



ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของดอกเห็ดหอมและดอกเห็ดเป่าฮื้อที่ผ่านการย่อยโดย
เอนไซม์ย่อยโปรตีน



วรรณกร สากระแสน์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของดอกเห็ดหอมและดอกเห็ดเป่าฮื้อที่ผ่านการย่อยโดย
เอนไซม์ย่อยโปรตีน



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของดอกเห็ดหอมและดอกเห็ดเป่าฮื้อที่ผ่านการ
ย่อยโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน"
ของ วรณกร สากระแสร์
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกียรติวี ชวงศ์โกมล)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัล อรรถรัฐ)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนตรนภิส วรรณิสสร)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของดอกเห็ดหอมและดอกเห็ดเป่าฮื้อที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน
ผู้วิจัย	วรรณภร สากระแสน์
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรงค์ อรรถรัฐ
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. ชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2565
คำสำคัญ	การสังเคราะห์เมลานิน, การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, การต้านอนุมูลอิสระ, โปรตีนไฮโดรไลเซส/เปปไทด์, เห็ดหอม, เห็ดเป่าฮื้อ

บทคัดย่อ

เมลานินเป็นเม็ดสีที่สร้างมาจากเมลานोไซต์ผ่านกระบวนการเมลานินเจเนซิส โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นกุญแจสำคัญเร่งปฏิกิริยาของกระบวนการ หากมีการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางผิวหนัง (hyperpigmentation) ปัจจุบันทางเวชสำอางใช้วิตามินซี อาร์บูติน และ กรดโคจิก ฯลฯ มาเป็นองค์ประกอบผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสหรือลดสารอนุมูลอิสระในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน แต่อย่างไรก็ตามสารกลุ่มดังกล่าวหากใช้ในระยะเวลาและเกิดสะสมในปริมาณมาก อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อเซลล์ผิวหนังได้ ดังนั้นปัจจุบันมีการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเช่นกลุ่มเปปไทด์เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะส่งผลข้างเคียงต่อเซลล์ผิวหนังที่น้อยกว่า ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจในการศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซส (PH) ด้วยเอนไซม์โปรติเอสเพื่อให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa จากดอกเห็ดต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านอนุมูลอิสระ โดยการทดลองแบ่งตัวอย่างเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ เห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (FHm) เห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) เห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) และเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPP) สารสกัดทั้งหมดถูกย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบขนาด Tricine (SDS-PAGE) และวัดระดับการย่อยสลาย (%DH) พบว่าเปปไทด์มีขนาดเล็กกว่า 6.5 kDa โดยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ผ่านการย่อยโดยใช้มิกส์เอนไซม์มีค่าระดับการย่อยสลายสูงกว่าการใช้เอนไซม์เปปซินเพียงชนิดเดียว (DHm 87% และ FHm 86%) ทั้งยังพบว่า DHm มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น (IC_{50} DPPH 1.260 และ ABTS 0.605 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ในขณะที่ FPP มีสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (IC_{50} Tyrosinase inhibition 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ RHAKF (IC_{50} 0.690 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของกรดโคจิก (IC_{50} 0.047 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ตามลำดับ และ FPP มีกลไกการยับยั้งชนิดไม่แข่งขัน หรือ (noncompetitive)

โดยผลสรุปได้ว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขณะที่การย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์อาจช่วยเรื่องต้านอนุมูลอิสระได้ ทั้งยังพบว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดสดทั้ง FHm, FHp และ FPp มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT ในทางตรงข้ามเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/mL เป็นต้นไป ผลวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน (LC-MS) พบลำดับเปปไทด์ที่สนใจ 5 สาย ได้แก่ (1) PATVSIPGV, (2) LTLEEGESVG และ (3) LGERTLDEI เป็นลำดับที่มีความน่าสนใจต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขณะที่ (4) SVTPATIPPY และ (5) VGGLPGGG เป็นลำดับที่มีความน่าสนใจต่อการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free-radical scavenging 0.4042 และ 0.5230 ตามลำดับ) ผลการจำลองการจับกันผ่านเทคนิค Molecular docking พบว่าการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและลิแกนด์ IPGV (PATVSIPGV), TLEE (LTLEEGESVG) และ LGER (LGERTLDEI) มีค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) เท่ากับ 59.92, 79.07 และ 75.39 ตามลำดับ และจับด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นหลัก ซึ่งชี้ให้เห็นว่า TLEE มีการจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ตีดีที่สุด ผู้วิจัยคาดว่าเปปไทด์เหล่านี้ที่ส่งเสริมการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ได้ดีเช่นกัน และผลการทดลองการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดโดยใช้ ITS region สามารถจำแนกสายพันธุ์ดอกเห็ด โดยระบุความเหมือน (identity) ชนิดของเห็ดหอม (*L. edodes*) ได้คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ CC7 (MK940837) มากกว่าร้อยละ 99 ในขณะที่ความเหมือน (identity) ชนิดของเห็ดเป่าฮื้อ (*P. cystidiosus*) ได้คล้ายคลึงกับ *P. cystidiosus* isolate XH004 small subunit ribosomal RNA gene (MW947478.1), *P. cystidiosus* isolate XH006 small subunit ribosomal RNA gene (MW947480.1), *P. cystidiosus* isolate XH008 small subunit ribosomal RNA gene (MW947482.1), *P. cystidiosus* var. *formosensis* CBS 100129 (NR103594.1), *P. cystidiosus* สายพันธุ์ S396 clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882573.1), CGMCC 3.7470 small subunit ribosomal RNA gene (KX787086.1) และ Blao clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882571.1) มากกว่าร้อยละ 94 ตามลำดับ

Title	ANTI-TYROSINASE ACTIVITY OF <i>LENTINUS EDODES</i> AND <i>PLEUROTUS CYSTIDIOSUS</i> FRUITING BODY HYDROLYSATE WITH PROTEOLYTIC ENZYME
Author	Wannaporn Sagasae
Advisor	Assistant Professor Dr. Jongrak Attarat
Academic Paper	M.S. Thesis in Biochemistry, Naresuan University, 2022
Keywords	Melanogenesis Tyrosinase inhibition Antioxidant activity Peptide/Protein hydrolysate <i>Lentinus edodes</i> <i>Pleurotus cystidiosus</i>

ABSTRACT

Melanin is a pigment which is produced from the melanocyte cells by the process called melanogenesis. Tyrosinase is a key enzyme in the melanin production, and its over activity leads to dermatological disorders (hyperpigmentation). Generally, a depigmenting agent may consist of ascorbic acid, arbutin and kojic acid, and many others that are used in cosmetic products to reduce free radicals and melanin synthesis. These substances when used for a long period of time may accumulate in large quantities in the skin, which can result in cytotoxic damage to the melanocyte cells. A discovery of new depigmentation compounds from natural products such as peptides, are able to inhibit tyrosinase activity which may help to reduce the side effects on the skin cells. In this study, the protein hydrolysate (PH) was prepared from fruiting body of Horm (*Lentinus edodes*) and the Paohue (*Pleurotus cystidiosus*) mushrooms. These samples were divided into 4 groups based on enzymatic digestion to obtain peptides that were smaller than 3 kDa in each of the groups: (1) fresh *L. edodes* hydrolyzed with a mixed enzymes (FHm), (2) fresh *L. edodes* hydrolyzed only with pepsin (FHp), (3) dried *L. edodes* hydrolyzed with a mixed enzymes (DHm), (4) Fresh *P. cystidiosus* hydrolyzed only with pepsin (FPp). After the hydrolysis reaction was performed for 24 h, the protein hydrolysates were partially purified using ultrafiltration of MwCO at 10 and 3 kDa. The protein hydrolysates showed molecular weight size of less than 6.5 kDa by Tricine–SDS PAGE. The degree of hydrolysis was

determined by using the TNBS method, while the protein hydrolysates that used the mixed enzymes, showed a higher degree of hydrolysis (%DH) than only using the pepsin (87% DHm and 86% FHm). From the total phenolic compound content assay, DHm also had the highest content of phenolic compounds and antioxidant activity compared to the other protein hydrolysates (IC_{50} DPPH 1.260 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and ABTS 0.605 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Interestingly, the FPp contained less phenolic compounds and lower free radical antioxidant activity, but had the highest tyrosinase inhibitory activity (IC_{50} : 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and its inhibitory ability showed no statistical difference when compared to RHAKF (IC_{50} : 0.690 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and kojic acid (IC_{50} : 0.047 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), respectively. The inhibitory kinetics of FPp was a non-competitive inhibition. This should be concluded that pepsin hydrolysis of the mushroom proteins was effective for inhibiting tyrosinase, while the mixed enzymes may help with antioxidant activity. The cytotoxicity of protein hydrolysate was performed using the MTT assay. It was also found that the protein hydrolysate prepared from FHm, FHp and FPp fresh mushrooms that have nontoxic to normal human keratinocyte cells (HaCaT cell), while the DHm from a dried mushroom was toxic to HaCaT cells at concentrations of more than 1 mg/mL. Amino acid sequencing by LC-MS technic analysis revealed 5 interesting peptide sequences, which were, (1) PATVSIPGV, (2) LTLEEGESVG and (3) LGERTLDEI that are of interest in the study of tyrosinase inhibition, and (4) SVTPATIPPY and (5) VGGLPGGG were also of interest in the study of antioxidant activity (free-radical scavenging of 0.4042 and 0.5230, respectively). The Molecular docking simulation results showed that the binding of the protein tyrosinase and the ligands were, IPGV (PATVSIPGV), TLEE (LTLEEGESVG) and LGER (LGERTLDEI) which had binding energy values of 59.92, 79.07 and 75.39, respectively. This showed that the TLEE ligand had the highest binding capability to the active site of tyrosinase. The researchers assumed that these peptides also promoted the intracellular tyrosinase inhibitory effect. To precisely identify the mushroom strains, DNA barcoding based on the Internal transcribed spacer (ITS) region was performed. The sequence identities of shiitake (*L. edodes*) were higher than 99% which was similar to the *L. edodes* strain CC7 (MK940837), while the sequence identities of abalone (*P. cystidiosus*) were similar to the *P. cystidiosus* isolate XH004 small subunit ribosomal RNA gene

(MW947478.1), *P. cystidosus* isolate XH006 small subunit ribosomal RNA gene (MW947480.1), *P. cystidosus* isolate XH008 small subunit ribosomal RNA gene (MW947482.1), *P. cystidosus* var. *formosensis* CBS 100129 (NR103594.1), *P. cystidosus* stain S396 clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882573.1), CGMCC 3.7470 small subunit ribosomal RNA gene (KX787086.1), and Blao clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882571.1) were higher than 94%, respectively.



ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผศ.ดร.จรงค์ อรรถรัฐ ประธานที่ปรึกษางานวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ที่ได้กรุณาสับสนุน และช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นต้องขอขอบพระคุณรศ.ดร.เกียรติทิวิ ชวงศ์โกมล รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และผศ.ดร.เนตรนภิส วรรณิสสร อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิระดับปริญญาโท ตลอดจนกรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษาและปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของทุกๆ ท่าน จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณความอนุเคราะห์ในผลการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์จาก รศ.ดร. วรศักดิ์ แก้วก่อง อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ขอขอบพระคุณการส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจากดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และขอขอบพระคุณความอนุเคราะห์ในการติดตั้งโปรแกรม GOLD 2022.2.0 จากรศ.ดร.เกียรติทิวิ ชวงศ์โกมล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การอุปการะอบรมเลี้ยงดู คอยส่งเสริมการศึกษา ส่งเสริมค่าใช้จ่ายต่างๆ ตลอดจนคอยให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

ขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือกันมาโดยตลอด ให้คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ และได้แสดงความมีน้ำใจต่อกัน รวมถึงอำนวยความสะดวกในการให้ยืมเครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์ต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อีกทั้งงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรม (NRCT) จากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2564

ท้ายที่สุดต้องขอขอบพระคุณเจ้าของเอกสารและงานวิจัยทุกๆ ท่าน ที่ผู้วิจัยได้ค้นคว้านำมาอ้างอิงในการทำวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ญ
สารบัญตาราง.....	ฒ
สารบัญภาพ.....	ต
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ปัญหาและที่มาของปัญหา (Statement of the Problem).....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	2
ความสำคัญของการวิจัย (Significance).....	2
ขอบเขตงานวิจัย (Limitation).....	2
ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption).....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ (Definition of Terms).....	4
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	4
บทที่ 2.....	5
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Related Literature).....	5
1. เมลานิน (Melanin).....	5
ฟีโอเมลานโซม (Pheomelanosome).....	6

ยูเมลานโนโซม (Eumelanosome).....	6
2. เมลานินกับสีผิว	6
3. กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Melanogenesis).....	10
4. เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)	14
5. สารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	15
1. อาร์บูติน (Arbutin).....	16
2. กรดโคจิก (Kojic acid).....	17
3. วิตามินซี (Vitamin C).....	18
4. เปปไทด์ (Peptide).....	19
6. การประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยโดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง.....	26
7. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลสเสท.....	27
1. การเกิดโปรตีนไฮโดรไลสเสทโดยธรรมชาติ.....	28
2. การย่อยสลายด้วยสารเคมี.....	28
2.1. การย่อยสลายด้วยกรด	28
2.2. การย่อยสลายด้วยด่าง	28
2.3. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์	29
8. คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส	29
ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส	30
9. ชนิดเอนไซม์โปรติเอสที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย.....	30
มิกซ์เอนไซม์ หรือซูเปอร์เอนไซม์ (Super Enzymes).....	30
1.1 Pancreatin.....	31
1.2 Bromelain (EC 3.4.22.32).....	31

1.3	Pepsin (EC 3.4.23.1).....	32
1.4	Papain (EC 3.4.22.2).....	33
1.5	Cellulase (E.C.3.2.1.91).....	34
10.	ชนิดของเห็ดที่นำมาศึกษา.....	35
10.1	เห็ดหอม.....	35
10.2	เห็ดเป่าฮื้อ.....	43
11.	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต.....	52
12.	ระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์.....	55
บทที่ 3	63
วิธีดำเนินงานวิจัย (Research Method)	63
1.	กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	63
2.	เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	63
3.	วิธีดำเนินการ.....	66
3.1	การสกัดโปรตีน.....	66
3.1.1	การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดแห้ง.....	66
3.1.2	การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดสด.....	66
3.1.3	การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์โปรติเอส.....	67
3.1.4	การคัดแยกเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน.....	68
3.2	การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี TNBS (Trinitrobenzenesulphonic acid).....	68
3.3	การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	69
3.4	การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	69

3.4.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	69
3.4.2 การศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	69
3.5 การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu.....	70
3.6 การวิเคราะห์ศึกษาดูรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน ด้วยวิธี Tricine (SDS-PAGE).....	70
3.7 การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์โดยเทคนิค Mass spectrum.....	70
3.8 การศึกษาการจำลองการจับกัน 3 มิติด้วยโปรแกรม Molecular Docking.....	71
3.9 การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Enzyme Kinetic).....	71
3.10 การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดเปปไทด์	72
3.10.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT	72
3.10.2 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ด้วยเทคนิค MTT assay.....	72
3.11 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ DNA barcode และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree.....	72
3.11.1 การสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ.....	72
3.11.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR	72
3.11.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และวิเคราะห์ Phylogenetic tree	73
3.12 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล.....	73
บทที่ 4.....	74
ผลการวิจัย (Research Results).....	74
4.1 ผลการหาปริมาณโปรตีน.....	74

4.2 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี TNBS (Trinitrobenzenesulphonic acid)	75
4.3 การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	78
4.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	82
4.4.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	82
4.4.2 การศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	85
4.5 การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound)...	88
4.6 การวิเคราะห์ศึกษาดูรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน ด้วยวิธี Tricine (SDS-PAGE)	89
4.7 การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์โดยเทคนิค Mass spectrum.....	95
4.8 การศึกษาการจำลองการจับกัน 3 มิติด้วยโปรแกรม Molecular Dockings.....	112
4.9 การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Enzyme Kinetic).....	120
4.10 การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดเปปไทด์	128
4.11 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ DNA barcodes และวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree	132
บรรณานุกรม	160
ภาคผนวก.....	183
ประวัติผู้วิจัย	205

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงชนิดของสีผิว Fitzpatrick phototype	6
ตารางที่ 2 ค่า IC ₅₀ ของสารประกอบในเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ในธรรมชาติที่รู้จัก.....	22
ตารางที่ 3 องค์ประกอบกรดอะมิโนที่จำเป็นของเห็ดและเคซีนตามมาตรฐาน FAO/WHO	39
ตารางที่ 4 ปริมาณกรดอะมิโนในเห็ดหอม (<i>Lentinula edodes</i>).....	40
ตารางที่ 5 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเห็ดสกุล <i>Pleurotus</i>	46
ตารางที่ 6 องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนจากเห็ดไฮโดรไลเสท (MPH).....	47
ตารางที่ 7 สรุปภาวะการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส	67
ตารางที่ 8 ผลการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และแสดงค่า Yield(%)	74
ตารางที่ 9 แสดงค่าระดับการย่อยสลายของสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท.....	77
ตารางที่ 10 แสดงค่า TEAC และค่า IC ₅₀ ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทและสารมาตรฐาน.....	88
ตารางที่ 11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท.....	89
ตารางที่ 12 ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot และค่า Free-radical scavenging (FRS) ของเห็ดแปะฮื่อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPp)	97
ตารางที่ 13 ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot และค่า Free-radical scavenging (FRS) ของเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp).....	100
ตารางที่ 14 ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot และค่า Free-radical scavenging (FRS) ของเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (FHm).....	102

ตารางที่ 15 ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot และค่า Free-radical scavenging (FRS) ของ เห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm)	105
ตารางที่ 16 ลำดับเปปไทด์ที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอส.....	108
ตารางที่ 17 สรุปรดอะมิโนตามกลุ่มฤทธิ์ชีวภาพต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	111
ตารางที่ 18 สรุปรการแยกกรดอะมิโนออกตามกลุ่มฤทธิ์ชีวภาพต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระ.....	112
ตารางที่ 19 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ RHAKF และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)	114
ตารางที่ 20 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ IPGV และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)	116
ตารางที่ 21 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ TLEE และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)	118
ตารางที่ 22 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ LGER และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)	120
ตารางที่ 23 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (v_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง kojic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mM)	121
ตารางที่ 24 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (v_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง RHAKF ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL)	122
ตารางที่ 25 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (v_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง DHm ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL)	123

ตารางที่ 26 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง FHm ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL) 124

ตารางที่ 27 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง FHp ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL) 125

ตารางที่ 28 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง FPP ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL) 126

ตารางที่ 29 สรุปการวิเคราะห์ชนิดของกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 127

ตารางที่ 30 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมแห้งหลังทำการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 128

ตารางที่ 31 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมสดหลังทำการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 130

ตารางที่ 32 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดเป่าฮื้อสดหลังทำการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 131

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ลักษณะของสารเมลานิน (Pheomelanin ; A) และ (Eumelanin ; B).....	5
ภาพ 2 กระบวนการสร้างเม็ดสีกระตุ้นเซลล์เมลานोไซโตโดยตรง.....	8
ภาพ 3 กระบวนการสร้างเม็ดสีโดยกระตุ้นเคราติโนไซต์.....	8
ภาพ 4 ภาพแสดงการทะลุทะลวงของรังสีที่มีความยาวคลื่นต่างๆ เข้าไปในผิวหนัง.....	9
ภาพ 5 กระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Melanogenesis).....	12
ภาพ 6 ลักษณะโครงสร้างการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไทโรซิเนสในมนุษย์ (hTyr) และ Isoenzymes Ab PPO3 และ Ab PPO4 ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mTyr).....	13
ภาพ 7 หน้าที่ของเมลานินในพืงใจ.....	14
ภาพ 8 ตัวอย่างปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	15
ภาพ 9 โครงสร้างและบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	15
ภาพ 10 โครงสร้างที่มีลักษณะหมู่มูฟกัซันคล้ายกัน.....	16
ภาพ 11 กระบวนการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยสารอาร์บูติน.....	17
ภาพ 12 โครงสร้างของกรดโคจิก.....	17
ภาพ 13 กระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินโดยกรดโคจิก.....	18
ภาพ 14 โครงสร้างของวิตามินซี.....	18
ภาพ 15 Stereo isomer ของกรดอะมิโน (ยกเว้น glycine) มี 2 ชนิด ได้แก่ L-form และ D-form.....	20
ภาพ 16 โครงสร้างเปปไทด์ประกอบด้วยปลายเอ็น (N-terminal) และปลายซี (C-terminal).....	20

ภาพ 17 เปปไทด์ซึ่งเกิดจากกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันเป็นสายด้วยพันธะเพปไทด์20

ภาพ 18 อาการข้างเคียงจากการใช้ครีมที่มีส่วนผสมของปรอท ผิวมีลักษณะเป็นรอยต่าง
ขาวและฝ้า22

ภาพ 19 แสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosine; A และ L-DOPA; B) สีฟ้าแทนด้วย
สารไฮโดรควิโนน (HQ) และสีน้ำเงินแทนด้วยสารสกัดโอลิโกเปปไทด์ (Lumixyl) ในระดับ
ความเข้มข้นที่ต่างกัน23

ภาพ 20 (A) แสดงการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน/เซลล์เมลานโนไซต์จากสารไฮโดร
ควิโนน (HQ) และสารสกัดโอลิโกเปปไทด์ (Lumixyl) ที่ความเข้มข้น 10 μ M (B) แสดงผล
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง.....24

ภาพ 21 การยับยั้งของเปปไทด์แต่ละชนิดต่อปฏิกิริยาโมโนฟีโนเลสของเอนไซม์ไทโรซิเนส
.....25

ภาพ 22 ผลของเปปไทด์แต่ละชนิดต่อปริมาณเมลานินและความมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง
ผิวหนังชนิดเมลานوما B16 ของหนู (A) ปริมาณเมลานินสัมพัทธ์ 3 วันหลังการรักษาด้วย
เปปไทด์ (B) ความมีชีวิตของเซลล์ 3 วันหลังการบำบัดด้วยเปปไทด์เมื่อตรวจวิเคราะห์โดย
ใช้วิธี MTT25

ภาพ 23 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยเซลล์ keratinocyte .27

ภาพ 24 ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์โบรมีเลน.....32

ภาพ 25 ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์เปปซิน33

ภาพ 26 ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์ปาเปน.....34

ภาพ 27 เห็ดหอม (*Lentinula edodes*)35

ภาพ 28ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารสกัดจากผลของเห็ดหอมที่ความเข้มข้นต่างๆ41

ภาพ 29 ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดที่กินได้ห้าชนิดโดยใช้: (A) น้ำ; (B)
50% (v/v) ethanol; (C) diethyl ether; เมื่อเทียบกับ butylated hydroxyanisole (BHA)
และ α -tocopherol ทดสอบด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity42

ภาพ 30 เห็ดเป่าฮื้อ (Pleurotus cystidiosus).....	43
ภาพ 31 HPLC chromatogram (λ 280nm) elution profile (A) pure phenolic and flavonoids standards mixture (B) สารสกัดเห็ด P. ostreatus และ (C) L. edodes	49
ภาพ 32 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH, ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเห็ดตระกูล oyster.....	50
ภาพ 33 Morphology ของเซลล์คีราตินไนไซต์ (A, C, E) และเซลล์มะเร็งเมลาโนมาของหนู (B, D, F) เมื่อกำหนดให้ (A, B) คือหลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงใน DMEM; (C, D) บ่มด้วยสารสกัดที่ฉายรังสี UV-B และ (E, F) บ่มด้วยสารสกัดที่ไม่ฉายรังสี.....	51
ภาพ 34 ความมีชีวิตของเซลล์ (%) ของเคอราตินไนไซต์ของมนุษย์ (A) และเซลล์มะเร็งเมลาโนมาของหนู (B) หลังการรักษาด้วยสารสกัดที่ไม่ฉายรังสีและฉายรังสี.....	52
ภาพ 35 แสดงปริมาณกรดฟีนอลและเออร์โกสเตอรอลในสารสกัดเอทานอลจากเห็ดและในสูตรเวชสำอาง (Table1) และแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดเอทานอลและสูตรเวชสำอาง (Table2).....	52
ภาพ 36 โครงสร้างของบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)	53
ภาพ 37 แสดงภาพรวมกระบวนการจำลองการจับกันของโมเลกุล.....	56
ภาพ 38 แบบจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุลของไทโรซิเนสและลิแกนด์ระหว่าง 4c 6b และ 6c.....	59
ภาพ 39 แบบจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุลของไทโรซิเนสและลิแกนด์ (A) แบบจำลอง 3 มิติของ NYRRE (B) ภาพ 2 มิติของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง NYRRE กับเอนไซม์ไทโรซิเนส (C) แบบจำลอง 3 มิติของ RHAKF (D) ภาพ 2 มิติของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง RHAKF กับ เอนไซม์ไทโรซิเนส.....	60
ภาพ 40 แบบจำลอง 2 มิติ แสดงการจับกันระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนสและลิแกนด์ (A) ...การจับบริเวณ Active site BC3 ของสาย RHAKF (B) การจับบริเวณ Active site BC7 ของสาย RHAKF (C) การ จับบริเวณ Active site AC8 ของสาย RHAKF (D) การจับบริเวณ Active site BC3 ของสาย NYRRE	61

ภาพ 41 ปฏิสัมพันธ์ EF-5 กับเอนไซม์ไทโรซิเนส (A) แบบจำลอง 3 มิติ (B) แบบจำลอง 2 มิติ	62
ภาพ 42 แผนภูมิแท่งแสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลสเสทด้วยวิธี TNBS ระหว่างสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) และมิกส์เอนไซม์ (FHm) ขนาด <3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ	75
ภาพ 43 แผนภูมิแท่งแสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลสเสทด้วยวิธี TNBS ระหว่างสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) ขนาด <3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ	76
ภาพ 44 แผนภูมิแท่งแสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลสเสทด้วยวิธี TNBS ระหว่างสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPP) ขนาด <3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ	77
ภาพ 45 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) และมิกส์เอนไซม์ (FHm) ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	78
ภาพ 46 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทเห็ดหอมสดใน 96 well-plate	79
ภาพ 47 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	80
ภาพ 48 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทเห็ดหอมแห้งใน 96 well-plate	80
ภาพ 49 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วย..... เอนไซม์เปปซิน (FPP) ความเข้มข้นโปรตีน 0.05, 0.1, 0.25, และ 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	81

ภาพ 50 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทเห็ดเป่าฮื้อใน 96 well-plate.....	81
ภาพ 51 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) และมิกส์เอนไซม์ (FHm) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL.....	83
ภาพ 52 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL.....	84
ภาพ 53 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าฮื้อที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL.....	84
ภาพ 54 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) และมิกส์เอนไซม์ (FHm) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL.....	85
ภาพ 55 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL.....	86
ภาพ 56 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL.....	87
ภาพ 57 รูปแบบการแสดงออกของสารสกัดเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) ด้วยวิธี Tricine (15% SDS-PAGE).....	90
ภาพ 58 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ Software analyzed.....	91

ภาพ 59 รูปแบบการแสดงผลของสารสกัดหยาบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วย (A) มิกส์เอนไซม์ (FHm) และ (B) เอนไซม์เปปซิน (FHp) ด้วยวิธี Tricine (15%SDS-PAGE)	92
ภาพ 60 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ Software analyzed จากเห็ดหอมสดเมื่อย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (A) และเอนไซม์เปปซิน (B).....	93
ภาพ 61 รูปแบบการแสดงผลของสารสกัดหยาบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดป่าที่สกัดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPp) ด้วยวิธี Tricine (15% SDS-PAGE).....	94
ภาพ 62 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ Software analyzed.....	95
ภาพ 63 การศึกษา Molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) (A) ภาพ 3D ของการ interactions ระหว่าง RHAKF (B) แบบจำลองการจับกันแบบ 2D.....	113
ภาพ 64 การศึกษา Molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) (A) ภาพ 3D ของการ interactions ระหว่าง IPGV (B) แบบจำลองการจับกันแบบ 2D.....	115
ภาพ 65 การศึกษา Molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) (A) ภาพ3D ของการ interactions ระหว่าง TLEE (B) แบบจำลองการจับกันแบบ 2D	117
ภาพ 66 การศึกษา Molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) (A) ภาพ 3D ของการ interactions ระหว่าง LGER (B) แบบจำลองการจับกันแบบ 2D.....	119
ภาพ 67 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้งkojic acid (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_o) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot	ตาม

- สมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ 121
- ภาพ 68 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง RHAKF (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ 122
- ภาพ 69 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง DHm (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ 123
- ภาพ 70 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง FHm (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ 124
- ภาพ 71 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง FHp (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ 125

ภาพ 72 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้งFPp (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ 126

ภาพ 73 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ หลังทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ 129

ภาพ 74 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์และเอนไซม์เปปซินตามลำดับ หลังทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 131

ภาพ 75 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าฮื้อที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน หลังทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 132

ภาพ 76 แสดง ITS4-5 PCR-product ของเห็ดหอมแห้ง (*L. edodes*) เมื่อ Lane M; DNA size markers, Lane1; 50 ug, Lane2; 100 ug and Lane3; Negative control 133

ภาพ 77 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จาก DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดหอม(แห้ง) กับฐานข้อมูลใน GenBank..... 134

ภาพ 78 แสดง ITS4-5 PCR-product ของเห็ดหอมสด (*L. edodes*) เมื่อ Lane M; DNA size markers, Lane1; 50 ug, Lane2; 100 ug and Lane3; Negative control 134

ภาพ 79 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จาก DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดหอม(สด) กับฐานข้อมูลใน GenBank..... 136

ภาพ 80 แสดง ITS4-5 PCR-product ของเห็ดเป่าฮื้อ (*P. cystidiosus*) เมื่อ Lane M; DNA size markers, Lane1; 50 ug, Lane2; 100 ug and Lane3; Negative control 136

ภาพ 81 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จาก DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดเป่าฮื้อ(สด) กับฐานข้อมูลใน GenBank..... 137

ภาพ 82 แผนภาพสรุปผลงานวิจัย 158



บทที่ 1

บทนำ

ปัญหาและที่มาของปัญหา (Statement of the Problem)

ปัญหาผิวหนังกระ ฝ้า จุดต่างดํา ล้วนเกิดจากการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่มากเกินไป ก่อให้เกิดความผิดปกติของเม็ดสีเรียกว่า ภาวะ “Hyperpigmentation” หมายถึง ภาวะที่มีการสะสมของเมลานินผิดปกติ ส่งผลให้ผิวหนังมีสีเข้มขึ้นหรือดําคล้ำขึ้น เป็นลักษณะการแสดงออกทางผิวหนังทั่วไป เช่น ฝ้า กระ จุดต่างดํา เป็นต้น โดยมีกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Melanogenesis) ในผิวหนังเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กำหนดอัตราการควบคุมการผลิตเมลานินเป็นปัจจัยหลัก ทั้งนี้หากเอนไซม์ไทโรซิเนสมีการผลิตหรือทำงานที่มากเกินไปส่งผลให้เกิดภาวะ Hyperpigmentation ดังกล่าวได้ ดังนั้นในปัจจุบันได้รับความนิยมนำการนํากรดโคจิก อาร์บูติน และวิตามินซีมาใช้เป็นส่วนประกอบในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่หากใช้ในปริมาณที่สูงหรือถูกสะสมในร่างกายเป็นเวลานาน อาจส่งผลข้างเคียงต่อผิวหนังได้ ปัจจุบันสารสกัดเปปไทด์เป็นหนึ่งในสารสกัดจากธรรมชาติ ที่ได้รับความนิยมและมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ การวิจัยสถิติทางการตลาดเปิดเผยว่าตลาดการสังเคราะห์เปปไทด์เครื่องสำอางในช่วงคาดการณ์ (2565-2575) จะมี Compound Annual Growth Rate อัตราเติบโตเพิ่มขึ้นที่ 5.6% ของตลาดทั่วโลก ซึ่งนี้จะแสดงให้เห็นถึงการพัฒนาเปปไทด์สังเคราะห์ที่ใหม่ที่น่าสนใจและมีแนวโน้มการเติบโตสูงขึ้น

ส่วนฟรุ๊ตติ้งบอดี (fruiting body) หรือดอกเห็ดหอมและดอกเห็ดเป๋าฮื้ออุดมไปด้วยแหล่งโปรตีนและกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติต่างๆ มีสรรพคุณทางยาและรักษาโรคหลากหลาย เหมาะแก่การนำมาผลิตเป็นเปปไทด์ซึ่งผ่านกระบวนการย่อยเป็นโปรตีนไฮโดรไลสเสทด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ทั้งนี้มีรายงานว่าเปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะมีส่วนช่วยในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดูดซึม และมีความคงตัวของสารสกัดที่ดีมากยิ่งขึ้น

โมเลกุลาร์ดีocking (Molecular docking) เป็นการศึกษากลศาสตร์เชิงโมเลกุลโดยศึกษา ลักษณะการจับกันหรืออันตรกิริยาระหว่างอะตอมของ 2 โมเลกุลหรือมากกว่า เช่นตัวรับ หรือลิแกนด์ เช่น เอนไซม์กับตัวยับยั้ง เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำ molecular docking มาใช้ในการศึกษาสารชีวเคมีพวกโปรตีนอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบยาหรือลิแกนด์ได้ การศึกษาโมเลกุลาร์ดีocking ต้องใช้โปรแกรมแสดงผลเป็น 3 มิติเพื่อให้เข้าใจอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นได้ชัดเจน ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่มีเป้าหมายในการศึกษาการเข้าจับของตัวยา หรือลิแกนด์ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาและบริเวณยึดจับกันของโปรตีนหรือตัวรับ เพื่อค้นหาโครงสร้างที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เกิดยับยั้งหรือลดการทำงานลง

จากปัญหาและข้อมูลทั้งหมดจึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาผลโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมและเห็ดเป่าฮื้อต่อการออกฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและศึกษาโมเลกุลาร์ด็อกกิง เพื่อค้นหาแรงกระทำระหว่างโมเลกุลกับเอนไซม์เป้าหมาย โดยผู้วิจัยคาดว่า สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสดังกล่าวจะสามารถต่อยอดและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากดอกเห็ดหอมและเห็ดเป่าฮื้อต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากดอกเห็ดหอมและเห็ดเป่าฮื้อเปรียบเทียบกับเปปไทด์สังเคราะห์และสารมาตรฐาน เช่น กรดโคจิก
3. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของผลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ในผิวหนัง (เซลล์ HaCaT)
4. เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและคำนวณการเกิดอันตรกิริยา และพลังงานการยึดจับระหว่างตัวยับยั้งจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสต่อบริเวณการจับเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง (Molecular docking)

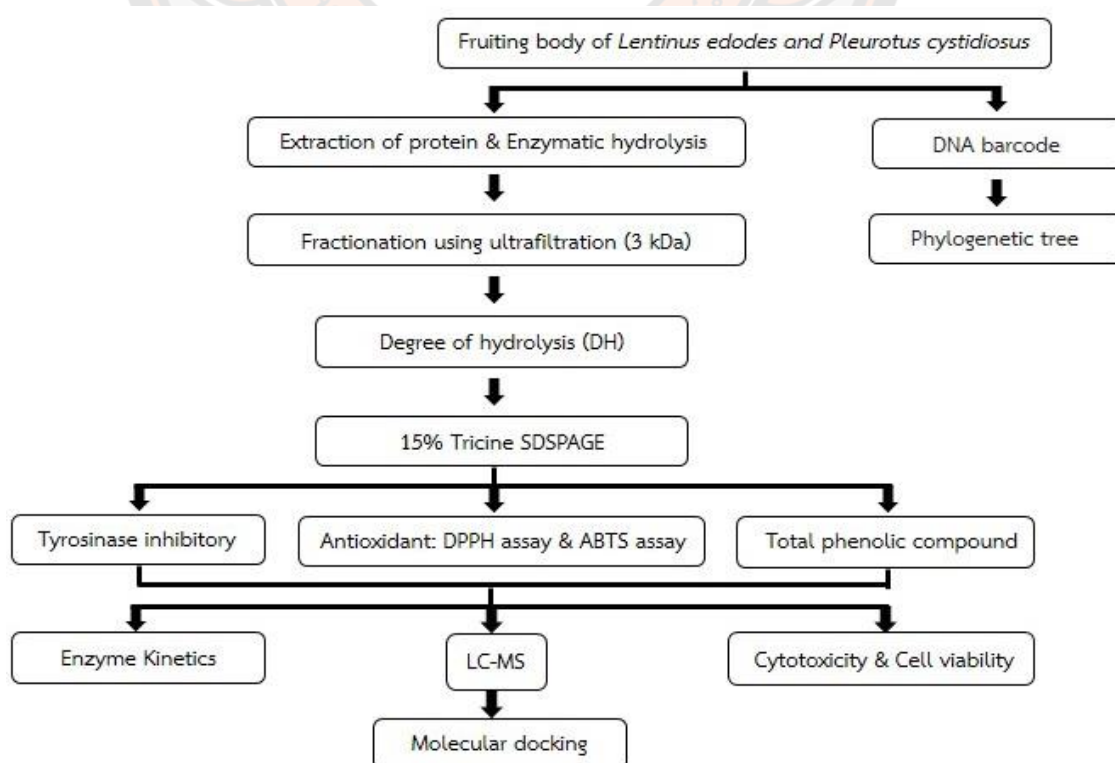
ความสำคัญของการวิจัย (Significance)

1. ทำให้ทราบโครงสร้างการเกิดอันตรกิริยาและทราบค่าการกระจายตัวของพลังงานการจับ (Binding energy) ระหว่างตัวยับยั้งจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสต่อบริเวณการจับของเอนไซม์ไทโรซิเนส
2. เพื่อเป็นแนวทางในการออกแบบตัวยับยั้งหรือพัฒนาสารสกัดใหม่ให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์และเป็นพิษกับเซลล์ผิวหนังน้อยกว่าตัวยับยั้งที่มีอยู่เดิม
3. เห็ดหอมและเห็ดเป่าฮื้ออุดมไปด้วยแหล่งโปรตีนและคุณประโยชน์ต่างๆ เหมาะแก่การนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลสเพื่อพัฒนาและต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อีกทั้งเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของเห็ดทางเศรษฐกิจต่อไปได้

ขอบเขตงานวิจัย (Limitation)

1. เตรียมสารสกัดโปรตีนจากดอกเห็ดภายใต้สภาวะการใช้เอนไซม์โปรติเอสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดแยกสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสให้มีขนาดเล็กกว่า 6.5 กิโลดาลตัน

2. ศึกษาการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี TNBS (Trinitrobenzene- sulfonic acid)
3. แยกวิเคราะห์โปรตีนเพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส (Protein profile) ด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE
4. ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
5. วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสโดยเทคนิค Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS)
6. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสต่อเซลล์ HaCaT โดยวิธี MTT
7. ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme kinetics) หรือกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส
8. ศึกษาลักษณะโครงสร้างและคำนวณการเกิดอันตรกิริยา และพลังงานการยึดจับระหว่างตัวยับยั้งจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสต่อบริเวณการจับของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเทคนิค Molecular docking
9. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดเพื่อระบุความจำเพาะจากบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) และวิเคราะห์ผ่าน Phylogenetic tree



ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้ ตลอดจนพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้องปลอดภัยจากสารปนเปื้อนและสารต้องห้ามที่ใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง อันได้แก่ สารปรอท สารไฮโดรควิโนน สเตียรอยด์ เป็นต้น

นิยามศัพท์เฉพาะ (Definition of Terms)

(ภาษาไทย) การสังเคราะห์เมลานิน, การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, การต้านอนุมูลอิสระ, โปรตีนไฮโดรไลส/เปปไทด์, เห็ดหอม, เห็ดเป๋าฮื้อ

(ภาษาอังกฤษ) Melanogenesis, Tyrosinase inhibition, Antioxidant activity, Peptide/Protein hydrolysate, *Lentinus edodes*, *Pleurotus cystidosus*

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

1. สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากดอกเห็ดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้และใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดโคจิก
2. สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากดอกเห็ดจะมีความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนัง
3. สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากดอกเห็ดสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือกลุ่มบำรุงผิวในอนาคตต่อไปได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Related Literature)

1. เมลานิน (Melanin)

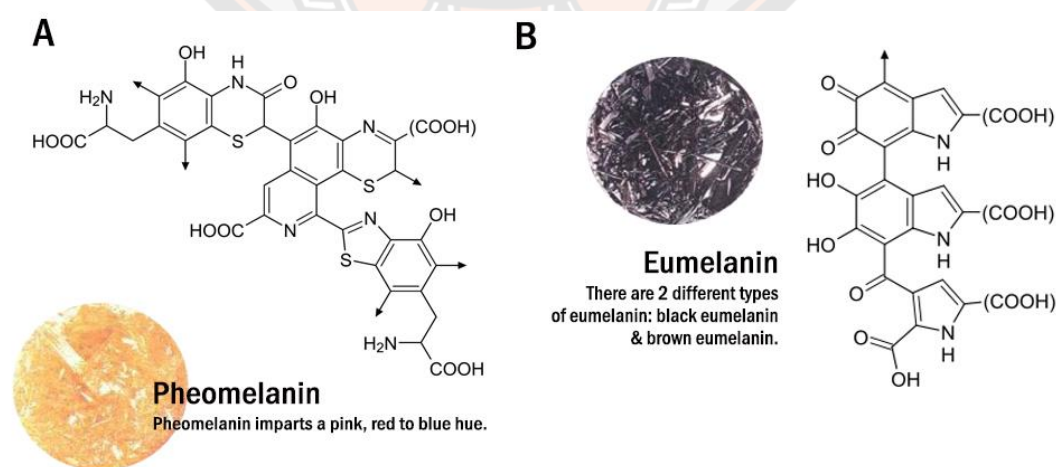
สารเมลานิน (Melanin) หรือเม็ดสีที่สร้างมาจากเมลานोไซต์ (Melanocyte) เป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์ระบบประสาท (neural crest) ในระยะเอ็มบริโอของมนุษย์ แทรกตัวอยู่ในชั้นหนังกำพร้าส่วน stratum basale โดยเซลล์เมลานोไซต์หนึ่งเซลล์จะแตกแขนงเป็นร่างแหเล็กๆ ลักษณะยื่นไซโตพลาสซึม (dendritic cell) ไปเกาะติดกับเซลล์ตัวอื่นในชั้นหนังกำพร้า (Keratinocyte) (Kumpol Aiempanakit, 2015)

เมลานอไซต์จะสร้างสารเมลานินบรรจุในแคปซูลเรียกว่า เมลาโนโซม (Melanosome) เมื่อสังเคราะห์เสร็จจะถูกส่งไปตามร่างแหเข้าสู่เซลล์ผิวหนัง สารเมลานินเป็นตัวทำให้เกิดสีของเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น สีผิว สีผม สีม่านตาโดยหน้าที่หลักของเมลานิน คือ มีส่วนช่วยในการดักจับอนุมูลอิสระและป้องกันผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเสมือนแผ่นกรองแสงที่คอยดูดซับรังสีที่แทรกซึมผ่านเข้ามาในชั้นผิวหนัง เมลานินจะเปลี่ยนให้รังสีพลังงานสูงกลายเป็นความร้อนที่ไม่อันตรายต่อผิวหนัง ซึ่งจะช่วยยับยั้งไม่ให้รังสีดังกล่าวทะลุผ่านไปยังชั้นหนังแท้ได้

สารเมลานินสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (แสดงดังภาพ 1)

1. ฟีโอเมลานิน (Pheomelanin) เป็นเซลล์สีเหลืองหรือแดง เพราะมีเมลานินน้อย
2. ยูเมลานิน (Eumelanin) เป็นเซลล์เม็ดสีเข้ม เพราะมีเมลานินบรรจุอยู่ในแคปซูลมาก

(Muhammad & Duangporn, 2016)



ภาพ 1 ลักษณะของสารเมลานิน (Pheomelanin ; A) และ (Eumelanin ; B)

ที่มา: (Muhammad & Duangporn., 2016)

ฟีโอเมลานโซม (Pheomelanosome)

เซลล์สีเหลืองหรือแดง มีขนาดเล็ก (0.5-0.3 ไมโครเมตร) มีรูปร่างกลม เกาะตัวเป็นกลุ่ม ตั้งแต่ 2-10 ลูก มีการสลายตัวที่เร็ว มีไนโตรเจน และซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบ และมีรงควัตถุ “สีขาวย” สีที่แสดงออกมาจึงเป็นสีโทนสว่าง ฟีโอเมลานโซมประกอบด้วยสารหลักอย่างแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในสีโทนส้มแดง มีจำกัดและเห็นชัดได้ใน เส้นผม ขน หรือ บริเวณผิวหนัง เป็นต้น (JS Inno Tech Co.,Ltd, 2017)

ยูเมลานโซม (Eumelanosome)

เซลล์เม็ดสีเข้ม มีขนาดใหญ่ (0.5-0.8 ไมโครเมตร) รูปร่างเป็นวงรี ลูกหุ้มดังกล่าวจะกระจายตัวอยู่อย่างเดี่ยวๆ มีการสลายตัวที่ช้า มีรงควัตถุ “สีน้ำตาล-ดำ” โครงสร้างเมทริกซ์ประกอบด้วย filaments/lamellae (Livia-Elena Sima, 2009) โดยทั่วไปของเมลานินประเภทนี้จะกระจายอย่างแพร่หลายทั่วเนื้อเยื่อต่าง ๆ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์อื่น ๆ อาทิเช่น เส้นผมสีดำ ขนนก มะเร็งชนิดเมลานิน และน้ำหมึกสีดำของปลาหมึก อย่างไรก็ตามหากปริมาณของเมลานินมีมากจะผลิตสีที่เข้ม หรือหากปริมาณเมลานินมีน้อยจะแสดงผลในสีที่อ่อนลง (JS Inno Tech Co.,Ltd, 2017)

2. เมลานินกับสีผิว

สีผิวของมนุษย์จำแนกได้ 6 ระดับ (Fitzpatrick phototype) คือ ระดับที่ I ถึง IV ตามปริมาณของเม็ดสีผิวเมลานินที่เพิ่มมากขึ้นและระดับที่ลดลงของการยอมให้แดดไหม้ได้ ซึ่งสีผิวประเภทที่ 6 จะเป็นประเภทที่สีเข้มที่สุดแต่ยอมให้แดดไหม้ได้ในระดับที่น้อยที่สุด (สารสุขภาพ, ม.ป.ป.) (แสดงตาราง 1)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของสีผิว Fitzpatrick phototype

Phototype	สีผิวเมื่อไม่สัมผัสแสงแดด	การตอบสนองเมื่อสัมผัสแสงแดด
I	ขาว	ผิวไหม้แดดบ่อยครั้ง ไม่พบผิวสีเข้ม
II	ขาว	ผิวไหม้แดดบ่อยครั้ง ผิวสีเข้มบางครั้ง
III	ขาว เหลือง	ผิวไหม้แดดบางครั้ง ผิวสีเข้มบางครั้ง
IV	เหลือง น้ำตาล	ผิวไหม้แดดบางครั้ง ผิวสีเข้มบ่อยครั้ง
V	น้ำตาล ดำ	ผิวไหม้แดดน้อยมาก ผิวสีเข้มถึงดำ
VI	ดำ	ไม่พบผิวไหม้แดด ผิวสีเข้มถึงดำ

ที่มา: (Kumpol Aiempanakit, 2015)

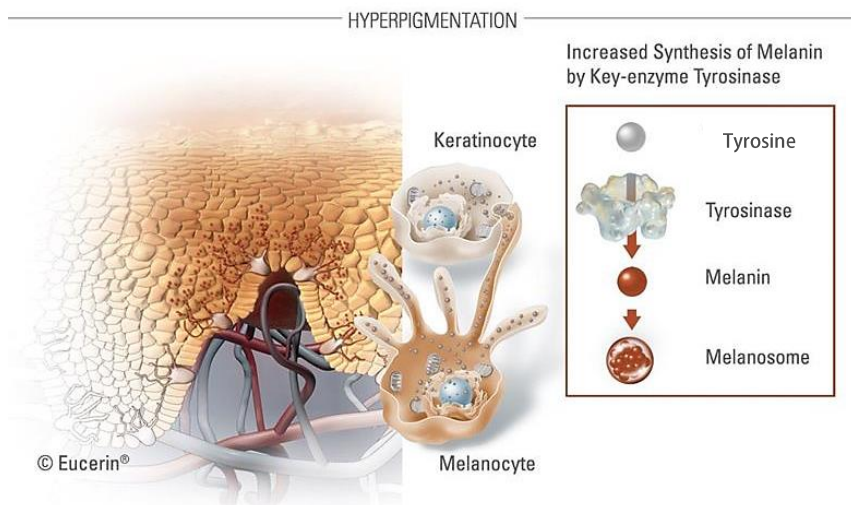
โดยปกติทั่วไปสีผิวจะเรียบสม่ำเสมอทั้งไปในแต่ละบริเวณของร่างกาย แต่อาจจะเกิดสีผิวที่ไม่สม่ำเสมอได้ ซึ่งเป็นได้ทั้งสีผิวจางลงหรือเข้มขึ้น เมื่อมีความผิดปกติของการสร้างเม็ดสีเมลานินเกิดขึ้นนับว่าเป็นปัญหาในวงการแพทย์และเครื่องสำอางเป็นอย่างมาก การที่ผิวหนังสร้างเม็ดสีผิวที่มากเกินไปส่งผลให้มีสีผิวที่คล้ำเกินระดับปกติ หรือเรียกว่าภาวะ hyperpigmentation ส่งผลให้เกิดอาการ กระ ฝ้า จุดต่างดํา ผิวหนังอักเสบ

สาเหตุเกิดได้ทั้งปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม ฮอร์โมน และการถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระหรือปัจจัยภายนอก เช่น ยา และรังสียูวี (Ultraviolet : UVR หรือ UV) เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้ล้วนแต่มีส่วนกระตุ้นให้ผิวหนังมีการผลิตเม็ดสีเมลานินที่มากขึ้น

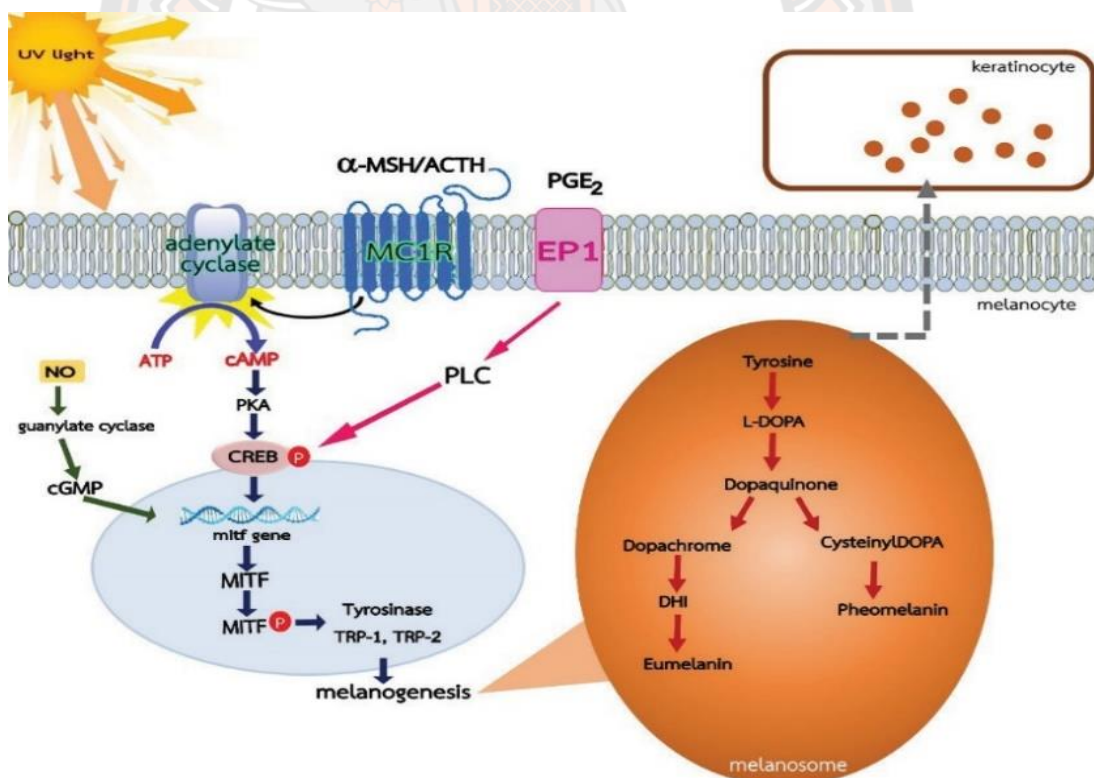
จากการศึกษาพบว่า 90% ของปัญหาผิวหนังนั้นเป็นผลมาจากปัจจัยหลักคือรังสียูวี (รวีโรจน์ จันทรหอม, 2551) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบหรือที่เรียกว่า Reactive oxygen species (ROS) ซึ่งได้แก่ hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion (O_2^-), lipid peroxy radical ($\text{LOO}\cdot$) และ nitric oxide radical ($\text{NO}\cdot$) เป็นต้น (อรอนงค์ รักสวนจิก, 2559) ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายหรือสามารถไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ รังสียูวีมีผลต่อการสร้างเมลานิน 2 วิธี

(1) รังสียูวีจะกระตุ้นเซลล์เมลานोไซต์โดยตรง มีผลให้เอนไซม์ไทโรซิเนสภายในเมลานोไซมถูกกระตุ้นเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นเม็ดสีเมลานิน และเคลื่อนย้ายเม็ดสีเมลานินจากเมลานोไซต์มาที่เซลล์ผิวหนังชั้นบน ยิ่งจำนวนเม็ดสีเมลานินมากยิ่งขึ้นทำให้มีสีผิวเข้มขึ้น (แสดงดังภาพ 2)

(2) รังสียูวีจะไปกระตุ้นเซลล์เคราติโนไซต์ก่อให้เกิดการควบคุมการส่งสัญญาณแบบพาราไครน์ (paracrine regulation process) ทำให้เซลล์เคราติโนไซต์หลังสารหลายชนิดออกมา ได้แก่ Prostaglandin E2 (PGE2) , ฮอร์โมนเมลานोไซต์ สติมูเลติง (α -melanocyte stimulating hormone; α -MSH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนกลางสร้างมาจากเซลล์เมลานोไซต์ ฮอร์โมนชนิดนี้จะไปกระตุ้นการสร้างเมลานินผ่าน cyclic AMP (cAMP) ซึ่งไปกระตุ้นให้โปรตีนไคเนสเอ (proteinkinase A) เร่งปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน มีผลทำให้ยีน microphthalmia-associated transcription factor (*MITF* gene) ซึ่งเป็นหน่วยพันธุกรรมที่ควบคุมเซลล์เมลานोไซต์ให้ทำงาน ทำให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ สร้างเมลานิน และควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ รวมถึงควบคุมการจำลองแบบดีเอ็นเอของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ ไทโรซิเนส, TRP-1 และ TRP-2 เป็นต้น (แสดงดังภาพ 3) ในอีกทางหนึ่งเซลล์เมลานोไซต์จะตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบที่ผิวหนัง กระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ interleukin-1 มีผลกระตุ้น MSH receptor ทำให้มีการสร้างเมลานินมากขึ้น เช่นเดียวกันฮอร์โมนแอดรีโนคอร์ติโคทรอปิก (Adrenocorticotrophic hormone; ACTH) ยังมีผลไปกระตุ้นไนตริกออกไซด์ซึ่งจะไปเร่งการทำงานของ α -MSH ได้อีกด้วย (D'Mello et al., 2016; Slominski et al., 2012)



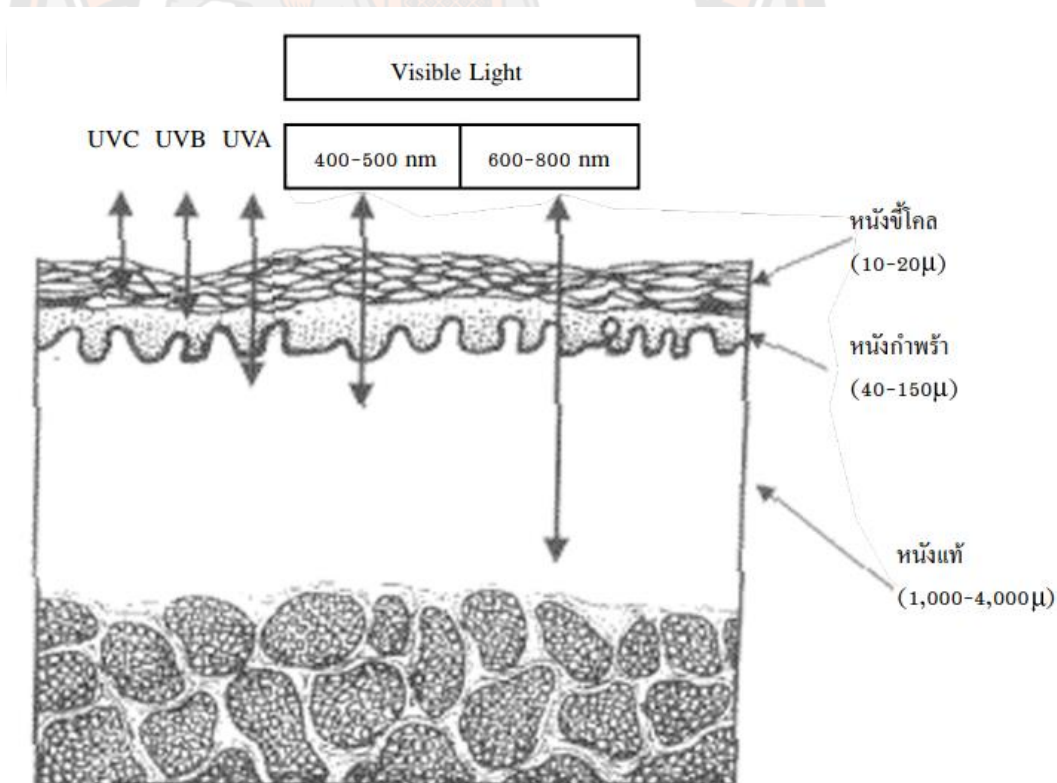
ภาพ 2 กระบวนการสร้างเม็ดสีกระตุ้นเซลล์เมลานोไซตโดยตรง
ที่มา: (<https://www.eucerin.co.th/about-skin/indications/>)



ภาพ 3 กระบวนการสร้างเม็ดสีโดยกระตุ้นเคราติโนไซต
ที่มา: (ประไพพิศ อินเสน, 2561)

การถูกสัมผัสจากรังสียูวีส่งผลให้ผิวหนังเกิดผลภายในระยะสั้นๆ ได้แก่ ผิวหนังไหม้จากแสงแดดหรือผิวหนังมีสีคล้ำลง หรือหากส่งผลภายในระยะยาว ก็จะทำให้เกิดผิวหนังเสื่อมหรือทำให้ผิวหนังแก่เร็ว เช่น ทำให้เกิดริ้วรอยย่น ผิวหนังกำพืดบางลง เส้นเลือดขยาย เกิดรอยฝ้าและตกกระ เป็นต้น (นพ.สิริ เชี่ยวชาญวิทย์, ม.ป.ป.) ซึ่งสาเหตุจากผิวที่ไม่ได้รับการปกป้อง ทำให้เม็ดสีผิวสะสมมากในบริเวณนั้น เกิดผื่นสีน้ำตาลเป็นรอยคล้ำหรือบางรายอาจเป็นปื้นสีดำเป็นบริเวณกว้างเรียกว่า ภาวะสีผิวดำ (Kumpol Aiempanakit, 2015)

รังสียูวี ประกอบด้วยด้วยกลุ่มคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหลายความยาวคลื่นด้วยกัน ขณะที่แสงอาทิตย์เดินทางผ่านเข้ามาสู่ชั้นบรรยากาศของโลก ความยาวคลื่นบางช่วงจะถูกดูดซับหรือไม่ก็สะท้อนกลับไป รังสีที่เหลือก็จะผ่านลงมาสู่พื้นผิวโลก ส่งผลเสียให้เกิดปัญหาผิวหนังต่างๆ (Barami Laboratories, 2015) ซึ่งรังสียูวีสามารถแบ่งออกเป็น 3 โซน ได้แก่ UVC (ช่วงคลื่นระหว่าง 200-280 nm), UVB (ช่วงคลื่นระหว่าง 290-320 nm) และ UVA (ช่วงคลื่นระหว่าง 320-400 nm) ซึ่งแสงที่มีความยาวคลื่นยาวจะทะลุทะลวงเข้าไปในผิวหนังได้ดีกว่าแสงที่มีความยาวคลื่นสั้น ประมาณร้อยละ 90 ของรังสีชนิดต่างๆ จะถูกดูดซึมในบริเวณลูกศร (นพ.สิริ เชี่ยวชาญวิทย์, ม.ป.ป.) (แสดงดังภาพ 4)



