
Uncut 5 $\mu g/ml$	21.75	27.90	6.15	0.45	0.73	0.06
Pre-treated PH-A with LPS	23.27	27.31	4.04	-1.66	3.10	0.01
Pre-treated PH-P with LPS	20.50	25.90	5.41	-0.29	1.22	0.05
Pre-treated Uncut with LPS	22.18	27.21	5.04	-0.66	1.57	0.02

4.2 การแสดงออกของยีน interleukin-1 (*IL-1*) ในเซลล์ RAW264.7 (No.2)

sample	Actin (Mean Ct)	IL-1 (Mean Ct)	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$1.98^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	S.D.
Control	19.54	28.27	8.74	0.00	1.00	1.00
LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	19.26	22.17	2.92	-5.82	53.27	0.02
PH-A 5 $\mu\text{g/ml}$	19.26	28.01	8.75	0.01	0.99	0.09
PH-P 5 $\mu\text{g/ml}$	18.57	27.45	8.88	0.15	0.90	0.01
Uncut 5 $\mu\text{g/ml}$	19.25	28.19	8.94	0.20	0.87	0.06
Pre-treated PH-A with LPS	18.74	25.93	7.19	-1.54	2.87	0.13
Pre-treated PH-P with LPS	18.87	25.85	6.98	-1.76	3.32	0.11
Pre-treated Uncut with LPS	20.00	27.10	7.10	-1.64	3.06	0.01

4.3 การแสดงออกของยีน interleukin-1 (*IL-1*) ในเซลล์ RAW264.7 (No.3)

sample	Actin (Mean Ct)	IL-1 (Mean Ct)	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$1.98^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	S.D.
Control	19.81	28.74	8.93	0.00	1.00	1.00
LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	18.38	22.20	3.82	-5.11	32.79	0.06
PH-A 5 $\mu\text{g/ml}$	19.48	28.45	8.98	0.05	0.97	0.02
PH-P 5 $\mu\text{g/ml}$	18.44	27.29	8.85	-0.08	1.06	0.14
Uncut 5 $\mu\text{g/ml}$	19.37	28.06	8.69	-0.24	1.18	0.00
Pre-treated PH-A with LPS	20.05	26.38	6.32	-2.61	5.94	0.17
Pre-treated PH-P with LPS	18.72	25.82	7.10	-1.83	3.49	0.12
Pre-treated Uncut with LPS	18.50	26.19	7.69	-1.23	2.32	0.01

4.4 การแสดงออกของยีน interleukin-1 (*IL-1*) ในเซลล์ RAW264.7

การแสดงออกของยีน interleukin-1 ( <i>IL-1</i> )					
sample	1	2	3	mean	S.D.
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	40.75	53.27	32.79	42.27	9.24
PH-A 5 $\mu\text{g/ml}$	1.23	0.99	0.97	1.06	0.13
PH-P 5 $\mu\text{g/ml}$	0.88	0.90	1.06	0.95	0.09
Uncut 5 $\mu\text{g/ml}$	0.73	0.87	1.18	0.93	0.20
Pre-treated PH-A with LPS	3.10	2.87	5.94	3.97	1.53
Pre-treated PH-P with LPS	1.22	3.32	3.49	2.68	1.13
Pre-treated Uncut with LPS	1.57	3.06	2.32	2.32	0.67



4.5 การแสดงออกของยีน interleukin-6 (*IL-6*) ในเซลล์ RAW264.7 (No.1)

sample	Actin (Mean Ct)	IL-1 (Mean Ct)	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$1.92^{\Delta\Delta Ct}$	S.D.
Control	23.27	34.88	11.61	0.00	1.00	1.00
LPS 1 $\mu g/ml$	20.47	22.96	2.49	-9.12	382.79	0.16
PH-A 5 $\mu g/ml$	24.32	37.81	13.49	1.88	0.29	1.61
PH-P 5 $\mu g/ml$	24.61	35.35	10.75	-0.86	1.76	0.79
Uncut 5 $\mu g/ml$	23.69	36.24	12.54	0.93	0.54	0.46
Pre-treated PH-A with LPS	20.96	26.98	6.01	-3.93	12.99	0.04
Pre-treated PH-P with LPS	20.73	27.44	6.71	-3.23	8.24	1.07
Pre-treated Uncut with LPS	21.12	28.83	7.71	-2.23	4.29	0.85

4.6 การแสดงออกของยีน interleukin-6 (*IL-6*) ในเซลล์ RAW264.7 (No.2)

sample	Actin (Mean Ct)	IL-1 (Mean Ct)	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$1.92^{\Delta\Delta Ct}$	S.D.
Control	19.54	29.84	10.31	0.00	1.00	1.00
LPS 1 $\mu g/ml$	19.26	20.29	1.03	-9.27	423.62	0.19
PH-A 5 $\mu g/ml$	19.26	29.36	10.10	-0.21	1.14	0.21
PH-P 5 $\mu g/ml$	18.57	29.05	10.48	0.18	0.89	0.20
Uncut 5 $\mu g/ml$	19.25	29.90	10.65	0.34	0.80	0.33
Pre-treated PH-A with LPS	18.74	26.79	8.05	-2.26	4.35	0.01
Pre-treated PH-P with LPS	18.87	27.07	8.20	-2.10	3.94	0.04
Pre-treated Uncut with LPS	20.00	27.79	7.79	-2.51	5.15	0.07

4.7 การแสดงออกของยีน interleukin-6 (*IL-6*) ในเซลล์ RAW264.7 (No.3)

sample	Actin (Mean Ct)	IL-1 (Mean Ct)	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$1.92^{\Delta\Delta Ct}$	S.D.
Control	19.81	30.78	10.97	0.00	1.00	1.00
LPS 1 $\mu g/ml$	18.38	20.47	2.09	-8.88	327.74	0.02
PH-A 5 $\mu g/ml$	19.48	30.24	10.77	-0.20	1.14	0.05
PH-P 5 $\mu g/ml$	18.44	29.27	10.83	-0.14	1.10	0.21
Uncut 5 $\mu g/ml$	19.37	29.42	10.05	-0.91	1.82	0.11
Pre-treated PH-A with LPS	20.05	27.04	6.98	-3.98	13.45	0.05
Pre-treated PH-P with LPS	18.72	26.83	8.10	-2.86	6.48	0.17
Pre-treated Uncut with LPS	18.50	26.24	7.74	-3.23	8.21	0.09

4.8 การแสดงออกของยีน interleukin-6 (*IL-6*) ในเซลล์ RAW264.7

การแสดงออกของยีน interleukin-6 ( <i>IL-6</i> )					
sample	1	2	3	mean	S.D.
Control	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
LPS 1 µg/ml	382.79	423.62	327.74	378.05	43.04
PH-A 5 µg/ml	0.29	1.14	1.14	0.86	0.44
PH-P 5 µg/ml	1.76	0.89	1.10	1.25	0.40
Uncut 5 µg/ml	0.54	0.80	1.82	1.05	0.60
Pre-treated PH-A with LPS	12.99	4.35	13.45	10.26	4.58
Pre-treated PH-P with LPS	8.24	3.94	6.48	6.22	1.93
Pre-treated Uncut with LPS	4.29	5.15	8.21	5.89	1.84