ภาพ 4 ภาพแสดงการทะลุทะลวงของรังสีที่มีความยาวคลื่นต่างๆ เข้าไปในผิวหนัง
ที่มา: (รวีโรจน์ จันทร์หอม, 2551)

รังสี UVC

เป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 200-280 nm ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่สั้นที่สุด จึงมีพลังงานมากที่สุดด้วย รังสี UVC เกือบทั้งหมดนี้จะถูกกรองที่ชั้นโอโซนในบรรยากาศของโลก มักมาไม่ถึงผิวโลกยกเว้นบริเวณยอดเขาสูง และถึงแม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย ก็สามารถทำให้เกิดผื่นแดงและทำให้ผิวหนังเปลี่ยนเป็นสีแทนได้ (Barami Laboratories, 2015)

รังสี UVB

มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 290-320 nm ถูกดูดซับโดยโอโซนในชั้นบรรยากาศ Troposphere ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่สามารถทะลุผ่านผิวหนังได้ดีและเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดอันตรายต่อผิวหนังทั้งในระยะเฉียบพลันและเรื้อรัง ทำให้เกิดผื่นแดงและไหม้เกรียมได้ เพราะมันสามารถทะลุผ่านผิวหนังชั้นสเตรตัมคอร์เนียม (Stratum corneum) และอีพิตเดอมีส (Epidermis) ได้ รังสีนี้จะทำให้เกิดผลเสียต่อผิวหนังในทันที เช่น ผิวไหม้เกรียม ผื่นแดงเป็นต้น (Barami Laboratories, 2015)

รังสี UVA

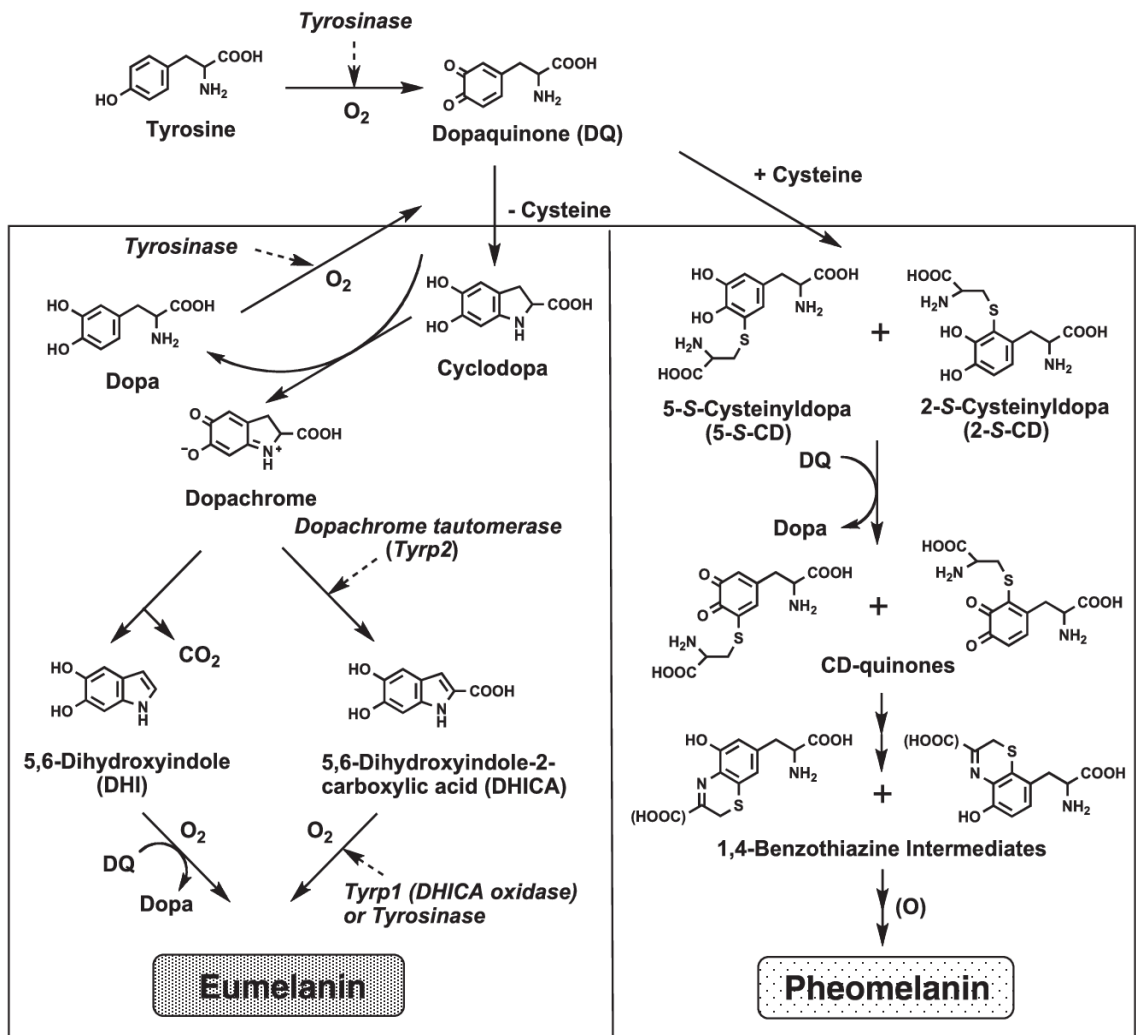
มีช่วงความยาวคลื่นอยู่ที่ 320-400 nm รังสีช่วงนี้จะมีพลังงานต่ำสุด จะถูกดูดซับในชั้นเดียวกับ UVB เหลือผ่านมายังผิวโลกประมาณ 6.3% แต่มีอำนาจทะลุทะลวงผ่านชั้นผิวหนังได้ลึกที่สุด (รวีโรจน์ จันทรหอม, 2551) และมีผลกระทบเป็นวงกว้างต่อโครงสร้างชั้นผิวหนัง รังสีนี้ในปริมาณน้อยก็สามารถทะลุผ่านชั้นหนังแท้ (Dermis) ได้ ซึ่งจะไปกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินได้มาก และเมลานินนี้จะไปปกป้องผิวจากการถูกทำลายอีก (Barami Laboratories, 2015)

ปัจจัยรองลงมาเกิดจาก กรรมพันธุ์ อายุ หรือความเครียดก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งทั้งร่างกายและจิตใจส่งผลให้สมองสั่งการกระตุ้นเซลล์ให้ผลิตเม็ดสีเพิ่มขึ้นได้โดยตรง หรือแม้กระทั่งเกิดจากฮอร์โมนเพศชนิดเอสโตรเจน (Estrogen) และโปรเจสเตอโรน (Progesterone) มีผลทำให้เกิดฝ้า โดยเฉพาะสตรีที่รับประทานยาคุมกำเนิดหรือสตรีที่ตั้งครรภ์ นอกจากการแพ้ยาแล้ว การแพ้เครื่องสำอางเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดฝ้าหรือผิวหนังอักเสบได้ ยาบางชนิดมีผลไวต่อแสงทำให้หน้าบางลง (DEWellness, 2016) ปัจจัยเหล่านี้ล้วนเป็นสาเหตุที่ทำให้เม็ดสีผิวมากขึ้นจนก่อให้เกิดผลที่ตามมาส่งผลให้เกิดภาวะดังกล่าวได้เป็นต้น

3. กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Melanogenesis)

กระบวนการสังเคราะห์เมลานินในผิวหนังเริ่มจากสารตั้งต้นที่มีในร่างกายซึ่งเป็นกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ในร่างกายถูกเปลี่ยนให้เป็น dihydroxyphenylalanine (3,4-dihydroxyphenylalanine; L-DOPA) ด้วยเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งขั้นตอนแรกนี้จะขั้นตอนกำหนดปฏิกิริยา (Muhammad & Duangporn, 2016) เรียกปฏิกิริยา Monophenolase เนื่องจากขั้นตอนหลังจาก

นี่จะเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถเกิดขึ้นได้เองในสภาวะ pH ของร่างกายสมดุล กล่าวคือ หลังจากที่ tyrosine ถูกเปลี่ยนให้เป็น L-DOPA แล้ว เรียกปฏิกิริยา Diphenolase จากนั้น L-DOPA จะถูกเปลี่ยน แปลงต่อไปเป็น DOPAquinone (3,4-dihydroxyphenylalanine quinone) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ Eumelanin หรือ Pheomelanin หากกรณีในร่างกายอยู่ในสภาวะขาดสารประกอบที่มี sulfur (thiol compound) DOPAquinone จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น DOPACHROME ด้วยกระบวนการ auto-oxidation หรือ เรียกว่าการ เกิด cyclization และมีเอนไซม์ TRP-2 (tyrosinase-related protein 2) หรือ DOPACHROME tautomerase กระตุ้นให้ DOPACHROME เกิดการ tautomerize ขึ้นต่อไปเป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) เรียกปฏิกิริยา Tautomerization ได้เป็นเม็ดสีดำ ในบางครั้งกลุ่มของกรดคาร์บอกซิลิกอาจจะไม่หลุดออกไปในขั้นตอนของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะอาศัยเอนไซม์ TYRP-1 (DHICA oxidase) ในการเปลี่ยน DHICA ไปเป็นโมโนเมอร์รูปแบบใหม่ที่มีชื่อว่า Indole-5,6-hydroquinone-2-carboxylic acid ไปสร้าง eumelanin เม็ดสีน้ำตาลต่อไป แต่ในสภาวะที่ร่างกายมี cysteine หรือ glutathione ทำให้ DOPAquinone จะเข้าไปรวมตัวกับสารดังกล่าวกลายเป็น cysteinyl DOPA หรือ glutathionyl DOPA และเปลี่ยนต่อไปเป็น alanylhydroxyl benzothiazine หรือ 1,4-benzothiazinyl alanine เพื่อนำไปสังเคราะห์ Pheomelanin เม็ดสีเหลืองแดงต่อไป (Muhammad & Duangporn, 2016) (แสดงดังภาพ 5)



ภาพ 5 กระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Melanogenesis)

ที่มา : (Ito S and Wakamatsu K., 2008)

ฟังไจบางกลุ่มจะสังเคราะห์เมลานิน โดยหน้าที่ของเมลานินในฟังไจ เช่น ป้องกันแสงแดด, สะสมพลังงาน, การปรับอุณหภูมิ, ป้องกันการคายน้ำและต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (แสดงดังภาพ 7) (Cordero RJ, Casadevall A., 2017) เอนไซม์โดยธรรมชาติทำหน้าที่ได้ทั้ง 2 ทาง คือ สังเคราะห์เมลานิน เมื่อมีกลุ่มจำนวนสารตั้งต้นที่เป็นองค์ประกอบในพืชหรือฟังไจเป็นจำนวนมาก เกิดการเร่งปฏิกิริยา oxidation เกิดเป็น polymer ทำหน้าที่เฉพาะ เช่น เมลานินในฟังไจทำหน้าที่แสดงออกสี ในปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของพืชและฟังไจ และอีกหนึ่งหน้าที่ของเอนไซม์คือ การย่อยสลายเมลานินเพื่อให้เกิดสมดุลในธรรมชาติ เมื่อย่อยสลายจะเกิดการสังเคราะห์ใหม่ขึ้นเป็นวัฏจักร (Borges CR et al., 2001) การศึกษาโครงสร้างของรีคอมบิแนนท์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเห็ด *Agaricus bisporus* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไทโรซิเนสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมสูง (Chang,

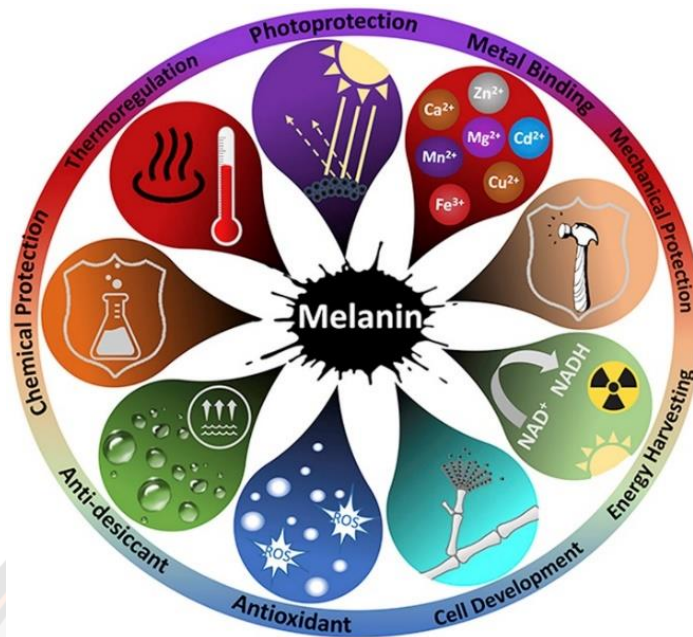
2009) มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่ากลุ่มของฟิงไจมีการสังเคราะห์ขึ้นภายในถุงเซลล์คล้ายกับ melanosomes ของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมและสามารถเคลื่อนที่ไปยังผนังเซลล์ได้ (Eisenman HC et al., 2012)

	363	367		390																															
hTyr	SMH	NAL	HI	YMN GTMS	SQ	VQ	GS	AND	P	I	F	LL	HHA																						
mTyr PPO3	MV	HNT	VH	FL	I	GR	D	P	T	L	D	PL	V	P	G	H	M	G	S	V	P	H	A	A	F	D	P	I	F	W	M	H	H	C	
mTyr PPO4	AV	H	D	I	H	G	F	V	G	R	G	A	I	R	G	H	M	T	H	A	L	F	A	A	F	D	P	I	F	W	L	H	H	S

ภาพ 6 ลักษณะโครงสร้างการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไทโรซิเนสในมนุษย์ (hTyr) และ Isoenzymes Ab PPO3 และ Ab PPO4 ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mTyr)

ที่มา: (Mann, T et al., 2018))

งานวิจัยปี 2018 ศึกษาการจับที่เป็นไปได้ของ Thiamidol กับ hTyr วิเคราะห์ผ่าน molecular docking เมื่อกำหนดสีแดงคือฮิสทีดีนที่จับ Cu และสีน้ำเงินคือสารตกค้างที่อาจมีปฏิกิริยากับ Thiamidol ผลระบุว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mTyr) มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณของตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ซึ่งแตกต่างจาก hTyr อย่างมีนัยสำคัญ (Mann, T et al., 2018) จากที่กล่าวมาข้างต้นว่าการสังเคราะห์เมลานินโดยเอนไซม์ไทโรซิเนสในฟิงไจและในมนุษย์มีความคล้ายคลึงกัน (Williamson PR et al., 1998) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีเลือกใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสจากกลุ่มฟิงไจในเห็ดเป็นตัวอย่งในการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน

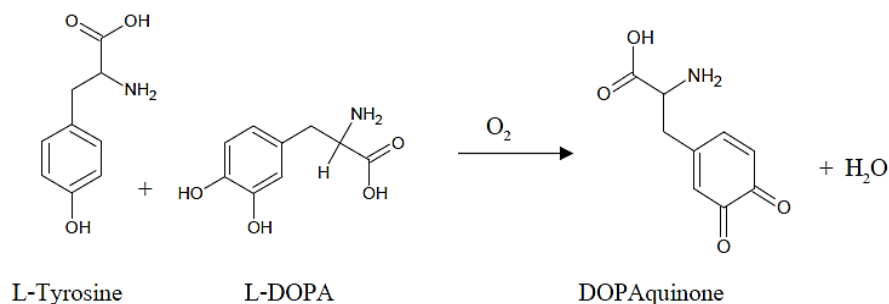


ภาพ 7 หน้าที่ของเมลานินในฟงไฉ

ที่มา : (Cordero RJ, Casadevall A., 2017)

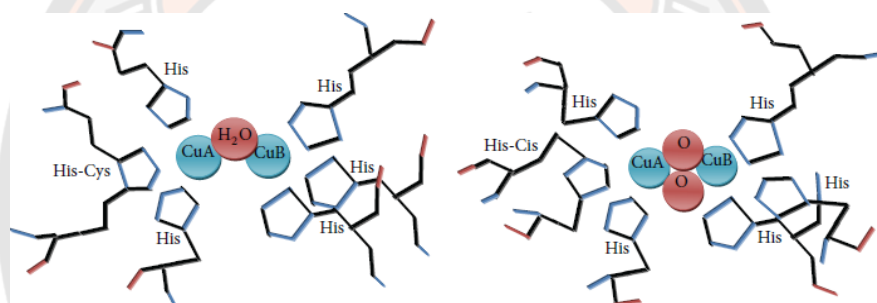
4. เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (EC 1.14.18.1; L-tyrosine,L-dopa:oxygen oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารประกอบฟีนอล เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 60-70 kDa (ประไฟพิศ อินเสน, 2561) มีค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 6.8 (R. Halaban, 2022 & H.S. Raper, 1928 & H.S. Mason, 1965) บทบาทมากที่สุดในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินและเป็นเอนไซม์ที่กำหนดอัตราการการทำงานสำหรับการควบคุมการผลิตเมลานิน ทำหน้าที่เปลี่ยนไทโรซินไปเป็นสาร intermediate (DOPA, DOPAquinone, DOPochrome, DHI) (Muhammad & Duangporn, 2016) (แสดงดังภาพ 8)



ภาพ 8 ตัวอย่างปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
ที่มา: (สาวิตรี ตาสุดิน, 2549)

โดยทั่วไปเอนไซม์ไทโรซิเนสจะพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ภายในโครงสร้างจะประกอบไปด้วย copper 2 อะตอม (Cu^{2+}) ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาและทำหน้าที่เป็นปัจจัยร่วม (cofactor) ของเอนไซม์ ได้แก่ copper A binding site และ copper B binding site ซึ่งแต่ละไอออนของคอปเปอร์จะถูกจับไว้ด้วยแขนงข้าง (side chain) ของกรดอะมิโนฮิสทีดีน (His) ตำแหน่งที่ 61, 85, 94, 259, 263 และ 296 ซึ่งมีทำหน้าที่ร่วมกับออกซิเจนเพื่อเร่งให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ phenol และ catechol ไปเป็น ortho-quinones ที่ dioxygen บริเวณเร่งปฏิกิริยา เกิดได้เร็วขึ้น (Zaidi K.U. et al, 2014) (แสดงดังภาพ 9)



ภาพ 9 โครงสร้างและบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส
ที่มา: (Zaidi K.U. et al., 2014)

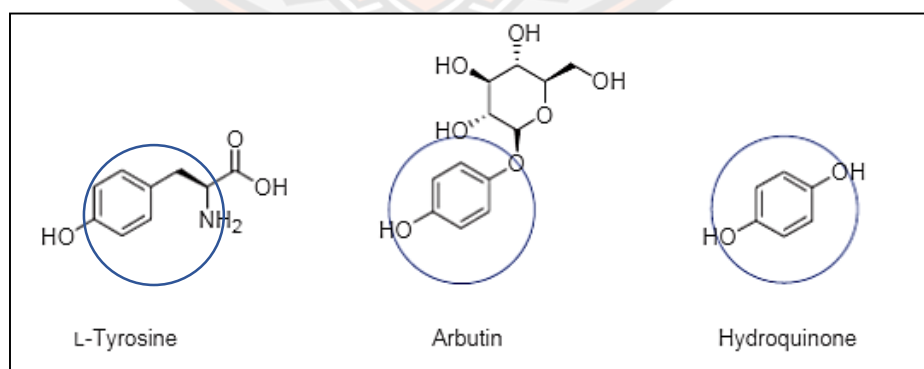
ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างเมลานินได้ วิธีหนึ่งก็คือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยแย่งจับกับโลหะ Cu^{2+} ซึ่งโลหะ Cu^{2+} จะใช้ตำแหน่งที่ว่างอยู่อีกหนึ่งตำแหน่งไปจับกับ L-Dopa ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อย่อยสลายและเกิดเป็นเมลานินได้ ดังนั้นหากมีสารที่สามารถจับกับโลหะ Cu^{2+} ได้ดีกว่า L-Dopa ก็จะทำให้โลหะ Cu^{2+} ของเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามารถไปจับกับ L-Dopa หรือจับได้ไม่ดี จึงทำให้ไม่สามารถเกิดการย่อยสลายที่ได้และทำให้เกิดการสร้างเมลานินได้ลดลง (สุชาติ จันทรพรหมมา, 2554)

5. สารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นได้ทั้งสารสังเคราะห์และสารที่พบในธรรมชาติซึ่งอาจเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ เทอร์ปีน สเตอรอยด์ กรดคาร์บอกซิลิก กรดไขมัน คู

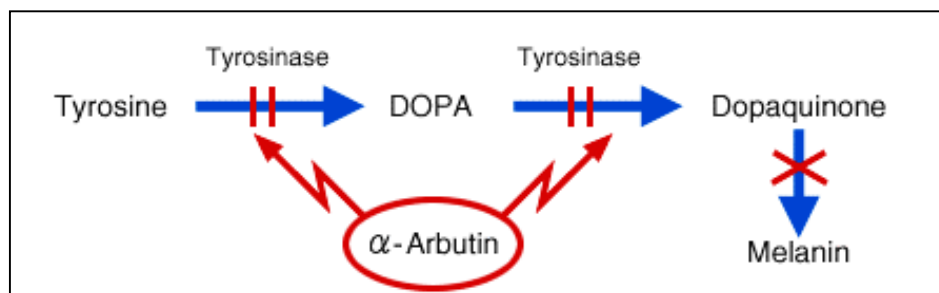
มาริน สติลป็น ไปไฟเพอริน ไดไฮดรอกซีควินอน รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปวิตามินซีและวิตามินอี เป็นต้น ในทางชีวเคมี สารเหล่านี้มีกลไกการยับยั้งที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของสารยับยั้งชนิดนั้น และยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งชนิด monophenolase และ/หรือ diphenolase จึงทำให้สารเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพหลายรูปแบบ ตัวอย่างสารที่ทำให้ผิวกระจ่างใสเป็นที่รู้จักและเป็นที่ยอมรับ (Sarkar, Chugh & Garg, 2016) อาทิ เช่น

1. **อาร์บูติน (Arbutin)** หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์ hydroquinone-beta-D-glucopyranoside ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไฮโดรควิโนนในรูปของ glycosylated สกัดแยกได้จากพืช หลายชนิด ได้แก่ แครนเบอร์รี่ บลูเบอร์รี่ ข้าวสาลี และลูกแพร์ เป็นต้น อาร์บูตินบริสุทธิ์จากปฏิกิริยาเคมีระหว่างสาร 2 ตัว คือ Acetobromoglucose กับ Hydroquinone ในสถานะที่เป็นต่าง (อภัย ราชวรวิจิตร, 2012) เป็นสารที่ออกฤทธิ์ลอกเซลล์ผิวหนัง (keratolytic) จัดเป็นสารทำให้ผิวขาวชนิดหนึ่ง โดยมีฤทธิ์ลอกผิวหนังที่ชั้นนอกสุดออกไป (สารสุขภาพ, ม.ป.ป.) และมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีโดยไปจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสสามารถยับยั้งได้ทั้งขั้นตอนปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซีให้ไทโรซีนและปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-DOPA เป็นการยับยั้งเอนไซม์เป็นแบบแข่งขันและผันกลับได้ กล่าวคือสารนั้นมีโครงสร้างที่เข้าจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาทั้ง copper A binding site และ copper B binding site เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับไทโรซีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา (Maeda. K & Fukuda. M, 1996) (แสดงดังภาพ 10-11) แต่ข้อเสียของอาร์บูตินคือ หากใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางในความเข้มข้นปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อการใช้ระยะยาวเสี่ยงต่อการเกิดรอยดำจากการอักเสบ อีกทั้งมีราคาแพง เพิ่มต้นทุนในการผลิต และไม่เสถียรเพราะเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ (Patcharapa, 2016)



ภาพ 10 โครงสร้างที่มีลักษณะหมู่ฟังก์ชันคล้ายกัน

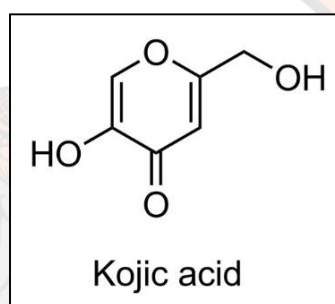
ที่มา: (Sapkota K et al., 2010)



ภาพ 11 กระบวนการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยสารอาร์บูติน

ที่มา: (Glico nutrition Co.,Ltd., 2019)

2. กรดโคจิก (Kojic acid)

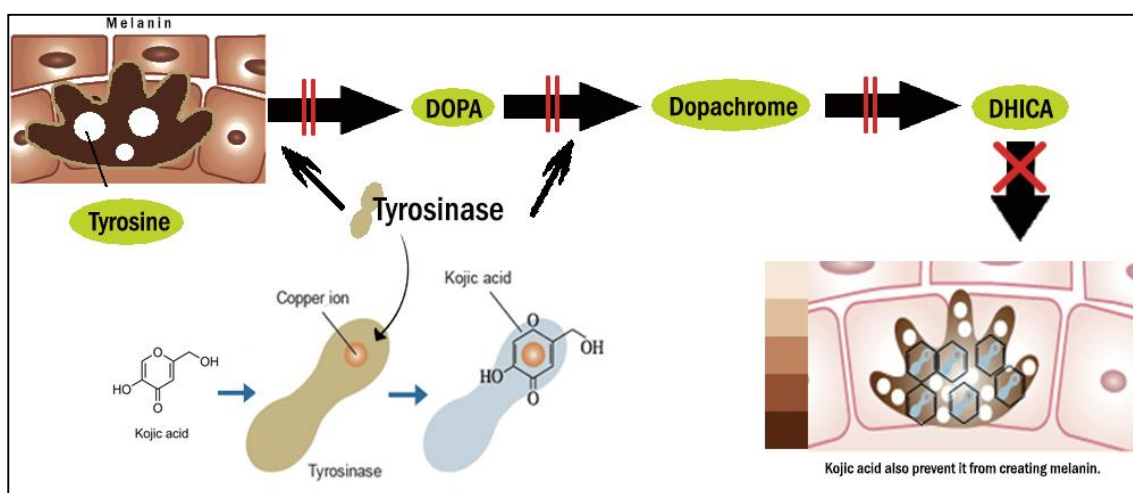


ภาพ 12 โครงสร้างของกรดโคจิก

ที่มา: (Michelle, 2014)

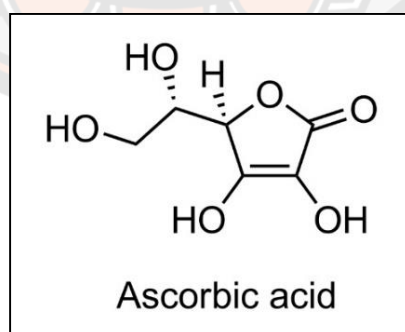
เป็นเมแทบอลิต์พบได้ในธรรมชาติหรือที่ได้จากเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus oryzae* มีชื่อสามัญว่าโคจิกญี่ปุ่น กรดโคจิกสามารถยับยั้งการเปลี่ยนสีของผลไม้ไม่ให้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Oxidative browning) หรือทำให้เนื้อของอาหารทะเลคงมีสีแดงอมชมพูได้ทนนาน (อภัย ราชภูริวิจิตร, 2018) ด้วยคุณสมบัติที่คอยยับยั้งและป้องกันการรวมตัวของเม็ดสีทั้งพืชและในสัตว์ กรดโคจิกจึงถูกนำไปใช้ในการรักษาฝ้า กระ และยังมีงานวิจัยที่พัฒนาโครงสร้างของโคจิกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผ่านผิวหนังและออกฤทธิ์ในการรักษาความผิดปกติทางผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kim et al., 2002; Ebanks, Wickett & Boissy, 2009) เป็นการยับยั้งเอนไซม์เป็นแบบแข่งขันและผันกลับได้ โดยกรดโคจิกจะไปจับกับไอออนของ copper A และ copper B ในโมเลกุลเอนไซม์ไทโรซิเนสที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาผ่านกลุ่ม 5-hydroxyl และ 4-carbonyl (Cabanis, 1994) ขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา tautomerization ในการเปลี่ยน Dopa-chrome ไปเป็น DHICA ของกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Ebanks J.P. et al, 2009) (แสดงดังภาพ 13) ผลิตภัณฑ์กรดโคจิกที่มี

ความเข้มข้น 1–2% จะไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่อผิวหนังของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามมีข้อกำหนดให้ผลิตภัณฑ์ของกรดโคจิกต้องมีความเข้มข้นไม่เกิน 4% (อภิย ราชภูริจิตร, 2018) หากใช้ในปริมาณที่มากหรือสะสมอย่างต่อเนื่องอาจเป็นอันตรายเมื่อสูดดมกลืนกินและหากถูกดูดซึมผ่านผิวหนัง สภาพผิวอาจมีลักษณะเป็นผื่นแดงหรือกระแทกคันมีอาการปวดแสบพุพองและแห้งเป็นขนาดหย่อมๆ ได้



ภาพ 13 กระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินโดยกรดโคจิก

3. วิตามินซี (Vitamin C) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ Ascorbic acid



ภาพ 14 โครงสร้างของวิตามินซี

ที่มา: (Michelle, 2014)

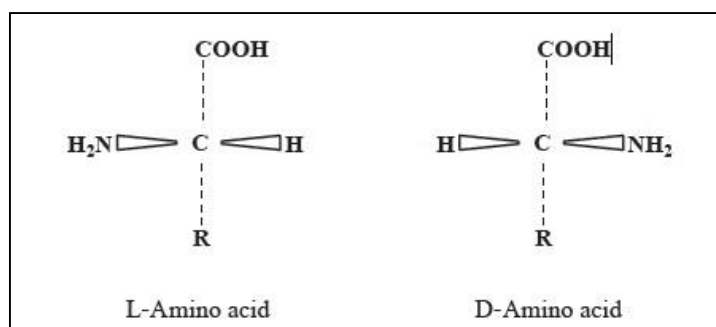
ซึ่งมีสมบัติเป็นกรดอ่อนๆ สามารถพบได้ในธรรมชาติจากผลไม้และผักใบเขียว วิตามินซีเป็นวิตามินที่สามารถละลายได้ในน้ำ เมื่อรับประทานและถูกร่างกายดูดซึมไปใช้แล้วสามารถถูกขับออกได้ทางปัสสาวะในรูปของกรดออกซาลิก (oxalic acid) นอกจากนี้วิตามินซียังถูกทำลายได้ง่ายโดยแสงอาทิตย์ ประโยชน์ของวิตามินซีคือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบจากการยับยั้งการทำงานของสารไซโตไคน์บางชนิด มีฤทธิ์ฟอกสีผิวและมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทำให้สีของเมลานินจางลง (Zhai and Maibach, 2001) กลไกการทำงานของวิตามินซีจะขัดขวางการสังเคราะห์ DOPA quinone ไปเป็น DHICA โดยจะเปลี่ยนจาก DOPA quinone กลับไปเป็น L-DOPA ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของกระบวนการ oxidation (Michelle, 2014) โดยเข้าไปจับกับโมเลกุลของทองแดงที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Saghaie L. et al, 2013)

การศึกษาวิจัยพบว่าวิตามินซีที่อยู่ในรูปแบบของ Magnesium ascorbyl phosphate (MAP) เป็นโมเลกุลที่มีความคงตัวมากและสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ชั้นผิวหนังได้ดี และยังมีอนุพันธ์ของวิตามินซีอีกหลายรูปแบบ เช่น Ascorbyl-6-palmitate, Disodium isostearyl 2-O L-ascorbyl phosphate (VCP-IS-Na) และ Ascorbic acid sulfate ที่สามารถซึมเข้าสู่ผิวได้ดีเช่นกัน โดยปกติวิตามินซีมักพบในความเข้มข้น 5-10% (Michelle, 2014) แต่หากเมื่อได้รับในปริมาณมากหรือสะสมอย่างต่อเนื่อง จะส่งผลกระทบต่อผิวหนังโดยมีฤทธิ์เป็น Pro-oxidant ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อร่างกายได้ (Saghaie L. et al., 2013)

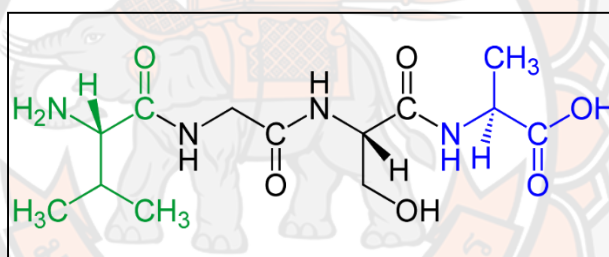
4. เปปไทด์ (Peptide)

คือสายพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนที่มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ ซึ่งกรดอะมิโนทุกชนิด (ยกเว้น glycine ที่มีหมู่ R เป็นไฮโดรเจน) มีอยู่สองรูปแบบคือแบบแอล และแบบดี (L form และแบบ D form) (**แสดงดังภาพ 15**) เปปไทด์ปลายด้านที่มีหมู่อะมิโนเป็นอิสระเรียกว่าปลายเอ็น (N-terminal) ส่วนปลายที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นอิสระเรียกว่าปลายซี (C-terminal) การเรียกชื่อเปปไทด์จะเรียกตามลำดับกรดอะมิโนจากปลาย N (N-terminal) ไปหาปลาย C (C-terminal) (**แสดงดังภาพ 16-17**) เปปไทด์นั้นเป็นส่วนผสมจากธรรมชาติ เป็นอนุพันธ์หน่วยย่อยที่เล็กที่สุดของโปรตีน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโปรตีน ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลากหลายชนิด กรดอะมิโนนั้นเป็นตัวสร้างโปรตีนและโปรตีนเองนั้นก็เป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างผิว ปัจจุบันเปปไทด์ได้มีการพัฒนาให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีขึ้นมาก จากการรายงานพบว่าการทาครีมที่มีสารเปปไทด์เป็นส่วนประกอบจะสามารถแทรกซึมผิวได้ลึกและดีกว่าสารออกฤทธิ์อื่นๆ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงมีการนำเปปไทด์หลายชนิดมาใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว เช่น ช่วยยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทำให้ริ้วรอยลดน้อยลง และเข้าไปช่วย

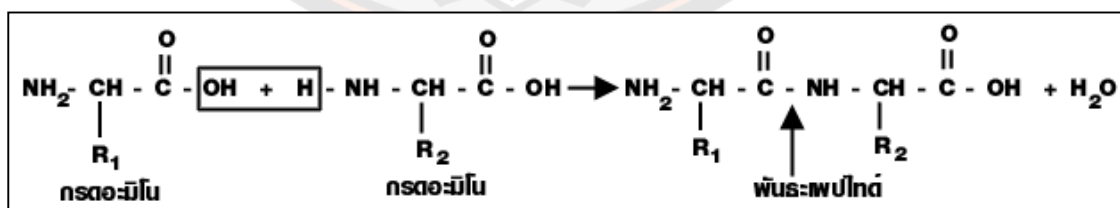
สร้างพื้นฟูคอลลาเจน ทำให้ผิวตึงกระชับเรียบเนียน อีกทั้งยังช่วยทำให้หน้าขาวใส เป็นต้น (สารพันความรู้เกี่ยวกับการดูแลสุขภาพและความงาม, 2554)



ภาพ 15 Stereo isomer ของกรดอะมิโน (ยกเว้น glycine) มี 2 ชนิด ได้แก่ L-form และ D-form
ที่มา: (<https://www.siamchemi.com/>)



ภาพ 16 โครงสร้างเปปไทด์ประกอบด้วยปลายเอ็น (N-terminal) และปลายซี (C-terminal)
ที่มา: (Kiddle Encyclopedia, 2019)




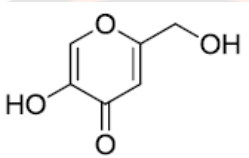
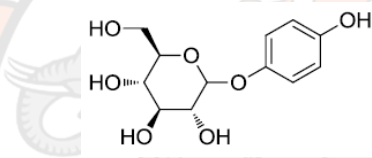
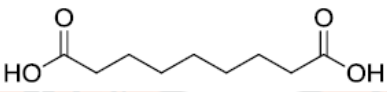
ภาพ 17 เปปไทด์ซึ่งเกิดจากกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันเป็นสายด้วยพันธะเพปไทด์

ที่มา: (http://119.46.166.126/self_all/selfaccess10/m4/biology4_2/lesson2/content1.php)

สารยับยั้งไทโรซิเนสหลายชนิด เช่น ไฮโดรควิโนน (Heilgemeir, G. P.& Balda, B. R.1981), กรดโคจิก(Mishima, Y et al., 1988), กรดอะเซลลาอิก (Breathnach, A. C et al., 1989

& Verallo-Rowell, V. M et al., 1989), ฟีนอลที่อุดมด้วยอิเล็กตรอน (Jimbow, K. 1991) และอาร์บูติน ได้รับการทดสอบในเภสัชภัณฑ์และเครื่องสำอางสำหรับความสามารถในการป้องกันการผลิตเมลานิน ในขณะที่เดียวกันการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและกิจกรรม (Structure-activity relationship “SAR”) ได้รับการกล่าวถึงอย่างกว้างขวาง (แสดงดังตาราง 2) ระบุว่าไฮโดรควิโนนเป็นหนึ่งในส่วนผสมมากที่สุดในบรรดาสารทำให้ผิวขาวทั่วไป แต่สารไฮโดรควิโนนทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง (Parvez, S. et al. 2006) และคิดว่าเป็นสารก่อกลายพันธุ์ต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Curto, E. V. et al. 1999) และเป็นพิษต่อเซลล์เมลานोไซต์ (Felipe Jimenez&Ph.D., 2009) สิ่งนี้นำไปสู่การใช้กรดโคจิกและอาร์บูตินเป็นตัวแทนทางเลือก แต่สารเหล่านี้มีประสิทธิผลต่ำในร่างกาย นอกจากนี้เนื่องจากผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ความคงตัวของสูตรต่ำ และการซึมผ่านผิวหนังที่ไม่ดีและการใช้งานที่มีจำกัด (Hermanns, J. F et al., 2000) เจ้าหน้าที่ญี่ปุ่นยังกระตุ้นให้ห้ามใช้กรดโคจิกในการรักษาผิวหนังเนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง (Fuyuno, I et al., 2004) อย่างไรก็ตามกระบวนการทำให้เกิดสีผิวจางลงด้วยสารดังกล่าวข้างต้นทั้งอาร์บูติน กรดโคจิกหรือวิตามินซีหากใช้ในความเข้มข้นที่สูงและติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน อาจมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์หรือเป็นพิษต่อผิวหนังได้ เช่น ผลผลิตทำให้เกิดสีผิวขาวมักใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์รบกวนกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ สารประกอบของปรอท (mercury compounds) ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในกระบวนการสร้างเมลานิน (สารสุขภาพ, ม.ป.ป.) เว้นแต่สารสกัดจากเปปไทด์เนื่องจากเป็นสารสกัดจากโปรตีนที่ได้จากธรรมชาติและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังที่น้อยกว่าสารเคมีดังกล่าว (Felipe Jimenez&Ph.D., 2009) ทั้งนี้ สารประกอบของปรอทจัดเป็นสารอันตรายที่ทำให้เกิดอาการแพ้ ผื่นแดง ผิวด่าง และเกิดรอยด่างบนใบหน้า และอาจทำให้เกิดการสะสมพิษของปรอท ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต ทำให้ตับและไตอักเสบ เกิดโรคโลหิตจาง ทางเดินปัสสาวะอักเสบได้ (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล, ม.ป.ป) (แสดงดังภาพ 18)

ตารางที่ 2 ค่า IC₅₀ ของสารประกอบในเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ในธรรมชาติที่รู้จัก

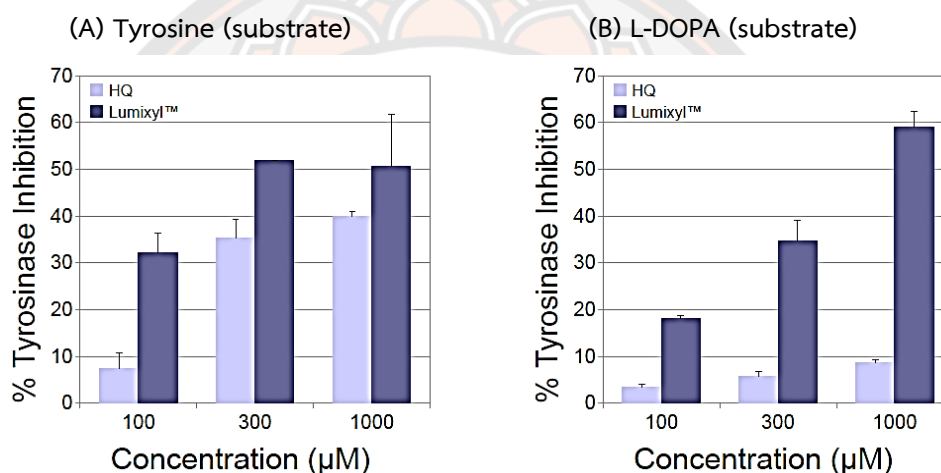
สารประกอบในเครื่องสำอาง	โครงสร้าง 2 มิติ	IC ₅₀ (μM)	อ้างอิง
Hydroquinone (ไฮโดรควิโนน)		25.88	(Marrero-Ponce, Y. et al., 2007)
Kojic acid (กรดโคจิก)		40.69	(Hsiao, N. W. et al., 2014)
Arbutin (อาร์บูติน)		368.93	(Hsiao, N. W. et al., 2014)
Azelaic acid (กรดอะเซลลาอิก)		>368.93	(Sima, V. H. et al., 2011)

ที่มา: (Chen, W. C et al., 2015)



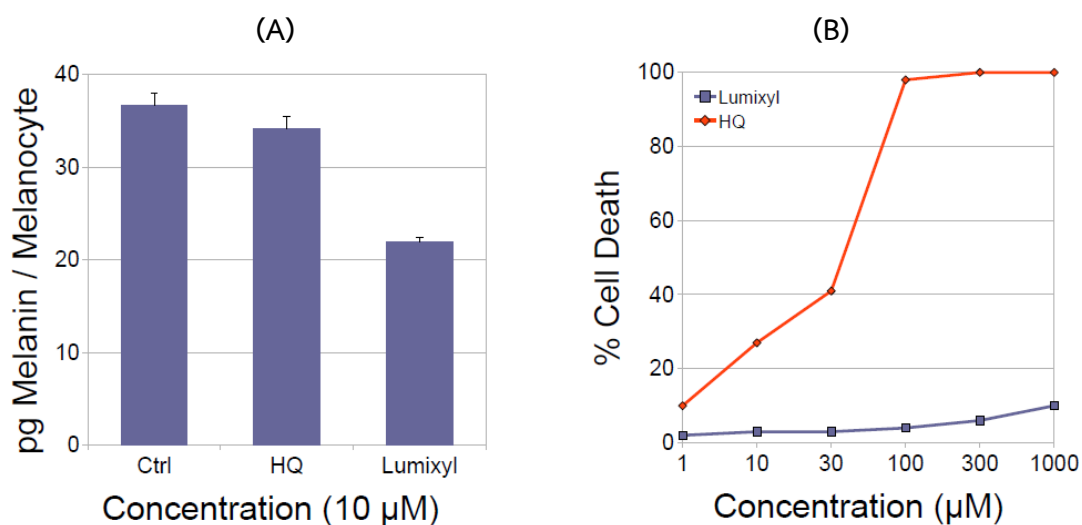
ภาพ 18 อาการข้างเคียงจากการใช้ครีมที่มีส่วนผสมของปรอท ผิวมีลักษณะเป็นรอยต่างขาวและฝ้า
ที่มา: (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล, ม.ป.ป)

งานวิจัย (Felipe Jimenez&Ph.D., 2009) ได้ศึกษาสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ Decapeptide-12 (Lumixyl) (สารกลุ่มโปรตีนที่มีกรดอะมิโนเรียงต่อกัน 12 ตัว) ในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีของภาวะความผิดปกติเมื่อเทียบกับสารไฮโดรควิโนน (HQ) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดโพลิโกเปปไทด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นต่างๆ (แสดงดังภาพ 19) อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่า ณ ความเข้มข้น 10 μM ที่เท่ากัน สารสกัดโพลิโกเปปไทด์และสารไฮโดรควิโนนมีความสามารถในการลดระดับเมลานินภายในเซลล์เมลานোসัยต์ของมนุษย์ได้ 40% และ 7% ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังพบว่า ณ ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น สารไฮโดรควิโนนมีผลเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นเช่นกันเมื่อเทียบกับสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ (แสดงดังภาพ 20)



ภาพ 19 แสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosine; A และ L-DOPA; B) สืฟ้าแทนด้วยสารไฮโดรควิโนน (HQ) และสีน้ำเงินแทนด้วยสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ (Lumixyl) ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน

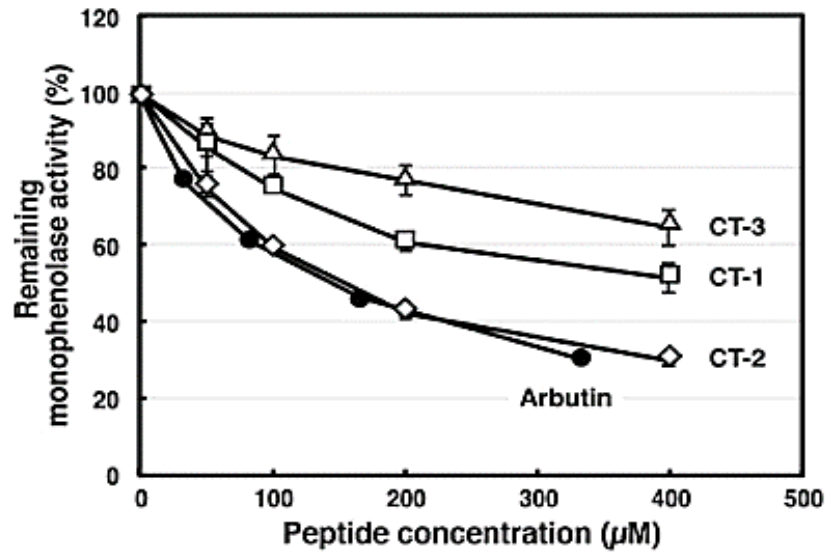
ที่มา: (Felipe Jimenez&Ph.D., 2009)



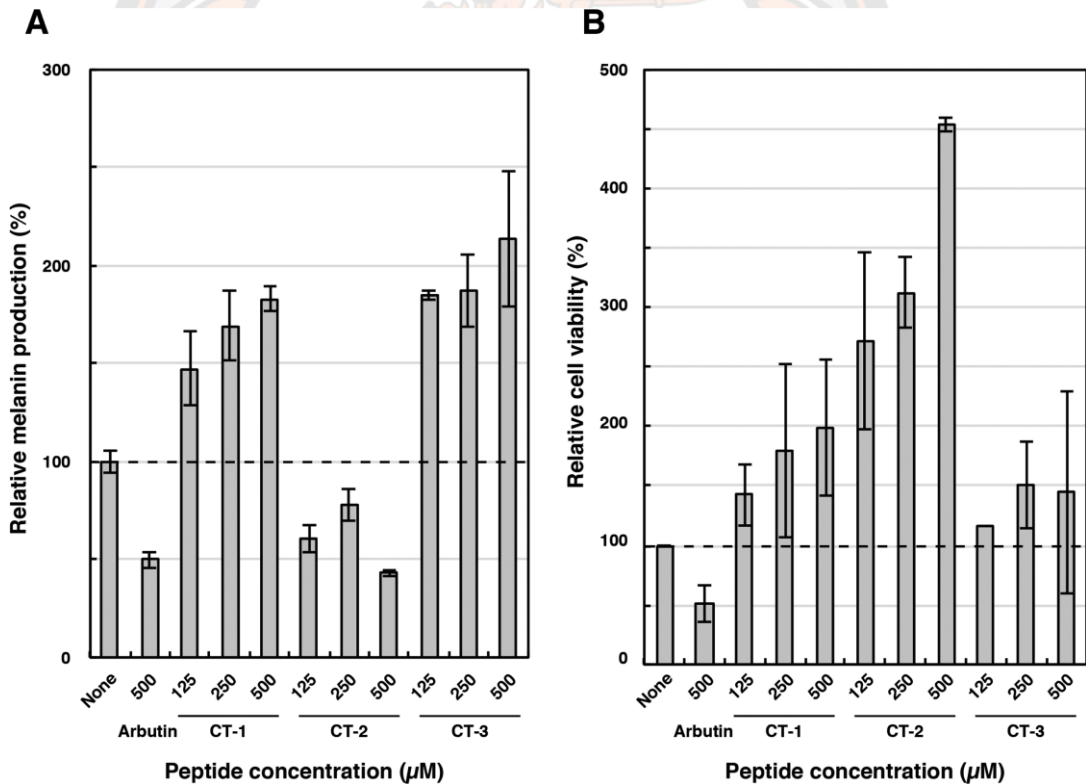
ภาพ 20 (A) แสดงการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน/เซลล์เมลานোসิตจากสารไฮโดรควิโนน (HQ) และสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ (Lumixyl) ที่ความเข้มข้น 10 μM (B) แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง

ที่มา: (Felipe Jimenez&Ph.D., 2009)

จากงานวิจัยในปี 2016 ได้มีการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซส(เปปไทด์)จากรำข้าว ได้แก่ เปปไทด์ชนิด CT1 (HGEGGRPY), CT2 (LQPSHY) และ CT3 (HPTSEVY) มาใช้ในการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mTyr) เทียบกับการทำงานของอัลบูติน จากผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ชนิด CT2 มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดและไปในทิศทางเดียวกับอัลบูติน (แสดงดังภาพ 21) อีกทั้งจากการวิเคราะห์ปริมาณเมลานิน (Melanin contents) พบว่าเปปไทด์ CT1และ CT3 เพิ่มการผลิตเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลานوما B16 ของหนู ในขณะที่เปปไทด์ CT2 ยับยั้งการผลิตเมลานินได้สูงกว่าร้อยละ 50 ที่ 500 μM และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารมาตรฐานอาร์บูติน (แสดงดังภาพ 22A) จากนั้นนำมาทดลองกับเซลล์เมลานิน และนำไปวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay เพื่อหาความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันของ CT2 มีอัตราการอยู่รอดของเซลล์สูงที่สุด ในขณะที่อัลบูตินมีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด หมายความว่าอาร์บูตินมีผลเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับสารสกัดเปปไทด์ (แสดงดังภาพ 22B) (Ochiai A et al., 2016)



ภาพ 21 การยับยั้งของเปปไทด์แต่ละชนิดต่อกิจกรรมไทโรซิเนสของเอนไซม์ไทโรซิเนส
ที่มา: (Ochiai A et al., 2016)



ภาพ 22 ผลของเปปไทด์แต่ละชนิดต่อปริมาณเมลานินและควมมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิดเม
ลาโนมา B16 ของหนู (A) ปริมาณเมลานินสัมพัทธ์ 3 วันหลังการรักษาด้วยเปปไทด์ (B)
ควมมีชีวิตของเซลล์ 3 วันหลังการบำบัดด้วยเปปไทด์เมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธี MTT

ที่มา: (Ochiai A et al., 2016)

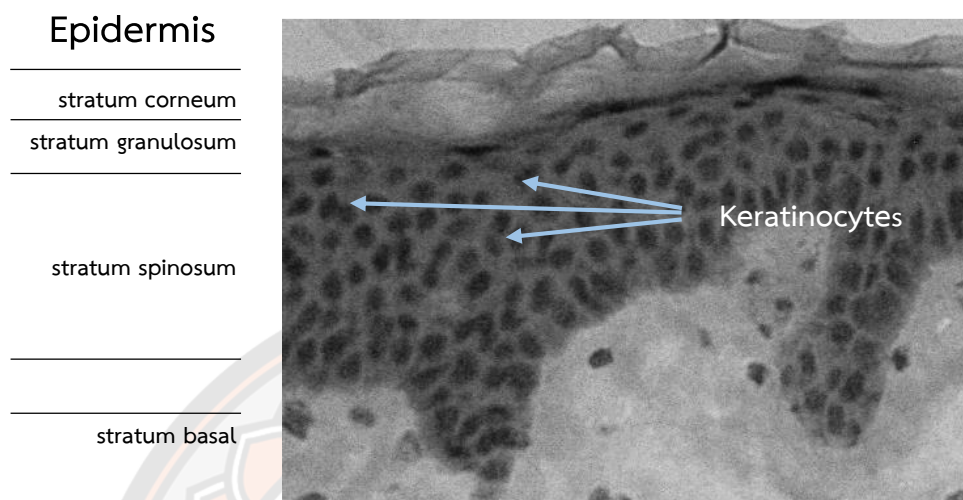
ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์น้อยกว่าและมีความปลอดภัยสูง จากข้อมูลทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า สารสกัดเปปไทด์มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการพัฒนาสารยับยั้งไทโรซิเนสใหม่จากแหล่งต่างๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการค้นคว้าและศึกษาหาเปปไทด์มาใช้แทนสารเคมีดังกล่าว ซึ่งเปปไทด์อาจเตรียมได้จากกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท เป็นต้น

6. การประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยโดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

ในปัจจุบันมีงานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังมากมาย ไม่ว่าจะเป็นทางด้านพยาธิกำเนิดและการรักษาโรค รวมไปถึงการทดสอบฤทธิ์ของยาหรือสารสกัดสมุนไพร เนื่องจากว่าผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาใช้กับผิวหนังต้องได้รับการทดสอบพิษต่อผิวหนัง เพื่อป้องกันการเกิดโรค รวมไปถึงการเกิดอาการแพ้ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับผิวหนังและเพื่อรับรองว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ก่อนที่จะมีการผลิตออกสู่ท้องตลาด ซึ่งนวัตกรรมเหล่านี้ล้วนมีมูลค่าอย่างมหาศาลต่อเศรษฐกิจในระดับประเทศหรือระดับโลก (Khwandow et al., 2017)

เซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิดเคอราติโนไซต์ (Keratinocyte) เป็นทางเลือกหนึ่งในปัจจุบันที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยด้านผิวหนังในลักษณะ *in vitro* ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่จะต่อยอดงานวิจัย ในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ ตามลำดับ ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เซลล์ผิวหนังมนุษย์ร่วมกับเซลล์อื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบของผิวหนัง เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ที่ทำหน้าที่สร้างเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) และคอลลาเจน ซึ่งจะรวมตัวกันเป็นกรอบโครงสร้างของเนื้อเยื่อในสัตว์และมนุษย์ซึ่งเป็นการสร้างผิวหนังเลียนแบบผิวหนังของมนุษย์เพื่อใช้ในงานวิจัยขั้นต้น ก่อนที่จะนำไปศึกษาวิจัยต่อไปในขั้นคลินิก ซึ่งโมเดลนี้ได้รับการยอมรับและถูกนำมาใช้มากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากมีความใกล้เคียงกับผิวหนังจริงของมนุษย์ซึ่งดีกว่าการใช้ผิวหนังของสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ การใช้โมเดลผิวหนังของมนุษย์ยังเป็นทางเลือกหนึ่งของนักวิจัยที่จะช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองโดยไม่จำเป็น หรือให้ผลการทดลองที่ไม่ตรงเป้าหมายและเพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดทางด้านจริยธรรม ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อนโยบายลดการทดสอบสารเคมีในสัตว์ทดลอง (3R's: Reduce, Refine, Replace) ของประเทศในสหภาพยุโรป (Khwandow et al., 2017) จึงได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษของผิวหนัง โดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงทดแทนการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง โดยการประเมินความเป็นพิษต่อผิวหนังจะพิจารณาจากความสามารถของสารทดสอบในการลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) และเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงในการทดสอบ ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบนั้นได้มีการนำเซลล์ผิวหนังมาเพื่อพัฒนา ได้แก่

เซลล์เคอราติโนไซต์ (Keratinocyte cell) ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่อยู่ชั้นหนังกำพร้า เป็นต้น (สกล เทพ ศรีรักษ์, 2553) (แสดงดังภาพ 23)



ภาพ 23 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยเซลล์ keratinocyte
ที่มา: (จารุภา วิโยชน์, 2560)

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังของเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte) โดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงในรูปแบบ cell line ในการทดสอบแทนการใช้สัตว์ทดลอง โดยมุ่งหวังว่าจะเป็นส่วนหนึ่งในการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือสารสกัดเปปไทด์ที่ดีในอนาคต

7. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

โปรตีนไฮโดรไลเสท คือผลผลิตของโปรตีนที่ได้จากกระบวนการย่อยหรือไฮโดรไลซิสโปรตีน โดยโมเลกุลของโปรตีนจะถูกตัดพันธะให้มีขนาดเล็กลงเป็นเปปไทด์มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน หรือกรดอะมิโนอิสระ (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2546) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทสามารถผลิตได้จากแหล่งโปรตีนที่หลากหลาย เช่น ปลา นม ไข่ พืช เป็นต้น กระบวนการผลิตสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีกรด ต่าง หรือเอนไซม์โปรตีเอส ในสภาวะเหมาะสม การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจะช่วยเพิ่มความหลากหลายในการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ซึ่งการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจะส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโปรตีน โดยทำให้เปปไทด์มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีขั้วเพิ่มขึ้น ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายได้ดี (ทิพย์วดี และศศิธร, 2562)

ปัจจัยหลายประการที่ควรคำนึงถึงการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท ได้แก่ ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้ง

ต้น ระยะเวลา ค่า pH ของเอนไซม์ และอุณหภูมิ เป็นต้น ซึ่งการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ สามารถส่งผลกระทบต่อสมบัติการทำงานของโปรตีนในด้านต่างๆ และมีความเหมาะสมในด้านการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Vanga, S. K., Singh, A. and Raghavan, V.,2017) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลสโดยทั่วไป กระทำ ได้ 3 วิธี ได้แก่

1. การเกิดโปรตีนไฮโดรไลสโดยธรรมชาติ อาศัยกระบวนการย่อยสลายตัวเองด้วยเอนไซม์โปรติเอส ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อและเครื่องในสัตว์เช่น เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน เป็นต้น ซึ่งวิธีการย่อยสลายนี้ค่อนข้างซับซ้อนเนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่มากมายหลายชนิด แต่ละชนิดมีหน้าที่การทำงานที่แตกต่างกันทำให้ไม่สามารถที่ควบคุมการย่อยสลายของโปรตีนและใช้เวลาการย่อยสลายที่ยาวนาน

2. การย่อยสลายด้วยสารเคมี การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารเคมีเป็นการใช้กรดหรือด่างในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น ในการตัดสายเปปไทด์ให้สั้นลง เป็นวิธีที่มีราคาถูก สามารถย่อยสลายโปรตีนได้รวดเร็วและให้กลิ่นรสที่ดี นิยมนำมาใช้ในการผลิตสารเพิ่มรสชาติและเป็นส่วนผสมในอาหาร การย่อยสลายด้วยสารเคมีแบ่งเป็น 3 วิธี ได้แก่

2.1. การย่อยสลายด้วยกรด การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรด (Acid hydrolysis) โดยใช้กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดซัลฟูริก หรือกรดไฮโดรคลอริก เป็นต้น การใช้กรดซัลฟูริกย่อยสลายโปรตีนจะทำให้โปรตีนมีกลิ่นไม่ดีและเมื่อทำให้เป็นกลางจะเกิดตะกอนของเกลือแคลเซียมซัลเฟต ทั้งนี้เพราะไอออนซัลเฟตถูก แยกออกโดยการเติมแคลเซียมออกไซด์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยา ให้แคลเซียมซัลเฟต ดังนั้นตะกอนจะดูดซับกรดอะมิโนหรือสารประกอบอื่นๆ ที่ได้จากการย่อยโปรตีน ส่วนการย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกนั้นจะทำให้เกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกในการย่อยสลายโปรตีน (Hill, 1965) เนื่องจากเกลือที่เกิดขึ้นเป็นเกลือที่ใช้ในอาหารทั่วไปจึงส่งผลเสียต่อผลิตภัณฑ์น้อย กระบวนการนี้เป็นวิธีที่ได้รับการนิยมนมากกว่าการย่อยด้วยด่าง สามารถทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายต่ำ และประหยัดเวลา แต่ข้อด้อยคือทำให้สูญเสียกรดอะมิโนทริปโตเฟน และอาจทำให้กรดอะมิโนซิสเตอีน, เซอรีน และเมทไธโอนีนถูกทำลายด้วย (Olcott&Fraenkel, 1974) นอกจากนี้การย่อยสลายด้วยกรดทำให้วิตามินส่วนใหญ่ถูกทำลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสชาติและคุณสมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนไป (Peterson, 1974) การย่อยสลายด้วยกรดทำให้พันธะเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแอสพาร์ติกอยู่ทางด้านปลายสายจะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าพันธะเปปไทด์อื่นๆ ประมาณ 100 เท่า (Shih, 1992)

2.2. การย่อยสลายด้วยด่าง การย่อยสลายโปรตีนด้วยด่าง (Alkali hydrolysis) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าการย่อยสลายด้วยด่างทำให้กรดอะมิโนทริปโตเฟนถูกทำลายน้อยกว่าการใช้กรด ส่งผลกระทบต่อคุณภาพทางด้าน

โภชนาทำให้เกิดกลิ่นรสไม่ดี และเกิดปฏิกิริยาซีไมเซชัน (racemization) จะมีการดึงไฮโดรเจนจาก แอลฟาคาร์บอนของกรดอะมิโนหรือกรดอะมิโนบางชนิด ซึ่งเกิดการเปลี่ยนรูปของกรดอะมิโน L-form ไปเป็น D-form ที่ร่างกายไม่สามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ และยังทำให้กรดอะมิโนอาร์จินีน ทรีโอนีน และซีสเทอีนถูกทำลาย ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยสารละลายต่างเกิดเร็วกว่า ย่อยสลายด้วยสารละลายกรด (Shih, 1992)

2.3. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นการใช้เอนไซม์โปรติเอสทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ของโปรตีน กระบวนการนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง ทำในสภาวะที่ไม่รุนแรง และสามารถควบคุมระดับอัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยได้ดีกว่าการย่อยสลายตัวเอง (Kristinsson&Barbara, 2000) วิธีนี้อัตราการย่อยสลายค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการใช้กรดและด่าง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงในการเข้า ตัดพันธะเปปไทด์สูงกว่า ซึ่งให้ปริมาณเปปไทด์สูงสุด โดยการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ด้วย น้ำ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) (Adler-Nissen, 1986)

ปัจจัยหลายประการที่ควรคำนึงถึงการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท ได้แก่ ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น ระยะเวลา ค่า pH ของเอนไซม์ และอุณหภูมิ เป็นต้น ซึ่งการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมของการย่อย ให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ สามารถส่งผลต่อสมบัติการทำงาน ของโปรตีนในด้านต่างๆ และมีความเหมาะสมในด้านการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Vanga, S. K., Singh, A. and Raghavan, V.,2017)

นอกจากนี้เปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสท มีความหลากหลายในการออกฤทธิ์ต่างๆ การใช้ระบบอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) จะสามารถช่วยให้ได้กลุ่มของเปปไทด์ที่ต้องการนั้น แคลบลง เช่น ได้ขนาดโมเลกุลที่ต้องการและมีฤทธิ์เฉพาะที่ต้องการ ซึ่งมักจะขึ้นอยู่กับแหล่งโปรตีนที่ใช้ เริ่มต้น อีกทั้งการย่อยสลายโปรตีนควรคำนึงถึงระดับของการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีสมบัติตามที่ต้องการและมี ประสิทธิภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป (ทิพย์วลี และศศิธร, 2562)

8. คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและโอลิโกเปปไทด์ต่างๆ ซึ่งโปรติเอสผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยในระยะแรกๆ นั้นศึกษาการผลิตโปรติเอสในพืชและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ ยกตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากพืช เช่น ปาเปน โบรมิเลน ผลิตได้จากสัตว์ เช่น เปปซิน ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น แอลคาเลส และผลิตได้จากแบคทีเรีย เช่น นิเวทรส เป็นต้น มีการจัดแบ่งชนิดของโปรติเอสไว้หลายวิธี เช่น แบ่งตามจุดกำเนิดได้เป็น 3

ชนิดคือ จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ หรือแบ่งตามลักษณะการตัดบนสายโพลีเปปไทด์ได้เป็น 2 ชนิด คือเอกโซเปปทีเดสและเอนโดเปปทีเดส หรือถ้าแบ่งตามลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์สามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ Metalloproteinase, Acid proteinase, Cystein proteinase และ Serine proteinase ตามลำดับ (Saiprajong, R. 2009)

ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสส่วนใหญ่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักล้างและอุตสาหกรรมอาหาร เมื่อเทคโนโลยีมีการพัฒนามากขึ้น และมีความต้องการในการใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้น ทำให้มีการนำเอนไซม์โปรติเอสมาพัฒนา และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นมากขึ้น อุตสาหกรรมที่มักมีการนำโปรติเอสไปใช้ได้แก่ อุตสาหกรรมซักล้าง (detergents) โดยโปรติเอสเป็นหนึ่งในส่วนผสมของสารซักฟอก ซึ่งนำมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นสิ่งสกปรก อุตสาหกรรมฟอกหนัง (leather industry) เป็นอีกอุตสาหกรรมหนึ่งที่ใช้โปรติเอส โดยปกติใช้สารเคมีเช่น โซเดียมซัลไฟต์ในการฟอกหนังและกำจัดขน แต่การใช้สารเคมีก่อให้เกิดปัญหามลพิษ โปรติเอสจึงถูกเลือกมาใช้ทดแทนสารเคมีเพื่อลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม อีกทั้งการใช้โปรติเอสในกระบวนการอุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมถ้ำรูป เป็นต้น (Helle, O. and Boyce, 1990)

อุตสาหกรรมอาหารหลายกลุ่มมีการใช้โปรติเอส เช่น อุตสาหกรรมผลิตเบียร์ (beer industry) อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม (dairy industry) ใช้โปรติเอสในการผลิตเนยแข็งช่วยในการตกตะกอนของนม ในอุตสาหกรรมขนมอบ (baking industry) ในกระบวนการผลิตแป้งสาลีมีโปรตีนที่เรียกว่า กลูเต็น (gluten) จะมีการใช้โปรติเอสผสมลงไปช่วยในการย่อยโปรตีน และลดเวลาในการผสม ทำให้ขนมอบมีปริมาตรเพิ่มขึ้น ตลอดจนใช้โปรติเอสในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากถั่ว ผลิตภัณฑ์ยา โดยพัฒนาประสิทธิภาพของยาด้านจุลินทรีย์และใช้ร่วมกับสารปฏิชีวนะในการรักษาบาดแผล (Suryanarayana, Saraswathi and Dwarakanath, 1998)

9. ชนิดเอนไซม์โปรติเอสที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

มิกส์เอนไซม์ หรือซูเปอร์เอนไซม์ (Super Enzymes)

มิกส์เอนไซม์ เป็นเอนไซม์ช่วยย่อยไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน แก้อาการอาหารไม่ย่อย ลดอาการของทางเดินอาหาร เช่น อาการที่เกิดจากกรดไหลย้อนกลับ (GERD) ทำให้รู้สึกปวดแสบร้อนในบริเวณหน้าอก ลดน้ำตาลในเลือดและโรคเบาหวาน

หน้าที่ของเอนไซม์ในร่างกาย ได้แก่ ย่อยอาหาร, นำส่งสารอาหารไปเลี้ยงเซลล์, สลายสารพิษ, ทำให้เลือดบริสุทธิ์ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันแข็งแรง, สร้างโปรตีนในกล้ามเนื้อ, ช่วยให้กล้ามเนื้อหดตัว กำจัดคาร์บอนไดออกไซด์จากปอด และลดความเครียดของตับอ่อน และอวัยวะอื่นๆ

ส่วนประกอบสำคัญในมิกส์เอนไซม์ ได้แก่

1.1 Pancreatin

เอนไซม์เพนกรีเอตินทำงานได้ดีที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 50 °C ประกอบไปด้วยเอนไซม์ Amylase, Lipase, Trypsin เป็นต้น ปกติเอนไซม์เหล่านี้พบที่ตับอ่อน มีหน้าที่ย่อยสารอาหารที่เรารับประทานเข้าไปเช่น แป้ง ไขมัน และโปรตีน เมื่อสารอาหารแตกออกเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก จะถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กสู่กระแสเลือดแล้วส่งไปทั่วร่างกาย ภายในเพนกรีเอตินมีฤทธิ์เอนไซม์ต่างๆ อาทิ เช่น

- Pancreatic protease : เอนไซม์โปรติเอส ย่อยอาหารกลุ่มโปรตีน เช่น เอนไซม์ทริปซิน
- Pancreatic amylase : เอนไซม์อะไมเลส ย่อยคาร์โบไฮเดรตหรือแป้งที่เป็นแป้งเด็กซ์ตริน และได้น้ำตาลมอลโตสบางส่วน
- Pancreatic lipase : เอนไซม์ไลเปส ย่อยไขมันโดยอาศัยเกลือน้ำดี (bile salt) เป็นตัวอีมัลซิไฟต์ (emulsified) ไขมันจะถูกย่อยได้กรดไขมันและกลีเซอรอล

1.2 Bromelain (EC 3.4.22.32)

เอนไซม์โบรมีเลนเป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อพืชตระกูล Bromeliaceae เช่น สับปะรด (*Ananas comosus Merr.*) ซึ่งพบในส่วนลำต้น เปลือก แกน ใบ และผล จัดเป็นโปรตีนพวกมีคุณสมบัติเป็นเบส (basic protein) สามารถละลายน้ำได้ ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ อะซีโตน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาและมีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่มีปฏิกิริยาสารตั้งต้นเป็นกลุ่มไทออล (thiol group) หรืออะมิโนที่มีลักษณะโครงสร้างแบบอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ไทโรซีน ไลซีน ไกลซีน และฟีนิลอะลานีน โดยสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้นจะมี pH เท่ากับ 6-8 และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 63-65 °C (กัลยา และคณะ, 2520) เอนไซม์โบรมีเลนนี้สามารถทำลายด้วยความร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 70 °C และถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วยสารโลหะหนัก เช่น สารพวกปรอท (mercurials) และสามารถกระตุ้นการทำงานด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนและเมอร์แคปโตเอทานอล

ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์โบรมีเลน (แสดงดังภาพ 24)

Preferential cleavage:

P6	P5	P4	P3	P2	P1	↓	P1'	P2'	P3'	P4'
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Lys	↓	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	↓	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	↓	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa

ภาพ 24 ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์โบรมีเลน

(เมื่อ Xaa: กรดอะมิโนทั่วไป และ ↓: จุดตัดพันธะเปปไทด์)

ที่มา: (<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals>)

เอนไซม์โบรมีเลนจะเข้าตัดหรือไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ที่อยู่ด้านในของสายพอลิเพปไทด์บริเวณปลาย C-terminal โดยมีความเฉพาะเจาะจงกับพันธะเปปไทด์ที่มีกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl group) หรืออะมิโนที่มีลักษณะโครงสร้างแบบอะโรมาติก ซึ่งจะเข้าตัดระหว่างกลุ่มอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) หรือกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เช่น อะลานีน (Alanine, Ala), ไลซีน (Lysine, Lys), และไทโรซีน (Tyrosine, Tyr)

1.3 Pepsin (EC 3.4.23.1)

เอนไซม์เปปซินจัดเป็นเอนไซม์กลุ่ม Aspartic proteinase เป็นสมาชิกของตระกูล Peptidase A1 ซึ่งเป็นโปรติเอสที่ย่อยได้ดีในน้ำย่อยของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ถูกผลิตโดยสิ่งมีชีวิตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหมด น้ำหนักโมเลกุล 34,620 ดาลตัน ทำงานได้ดีในสภาวะค่า pH 2 และอุณหภูมิที่ 37 °C ถูกสร้างขึ้นในรูปเปปซิโนเจนไม่สามารถทำงานได้ โดยผนังชั้นในสุดของกระเพาะอาหารหลังกรดไฮโดรคลอริกออกมาทำให้มีสภาพเป็นกรดเพื่อแลกเปลี่ยนเปปซิโนเจนเป็นเอนไซม์เปปซินเพื่อทำหน้าที่ย่อยสารอาหารประเภทโปรตีน ให้มีขนาดเล็กลงก่อนส่งไปย่อยต่อที่ลำไส้เล็ก เอนไซม์เปปซินสามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้ดีกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบอะโรมาติก (aromatics) เช่น ฟีนิลอะลานีน, ลิวซีน, ทริปโตเฟนและไทโรซีน

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นหนึ่งในเอนไซม์นี้ที่สำคัญ มีความเกี่ยวข้องในการย่อยอาหารในกระเพาะอาหารของสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังมีประโยชน์ในวงการแพทย์ สารส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นยาหรืออาหารเสริม

ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์เปปซิน (แสดงดังภาพ 25)

Preferential cleavage:											
P6	P5	P4	P3	P2	P1	↓	P1'	P2'	P3'	P4'	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	hydrophobic	↓	hydrophobic	Xaa	Xaa	Xaa	

ภาพ 25 ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์เปปซิน

(เมื่อ Xaa: กรดอะมิโนทั่วไป และ ↓: จุดตัดพันธะเปปไทด์)

ที่มา: (<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals>)

เอนไซม์เปปซินจะเข้าตัดหรือไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ที่อยู่ด้านในของสายพอลิเปปไทด์ บริเวณปลาย C-terminal โดยมีความเฉพาะเจาะจงกับพันธะเปปไทด์ ที่เกิดจากกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติกหรือเป็นกรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรด คือมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) 2 หมู่ (dicarboxylic acid) อยู่ในโมเลกุล เช่น กรด กลูตามิก และกรดแอสพาร์ติก ซึ่งจะเข้าตัดระหว่างกลุ่มอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) หรือกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เช่น อะลานีน (Alanine, Ala), วาลีน (Valine, Val), ทริปโตเฟน (Tryptophan, Trp) และ ไทโรซีน (Tyrosine, Tyr) ทั้งนี้จะได้รับการยกเว้นในสภาวะปกติที่กรดอะมิโนลิวซีน (Leucine, Leu) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine, Phe) เชื่อมกัน ณ ตำแหน่ง P1 และ P1' ดังกล่าว ซึ่งหากนอกเหนือจากตำแหน่งนั้นแล้ว กรดอะมิโนทั่วไปจะถูกเชื่อมกันตามปกติ

1.4 Papain (EC 3.4.22.2)

เอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอ เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและการทำให้เนื้อนุ่ม เอนไซม์ปาเปนมักตัดพันธะเปปไทด์ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนชนิดเบส

ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ปาเปนนั้นแตกต่างกันไปตามลักษณะและความเข้มข้นของสารตั้งต้น ช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.0-7.0 หากใช้สารตั้งต้นเป็นเจลาติน จะมีค่า pH ที่เหมาะสมคือ pH 5.0 หากใช้เคซีน (casein) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เป็นสารตั้งต้นจะมี pH ที่เหมาะสมคือ pH 7.0 เอนไซม์ปาเปนมีเสถียรภาพ สูงสุดในช่วง pH 5.0-9.0 และที่อุณหภูมิ 60-70 °C และเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลุ่มโปรตีเอสอื่นๆ เอนไซม์ปาเปนมีความเสถียรในอุณหภูมิที่สูงกว่าซึ่งสามารถมีกิจกรรมได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-90 °C หากอุณหภูมิสูงกว่า 90 °C เป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ไม่ว่าจะใช้วิธีการแช่เยือกแข็งหรือให้ความร้อนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (Whitehurst & Van Oort, 2009)

ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์ปาเปน (แสดงดังภาพ 26)

Preferential cleavage:										
P6	P5	P4	P3	P2	P1 ↓	P1'	P2'	P3'	P4'	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	hydrophobic	Arg ↓	not Val	Xaa	Xaa	Xaa	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	hydrophobic	Lys ↓	not Val	Xaa	Xaa	Xaa	

ภาพ 26 ตำแหน่ง cleavage site ของเอนไซม์ปาเปน

(เมื่อ Xaa: กรดอะมิโนทั่วไป และ ↓: จุดตัดพันธะเปปไทด์)

ที่มา: (<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals>)

เอนไซม์ปาเปนจะเข้าตัดพันธะเปปไทด์ระหว่างตำแหน่งที่เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ วาลีน (Valine, Val) ณ ตำแหน่งที่ P1' โดยตัดแยกออกกับตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นประจวบที่ เป็น อาร์จินีน (Arginine, Arg) หรือไลซีน (Lysine, Lys) ณ ตำแหน่งที่ P1 ซึ่งหน้าตำแหน่งของกรดอะมิโน ทั้งสองชนิด (P1) ต้องเชื่อมอยู่กับตำแหน่งที่ P2 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) หรือกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ทั้งนี้จะได้รับการยกเว้นในสภาวะปกติที่กรดอะมิโนลิซีน (Leucine, Leu) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine, Phe) เชื่อมกัน นอกเหนือจากตำแหน่ง ดังกล่าวแล้วจะเชื่อมอยู่กับกรดอะมิโนทั่วไปตามปกติ

1.5 Cellulase (E.C.3.2.1.91)

เอกโซกลูคาเนส หรือ เอกโซ-1,4-กลูคาเนส หรือเอกโซปีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซปีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส หรือเซลลูเลส (cellulase) พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส พืช หอยบางชนิด ได้แก่ *Helic pomatia* และจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ ฟังไจ และแอกติโนไมซีส สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์นี้ในทางอุตสาหกรรมเพื่อใช้ผลิตสารที่เป็นประโยชน์ดังที่กล่าวข้างต้น และ ศึกษาในจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากการย่อยสลายเซลลูโลสอาศัยการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสโมเลกุลของ เซลลูโลสที่พันธะ ปีต้า-1, 4-ไกลโคไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ที่ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 หน่วย หรืออาจเรียกว่า cellulolytic enzyme นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้ โดยอาศัย การทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนสอีกด้วย

จะเห็นได้ว่าเอนไซม์โปรตีเอสมีประโยชน์มากมาย แต่ต้องมีการศึกษาวิธีการผลิต การควบคุมปัจจัยการผลิต และศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงวิธีการผลิต เพื่อให้ได้เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) ได้จริงในอุตสาหกรรม เนื่องจากสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ต้องขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ที่ใช้และแหล่งโปรตีนนั้นๆ ทั้งนี้ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทสามารถผลิตได้จากแหล่งโปรตีนที่หลากหลาย อาทิเช่น ไข่ นม ไข่ ถั่ว ปลา ข้าว และเห็ด เป็นต้น

10. ชนิดของเห็ดที่นำมาศึกษา

10.1 เห็ดหอม

เห็ดหอมเป็นที่ยอมรับกันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันว่าเห็ดหอมเป็นได้ทั้งอาหารและยารักษาโรค เห็ดหอมอุดมไปด้วยสารอาหารแร่ธาตุที่หลากหลาย รสชาติดี มีโปรตีนสูง ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการมากเพียงพอที่จะใช้ทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้

ปัจจุบันการเพาะปลูกและบริโภคเห็ดในประเทศไทยได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากเห็ดมีราคาถูก หาได้ง่าย และมีคุณประโยชน์สูง โดยเฉพาะสรรพคุณทางยา ดังนั้นเห็ดหอมจึงมีศักยภาพในการนำมาศึกษา พัฒนาและต่อยอดงานวิจัยเพื่อใช้เป็นยารักษาโรค หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไปได้ในอนาคต



ภาพ 27 เห็ดหอม (*Lentinula edodes*)

ที่มา: (<https://thummanoondotcom.wordpress.com/2014/02/02/>)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Lentinula edodes*

ชื่อไทย: เห็ดหอม

ชื่อสามัญ: Shiitake
ชื่ออื่น: ญีปุ่นเรียกว่า ไชอิตาเกะ เกาหลีเรียกว่า โบโกะ จีนเรียกว่า เฮียโกะ อังกฤษเรียกว่าเห็ดดำ
อาณาจักร/วงศ์: ฟังไจ/Marasmiaceae
ถิ่นกำเนิด: ประเทศจีน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และไต้หวัน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: บริเวณหมวกเห็ดจะมีลักษณะกลม ตรงผิวของหมวกเห็ดจะมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม หรือน้ำตาลอมแดง โดยมีขนที่รวมกันเป็นลักษณะเกล็ดสีขาวหายากๆ กระจายบริเวณขอบหมวกเห็ด ส่วนบริเวณครึ่งเมื่ออ่อนจะเป็นแผ่นสีขาวบางๆ แต่เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเข้มทันที เนื้อหมวกแน่น มีลักษณะเว้ากลางเล็กน้อย มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-10 เซนติเมตร มีก้านดอกและโคนก้านดอกสีน้ำตาลอ่อนๆ หรือขาว ขนาดประมาณ 1-1.5 x 5-6 เซนติเมตร ส่วนเนื้อของเห็ดหอมจะนุ่ม และมีกลิ่นหอมอันเป็นเอกลักษณ์ที่เฉพาะตัวของเห็ดหอม (เห็ดชูไทย, ม.ป.ป. & Herbs botany, 2014)

แร่ธาตุและวิตามินที่สำคัญ (ยอดยิ่ง, 2554) :

- 1. เซเลเนียม (Se)** เป็นธาตุที่มีฤทธิ์ด้านการเกิดอนุมูลอิสระจึงลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งและโรคต่างๆ ในผู้สูงอายุเช่นโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น
- 2. โพแทสเซียม (K)** เป็นธาตุที่จำเป็นต่อการควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจความสมดุลของน้ำในร่างกายการทำงานของกล้ามเนื้อและระบบประสาทต่างๆ เนื่องจากเห็ดมีปริมาณโพแทสเซียมสูง แต่ปริมาณโซเดียมต่ำจึงช่วยลดความดันโลหิตได้ดี
- 3. เหล็ก (Fe)** เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในเม็ดเลือดแดงและเอนไซม์ต่างๆ ในร่างกาย หากร่างกายขาดเหล็กจะทำให้ T-cell มีจำนวนลดลงและความสามารถของ Neutrophil ในการทำลายเชื้อโรคลดลงด้วย ดังนั้นหากร่างกายขาดเหล็กอาจทำให้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้มากขึ้น
- 4. ทองแดง (Cu)** เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิดในร่างกายที่ทำหน้าที่ผลิตพลังงานให้แก่ร่างกายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเสริมสร้างความยืดหยุ่นให้แก่ผิวหนัง ช่วยสร้างสีผิวให้คล้ำขึ้นเพื่อปกป้องอันตรายจากแสงแดดมีส่วนในการสร้างสีตาและสีผม เป็นต้น
- 5. วิตามินบีรวม** เป็นวิตามินที่พบได้มากในเห็ดช่วยบำรุงผิวพรรณและการมองเห็นช่วยควบคุมการทำงานของระบบย่อยอาหารและระบบประสาท เป็นต้น

สารเคมีและสรรพคุณสำคัญที่พบในเห็ดหอม: (ยอดยิ่ง, 2554)

- 1. Eritadenine และ AC-2P** มีประสิทธิภาพทำให้ไตทำลายคอเลสเตอรอลและไขมันในเลือด

2. **Lentinan** (β 1,3 และ 1,6 glucan) เป็น Polysaccharide กระตุ้นภูมิคุ้มกันและต่อต้านการติดเชื้อ ช่วยชะลอการแพร่กระจายและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Chihara, G. et al., 1970)
 3. **Ergosterol** ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เมื่อได้รับแสงอาทิตย์จะเปลี่ยนเป็นวิตามิน D ป้องกันกระดูกพรุน
 4. **AHCC (Active hexose correlated compound)** เป็นสารที่มี α -glucose มาก เป็นสารกระตุ้นการต้านเชื้อของร่างกายทั้งไวรัสและแบคทีเรีย
 5. **Heterogalactan** ลดการเจ็บปวดของอวัยวะภายในและลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ (Carbonero, E.R. and et al., 2008)
 6. **Phenolic compound** กำจัดอนุมูลอิสระ ได้แก่ Cinnamic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid, Protocatechuic acid, Gallic acid, Catechin และ Quercetin เป็นต้น
 7. **Exo-polymer** ลดน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน เพิ่มอินซูลิน ลดคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ (Yang, B.K et al., 2002)
 8. **Lentinula edodes mycelium (LEM)** Protein bound polysaccharide รักษาตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัส B และ C ช่วยกระตุ้นการสร้าง macrophage และ Interleukin-1 ยับยั้งการเจริญ HIV
 9. **Lenthionine** เป็นสารที่ให้กลิ่นหอม (Odoriferous)
 10. **Lentin** เป็นโปรตีนแยกได้จากดอกเห็ดหอม ยับยั้งการเจริญของไมซีเลียมเชื้อราหลายชนิด
 11. **β -glucan, Homo-glucan, Hetero-glucan** ต้านเนื้องอก ต้านแบคทีเรีย รา ไวรัส และปรสิต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ลดระดับคอเลสเตอรอลและกลูโคสในเลือด เป็นต้น
- องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางอาหาร:**

นักโภชนาการวิเคราะห์ว่าเห็ดหอมประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด เอนไซม์มากกว่า 30 ชนิด วิตามินบี วิตามินเอและวิตามินดี เป็นต้น หากพิจารณาถึงคุณค่าทางอาหารของเห็ดหอมสดจำนวน 100 กรัม จะให้พลังงาน 387 กิโลแคลอรี ที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 67.5 กรัม โปรตีน 17.5 กรัม ไขมัน 8.0 กรัม เส้นใย 8.0 กรัม วิตามินบี1 1.8 มิลลิกรัม วิตามินบี2 4.9 มิลลิกรัม ไนอะซิน 4.9 มิลลิกรัม แคลเซียม 98 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 476 มิลลิกรัม และเหล็ก 8.5 มิลลิกรัม สำหรับคุณค่าทางอาหารของเห็ดหอมแห้งจำนวน 100 กรัม ให้พลังงาน 375 กิโลแคลอรี ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 82.3 กรัม โปรตีน 10.3 กรัม ไขมัน 1.9 กรัม เส้นใย 6.5 กรัม วิตามินบี1 0.4 มิลลิกรัม วิตามินบี2 0.9 มิลลิกรัม ไนอะซิน 11.9 มิลลิกรัม แคลเซียม 12 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 171 มิลลิกรัม และเหล็ก 4 มิลลิกรัม ทั้งนี้เห็ดหอมมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าเห็ดแชมปิญอง(เห็ดกระดุม) ถึง

2 เท่า และอุดมด้วยแร่ธาตุและวิตามินที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากมายหลายชนิด (ชุตติมา และสนทยา, 2552)

เห็ดหอมประกอบด้วยโปรตีนสูงถึง 23% แต่มีปริมาณไขมันต่ำเพียงไม่เกิน 2% ซึ่งในจำนวนนี้มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว oleic acid และ linoleic acid ประมาณ 72-77% ของปริมาณไขมันทั้งหมด ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย อุดมด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญทั้ง 9 ชนิด ประมาณ 39% ได้แก่ ลิวซีน ไอโซลิวซีน วาลีน ทรีโตนแพน ไลซีน ทรีโอนีน ฟีนิลอลานีน เมทไทโอนีน และฮีสทิดีน และวิตามินที่พบในเห็ดหอมได้แก่ วิตามิน บี 1 (thiamine) วิตามิน บี 2 (riboflavin) ไนอะซิน (niacin) และวิตามิน ซี (ascorbic acid) (ชุตติมา และสนทยา, 2552)

งานวิจัยปี 2015 ได้รายงาน bahwa เห็ดหอมแบบแห้งและแบบผงอุดมไปด้วยปริมาณโปรตีนถึง 4.7 และ 12.8 % ตามลำดับ แต่มีปริมาณไขมันต่ำเพียงไม่เกิน 2% (Valverde, M. E et al., 2015)

จากงานวิจัยปี 2017 และ 2019 มีรายงานว่าดอกเห็ดหอมอุดมไปด้วยโปรตีน (26% ของน้ำหนักแห้ง), ไขมัน, รวมถึงกรดไขมัน (ส่วนใหญ่เป็นกรดไลโนเลนิก), คาร์โบไฮเดรต, ergosterols และแร่ธาตุ; วิตามิน B1, B2 และ C (Himanshi และคณะ., 2017; Badalyan และคณะ., 2019)

งานวิจัยปี 2010 ของคุณ Yaovadee และคณะ ได้วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณโปรตีนในเห็ดที่กินได้บางชนิดในประเทศไทย ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบโปรตีนในเห็ดเป่าฮื้อ (*Pleurotus ostreatus*) และเห็ดหอม (*Lentinus edodes*) แตกต่างกันระหว่าง 19.59 ก./100 ก. และ 24.68 ก./100 ก. ตามลำดับ และยังพบไขมันต่ำในเห็ดเป่าฮื้อ (0.62 ก./100 ก.) และในเห็ดหอม (1.42 ก./ 100 ก.) ซึ่งลักษณะโปรตีนสูงแต่ไขมันต่ำเหล่านี้สอดคล้องกับงานก่อนหน้า (Aletor, 1995; Longvah and Deosthale, 1998; Diez and Alvarez, 2001) อีกทั้งองค์ประกอบของกรดอะมิโนของเห็ดเหล่านี้ **แสดงดังตาราง 3** ผลการตรวจกรดอะมิโนพบว่าโปรตีนมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นส่วนใหญ่มีประโยชน์ทางโภชนาการ ดังนั้นจากการตรวจสอบค่าทางชีววิทยาในร่างกาย พบว่าคุณภาพโปรตีนของ *L. edodes* นั้นดีที่สุดในเมื่อเทียบกับเห็ดชนิดอื่น

ตารางที่ 3 องค์ประกอบกรดอะมิโนที่จำเป็นของเห็ดและเคซีนตามมาตรฐาน FAO/WHO

Essential amino acid	Amino acid mg/gm of protein					FAO/WHO1 1972
	Nang Rom	Kra Dang	Pao Heo	Hoom	Casein	
Isoleucine	38	36	36	37	41	40
Leucine	7	59	56	53	97	70
Lysine	40	38	38	41	71	55
Methionine+Cystine	55	4	50	60	44	35
Phenylalanine+Tyrosine	58	58	59	54	101	60
Threonine	49	43	48	50	44	40
Tryptophan	7*(70)	6*(60)	7*(70)	6*(60)	-	10
Valine	53	58	66	48	53	50

1 Source : Food composition table for use in East Asia (FAO, 1972).

* () Chemical score = $\frac{\text{amino acid content in diet}}{\text{amino acid content in FAO/WHO Standard}} \times 100$

ที่มา: (Y. Cuptapun et al., 2010)

จากปี 2018 และ 2019 รายงานว่าโปรตีนจากดอกเห็ดหอมมีกรดอะมิโน 18 ตัวซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของสูตรโภชนาการที่สมดุล ซึ่งมักประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น: ไลซีน, ทรีโอนีน, วาลีน, ทริโตนเฟน, ไทโรซีน เป็นต้น นอกจากนี้โปรตีนแล้ว ฟังไยยังสามารถสังเคราะห์ไขมันและส่วนประกอบของไขมันที่มีฤทธิ์สูงได้ในปริมาณที่ค่อนข้างมาก ประกอบด้วยโมโนและไตรกลีเซอไรด์ สเตอรอล และฟอสโฟลิปิด (Muszynska, B และคณะ., 2018; Wen Li และคณะ., 2019)

งานวิจัยปี 2020 ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนของ *Lentinus edodes* สายพันธุ์ 2541 และพบว่าโปรตีนประกอบด้วยกลูตามิกสูงถึง 17% ซึ่งเป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็น และยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็น (47%) ในบรรดากรดอะมิโนที่จำเป็นที่เด่นๆ คือ ลิวซีน ไลซีน วาลีน และไทโรซีน (Mustafin K.G et al., 2020)

งานวิจัยปี 2554 ของคุณจันทร์สุดา จริยวัฒน์วิจิตร และคณะกล่าวถึงคุณลักษณะและองค์ประกอบด้านรสชาติที่สำคัญในเห็ดหอมสดที่ปลูกในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีผลต่อรสชาติของเห็ดหอมสดหลังการเก็บเกี่ยว ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 0, 4 และ 8 วัน พบว่าในเห็ดหอมสดมีปริมาณกรดกลูตามิกมากกว่ากรดอะมิโนอิสระชนิดอื่น (แสดงดังตาราง 4) โดยมีปริมาณ 470, 509 และ 1,008 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ในอาหาร กรดอะมิโนอิสระที่พบรองลงมาคือ เซอริน และอาร์จินีน ซึ่งมีประมาณ 361,

327, 395 และ 222, 234 , 241 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเก็บรักษาไว้ 0, 4 และ 8 วัน ตามลำดับ กรดกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนอิสระที่ทำให้เกิดรสอูมามิ หรือรสกลมกล่อม หรือรสอร่อย (MSG-like) โดยเซอรีนและอาร์จินีนเป็นกรดอะมิโนอิสระซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ทำให้เกิดรสหวาน (จันทร์สุดา จริยวัฒนวิจิตร, 2554)

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดอะมิโนในเห็ดหอม (*Lentinula edodes*)

Amino acid	Content ^a (mg/100g dry wt.)		
	Day 0	Day 4	Day 8
L-Alanine	170 ± 28 bc	147 ± 18 b	152 ± 16 b
L-Arginine	222 ± 32 bc	234 ± 26 bc	241 ± 34 bc
L-Aspartic acid	220 ± 24 bc	240 ± 29 bc	306 ± 37 bc
L-Glutamic acid	470 ± 51	509 ± 55 c	1,008 ± 67 d
Glycine	183 ± 18 bc	201 ± 27 bc	228 ± 26 bc
L-Histidine ^c	138 ± 17 b	134 ± 19 b	154 ± 23 b
L-Isoleucine ^c	211 ± 22 bc	149 ± 21 b	152 ± 19 b
L-Leucine ^c	191 ± 15 bc	204 ± 25 bc	200 ± 35 b
L-Lysine ^c	215 ± 24 bc	168 ± 19 b	179 ± 24 b
L-Methionine ^c	155 ± 16 b	123 ± 16 b	131 ± 17 b
L-Phenylalanine ^c	179 ± 18 b	157 ± 26 b	153 ± 21 b
L-Serine	361 ± 26 c	327 ± 22 c	395 ± 31 c
L-Threonine ^c	202 ± 25 bc	221 ± 26 bc	237 ± 26 bc
L-Tryptophan ^c	126 ± 18 b	98 ± 19 a	96 ± 25 a
L-Tyrosine ^c	67 ± 12 a	61 ± 18 a	nd
L-Valine	nd	nd	nd
Total	3,110 ± 207	2,973 ± 221	3,632 ± 356

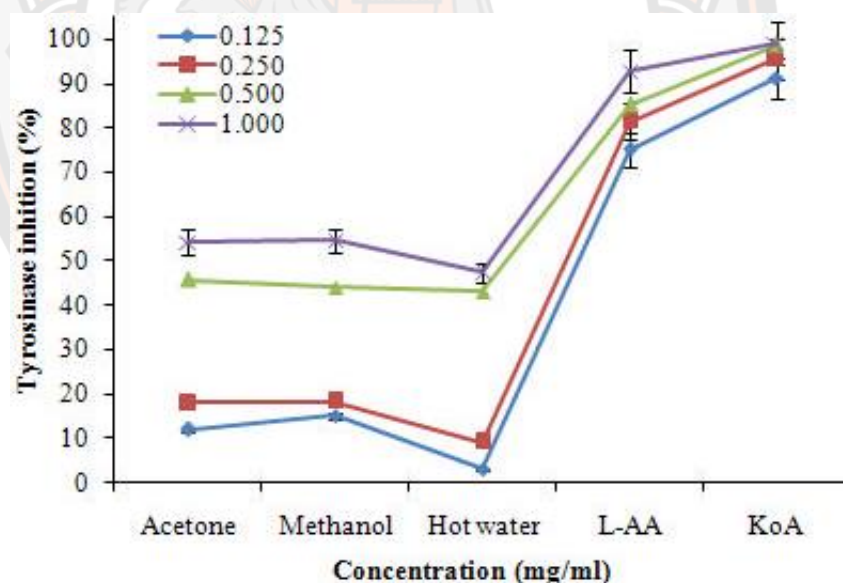
^a Each value is expressed as mean ± SD. (n=9). Means with different letters within a row are significantly different ($P<0.05$).

^b nd, not detected , ^c Essential amino acids.

ที่มา: (จันทร์สุดา จริยวัฒนวิจิตร, 2554)

มีการรายงานว่าสารจำพวก flavonoids, lignans, และ phenolic acids พบมากในเห็ดทั่วไป เช่น epicatechin gallate, epigallocatechin, caffeic acid, ferulic acid, quercetin, rutin และ avobenzene เป็นต้น ซึ่งเป็นหนึ่งในสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันหรือลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และได้รับการรายงานว่าสามารถลดปริมาณเมลานินและแสดงการยับยั้งไทโรซิเนสซึ่งอาจมีผลต่อการชะลอการสร้างเม็ดสีได้ (Taofiq et al., 2016)

จากงานวิจัย (Yoon et al., 2011) ได้ทำการตรวจหาความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิก และศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดต่างๆ จากดอกเห็ดหอม ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากดอกเห็ดหอมด้วยอะซิโตน เมทานอล และน้ำร้อนที่ความเข้มข้น 0.125-1.0 มก./มล. มีค่าการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ระหว่างร้อยละ 11.94-54.22, 15.12-54.61 และ 3.09-47.32 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารมาตรฐานวิตามินซีและกรดโคจิกแสดงฤทธิ์การยับยั้งไทโรซิเนสที่สูงซึ่งมีค่าร้อยละ 75.12-92.74 และ 91.23-99.00 ตามลำดับ (แสดงดังภาพ 28) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากดอกเห็ดหอมมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น

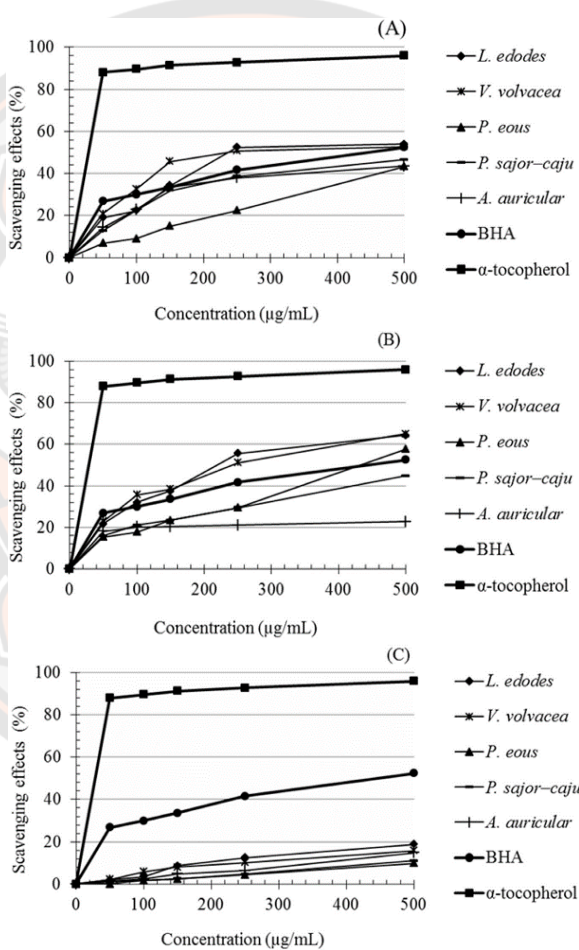


ภาพ 28 ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารสกัดจากผลของเห็ดหอมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ที่มา: (Yoon et al., 2011)

อีกทั้งจากงานวิจัยปี 2016 (Boonsong et al., 2016) ได้ทำการสกัดหาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเห็ดที่รับประทานได้ 5 ตัวอย่าง

ได้แก่ *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus eous*, *Pleurotus sajor-caju* และ *Auricularia auricular* โดยใช้วิธีสกัดสามชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำ, 50% (v/v) ethanol และ diethyl ether ผลพบว่า 50% (v/v) ethanol จากสารสกัดเห็ดหอมมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สูงกว่าตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดชนิดอื่นๆ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity ที่แรงที่สุด (64.34%) เมื่อเทียบกับ butylated hydroxyanisole (BHA) ที่ 500 mg/mL (แสดงดังภาพ 29) ดังนั้นสารสกัดจากเห็ดหอมแห้งจึงสามารถใช้เป็นแหล่งต่อต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหรือใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมได้



ภาพ 29 ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดที่กินได้ห้าชนิดโดยใช้: (A) น้ำ; (B) 50% (v/v) ethanol; (C) diethyl ether; เมื่อเทียบกับ butylated hydroxyanisole (BHA) และ α -tocopherol ทดสอบด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity ที่มา: (Boonsong et al., 2016)

และงานวิจัยปี 2016 ได้รายงานว่าสารสกัดเอทานอลิกของดอกเห็ด *L. edodes* (8.94 mg/g) ได้รับการวิเคราะห์ในแง่ของฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อต้านไทโรซิเนสสารต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าในสารสกัดเห็ดหอมและในสูตรเวชสำอางประกอบด้วย ประกอบด้วยกรดฟีนอลิก ได้แก่ Cinnamic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid และ Protocatechuic acid เป็นต้น (Oludemi Taofiq et al., 2016) (แสดงดังภาพ 35)

10.2 เห็ดเป๋าฮื้อ

เห็ดเป๋าฮื้อเป็นเห็ดชนิดหนึ่งในสกุล *Pleurotus* หรือเห็ดหอยโข่งทะเล มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีนและไต้หวัน เป็นเห็ดตระกูลเดียวกับเห็ดนางฟ้าและนางรม การแพร่กระจายของเห็ดเป๋าฮื้ออยู่ในแถบร้อนของโลกทางด้านเอเชีย ได้แก่ จีน ไต้หวัน ภูฐาน ลาว พม่า และ ไทย ส่วนในสหรัฐอเมริกาพบในแถบตะวันออกและตะวันออกเฉียงใต้ นอกจากนี้ยังพบเห็ดชนิดนี้กระจายอยู่ในแถบแอฟริกาใต้ด้วย ในสภาพธรรมชาติพบตามต้นไม้หรือตามโคนต้นไม้ที่มีใบกว้างโดยทั่วไป เห็ดเป๋าฮื้อเป็นเห็ดที่มีรสชาติอร่อยจึงทำให้เห็ดชนิดนี้เป็นที่สนใจของนักเพาะเห็ดทั่วไป อีกทั้งยังมีสรรพคุณทางยาต้านการต่อต้านแบคทีเรียพวกกรัมบวก และป้องกันโรคมะเร็ง และยังสามารถป้องกันโรคหวัดช่วยการไหลเวียนของเลือด และโรคกระเพาะได้ แต่เห็ดเป๋าฮื้อเป็นเห็ดที่เพาะยาก ราคาสูง และมีการเพาะเชิงการค้ากันน้อยเมื่อเทียบกับเห็ดตระกูลเดียวกันอย่างเห็ดนางฟ้าเห็ดนางรม ดังนั้นเห็ดเป๋าฮื้อจึงมีงานวิจัยและถูกนำมาศึกษาค่อนข้างน้อย ผู้วิจัยจึงสนใจเห็ดชนิดนี้เพื่อนำมาศึกษาต่อยอดงานวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสามารถเพิ่มมูลค่าต่อไปได้ในอนาคต



ภาพ 30 เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*)

ที่มา: (<https://sites.google.com/site/hedchoothai/-hed/>)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Pleurotus cystidiosus*
 ชื่อไทย: เห็ดเป่าฮื้อ
 ชื่อสามัญ: Abalone mushroom
 ชื่ออื่น: เห็ดหอยโข่งทะเล, *Pleurotus ostreatus* (FR.) Guel, *Pleurotus cystidiosus* O.K. Miller, Maple oyster mushroom, Miller's oyster mushroom, Chen and Cheng

อาณาจักร/วงศ์: ฟังไจ/Animalia

ถิ่นกำเนิด: ประเทศจีน และไต้หวัน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เห็ดเป่าฮื้อเป็นเห็ดที่ผลิตดอกเห็ดซึ่งมีหมวกดอก (cap) คล้ายกับหมวกดอกของเห็ดนางรม โดยทั่วไปหมวกดอกมีลักษณะแบนและเว้าลงตรงกลางเกิดเป็นแอ่งเล็กน้อย ขนาดความกว้างของ หมวกดอก คือ 5-15 เซนติเมตร ผิวของหมวกดอกแห้ง ไม่เปียกเป็นเมือก สีครีมถึงขาวนวล ครีบดอก (gill) กว้าง ครีบดอกมีสีขาวถึงสีครีม ก้านดอก (stalk) ใหญ่และหนา อวบแน่น ปกติก้านดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 เซนติเมตร ยาว 5-8 เซนติเมตร ดอกเห็ดบางดอกมีก้านดอกสั้นมาก ก้านดอกไม่ติดตรงกลางดอก แต่จะติดที่บริเวณขอบของหมวกดอกด้านใดด้านหนึ่ง เส้นใยเป็นระบบ monomitic เซลล์ของครีบดอก ซึ่งต่อมาพัฒนาเป็นสปอร์ และพัฒนาเป็นเส้นใย (hypha) ที่มีสภาพเป็น dikaryotic แล้วพัฒนาเป็นกลุ่มเส้นใย (mycelium)

คุณค่าทางโภชนาการ (เห็ดหูไทย, ม.ป.ป. & Herbs botany, 2014)

เห็ดเป่าฮื้อ 100 กรัมจะให้พลังงาน 34 กิโลแคลอรี, โปรตีน 1.6 กรัม, ไขมัน 0.4 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 1.0 กรัม, ธาตุแคลเซียม 3 มิลลิกรัม, ธาตุฟอสฟอรัส 78 มิลลิกรัม, ธาตุเหล็ก 1.1 มิลลิกรัม, วิตามินบี3 2.8 มิลลิกรัม, วิตามินซี 11 มิลลิกรัม

สารเคมีและสรรพคุณสำคัญ: (Jaworska G. et al., 2015 & El-Enshasy et al., 2018)

1. **วิตามินดี (Vitamin D)** เป็นสารที่โดดเด่นที่สุดที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ
2. **Ergosterol** ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เมื่อได้รับแสงอาทิตย์จะเปลี่ยนเป็นวิตามิน D ป้องกันกระดูกพรุน
3. **Phenolic compound** ได้แก่ Cinnamic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid, *p*-Coumaric acid, Benzoic acids, Gallic acid, Vanillic acid, Salicylic acid และ Veratric acid เป็นต้น
4. **Beta-Carotene และ Lycopene** เป็นสารที่โดดเด่นที่สุดที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี สามารถปกป้องรังสีอัลตราไวโอเล็ต ป้องกันพิษจากปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเนื่องจากแสงและป้องกันการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระได้

5. **Ascorbic acid** สารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ในการกำจัด superoxide, hydrogen peroxide, peroxyradicals, hydroxyl radical และ hypochlorite ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation

6. **Tocopherols หรือ วิตามินอี (Vitamin E)** เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนต่างๆ ของการก่อมะเร็งผ่านการมีส่วนร่วมช่วยในการสร้างภูมิคุ้มกันการซ่อมแซมเมมเบรนและ DNA และลดความเสียหายของ DNA oxidation และวิตามินอีที่ฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุดเนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

7. **Exopolysaccharides (EPS)** เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ เป็นสารทางชีวภาพสร้างโดยจุลินทรีย์ ยีสต์และแบคทีเรีย บทบาทของ EPS ว่าเป็นการยึดติดกับพื้นผิวการตรึงเอนไซม์ภายนอกเซลล์การป้องกันการคายน้ำของเส้นใยและการกักเก็บสารอาหารเสริม

8. **β -glucan, Homo-glucan, Hetero-glucan** ต้านเนื้องอก ต้านแบคทีเรีย รา ไวรัสและปรสิต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ลดระดับคอเลสเตอรอลและกลูโคสในเลือด เป็นต้น

งานวิจัยปี 2021 (Galappaththi MCA et al., 2021) รายงานว่าเห็ดสกุล *Pleurotus* มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่มีกลิ่นหอม ซึ่งอุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน วิตามิน แร่ธาตุ และใยอาหาร (Naraian et al. 2016) จากการศึกษาพบสารต่างๆ เช่น เลคติน กลูแคน ไกลโคเปปไทด์ เบต้า-ดี-กลูแคน (เยื่อหุ้มปอด) โพลีแซคคาไรด์ และโลวาสแตติน โดยทั่วไปแล้วสารประกอบเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สารต้านเนื้องอก ยาปฏิชีวนะ สารต้านไวรัส สารต้านการอักเสบ และยาด้านคอเลสเตอรอล (Cohen et al. 2002) ปริมาณสารอาหารของเห็ดแตกต่างกันไปตามส่วนประกอบของสารตั้งต้น (Patrabansh & Madan 1997) อุดมไปด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ โดยพบว่า *P. cystidiosus* มีโปรตีนร้อยละ 15.4 (Yang et al., 2001) และ 18 (Khan & Tania 2012) ของน้ำหนักแห้งของเห็ด และยังประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นและไม่จำเป็น (แสดงดังตาราง 5)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเห็ดสกุล *Pleurotus*

Amino acid	mg/g dry weight						
	<i>P. sajorcaju</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. citrinopieatus</i>	<i>P. eryngii</i>	<i>P. cystidiosus</i>	<i>P. florida</i>	<i>P. tuber-regium</i>
Ala	11.24	28.6	-	8.92	3.94	4.5-5.4	-
Arg	-	27.6	-	-	ND	0.1-1.0	-
Asp	20.12	31.4	-	19.55	0.05	0.3	-
Cys	-	3.8	-	-	-	11.6-23.8	-
Glu	15.56	53.3	-	18.48	1.16	-	-
Gly	9.37	17.1	-	7.48	0.14	2.6-2.9	-
His	-	12.4	-	2.50	ND	0.2-21.7	-
Iso	11.20	16.2	0.580-0.722	7.27	0.23	2.8-27.9	21.1
Leu	14.61	25.7	0.535-0.625	10.77	ND	4.3-13.7	28.4
Lys	5.75	22.9	-	7.31	0.32	-	27.4
Met	2.72	3.8	0.321-0.500	-	ND	7.6	4.8
Phe	9.24	15.2	0.598-0.695	7.16	0.28	3.6-28.9	21.9
Pro	7.91	15.2	-	5.86	-	6.0	-
Ser	7.65	18.1	-	5.96	0.51	-	-
Thr	8.95	17.1	0.800-0.875	6.78	0.42	-	31.4
Tyr	5.96	13.3	-	4.88	0.05	2.2-22.5	4.2
Val	10.04	21.0	0.930-1.035	7.40	0.09	13.0-47.3	33.4

“-” Result(s) not found

ที่มา: (Galappaththi MCA et al., 2021)

งานวิจัยก่อนหน้าปี 2016 (Banjongsinsiri, P et al., 2016) วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนของ MPHs จากเห็ดนางรม Oyster mushroom (OMPH), เห็ดเป๋าฮื้อ Abalone mushroom (AMPH) และเห็ดหอม Shiitake mushroom (SHMPH) (แสดงดังตาราง 6) ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในเห็ดนางรม OMPH (341-384 มก./100 มล.) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ AMPH (119-157 มก./100 มล.) และเห็ดหอม SHMPH (80-110 มก./100 มล.) ผลจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ การตกตะกอน และการแยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำ โพรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้รับอาจมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ต่างกันตามระยะเวลาย่อยสลาย ในแง่ของกรดอะมิโนแต่ละตัว กรดอะมิโนที่มีมากที่สุดที่พบใน MPH คือ กลูตามิก (Glu) (20-40%) ผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับรายงาน

(Chirinang, P. & Intarapichet, K. 2009) สามารถอธิบายได้ว่ากลูตามेट ถูกแยกออกเป็นกรดกลูตามิกในระหว่างการไฮโดรไลซิส (Aaslyng et al., 1998)

ตารางที่ 6 องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนจากเห็ดไฮโดรไลเสท (MPH)

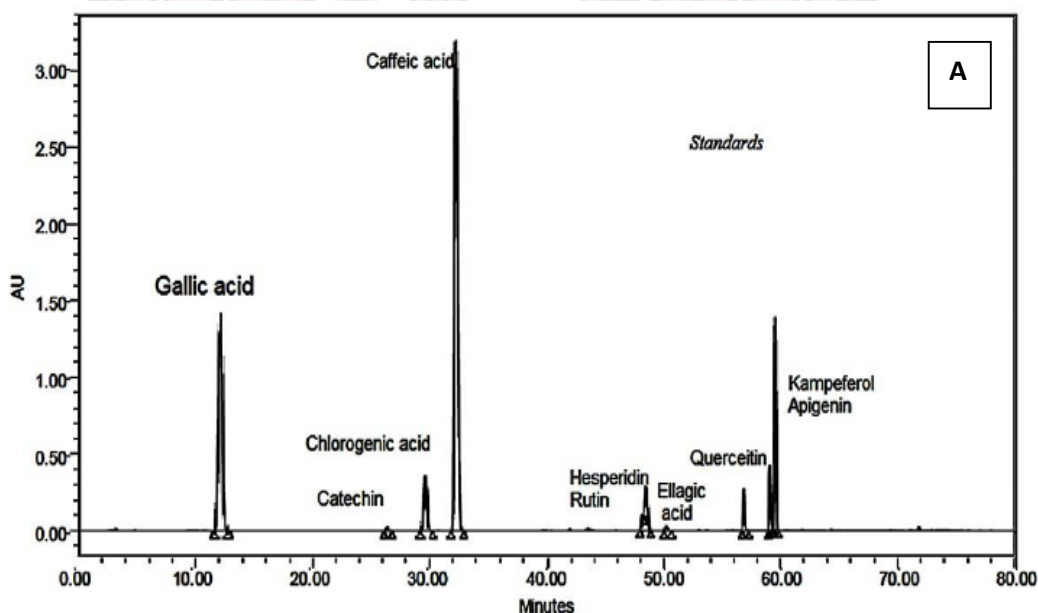
Amino acids (mg/100ml)	OMPH				AMPH				SHMPH			
	6	12	18	24(hra)	6	12	18	24(hra)	6	12	18	24(hra)
Aspartic acid	19.81	21.01	20.68	20.95	2.66	4.41	4.50	3.76	3.16	3.94	1.16	0.77
Serine	21.66	25.80	25.82	23.99	10.63	13.58	14.06	13.31	3.76	5.82	3.01	3.12
Glutamic acid	44.00	47.70	46.32	47.78	31.22	32.06	36.10	36.33	14.23	17.68	20.61	21.55
Glycine	9.26	12.76	13.17	11.88	6.01	7.27	7.68	7.41	1.94	2.52	2.73	2.77
Histidine	10.07	11.11	11.30	11.20	4.10	4.93	5.23	5.06	1.23	1.74	1.74	1.73
Arginine	32.47	22.55	22.77	24.69	5.54	-	-	-	6.45	9.70	9.42	9.55
Threonine	23.98	25.77	25.99	25.25	11.58	13.04	13.77	13.40	5.56	7.38	7.56	8.03
Alanine	31.35	33.55	33.17	32.36	11.85	13.30	14.68	14.23	9.12	11.47	12.46	12.92
Proline	7.63	10.94	11.39	10.54	4.44	6.63	7.76	7.90	0.89	1.59	1.71	1.71
Tyrosine	23.06	22.82	23.68	22.97	2.65	3.64	3.66	2.51	2.75	3.52	3.44	3.62
Valine	27.83	28.58	29.04	28.47	10.22	11.66	12.69	12.00	7.43	9.84	10.21	10.61
Methionine	5.69	4.87	5.03	4.92	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	-	25.53	27.66	29.55	-	10.42	12.26	12.55	3.31	5.16	5.05	5.05
Isoleucine	22.83	23.58	24.12	22.95	6.60	7.28	8.27	7.08	5.29	7.29	7.41	7.67
Leucine	36.78	37.21	38.05	36.40	6.33	8.15	10.34	9.33	9.03	12.09	12.14	12.53
Phenylalanine	24.66	24.56	25.61	24.53	5.24	5.35	6.19	5.32	6.08	7.95	7.87	8.40
Cystine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	341	378	384	378	119	142	157	150	80	108	107	110

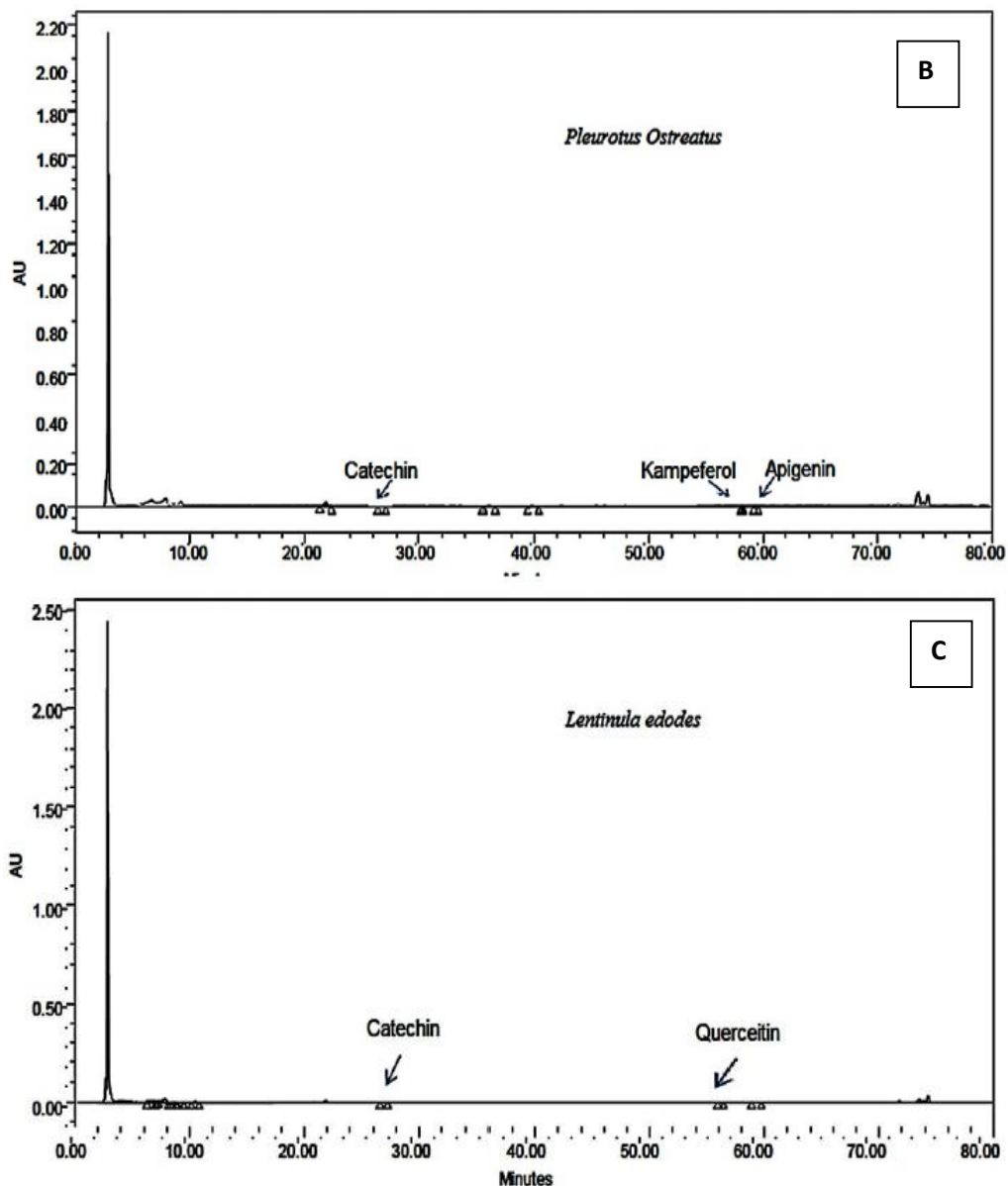
Note : ND is none detected

ที่มา: (Banjongsiniri, P et al., 2016)

งานวิจัยปี 2009 ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเห็ด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*) และ *Pleurotus sajor-caju* (*P. sajor-caju*) โดยพบว่า *P. ostreatus* มีสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่า *P. sajor-caju* ซึ่ง EC_{50} ของสารสกัด *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* มีค่าเท่ากับ 11.56 และ 13.38 มก./มล. ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดแห้ง *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* ทั้งสองชนิดพบว่าอุดมด้วยโปรตีนร้อยละ 20.82 และ 21.30 ตามลำดับ โดยพบว่ามีปริมาณกรดอะมิโนกลูตามิกสูงที่สุดและรองมาคือกรดแอสปาร์ติก และอาร์จินีน ตามลำดับ (Chirinang, P., & Intarapichet, K 2009)

งานวิจัยปี 2021 คณะวิจัยได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสารสกัดจากเห็ดที่กินได้ทั้งสองชนิด ได้แก่ *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*) และ *Lentinula edodes* (*L. edodes*) พบว่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และการทดสอบ ORAC ของสารสกัดทั้งสองแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ โดย *P. ostreatus* ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า *L. edodes* ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่า โดยพบว่ามีเลกุลฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่พบใน *P. ostreatus* ได้แก่ Catechin, Kampeferol และ Apigenin และใน *L. edodes* ได้แก่ Catechin และ Quercetin (แสดงดังภาพ 31) อีกทั้งยังพบ Ascorbic acid, Nicoinic acid, Nicotinamide และ Pyridoxine ทั้งใน *P. ostreatus* และ *L. edodes* ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ตรวจสอบสารสกัดโดยทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้การวิเคราะห์ LC-Triple TOF-MS สำหรับ *P. ostreatus* มีการระบุโปรตีนทั้งหมด 753 ตัว และใน *L. edodes* ตรวจพบโปรตีนทั้งหมด 432 ตัว โดยโปรตีนที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ Rab GDP dissociation inhibitor, superoxide dismutase, thioredoxin reductase, serine proteinase และ lectin ซึ่ง *P. ostreatus* ยังแสดงโปรตีนที่ประกอบด้วย ostreolysin และ pleurotolysin ในขณะที่ *L. edodes* จะแสดงโปรตีนที่ latcripin และ valosin ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีส่วนช่วยในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งและต้านอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนก็ยังพบว่ากรดกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนที่มีมากที่สุดในการสกัดจากเห็ดทั้งสองชนิดเช่นกัน (Shaza M. Elhousseiny et al., 2021)





ภาพ 31 HPLC chromatogram (λ 280nm) elution profile (A) pure phenolic and flavonoids standards mixture (B) สารสกัดเห็ด *P. ostreatus* และ (C) *L. edodes* ที่มา: (Shaza M. Elhousseiny et al., 2021)

งานวิจัยปี 2010 ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของดอกเห็ด *Pleurotus ostreatus* ที่สกัดด้วยอะซีโตน เมทานอล และน้ำร้อน ผลพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *P. ostreatus* เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ซึ่งสารสกัดอะซีโตนมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดอื่นๆ ในการกำจัดอนุมูล DPPH⁺ ในขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด แต่สารสกัดด้วยอะซีโตนและน้ำร้อนมีฤทธิ์ปานกลาง นอกจากนี้

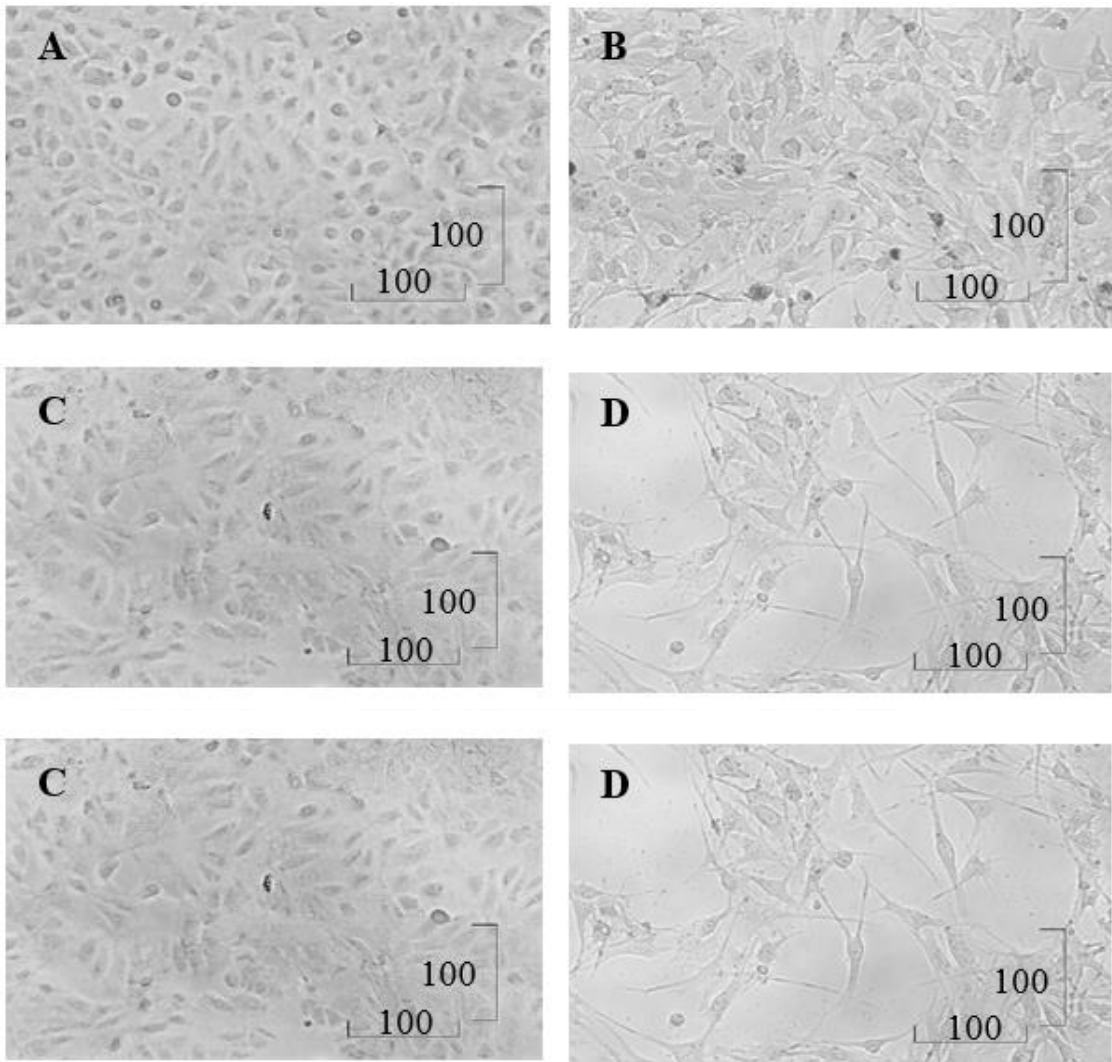
ยังวิเคราะห์ปริมาณกรดพีนอลและฟลาโวนอยด์ด้วย สารสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้ง β -carotene-linoleic acid ที่แรงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่นๆ ทั้งนี้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจขึ้นอยู่กับกลุ่มไฮดรอกซิลบนสารประกอบพีนอลของสารสกัดจากเห็ด ซึ่งอาจสร้างพันธะไฮโดรเจนกับไซต์ของเอนไซม์ ซึ่งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง สารยับยั้งไทโรซิเนสบางตัวทำหน้าที่ผ่านกลุ่มไฮดรอกซิลที่จับกับไทโรซิเนสแอกทีฟไซต์ ส่งผลให้เกิดการขัดขวาง สเตอริกหรือโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลง (Baek HS et al., 2008, Kim YJ et al., 2008) อย่างไรก็ตาม *P. ostreatus* อาจมีศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติได้ (Alam, N e al., 2010)

งานวิจัยปี 2016 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อต้านไทโรซิเนสและพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเห็ดตระกูล oyster โดยเห็ดตระกูล oyster เป็น 1 ใน 10 ของแหล่งที่อุดมไปด้วย ergosterol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของวิตามิน D2 ซึ่ง Ergosterol ในเห็ดสามารถเปลี่ยนเป็นวิตามิน D2 การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการขาดวิตามินดี มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งการขาดวิตามินดีทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ช่วยเร่งความชราและโรคที่เกี่ยวข้องกับอายุได้ อีกด้วย ตลอดจนมีรายงานว่าเห็ดตระกูล oyster มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสร่วมด้วย (Nuhu et al., 2010; Riani et al., 2012) สารสกัดเห็ดตระกูล oyster แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเชิงบวกโดยการทำให้สีม่วงของสารละลาย DPPH จางลงเป็นสีเหลืองได้ (แสดงดังภาพ 32) ความเข้มข้นของวิตามิน D2 ของสารสกัดเห็ดที่ฉายรังสีและไม่ฉายมีปริมาณพีนอลทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเห็ดทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งสารสกัดเห็ดตระกูล oyster ทั้งสองชนิดไม่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์คีราตินโนไซต์ (HaCaT) แต่ในทางกลับกันสามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์เมลาโนมา Murine (B16F10) ได้ (แสดงดังภาพ 33-34) (N. Banlangsawan et al., 2016)

Sample	EC ₅₀ of DPPH assay (μ g/mL)	Total Phenolics (mg TAE/g)	IC ₅₀ of Tyrosinase inhibitory activity (μ g/mL)
Non-irradiated mushroom extract (control)	869.95 \pm 4.04	39.48 \pm 1.24	2.857.28 \pm 14.93
Irradiated mushroom extract	871.31 \pm 6.68	38.68 \pm 2.57	2.849.07 \pm 16.79
Vitamin C	2.69 \pm 0.17*	-	-
Vitamin E	7.75 \pm 0.24*	-	-
Kojic acid	-	-	17.16 \pm 1.89*

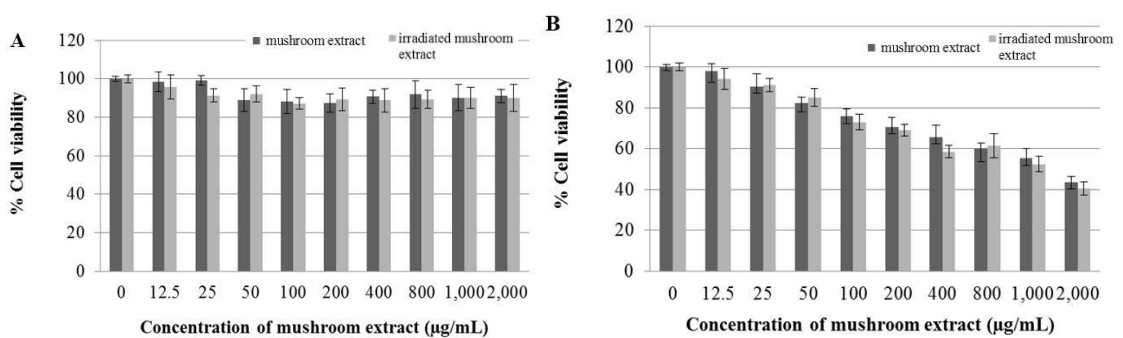
ภาพ 32 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH, ปริมาณพีนอลทั้งหมดและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเห็ดตระกูล oyster

ที่มา: (N. Banlangsawan et al., 2016)



ภาพ 33 Morphology ของเซลล์คีราตินโนไซต์ (A, C, E) และเซลล์มะเร็งเมลาโนมาของหนู (B, D, F) เมื่อกำหนดให้ (A, B) คือหลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงใน DMEM; (C, D) บ่มด้วยสารสกัดที่ฉายรังสี UV-B และ (E, F) บ่มด้วยสารสกัดที่ไม่ฉายรังสี

ที่มา: (N. Banlangsawan et al., 2016)



ภาพ 34 ความมีชีวิตของเซลล์ (%) ของเคอราตินไฮโดรไลซ์ของมนุษย์ (A) และเซลล์มะเร็งเมลาโนมาของหนู (B) หลังการรักษาด้วยสารสกัดที่ไม่ฉายรังสีและฉายรังสี

ที่มา: (N. Banlangsawan et al., 2016)

และงานวิจัยปี 2016 ได้รายงานว่ามีสารสกัดเอทานอลิกของดอกเห็ด *P. ostreatus* ซึ่งมีปริมาณ ergosterol (78.20 mg/g) สูงกว่า *A. bisporus* (44.79 mg/g) และ *L. edodes* (8.94 mg/g) การศึกษานี้ได้เสนอการพัฒนาศักยภาพเวชสำอางของ *P. ostreatus* เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยในงานปัจจุบันศักยภาพเวชสำอางของสารสกัดเอทานอลิกที่เตรียมจาก *A. bisporus*, *P. ostreatus* และ *L. edodes* ได้รับการวิเคราะห์ในแง่ของฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อต้านไทโรซิเนสสารต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดมีลักษณะเฉพาะในแง่ของกรดฟีนอลิกและองค์ประกอบของ ergosterol และที่ถูกลำเลียงอยู่ในครีม/เครื่องสำอาง (Oludemi Taofiq et al., 2016) (แสดงดังภาพ 35)

Table 1. Phenolic acids and ergosterol content in the mushroom ethanolic extracts and in the cosmeceutical formulations.

Phenolic Acids (µg/g)	Mushroom Extracts			Cosmeceutical Formulations		
	<i>A. bisporus</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>L. edodes</i>	<i>A. bisporus</i> cream	<i>P. ostreatus</i> Cream	<i>L. edodes</i> Cream
Cinnamic acid	90.06 ± 0.74 ^b	362.7 ± 1.28 ^a	7.31 ± 0.14 ^c	87.73 ± 1.63 ^b	317.43 ± 1.32 ^a	6.10 ± 0.56 ^c
p-Hydroxybenzoic acid	nd	157.78 ± 4.13	83.05 ± 2.15	nd	138.88 ± 2.30	73.67 ± 1.56
p-Coumaric acid	nd	63.74 ± 0.15	nd	nd	53.16 ± 2.94	nd
Protocatechuic acid	nd	nd	52.45 ± 0.38	nd	nd	39.85 ± 1.53
Total (µg/g)	90.06 ± 0.74 ^c	584.24 ± 3.01 ^a	142.81 ± 2.39 ^b	87.73 ± 1.63 ^c	509.47 ± 3.93 ^a	119.61 ± 2.54 ^b
Ergosterol (mg/g)	44.79 ± 0.37 ^b	78.20 ± 0.54 ^a	8.94 ± 0.04 ^c	45.43 ± 1.38 ^b	71.62 ± 0.29 ^a	8.60 ± 0.25 ^c

nd—not detected. In each row and within each group of samples (mushrooms extracts and final cosmeceutical formulations), different letters mean significant statistical differences ($p < 0.05$).

Table 2. Anti-inflammatory, anti-tyrosinase, and antioxidant activities of the mushroom ethanolic extracts and of the cosmeceutical formulations.

Bioactivities	Mushroom Extracts			Cosmeceutical Formulations		
	<i>A. bisporus</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>L. edodes</i>	<i>A. bisporus</i> Cream	<i>P. ostreatus</i> Cream	<i>L. edodes</i> Cream
Anti-inflammatory (EC ₅₀ value, mg/mL)	0.18 ± 0.01 ^b	0.29 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.01 ^b	2.52 ± 0.23 ^b	3.81 ± 0.23 ^a	2.59 ± 0.23 ^b
Anti-tyrosinase (EC ₅₀ value, mg/mL)	0.16 ± 0.01 ^b	0.86 ± 0.07 ^a	0.82 ± 0.08 ^a	3.22 ± 0.37 ^b	11.01 ± 0.35 ^a	11.89 ± 0.85 ^a
Antioxidant (EC ₅₀ value, mg/mL)						
DPPH radical-scavenging activity	7.04 ± 0.32 ^b	7.69 ± 0.20 ^b	23.36 ± 1.11 ^a	234.3 ± 10.9 ^b	239.5 ± 10.4 ^b	321.8 ± 16.4 ^a
Reducing power	2.34 ± 0.05 ^b	2.36 ± 0.08 ^b	3.03 ± 0.04 ^a	35.91 ± 0.31 ^b	32.18 ± 2.73 ^c	48.90 ± 0.64 ^a

Dexamethasone was used as positive control for anti-inflammatory activity (EC₅₀ = 0.016 mg/mL). Ascorbic acid was used as positive control for anti-tyrosinase activity (EC₅₀ = 0.031 mg/mL). Trolox was used as positive control for antioxidant activity (EC₅₀ = 0.041 mg/mL for reducing power and 0.042 mg/mL for DPPH scavenging activity. In each row and within each group of samples (mushrooms extracts and final cosmeceutical formulations), different letters mean significant statistical differences ($p < 0.05$).

ภาพ 35 แสดงปริมาณกรดฟีนอลและเออร์โกสเตอรอลในสารสกัดเอทานอลจากเห็ดและในสูตรเวชสำอาง (Table 1) และแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดเอทานอลและสูตรเวชสำอาง (Table 2)

ที่มา: (Oludemi Taofiq et al., 2016)

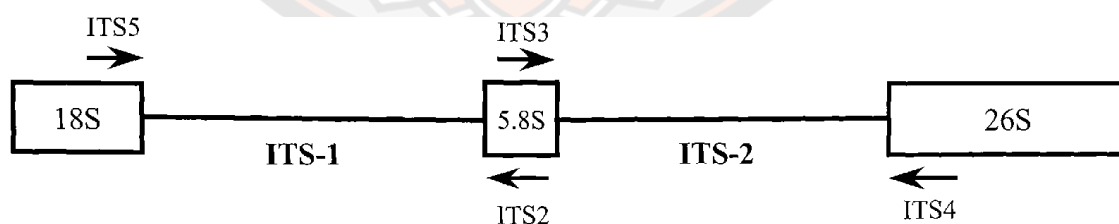
11. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ แต่ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่พบ คือ เรื่องการตรวจสอบสายพันธุ์ โดยทั่วไปจะอาศัยความรู้ทางด้านสัตวศาสตร์และสัตววิทยา แต่เนื่องจากลักษณะทางด้านสัตวศาสตร์และสัตววิทยาของ

สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่จะเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้การจำแนกสายพันธุ์เกิดการผิดพลาด เพราะสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะมีสารพันธุกรรมพื้นฐานที่เหมือนกัน มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน หรือมีดีเอ็นเอที่เหมือนกัน แต่การจัดเรียงตัวที่ต่างกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดความหลากหลายของรหัสพันธุกรรมจนกลายมาเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นหากต้องการเปรียบเทียบพันธุกรรมของเห็ดในระบบเดียวกัน จึงจำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน หรือยีนมาตรฐานมาตรวจสอบจึงเป็นที่มาของการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (สุวิชา และคณะ, 2551)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ประกอบด้วยหลายเทคนิคที่อาศัยหลักการพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Ersek et al., 1994; Hegedus and Khachatourians, 1996) การศึกษาความแตกต่างของดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacers (ITSs) ของ ribosomal DNA (rDNA) มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปเนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Hao et al., 2010) และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่นๆ ของ rDNA จึงมักถูกใช้เป็นบาร์โค้ดสากลเพื่อระบุสายพันธุ์ของเห็ดที่เป็นยาและเห็ดที่กินได้ (สุวิชา และคณะ, 2551)

Internal transcribed spacer region (ITS) คือบริเวณลำดับเบสที่เรียกว่า noncoding sequence โดยมีอยู่ 2 ชนิด คือ ITS1 ตั้งอยู่ระหว่างยีน 18S และ 5.8S และ ITS2 ตั้งอยู่ระหว่าง 5.8S และ large subunit (Baldwin et. al., 1995) (แสดงดังภาพ 36) ซึ่งเป็นลำดับเบสที่สามารถนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของพืชได้ มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปในการศึกษาเพื่อจำแนกหรือบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอใน บริเวณอื่นๆ ของ rDNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ (ณัฐชา และคณะ, 2562)



ภาพ 36 โครงสร้างของบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

(ที่มา: Shen, Y et al., 1998)

ยกตัวอย่างงานวิจัยปี 2014 (Praphrute R., Charerntantanakul W., 2014) ได้ใช้เทคนิคทางอนุชีวโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบสารพันธุกรรม เพื่อช่วยในการระบุชนิดของเห็ดพิษ เห็ดจำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ เห็ดไข่ตายซาก เห็ดไข่หงส์ เห็ดเปื้อนที่ลักษณะคล้ายเห็ดหล่ม เห็ด

แดงน้ำหมาก เห็ดกระโถงตีนดำ เห็ดหัวกรวดครีบเขียว และเห็ดเป็ลักษณะคล้ายเห็ดหอม นำมาสกัด ดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ ITS5/ITS4 แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal DNA บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 7 ตัวอย่างนั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน *A. pseudoporphyria* (93%), *S. sinnamariense* (89%), *Russula sp.* (91%), *R. emetica* (95%), *C. nothorachodes* (92%), *C. molybdites* (99%) และ *A. subsaharianus* (96%) ตามลำดับ เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อเห็ดแต่ละชนิดมาทดสอบความจำเพาะด้วยการตรวจติดตามสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วย SYBR Green I พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะ (specificity) สามารถแยกเห็ดแต่ละชนิดออกจากกันได้

อีกทั้งจากงานวิจัยของคุณหนึ่ง เตียอำรุง และสุรลักษณ์ รอดทอง ปี 2543 จากการเก็บตัวอย่างเห็ดป่าที่บริโภคได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งหมด พบว่าสามารถจำแนกได้ทั้งสิ้น 9 จีนัส ได้แก่ *Russula*, *Boletus*, *Suillus*, *Lactarius*, *Termitomyces*, *Amanita*, *Camtharellus*, *Tricholoma* และ *Astraeus* พบว่าในกลุ่มจีนัส *Russula* และ *Boletus* มีความหลากหลายในระดับ species สูงที่สุด โดยวิเคราะห์ยีนในบริเวณที่ ITS โดยใช้ primer ITS 4-5 ในการเพิ่มจำนวนชุดของยีนดังกล่าวโดย restriction enzyme 4 ชนิดได้แก่ Alu1, Hinf1, Mbo1 และ Taq1 จากนั้นนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยพบว่าเห็ดในกลุ่มจีนัส *Russula* ทั้งหมดมีความแตกต่างกันในระดับ DNA ทั้งสิ้น 23 แบบ จากตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ในขณะที่เห็ดในกลุ่มจีนัส *Boletus* มีความแตกต่างในระดับ DNA ทั้งสิ้น 16 แบบ จากตัวอย่างที่เก็บมาศึกษา 17 ตัวอย่าง ความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมในระดับ DNA ของเห็ดในกลุ่มจีนัส *Russula* สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ซึ่งในแต่ละกลุ่มไม่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของสปีดอกเห็ดกับลักษณะของ ITS-RFLP และพบว่าบางกลุ่มมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเห็ดในกลุ่ม *Lactarius* มากกว่ากลุ่ม *Russula* ด้วยกันเอง ในขณะที่เห็ดในกลุ่มจีนัส *Boletus* พบว่าสามารถแบ่งจำนวนกลุ่มได้เช่นเดียวกับ *Russula* และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสปีดอกของเห็ดกับลักษณะของ ITS-RFLP ด้วยเช่นเดียวกัน จากการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่ายังคงมีความเสี่ยงที่จะนำเห็ดมีลักษณะสัญญาณปรากฏภายนอกคล้ายคลึงกันมาใช้ และอาจส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผลการทดลองต่อไปได้

เป้าหมายของการศึกษานี้คือเพื่อจะรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ เพื่อระบุความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดที่บริโภคได้ ทั้งเห็ดที่เป็นยาและเห็ดที่กินได้ ซึ่งจะเป็นพื้นฐานของการศึกษาและวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีต่างๆ เพื่อการประยุกต์ใช้เฉพาะทางต่อไป

12. ระเบียบวิธีการคำนวณทางเคมีควอนตัมหรือเคมีคอมพิวเตอร์

จากรายงานของ บุญเดช เบิกฟ้า (2560) ได้อธิบายไว้ว่า เคมีเชิงคอมพิวเตอร์ คือการศึกษาเชิงทางทฤษฎีใน การคำนวณโครงสร้าง และสมบัติต่างๆ เช่น สมบัติทางโมเลกุล อธิบายกลไกต่างๆ ของปฏิกิริยาเคมีในระดับโมเลกุล โดยใช้อุปกรณ์ทางคอมพิวเตอร์ที่มีสมรรถนะสูงในการคำนวณ รวมทั้งการวิเคราะห์กลไกการเป็นไปของปฏิกิริยาต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันนี้มีงานวิจัยอีกมากที่มีการนำศาสตร์การคำนวณเคมีทางคอมพิวเตอร์มาใช้ อีกทั้งมีการประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อีกมาก ทั้งการพัฒนาตัวเร่งปฏิกิริยาทางปิโตรเคมี และการออกแบบตัวยา เป็นต้น เนื่องจากสมบัติทางเคมีที่คำนวณได้นั้นจะขึ้นกับโครงสร้าง 3 มิติที่สามารถมองเห็นได้ง่าย และชัดเจนขึ้นผ่านโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ หรือเรียกว่าแบบจำลองโมเลกุล (Molecular Modeling)

1. แนวทางในการศึกษาเคมีเชิงคอมพิวเตอร์ ตามหลักการนั้นมีอยู่ 2 แนวทาง ซึ่งผลการคำนวณที่ได้จะใช้อธิบายสมบัติต่างๆ เช่น ใช้คำนวณหาพลังงาน และสมบัติของโครงสร้างโมเลกุล หรือหาโครงสร้างที่เสถียร หรือคำนวณความถี่จากการสั่นของอนุภาคที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุล แนวทางทั้ง 2 นั้นได้แก่ (บุญเดช เบิกฟ้า, 2560)

1.1. การคำนวณด้วยกลศาสตร์โมเลกุล (Molecular Mechanics, MM) ใช้หลักการทางฟิสิกส์ ในการคำนวณเพื่อทำนายโครงสร้าง และสมบัติต่างๆ ของโมเลกุล

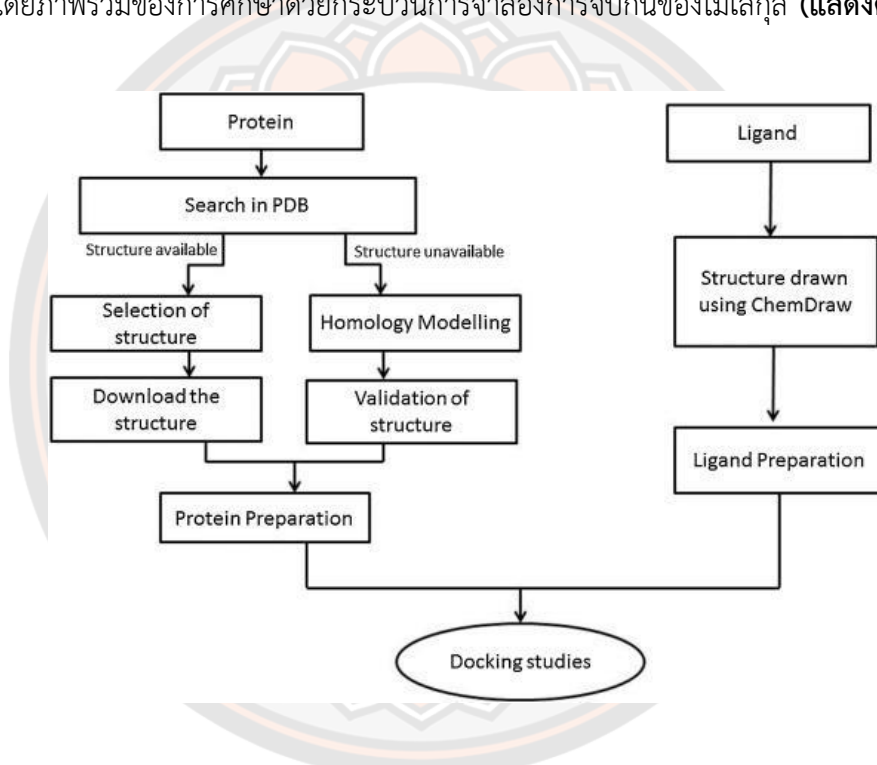
1.2. การคำนวณด้วย Electronic Structure Methods ใช้หลักการทางกลศาสตร์ควอนตัม (Quantum mechanics, QM) ในการคำนวณหาพลังงานและสมบัติต่างๆ ของโมเลกุล จากการแก้สมการชเรอดิงเงอร์ (Schrödinger Equation)

2. การออกแบบโมเลกุล (Molecular Design) การศึกษาการเข้ายึดจับกันของโมเลกุล และศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลยา หรือลิแกนด์ (Ligand) กับ ตำแหน่งปฏิกิริยาหรือบริเวณ Binding Site ของตัวรับ (Receptor) หรือโมเลกุลเป้าหมาย เช่น โปรตีน เอนไซม์ และดีเอ็นเอ เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถศึกษาโครงสร้างเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ และความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลยา หรือลิแกนด์แบบ 3 มิติ (3D Quantitative Structure Activity Relationships) โดยมีทั้งการเข้าจับกันของโปรตีน-โปรตีน Protein-Protein Docking และ Protein-Ligand Docking ซึ่งการศึกษาทั้งหมดนี้จะเป็นการออกแบบสารโมเลกุลใหม่ เช่น ยารักษา (Drug Design) ให้มีคุณสมบัติหรือฤทธิ์การรักษาตามต้องการ โดยอาศัยเทคนิคโมเลกุลาร์ดีอกกิง (Molecular Docking) (Morris & Lim-Wilby, 2008)

3. โมเลกุลาร์ดีอกกิง (Molecular Docking) การเทียบท่าของโมเลกุล หรือการจำลองการจับกันเป็นวิธีการที่จำลองขึ้นด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อทำนาย โครงสร้างของตัวรับกับลิแกนด์เชิงซ้อนที่เป็นสับสเตรต (substrate) หรือตัวยับยั้ง (inhibitor) ตัวอย่างเช่น การศึกษาการจับกันของตัวยาซึ่งเป็นตัวยับยั้งกับเอนไซม์ และวัตถุประสงค์ของการทำ Protein-Ligand Molecular Docking นั้น

เพื่อคาดการณ์การจับกันในรูปแบบ 3 มิติ ระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์ที่เป็นสารหรือยาที่เราสนใจจะศึกษา ซึ่งได้มาจากการสกัดพืชสมุนไพร หรือแหล่งธรรมชาติเป็นต้น

การจำลองการจับกันนั้นจะทำการค้นหาโครงสร้างที่เหมาะสมที่สุดจากการคำนวณค่าระดับพลังงานที่สารจับกัน และจัดอันดับของค่าพลังงานจากการจับกันของสาร โดยใช้ Scoring Function เป็นดัชนีการให้คะแนน สิ่งที่ต้องระวังในการทำ คือ การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในโปรแกรม สูตรโครงสร้างของสารหรือลิแกนด์เริ่มต้นทั้งแบบ 2 และ 3 มิติ การหาค่า พลังงานต่ำสุดในการจับกันของสาร (algorithm) และวิเคราะห์ผลโดยการคัดเลือกโครงสร้างที่ได้จากการจำลองการจับกันที่เหมาะสมเนื่องจากการคัดเลือกโครงสร้างที่เหมาะสมจะส่งผลให้ได้ผลลัพธ์ที่ดี (Morris & Lim-Wilby, 2008) โดยภาพรวมของการศึกษาด้วยกระบวนการจำลองการจับกันของโมเลกุล (แสดงดังภาพ 37)



ภาพ 37 แสดงภาพรวมกระบวนการจำลองการจับกันของโมเลกุล

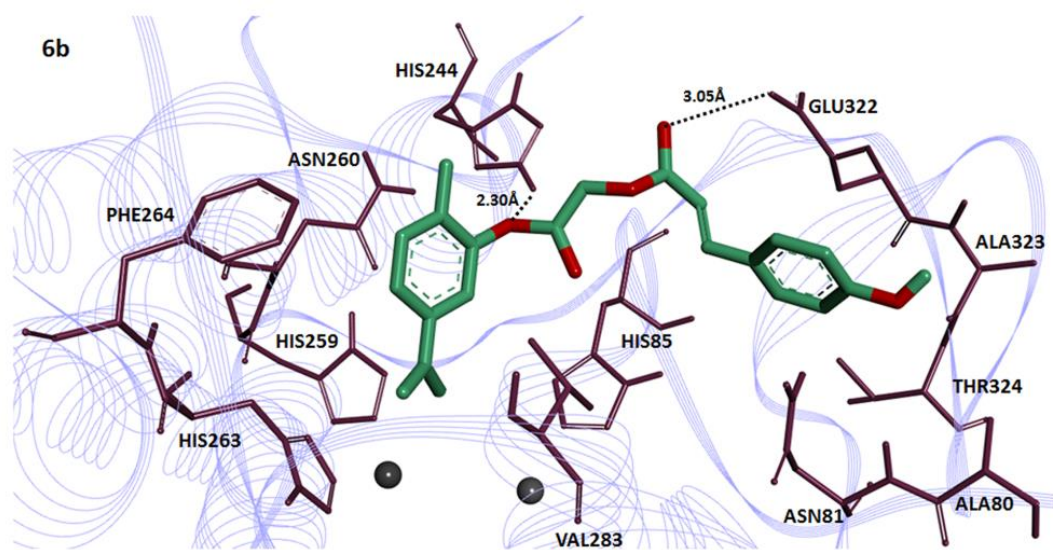
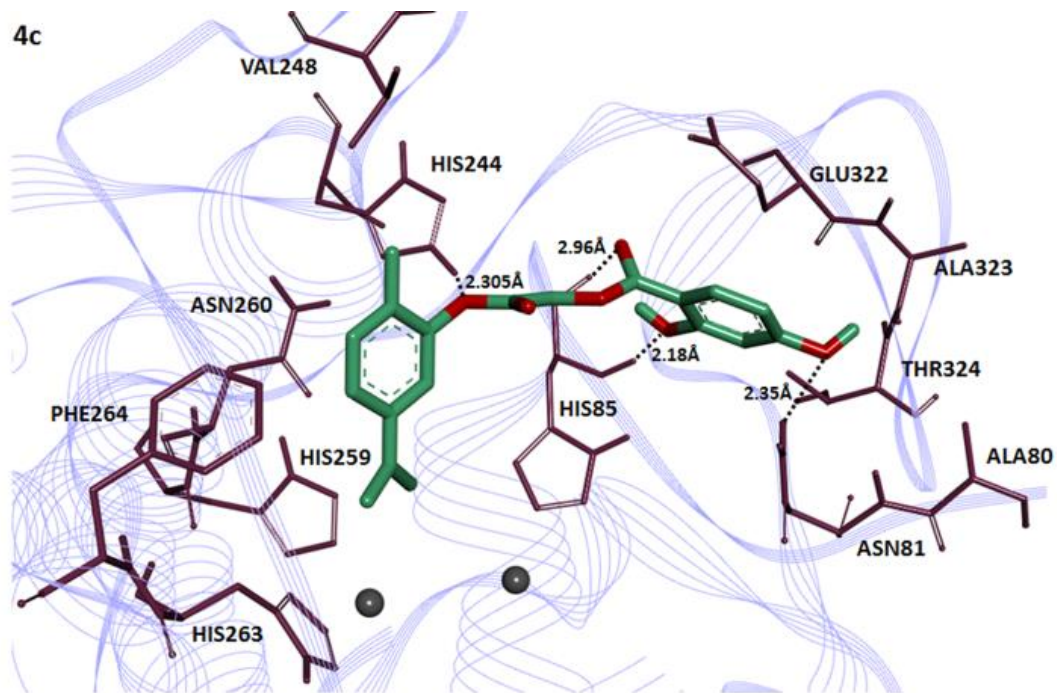
ที่มา : (Gupta, Sharma, & Kumara, 2018)

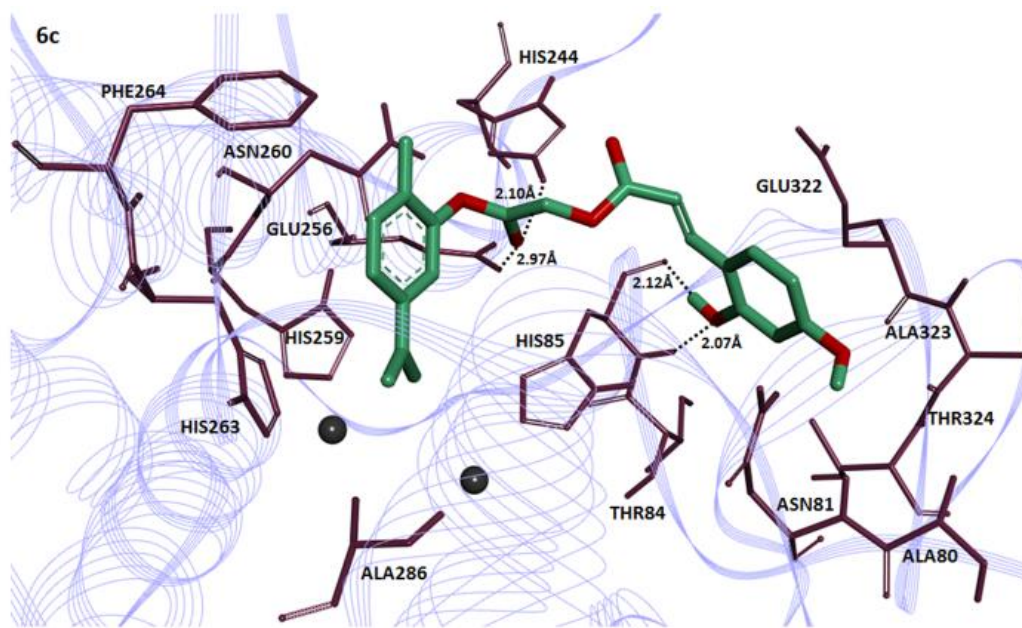
4. กระบวนการการจับกัน (Docking Algorithms) โดยทั่วไปแล้วกระบวนการนี้จะทำนายรูปแบบโครงสร้างในทิศทางต่างๆ ของลิแกนด์บริเวณ binding site จุดสำคัญในการพัฒนา Docking Algorithms คือความถูกต้องของการจำลองการจับกัน ฟังก์ชันที่ใช้กันมากที่สุดคือ Gold, Flex, Dock และ Autodock เป็นต้น (Gupta et al., 2018)

5. การให้คะแนนการจำลองการจับกัน (Scoring function) การให้คะแนนการจำลองการจับ ขณะทีกระบวนการจำลองการจับกันของโมเลกุลดำเนินไป การจับกันของโปรตีนกับลิแกนด์จะ

เกิดขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระของกิบส์ (Gibbs' free energy, ΔG) ในระบบมีค่าติดลบ เมื่อระบบอยู่ในสภาวะสมดุลที่ความดัน และอุณหภูมิคงที่ การสิ้นสุดของการจับกัน หรือการเกิดสารประกอบระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์นั้นจะขึ้นอยู่กับขนาดค่าลบของ ΔG หรือค่า binding energy ที่ต่ำของสารประกอบเชิงซ้อนโปรตีนกับลิแกนด์แสดงถึงความเสถียรของโปรตีนกับลิแกนด์ที่มีความคงตัวสูงในทำการจับนั้นๆ

ในปี 2017 คณะวิจัยของคุณชาแมนและมุฮัมมัด ได้ศึกษาการโมเลกุลาร์ดอกกิ้งของอนุพันธ์ Carvacrol เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (PDB ID: 2Y9X); การสังเคราะห์กลไกจลนศาสตร์ และการศึกษาการเชื่อมต่อโมเลกุล กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของอนุพันธ์สังเคราะห์พบว่าหนึ่งในอนุพันธ์ 6c มี IC_{50} 0.0167 μM น้อยกว่ากรดโคจิกมาตรฐาน (IC_{50} 16.69 μM) และอนุพันธ์ 4c และ 6b ยังแสดงกิจกรรมยับยั้งไทโรซิเนสที่ดี (IC_{50} 6.7 μM) และ (IC_{50} 6.5 μM) ตามลำดับ การทำโมเลกุลาร์ดอกกิ้งของงานวิจัยนี้ถูกวิเคราะห์ผ่านใช้โปรแกรม Autodock 4.2 โดยศึกษาโครงสร้างอนุพันธ์ Carvacrol พบว่า 2-hydroxy group of cinnamic acid ในอนุพันธ์ 6c มีค่าพลังงานยึดจับ (Binding energy) เท่ากับ -7.90 kcal/mol ซึ่งให้ค่าต่ำที่สุด และปฏิสัมพันธ์กับกรดอะมิโน HIS85 ของโปรตีนเป้าหมาย มีค่าพันธะไฮโดรเจน (bonding distance) 2.07 และ 2.12 Å อีกทั้งเอสเทอร์คาร์บอนิลออกซิเจนในสารประกอบเดียวกันมีปฏิสัมพันธ์กับ HIS284 และ GLU256 เท่ากับ 2.10 และ 2.97 Å ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานว่ากรดอะมิโนเหล่านี้พบในบริเวณที่มี active binding site และมีความสำคัญต่อกระบวนการ downstream signaling pathways ดังนั้นอนุพันธ์ 6c จาก Carvacrol สามารถพัฒนาการออกแบบเป็นตัวแทนเครื่องสำอางใหม่ต่อไปได้ (Ashraf et al., 2017)

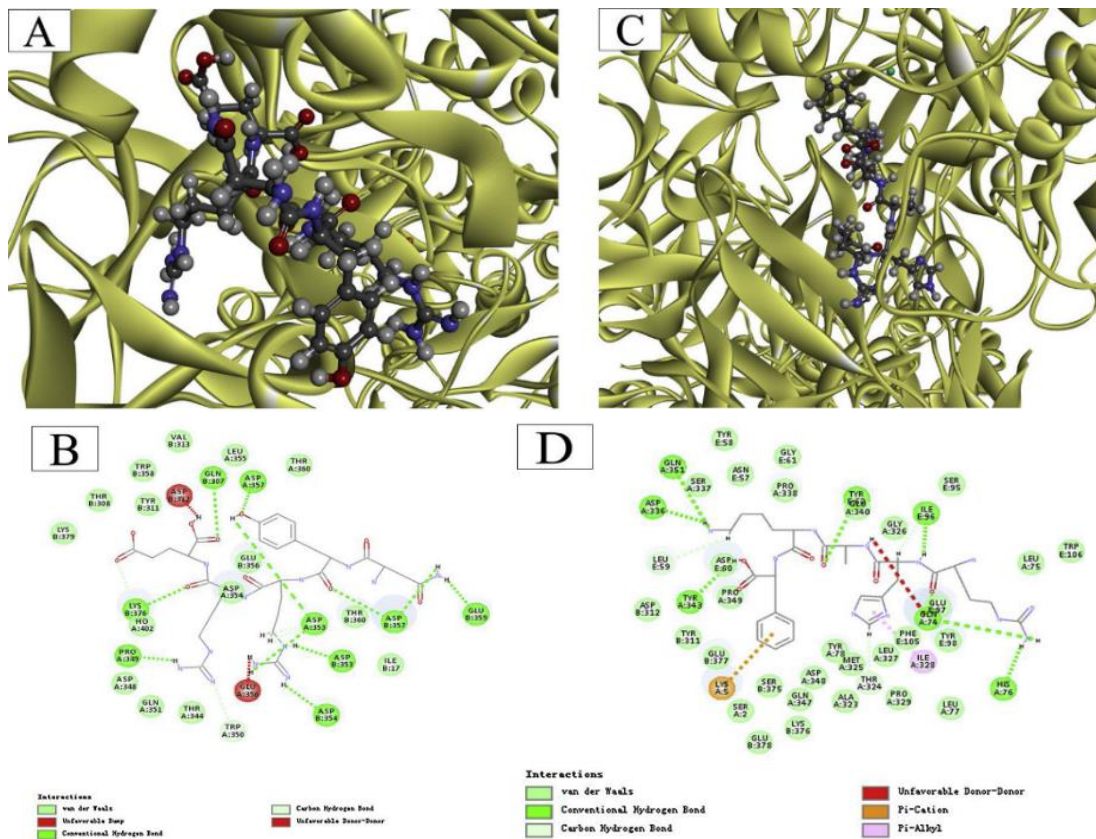




ภาพ 38 แบบจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุลของไทโรซิเนสและลิแกนด์ระหว่าง 4c 6b และ 6c

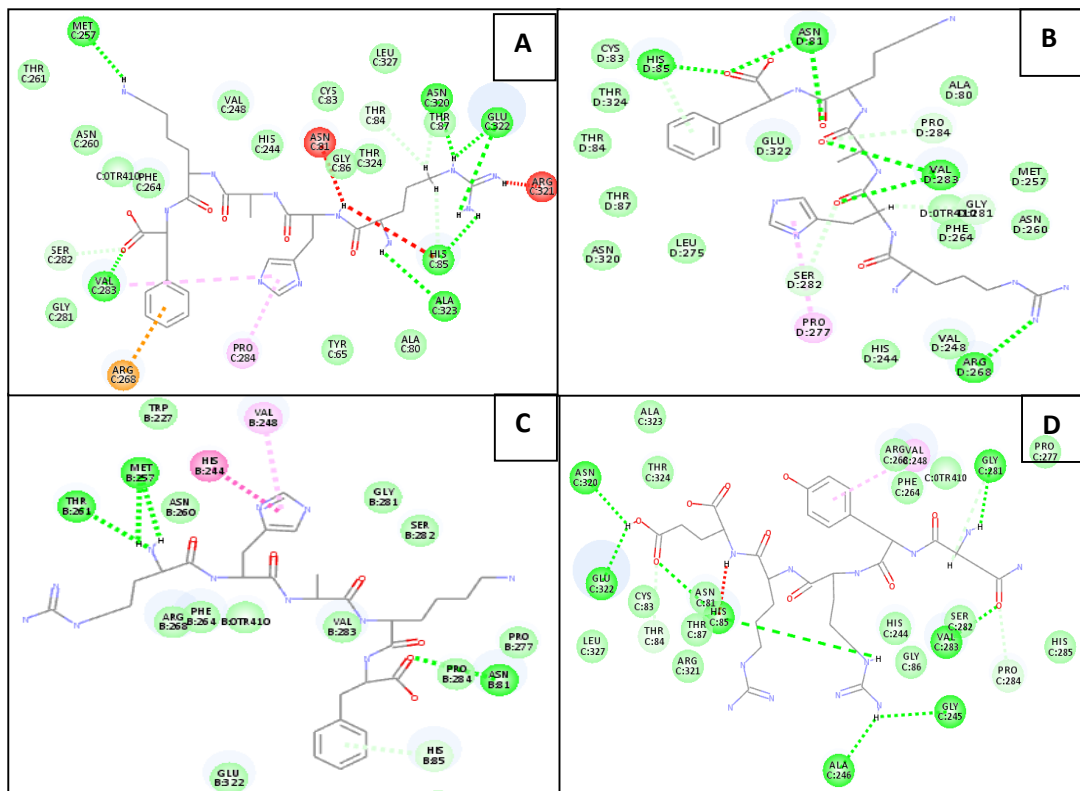
ที่มา : (Ashraf et al., 2017)

Denga และคณะในปี 2020 ได้ศึกษาบทบาทการดูแลผิวของเปปไทด์ที่เตรียมจากโปรตีนเมลิ็ดพันธุ์มะตูมจีน: การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน, การยับยั้งไทโรซิเนส (PDB ID: 2Y9X) และการศึกษาการจับกันระดับโมเลกุลผ่าน Molecular Docking พบเพนทะเปปไทด์จากเมลิ็ดมะตูมจีน 2 สาย ได้แก่ ASN-TYR-ARG-ARG-GLU (NYRRE) และ ARG-HIS-ALA-LYS-PHE (RHAKF) ตามลำดับ อีกทั้งได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและกลไกการยึดจับกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ จากการวิเคราะห์ LibDockScore แสดงค่ามุมการหมุนลิแกนด์ซึ่งแทนด้วยเปปไทด์ NYRRE และ RHAKF ที่จับกับโปรตีนภายใน receptor ของเอนไซม์ (site receptor cavities) มีค่า 215.3 และ 202.7 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า NYRRE มีปฏิสัมพันธ์กับไทโรซิเนส อย่างแน่นหนากว่า แต่มีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ที่ลดลงเมื่อเทียบกับ RHAKF เนื่องจากภายในสายลำดับเปปไทด์ RHAKF ประกอบด้วยกรดอะมิโน ALA และ PHE ซึ่งเป็นกลุ่ม hydrophobic และกรดอะมิโน ARG และ HIS ที่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจน เพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี อีกทั้งกรดอะมิโน HIS และ LYS มีฤทธิ์ในการจับโลหะคอปเปอร์ได้ดี ทั้งยังพบ docking site ของเปปไทด์ RHAKF ที่เชื่อมกับเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าสาย NYRRE ได้ถึง 6 พันธะ (แสดงดังภาพ 39)



ภาพ 39 แบบจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุลของไทโรซิเนสและลิแกนด์ (A) แบบจำลอง 3 มิติ ของ NYRRE (B) ภาพ 2 มิติของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง NYRRE กับเอนไซม์ไทโรซิเนส (C) แบบจำลอง 3 มิติของ RHAKF (D) ภาพ 2 มิติของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง RHAKF กับ เอนไซม์ไทโรซิเนส

ที่มา : (Denga et al., 2020)



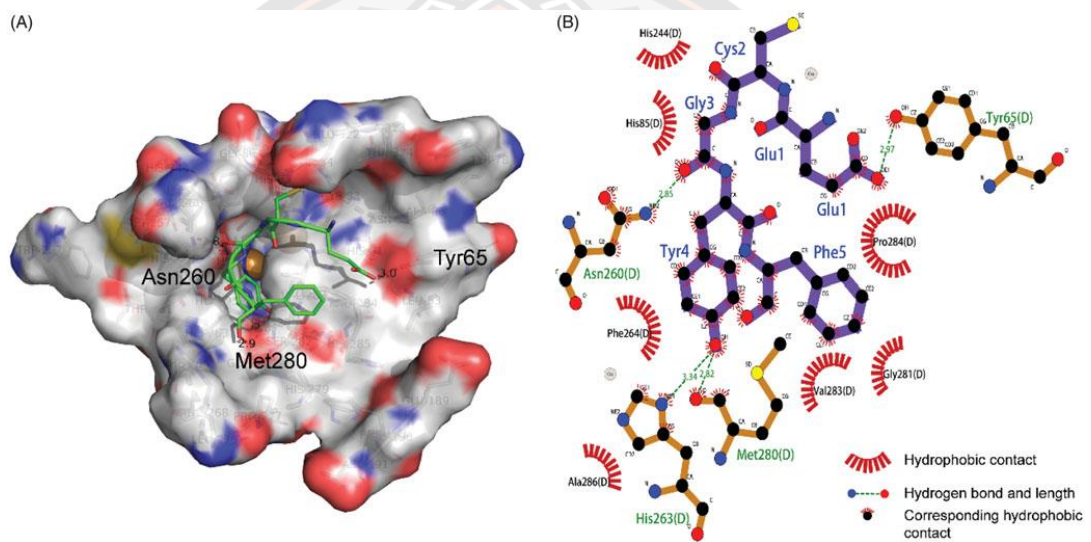
ภาพ 40 แบบจำลอง 2 มิติ แสดงการจับกันระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนสและลิแกนด์ (A) การจับบริเวณ Active site BC3 ของสาย RHAKE (B) การจับบริเวณ Active site BC7 ของสาย RHAKE (C) การจับบริเวณ Active site AC8 ของสาย RHAKE (D) การจับบริเวณ Active site BC3 ของสาย NYRRE

ที่มา : (Denga et al., 2020)

ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์ Molecular Docking ยังแสดงให้เห็นว่าสาย RHAKE สามารถเข้าจับกับ His ที่บริเวณ Active site ได้ถึง 3 ตำแหน่ง (แสดงดังภาพ 40A-C) ในขณะที่ NYRRE จับได้เพียง 1 ตำแหน่ง (แสดงดังภาพ 40D) ดังนั้นการนำเปปไทด์ที่สนใจเข้าไปในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถขัดขวางการเข้าถึงของสารตั้งต้นที่บริเวณ active site หรือการเข้าจับกับโลหะคอปเปอร์ได้ดีกว่า ส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (Denga et al., 2020)

งานวิจัยปี 2019 ค้นพบเพนตะเปปไทด์ ECGYF (EF-5) ชนิดใหม่ที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสประกอบด้วย Glu-Cys-Gly-Tyr-Phe ที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ และผลของการยับยั้งไทโรซิเนสพบว่าความสามารถของ EF-5 ในการยับยั้งการผลิตเมลานินที่เร่งปฏิกิริยาโดยไทโรซิเนสสามารถยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญ และสามารถยับยั้งได้เกือบทั้งหมดที่ความเข้มข้น 6.2 mM ซึ่ง

ออกฤทธิ์ยับยั้งสูงกว่าเมื่อเทียบกับอาร์บูตินและกลูตาไธโอน (IC50: 0.46 mM, 5.73 mM และ 1.18 mM ตามลำดับ) การศึกษาการเชื่อมต่อระดับโมเลกุลได้เผยปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ไทโรซิเนส (PDB ID: 2Y9X) และเปปไทด์ EF-5 แบบจำลองอันตรกิริยามีพลังงานจับ $-2.15 \text{ kcal mol}^{-1}$ พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ผ่านพันธะไฮโดรเจนกับ TYR65, ASP260, HIS263 และ MET280 ซึ่งจะเห็นว่าถูกกำหนดโดยพันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาที่ไม่ชอบน้ำเป็นหลัก (แสดงดังภาพ 41) ตลอดจน EF-5 ยังมีความสามารถในการกำจัดทั้งอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์และพบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT ดังนั้นคุณลักษณะเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าเปปไทด์ EF-5 อาจใช้เป็นทางเลือกตัวยับยั้งไทโรซิเนสที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพได้ (Shen, Z et al., 2019)



ภาพ 41 ปฏิสัมพันธ์ EF-5 กับเอนไซม์ไทโรซิเนส (A) แบบจำลอง 3 มิติ (B) แบบจำลอง 2 มิติ
ที่มา : (Shen, Z et al., 2019)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย (Research Method)

ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลโปรตีนไฮโดรไลเซส(เปปไทด์)จากดอกเห็ดหอมและดอกเห็ดเป่าฮื้อต่อการออกฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษากลศาสตร์การจำลองจับกันเชิงโมเลกุล (Molecular docking) เพื่อค้นหาแรงกระทำระหว่างโมเลกุลกับเอนไซม์เป้าหมายนั้น ผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซส(เปปไทด์)ดังกล่าวจะสามารถออกฤทธิ์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีขึ้น ทั้งนี้ผู้วิจัยมีการดำเนินการวิจัยโดยมีขั้นตอนดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

- ตัวอย่าง
1. ผงดอกเห็ดหอมอบแห้ง (*Lentinus edodes*) จากฟาร์ม จ.ลำปาง
 2. ดอกเห็ดหอมสด (*Lentinus edodes*) จากฟาร์ม จ.เชียงใหม่
 3. ดอกเห็ดเป่าฮื้อสด (*Pleurotus cystidiosus*) จากฟาร์ม จ.พิษณุโลก

2. เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

1. 5% CO₂ Incubator (Shel lab, USA)
2. 96 well-plates
3. Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck KGaA)
4. Analytical balance
5. Autoclave
6. Autopipette
7. Beaker
8. Centrifuge tube (15 และ 50 ml)
9. Duran-Laboratory glass bottles (50, 100, 250, 500 และ 1000 ml)
10. Dialysis tube SnakeSkin 10000 MWCO (Thermo scientific, USA)
11. Erlenmeyer flask
12. Forceps
13. Freeze dryer
14. Gel electrophoresis

15. Glass rod
16. Glove-powder free
17. GOLD 2022.2.0 (Molecular Docking)
18. Graduated Cylinde (50, 100, 250, 500 และ 1000 ml)
19. Hot air oven
20. Image J software
21. Incubate shaker
22. Inverted microscope (Olympus, USA)
23. Laminar flow hood (NuAire, Inc., USA)
24. Magnetic Stir Bar
25. MALDI-TOF Mass Spectrometer (MALDI-TOF / MS)
26. Microcentrifuge tube 1.5 ml
27. Micropipette tips
28. Microplate reader
29. Molecular image Gel documentation system (GE Healthcare Sciences, USA)
30. Mortar
31. Overhead stirrer
32. Parafilm
33. Pasteur pipette
34. PCR Thermal Cyclers
35. pH meter
36. Rack
37. Refrigerated centrifuge (Andreas Hettich mbH & Co.KG, Germany)
38. Spatula chemistry
39. Spin down
40. SPSS Statistics 23 program (ANOVA)
41. Stirring hotplate
42. Syringe-driven Filter (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
43. Ultracentrifuge and centrifuge adapter
44. Volumetric flask (100, 250, 1000 ml)

45. Vortex mixer
46. Water bath (Mettler, USA)
47. Weighing papers

สารเคมี

1. 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS;
 $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$)
2. 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS)
3. 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris-base)
4. 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
5. Acetonitrile
6. Agarose
7. Albumin from bovine serum, Cohn V fraction (BSA)
8. Ammonium sulfate
9. Boric acid
10. Copper sulfate
11. Di (phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$)
12. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
13. Dipotassium hydrogenphosphate (K_2HPO_4)
14. Ethanol
15. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; $C_{10}H_{16}N_2O_8$)
16. Fetal bovine serum (FBS)
17. Folin – Ciocalteu's phenol reagent (FCR)
18. Gallic acid
19. Hydrochloric acid
20. Kojic acid
21. L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)
22. OneMarkB (GeneDireX, Inc)
23. OnePCR Plus (GeneDireX, Inc) (Taq DNA Polymerase, PCR buffer, dNTP,
gel loading dyes, enhancer และ fluorescence dye)
24. PCR Clean-up and Gel extraction Kit (PureDirecx, Taiwan)
25. Pepsin (Thorne research®)

26. Phosphate-buffered saline (PBS)
27. Plant genomic DNA Kit (Tiangen Biotech Co.)
28. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
29. Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)
30. Potassium phosphate
31. RHAKF ลำดับเปปไทด์สังเคราะห์จากบทความ (Denga et al., 2020)
32. Sodium carbonate
33. Sodium chloride
34. Sodium dodecyl sulfate (SDS; $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)
35. Sodium hydroxide
36. Sodium phosphate
37. Sodium potassium tartrate
38. Super enzymes (Now Foods®, 395 S. Glen Ellyn Rd. Now food.com)
(Pancreatin, Bromelain, Pepsin, Papain และ Cellulase)
39. Trolox
40. Tyrosinase (EC 1.14.18.1) ในเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus*

3. วิธีดำเนินการ

3.1 การสกัดโปรตีน

3.1.1 การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดแห้ง

นำตัวอย่างจากผงเห็ดหอมแห้งผสมในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:10 (w/v) สกัดโปรตีนด้วย 1 M NaOH ปรับ pH 10 นำไปปั่นด้วยเครื่อง overhead ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 g เป็นเวลา 20 นาที และเก็บส่วนใสมาปรับ pH เป็น 4.2 ด้วย 1 M HCl จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและเก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง (ความเร็ว 9000 g เป็นเวลา 20 นาที) และนำตะกอนมาปรับ pH เป็น 7 ด้วย 1 M NaOH ก่อนทำแห้งแบบแช่แข็งภายใต้ภาวะสุญญากาศ (Freeze dry)

3.1.2 การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดสด

นำตัวอย่างจากส่วน fresh fruiting body ของเห็ดหอมและเป่าอ้อมาสับชิ้นเล็กๆ และนำมาปั่นโฮโมจีไนส์ใน 0.15 M NaCl แช่เย็น (อัตราส่วน 1 g fruiting body : 2 ml 0.15 M NaCl) หลังจากปั่นโฮโมจีไนส์เสร็จนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาทีที่ 4 °C และเก็บส่วนของสารละลายข้างบน มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่

ความเข้มข้นอิมัตว 60% แล้วบ่มสารสกัดโปรตีนไว้ที่ 4 °C บนภาคน้ำแข็ง 1.30 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที 4 °C อีกครั้ง และเทส่วนสารละลายชั้นบนทิ้งเพื่อเอาตะกอนโปรตีนมาละลายกลับด้วยน้ำกลั่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที 4 °C อีกครั้ง และเก็บส่วนใสทั้งหมด สุดท้ายกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิสด้วยน้ำในการดึงเกลือออกจากสารละลายโปรตีน ก่อนทำแห้งแบบแช่แข็งภายใต้ภาวะสุญญากาศ (Freeze dry)

3.1.3 การสกัดโปรตีนไฮโดรไลสด้วยเอนไซม์โปรติเอส

การเตรียมสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส (PH) หลังผ่านกระบวนการ Freeze dry ให้ทำการชั่งผงโปรตีนจากเห็ดมาละลายในบัฟเฟอร์ 10:1 (w/v) มิกซ์เอนไซม์: 5 mM Potassium phosphate (pH 6.8) และเอนไซม์เปปซิน: 50 mM Sodium acetate (pH 3.7) จากนั้นเติมเอนไซม์โปรติเอสในอัตราส่วน 5% เอนไซม์/สารตั้งต้น (100 กรัม ตัวอย่างโปรตีน: 5 กรัม เอนไซม์) โดยทำในสภาวะต่างกัน (ดังตารางที่ 7) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่ 95°C จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใสที่ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 45 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง

ตารางที่ 7 สรุปสภาวะการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ประเภท	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ชื่อย่อ	วิธีการสกัด	เอนไซม์โปรติเอส	pH	อุณหภูมิ	เวลา
สด (F)	เห็ดหอม (H)	FHp	แอมโมเนียมซัลเฟต	เปปซิน	3.7	37 °C	24 ชั่วโมง	
	เห็ดหอม (H)	FHm	แอมโมเนียมซัลเฟต	มิกซ์เอนไซม์	6.8	40 °C	24 ชั่วโมง	
	เห็ดเป่าฮื้อ (P)	FPp	แอมโมเนียมซัลเฟต	เปปซิน	3.7	37 °C	24 ชั่วโมง	
อบแห้ง (D)	เห็ดหอม (H)	DHm	กรด-เบส	มิกซ์เอนไซม์	6.8	40 °C	24 ชั่วโมง	

หมายเหตุ ในเล่มนี้ใช้ชื่อย่อตัวอย่างสำหรับการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลส 4 ตัวอย่าง

- FHp แทนเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน
- FHm แทนเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์
- DHm แทนเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์
- FPp แทนเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน

3.1.4 การคัดแยกเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน

ส่วนใสที่ได้จาก 3.1.3 ถูกนำมากรองแบบหยาบผ่าน Amicon Ultra Centrifugal Filter ขนาด 10 kDa cut-off จากนั้นนำส่วนใสที่ผ่านการกรองไปแยกโปรตีนให้เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa ผ่าน Amicon Ultra Centrifugal Filter ขนาด 3 kDa cut-off (ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 40 นาที) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง จากนั้นนำสารสกัดที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa มาทำแห้งแบบแช่แข็งภายใต้ภาวะสุญญากาศ (Freeze dry)

เมื่อตัวอย่างแห้งเป็นผงจากการ Freeze dry ให้นำมาละลายกลับ ด้วยน้ำกลั่น 1:1 (w/v) และนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยใช้สารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ในช่วง 10-50 ไมโครกรัม เป็นโปรตีนเปรียบเทียบ (reference) และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) จากสมการกราฟมาตรฐาน

3.2 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีน ด้วยวิธี TNBS (Trinitrobenzenesulphonic acid) (Adler-Nissen, et al. 1979)

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี TNBS ดัดแปลงวิธีจาก (Adler-Nissen, et al., 1979) เริ่มจากเตรียมตัวอย่างหรือ สารละลายมาตรฐานใน 0.2 M Sodium phosphate buffer (pH 8.2) เติม 0.05% TNBS reagent ลงใน 96 well plate ทำในสภาวะอุณหภูมิคงที่ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้ความมืด จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร คำนวณหา ระดับการย่อยสลายของโปรตีน (Degree of hydrolysis; DH)

$$\text{จากสูตร } DH (\%) = (AN_1 / Npd) \times 100$$

เมื่อ AN_1 : ความเข้มข้นของโปรตีนหลังการย่อยสลายหาได้จากกราฟมาตรฐาน (mM)
 Npd แทนด้วย ค่าคงตัวหรือปริมาณไนโตรเจนของพันธะเปปไทด์ในสารตั้งต้นโปรตีน (มก./ก.)

ค่า Npd ที่หาค่า : 4.4736 (มก./ก.) และที่หาค่า : 4.2475 (มก./ก.)

(ค่า Npd ได้รับการวิเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี)

3.3 การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ถูกดัดแปลงวิธีจาก (Zaidi, K. U et al., 2012 และ Cui, H. X et al., 2018) นำสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดและเห็ดหอมแห้งที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 µg/µL และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.05 ถึง 0.5 µg/µL เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ kojic acid 0.1 µg/µL และเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF 1.5 µg/µL ตามลำดับ โดยทั้งสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทและสารมาตรฐานจะถูกเติมด้วยสารตั้งต้น 5 mM L-DOPA ปริมาตร 120 ไมโครลิตรและผสมกับ 5 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ตัวอย่างถูกทดสอบใน commercial mushroom tyrosinase EC 1.14.18.1 (0.25 U/µL) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ซึ่งค่าจะถูกนำมาคำนวณหา %Inhibition tyrosinase ต่อไป

จากสูตร Tyrosinase inhibition (%) = $[(OD_{475_{control}} - OD_{475_{sample}}) / OD_{475_{control}}] \times 100$

3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.4.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ถูกดัดแปลงวิธีจาก (Kriengsak T, Unaro JB & Kevin C. 2006) โดยเริ่มจากเติมตัวอย่างหลุมละ 20 ไมโครลิตร ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทระหว่างความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 µg/µL โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 0.5 µg/µL Trolox และเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF 1.5 µg/µL ตามลำดับ จากนั้นเติม 0.1 mM DPPH solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหา %DPPH scavenging effect

จากสูตร DPPH scavenging effect (%) = $[(OD_{517_{blank}} - OD_{517_{sample}}) / OD_{517_{blank}}] \times 100$

3.4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ถูกดัดแปลงวิธีจาก (Memarpoor-Yazdi M et al., 2012) โดยเริ่มจากเติมตัวอย่างหลุมละ 20 ไมโครลิตรของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทระหว่างความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 µg/µL โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 0.5 µg/µL Trolox และเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF 1.5 µg/µL ตามลำดับ จากนั้นเติมสารผสม 2.45 mM Potassium persulfate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 7 mM ABTS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และบ่มตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหา % ABTS scavenging effect

จากสูตร ABTS scavenging effect (%) = $[(OD734_{\text{blank}} - OD734_{\text{sample}}) / OD734_{\text{blank}}] \times 100$

3.5 การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu

การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound) ถูกอ้างอิงจาก (Sim KS et. al., 2010 และ Hatami, T et. al., 2014)

โดยเริ่มจากนำตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสทั้งหมดที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.125-0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมตัวอย่างหลุมละ 20 ไมโครลิตรและสารละลาย 1:4 (v/v) Folin – ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 10% sodium carbonate ปริมาตร 75 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

3.6 การวิเคราะห์ศึกษาการแสดงผลการแยกของโปรตีน ด้วยวิธี Tricine (SDS-PAGE) ถูกอ้างอิงและดัดแปลงวิธีจาก (Biji T. Kurien and R. Hal Scofield et al., 2012)

นำสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสทั้งหมดที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน ปริมาณโปรตีน 200 ไมโครกรัม มาวิเคราะห์ศึกษาองค์ประกอบและรูปแบบการแสดงผลของโปรตีนเทียบกับสารสกัดหยาบ ด้วยเทคนิค Tricine Gel electrophoresis (15% SDS-PAGE) ผ่านความต่างศักย์ 120 โวลต์ โดยใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง ภายหลังจากการแยกโปรตีน ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ถูกแยกออกจากกันจะนำมาย้อมด้วยสี Silver staining และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ Software

3.7 การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์โดยเทคนิค Mass spectrum

การส่งตรวจวิเคราะห์ได้รับความอนุเคราะห์จากดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ผู้วิจัยเลือกตัดแถบโปรตีนที่ต้องการออกจากเจล (จากขั้นตอน 3.6) โดยผู้วิจัยเลือกโปรตีนไฮโดรไลเซสที่มีขนาดต่ำกว่า 6.5 kDa และตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1-2 มิลลิเมตร นำไปส่งตรวจวิเคราะห์ โดยนำไปทำบริสุทธีเบื้องต้นด้วย Ziptip แล้ววัดความเข้มข้นของเปปไทด์ด้วยเทคนิคของ Lowry (1951) โดยใช้โปรตีน BSA เป็นโปรตีนมาตรฐานหลังจากนั้นนำเปปไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์

ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography – Mass Spectrometer (LC-MS) แล้วหามวลโมเลกุลและกรดอะมิโนภายในสายลำดับเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Maxquant version 2.1.3.0 (Tyanova et al., 2015) ใช้ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot ของ *Pleurotus* และ *Lentinus*

3.8 การศึกษาการจำลองการจับกัน 3 มิติด้วยโปรแกรม Molecular Docking

ทำการศึกษาโครงสร้างอนุพันธ์และการจำลองการจับกันแบบ 3 มิติระดับโมเลกุล เพื่อแสดงการเกิด interactions และอันตรกิริยาที่จับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสกับสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท(เปปไทด์) โดยเลือกลำดับเปปไทด์จากสารสกัดเห็ดหอมสด (FHp) และเห็ดเป่าฮื้อ (FPp) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เปปซิน (PATVSIPIGV, LTLEEGESVG และ LGERTLDEI) และเปปไทด์สังเคราะห์ (RHAKF) นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GOLD 2022.2.0 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เกียรติทวิ ชูวงศ์โกมล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) และโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไทโรซิเนส (PDB ID: 2Y9X) ได้มาจาก RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/2Y9X>)

3.9 การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Enzyme Kinetic)

ศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ โดยใช้หลักของไลน์วีเวอร์และเบิร์ก (Lineweaver and Burk doublereciprocal plot) (Lineweaver and Burk, 1934) ซึ่งจะทำให้การวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา $[V_0]$ ที่มีตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทและเปรียบเทียบกับกลไกการยับยั้งของสาร kojic acid และเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF โดยแปรผันกับความเข้มข้นสารตั้งต้น L-DOPA $[S]$ ที่ความเข้มข้น 0.65, 1.25, 2.5, 5 และ 10 mM ในสถานะที่มีความเข้มข้นโปรตีนของสกัด ได้แก่ DHm (0, 0.09, 0.125 และ 0.5 mg/mL) FHm (0, 0.25, 0.5 และ 1 mg/mL) FHp (0, 0.125, 0.25 และ 0.375 mg/mL) FPp (0, 0.25, 0.375 และ 0.5 mg/mL) kojic acid (0, 0.034, 0.069, 0.138 และ 0.275 mM) และเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF (0, 0.1875 และ 0.375 mg/mL) ทำการทดลองในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ข้อ 3.3) จากนั้นติดตามจลนศาสตร์ของการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เป็นเวลาทุกๆ 10 นาที และทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Microsoft excel เพื่อรายงานค่าทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์และวิเคราะห์ชนิดของกลไกการยับยั้ง ได้แก่ การยับยั้งแบบ competitive inhibition แบบ non-competitive inhibition และแบบ uncompetitive inhibition

3.10 การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดเปปไทด์

การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ได้รับความอนุเคราะห์ในการทดลองจาก รศ.ดร. วรศักดิ์ แก้วก่อง อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3.10.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT

ทำการเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์ในผิวหนัง (HaCaT) ด้วยอาหาร DMEM ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS) และ 1% Anti-Anti (100U/mL) บ่มในตู้บ่มเซลล์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิคงที่ 37 °C และคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3.10.2 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ด้วยเทคนิค MTT assay

เลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยง 96 หลุมที่ 2,000 เซลล์/หลุม และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 mg/mL และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมสารละลาย 10 μ L MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5 มก./มล. ใน PBS) บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นละลายผลึกด้วย 100 μ L ของ DMSO บ่มทิ้งไว้ 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหา %Cell viability

$$\text{จากสูตร Cell viability (\%)} = [(OD_{\text{control}} - OD_{\text{treated}}) / (OD_{\text{control}})] \times 100$$

3.11 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ DNA barcode และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree

3.11.1 การสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเห็ดแห้งและเห็ดสดมาการสกัด DNA โดยนำดอกเห็ดมาบดในโถรงแช่เย็นจนเป็นผงละเอียด เติมนิโตรเจนเหลวระหว่างบดเป็นระยะๆ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม จากนั้นดำเนินการตามคู่มือการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Plant genomic DNA Kit (Tiangen Biotech Co.) และวัดความเข้มข้นของ DNA ที่ 260 นาโนเมตร

3.11.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และการทำปฏิกิริยาผลิตภัณฑ์ PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR เตรียมสารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 25 ไมโครลิตร ของ 1x One PCR™ plus (Taq DNA Polymerase, PCR buffer, dNTP, gel loading dyes, enhancer และ fluorescence dye) ไพรเมอร์ ITS5-Forward (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') และ ITS4- Reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ไพรเมอร์ละ 1 ไมโครลิตร, DNA template 50 และ 100 นาโนกรัม และเติมน้ำ deionized ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 50 ไมโครลิตร ตั้งค่าโปรแกรมเครื่องเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอเป็น Pre denaturation 94°C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation 94°C นาน 30 วินาที annealing 50°C นาน 1 นาที และ extension 72°C นาน 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72°C นาน 5 นาที

นำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาแยกดูขนาดแถบดีเอ็นเอในแผ่นอะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1% ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ นาน 45 นาที โดยเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker) ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR และบันทึกภาพ

3.11.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และวิเคราะห์ Phylogenetic tree

นำ DNA fragment จาก agarose gel ปริมาณ 300 มิลลิกรัม มาทำบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด PCR Clean-Up & Gel Extraction Kit (PureDireX) จากนั้นจัดส่งผลิตภัณฑ์ DNA ไปวิเคราะห์ลำดับเบส นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีการ Sequencing จาก 3730 XL Sequencer, Applied Biosystems จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสมาทำการ Blast กับเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ด หรือ Phylogenetic tree ด้วย MEGA software V.11

3.12 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics 23 จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว Analysis of Variance (ANOVA) เพื่อทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมเชิงบวก ($p < 0.05$) ข้อมูลรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD สำหรับการวิเคราะห์ เมื่อวิเคราะห์จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

บทที่ 4

ผลการวิจัย (Research Results)

4.1 ผลการหาปริมาณโปรตีน

เมื่อนำสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท (PH) ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa จากดอกเห็ดที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันมาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยใช้สารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ในช่วง 10-50 ไมโครกรัม เป็นโปรตีนเปรียบเทียบกับ (reference) และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำมาคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และปริมาณโปรตีนทั้งหมด (g) (แสดงดังตาราง 8)

ตารางที่ 8 ผลการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และแสดงค่า Yield(%)

ประเภท ตัวอย่าง ดอก เห็ด	ตัวอย่าง	เอนไซม์ โปรตีเอส	ความเข้มข้นโปรตีน ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)		น้ำหนักสารสกัด		
			สารสกัด หยาบ (ไม่ย่อย)	เล็กกว่า 3 kDa	ปริมาณ ตั้งต้น (g)	ปริมาณ สุดท้าย (g)	Yield (%)
สด	เห็ดหอม	เปปซิน	2.0 ± 0.10	3.4 ± 0.02	2860	0.5	0.017
	เห็ดหอม	มิกส์ เอนไซม์	2.0 ± 0.10	5.7 ± 0.10	2018	0.3	0.015
	เห็ดเป่าฮื้อ	เปปซิน	4.1 ± 0.08	6.6 ± 0.02	2500	0.3	0.012
อบแห้ง	เห็ดหอม	มิกส์ เอนไซม์	8.0 ± 0.06	13.3 ± 0.03	200	0.1	0.059

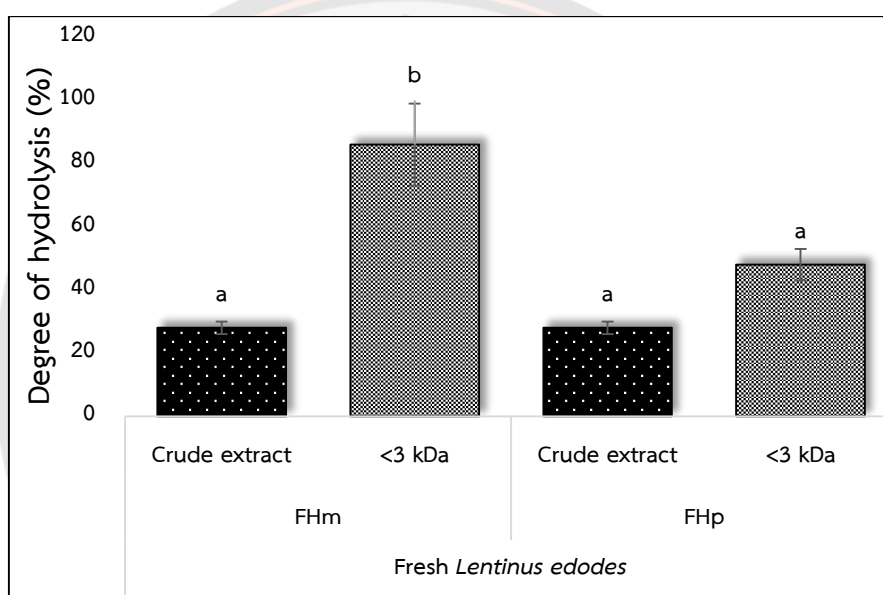
ข้อมูลทั้งหมดรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n = 3)

จากตารางผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท (PH) ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa พบว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนมากกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย เมื่อคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งหลัง Freeze dry หรือปริมาณสุดท้ายของกระบวนการสกัด (กรัม) เทียบกับปริมาณตั้งต้น (กรัม) พบว่าเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) เห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (FHm) เห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) และเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (Fpp) มีปริมาณสารสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.017, 0.015, 0.012 และ 0.059 กรัม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าหากเทียบในปริมาณเริ่มต้น 100 กรัม ปริมาณสุดท้ายของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งจะให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่าเห็ดสด

4.2 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี TNBS (Trinitrobenzenesulphonic acid)

การศึกษาหาระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซส หรือ Degree of hydrolysis (%DH) ด้วยวิธี TNBS โดยนำค่าที่ได้จะถูกนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับการย่อยสลาย (แสดงดังภาพ 42-44)

1. ตัวอย่าง: เห็ดหอมสด

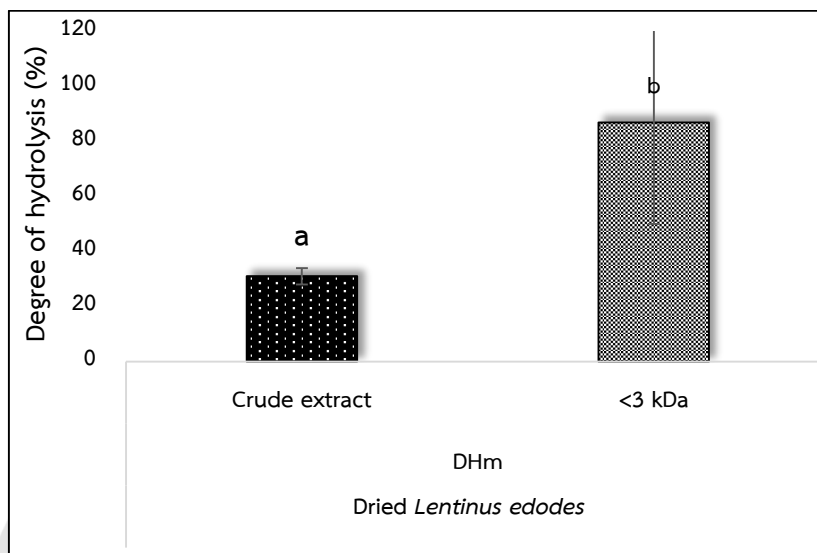


ภาพ 42 แผนภูมิแท่งแสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซสด้วยวิธี TNBS ระหว่างสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) และมิกซ์เอนไซม์ (FHm) ขนาด <3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3), ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

จากผลการทดลองระดับการย่อยสลายของตัวอย่างเห็ดหอมสด พบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย (Crude extract) มีค่าเท่ากับร้อยละ 28 ในขณะที่เมื่อนำไปผ่านการย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์และเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซส (<3 kDa) ทั้ง FHm และ FHp มีค่าระดับของการย่อยสลายสูงขึ้น เท่ากับร้อยละ 86 และ 48 ตามลำดับ

2. ตัวอย่าง: เห็ดหอมแห้ง

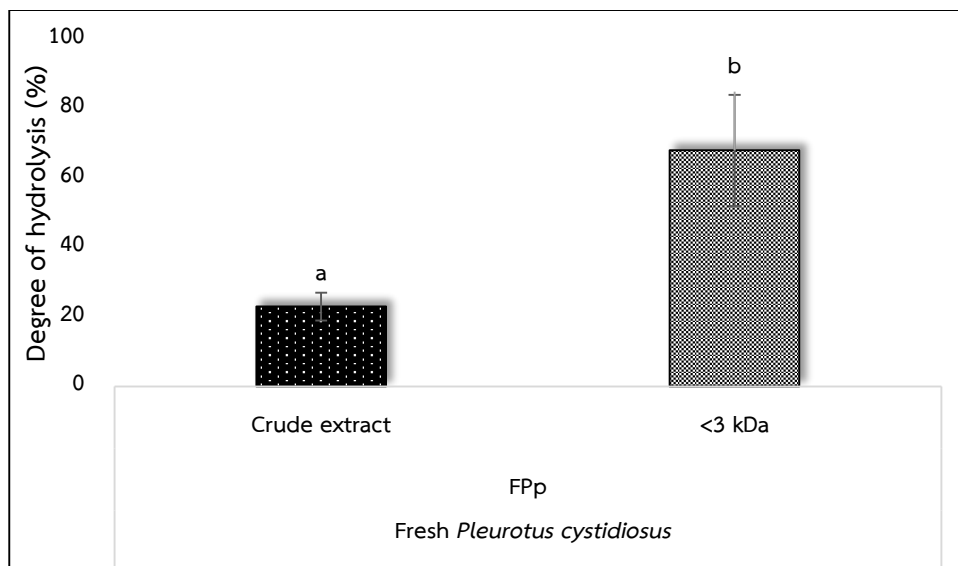


ภาพ 43 แผนภูมิแท่งแสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธี TNBS ระหว่างสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) ขนาด <3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ($n=3$), ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

จากผลการทดลองระดับการย่อยสลายของตัวอย่างเห็ดหอมแห้ง พบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย (Crude extract) มีค่าเท่ากับร้อยละ 31 ในขณะที่เมื่อนำไปผ่านการย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท DHm (<3 kDa) มีค่าระดับของการย่อยสลายสูงขึ้นเท่ากับร้อยละ 87 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

3. ตัวอย่าง: เห็ดเป่าฮื้อ



ภาพ 44 แผนภูมิแท่งแสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลสด้วยวิธี TNBS ระหว่างสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPp) ขนาด <3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3), ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

จากผลการทดลองระดับการย่อยสลายของตัวอย่างเห็ดเป่าฮื้อสด พบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย (Crude extract) มีค่าเท่ากับร้อยละ 23 ในขณะที่เมื่อนำไปผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส FFP (<3 kDa) มีค่าระดับของการย่อยสลายสูงขึ้นเท่ากับร้อยละ 68 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 9 แสดงค่าระดับการย่อยสลายของสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส

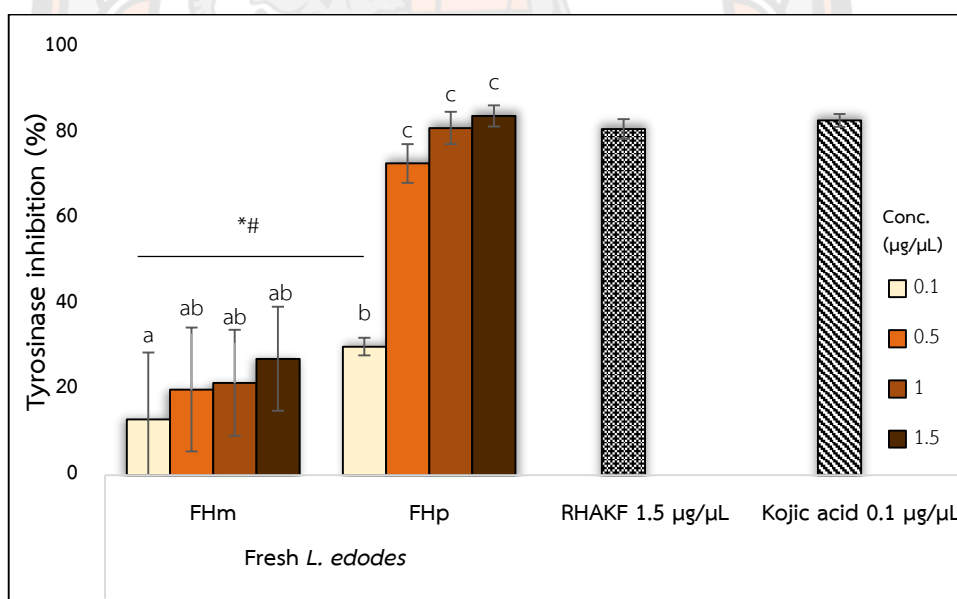
	FHm		FHp		DHm		FPp	
	Crude	<3 kDa	Crude	<3 kDa	Crude	<3 kDa	Crude	<3 kDa
%DH	28	86	28	48	31	87	23	68

จากผลการทดลองระดับการย่อยสลายของตัวอย่างทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าหลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสมีระดับการย่อยสลายได้เป็นกรดอะมิโนเพิ่มสูงขึ้นซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย แสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยโดยใช้มิกซ์เอนไซม์มีค่าระดับการย่อยสลายสูงกว่าการใช้เอนไซม์เปปซินเพียงชนิดเดียว ดังนั้นการเลือกเอนไซม์โปรติเอสจึงเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ควรคำนึงถึง ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าหากปฏิกิริยาไม่ได้มีการหยุดลง การเลือกใช้เวลา หรือปริมาณของเอนไซม์ที่มากขึ้นอาจทำให้มีการย่อยสลายของโปรตีนและ/หรือเปปไทด์ดำเนินต่อไปได้

4.3 การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เมื่อนำค่าดูดกลืนแสงของเอนไซม์ไทโรซิเนส จาก Commercial tyrosinase ในเห็ดที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด จากผลการทดลองการศึกษา ณ เวลาที่ 20 นาที โดยค่าที่ได้นำมาคำนวณ %Inhibition (แสดงดังภาพ 45-50)

1. ตัวอย่าง: เห็ดหอมสด



ภาพ 45 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) และมิกซ์เอนไซม์ (FHm) ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n=3); #, * แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKEF และกรดโคจิกตามลำดับ และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกัน

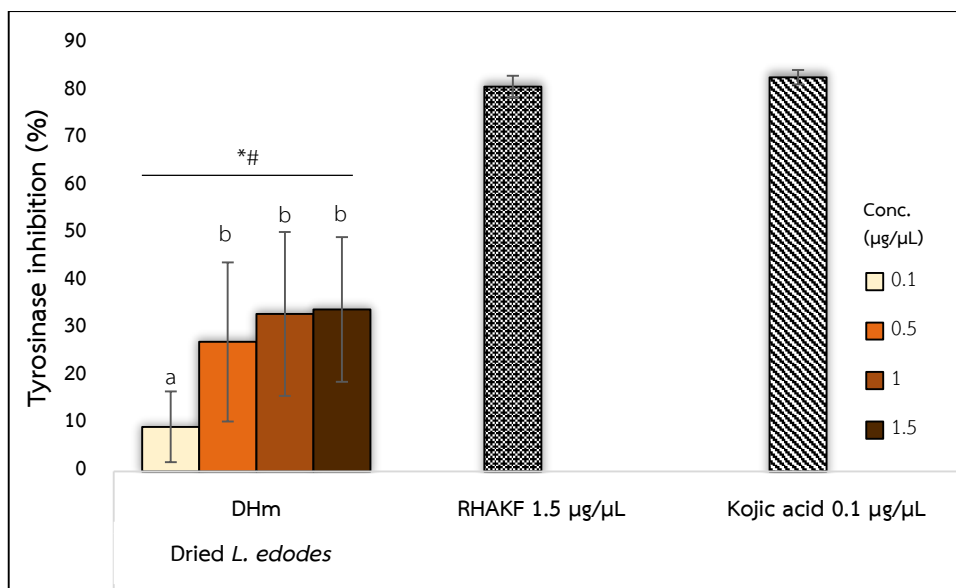
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$); NS: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 46 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเทห็ดหอมสดใน 96 well-plate

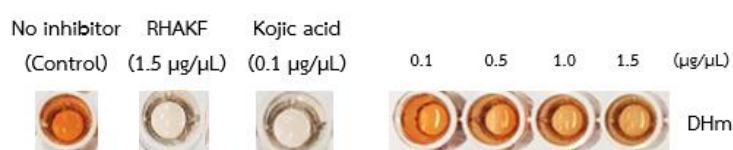
ผลการทดลองในภาพที่ 45 แสดงความเข้มข้นของโปรตีนตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเท โดยจากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเทห็ดหอมสดทั้ง FHm และ FHp มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถลดการทำงานของ L-DOPA oxidase ได้ร้อยละ 13 ถึง 27 และ 30 ถึง 84 ตามลำดับ โดยพบว่า FHm มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ต่ำกว่า FHp โดยที่ความเข้มข้น 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ FHm และ FHp พบว่ามีค่าการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) และ IC_{50} ของ FHp เท่ากับ 0.285 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ในขณะที่ FHm ไม่สามารถหา IC_{50} ได้ (แสดงดังตาราง 10) อย่างไรก็ตามตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ FHp พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของกรดโคจิก (IC_{50} 0.047 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ RHAKF (IC_{50} 0.690 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ผลจึงชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดโคจิกและเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งที่สูงกว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเทห็ดหอมสดด้วยมิกซ์เอนไซม์

2. ตัวอย่าง: ห็ดหอมแห้ง



ภาพ 47 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิลล์เอนไซม์ (DHm) ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n=3); #,* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKF และกรดโคจิกตามลำดับ และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

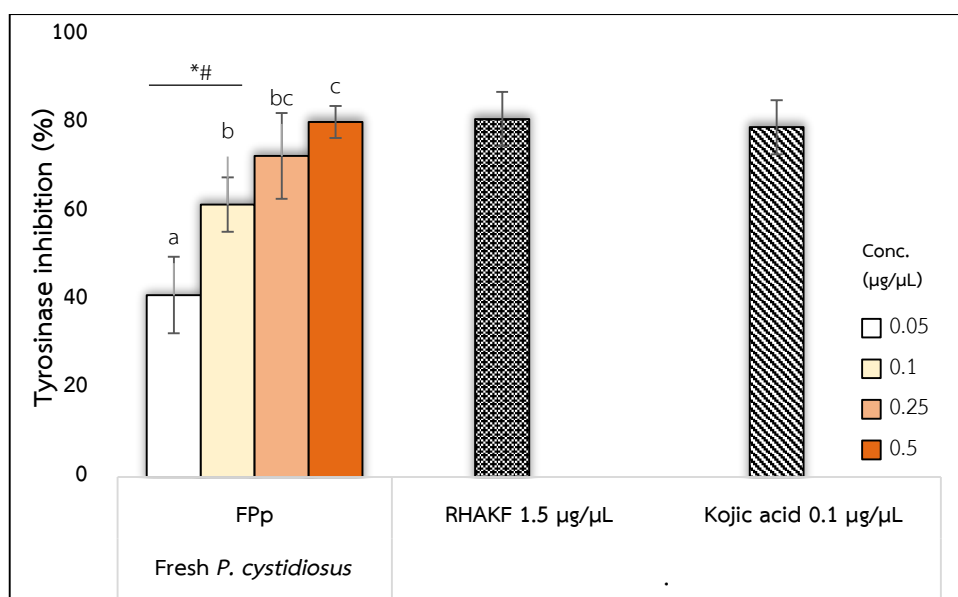


ภาพ 48 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทเห็ดหอมแห้งใน 96 well-plate

ผลการทดลองในภาพที่ 47 แสดงความเข้มข้นของโปรตีนตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.5 µg/µL ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดอกเห็ดหอมแห้ง โดยจากกราฟแสดงให้เห็นว่า DHm มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 µg/µL สามารถลดการทำงานของ L-DOPA oxidase ได้ร้อยละ 9 ถึง 34 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าความเข้มข้น 0.5 ถึง 1.5 µg/µL ของ DHm มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตาม DHm ไม่สามารถหา IC_{50} ได้ (แสดงดังตาราง 10) และเมื่อเทียบกับ 0.1 µg/µL ของกรดโคจิก (IC_{50} 0.047

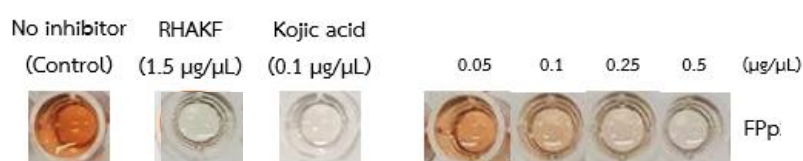
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และ $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ RHAKF (IC_{50} $0.690 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) พบว่าแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าการยับยั้งสูงถึงร้อยละ 83 และ 81 ตามลำดับ ผลจึงชี้ให้เห็นว่าเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ต่ำกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิกและเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF ดังกล่าว

3. ตัวอย่าง: เห็ดเป๋าฮื้อ



ภาพ 49 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป๋าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPP) ความเข้มข้นโปรตีน 0.05, 0.1, 0.25, และ $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ($n=3$); #,* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKF และกรดโคจิกตามลำดับ และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)



ภาพ 50 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทเห็ดเป๋าฮื้อใน 96 well-plate

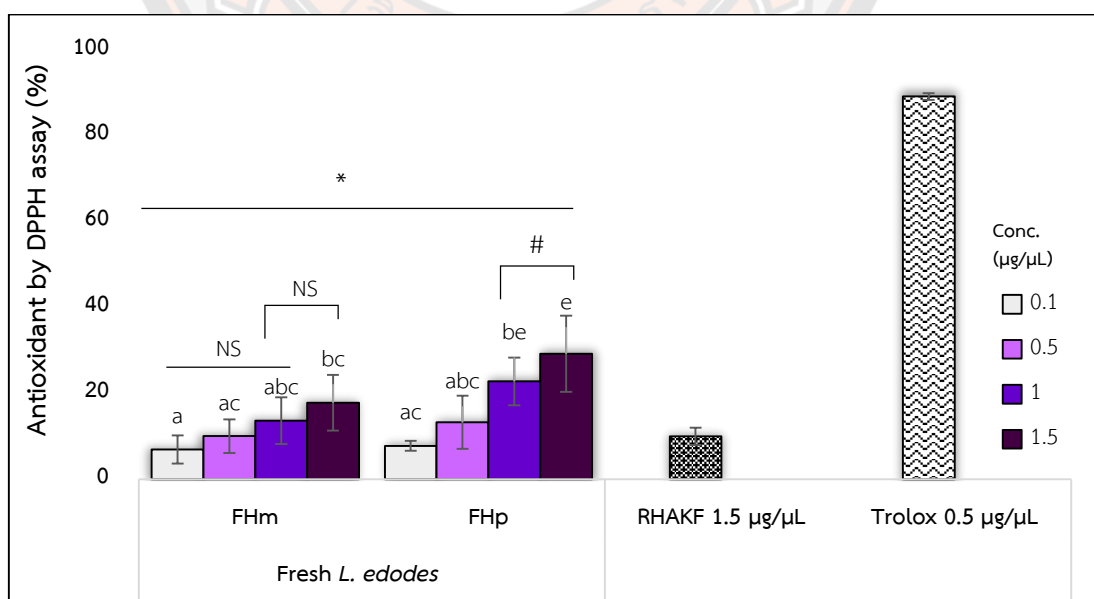
ผลการทดลองในภาพที่ 49 แสดงความเข้มข้นของโปรตีนตั้งแต่ 0.05 ถึง 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากดอกเห็ดเป่าฮื้อ โดยจากกราฟแสดงให้เห็นว่า FpP มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.05 ถึง 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถลดการทำงานของ L-DOPA oxidase ได้ถึงร้อยละ 41 ถึง 80 ตามลำดับ (IC_{50} 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.25 ถึง 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ RHAKF และ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของกรดโคจิก ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 81 (IC_{50} 0.690 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และ 79 (IC_{50} 0.047 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ตามลำดับ ผลจึงชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดโคจิกและเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF

4.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4.4.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลสขนาดเล็กลงกว่า 3 kDa ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งค่าดูดกลืนแสงที่ได้นำมาคำนวณหาฤทธิ์ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH^{•+} หรือ %Antioxidant Index (AI) (แสดงดังภาพ 51-53)

1. ตัวอย่าง: เห็ดหอมสด

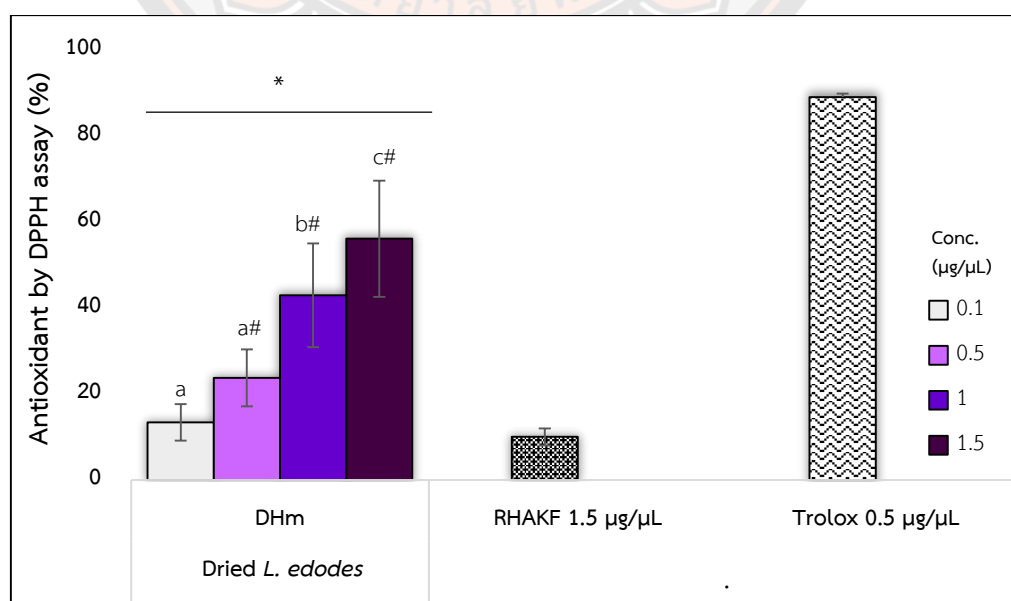


ภาพ 51 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) และมิกซ์เอนไซม์ (FHm) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3); #,* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKF และ Trolox และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ ระดับ ความเชื่อมั่น ร้อย ละ 95 ($p<0.05$); NS: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์ (FHm) และเอนไซม์เปปซิน (FHp) มีการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH⁺ ได้ร้อยละ 7 ถึง 18 และ 8 ถึง 29 ตามลำดับ โดยพบว่า 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ FHp มีค่าต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า FHm ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนส่งผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH⁺ ได้สูงกว่ามิกซ์เอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสททั้ง FHm และ FHp ยังคงมีค่าน้อยกว่า 50% หรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หากเมื่อเทียบกับ Trolox ซึ่งมีค่าต้านอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 89

2. ตัวอย่าง: เห็ดหอมแห้ง

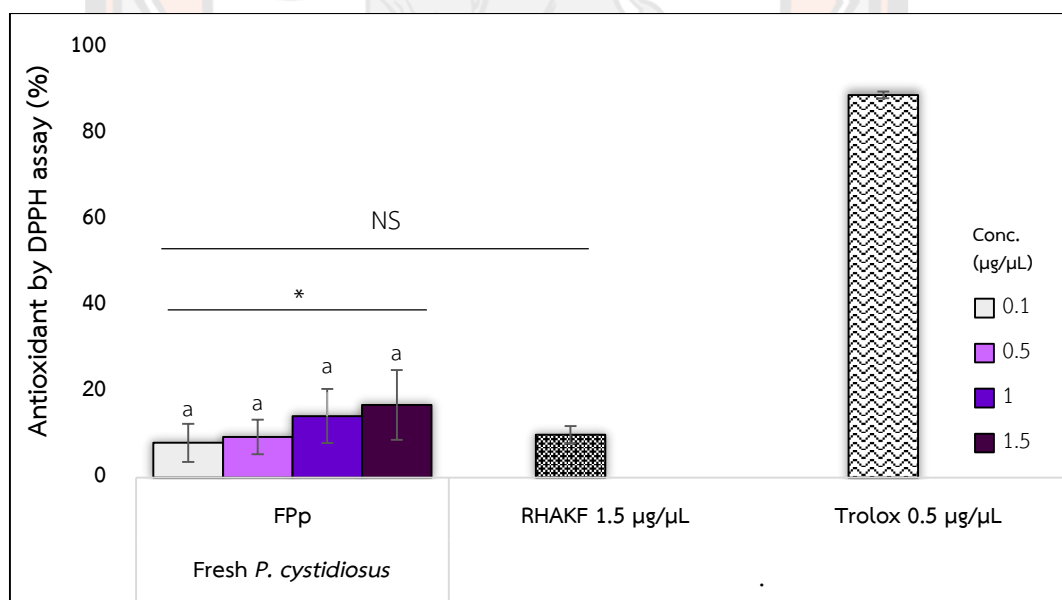


ภาพ 52 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้ง ที่ย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์ (DHm) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n=3); #,* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKF และ Trolox และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05); NS: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์ (DHm) มีการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 µg/µL สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH⁺ ได้ร้อยละ 13 ถึง 56 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท DHm ยังคงมีค่าต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) หากเมื่อเทียบกับ Trolox ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 89

3. ตัวอย่าง: เห็ดเป่าฮื้อ



ภาพ 53 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าฮื้อที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPP) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 µg/µL

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n=3); #,* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKF และ Trolox และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมี

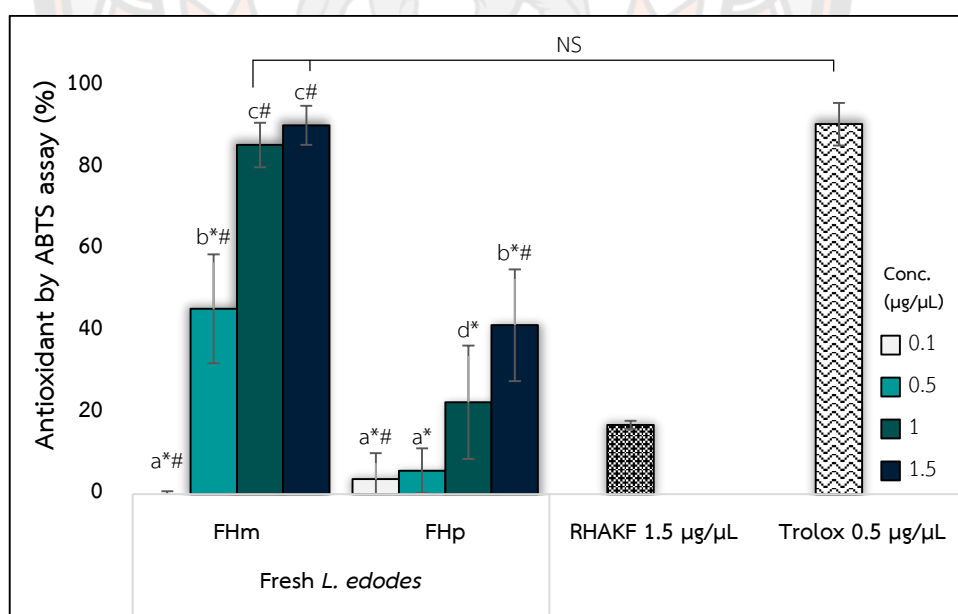
นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$); NS: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าฮือสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์ เปปซิน (FHp) มีการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH⁺ ได้ร้อยละ 8 ถึง 17 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท FHp ยังคงมีค่าต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าหรือแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หากเมื่อเทียบกับ Trolox ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 89

4.4.2 การศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

โปรตีนไฮโดรไลเสทขนาดเล็กกว่า 3 kDa (PH) ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ซึ่งค่าดูดกลืนแสงที่ได้นำมาคำนวณหาฤทธิ์ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ หรือ %Antioxidant Index (AI) (แสดงดังภาพ 54-56)

1. ตัวอย่าง: เห็ดหอมสด

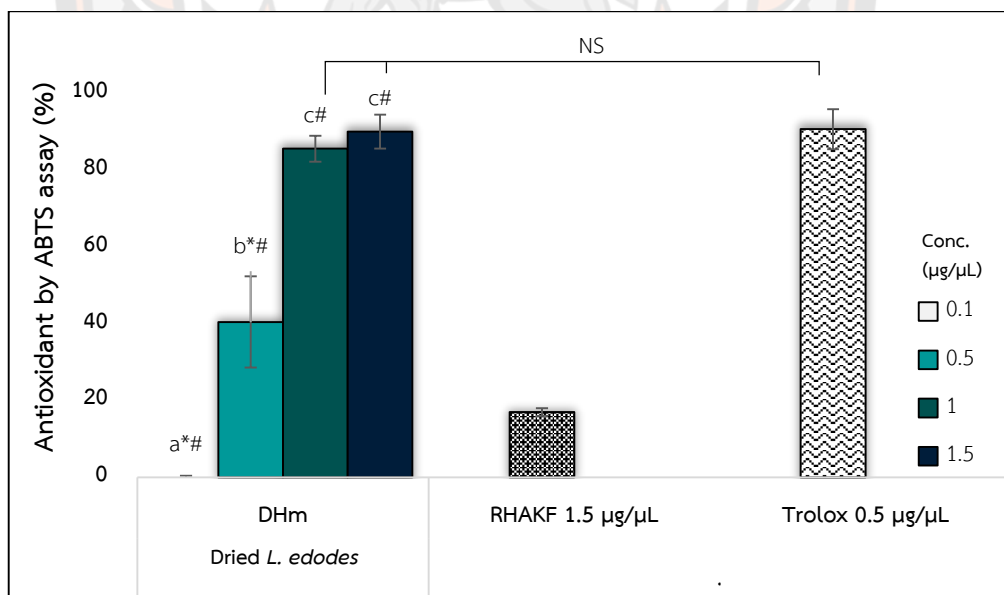


ภาพ 54 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) และมิกซ์เอนไซม์ (FHm) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3); #,* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKF และ Trolox และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ ระดับ ความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($p < 0.05$); NS: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดทั้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์และเอนไซม์เปปซิน (FHm และ FHp) มีการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{+} ได้ร้อยละ 0 ถึง 90 และ 4 ถึง 41 ตามลำดับ โดยพบว่า 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ FHm มีค่าต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า FHp ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งให้เห็นว่ามิกส์เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนส่งผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH^{+} ได้สูงกว่าเอนไซม์เปปซิน แต่อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นโปรตีน 1 และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ FHm มีค่าต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับ Trolox ซึ่งมีค่าต้านอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 86, 90 และ 91 ตามลำดับ

2. ตัวอย่าง: เห็ดหอมแห้ง

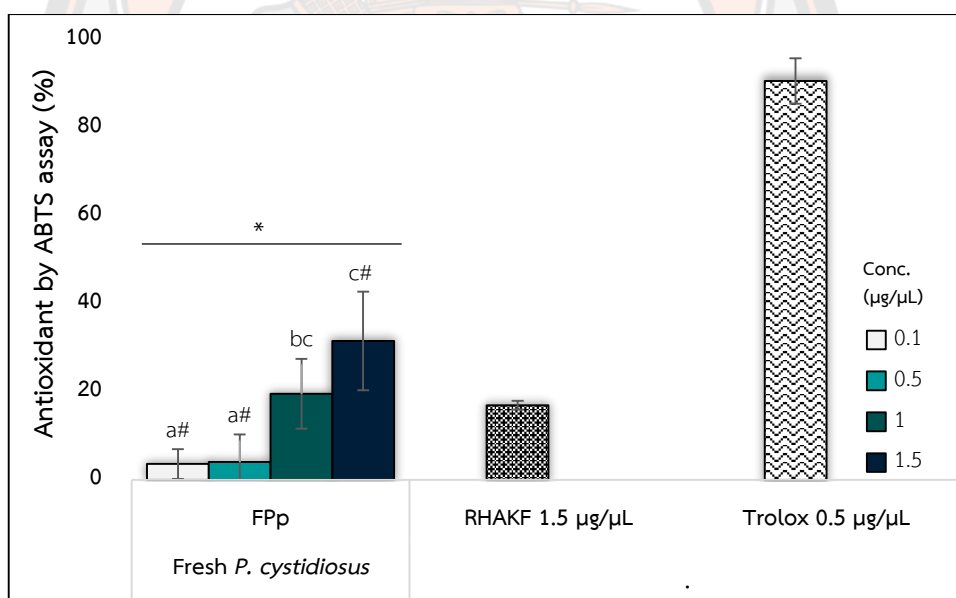


ภาพ 55 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{+} จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3); #,* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKF และ Trolox และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$); NS: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) มีการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ได้ร้อยละ 0 ถึง 90 ตามลำดับ โดยพบว่า 1 และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ DHm มีค่าต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับ Trolox ซึ่งมีค่าต้านอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 86, 90 และ 91 ตามลำดับ

3. ตัวอย่าง: เห็ดเป่าฮื้อ



ภาพ 56 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1, และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3); #,* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ RHAKF และ Trolox และตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$); NS: ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์ เปปซิน (Fp) มีการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1 ถึง 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ร้อยละ 4 ถึง 32 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส Fp ยังคงมีค่าต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าหรือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หากเมื่อเทียบกับ Trolox ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 91

จากข้อมูลทั้งหมดสามารถแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสทุกชนิดรายงานเป็นค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ 50% และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox เรียกว่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; $\mu\text{mol Trolox/g sample}$) ซึ่งค่านี้แสดงถึงความเข้มข้นของ Trolox ที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระต่อสารที่ทดสอบ 1 กรัม (แสดงดังตาราง 10)

ตารางที่ 10 แสดงค่า TEAC และค่า IC_{50} ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสและสารมาตรฐาน

ตัวอย่าง	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g samples}$)		IC_{50} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)		
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	Tyr
FHp	103.28 \pm 7.25	134.07 \pm 13.67	nd	nd	0.285
FHm	63.02 \pm 5.31	292.70 \pm 4.79	nd	0.555	nd
Fp	59.96 \pm 6.01	102.37 \pm 11.20	nd	nd	0.071
DHm	198.63 \pm 11.06	291.46 \pm 4.42	1.260	0.605	nd
Trolox	nd	nd	0.065	0.059	nd
Kojic acid	nd	nd	nd	nd	0.047
RHAKF	36.14 \pm 1.82	55.64 \pm 0.99	nd	nd	0.69

ข้อมูลทั้งหมดรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ($n = 3$)

Tyr, Tyrosinase inhibition; Nd, not detected.

4.5 การศึกษาหาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound)

จากการนำโปรตีนไฮโดรไลสขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน (PH) ความเข้มข้นต่างๆ มาวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ซึ่งค่าดูดกลืนแสงที่ได้นำมาคำนวณเทียบจากสมการกราฟมาตรฐานที่มี Gallic acid ความ

เข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) เป็นสารละลายมาตรฐาน และนำมาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แสดงในรูปของ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (แสดงดังตาราง 11)

ตารางที่ 11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท

ความเข้มข้นโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	FHm	FHp	DHm	Fpp
100	13 \pm 0.02	12 \pm 0.03	7 \pm 0.02	4 \pm 0.02
500	25 \pm 0.02	20 \pm 0.01	24 \pm 0.02	16 \pm 0.02
1,000	42 \pm 0.04	30 \pm 0.01	54 \pm 0.02	33 \pm 0.03
1,500	55 \pm 0.02	41 \pm 0.01	77 \pm 0.03	51 \pm 0.04

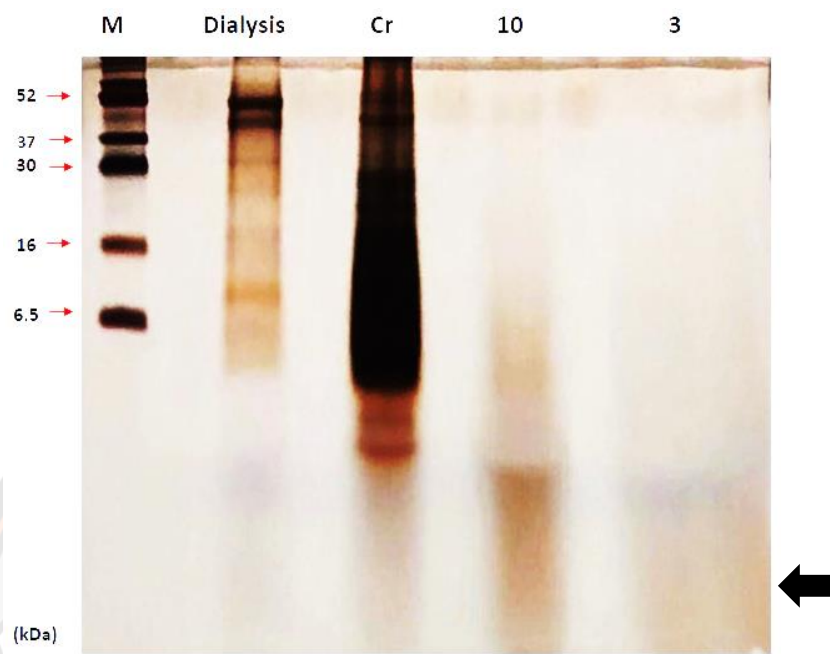
ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3)

จากตารางแสดงให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยพบว่าสารสกัดจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งหมด ทั้งนี้ สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยโดยมิกส์เอนไซม์ไม่ว่าจะเห็นหรือเห็นสดต่างก็มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนส่งผลต่อสารประกอบฟีนอลิก (77 \pm 0.03 และ 55 \pm 0.02) ที่สูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (41 \pm 0.01 และ 51 \pm 0.04) ตามลำดับ

4.6 การวิเคราะห์ศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน ด้วยวิธี Tricine (SDS-PAGE)

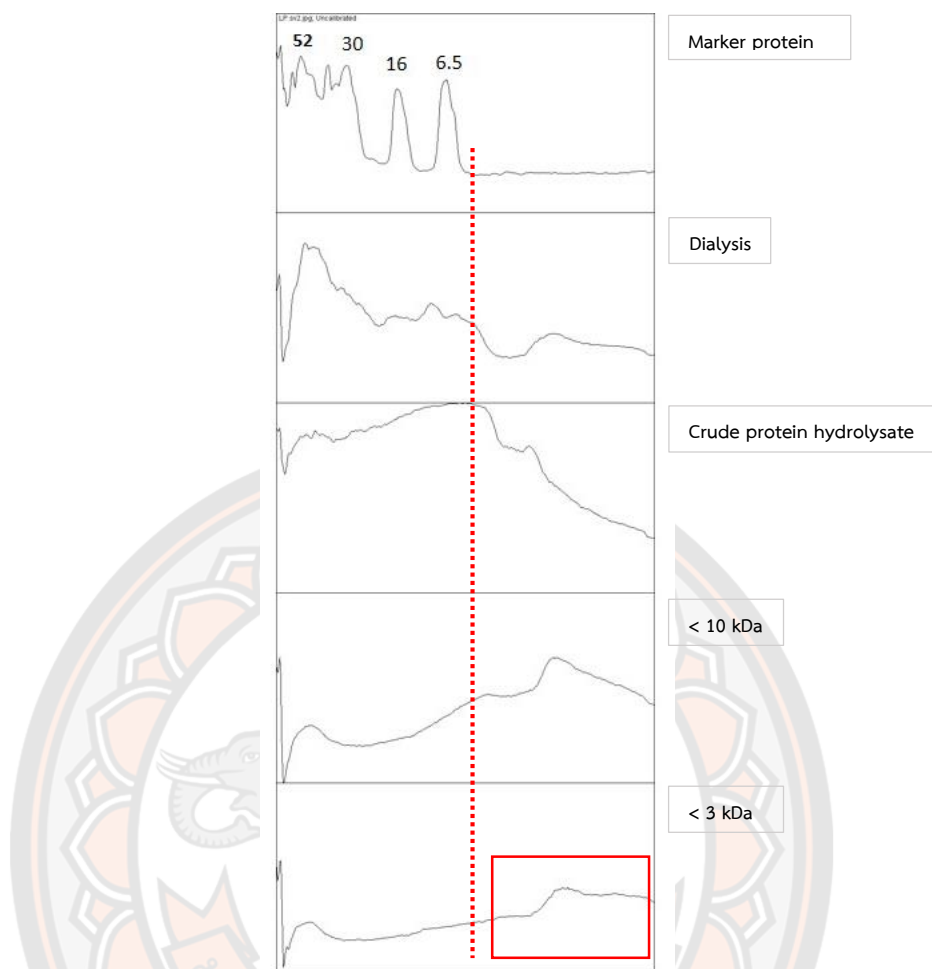
จากผลการศึกษารูปแบบการแสดงออกของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท ผ่านวิธี Tricine SDS-PAGE และถูกนำไปย้อมด้วยสี Silver staining (แสดงดังภาพ 57-62)

1. ตัวอย่าง: เห็ดหอมแห้ง



ภาพ 57 รูปแบบการแสดงออกของสารสกัดเห็ดหอมเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมีกัลเอนไซม์ (DHm) ด้วยวิธี Tricine (15% SDS-PAGE)

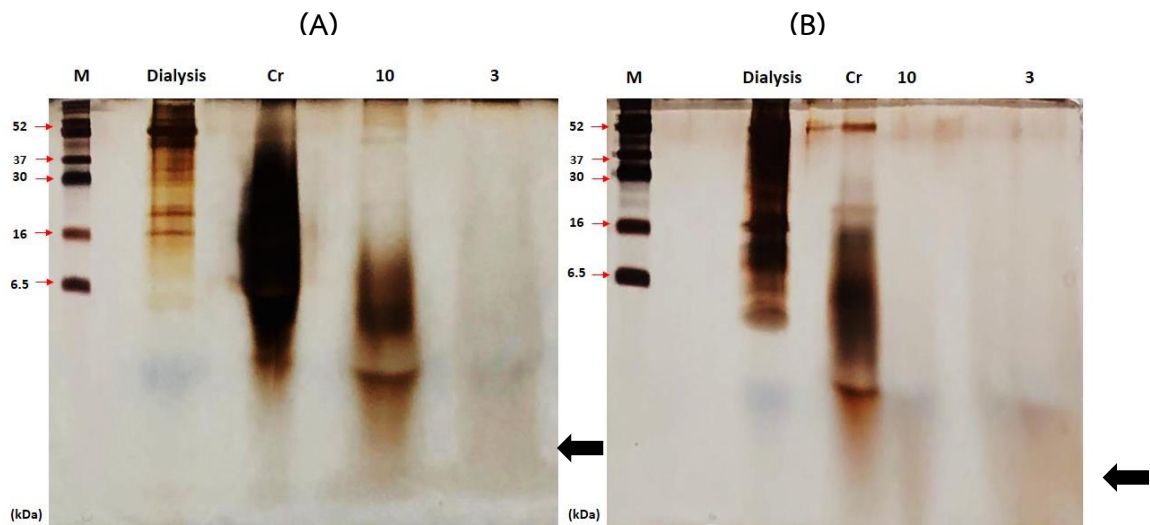
เมื่อ	แถว M	:	โปรตีนมาตรฐาน
	แถว Dialysis	:	โปรตีนหลัง Dialysis (สารสกัดเห็ดหอม)
	แถว Cr	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท DHm
	แถว 10	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท DHm ขนาด <10 kDa
	แถว 3	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท DHm ขนาด <3 kDa



ภาพ 58 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ Software analyzed

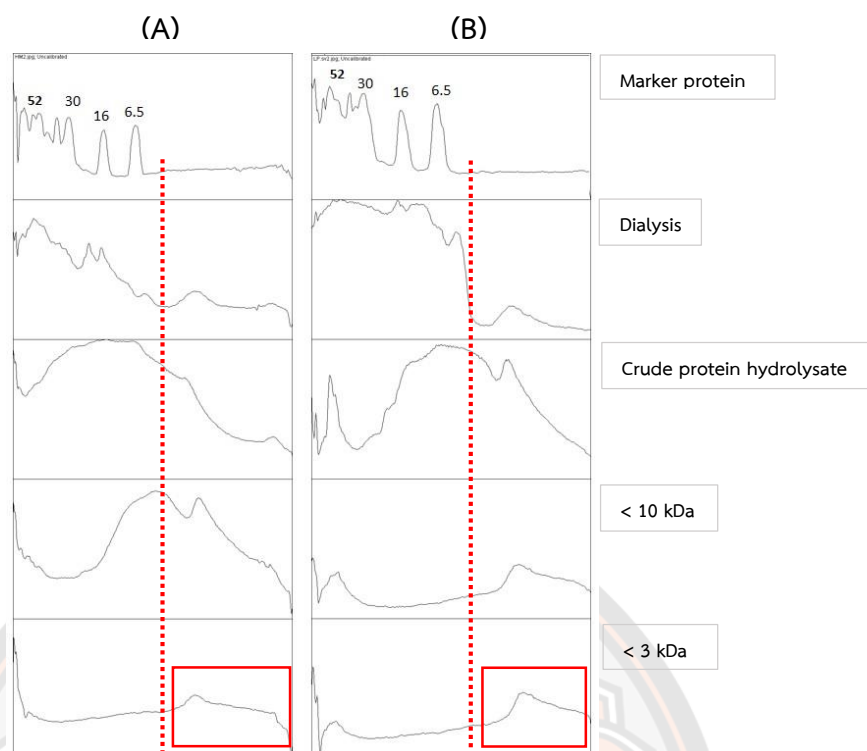
จากผลการทดลองเมื่อกำหนดให้แถว Dialysis คือ สารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย และแถว Cr-3 คือโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ผ่านการย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์และถูกทำให้มีขนาดเล็กกว่า 10 และ 3 kDa ตามลำดับ ผลชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อยจะมีขนาดโปรตีน 6.5-52 kDa และหลังจากผ่านการย่อยจะสังเกตเห็นถึงการหายไปของโปรตีนขนาดใหญ่ ให้เหลือเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กลง อีกทั้งโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ถูกทำให้มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa สามารถพบได้ในช่วงที่ต่ำกว่า 6.5 kDa เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานหรือ Marker จากแถวที่ 1

2. ตัวอย่าง: เห็ดหอมสด



ภาพ 59 รูปแบบการแสดงออกของสารสกัดเห็ดหอมสดเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วย (A) มิกัลเอนไซม์ (Fhm) และ (B) เอนไซม์เปปซิน (FHp) ด้วยวิธี Tricine (15%SDS-PAGE)

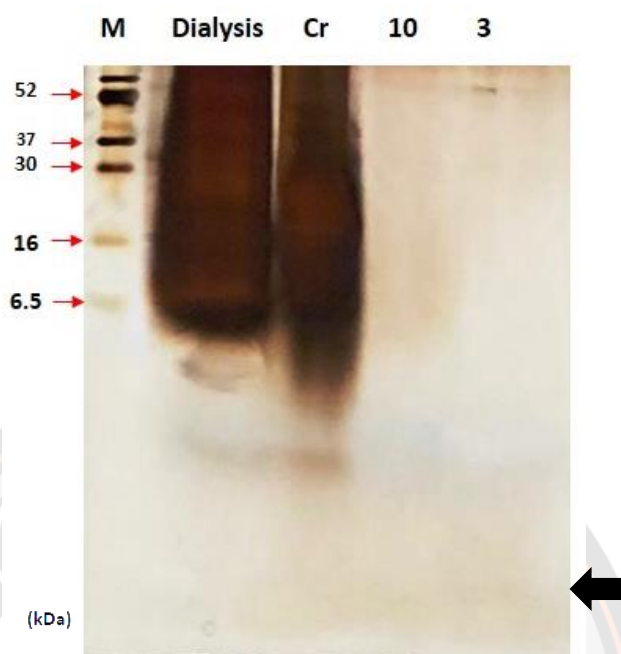
เมื่อ	แถว M	:	โปรตีนมาตรฐาน
	แถว Dialysis	:	โปรตีนหลัง Dialysis (สารสกัดเห็ดหอม)
	แถว Cr	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท Fhm และ FHp
	แถว 10	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท Fhm และ FHp ขนาด <10 kDa
	แถว 3	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท Fhm และ FHp ขนาด <3 kDa



ภาพ 60 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ Software analyzed จากเห็ดหอมสดเมื่อย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (A) และเอนไซม์เปปซิน (B)

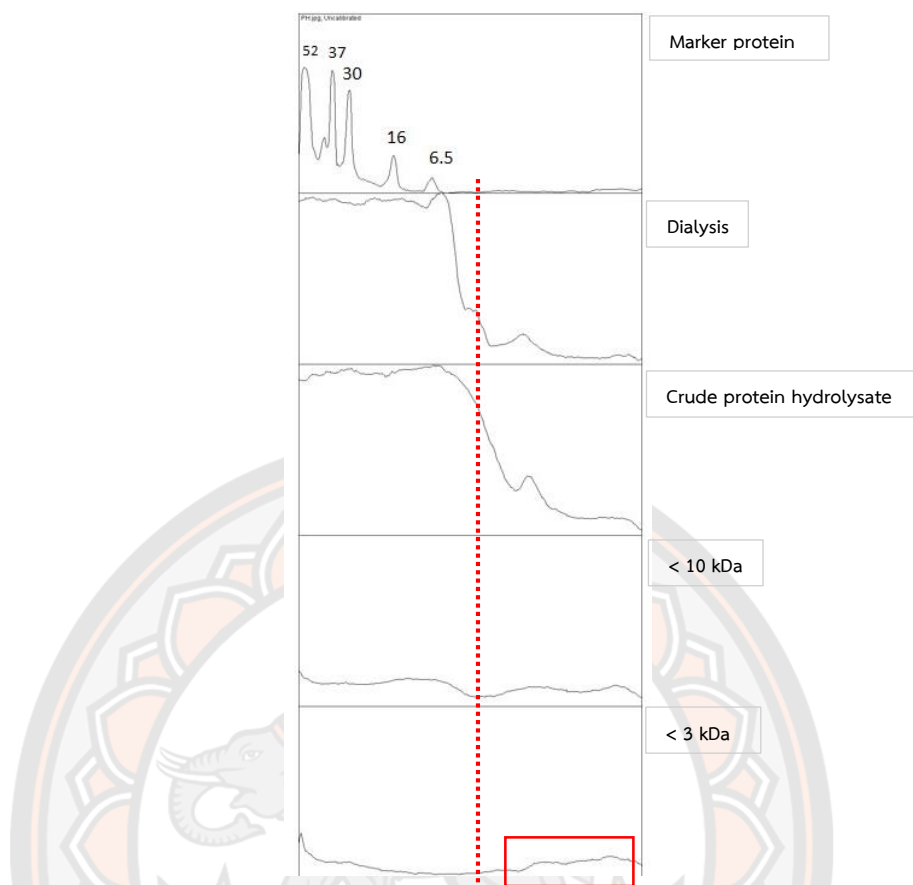
จากผลการทดลองเมื่อกำหนดให้แถว Dialysis คือ สารสกัดที่ยาที่ไม่ผ่านการย่อย และแถว Cr-3 คือโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมสดที่ผ่านการย่อยและถูกทำให้มีขนาดเล็กกว่า 10 และ 3 kDa เมื่อย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (A) และเอนไซม์เปปซิน (B) ตามลำดับ ผลชี้ให้เห็นว่าสารสกัดที่ยาที่ไม่ผ่านการย่อยจะมีขนาดโปรตีน 6.5-52 kDa และหลังจากผ่านการย่อยจะสังเกตเห็นถึงการหายไปของโปรตีนขนาดใหญ่ ให้เหลือเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กลง อีกทั้งโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ถูกทำให้มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa สามารถพบได้ในช่วงที่ต่ำกว่า 6.5 kDa เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานหรือ Marker จากแถวที่ 1

3. ตัวอย่าง: เห็ดเป่าฮื้อ



ภาพ 61 รูปแบบการแสดงออกของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) ด้วยวิธี Tricine (15% SDS-PAGE)

เมื่อ	แถว M	:	โปรตีนมาตรฐาน
	แถว Dialysis	:	โปรตีนหลัง Dialysis (สารสกัดเห็ด)
	แถว Cr	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท FHp
	แถว 10	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท FHp ขนาด <10 kDa
	แถว 3	:	โปรตีนไฮโดรไลเสท FHp ขนาด <3 kDa



ภาพ 62 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ Software analyzed

จากผลการทดลองเมื่อกำหนดให้แถว Dialysis คือ สารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย และแถว Cr-3 คือโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าฮื้อสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและถูกทำให้มีขนาดเล็กกว่า 10 และ 3 kDa ตามลำดับ ผลชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อยจะมีขนาดโปรตีน 6.5-52 kDa และหลังจากผ่านการย่อยจะพบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 6.5 kDa และแถว 10-3 kDa พบการหายไปของโปรตีนขนาดใหญ่ ให้เหลือเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กลง ทั้งนี้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ถูกทำให้มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa สามารถพบได้ในช่วงที่ต่ำกว่า 6.5 kDa เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานหรือ Marker จากแถวที่ 1

4.7 การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์โดยเทคนิค Mass spectrum

โดยผู้วิจัยเลือกโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีขนาดต่ำกว่า 6.5 kDa (จากผลการทดลอง 4.6) โดยเลือกตัดแถบโปรตีนที่ต้องการออกจากเจลขนาด 1-2 มิลลิเมตร นำไปส่งตรวจวิเคราะห์ โดยนำไปทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย Ziptip แล้ววัดความเข้มข้นของเปปไทด์ด้วยเทคนิคของ Lowry (1951) โดย

ใช้โปรตีน BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นนำเปปไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography – Mass Spectrometer (LC-MS) แล้วหามวลโมเลกุลและกรดอะมิโนภายในสายลำดับเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Maxquant version 2.1.3.0 (Tyanova et al., 2015) โดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot ของ *Pleurotus* และ *Lentinus*

จากนั้นทุกลำดับที่ได้ภายหลังจากการวิเคราะห์ นำมาหาค่า Free-radical scavenging (FRS) จากฐานข้อมูล AnOxPePred เพื่อทำนายคุณสมบัติของเปปไทด์ต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (แสดงดังตาราง 12-15)

จากผลวิเคราะห์ ผู้วิจัยได้คัดเลือกลำดับเปปไทด์เหลือเพียง 5 สาย เพื่อนำมาศึกษาต่อ (แสดงดังตาราง 16) โดยกำหนดให้เป็นเปปไทด์ลำดับที่ 1-2 จากตัวอย่าง FpP, เปปไทด์ลำดับที่ 3 จากตัวอย่าง FHp, เปปไทด์ลำดับที่ 4 จากตัวอย่าง FHm และเปปไทด์ลำดับที่ 5 จากตัวอย่าง DHm ตามลำดับ



ตารางที่ 12 ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot และค่า Free-radical scavenging (FRS) ของเห็ดที่เป่าซื้อสดที่ปล่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPP)

Leading razor protein	Protein names	Sequence	Length	Mass	Score	Entry Name	Gene Names	Organism	Gene Ontology (molecular function)	FRS
A0A2K9YND2	"Laccase, EC 1.10.3.2"	PATVSI PGV	9	839.47527	99.919	A0A2K9YND2_PLEOS		<i>Pleurotus ostreatus</i> (Oyster mushroom) (White-rot fungus)	copper ion binding hydroquinone: oxygen oxidoreductase activity	0.3470
A0A8H7A2N5	Subtilisin-like serine protease	VASISL PGV	9	841.49092	86.086	A0A8H7A2N5_PLEOS	SUB6_2 PC9H_004343	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Oyster mushroom) (White-rot fungus)	serine-type endopeptidase activity	0.3581
A0A067NR31	Uncharacterized protein	LSSPRHTTF	9	1044.5352	67.032	A0A067NR31_PLEOS	PLEOSDRAFT_11 01521	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15		0.4345
A0A067N692	t-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein	LLIILLLLLIII	12	1375.0193	62.823	A0A067N692_PLEOS	PLEOSDRAFT_52 938	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15		0.3253
A0A8H6ZQR6	MFS domain-containing protein	VPSPAALATTN	11	1040.5502	57.59	A0A8H6ZQR6_PLEOS	PC9H_010025	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Oyster mushroom) (White-rot fungus)	transmembrane transporter activity	0.3235

A0A8H6ZNN6	Uncharacterized protein	ISSPFLGLDP	10	1044.5492	57.281	A0A8H6ZNN6_PLEOS	PC9H_011501	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Oyster mushroom) (White-rot fungus)	positive regulation of ubiquitin protein ligase activity; anaphase-promoting complex binding ubiquitin-protein transferase activator activity	0.3843
A0A067NEA4	Uncharacterized protein	LSSPNVQSTL	10	1044.5451	55.531	A0A067NEA4_PLEOS	PLEOSDRAFT_17_4919	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15		0.2695
A0A067P2U7	Uncharacterized protein	LLLIGNQS	8	856.50182	51.787	A0A067P2U7_PLEOS	PLEOSDRAFT_10_33289	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15	hydrolase activity	0.3717
A0A8H6ZM87	Uncharacterized protein	ISSPKVTQAD	10	1044.5451	50.607	A0A8H6ZM87_PLEOS	PC9H_011650	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Oyster mushroom) (White-rot fungus)	potassium ion transport	0.2478
A0A8H7DXC4	Uncharacterized protein	PTAVSTIAQGT	11	1044.5451	48.794	A0A8H7DXC4_PLEOS	PC9H_000992	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Oyster mushroom) (White-rot fungus)		0.2908
A0A1S6Q8L9	Non-ribosomal peptide synthetase	LASSLHLK	8	867.5178	44.611	A0A1S6Q8L9_9HYPO		<i>Trichoderma aggressivum</i> f. europaeum	biosynthetic process; methylation	0.4122
A0A067N6F1	Uncharacterized protein	LTTLEEGESVG	10	1032.4975	44.447	A0A067N6F1_PLEOS	PLEOSDRAFT_16_3449	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15		0.3772
A0A067NWW8	Vps8 domain-containing protein	LLIVKILL	8	923.67833	43.066	A0A067NWW8_PLEOS	PLEOSDRAFT_10_93504	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15	protein targeting to vacuole	0.3059

A0A067NW1	Uncharacterized protein	WVLLKDP	8	869.52222	40.103	A0A067NW1	PLEOSDRAFT_10	0.3382
A0A8H6ZY20	FAD_binding_3 domain-containing protein	GEVGAGVGLGP NAV	14	1195.6197	33.961	A0A8H6ZY20	PC9H_003256	0.4708
						_PLEOS	77171	
						_PLEOS		FAD binding; oxidoreductase activity



ตารางที่ 13 ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot และค่า Free-radical scavenging (FRS) ของที่หอดมสคที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp)

Leading razor protein	Protein names	Sequence	Length	Mass	Score	Entry Name	Gene Names	Organism	Gene Ontology (molecular function)	FRS
A0A5C2TNP0	"DNA polymerase, EC 2.7.7.7"	TVSPASKENI	10	1044.5451	73.248	A0A5C2TNP0_9APHY	L226DRAFT_37	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7	DNA replication nucleus "4 iron, 4 sulfur cluster binding; DNA binding	0.2925
A0A1Q3ET93	Other 1 protein kinase	LSPAMRRQ	9	1044.5498	65.038	A0A1Q3ET93_LENED	LENED_012567	<i>Lentiniula edodes</i>	protein phosphorylation ATP binding; protein kinase activity	0.3749
A0A1Q3E365	Uncharacterized protein	SVTPATIPPY	10	1044.5492	60.788	A0A1Q3E365_LENED	LENED_003280	<i>Lentiniula edodes</i>		0.4042
A0A5C2TX04	Uncharacterized protein	LSSPLITSNN	10	1044.5451	58.815	A0A5C2TX04_9APHY	L226DRAFT_11	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7		0.2594
A0A5C2SXE0	Uncharacterized protein	LSSTTFPRH	9	1044.5352	43.246	A0A5C2SXE0_9APHY	L226DRAFT_34	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7		0.3689
A0A1Q3ER77	Mrna export receptor mex67	LSLQNDLK	9	1044.5451	42.109	A0A1Q3ER77_LENED	LENED_011890	<i>Lentiniula edodes</i>	mRNA transport	0.3165
A0A5C2TFQ4	Uncharacterized protein	LSPSALSEKG G	11	1044.5451	38.55	A0A5C2TFQ4_9APHY	L226DRAFT_57	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7		0.2749
A0A5C2SST7	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase protein	VLSMMAVGS SDSA	13	1253.5632	35.944	A0A5C2SST7_9APHY	L227DRAFT_61	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-6	hydrolase activity	0.3367

A0A1Q3DZC1	Pali-domain-containing protein	ILLLLAGCT	9	915.54633	35.105	A0A1Q3DZC1	LENED_001881	<i>Lentinula edodes</i>	plasma membrane	0.3544
A0A5C2U544	Pex19-domain-containing protein	DVLEQFNVP	9	1059.5237	28.174	A0A5C2U544	L226DRAFT_25	<i>Lentinus tigrinus</i>	peroxisome	0.4234
A0A5C2TL18	MFS general substrate transporter	TLLDWQVW	8	1059.5389	26.602	A0A5C2TL18	L226DRAFT_57	<i>Lentinus tigrinus</i>	Transmembrane; transporter activity	0.4433
A0A5C2TN54	Uncharacterized protein	IVDGAGRMGG L	11	1044.5386	26.384	A0A5C2TN54	L226DRAFT_55	<i>Lentinus tigrinus</i>		0.3880
A0A5C2U2T4	DUF55-domain-containing protein	RAKHFVPL	8	966.57632	26.341	A0A5C2U2T4	L226DRAFT_47	<i>Lentinus tigrinus</i>		0.4205
A0A1Q3EJ9	Uncharacterized protein	LGERTLDEI	9	1044.5451	24.923	A0A1Q3EJ9	LENED_009273	<i>Lentinula edodes</i>		0.3402
A0A1Q3DX82	Glutathione s-transferase	KLKPLIIP	8	920.64227	22.622	A0A1Q3DX82	LENED_001003	<i>Lentinula edodes</i>	glutathione metabolic process; transferase activity	0.3238

ตารางที่ 14 ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot และค่า Free-radical scavenging (FRS) ของที่หอมสดที่ย่อยด้วยมิกเอนไซม์ (FHM)

Leading razor protein	Protein names	Sequence	Length	Mass	Score	Entry Name	Gene Names	Organism	Gene Ontology (molecular function)	FRS
A0A5C2SE75	Uncharacterized protein	LLLLLLLLLLL	11	1261.9353	102.98	A0A5C2SE75_9APHY	L227DRAFT_535_95	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-6		0.3733
A0A1Q3E793	Other 1 protein kinase	LSSPAMRRQ	9	1044.5498	69.998	A0A1Q3E793_LENED	LENED_012567	<i>Lentinula edodes</i>	protein phosphorylation; ATP binding; protein kinase activity	0.3749
A0A5C2TNP0	"DNA polymerase, EC 2.7.7.7"	TVSPASKENI	10	1044.5451	62.546	A0A5C2TNP0_9APHY	L226DRAFT_377_524	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7	DNA replication nucleus "4 iron, 4 sulfur cluster binding; DNA binding; DNA-directed DNA polymerase activity; metal ion binding; nucleotide binding"	0.2925
A0A1Q3E365	Uncharacterized protein	SVTPATIPPY	10	1044.5492	60.788	A0A1Q3E365_LENED	LENED_003280	<i>Lentinula edodes</i>		0.4042
A0A5C2TU99	Uncharacterized protein	LLLLLLLP	8	906.65178	51.809	A0A5C2TU99_9APHY	L226DRAFT_301_883	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7		0.3840

A0A1Q3DWX6	Cell cycle arrest in response to pheromone-related protein	PIKKLLLLL	9	1049.7576	17.986	A0A1Q3DWX6_LENED	LENED_000882	<i>Lentinula edodes</i>	0.2941
A0A5C2T2B9	Glycoside hydrolase	KQGSTLKK	8	888.53927	16.964	A0A5C2T2B9_9APHY	L226DRAFT_494_782	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2S51-7	0.3160 carbohydrate derivative catabolic process; lipid catabolic process"hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
A0A1Q3EST8	"Alpha-1,3-glucan synthase, EC 2.4.1.183"	ARILANPG	8	810.47119	12.988	A0A1Q3EST8_LENED	LENED_012553	<i>Lentinula edodes</i>	0.3612 carbohydrate metabolic process"alpha-1,3-glucan synthase activity; NAD+ kinase activity
A0A5C2TMX0	G-protein alpha subunit	RPVKVLLL	8	936.64842	11.368	A0A5C2TMX0_9APHY	L226DRAFT_459_341	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2S51-7	0.3057 G protein-coupled receptor signaling pathway
A0A5C2T0V2	"(4-O-methyl)-D-glucuronate--lignin esterase, EC 3.1.1.117"	GGGLVLAFL	8	732.41703	9.7496	A0A5C2T0V2_9APHY	L226DRAFT_470_233	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2S51-7	0.3771

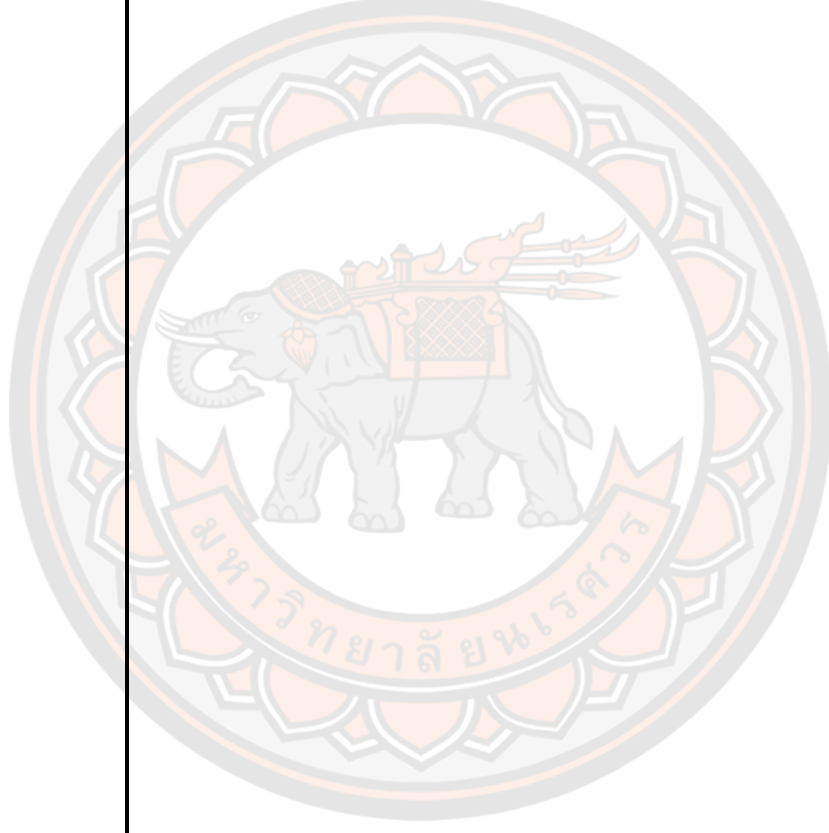
A0A5C2TZJ0	Uncharacterized protein	VPKRRKLPP	9	1061.7073	7.94	A0A5C2TZJ0_9APHY	L226DRAFT_530_467	<i>Lentinus tigrinus</i>	ALCF2SS1-7	0.3225
A0A5C2TG90	"(4-O-methyl)-D-glucuronate--lignin esterase, EC 3.1.1.117"	KLAGPGAAG	9	740.41809	7.7117	A0A5C2TG90_9APHY	L226DRAFT_546_256	<i>Lentinus tigrinus</i>	ALCF2SS1-7	0.3853
A0A5C2TAI9	Uncharacterized protein	AMALRLNA	9	986.56952	6.8241	A0A5C2TAI9_9APHY	L226DRAFT_614_254	<i>Lentinus tigrinus</i>	ALCF2SS1-7	0.3074
A0A5C2TIH2	HMG box domain-containing protein	GKLLGAKW	8	871.52797	4.3163	A0A5C2TIH2_9APHY	L226DRAFT_533_002	<i>Lentinus tigrinus</i>	ALCF2SS1-7	0.3849
A0A1Q3E5X2	Serine threonine protein kinase	LLKLLKIVGL	10	1172.7897	2.5133	A0A1Q3E5X2_LENED	LENED_004306	<i>Lentiniula edodes</i>	kinase activity phosphorylation	0.3630

ตารางที่ 15 ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot และค่า Free-radical scavenging (FRS) ของเห็ดหอมแห้งที่ขยอตัวมิกส์เอโนไซม์ (DHm)

Leading razor protein	Protein names	Sequence	Length	Mass	Score	Entry Name	Gene Names	Organism	Gene Ontology (molecular function)	FRS
A0A1Q3E193	Other 1 protein kinase	LSSPAMRRQ	9	1044.5498	66.682	A0A1Q3E193 _LENEDED	LENED_012567	<i>Lentinula edodes</i>	protein phosphorylation; ATP binding; protein kinase activity	0.3749
A0A1Q3E365	Uncharacterized protein	SVTPATIPPY	10	1044.5492	60.788	A0A1Q3E365 _LENEDED	LENED_003280	<i>Lentinula edodes</i>		0.4042
A0A5C2T7M3	F-box domain-containing protein	LSSPTVPLEC	10	1044.5161	44.447	A0A5C2T7M3 _9APHY	L226DRAFT_142 393	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7	A0A5C2T7M3	0.3666
A0A1Q3E848	ERAD-associated E3 ubiquitin-protein ligase doa10	IAWWISNR	8	1044.5505	35.88	A0A1Q3E848 _LENEDED	LENED_004943	<i>Lentinula edodes</i>	zinc ion binding	0.3967
A0A5C2RNW4	"Fructose-bisphosphate aldolase, FBP aldolase, EC 4.1.2.13"	ADEAYFKEH	9	1108.4825	31.934	A0A5C2RNW 4_9APHY	L227DRAFT_581 739	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-6	glycolytic process; fructose-bisphosphate aldolase activity; zinc ion binding	0.4714
A0A1Q3DWX6	Cell cycle arrest in response to pheromone-related protein	PIKKLLLLL	9	1049.7576	13.579	A0A1Q3DWX 6_LENEDED	LENED_000882	<i>Lentinula edodes</i>		0.2941

A0A5C2U194	Uncharacterized protein	ILILILKLP	9	1034.7467	12.988	A0A5C2U194_9APHY	L226DRAFT_528	<i>Lentinus tigrinus</i>	0.3110
A0A1Q3E094	Uncharacterized protein	KTKKKKKK	8	1015.723	4.5738	A0A1Q3E094_LENED	LENED_002216	<i>Lentinus tigrinus</i>	0.2215
A0A5C2STE3	Uncharacterized protein	RYRKKELELL HKVLK	15	1952.2047	4.2426	A0A5C2STE3_9APHY	L227DRAFT_649	<i>Lentinus tigrinus</i>	0.3289
A0A1Q3ELL9	Transcription factor	LIGAGCGG	8	646.31085	3.6118	A0A1Q3ELL9_LENED	LENED_010144	<i>Lentinus edodes</i>	0.4443
A0A5C2TMX3	SAE2 domain-containing protein	HAADCECC	8	850.24079	3.6118	A0A5C2TMX3_9APHY	L226DRAFT_485	<i>Lentinus tigrinus</i>	0.3573
A0A5C2TSI2	Uncharacterized protein	TTHGRAVS	8	827.42496	3.6118	A0A5C2TSI2_9APHY	L226DRAFT_487	<i>Lentinus tigrinus</i>	0.4032
A0A1Q3EQ46	"Branched-chain-amino-acid aminotransferase, EC 2.6.1.42"	KLKILTPLLIR	11	1306.9064	3.2558	A0A1Q3EQ46_LENED	LENED_011477	<i>Lentinus edodes</i>	0.3504
A0A5C2SZW8	General substrate transporter	GVGGGWS	8	630.33369	2.9837	A0A5C2SZW8_9APHY	L226DRAFT_576	<i>Lentinus tigrinus</i>	0.4301
A0A5C2SW22	Uncharacterized protein	GLLALVKH	8	849.54362	2.1964	A0A5C2SW22_9APHY	L226DRAFT_346	<i>Lentinus tigrinus</i>	0.3682

A0A5C2T306	Glycoside	VGGLPGGG	8	612.32313	1.1281	A0A5C2T306	L226DRAFT_574	<i>Lentinus tigrinus</i>	hydrolase activity,	0.5230
	hydrolase family					_9APHY	939	ALCF2SS1-7	hydrolyzing O-glycosyl	
	16 protein								compounds;	
									carbohydrate metabolic	
									process	



เปปไทด์ทุกสาย เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อหาลำดับ sequence ผู้วิจัยจึงมีความสนใจแยกเปปไทด์เหล่านี้มาศึกษาต่อ (แสดงดังตาราง 16) โดยกำหนดให้เป็นเปปไทด์ลำดับที่ 1-2 จากตัวอย่าง FPp, เปปไทด์ลำดับที่ 3 จากตัวอย่าง FHp, เปปไทด์ลำดับที่ 4 จากตัวอย่าง FHm และเปปไทด์ลำดับที่ 5 จากตัวอย่าง DHm ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ลำดับเปปไทด์ที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอส

ตัวอย่าง	หมายเลข	Leading razor	ชื่อโปรตีน (หน้าที่)	ลำดับกรดอะมิโน	ขนาด (Da)
FPp	1	A0A2K9YND2	Laccase, EC 1.10.3.2	PATVSIPGV	839.4753
	2	A0A067N6F1	Uncharacterized protein	LTLEEGESVG	1032.4875
FHp	3	A0A1Q3EJJ9	Uncharacterized protein	LGERTLDEI	1044.5451
FHm	4	A0A1Q3E365	Uncharacterized protein	SVTPATIPPY	1044.5492
DHm	5	A0A5C2T306	Glycoside hydrolase family 16 protein	VGGLPGGG	612.3231

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าเปปไทด์ลำดับที่ 1 PATVSIPGV (Pro-Ala-Thr-Val-Ser-Ile-Pro-Gly-Val) จากตัวอย่าง FPp มี score ความเหมือน 88.734 เทียบกับ *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom) (White-rot fungus) ชื่อโปรตีน Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) ซึ่งมีหน้าที่การจับกับไอออนทองแดงและ hydroquinone: oxygen oxidoreductase activity โดยทองแดงเหล่านี้เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นต่างๆ ด้วยการลดโมเลกุลออกซิเจนไปเป็นน้ำ

เปปไทด์ลำดับที่ 4 SVTPATIPPY (Ser-Val-Thr-Pro-Ala-Thr-Ile-Pro-Pro-Tyr) จากตัวอย่าง FHm เป็น Uncharacterized protein หรือยังไม่มีรายงานระบุอย่างชัดเจน และเปปไทด์ลำดับที่ 5 VGGLPGGG (Val-Gly-Gly-Leu-Pro-Gly-Gly-Gly) จากตัวอย่าง DHm มี score ความเหมือนเพียง 1.1281 เทียบกับ *Lentinus tigrinus* ALCF2SS1-7 มีชื่อโปรตีน Glycoside hydrolase family 16 protein (GH16) เป็นสมาชิกของกลุ่ม 16 ตัว ตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ประกอบด้วยตระกูลไกลโคซิเดสและทรานส์ไกลโคซิเดส ที่มีขนาดใหญ่และมีความหลากหลายทางอนุกรมวิธาน เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายหรือการเปลี่ยนแปลงของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผนังเซลล์ในมวลชีวภาพในทะเลและบนบก ส่วนใหญ่กระจายอยู่ทั่วไปตามโดเมนของสิ่งมีชีวิต รวมถึงแบคทีเรีย เชื้อรา พืช และสัตว์ (แมลงบนบกและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล) (Viborg, A. H et al., 2019) ซึ่งเปปไทด์ทั้งสองสายผู้วิจัยพบว่าจากลำดับเปปไทด์มีค่า Free-radical scavenging (FRS) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับลำดับอื่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.4042 และ 0.5230 ตามลำดับ จึงมีความน่าสนใจต่อการศึกษารูปร่างด้านอนุมูลอิสระ

เปปไทด์ ลำดับที่ 2 LTLEEGESVG (Leu-Thr-Leu-Glu-Glu-Gly-Glu-Ser-Val-Gly) และ เปปไทด์ ลำดับที่ 3 LGERTLDEI (Lue-Gly-Glu-Arg-Thr-Leu-Asp-Glu-Ile) เป็น Uncharacterized protein หรือยังไม่มีรายงานระบุอย่างชัดเจน แต่ผู้วิจัยพบว่าจากลำดับเปปไทด์ ประกอบไปด้วยกรดกลูตามิก (Glu) ภายในสาย ซึ่งจากผลการวิเคราะห์มีความสอดคล้องกับงานวิจัย ในปี 2022 ที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจาก แมงกะพรุน (*Lobonema smithii*) โดยเขาพบว่ากรดอะมิโนของ JFFH ที่ประกอบด้วย Gly, Ala, Glx (Gln + Glu), Alx (Asn + Asp) และ Pro เป็นกรดอะมิโนที่มีมากที่สุด ใน JFFH ซึ่งคิดเป็น ประมาณ 18, 14, 13, 9 และ 9% ขององค์ประกอบกรดอะมิโนทั้งหมดตามลำดับ โดยเฉพาะกรดอะมิโน Asn + Asp และ Gln + Glu พบมากถึง 5.00 และ 6.96 กรัมของกรดอะมิโน/100 กรัมของ ตัวอย่าง อีกทั้งกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น Ala, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Phe, Trp, Leu และ Pro ประกอบด้วย 43% ของ JFFH ซึ่งมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจากผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารต้านอนุมูลอิสระของ JFFH อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณ กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ทั้งนี้ยังพบว่ากรดอะมิโน Ser ที่พบในเปปไทด์ลำดับที่ 1, 2 และ 4 อาจเกี่ยวข้องกับกลุ่มไทออลในการกำจัดไอออนทองแดงซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไทโรซิเนสได้เช่นกัน (Upata, M et al., 2022)

จากงานวิจัยปีค.ศ. 2009 การศึกษากรดอะมิโนและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus sajor-caju* เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนพบว่า เห็ดทั้งสองชนิดมีปริมาณกรด กลูตามิกสูงที่สุด (Glu) และรองมาคือกรดแอสปาร์ติก (Asp) และอาร์จินีน (Arg) ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้อาจบอกถึงความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Chirinang, P., & Intarapichet, K 2009)

จากงานวิจัยปีค.ศ. 2020 เปปไทด์ที่ได้จากเห็ดที่กินได้: *Hericium erinaceus* ต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและกระตุ้นการตายของเซลล์ในเซลล์มะเร็งปอดในมนุษย์ ยังให้ผลพบว่าในบรรดากรดอะมิโนใน *H. erinaceus* พบกลูตามิก (Glu) เป็นที่แพร่หลายมากที่สุด รองลงมาคือไลซีน (Lys) และแอสปาร์ติก (Asp) ซึ่งบอกถึงความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และยังพบกรดอะมิโนบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Phe, Tyr, Cys และ Met สามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ได้ค่อนข้างเฉพาะ ทั้งนี้อะโรมาติกอะมิโนแอซิดที่มี หมู่มาก เช่น Trp ของกลุ่มอินโดลิก หรือ His ของกลุ่มอิมิดาโซล สามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ผ่านการให้ไฮโดรเจนให้กับอนุมูลที่ขาดอิเล็กตรอน นอกจากนี้กลุ่ม -SH ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระได้ (Sangtitanu, T et al., 2020)

อย่างไรก็ตามเปปไทด์ลำดับที่ 4 SVTPATIPPY ผู้วิจัยพบว่าภายในลำดับเปปไทด์ประกอบไปด้วยโพร ลีน (P) เซอรีน (S) และไทโรซีน (Y) สอดคล้องกับลำดับเปปไทด์ LQPSHY จากงานวิจัยในปี ค.ศ. 2016 ซึ่งพบภายในสายเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบ Ser หรือ Pro หรือ Tyr ที่สอดคล้องกับเปปไทด์ในลำดับที่ 1, 2 และ 5 เช่นเดียวกัน ผลจากงานวิจัยนี้ได้มีการสกัดเปปไทด์จากรำข้าว ได้แก่ชนิด CT1 CT2 CT3 มาใช้ในการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเทียบกับการทำงานของ arbutin จากผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ชนิด CT2 (Leu-Gln-Pro-Ser-His-Tyr) มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด (Ochiai, A et al., 2016) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยปีค.ศ. 2019 รายงานการยับยั้งไทโรซิเนสและกลไกของ Leucrociclin I และเปปไทด์ดัดแปลงใหม่สองชนิด คือ Tyrosinase Inhibitor Leucrociclin I (TILI); TILI-1 (NGVQPKC) และ TILI-2 (CNGVQPK) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและกลไกของเปปไทด์เปรียบเทียบกับ Leucrociclin I (NGVQPKY) แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์เหล่านี้ประกอบด้วย Gly (G), Val (V), Pro (P) และ Tyr (Y) มีอยู่ภายในสาย ซึ่งสอดคล้องกับเปปไทด์ลำดับที่ 1-5 ที่พบภายในสายเช่นเดียวกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ากรดอะมิโนเหล่านี้ได้ในการส่งเสริมฤทธิ์การยับยั้งไทโรซิเนส และผลการวิจัยพบว่า TILI-2 สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงสุด ตามด้วย TILI-1 และ Leucrociclin I ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงในไทโรซินของ Leucrociclin I เป็นซิสเตอีนสามารถเพิ่มการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ และซิสเตอีนที่ปลาย N ของ TILI-2 แสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าซิสเตอีนที่ปลาย C ของ TILI-1 ดังนั้นตำแหน่งและโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนถือมีบทบาทในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Joompang, A et al., 2020)

อีกทั้งงานวิจัยปีค.ศ. 2020 ที่ศึกษาหน้าที่การดูแลผิวของเปปไทด์ที่ถูกเตรียมจากโปรตีนเมล็ดมะตูมจีน พบว่าเปปไทด์สาย RHAKF มี Ala (A) และ Arg (R) เป็นองค์ประกอบสอดคล้องกับเปปไทด์ลำดับที่ 1, 3, และ 4 ที่พบกรดอะมิโนภายในสายตามลำดับ และผลการทดลอง RHAKF มี chelating activity IC50 เท่ากับ 0.93 mg/mL จากผลการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์รายงานว่า Ala และ Phe เป็นกลุ่ม hydrophobic อยู่ได้ทั้ง N-terminal และ C-terminal มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ และยังให้ความสามารถในการจับกับข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ อีกทั้ง Lys, Arg และ His มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน เนื่องจากมีความสามารถในการบริจาคไฮโดรเจน และ Lys ยังมีฤทธิ์ในการจับโลหะได้ ยิ่งไปกว่านั้นวงแหวน imidazole ของ His ที่อยู่ในสายกำจัดอนุมูลอิสระและคีเลตด้วยโลหะได้ (Yejun Deng et al., 2020)

จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสทั้งหมด 5 ลำดับ ได้แก่ (1)PATVSIPGV, (2)LTLEEGESVG, (3)LGERTLDEI, (4)SVTPATIPPY, และ (5)VGGLPGGG คาดว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น กลูตามิก (E),

โพรลีน (P), ไกลซีน (G), ลิวซีน (L), ไทโรซีน (Y), วาลีน (V) และอะลานีน (A) เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่พบว่าสารสกัดที่ถูกลบด้วยเอนไซม์เปปซินประกอบด้วยกลูตามิก (E) ภายในสายจึงมีผลต่อการออกฤทธิ์ที่ดีที่สุด

ทั้งนี้กรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เมทไทโอนีน (M), ฮีสทิดีน (H), ซีสเทอีน (C), ไอโซลิวซีน (I), ฟีนิลอะลานีน (F), ทริปโตแฟน (W), อาร์จินีน (R), ไลซีน (K) อีกทั้งจากการรายงานของคุณ Mendis, Rajapaksea, Byunb, & Kima (2005) Ranathunga et al., (2005) และ Wattanasiritham L et al., (2016) กล่าวว่าเปปไทด์ที่ประกอบด้วยโพรลีน (P), ไกลซีน (G), อะลานีน (A), วาลีน (V) และลิวซีน (L) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แข็งแกร่งที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบกรดอะมิโนเหล่านี้อยู่ในภายในสาย และยังชี้ให้เห็นว่ากรดอะมิโนโพรลีน (P), ไกลซีน (G), ลิวซีน (L), ฟีนิลอะลานีน (F), วาลีน (V), อะลานีน (A), ไลซีน (K) เหล่านี้คาดว่ามีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านอนุมูลอิสระได้เป็นต้น

อย่างไรก็ตามผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่าต่ำกว่าวิธี ABTS เนื่องจากการทดลอง DPPH เป็น stable radical ทำปฏิกิริยาในตัวทำละลายเมทานอล ขณะที่ ABTS ทำปฏิกิริยาในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าด้วยสารละลายตัวกลางที่ต่างกัน ส่งผลต่อค่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระที่ได้ไม่เป็นไปตามกัน โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH อาจเกิดได้จากสารกลุ่ม hydrophobic ในขณะที่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS อาจเกิดได้จาก hydrophilic เป็นต้น

ตารางที่ 17 สรุปรดอะมิโนตามกลุ่มฤทธิ์ชีวภาพต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตัวอย่าง	ลำดับเปปไทด์	กรดอะมิโน	ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส	กรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ	กรดอะมิโนชอบน้ำ
Positive peptide	RHAKF	Arg-His-Ala-Lys-Phe	R,A,F	A,F	R,H,K
FPp	PATVSIPGV	Pro-Ala-Thr-Aal-Ser-lie-Pro-Gly-Val	P,A,T,V,S,P,V	P,A,V,I,P,G,V	T,S
	LTLEEGESVG	Leu-Thr-Leu-Glu-Glu-Gly-Glu-Ser-Val-Gly	L,T,L,E,E,E,S,V	L,L,G,V,G	T,E,E,E,S
FHp	LGERTLDEI	Lue-gly-glu-arg-thr-leu-asp-glu-iae	L,E,R,T,L,D,E	L,G,L,I	E,R,T,D,E

ตารางที่ 18 สรุปการแยกกรดอะมิโนออกตามกลุ่มฤทธิ์ชีวภาพต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

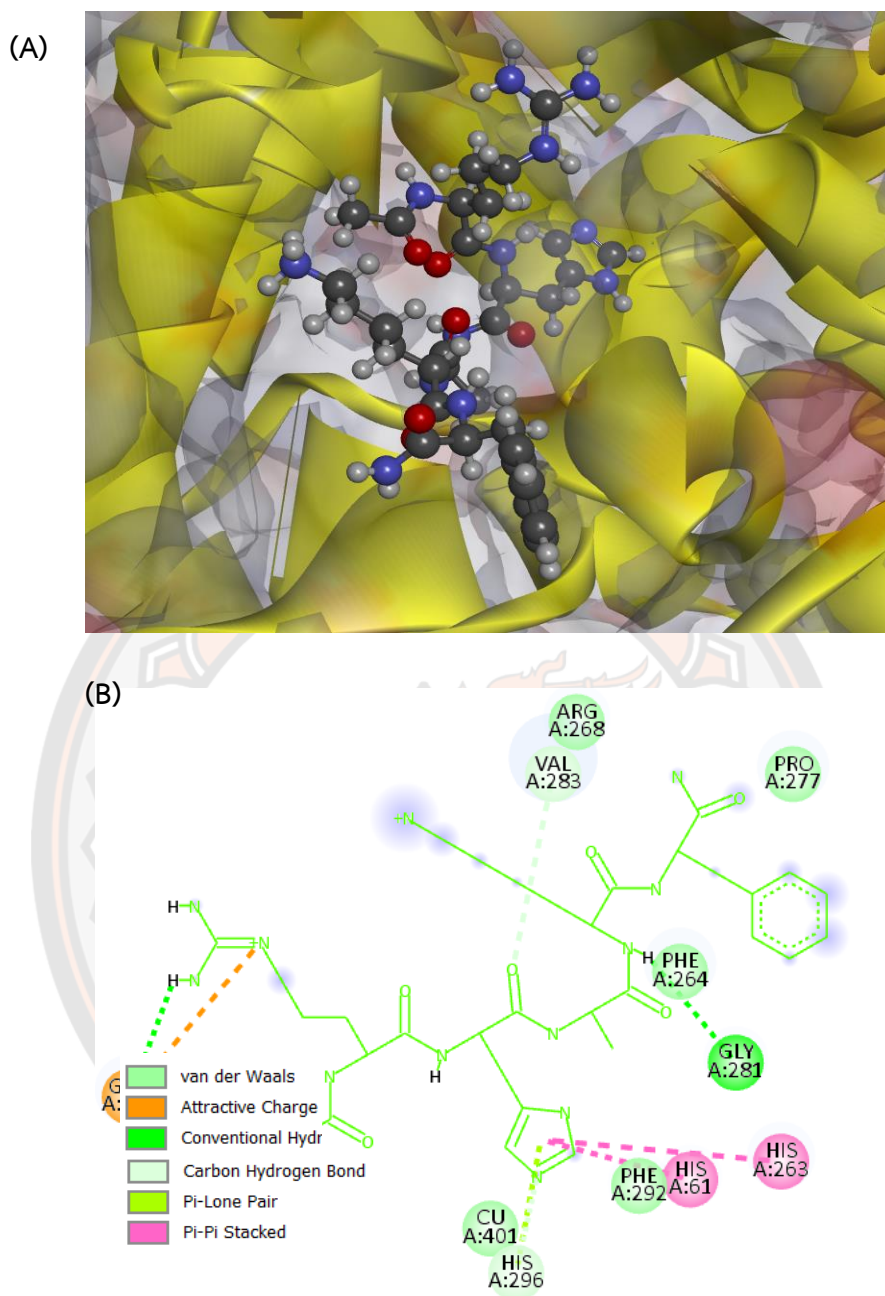
ตัวอย่าง	ลำดับเปปไทด์	กรดอะมิโน	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	กรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ	กรดอะมิโนชอบน้ำ	FRS
FHm	SVTPATIPPY	Ser-Val-Thr-Pro-Ala-Thr-Ile-Pro-Pro-Tyr	S,V,P,A,I,P,P,Y	V,P,A,I,P,P,Y	S,T,T	0.4042
DHm	VGGLPGGG	Val-Gly-Gly-Leu-Pro-Gly-Gly-Gly	V,G,G,L,P,G,G,G	V,G,G,L,P,G,G,G	-	0.5230

4.8 การศึกษาการจำลองการจับกัน 3 มิติด้วยโปรแกรม Molecular Dockings

ทำการศึกษาโครงสร้างอนุพันธ์และการจำลองการจับกันแบบ 3 มิติระดับโมเลกุล เพื่อแสดงการ interactions และอันตรกิริยาที่จับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสกับสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท(เปปไทด์) โดยเลือกลำดับเปปไทด์จากสารสกัดที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (PATVSIPGV, LTLEEGESVG และ LGERTLDEI) และเปปไทด์สังเคราะห์ (RHAKF) นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GOLD 2022.2.0

ลำดับเปปไทด์ RHAKF

การเทียบโครงสร้างของโมเลกุล หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) และลิแกนด์ RHAKF (RHAKF, RHA, HAK, AKF, RHAK และ HAKF) แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ RHAKF มีค่าเท่ากับ 75.24 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ tyrosinase มี interaction 5 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Attractive charge, Pi-lone pair และ Pi-Pi stacked ผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ RHAKF จับกับ GLU322, HIS29, VAL283 และ GLY281 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจนและจับกับ HIS61 และ HIS263 ด้วย Hydrophobic (Pi-Pi Stacked) (แสดงดังภาพ 63 และตาราง 19)



ภาพ 63 การศึกษา Molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

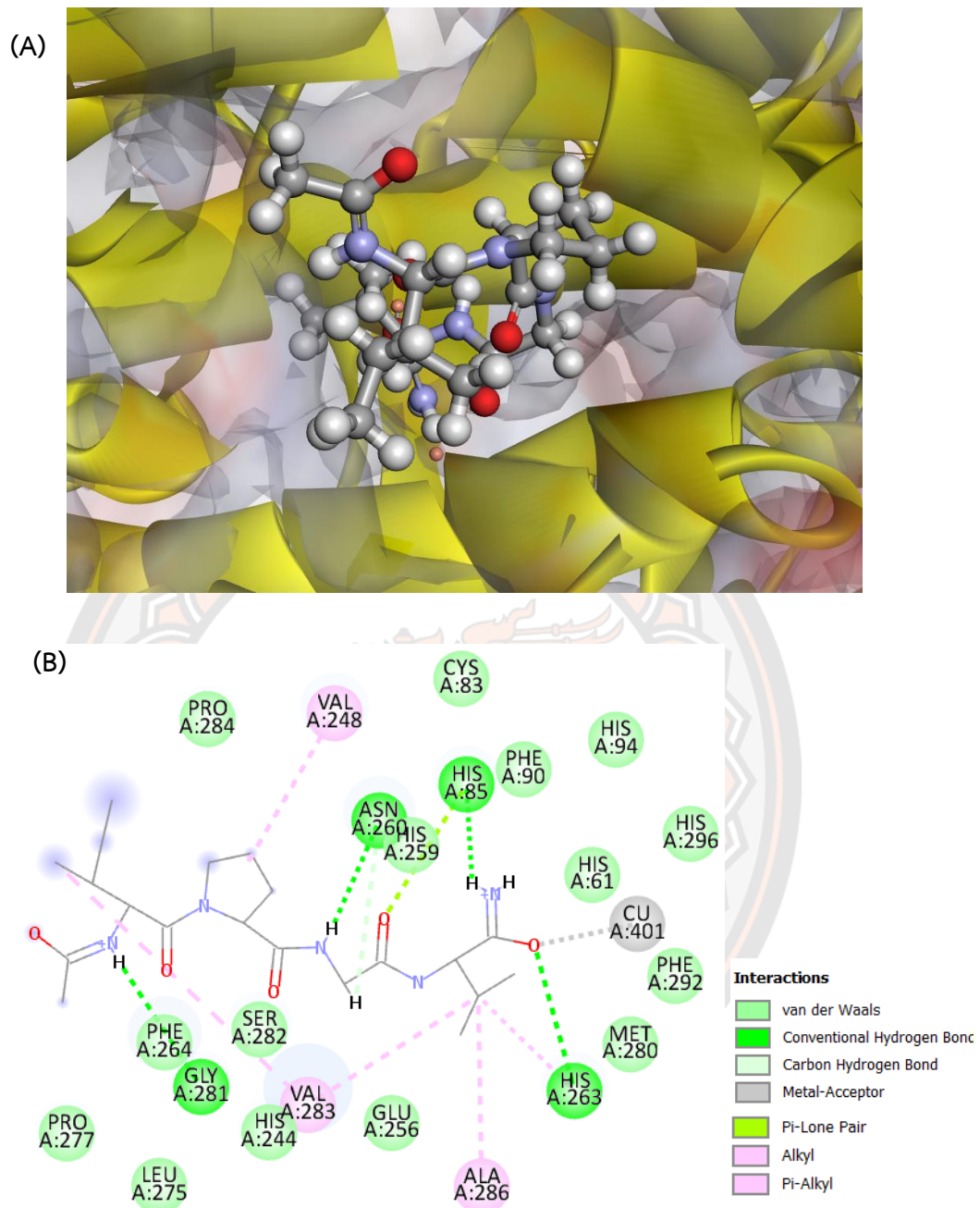
(A) ภาพ 3D ของการ interactions ระหว่าง RHAKF (B) แบบจำลองการจับกันแบบ 2D

ตารางที่ 19 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ RHAKF และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

ลำดับเปปไทด์	Peptide residues	RHAKF-tyrosinase	Interaction type/bond length
RHAKF	R	Arg:N14 -	Conventional Hydrogen Bond
		GLU322:OE1	Electrostatic/5.45
	H	Arg:H27 -	Hydrogen Bond/2.43
		GLU322:OE1	Hydrophobic (Pi-Pi Stacked)/4.15
	H	His2 - HIS61	Hydrophobic (Pi-Pi Stacked)/4.96
		His2 - HIS263	Hydrophobic (Pi-Pi Stacked)/4.96
		His:N40 - HIS296:HE1	Hydrogen Bond/2.26
		His:O34 - VAL283:HA	Hydrogen Bond/2.54
	A	-	-
	K	Lys:H67 - GLY281:O	Hydrogen Bond/1.94
F	-	-	

ลำดับเปปไทด์ PATVSIPGV

การเทียบโครงสร้างของโมเลกุล หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) และลิแกนด์ PATVSIPGV (PATVSIPGV, PAT, ATV, TVS, VSI, SIP, IPG, PGV, PATV, ATVS, TVSI, VSIP, SIPG และ IPGV) แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ IPGV มีเท่ากับ 59.92 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ tyrosinase มี interaction 7 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Conventional hydrogen bond, Pi-lone pair, Pi-Alkyl, Alkyl และ Metal-acceptor จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ IPGV จับกับ ARG268, GLY281, ASN260, HIS263, HIS85 และ ASN260 ด้วยปฏิสัมพันธ์พันธะไฮโดรเจนและจับกับ HIS263 ด้วย Hydrophobic (Pi-Alky) (แสดงดังภาพ 64 และตาราง 20)



ภาพ 64 การศึกษา Molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

(A) ภาพ 3D ของการ interactions ระหว่าง IPGV (B) แบบจำลองการจับกันแบบ 2D

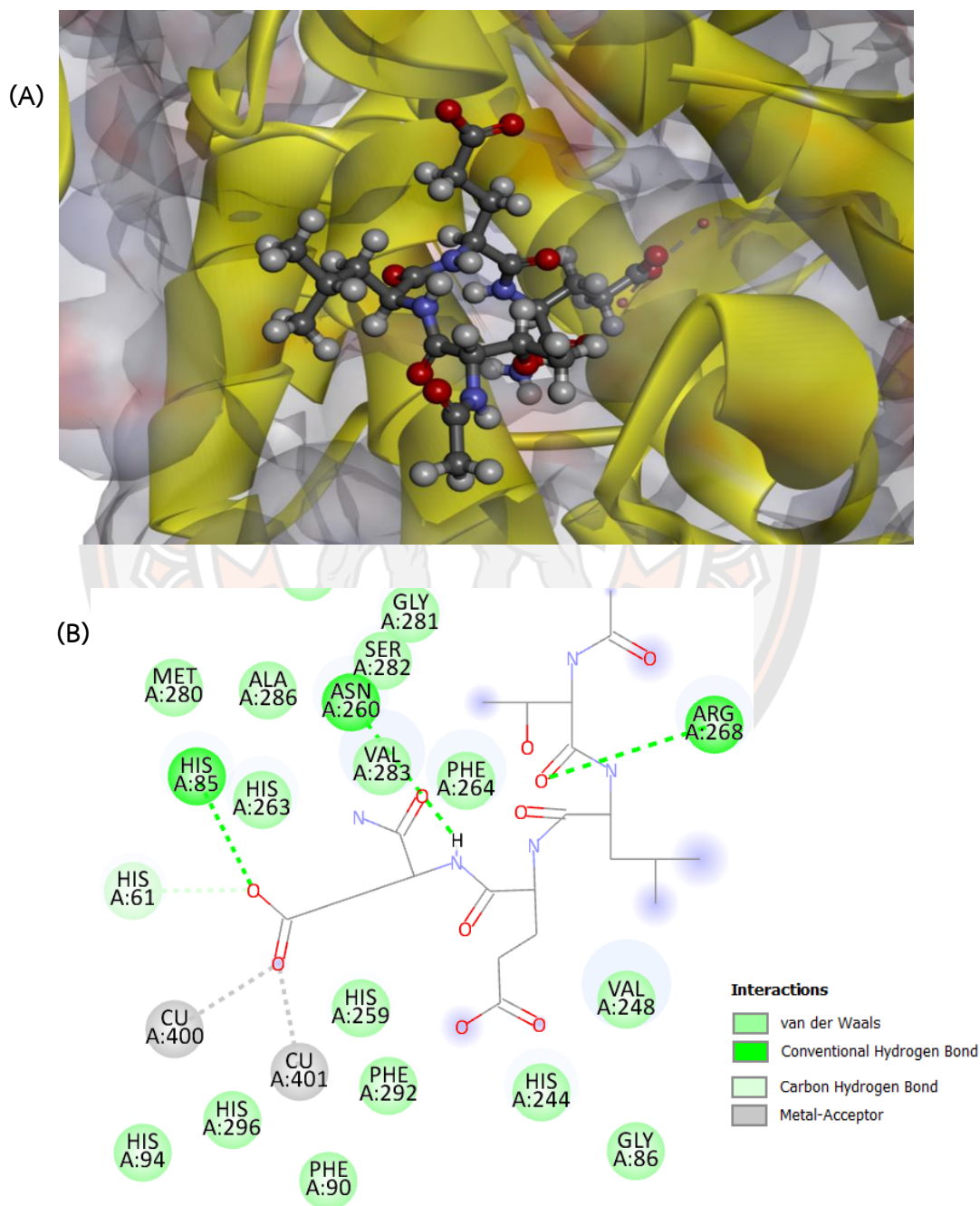
ตารางที่ 20 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ IPGV และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

ลำดับเปปไทด์	Peptide residues	IPGV-tyrosinase	Interaction type/bond length
IPGV		Ile:O2 - ARG268:HH11	Conventional Hydrogen Bond/2.67
		Ile:O2 - ARG268:HH12	Conventional Hydrogen Bond/2.73
	I	Ile:H25 - GLY281:O	Conventional Hydrogen Bond/2.74
		Ile:C13 - VAL283	Alkyl/4.89
	P	Pro2 - VAL248	Alkyl/4.57
	G	Gly:H44 - ASN260:OD1	Conventional Hydrogen Bond/2.12
		Gly:O43 - HIS85	Pi-Lone Pair/2.94
		Val:O50 - HIS263:NE2	Conventional Hydrogen Bond/2.49
		Val:H65 - HIS85:NE2	Conventional Hydrogen Bond/1.65
	V	Val:H45 - ASN260:OD1	Carbon Hydrogen Bond/3.05
		Val:O50 - CU401:CU	Metal-Acceptor/1.77
		Val:C51 - ALA286	Hydrophobic (Alkyl)/4.40
		Val:C51 - VAL283	Hydrophobic (Alkyl)/4.52
		Val:C51 - HIS263	Hydrophobic (Pi-Alkyl)/3.18

ลำดับเปปไทด์ LTLEEGESVG

การเทียบโครงสร้างของโมเลกุล หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) และลิแกนด์ LTLEEGESVG (LTLEEGESVG, LTL, TLE, LEE, EEG, EGE, GES, ESV, SVG, LTLE, TLEE, LEEG, EEGE, EGES, GESV และ ESVG) แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ TLEE มีเท่ากับ 79.07 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ tyrosinase มี interaction 4 ชนิดที่พบจากการจำลอง

ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Conventional hydrogen bond และ Metal-acceptor จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ TLEE จับกับ ARG268, HIS85, ASN260 และ HIS61 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน (แสดงดังภาพ 65 และตาราง 21)



ภาพ 65 การศึกษา Molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

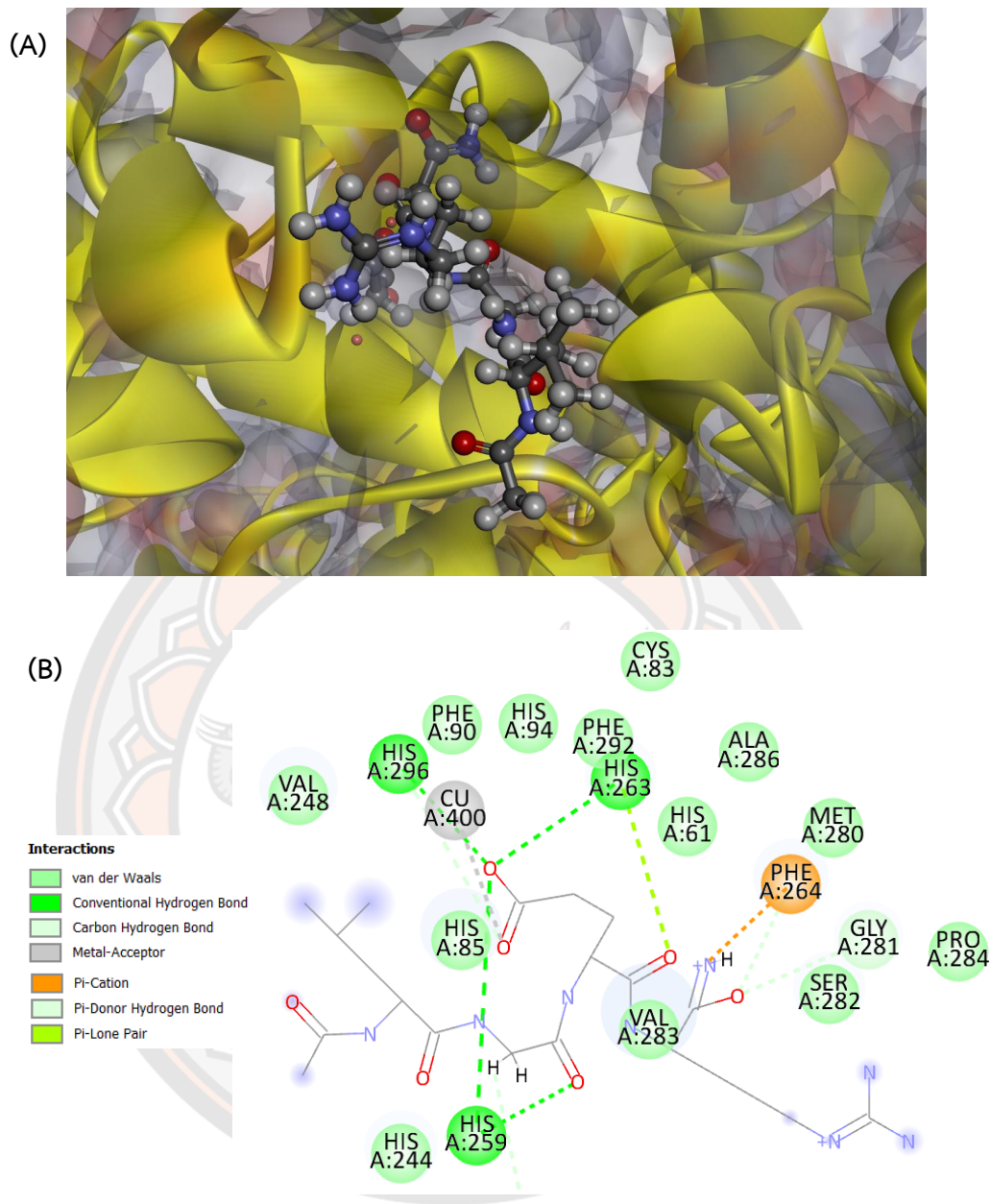
(A) ภาพ 3D ของการ interactions ระหว่าง TLEE (B) แบบจำลองการจับกันแบบ 2D

ตารางที่ 21 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ TLEE และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

ลำดับเปปไทด์	Peptide residues	TLEE-tyrosinase	Interaction type/bond length
TLEE	T	Thr:O10 - ARG268:HH11	Conventional Hydrogen Bond/2.24
	L	-	-
	E3	-	-
	E4	Glu3:H64 - ASN260:OD1	Conventional Hydrogen Bond/2.25
		Glu3:O62 - HIS85:NE2	Conventional Hydrogen Bond/2.52
		Glu3:O62 - HIS61:HE1	Carbon Hydrogen Bond/2.33
		Glu3:O63 - CU400:CU	Metal-Acceptor/2.48
		Glu3:O6 - CU401:CU	Metal-Acceptor/2.07

ลำดับเปปไทด์ LGERTLDEI

การเทียบโครงสร้างของโมเลกุล หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) และลิแกนด์ LGERTLDEI (LGERTLDEI, LGE, GER, ERT, RTL, TLD, LDE, DEI, LGER, GERT, ERTL, RTLD, TLDE และ LDEI) แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ LGER มีเท่ากับ 75.39 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ tyrosinase มี interaction 7 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Conventional hydrogen bond, Metal-acceptor, Pi-cation, Pi-donor hydrogen bond และ Pi-lone pair จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ LGER จับกับ HIS259, ASN260, GLU256, HIS263, HIS296, GLY281 และ PHE264 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน (แสดงดังภาพ 66 และตาราง 22)



ภาพ 66 การศึกษา Molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

(A) ภาพ 3D ของการ interactions ระหว่าง LGER (B) แบบจำลองการจับกันแบบ 2D

ตารางที่ 22 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ LGER และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

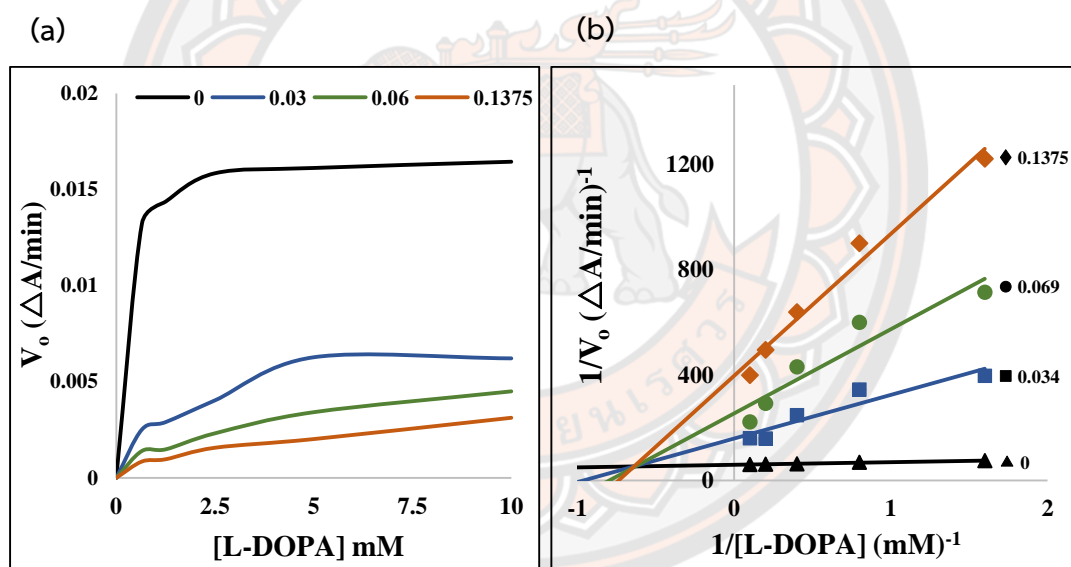
ลำดับเปปไทด์	Peptide residues	LGER-tyrosinase	Interaction type/bond length
	L	-	-
		Gly:O29 - HIS259:HD1	Conventional Hydrogen Bond/2.71
		Gly:O29 - HIS259:HE1	Carbon Hydrogen Bond/1.99
	G	Gly:O29 - ASN260:HA	Carbon Hydrogen Bond/2.91
		Gly:H31 - ASN260:OD1	Carbon Hydrogen Bond/2.14
		Gly:H32 - GLU256:OE2	Carbon Hydrogen Bond/2.78
		Gly:N72 - PHE264	Pi-Cation/2.87
LGER		Glu:O40 - HIS259:NE2	Conventional Hydrogen Bond/2.64
		Glu:O40 - HIS263:NE2	Conventional Hydrogen Bond/2.25
		Glu:O40 - HIS296:NE2	Conventional Hydrogen Bond/2.72
	E	Glu:O41 - HIS296:HE1	Carbon Hydrogen Bond/2.61
		Glu:O41 - CU400:CU	Metal-Acceptor/1.89
		Glu:O40 - CU401:CU	Metal-Acceptor/1.01
		Glu:O36 - HIS263	Pi-Lone Pair/2.83
		Arg:H73 - ASN260:O	Conventional Hydrogen Bond/2.04
	R	Arg:O51 - GLY281:HA2	Carbon Hydrogen Bond/2.34
		Arg:O51 - PHE264	Pi-Donor Hydrogen Bond/2.99

4.9 การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Enzyme Kinetic)

เมื่อนำเส้นจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้ตัวยับยั้งความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสำหรับปฏิกิริยาของ diphenolase activity ที่ได้จากแต่ละปฏิกิริยามาวิเคราะห์พร้อมทั้งคำนวณอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา $[V_0]$ และนำมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น $[S]$ ทำให้สามารถคำนวณหาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสและวิเคราะห์ชนิดของกลไกการยับยั้งได้ตามลำดับ (แสดงดังภาพ 67-72)

ตารางที่ 23 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง kojic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mM)

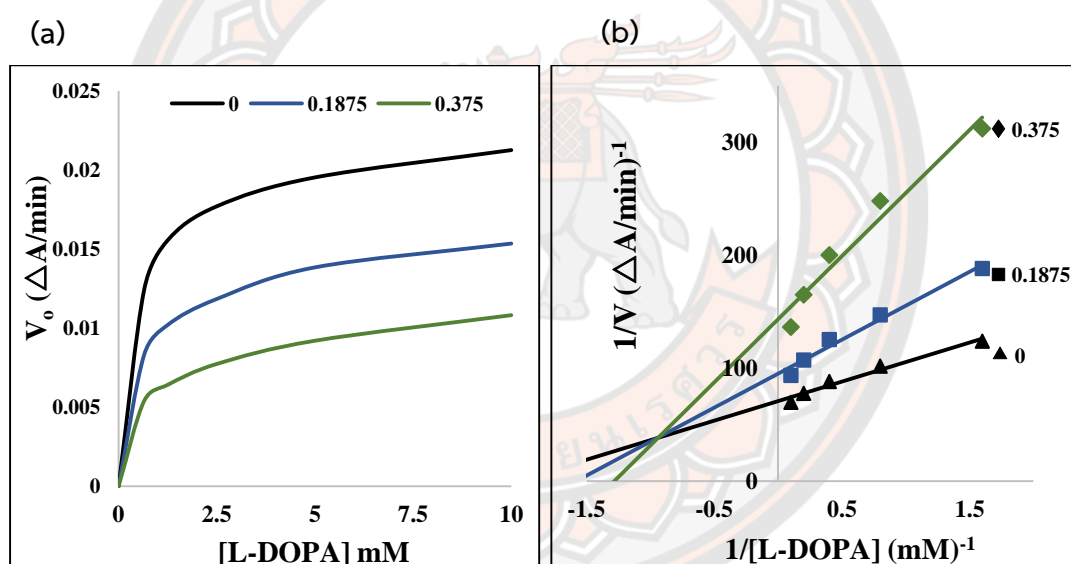
สารตั้งต้น (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_0) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)			
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง kojic acid (mM)			
	0.000	0.034	0.069	0.138
0.65	0.0132	0.0025	0.0014	0.0009
1.25	0.0144	0.0029	0.0015	0.0010
2.5	0.0159	0.0040	0.0023	0.0016
5	0.0161	0.0063	0.0034	0.0020
10	0.0165	0.0062	0.0045	0.0031



ภาพ 67 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง kojic acid (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$

ตารางที่ 24 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง RHAKF ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL)

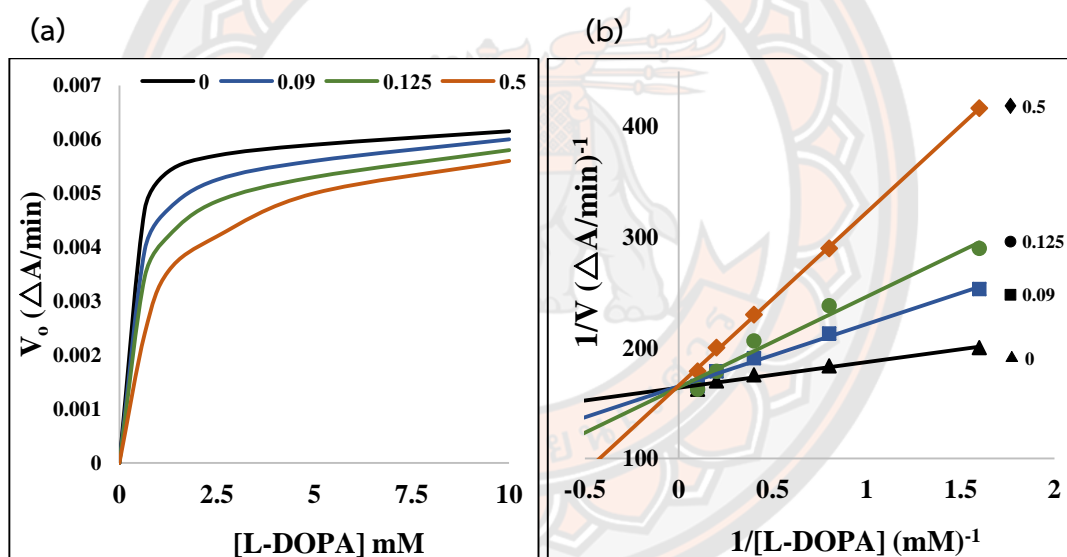
สารตั้งต้น (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_0) ($\Delta A/475$ / min)		
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง RHAKF (mg/mL)		
	0.000	0.1875	0.375
0.65	0.0124	0.0083	0.0054
1.25	0.0156	0.0102	0.0064
2.5	0.0177	0.0118	0.0077
5	0.0195	0.0138	0.0092
10	0.0213	0.0153	0.0108



ภาพ 68 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง RHAKF (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$

ตารางที่ 25 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง DHm ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL)

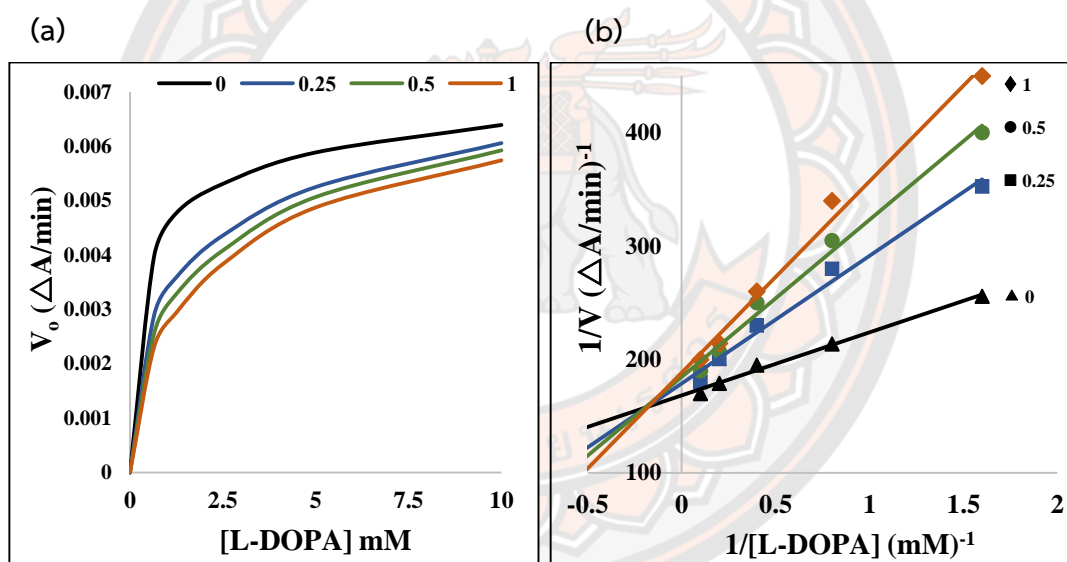
สารตั้งต้น (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_0) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)			
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง DHm (mg/mL)			
	0.000	0.09	0.125	0.5
0.65	0.0047	0.0040	0.0035	0.0024
1.25	0.0054	0.0047	0.0042	0.0036
2.5	0.0057	0.0053	0.0049	0.0042
5	0.0059	0.0056	0.0053	0.0050
10	0.0062	0.0060	0.0058	0.0056



ภาพ 69 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง DHm (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$

ตารางที่ 26 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง FHm ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL)

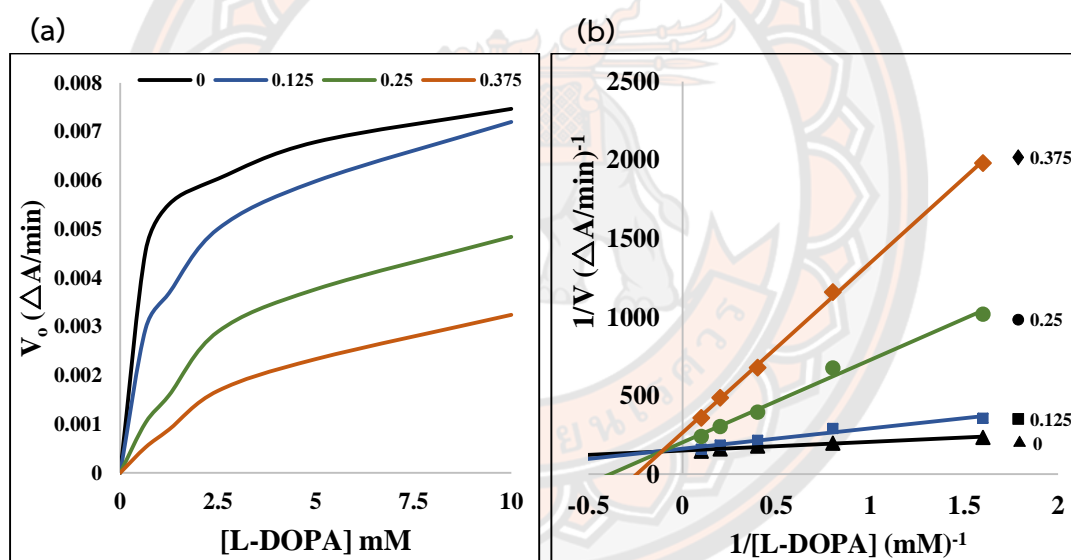
สารตั้งต้น (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_0) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)			
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง FHm (mg/mL)			
	0.000	0.25	0.5	1
0.65	0.0046	0.0030	0.0010	0.0005
1.25	0.0055	0.0037	0.0016	0.0009
2.5	0.0060	0.0050	0.0029	0.0017
5	0.0068	0.0060	0.0038	0.0023
10	0.0075	0.0072	0.0048	0.0032



ภาพ 70 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง FHm (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$

ตารางที่ 27 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_0) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง FHp ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL)

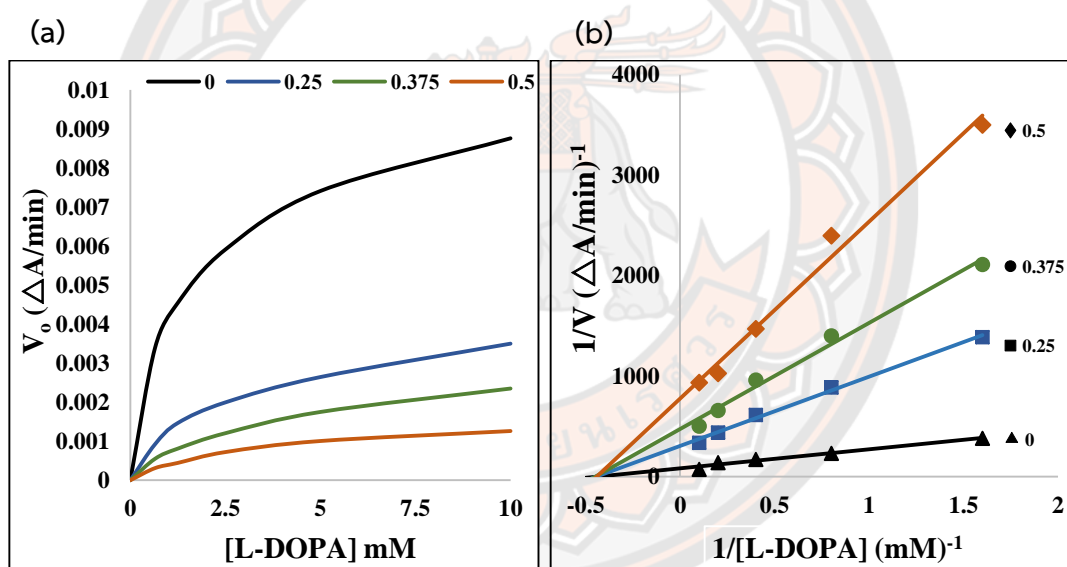
สารตั้งต้น (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_0) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)			
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง FHp (mg/mL)			
	0.000	0.125	0.25	0.375
0.65	0.0046	0.0030	0.0010	0.0005
1.25	0.0055	0.0037	0.0016	0.0009
2.5	0.0060	0.0050	0.0029	0.0017
5	0.0068	0.0060	0.0038	0.0023
10	0.0075	0.0072	0.0048	0.0032



ภาพ 71 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง FHp (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_0) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$

ตารางที่ 28 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้น (V_o) ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง FpP ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/mL)

สารตั้งต้น (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_o) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)			
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง FpP (mg/mL)			
	0.000	0.25	0.375	0.5
0.65	0.0034	0.0009	0.0006	0.0003
1.25	0.0045	0.0015	0.0008	0.0004
2.5	0.0059	0.0020	0.0012	0.0007
5	0.0074	0.0026	0.0018	0.0010
10	0.0088	0.0035	0.0024	0.0013



ภาพ 72 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยับยั้ง FpP (a) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_o) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น [L-Dopa] ที่มีการแปรผันตามความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (b) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) เมื่อจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$

ตารางที่ 29 สรุปการวิเคราะห์ชนิดของกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตัวยับยั้ง	ชนิดของกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส		
	Vmax	Km	ชนิดการยับยั้ง
Kojic acid	ลดลง	เพิ่มขึ้น	การยับยั้งแบบผสม (competitive/noncompetitive)
RHAKF	ลดลง	เพิ่มขึ้น	การยับยั้งแบบผสม (competitive/noncompetitive)
DHm	คงที่	เพิ่มขึ้น	การยับยั้งแบบแข่งขัน competitive
FHm	ลดลง	เพิ่มขึ้น	การยับยั้งแบบผสม (competitive/noncompetitive)
FHp	ลดลง	เพิ่มขึ้น	การยับยั้งแบบผสม (competitive/noncompetitive)
FPP	ลดลง	คงที่	การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน noncompetitive

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ DHm พบว่าเป็นชนิดการยับยั้งแบบแข่งขัน หรือ competitive inhibition (ภาพที่ 69 และตารางที่ 25) เมื่อหาจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ พบว่ามีค่า V_{max} คงที่และ K_m เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นกลไกการยับยั้งชนิด competitive inhibition โดยตัวยับยั้งจะรบกวนการเข้าจับของสารตั้งต้น L-Dopa บนตำแหน่งจับของเอนไซม์เป็นเหตุให้ค่า K_m เพิ่มสูงขึ้นโดยไม่มีผลกระทบต่อค่า V_{max}

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ FPP พบว่าเป็นชนิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน หรือ noncompetitive inhibition (ภาพที่ 72 และตารางที่ 28) เมื่อหาจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ พบว่ามีค่า V_{max} ลดลงและ K_m คงที่ ซึ่งลักษณะของการยับยั้งชนิด non-competitive inhibitor ตัวยับยั้งและสารตั้งต้น L-Dopa จะสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ตลอดเวลาโดยจับคนละตำแหน่งกัน เมื่อตัวยับยั้งและสารตั้งต้นเข้าจับกับเอนไซม์แล้วจะเกิดเป็น enzyme-substrate-inhibitor complex (ESI) ซึ่งไม่สามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไปได้แต่สามารถผันกลับไปเป็นสารเชิงซ้อน enzyme-substrate complex (ES) หรือ enzyme inhibitor complex (EI) ได้ จึงเป็นเหตุให้ค่า V_{max} ลดลง แต่ไม่มีผลต่อค่า K_m

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ Kojic acid, RHAKF, FHm และ FHp แสดงให้เห็นว่าเป็นการยับยั้งแบบผสม (mixed inhibition) ชนิดแบบแข่งขัน/ไม่แข่งขัน (competitive/noncompetitive) เมื่อหาจุดตัดแกน Y คือ $1/V_{max}$ และจุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ พบว่ามีค่า V_{max} ลดลงและ K_m เพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของตัวยับยั้ง ซึ่งการยับยั้งแบบผสมนี้ ตัวยับยั้งจะสามารถจับกับทั้งสารเชิงซ้อน enzyme-substrate complex (ES) และเอนไซม์อิสระ (E) แต่เมื่อภายหลังจากที่ตัวยับยั้งเข้าจับแล้ว มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ทำให้ affinity ของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจจะทำให้สารเชิงซ้อน enzyme-substrate complex (ES) จับกับสารตั้งต้นได้มากขึ้นหรือลดลงจากเดิม ส่งผลให้ค่า V_{max} และ K_m อาจคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงได้

4.10 การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดเปปไทด์

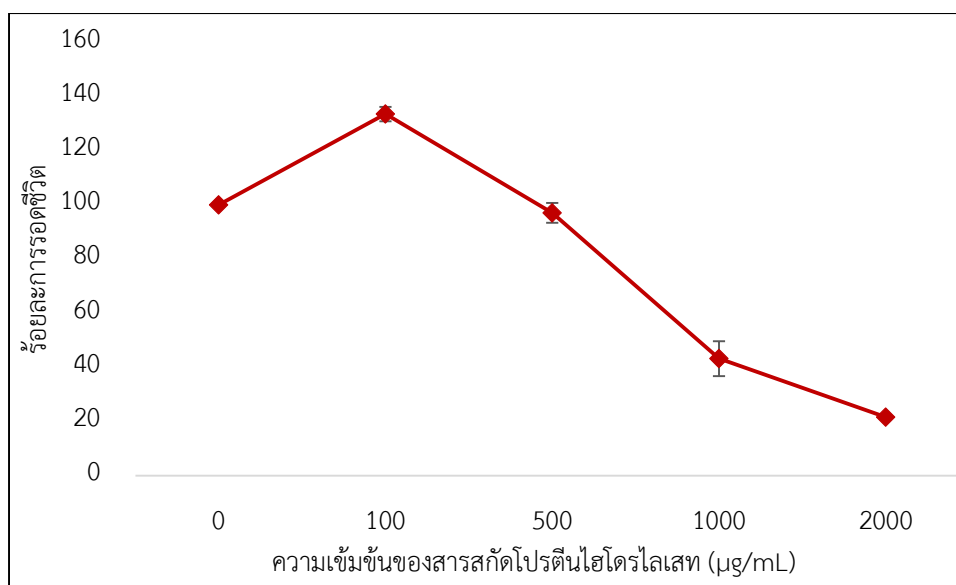
เมื่อทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้ง เห็ดหอมสด และเห็ดเป่าอื้อที่ย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสต่างกัน หลังทำการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองเกิดการเปลี่ยนสีของ MTT หลังบ่มนาน 3 ชั่วโมง เมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร พบว่ามีค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์คิดเป็นร้อยละ (แสดงดังตาราง 30-32 และภาพ 73-75)

1. ตัวอย่าง: เห็ดหอมแห้ง

ตารางที่ 30 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งหลังทำการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%Cell viability)
0	0.401 ± 0.004	100.00 ± 0.00
100	0.536 ± 0.015	133.54 ± 2.69
500	0.390 ± 0.018	97.07 ± 3.64
1000	0.174 ± 0.027	43.24 ± 6.64
2000	0.087 ± 0.001	21.68 ± 0.20

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3)



ภาพ 73 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ หลังทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n=3); ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

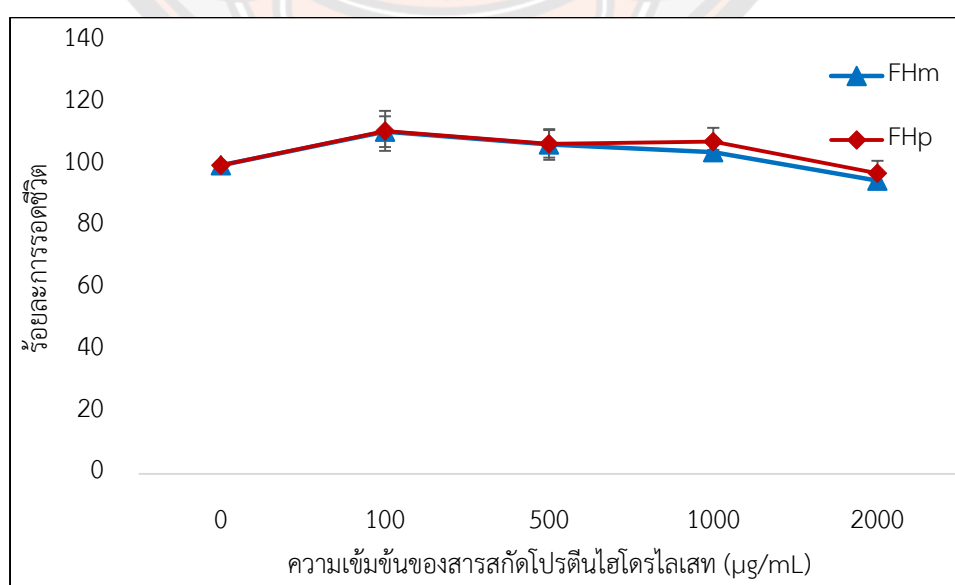
จากผลการทดลองอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 133.54±2.69, 97.07±3.64, 43.24±6.64 และ 21.68±0.20 ตามลำดับ โดยพบว่าตั้งแต่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทนี้ทำให้การเจริญของเซลล์ HaCaT ต่ำลงหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/mL เป็นต้นไป

2. ตัวอย่าง: เห็ดหอมสด

ตารางที่ 31 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมสดหลังทำการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส	ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%Cell viability)
FHm	0	0.434 ± 0.004	100.00 ± 0.91
	100	0.481 ± 0.022	110.87 ± 4.96
	500	0.463 ± 0.022	106.67 ± 4.99
	1000	0.452 ± 0.003	104.24 ± 0.69
	2000	0.412 ± 0.009	94.93 ± 2.08
FHp	0	0.434 ± 0.004	100.00 ± 0.91
	100	0.482 ± 0.028	111.07 ± 6.47
	500	0.464 ± 0.019	106.87 ± 4.46
	1000	0.467 ± 0.019	107.66 ± 4.44
	2000	0.422 ± 0.018	97.32 ± 4.09

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3)



ภาพ 74 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์และเอนไซม์เปปซินตามลำดับ หลังทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3); ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

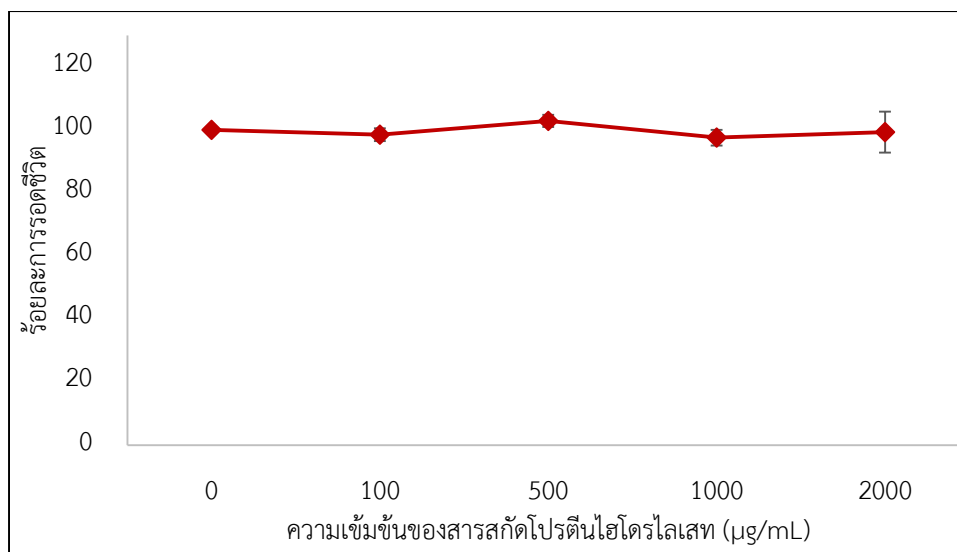
จากผลการทดลอง อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (FHm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 110.87 \pm 4.96, 106.67 \pm 4.99, 104.24 \pm 0.69 และ 94.93 \pm 2.08 ตามลำดับ และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FHp) มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 111.07 \pm 6.47, 106.87 \pm 4.46, 107.66 \pm 4.44 และ 97.32 \pm 4.09 ตามลำดับ โดยพบว่าทั้ง FHm และ FHp มีอัตราการรอดชีวิตในระดับที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมสดนี้ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ HaCaT หรือไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT

3. ตัวอย่าง: เห็ดเป่าฮื้อ

ตารางที่ 32 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดเป่าฮื้อสดหลังทำการทดสอบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%Cell viability)
0	0.344 \pm 0.020	100 \pm 2.03
100	0.339 \pm 0.023	98.52 \pm 1.95
500	0.354 \pm 0.023	102.89 \pm 2.45
1000	0.335 \pm 0.015	97.54 \pm 6.53
2000	0.342 \pm 0.030	99.33 \pm 3.07

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3)



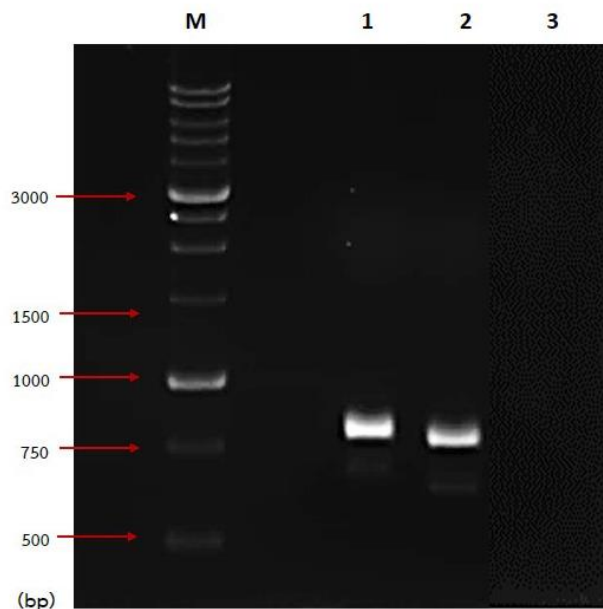
ภาพ 75 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าอื่อที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน หลังทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n=3); ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างกลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

จากผลการทดลอง อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าอื่อที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPP) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 2 mg/mL มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 98.52±1.95, 97.54±6.53 และ 99.33±3.07 ตามลำดับ โดยพบว่า FPP มีอัตราการรอดชีวิตในระดับที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดเป่าอื่อไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ HaCaT หรือไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT

4.11 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ DNA barcodes และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree

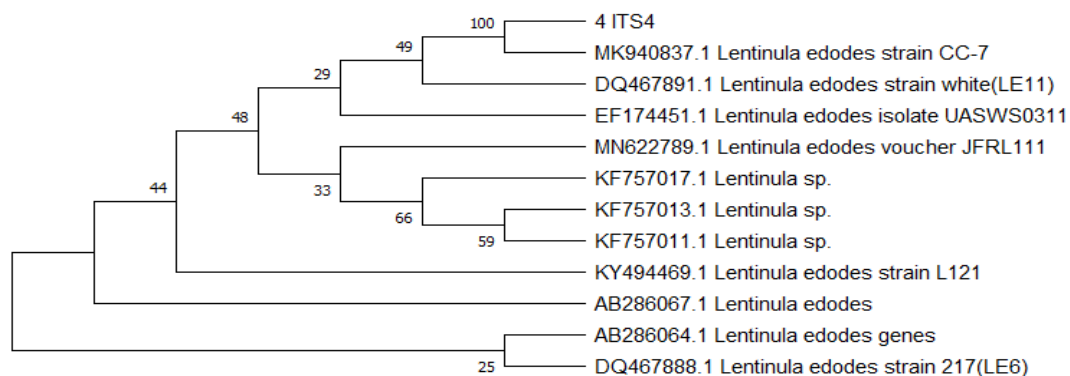
1. ตัวอย่าง: เห็ดหอมแห้ง



ภาพ 76 แสดง ITS4-5 PCR-product ของเห็ดหอมแห้ง (*L. edodes*) เมื่อ Lane M; DNA size markers, Lane1; 50 ug, Lane2; 100 ug and Lane3; Negative control

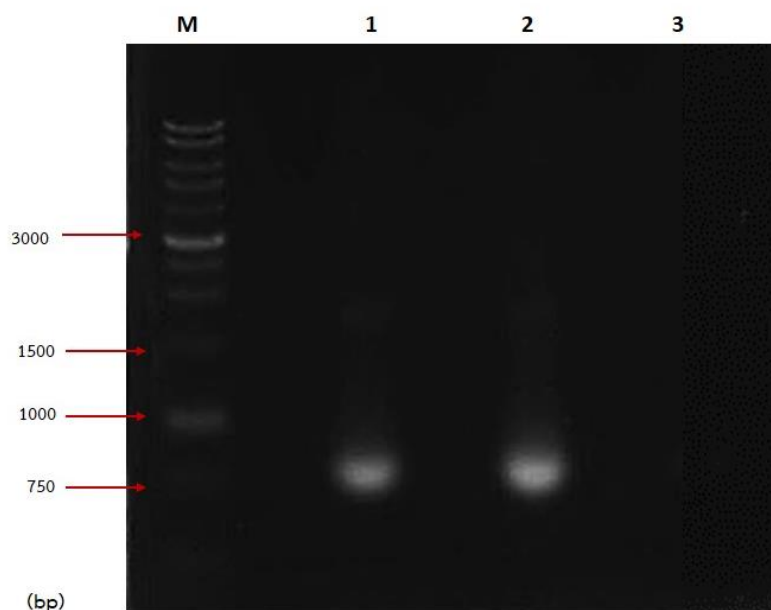
จากผลการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดโดยใช้ ITS region (Internal transcribed spacer) gene ด้วยไพรเมอร์ ITS5-Forward และ ITS4-Reverse พบว่าตัวอย่างมีการแสดงแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว และมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 750-800 คู่เบส (แสดงดังภาพ 76)

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA บริเวณ ITS และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จากการนำ DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าชนิดของเห็ดหอม (*L. edodes*) ได้คล้ายคลึงกับ *L. edodes* สายพันธุ์ CC7 (MK940837.1) มากกว่าร้อยละ 99 (แสดงดังภาพที่ 77)



ภาพ 77 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จาก DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดหอม(แห้ง) กับฐานข้อมูลใน GenBank

2. ตัวอย่าง: เห็ดหอมสด

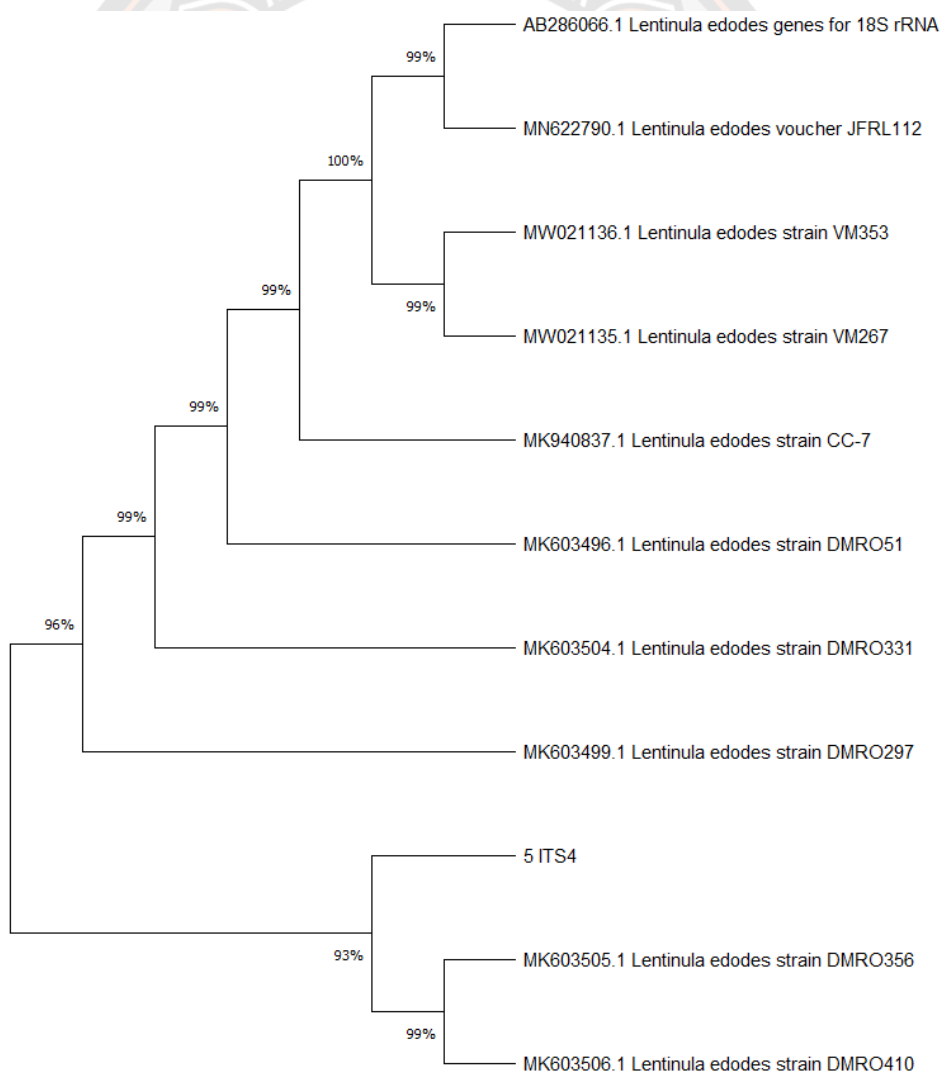


ภาพ 78 แสดง ITS4-5 PCR-product ของเห็ดหอมสด (*L. edodes*) เมื่อ Lane M; DNA size markers, Lane1; 50 ug, Lane2; 100 ug and Lane3; Negative control

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดโดยใช้ ITS region (Internal transcribed spacer) gene ด้วยไพรเมอร์ ITS5-Forward และ ITS4-Reverse

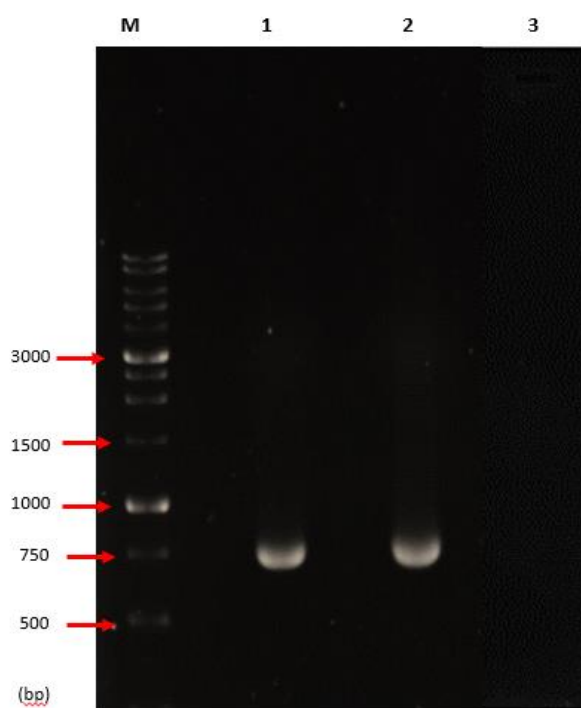
พบว่าตัวอย่างมีการแสดงแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว และมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 750-800 คู่เบส (แสดงดังภาพ 78)

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA บริเวณ ITS และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จากการทำ DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าเห็ดหอมสด (*L. edodes*) ได้คล้ายคลึงกับ *L. edodes* gene สำหรับ 18S rRNA (AB286066.1), *L. edodes* voucher JFRL 112 (MN622790.1), *L. edodes* สายพันธุ์ VM353 (MW021136.1), VM267 (MW021135.1), CC7 (MK940837.1), DMRO51 (MK603496.1), DMRO331 (MK603504.1) และ DMRO297 (MK603499.1) มากกว่าร้อยละ 99 (แสดงดังภาพ 79)



ภาพ 79 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จาก DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดหอม(สด) กับฐานข้อมูลใน GenBank

3. ตัวอย่าง: เห็ดเป่าฮื้อ

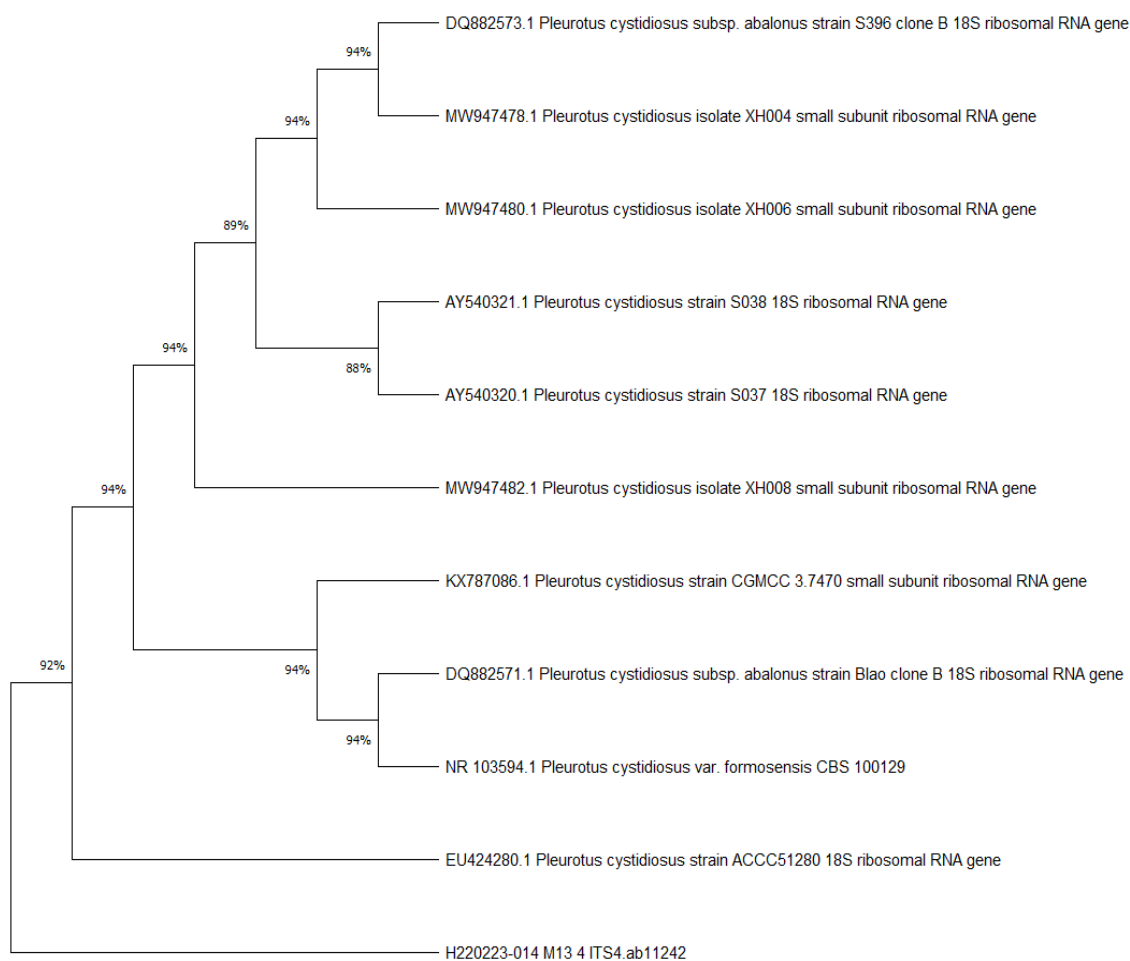


ภาพ 80 แสดง ITS4-5 PCR-product ของเห็ดเป่าฮื้อ (*P. cystidiosus*) เมื่อ Lane M; DNA size markers, Lane1; 50 ug, Lane2; 100 ug and Lane3; Negative control

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดโดยใช้ ITS region (Internal transcribed spacer) gene ด้วยไพรเมอร์ ITS5-Forward และ ITS4-Reverse พบว่าตัวอย่างมีการแสดงแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว และมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 600-750 คู่เบส (แสดงดังภาพ 80)

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA บริเวณ ITS และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จากการนำ DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าเห็ดเป่าฮื้อสด (*P. cystidiosus*) ได้คล้ายคลึงกับ *P. cystidiosus* isolate XH004 small subunit ribosomal RNA

gene (MW947478.1), *P. cystidiosus* isolate XH006 small subunit ribosomal RNA gene (MW947480.1), *P. cystidiosus* isolate XH008 small subunit ribosomal RNA gene (MW947482.1), *P. cystidiosus* var. *formosensis* CBS 100129 (NR103594.1), *P. cystidiosus* สายพันธุ์ S396 clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882573.1), CGMCC 3.7470 small subunit ribosomal RNA gene (KX787086.1) และ Blao clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882571.1) มากกว่าร้อยละ 94 (แสดงดังภาพ 81)



ภาพ 81 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค Phylogenetic tree จาก DNA barcodes และผลการเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดเป่าฮื้อ(สด) กับฐานข้อมูลใน GenBank

บทที่ 5

สรุปผล

อภิปรายผลการศึกษา

ปัจจุบันเห็นมีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก และปริมาณที่บริโภคเพิ่มขึ้นอย่างมากเนื่องจากรสชาติที่ดี หาสีได้ง่าย เป็นอาหารที่มีประโยชน์คุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากมีแคลอรี โซเดียม ไขมัน และคอเลสเตอรอลต่ำ ในขณะที่มีแคลเซียม คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ วิตามินสูง และอุดมด้วยโปรตีน เปปไทด์ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด (Mattila, P et al., 2000) เห็นเป็นหนึ่งในแหล่งธรรมชาติที่สำคัญที่สุดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการรักษามากมายและมักใช้ในยาแผนโบราณของจีนมานานหลายศตวรรษ อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ สารต้านเนื้องอก สารต้านไวรัส สารต้านจุลชีพ และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Zaidman, B.Z et al., 2005; Ooi, V.E et al., 2000; Wasser, S.P et al., 1999) อีกทั้งจากข้อมูลของกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (<https://fdc.nal.usda.gov/>) พบว่าเห็ดอุดมไปด้วยโปรตีนโดยมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าพืชชนิดอื่นๆ (Zhou, J et al., 2020) นอกจากนี้ เห็ดยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิดซึ่งมักมีอยู่ในโปรตีนจากสัตว์ สามารถบริโภคแทนเนื้อสัตว์ได้ (Gonzalez et al. 2020) จึงชี้ให้เห็นว่าเห็ดเป็นวัตถุดิบพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ปัจจุบันเห็ดที่บริโภคได้มีหลายชนิดโดยเฉพาะเห็ดหอมอุดมไปด้วยสารอาหารแร่ธาตุที่หลากหลาย มีโปรตีนสูง ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการมากเพียงพอที่จะใช้ทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้ ปัจจุบันการเพาะปลูกและบริโภคเห็ดในประเทศไทยได้รับความนิยมมากขึ้น จากงานวิจัยปี 2015 ได้รายงานว่าเห็ดหอมแบบแห้งและแบบผงอุดมไปด้วยปริมาณโปรตีนถึง 4.7 และ 12.8 % ตามลำดับ แต่มีปริมาณไขมันต่ำเพียงไม่เกิน 2% (Valverde, M. E et al., 2015) และจากงานวิจัยปี 2017 และ 2019 มีรายงานว่าดอกเห็ดหอมอุดมไปด้วยโปรตีน (26% ของน้ำหนักแห้ง), ไขมัน, รวมถึงกรดไขมัน (ส่วนใหญ่เป็นกรดไลโนเลนิก), คาร์โบไฮเดรต, ergosterols และแร่ธาตุ; วิตามิน B1, B2 และ C (Himanshi et al, 2017; Badalyan et al., 2019) นอกจากเห็ดหอมในการศึกษานี้ยังสนใจดอกเห็ดเป่าฮื้อซึ่งเป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* เป็นเห็ดตระกูลเดียวกับเห็ดนางฟ้าและนางรม การแพร่กระจายของเห็ดเป่าฮื้ออยู่ในแถบร้อนของโลกทางด้านเอเชีย ได้แก่ จีน ไต้หวัน ภูฏาน ลาว พม่า และ ไทย เห็ดเป่าฮื้อมีสรรพคุณทางยาต้านการต่อต้านแบคทีเรียพวกกรัมบวก และป้องกันโรคมะเร็ง และยังสามารถป้องกันโรคหวัดช่วยการไหลเวียนของเลือด และโรคกระเพาะได้ แต่เห็ดเป่าฮื้อเป็นเห็ดที่เพาะยาก และมีการเพาะเชิงการค้ากันน้อยเมื่อเทียบกับเห็ดตระกูลเดียวกันอย่างเห็ดนางฟ้าเห็ดนางรม ดังนั้นเห็ดเป่าฮื้อจึงมีงานวิจัยและถูกนำมาศึกษาค่อนข้าง

น้อย ผู้วิจัยจึงสนใจเห็นทั้งสองชนิดนี้เพื่อนำมาศึกษาต่อยอดงานวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสามารถเพิ่มมูลค่าและการผลิตต่อไปได้ในอนาคต

เปปไทด์เป็นองค์ประกอบย่อยของโปรตีนในธรรมชาติ ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลากหลายชนิด เป็นสายพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนที่มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ เปปไทด์มีคุณสมบัติสามารถออกฤทธิ์ทางสรีรวิทยาหรือออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Chakrabarti, S et al., 2018) ปัจจุบันเปปไทด์ได้มีการพัฒนาให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีขึ้นมาก จากการรายงานพบว่าการทาครีมที่มีสารเปปไทด์เป็นส่วนประกอบจะสามารถแทรกซึมผิวได้ดีและดีกว่าสารออกฤทธิ์เดิมๆ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงมีการนำเปปไทด์หลายชนิดมาใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว เช่น ช่วยยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อ ทำให้ริ้วรอยลดน้อยลง และเข้าไปช่วยสร้างฟื้นฟูคอลลาเจน ทำให้ผิวตึงกระชับเรียบเนียน อีกทั้งยังช่วยทำให้หน้าขาวใส เป็นต้น (สารพันความรู้เกี่ยวกับการดูแลสุขภาพและความงาม, 2554) อย่างไรก็ตามข้อเสียของเปปไทด์โมเลกุลขนาดใหญ่หรือมีประจุสูงมักมีปัญหาในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าสู่เมลาโนโซมเพื่อจับกับเอนไซม์เป้าหมาย ดังนั้นตัวรับบนพื้นผิวของเยื่อหุ้มพลาสมาของเมลาโนโซตควรเป็นเป้าหมายให้กับกลุ่มเซลล์ผ่านไม่ได้ (กรดอะมิโน เปปไทด์ และแอนะล็อก) สามารถเข้าถึงได้มากขึ้น (Davenport, A. P et al., 2020)

งานวิจัยปี 2022 ได้นำเสนอความก้าวหน้าล่าสุดในการบำบัดด้วยแสงซูปราโมเลกุลาร์โฟโตไดนามิก หรือ Photodynamic Therapy: PDT (พลังงานแสงบำบัด) ซึ่งเป็นการใช้เปปไทด์เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของแสงที่ใช้เป็นวิธีการรักษามะเร็ง โดยใช้เปปไทด์สำหรับการนำส่งตามเป้าหมายและการรักษาต่อต้านเนื้องอก โดยแสดงให้เห็นว่าการที่เปปไทด์จับกับ PDT อาจเพิ่มความสามารถในการเลือกส่งของสารไวแสงไปยังบริเวณที่เกิดรอยโรคได้ (Yijie_Li et al., 2022) ทั้งนี้การพัฒนาคุณสมบัติทางชีวภาพของ Melanocyte-stimulating hormone (MSH) ที่จับอยู่กับ octapeptide เป็นวิธีการรักษามะเร็งผิวหนังชนิด Lentigo Maligna Melanoma (LMM) โดยการรวมกันของสารไวแสงเข้ากับลิแกนด์เปปไทด์ (NAP-amide) ผ่านการจับกับ melanocortin-1 (MCR1) ด้วยการใช้ปริมาณแสง LED (ซึ่งมีความสามารถในการเจาะลึกลงไปใ้ผิวหนัง) ได้รับการพัฒนาเพื่อให้เกิดความเป็นพิษเฉพาะต่อเซลล์เป้าหมายได้ โดยแสดงให้เห็นว่าการกำจัดเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะจงโดยการบำบัดด้วย PDT เป็นวิธีการรักษาที่สร้างความเสียหายต่อเซลล์เคราติโนไซต์ได้น้อยที่สุด และมีประสิทธิผลในการควบคุมการสร้างเม็ดสีผิวได้เช่นกัน (Bigliardi, P.L., 2017)

นอกจากนี้ MSH เป็นลิแกนด์ของตัวรับ MCR1 โดย octapeptide ที่จับกับ MSH ที่มี DOTA (DOTA เป็นคีเลเตอร์สำหรับการกำหนดเป้าหมายของนิวไคลด์รังสีของมะเร็งผิวหนัง) แสดงให้เห็นว่า MSH-octapeptide conjugates สามารถจับกับ MC1R ที่แสดงออกอย่างสูงในเซลล์เมลาโนไซต์และเซลล์มะเร็งผิวหนังได้จำเพาะ (Siegrist, W., 1991 & Siegrist, W., 1989) โดยปกติ α -MSH

กระตุ้นการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลานोไซต์และเซลล์เมลานินมา กระบวนการนี้พบว่าเมลานินถูกหยุดการสร้างเมื่อได้รับการรักษาด้วย MSH-octapeptide conjugates (Eberle, A. N. 1988)

ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเม็ดสีหรือเมลานินได้ค้นพบสารเตตระเปปไทด์ พบว่าลำดับที่ออกฤทธิ์คาดว่าจะเป็ R-(F/L)-(C/W)-(G/R)-NH₂ ในบรรดาเตตระเปปไทด์แต่ละชนิด RFWG-NH₂, RLWG-NH₂ และ FRWG-NH₂ แสดงฤทธิ์ด้านการสร้างเม็ดสีที่สูง อีกทั้งไตรเปปไทด์ FWG-NH₂, LWG-NH₂ และ RWG-NH₂ มีฤทธิ์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ RFW-NH₂, RFG-NH₂, RLG-NH₂ หรือ RLW-NH₂ ซึ่งบ่งชี้ว่าปลาย C ของ WG-NH₂ มีความสำคัญต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของยีน ตลอดจนไดเปปไทด์ WG-NH₂ และโมนเปปไทด์ Gly-NH₂ (ไกลซีน) ยังคงมีฤทธิ์ด้านการสร้างเม็ดสีได้ ผลชี้ว่าเปปไทด์แอนติเมลานินเหล่านี้มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับส่วนหนึ่งของ α -MSH (Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂) ดังนั้นจึงคิดว่าเปปไทด์เหล่านี้สามารถกำหนดเป้าหมาย MC1R ซึ่งมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสีได้ (Slominski, A et al., 2019) นอกจากนี้การค้นพบและการพัฒนาทางคลินิกของยาจากเปปไทด์ เปปไทด์จำนวนมากมักจับกับตัวรับและต้องอาศัยการส่งสัญญาณ โดยผ่านตัวสื่อสัญญาณเพื่อกระตุ้นต่อการตอบสนองของเซลล์เป้าหมาย เปปไทด์อาจกระตุ้นผ่าน G-proteins หรือ G protein-coupled receptors (GPCRs) เป็นสื่อกลางในกระบวนการส่งสัญญาณที่หลากหลายและมีเป้าหมายโดยถือเป็นการรักษาทางคลินิก ลิแกนด์สำหรับ GPCRs ส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก คือเปปไทด์ (ประกอบด้วยกรดอะมิโน 50 ชนิดหรือน้อยกว่า) ซึ่งบ่งชี้ว่าโมเลกุลประเภทนี้อาจมีประโยชน์ทางการรักษา ปัจจุบันการปรับเปลี่ยนลำดับเปปไทด์ของลิแกนด์สำหรับ GPCRs (peptide-binding) มีประโยชน์เพื่อพัฒนาปฏิกิริยาและคุณสมบัติยาให้ดีขึ้น (Davenport, A. P et al., 2020) แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาระหว่างยาและร่างกาย (Drug-Body Interactions) ยังคงเป็นความรู้เพิ่มเติมทางด้านเภสัชพลศาสตร์และเภสัชจลนศาสตร์ที่ต้องศึกษาเชิงลึกต่อไป

เห็ดเป็นแหล่งโปรตีนและเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพตามธรรมชาติที่สำคัญ เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากกรดอะมิโนที่จำเป็นและยังส่งผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์หรือมีส่วนเกี่ยวข้องในการลด/ป้องกันโรคต่างๆ มีรายงานว่า mushroom bioactive peptides (MBAPs) ที่ได้จากเห็ดเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น มีบทบาท/การทำงานที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ยกตัวอย่าง เช่น เปปไทด์ลดความดันโลหิตที่มีประโยชน์ในการรักษาโรคความดันโลหิตสูงเนื่องจากความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) ถูกค้นพบในโปรตีน/เปปไทด์ในอาหาร และรู้จักกันในชื่อ ACE inhibitory peptides (Oh, J.-Y et al., 2020; Aluko, R.E et al., 2015) เปปไทด์ต้านจุลชีพ (AMPs) และเป็นยาปฏิชีวนะ (Reddy, K.V et al., 2004; R.M. Epanand, 2016) เปปไทด์ต้านมะเร็ง (ACPs) (Bhutia, S.K et al., 2008) ความผิดปกติของลิ้มเลือด ซึ่งรวมถึงลิ้มเลือดดำลึกลับและลิ้มเลือดอุดตันในปอด สามารถรักษาได้ด้วยเปปไทด์

(Cheng, S et al., 2019) นอกจากนี้ เปปไทด์หลายชนิดยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ (Sun, J et al., 2004; Zhao, Y et al., 2020) เป็นต้น แต่จากข้อมูลในปัจจุบันชี้ให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดยังไม่พบบทบาทชัดเจนในด้านการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสหรือการยับยั้งเม็ดสีเมลานินจึงเป็นที่น่ามาของวัตถุประสงค์การศึกษาในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ เปปไทด์ที่เตรียมจากโปรตีนไฮโดรไลสแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนขนาดใหญ่ที่ไม่ผ่านการเตรียมใดๆ (Udenigwe & Aluko, 2012) โปรตีนไฮโดรไลสคือผลิตภัณฑ์ของโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซิสโปรตีนโดยโมเลกุลของโปรตีนจะถูกตัดพันธะให้มีขนาดเล็กลงเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน หรือกรดอะมิโนอิสระ (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2546) การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เป็นหนึ่งในวิธีการย่อยโปรตีนที่รวดเร็ว ปลอดภัย ง่าย ราคาไม่แพง และควบคุมได้ซึ่งผลิตเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ (Zarei et al., 2014) การควบคุมสภาวะไฮโดรไลซิส เช่น เวลา ค่า pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่งผลต่อระดับของไฮโดรไลซิส (DH) (Hall and Ahmad, 1992)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผลิตสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสโดยใช้เอนไซม์เปปซินและมิกซ์เอนไซม์ในการย่อยโปรตีน และมีการควบคุมสภาวะแตกต่างกันไปตามความเหมาะสมของเอนไซม์โปรติเอส แต่ละชนิด (แสดงดังตาราง 7) และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณสุดท้ายของกระบวนการสกัด (กรัม) เทียบกับปริมาณตั้งต้น (กรัม) พบว่า FHp, FHm, FHp และ DHm มีปริมาณสารสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.017, 0.015, 0.012 และ 0.059 กรัม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าหากเทียบในปริมาณเริ่มต้น 100 กรัม ปริมาณสุดท้ายของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมแห้ง (DHm) จะให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่าเห็ดสด และจากผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี Trinitrobenzenesulphonic acid หรือ TNBS method พบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 µg/µL ระหว่างสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส จากผลการทดลองระดับการย่อยสลายของตัวอย่างทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทุกชนิดหลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสมีระดับการย่อยสลายได้เป็นกรดอะมิโนเพิ่มสูงขึ้นซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย ยกเว้น FHp ที่พบว่าไม่แตกต่างกัน อีกทั้งผลชี้ให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสที่ผ่านการย่อยโดยใช้มิกซ์เอนไซม์มีค่าระดับการย่อยสลายสูงกว่าการใช้เอนไซม์เปปซินเพียงชนิดเดียว ดังนั้นการเลือกเอนไซม์โปรติเอสจึงเป็นหนึ่งปัจจัยที่ควรคำนึงถึง

ผลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอมสดและเห็ดแปรรูปที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินให้ผลที่แตกต่างจากงานวิจัย (Adoui et al., 2013) โดยพบว่าเคซีนไฮโดรไลส (5 กรัม/100 มล.) ที่เตรียมด้วยเอนไซม์เปปซินจากหมู ที่เวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน แต่มีระดับการย่อยสลาย DH เท่ากับ 8.41% เท่านั้น การสังเกตนี้ยืนยันว่าภายใต้การใช้เอนไซม์เดียวกันแต่แหล่งโปรตีนต่างกัน

อาจทำให้การย่อยสลายของโปรตีนจะเกิดขึ้นต่างกัน ซึ่งจากผลการทดลองของผู้วิจัยในการศึกษานี้ แหล่งโปรตีนจากเห็ดจะเกิดการย่อยได้สูงกว่า

งานวิจัยในปี 2017 (M.A.. Corrons et al., 2017) กล่าวว่าระยะเวลาที่มีผลต่อการย่อยสลายของโปรตีนเคซีน กล่าวคือเมื่อใช้เวลามากขึ้น ระดับการย่อยสลายก็สูงขึ้นเช่นเดียวกัน และงานปี 2559 ระบุผลการวิเคราะห์หา %Degree of hydrolysis เมื่อเพิ่มเวลาในการไฮโดรไลซิส %DH ที่ได้ยิ่งเพิ่มมากขึ้นตามเช่นกัน (อรอนงค์ รักสวนจิก และคณะ, 2559) ใกล้เคียงกับงานวิจัยปี 2016 แสดงระดับการย่อยสลายของ Oyster mushroom (OMPH), Abalone mushroom (AMPH) และ Shiitake mushroom (SHMPH) ที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างแตกต่างที่มีนัยสำคัญของอัตราการไฮโดรไลซิส ในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก และยังคงอัตราคงที่ตั้งแต่ 12-24 ชั่วโมง (Banjongsinsiri, P et al., 2016) ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าเวลาที่นานขึ้นอาจทำให้การจับของเอนไซม์และซับสเตรตมากขึ้น ปริมาณพันธะเปปไทด์ที่ไฮโดรไลซ์จะยิ่งหลุดออกไป (Palupiet al., 2010) ผลแสดงแนวโน้มของ %DH ของ OMPH จะสูงที่สุดตลอดกระบวนการไฮโดรไลซิส เปรียบเทียบกับของ AMPH และ SHMPH พบว่า %DH สูงสุดของ OMPH, AMPH และ SHMPH คือ 46.54%, 38.15% และ 25.75% ซึ่งเกิดขึ้นที่ 18, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ สรุปคือเมื่อเพิ่มเวลาในการไฮโดรไลซิส %DH ที่ได้ยิ่งเพิ่มมากขึ้นตามเช่นกัน (Banjongsinsiri, P et al., 2016) ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าหากปฏิกิริยาไม่ได้มีการหยุดลง เวลาที่มากขึ้น อาจทำให้มีการย่อยสลายของโปรตีนและ/หรือเปปไทด์ดำเนินต่อไปได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยคาดว่า ปัจจัยหลายประการที่ควรคำนึงถึงการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท ได้แก่ วิธีการสกัด ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น อุณหภูมิ ค่า pH และระยะเวลา เป็นต้น ซึ่งการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ สามารถส่งผลต่อสมบัติการทำงานของโปรตีนในด้านต่างๆ และมีความเหมาะสมในด้านการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Vanga, S. K., Singh, A. and Raghavan, V.,2017)

ตลอดจนสายเปปไทด์ที่เกิดขึ้นโดยการย่อย เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa มาตรวจสอบคุณสมบัติและขนาดของเส้นเปปไทด์ด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ImageJ Software analyzed ผลวิจัยพบว่าเปปไทด์ที่ได้มีขนาดเล็กกว่า 6.5 kDa เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งสังเกตเห็นถึงการหายไปของโปรตีนขนาดใหญ่ ให้เหลือเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบที่ไม่ผ่านการย่อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2017 (M.A.. Corrons et al., 2017) เช่นเดียวกัน โดยพบว่าสารสกัดโปรตีนเคซีนหลังการถูกย่อยและนำไปผ่าน ultrafiltration ขนาด 3 kDa cut-off ผลชี้ให้เห็นว่าเคซีนที่ไม่ผ่านการย่อยจะมีขนาดโปรตีนในช่วง 14-45 kDa และหลังจากการย่อยเป็นเวลา 10 นาทีแรกเป็นต้นไป จะสังเกตเห็นถึงการ

หายไปของโปรตีนเคซีนจากที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นเปปไทด์เคซีนที่มีขนาดเล็กลง หรือพบได้ในช่วงขนาดที่น้อยกว่า 20 kDa เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

กลไกการสร้างเม็ดสีเมลานินในชั้นผิวหนังที่เป็นสาเหตุของสีผิวที่หมองคล้ำ จุดต่างดำ และ ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่จำกัดอัตราการผลิตเมลานิน ซึ่งกลไกดังกล่าวหากยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ก็จะลดการสร้างเม็ดสีเมลานินได้เช่นกัน ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างเมลานินได้ วิธีหนึ่งก็คือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยแย่งจับกับโลหะ Cu ซึ่งโลหะ Cu จะใช้ตำแหน่งที่ว่างอยู่อีกหนึ่งตำแหน่งไปจับกับ L-Dopa ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อย่อยสลายและเกิดเป็นเมลานินได้ ดังนั้นหากมีสารที่สามารถจับกับโลหะ Cu ได้ดีกว่า L-Dopa ก็จะทำให้โลหะ Cu ของเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามารถไปจับกับ L-Dopa หรือจับได้ไม่ดี จึงทำให้ไม่สามารถเกิดการย่อยสลายและทำให้เกิดการสร้างเมลานินได้ลดลง (สุชาติ จันทรพรหมมา, 2554)

ฟังก์ชันของกลุ่มจะมีการสังเคราะห์เมลานิน เพื่อทำหน้าที่ต่างๆของเมลานินในฟังก์ชัน เช่น ป้องกันแสงแดด สะสมพลังงาน การปรับอุณหภูมิ ป้องกันการคายน้ำและต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Cordero RJ, Casadevall A., 2017) มีการรายงานว่ามีการสังเคราะห์เมลานินโดยเอนไซม์ไทโรซิเนสในฟังก์ชันและในมนุษย์มีความคล้ายคลึงกัน (Williamson PR et al., 1998) ในปัจจุบันสารประกอบส่วนใหญ่ได้รับการทดสอบโดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสที่แยกได้จากเห็ด *Agaricus bisporus* (mTyr) (Espin et al., 2000; Garcia-Molina et al., 2005) ซึ่งเป็นเอนไซม์ไทโรซิเนสแอกทีฟเพียงชนิดเดียวที่มีจำหน่ายในท้องตลาดและเป็นส่วนผสมของไอโซเอนไซม์ไทโรซิเนสหลายชนิด โดยการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะของสารตั้งต้นของ mTyr นั้นแตกต่างจากเอนไซม์ไทโรซิเนสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างมีนัยสำคัญ (Hearing et al., 1980) ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ไทโรซิเนสของมนุษย์ (hTyr) มีข้อมูลด้านจลนพลศาสตร์หรือโครงสร้างน้อยมาก อาจเพราะปริมาณ hTyr ที่ได้รับมีปริมาณไม่เพียงพอจากแหล่งธรรมชาติหรือมีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (Olivares et al., 2002; Schweikardt et al., 2007; Tripathi et al., 1992; Wendt, 2006) และเมื่อไม่นานนี้ hTyr หลายกลุ่มได้พัฒนาระบบการแสดงออกที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Cordes et al., 2013; Fogal et al., 2015; Lai et al., 2016) แต่ข้อมูลโครงสร้างสามมิติของ hTyr หรือข้อมูลจลนศาสตร์ของสารยับยั้ง hTyr ยังคงหายไป ทั้งนี้งานวิจัยปี 2018 ได้ศึกษาการจับที่เป็นไปได้ของ Thiamidol กับ hTyr วิเคราะห์ผ่าน molecular docking ผลระบุว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mTyr) มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณของตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไทโรซิเนสในมนุษย์ (hTyr) อย่างมีนัยสำคัญ (แสดงดังภาพ 6) นอกจากนี้ยังได้กล่าวว่าสารยับยั้งมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากมนุษย์และเห็ดมีความขัดแย้งกัน กล่าวคือ Thiamidol ที่ระบุใหม่ (Beiersdorf AG, Hamburg, Germany) (isobutylamido thiazolyl resorcinol) มีค่าการยับยั้งไทโรซิเนสในมนุษย์ IC₅₀ เท่ากับ 1.1 (mmol/L) ในทางตรงกันข้าม สามารถยับยั้งไทโรซิเนสของเห็ดได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

(IC₅₀ เท่ากับ 108 $\mu\text{mol/L}$) (Mann, T et al., 2018) ดังนั้นจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาจึงชี้ให้เห็นว่าการศึกษาระบบยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในกลุ่มของเห็ดอาจไม่เพียงพอ ผู้วิจัยอาจจำเป็นต้องทดสอบกลุ่มเอนไซม์จากมนุษย์และทดสอบการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เมลานोไซต์เพิ่มเติมในอนาคต

จากผลการทดลองการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mTyr) เบื้องต้นในระดับหลอดทดลอง ซึ่งเป็นตัวกลางทำให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยวัดการเกิดสีของ dopaquinone โดยความเข้มข้นของสีที่ลดลงจะแปรผันโดยตรงกับประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ ผลพบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือ 0.1 และ 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของสารสกัดพบว่า Fp จากเห็ดเป่าฮื้อที่น้อยกว่าด้วยเอนไซม์เปปซินมีฤทธิ์สูงที่สุดเมื่อเทียบสารสกัดอื่น (IC₅₀ 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และยังชี้ให้เห็นอีกด้วยว่าที่ความเข้มข้น 0.25-0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ Fp และ 0.5-1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ FHp พบว่ามีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของกรดโคจิก (IC₅₀ 0.047 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของ RHAKF (IC₅₀ 0.690 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ผลจึงชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดโคจิกและเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF ตามลำดับ และเอนไซม์เปปซินยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าหากเมื่อเทียบกับการใช้มีกส์เอนไซม์ อย่างไรก็ตามสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ออกฤทธิ์ได้ต่ำ อาจมีการเข้าจับ Cu^{2+} ในโมเลกุลบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้โครงสร้างบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูญเสียการทำงานไป ทำให้ลดการสร้างเม็ดสีเมลานินลง มีผลให้ผิวกระจ่างใสขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ (Nakchum & Kim, 2016) ; (Schurink et al., 2007) และ (Zhuang et al., 2009) หรือสารสกัดโปรตีนที่ได้จากการทดลองยังไม่ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์

ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่า การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง (*in vitro*) ควรสัมพันธ์กับการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vivo*) หรือการวัดปริมาณเมลานิน (Melanin content) เพื่อความถูกต้องและน่าเชื่อถือของผลงานวิจัยมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยปี 2009 (Felipe Jimenez & Ph.D., 2009) ได้ศึกษาสารสกัดโอลิโกเปปไทด์ Decapeptide-12 (Lumixyl) (สารกลุ่มโปรตีนที่มีกรดอะมิโนเรียงต่อกัน 12 ตัว) ในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีของภาวะความผิดปกติเมื่อเทียบกับสารไฮโดรควิโนน (HQ) ผลการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดโอลิโกเปปไทด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ดได้ดีกว่าสารไฮโดรควิโนน (**แสดงดังภาพ 19-20**) อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการลดระดับเมลานินภายในเซลล์เมลานอไซต์ของมนุษย์นั้น ณ ความเข้มข้น 10 μM ที่เท่ากัน สารสกัดโอลิโกเปปไทด์และสารไฮโดรควิโนนสามารถลดระดับเมลานินได้ 40% และ 7% ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามเรื่องของ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในมนุษย์และเห็ดบางส่วนยังคงเป็นข้อสันนิษฐานซึ่งอาจมีผลขึ้นอยู่กับสารตั้งต้น L-tyrosine หรือ L-dopa เนื่องจากอาจมีบริเวณเร่ง

ปฏิกิริยาสองแห่งที่แตกต่างกัน กล่าวคือในมนุษย์จะสามารถเกิดได้ทั้งปฏิกิริยา Monophenolase (L-tyrosine) และ Diphenolase (L-dopa) ในขณะที่เอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ดจะสามารถเกิดเพียงปฏิกิริยา Diphenolase (L-dopa) เท่านั้น อีกทั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเห็ดมีอยู่ในไซโตพลาสซึมซึ่งแตกต่างจากไทโรซิเนสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อยู่บนเยื่อหุ้มของเมลานิน (Lai X, 2017 & Kus NJ, 2018) ดังนั้นผลของสารยับยั้งไทโรซิเนสภายในและภายนอกเซลล์เมลานโนไซต์อาจแตกต่างกัน

งานวิจัยก่อนหน้าในปี 2016 ได้มีการสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเทส(เปปไทด์)จากรำข้าว ได้แก่ เปปไทด์ชนิด CT1 (HGGEGGRPY), CT2 (LQPSHY) และ CT3 (HPTSEVY) มาใช้ในการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mTyr) เทียบกับการทำงานของอัลบูติน ทดสอบทั้งสองปฏิกิริยาทั้ง Monophenolase (L-tyrosine) และ Diphenolase (L-dopa) จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยา Monophenolase ที่มี L-tyrosine เป็นสารตั้งต้น เปปไทด์ชนิด CT2 มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดและไปในทิศทางเดียวกับอัลบูติน ในขณะที่ปฏิกิริยา Diphenolase เปปไทด์ที่แยกได้ทั้งหมดไม่สามารถหา IC_{50} ของการยับยั้งได้ หรือความเข้มข้นที่ยับยั้งต่อปฏิกิริยา Diphenolase อาจต้องสูงกว่าความเข้มข้นที่ต้านปฏิกิริยา Monophenolase เป็นต้น ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ปริมาณเมลานิน พบว่าเปปไทด์ CT1 และ CT3 เพิ่มการผลิตเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลานอมา B16 ของหนู ในขณะที่เปปไทด์ CT2 ยับยั้งการผลิตเมลานินได้สูงกว่าร้อยละ 50 ที่ $500 \mu\text{M}$ และมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารมาตรฐานอาร์บูติน (Ochiai A et al., 2016)

และงานวิจัยปี 2009 (Abu Ubeid et al., 2009) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ oligopeptide ทั้งหมด 7 ชนิดจากแหล่งฐานข้อมูล (Internal library) ที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ทั้งเห็ดและมนุษย์ และไม่แสดงพิษต่อเซลล์เมลานโนไซต์ของมนุษย์ โดยเขาาระบุลำดับการยับยั้งที่ออกฤทธิ์สูง 2 ลำดับคือ P3 (RADSRADC) และ P4 (YRSRKYSSWY) ที่มีความยาวกรดอะมิโน 8 และ 10 ตัวตามลำดับ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ดขึ้นอยู่กับขนาดเปปไทด์ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ 123 และ $40 \mu\text{M}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังตรวจสอบการยับยั้งของ P3 และ P4 ที่สัมพันธ์กับไฮโดรควิโนน (HQ) กับเอนไซม์ไทโรซิเนสของมนุษย์โดยใช้สารตั้งต้นต่างกันคือ สารตั้งต้นแรก L-dopa และสารตั้งต้นที่สอง L-tyrosine โดยมี L-dopa เป็นปัจจัยร่วม ผลการทดลองพบว่าโอลิโกเปปไทด์ P3 มีศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่า P4 ของสารตั้งต้น L-dopa ในทางกลับกัน เมื่อใช้ L-tyrosine เป็นสารตั้งต้น ผลชี้ว่า P4 แสดงการยับยั้งที่สูงกว่า P3 ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีสมมติฐานว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจมีไซต์เร่งปฏิกิริยาสองแห่งที่แตกต่างกันสำหรับ L-dopa และ L-tyrosine (Olivares et al., 2001)

มีการรายงานว่าสารจำพวก flavonoids, lignans, และ phenolic acids พบมากในเห็ดทั่วไป เช่น epicatechin gallate, epigallocatechin, caffeic acid, ferulic acid, quercetin, rutin และ avobenzonone เป็นต้น ซึ่งเป็นหนึ่งในสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ป้องกันหรือลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และได้รับการรายงานว่าสามารถลดปริมาณเมลานินและแสดงการยับยั้งไทโรซิเนสซึ่งอาจมีผลต่อการชะลอการสร้างเม็ดสีได้ (Taofiq et al., 2016) โมเลกุลฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่พบใน *P. ostreatus* ได้แก่ *p*-Coumaric acid, Kampeferol และ Apigenin และใน *L. edodes* ได้แก่ Protocatechuic acid และ Quercetin อีกทั้งยังพบ Catechin, Cinnamic acid, *p*-Hydroxybenzoic acid, Gallic acid, Ascorbic acid, Nicoinic acid, Nicotinamide และ Pyridoxine ทั้งใน *P. ostreatus* และ *L. edodes* (Shaza M. Elhusseiny et al., 2021 & M.J. Alves et al., 2013) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายสะดวกและรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH[•] และ ABTS^{•+} เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร โดยเป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอมซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ โดยทั่วไปส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซี เนื่องจาก ABTS^{•+} เป็นอนุมูลอิสระที่สลายตัวให้อนุมูลเปอร์ออกซี ส่วนวิธี DPPH เป็นการวัดความสามารถของสารในการรีดิวซ์ DPPH[•] ไปเป็นอนุมูลไฮโดรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว ไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล ABTS^{•+} (ดวงพร อมรเลิศพิศาล และคณะ, 2551; บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์, 2556) เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าไม่สัมพันธ์กัน สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท DHm, FHm, Fp และ FHp มีสารประกอบฟีนอลิกสูงในขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำตามลำดับ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าผลของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นอาจมีผลมาจากโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ได้จากสารสกัดโดยตรงมากกว่ากลุ่มสารประกอบฟีนอลิกดังกล่าว

ในขณะเดียวกันพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ที่สอดคล้องกัน และยังพบว่า DHm ยังเป็นสารสกัดที่พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีปริมาณต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น (IC₅₀ ABTS: 0.605 µg/µL และ IC₅₀ DPPH: 1.260 µg/µL) โดยชี้ให้เห็นว่าสารสกัดที่ย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการใช้เอนไซม์เปปซิน ซึ่งอาจเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกดังกล่าวที่พบได้ในเห็ด สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารสกัดเห็ดหอมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสามารถมีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) ซึ่งเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลได้ (Praphatsorn Santhi et al., 2016) นอกจากนี้มีสารประกอบประเภทฟีนอลิกที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แล้ว ก็ยังมีสารประกอบประเภทอื่นๆ เช่น กลุ่มโทโคฟีรอล กลุ่มสารไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) กลุ่มสารชอบน้ำ (Hydrophilic) และกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ที่ออกฤทธิ์ได้อีกด้วย (Li et

al., 2010) ทั้งนี้งานวิจัยปี 2016 (Wattanasiritham L et al., 2016) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่มีไลซีนหรืออาร์จินีน (กรดอะมิโนกลุ่ม Hydrophilic) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนประจุบวกที่ปลายสายจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เพราะตรงตำแหน่งหมู่ข้างของกรดอะมิโนมีความสามารถในการให้โปรตอนหรืออิเล็กตรอนแก่มูลของอนุมูลอิสระ จึงทำให้โมเลกุลดังกล่าวกลับมากอยู่ในสภาวะเสถียรไม่เป็นอนุมูลอิสระอีก (Sarmadi & Ismail, 2010)

อีกทั้งผลที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH⁺ และ ABTS⁺ ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งหมดมีค่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระไม่ใกล้เคียงกัน ผลพบค่าต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ในขณะที่ไม่สัมพันธ์กับวิธี DPPH สอดคล้องงานปี 2023 (Rumpf, J et al., 2023) อีกทั้งผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่าต่ำกว่าวิธี ABTS เนื่องจากการทดลอง DPPH เป็น stable radical ทำปฏิกิริยาในตัวทำละลายเมทานอล ขณะที่การทดลอง ABTS ทำปฏิกิริยาในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าด้วยสารละลายตัวกลางที่ต่างกัน ส่งผลต่อค่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระที่ได้ไม่เป็นไปตามกัน โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH อาจเกิดได้จากสารกลุ่ม hydrophobic ในขณะที่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS อาจเกิดได้จาก hydrophilic เป็นต้น จึงอาจสรุปได้ว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เตรียมได้ ประกอบด้วยสารกลุ่ม hydrophilic เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผู้วิจัยได้ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายจึงอาจมีผลทำให้ตัวอย่างละลายได้ดีในน้ำซึ่งจำเพาะกับวิธีการวัดด้วยวิธี ABTS มากกว่า ข้อสังเกตที่แตกต่างกันเหล่านี้ อาจเป็นเพราะองค์ประกอบของกรดอะมิโนและความสามารถในการละลายของเปปไทด์ (Netto and Galeazzi, 1998) จากผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ผลการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกไม่สอดคล้องกัน เนื่องจากเอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าหากเมื่อเทียบกับการใช้มิกซ์เอนไซม์ ในขณะที่มิกซ์เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าหากเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์เปปซิน ซึ่งความจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดส่งผลต่อการย่อยโปรตีนที่ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างกัน และโดยผลสรุปผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสมีฤทธิ์ช่วยต้านอนุมูลอิสระได้ แต่ไม่สามารถเทียบเท่า Trolox หากแต่ต้องทำการกำจัดสีของสารสกัดและเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น เพื่อให้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงมาตรฐานดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซสจากสารสกัดรกแพะของ (อรอนงค์ รักสวนจิก และคณะ, 2559) และสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (Alam, N e al., 2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของดอกเห็ด *Pleurotus ostreatus* ที่สกัดด้วยอะซีโตน เมทานอล และน้ำร้อน ผลพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *P. ostreatus* เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งสารสกัดอะซีโตนมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดอื่นๆ ในการกำจัดอนุมูล DPPH⁺ ในขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถ

ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด แต่สารสกัดด้วยอะซีโตนและน้ำร้อนมีฤทธิ์ปานกลาง อย่างไรก็ตาม *P. ostreatus* อาจมีศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติได้ นอกจากนี้เรื่องของขนาดมวลงของโปรตีนหรือเปปไทด์ อาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยปี 2022 ได้ระบุว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่มีขนาด 1-3 kDa ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} 8.95 mg/mL ในขณะที่ <1 kDa ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดด้วยวิธี ABTS (IC_{50} 0.89 mg/mL) และ 3-10 kDa ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดด้วยวิธี DPPH (IC_{50} 0.85 mg/mL) (Upata, M et al., 2022) ผลลัพธ์เหล่านี้สอดคล้องกับคุณ Mongkonkamthorn ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มี <1 kDa จากเลือดปลาหูฉลามและเนื้อสีเข้มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด (Mongkonkamthorn et al., 2020 & Mongkonkamthorn et al., 2021) และคุณ Zhuang มีรายงานว่าแมงกะพรุนไฮโดรไลเซส (1-3 kDa) 5 mg/mL มีผลยับยั้งไทโรซิเนสที่สูงกว่า 50% รวมทั้งมีฤทธิ์คีเลต Cu^{2+} ที่สูง (Zhuang, Y et al., 2009) ตลอดจนคุณ Prakot ยังรายงานถึงสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากโปรตีนไฮโดรไลเซสของบาบิโลนโดยตรวจพบว่ามีขนาด <5 kDa มีค่า IC_{50} ที่ 0.075 g/mL (Prakot, P et al., 2015) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าขนาดของโปรตีนมีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาใช้กับผิวหนังต้องได้รับการทดสอบพิษต่อผิวหนัง เพื่อป้องกันการเกิดโรค รวมไปถึงการเกิดอาการแพ้ต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นกับผิวหนัง (Khwandow et al., 2017) จำเป็นต้องมีการวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซส ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสหรือสารสกัดเปปไทด์ที่ดีในอนาคต ในการทดลองนี้เลือกเซลล์ HaCaT ซึ่งเป็นเซลล์คีราติโนไซต์ปกติเนื่องจากงานวิจัยของ Cooper และคณะในปี 2014 พบว่าเซลล์คีราติโนไซต์ปกติมีความคงทนต่อ UV น้อยกว่าเซลล์เมลานोไซต์ หากสารสกัดที่ใช้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์คีราติโนไซต์อาจไม่มีผลต่อเซลล์เมลานोไซต์ปกติเช่นกัน (Cooper, K et al., 2014) จากผลการทดลองพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดสดทั้ง FHm, FHp และ Fpp มีอัตราการรอดชีวิตในระดับที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดสดนี้ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์หรือไม่มีมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ในทางตรงข้ามเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์ (DHm) ทำให้การเจริญของเซลล์ HaCaT ต่ำลงหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/mL เป็นต้นไป สอดคล้องงานวิจัยปี 2016 ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากตระกูลเห็ด oyster โดยพบว่าสารสกัดที่ฉายรังสีและไม่ฉายทั้งสองชนิด ไม่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์คีราติโนไซต์ (HaCaT) แต่ในทางกลับกันสามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์เมลานอมา Murine (B16F10) ได้ (แสดงดังภาพ 34) (N. Banlangsawan et al., 2016) งานวิจัยในปี 2016 ได้มีการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซส(เปปไทด์) จากร้าขาวทดลองกับเซลล์เมลานอมาและนำไปวัดอัตราการอยู่รอด

ของเซลล์โดยวิธี MTT assay เพื่อหาความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันของ CT2 มีอัตราการอยู่รอดของเซลล์สูงที่สุดในขณะที่อัลบูตินมีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด หมายความว่าอาร์บูตินมีผลเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับสารสารสกัดเปปไทด์ (แสดงดังภาพ 21) (Ochiai A et al., 2016) และงานวิจัยปี 2009 ได้ศึกษาสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ Decapeptide-12 (Lumixyl) นำไปทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง พบว่าร้อยละของเซลล์ตายเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิด แต่สารไฮโดรควิโนนมีร้อยละการตายของเซลล์สูงกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ (Felipe Jimenez&Ph.D., 2009) จากข้อมูลทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซส (เปปไทด์) มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ สามารถรับรองว่าผลิตภัณฑ์นี้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคก่อนที่จะมีการผลิตออกสู่ท้องตลาดได้

จากการนำแถบโปรตีนขนาดเล็กกว่า 6.5 kDa มาส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (LC-MS) พบลำดับเปปไทด์ที่สนใจ 5 สาย (แสดงดังตาราง 16) โดยการคัดเลือกเปปไทด์นี้เนื่องจากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าเปปไทด์ลำดับที่ 1 PATVSIPGV (Pro-Ala-Thr-Val-Ser-Ile-Pro-Gly-Val) จากตัวอย่าง Fpp มีความเหมือนมากกว่า 90% กับ *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom) (White-rot fungus) ซึ่งโปรตีน Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) ซึ่งมีหน้าที่การจับกับไอออนทองแดงและ hydroquinone: oxygen oxidoreductase activity โดยทองแดงเหล่านี้เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นต่างๆ และเปปไทด์ลำดับที่ 2 LTLEEGESVG (Leu-Thr-Leu-Glu-Glu-Gly-Glu-Ser-Val-Gly) จากตัวอย่าง Fpp และเปปไทด์ลำดับที่ 3 LGERTLDEI (Leu-Gly-Glu-Arg-Thr-Leu-Asp-Glu-Ile) จากตัวอย่าง Fhp เป็น Uncharacterized protein หรือยังไม่มีรายงานระบุอย่างชัดเจน แต่ผู้วิจัยพบว่าจากลำดับเปปไทด์ประกอบไปด้วยกรดกลูตามิก (Glu) ภายในสาย สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2022 ที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซสจากแมงกะพรุน (*Lobonema smithii*) โดยเขาพบว่ากรดอะมิโนของ JFFH ที่ประกอบด้วย Gly, Ala, Glx (Gln + Glu), Alx (Asn + Asp) และ Pro เป็นกรดอะมิโนที่มีมากที่สุดใน JFFH ซึ่งคิดเป็นประมาณ 18, 14, 13, 9 และ 9% ขององค์ประกอบกรดอะมิโนทั้งหมดตามลำดับ โดยเฉพาะกรดอะมิโน Asn + Asp และ Gln + Glu พบมากถึง 5.00 และ 6.96 กรัมของกรดอะมิโน/100 กรัมของตัวอย่าง (Upata, M et al., 2022) อีกทั้งจากงานวิจัยปี 2009 การศึกษากรดอะมิโนและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus sajor-caju* เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนพบว่าเห็ดทั้งสองชนิดมีปริมาณกรดอะมิโนกลูตามิก สูงที่สุด (Glu) และรองมาคือกรดแอสปาร์ติก (Asp) และอาร์จินีน (Arg) ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้อาจบอกถึงความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Chirinang, P., & Intarapichet, K 2009)

งานวิจัยปี 2019 ค้นพบสารยับยั้งไทโรซิเนสชนิดใหม่ ซึ่งเป็นเพปไทด์ ECGYF (EF-5) ที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ และผลของการยับยั้งไทโรซิเนสพบว่าความสามารถของ EF-5 ในการยับยั้งการผลิตเมลานินที่เร่งปฏิกิริยาโดยไทโรซิเนสสามารถยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งสูงกว่าเมื่อเทียบกับอาร์บูตินและกลูตาไธโอน (IC_{50} : 0.46 mM, 5.73 mM และ 1.18 mM ตามลำดับ) อีกทั้งเปปไทด์ ECGYF (0.5 ถึง 1 mM) ลดปริมาณเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเทียบกับอาร์บูตินหรือกลูตาไธโอนโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (Shen, Z et al., 2019) และงานวิจัยปี 2018 เปรียบเทียบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโปรตีนจากรำข้าวไฮโดรไลสเสท ได้แก่ อัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลิน และโพรลามิน และพบว่าอัลบูมินแสดงฤทธิ์การยับยั้งที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับโปรตีนอื่นๆ ในบรรดาเปปไทด์จากรำข้าว พบว่าลำดับเปปไทด์ SSEYYGGESSSEQGYGEG แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด (IC_{50} : 1.31 mg/mL) เปปไทด์นี้ยังแสดงฤทธิ์คีเลตคอปเปอร์ (IC_{50} : 0.62 mg/mL) ซึ่งแรงกว่า EDTA (IC_{50} : 1.06 mg/mL) (Kubglomsong, S et al., 2018) โดยจะเห็นว่าภายในสายเปปไทด์เหล่านี้พบกรดอะมิโนกลูตามิก (E) ซึ่งสอดคล้องกับเปปไทด์ลำดับที่ 2 และ 3 จากตัวอย่าง FpP และ FHp ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน บ่งชี้ว่าเปปไทด์เหล่านี้อาจใช้เป็นตัวยับยั้งไทโรซิเนสที่มีศักยภาพในเครื่องสำอางหรือเพื่อรักษาความผิดปกติของผิวหนังได้ (Shen, Z et al., 2019) และงานวิจัยปี 2020 วิเคราะห์เปปไทด์ที่ได้จากเห็ดที่กินได้: *Hericium erinaceus* ต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและกระตุ้นการตายของเซลล์ในเซลล์มะเร็งปอดในมนุษย์ ยังให้ผลพบว่าในบรรดากรดอะมิโนใน *H. erinaceus* พบกลูตามิก (Glu) เป็นที่แพร่หลายมากที่สุด รองลงมาคือไลซีน (Lys) และแอสปาร์ติก (Asp) ซึ่งบอกถึงความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และยังพบกรดอะมิโนบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Phe, Tyr, Cys และ Met สามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ได้ค่อนข้างเฉพาะทั้งนี้กรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก เช่น กลุ่มอินโดลิกของกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Trp) หรือ กลุ่มอิมิดาโซลของกรดอะมิโนฮิสทีดีน (His) เพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ผ่านการให้ไฮโดรเจนได้ให้กับอนุมูลที่ขาดอิเล็กตรอน นอกจากนี้กลุ่ม -SH ของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระได้ (Sangtitanu, T et al., 2020)

เปปไทด์ลำดับที่ 4 SVTPATIPPY (Ser-Val-Thr-Pro-Ala-Thr-Ile-Pro-Pro-Tyr) จากตัวอย่าง FHm เป็น Uncharacterized protein หรือยังไม่มีรายงานระบุอย่างชัดเจน และเปปไทด์ลำดับที่ 5 VGGLPGGG (Val-Gly-Gly-Leu-Pro-Gly-Gly-Gly) จากตัวอย่าง DHm มีความเหมือนกับ *Lentinus tigrinus* ALCF2SS1-7 มีชื่อโปรตีน Glycoside hydrolase family 16 protein ซึ่งเปปไทด์ทั้งสองสายผู้วิจัยพบว่ามีค่า Free-radical scavenging (FRS) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับลำดับอื่น เปปไทด์ทั้งสองสายนี้จึงมีความน่าสนใจต่อการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจให้เปปไทด์ลำดับที่ 1-3

จากตัวอย่าง Fp และ Fhp เป็นลำดับที่มีความน่าสนใจต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขณะที่เปปไทด์ลำดับที่ 4-5 จากตัวอย่าง FHm และ DHm เป็นลำดับที่มีความน่าสนใจต่อการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS เบื้องต้น จากลำดับเปปไทด์สังเคราะห์ VGGLPGGG จากตัวอย่าง DHm และ PATVSIPGV, LTLEEGESVG จากตัวอย่าง Fp ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 82, 82 และ 76 และยังสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH^{•+} เท่ากับร้อยละ 7, 9 และ 9 และ ABTS^{•+} เท่ากับร้อยละ 14, 15 และ 16 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง.) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์เหล่านี้อาจเป็นเปปไทด์ชนิดใหม่ที่น่าสนใจและมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

การออกแบบโมเลกุล (Molecular Docking) คือการศึกษาการเข้ายึดจับกันของโมเลกุลและศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลตัวยับยั้งหรือลิแกนด์ (Ligand) กับตำแหน่งปฏิกิริยาหรือบริเวณ Binding Site ของตัวรับ (Receptor) หรือโมเลกุลเป้าหมายของเอนไซม์ไทโรซิเนส อีกทั้งยังสามารถศึกษาโครงสร้างเกี่ยวกับการออกฤทธิ์และความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลลิแกนด์แบบ 3 มิติ (3D Quantitative Structure Activity Relationships) โดยมีทั้งการเข้าจับกันของโปรตีน-โปรตีน Protein-Protein Docking และ Protein-Ligand Docking (Morris & Lim-Wilby, 2008) ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและลิแกนด์ IPGV (PATVSIPGV) และ TLEE (LTLEEGESVG) จากตัวอย่าง Fp มีเท่ากับ 59.92 และ 79.07 ตามลำดับ ซึ่ง TLEE มีค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) ที่ดีกว่า IPGV ผลนี้สอดคล้องกับการทดสอบในหลอดทดลองซึ่งคาดว่าจะเป็นหนึ่งในลำดับที่สามารถช่วยส่งเสริมการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีเช่นกัน โดย IPGV จับกับ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนสมี interaction 7 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Conventional hydrogen bond, Pi-lone pair, Pi-Alkyl, Alkyl และ Metal-acceptor ในขณะที่ TLEE มี interaction 4 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Conventional hydrogen bond และ Metal-acceptor แต่อาจให้การจับที่แข็งแรงกว่า (แสดงดังภาพ 64B-65B) ทั้งยังเห็นว่า GLU3 ของสาย TLEE สามารถจับกับ Cu ได้ถึง 2 อะตอมด้วยพันธะ Metal-Acceptor ซึ่งอะตอมของ TLEE ทำการจับอย่างใกล้ชิดกับไอออนของทองแดงในบริเวณที่ทำงานของไทโรซิเนส หมายความว่า TLEE อาจทำหน้าที่เป็นคีเลเตอร์จับกับทองแดงเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทั้งนี้องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเห็ดตระกูล *Pleurotus* พบว่าโปรตีนประกอบด้วยกลูตามิก (Glu) สูงที่สุด (Chirinang, P., & Intarapichet, K 2009) และงานวิจัยปี 2020 และ 2022 รายงานว่ากลูตามิกมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเอนไซม์เอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นต้น และ

ผลนี้เป็นไปในทิศทางเดียวจากผลการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผู้วิจัยที่พบว่าสารสกัด FpP ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด และสอดคล้องการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน ตลอดจนการศึกษา Docking ที่พบว่าสารสกัดที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินจะประกอบด้วยกลูตามิก (E) ภายในสายจึงมีผลต่อการออกฤทธิ์ที่ดีที่สุด ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์ยังพบ GLU3 มีปฏิสัมพันธ์กับกรดอะมิโน HIS85 และ HIS61 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกจับกับไอออนของคอปเปอร์ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส สอดคล้องกับปี 2017 คณะวิจัยของคุณชาแมนและมูฮัมมัด ได้ศึกษาการจับกันของโมเลกุลหรือโมเลกุลาร์ตอกกิ้งของอนุพันธ์ Carvacrol เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (2Y9X) พบว่า 2-hydroxy group of cinnamic acid ในอนุพันธ์ 4c และ 6c และมีปฏิสัมพันธ์กับกรดอะมิโน His85 ของโปรตีนเป้าหมายเช่นเดียวกัน ซึ่งมีรายงานว่ากรดอะมิโนนี้พบในบริเวณที่มี active binding site และมีความสำคัญต่อกระบวนการ downstream signaling pathways ดังนั้นอนุพันธ์ 4c และ 6c จาก Carvacrol สามารถพัฒนาการออกแบบเป็นตัวแทนเครื่องสำอางใหม่ต่อไปได้ (Ashraf et al., 2017) อีกทั้งการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและลิแกนด์ RHAKF แสดงค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยมี interaction 5 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Attractive charge, Pi-lone pair และ Pi-Pi stacked (**แสดงดังภาพ 63B**) ผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าจับด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน 4 กรดอะมิโน ได้แก่ GLU322, HIS29, VAL283 และ GLY281 ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัย Denga และคณะในปี 2020 พบว่า docking site ภายในสายลำดับเปปไทด์ RHAKF เชื่อมกับเอนไซม์ไทโรซิเนส 6 พันธะ ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Conventional hydrogen bond, Pi-Alkyl, Pi-cation และ Unfavorable Donor-Donor (**แสดงดังภาพ 39D**) โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ RHAKF จับด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน 12 กรดอะมิโน ได้แก่ ASP336, GLN74, GLN351, GLU340, HIS76, THR324, TYR343, GLU97, ILE96, LEU59 และ TYR62 อีกทั้งสาย RHAKF จับกับ HIS85 ที่บริเวณ Active site ได้ถึง 3 ตำแหน่ง (AC8, BC3, BC7) ดังนั้นการมีเปปไทด์เข้าไปในบริเวณสำคัญที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาศูนย์กลางของเอนไซม์ไทโรซิเนสนี้ จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยขัดขวางการเข้าถึงของสารตั้งต้นไปยังพื้นที่ใช้งานของไอออนทองแดง (Denga et al., 2020) ตลอดจนการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและลิแกนด์ LGER (LGERTLDEI) จากตัวอย่าง FHp มีค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยมี interaction จับกับ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส 7 ชนิด ได้แก่ Carbon hydrogen bond, Van der Waals, Conventional hydrogen bond, Metal-acceptor, Pi-cation, Pi-donor hydrogen bond และ Pi-lone pair (**แสดงดังภาพ 66B**) โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ LGER จับกับ HIS259, ASN260, GLU256, HIS263, HIS296, GLY281 และ PHE264 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจนเป็นหลัก ทั้งยังเห็นว่า GLU สามารถจับกับ Cu ได้ถึง 2

อะตอมด้วยพันธะ Metal-Acceptor และ GLU สามารถจับกับ HIS259, HIS263 และ HIS296 ด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งมีอยู่ในตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส ตามรายงานของ Biswas และคณะปี 2017 ระบุว่าสารรีดิวซ์ที่จับกับพันธะไฮโดรเจนมีบทบาทสำคัญต่อความสัมพันธ์ในการจับซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสถูกยับยั้ง (Biswas et al., 2017) ทั้งนี้ในปี 2017 คณะวิจัยของคุณซาแมนและมุฮัมมัด มีรายงานว่าเอสเทอร์คาร์บอนิลออกซิเจนในสารประกอบมีปฏิสัมพันธ์กับ HIS284 และ GLU256 ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้พบในบริเวณที่มี active binding site และมีความสำคัญต่อกระบวนการ downstream signaling pathways (Ashraf et al., 2017) สอดคล้องกับงานของผู้วิจัยที่พบว่า LGER มีปฏิสัมพันธ์กับ GLU256 เช่นเดียวกัน

งานวิจัยก่อนหน้านี้ (Shen et al., 2019) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลระหว่างเปปไทด์ ECGYF (EF-5) ที่ประกอบด้วย Glu-Cys-Gly-Tyr-Phe พบว่ามีปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) ผ่านพันธะไฮโดรเจนที่ TYR65, ASP260, HIS263 และ MET280 ระหว่างอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิลใน MET280 และอะตอมของไฮโดรเจนของหมู่ฟีนอลไฮดรอกซิลในไทโรซีน (Tyr) บนสายเปปไทด์ EF-5 เมื่ออะตอมออกซิเจนของไทโรซีน สร้างพันธะกับอะตอมไฮโดรเจนของ HIS263 จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (HIS263 ที่ตกค้างจะจับกับไอออนทองแดงโดยตรง) จึงไปยับยั้งการสร้างเมลานินได้ ทั้งนี้วงแหวนเบนซีนของไทโรซีนบนสายเปปไทด์ EF-5 ผ่านการทำอันตรกิริยาที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) กับ PHE264 และ PRO284 ซึ่งอาจปิดกั้น hydrophobic pocket ของเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้ความสามารถในการไม่ชอบน้ำลดลง (Mu Y, Li L, Hu SQ., 2013) ทั้งนี้ยังพบไกลซีน (Gly) บนสายเปปไทด์ EF-5 ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กับ ASN260 สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบ HIS263 และ ASN260 เชื่อมกับลิแกนด์ RHAKF, IPGV, TLEE และ LGER เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งลิแกนด์ LGER และ IPGV ที่พบว่ามีไกลซีน (Gly) บนสายจับอยู่กับ ASN260 ซึ่งอาจส่งผลให้ความสามารถในการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลงได้

อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้วิเคราะห์การทำงาน Molecular Docking ผ่านแบบจำลองเอนไซม์ไทโรซิเนส จากเห็ด (PDB ID: 2Y9X) ซึ่งผลการทำนายอาจให้ความแตกต่างกับแบบจำลองเอนไซม์ไทโรซิเนสจากมนุษย์ ยกตัวอย่างงานวิจัยปี 2015 ได้ระบุถึงความแตกต่างที่สำคัญระหว่างแบบจำลองเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดและมนุษย์ คือปฏิสัมพันธ์ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen-bonding) ที่เกิดจากสารตกค้างของบริเวณเร่งปฏิกิริยา H244, E256 และ F264 ของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ดไม่พบในสารตกค้างของบริเวณเร่งปฏิกิริยาเกี่ยวข้อง P505, S515 และ I523 ของเอนไซม์ไทโรซิเนสในมนุษย์ โดยสารสกัด bis(4-hydroxybenzyl)sulfide (T1) แยกได้จากพืชสมุนไพรจีน *Gastrodia elata* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ดอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีประสิทธิภาพสูงต่อการลดการผลิตเมลานินของเซลล์เมลานโนไซต์ของมนุษย์ ซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัด T1 อาจมีความเฉพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ดมากกว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสของ

มนุษย์อย่างแตกต่างกัน แต่เป็นที่น่าสนใจเมื่อนำมาทดลอง *in vivo* โดยใช้ปลาสมาหลายกลับพบว่าสารสกัด T1 สามารถลดระดับเมลานินได้ดีกว่าอาร์บูตินและกรดโคจิก (Chen, W. C et al., 2015)

การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งของเอนไซม์โดยสังเกตด้วยปฏิกิริยาการยับยั้งกิจกรรมจำเพาะของ o-diphenolase ผลการศึกษาเผยให้เห็นว่ากลไกการยับยั้งของ Fpp เป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) ตัวยับยั้งและสารตั้งต้นจะสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ตลอดเวลาโดยจับคนละตำแหน่งกัน โดยเข้าจับได้ทั้งสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น (ES complex) และเอนไซม์อิสระ (E) หรือกล่าวอีกอย่างหนึ่งว่าตัวยับยั้งชนิดนี้สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้โดยไม่สนใจว่ามีสารตั้งต้นจับอยู่กับเอนไซม์หรือไม่ นอกจากนี้ตัวยับยั้งจะไม่รบกวนการจับของสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง แต่จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้ catalytic group ของเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ จึงเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้น้อยลงหรือเปลี่ยนไม่ได้เลย จึงเป็นเหตุให้ค่า V_{max} ลดลง แต่ไม่มีผลต่อค่า K_m

งานวิจัยก่อนหน้าปี 2017 ได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านการสร้างเม็ดสีผิวของ 3,8-dihydroxyquinoline (jineol) ที่แยกจาก *Scolopendra subspinipes mutilans* สามารถยับยั้งการผลิตและออกซิเดชันของเมลานินในเซลล์ Melan-a และสามารถยับยั้งกิจกรรมไทโรซิเนสของเห็ด โดยมี IC_{50} เท่ากับ $39.46 \pm 0.01 \mu M$ และ $50.35 \pm 0.05 \mu M$ สำหรับสารตั้งต้น L-tyrosine และ L-DOPA ตามลำดับ ในขณะที่อาร์บูตินมี IC_{50} เท่ากับ 296.63 ± 0.01 อีกทั้งยังแสดงผลของยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ดอย่างมีนัยสำคัญผ่านการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) (M.B. Alam et al., 2017) และงานวิจัยปี 2019 พบสาร Caffeine ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์จากละอองเรณูของดอกเคมีเลีย แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ดอย่างเข้มข้นด้วยค่า IC_{50} $18.5 \pm 2.31 \mu g/mL$ ผ่านการยับยั้งชนิดไม่แข่งขัน (noncompetitive) การจำลองการจับกันของโมเลกุลแสดงให้เห็นว่า Caffeine จับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสผ่าน LYS379, LYS376, ASP357, GLU356, THR308, GLN307, ASP312 และ TRP358 โดยมีการเปลี่ยนตำแหน่งการจับของ L-tyrosine และโครงสร้างวงแหวนที่อยู่ติดกับศูนย์กลางที่ใช้งาน โดยจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนส ผลการทดลองพบว่า Caffeine มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์และแสดงการสร้างเมลานินของเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด B16F10 นั้นสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่ใช้ ซึ่งผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า Caffeine เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา หรือเป็นสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในอนาคตได้ (Y. Yang, X et al., 2019)

ในขณะที่การยับยั้งของ Kojic acid, RHAKEF, FHm และ FHp สามารถเข้าจับได้กับทั้งเอนไซม์อิสระ (E) หรือ ES complex ได้เช่นเดียวกัน แต่เมื่อภายหลังจากที่ตัวยับยั้งเข้าจับแล้ว มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ทำให้ affinity ของเอนไซม์ต่อซับสเตรตเปลี่ยนแปลงไป ซึ่ง

อาจจะทำให้สารเชิงซ้อนเอนไซม์-ตัวยับยั้ง (EI complex) จับกับซับสเตรตได้มากขึ้นหรือลดลงจากเดิม ดังนั้นจึงเรียกตัวยับยั้งนี้ใหม่เป็น mixed type inhibitor เป็นการยับยั้งแบบผสมชนิดแบบแข่งขัน/ไม่แข่งขัน (competitive/noncompetitive) การยับยั้งแบบผสมนี้ตัวยับยั้งจะสามารถจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งเดียวกับซับสเตรต ส่งผลให้ค่า V_{max} และ K_m อาจคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงได้นอกจากนี้งานวิจัยยังได้ใช้เปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF, และกรดโคจิกเป็นชุดการทดลองควบคุมผลบวก ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับ คุณ Yan-Mei Chen ปี 2019 และคุณ Wei wang ปี 2022 พบการวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์ของกรดโคจิกเป็นการยับยั้งเป็นการยับยั้งแบบผสม (mixed inhibition) เช่นเดียวกัน

ตลอดจนการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ที่พบในกรณีของ DHm อาจสันนิษฐานได้ว่าการยับยั้งลักษณะนี้ตัวยับยั้งมีหมู่ฟังก์ชันบางตำแหน่งคล้ายกับซับสเตรต (S) จึงสามารถแย่งเข้าจับกับบริเวณเร่ง (active site) บนเอนไซม์ได้ การยับยั้งแบบแข่งขันนี้สามารถผันกลับได้ (reversible) เพราะว่าตัวยับยั้งและสารตั้งต้นพยายามแข่งขันแย่งกันเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ หากตัวใดมีความเข้มข้นมากกว่า ก็จะเข้าจับได้ดีกว่า และการยับยั้งแบบนี้เป็นการยับยั้งแบบย้อนกลับได้ โดยการกำจัดตัวยับยั้งออกไปจากสารละลาย หรือโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงกว่าจะเข้าแย่งจับที่บริเวณเร่งทำให้ตัวยับยั้งหลุดออกไปจากบริเวณเร่ง กลไกการยับยั้งชนิด competitive inhibition ตัวยับยั้งจะรบกวนการเข้าจับของซับสเตรตบนตำแหน่งจับของเอนไซม์ เป็นเหตุให้ค่า K_m เพิ่มสูงขึ้น โดยไม่ผลกระทบต่อค่า V_{max}

การใช้ยีนมาตรฐาน ITS region (Internal transcribed spacer) ที่ ถูกใช้เป็นบาร์โค้ดสากลเพื่อระบุสายพันธุ์ของเห็ดที่เป็นยาและกินได้ นิวเคลียร์โรโบโซมอลไอทีเอส (nrITS) คือ ส่วนหนึ่งของ nucleolar organizer region (NOR) เป็นบริเวณซ้ำๆ ของ rDNA ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ระหว่าง ribosomal RNAs (rRNA) gene เป็นส่วนที่ไม่มีหน้าที่ แต่เป็นส่วนที่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ (Hao et al., 2010) นิยมใช้เป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสในกลุ่มฟังไจ โดย ITS คือนิวเคลียร์โรโบโซมอลที่จะถูก translation ออกมาเป็น main function ในเห็ดทุกชนิดต้องมี เช่น เป็นโปรตีนที่พบในดอกเห็ด (Yan et al., 2016) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA บริเวณ ITS ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเห็ดแต่ละชนิด เนื่องจาก ITS เป็นบริเวณที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง จึงเหมาะที่นำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ (Bruns et al., 1992; White et al., 1990; Turenne et al., 2000) ยกตัวอย่างการใช้ในส่วนของโรโบโซมอลดีเอ็นเอมาจัดจำแนกเห็ด สกุล *Phellinus* (Fischer and Binder 2004, Jeong et al., 2005) เช่น *Phellinus igniarius*, *Phellinus torulosus* (Tomsovsky et al., 2007) *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* (Park et al., 2013) *Xylariales* (Walter et al., 2011) *Pleurotus cystidiosus* (Georgios et al., 2004) *Pleurotus*

eryngii (Ro et al., 2007) เป็นต้น ในการทดลองนี้ใช้ ITS4-5 ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณระหว่าง small-large nuclear rDNA และ 5.8 rDNA สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้จำเพาะกว่า ยกตัวอย่าง งานวิจัยที่สำหรับระบุสายพันธุ์ *Lepista* หรือกลุ่มเชื้อราที่ก่อตัวเป็นเห็ด (Tricholomataceae, Basidiomycota) จากประเทศจีน โดยใช้ primer ITS4-5 เป็นหลัก (Wang S et al., 2019)

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดโดยใช้ ITS region (Internal transcribed spacer) gene ด้วยไพรเมอร์ ITS5-Forward และ ITS4-Reverse พบว่าตัวอย่างจากเห็ดหอมแห้ง เห็ดหอมสด และเห็ดเป่าฮื้อสด มีการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600-800 คู่เบส สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2020 ของคุณ Toshinungla Ao และคณะ โดยใช้ ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 เพื่อระบุลักษณะในเห็ดหอมและเห็ดป่าชนิดอื่นๆ ที่รับประทานได้ของนาคาแลนด์ ประเทศอินเดีย โดยพบการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 500 และ 800 คู่เบส และงานวิจัยในปี พ.ศ. 2543 ของคุณเตี้ย อารุง พบการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอของเห็ดในกลุ่มจีส *Boletus* ที่ขนาดประมาณ 550-800 คู่เบสเช่นเดียวกัน ในการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้พื้นฐานของ sequence similarity และ Phylogenetic analysis โดยข้อมูลลำดับเบสเมื่อทำการ Blast เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าบริเวณ ITS4 สามารถระบุความเหมือน (identity) ชนิดของเห็ดหอม (*L. edodes*) ได้คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ CC7 (MK940837) มากกว่าร้อยละ 99 ทั้งชนิดดอกเห็ดแห้งและสด (**แสดงดังภาพ 77, 79**) ในขณะที่ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์เห็ดเป่าฮื้อ (*P. cystidiosus*) ได้คล้ายคลึงกับ *P. cystidiosus* isolate XH004 small subunit ribosomal RNA gene (MW947478.1), *P. cystidiosus* isolate XH006 small subunit ribosomal RNA gene (MW947480.1), *P. cystidiosus* isolate XH008 small subunit ribosomal RNA gene (MW947482.1), *P. cystidiosus* var. formosensis CBS 100129 (NR103594.1), *P. cystidiosus* สายพันธุ์ S396 clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882573.1), CGMCC 3.7470 small subunit ribosomal RNA gene (KX787086.1) และ Blao clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882571.1) มากกว่าร้อยละ 94 ตามลำดับ (**แสดงดังภาพ 81**) ดังนั้น ITS สามารถจำแนกเห็ดได้อย่างถูกต้องและสอดคล้องกับระบบอนุกรมวิธานของเห็ดและยังสามารถแยกเห็ดแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องศึกษาดีเอ็นเอ ควบคู่กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา การมองด้วยตาเปล่า เช่น รูปร่าง กลิ่น และสี อาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกให้ถูกต้อง เนื่องจากความผันแปรของลักษณะภูมิศาสตร์จะมีผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยา และดีเอ็นเอ ซึ่งจะเป็นเครื่องหมายบาร์โค้ดของเห็ดในแต่ละท้องถิ่นต่อไป

สรุปผลการวิจัย

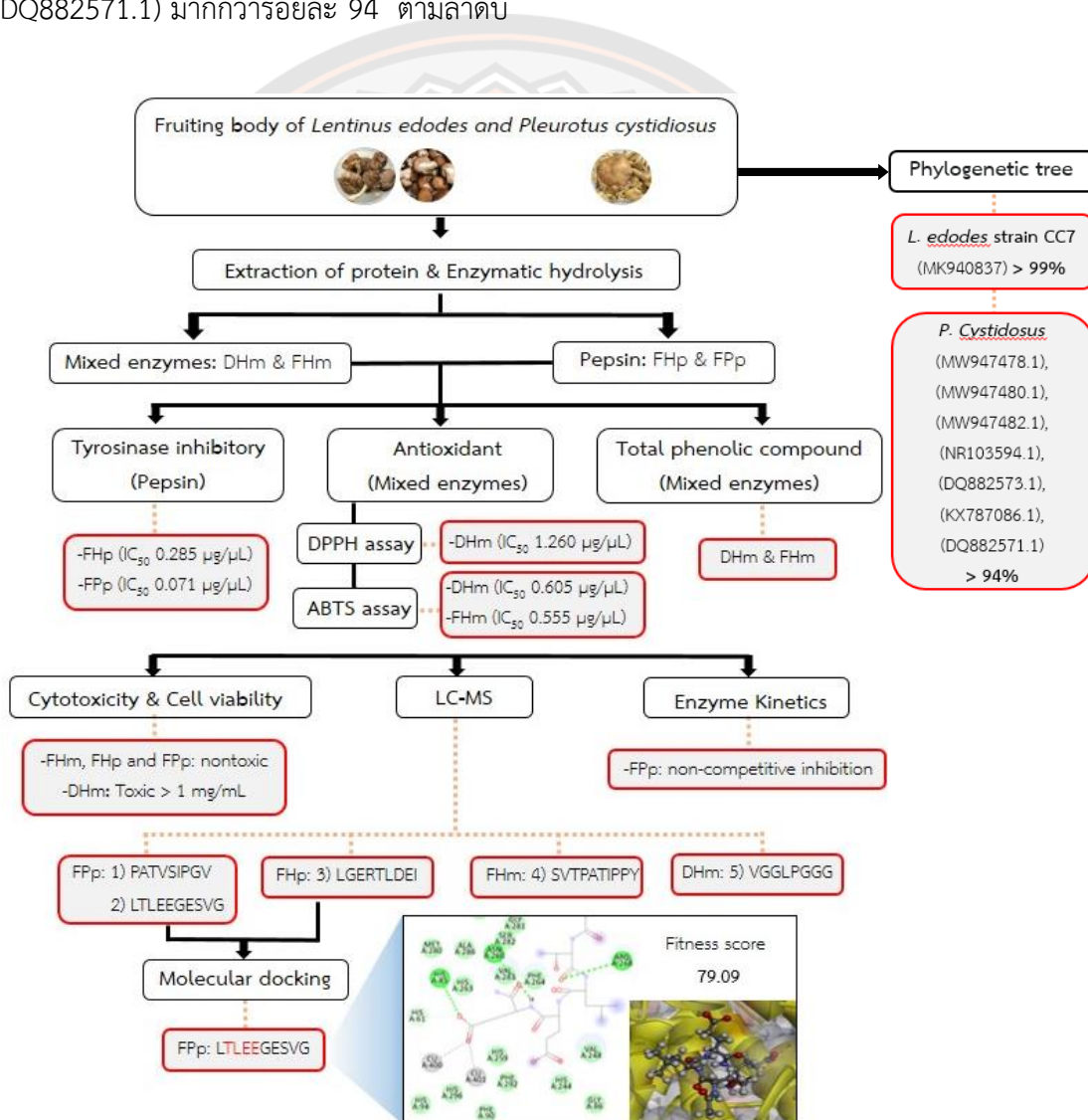
จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท (PH) จากเห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (FHm) และเอนไซม์เปปซิน (FHp) เห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) และเห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (FPp) สารสกัดทั้งหมดถูกย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถูกตรวจสอบขนาด Tricine (SDS-PAGE) และวัดระดับการย่อยสลาย (%DH) พบว่าเปปไทด์มีขนาดเล็กกว่า 6.5 kDa โดยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยโดยใช้มิกส์เอนไซม์มีค่าระดับการย่อยสลายสูงกว่าการใช้เอนไซม์เปปซินเพียงชนิดเดียว (DHm 87%, FHm 86%, FHp 48% และ FPp 68%)

สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท FPp มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (IC_{50} 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) เทียบกับเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF (IC_{50} 0.69 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) และ kojic acid (IC_{50} 0.047 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) อีกทั้ง FPp มีพฤติกรรมทางจลนศาสตร์พบว่า เป็นชนิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขันหรือ (noncompetitive) ในขณะที่สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท DHm พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น (IC_{50} โดยวิธี DPPH 1.260 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ และวิธี ABTS 0.605 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) จากผลการทดลองเห็นได้ว่าความจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดและสารตั้งต้นโปรตีนในเห็ดแต่ละชนิดส่งผลต่อการย่อยโปรตีนที่ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างกัน โดยผลสรุปได้ว่าเอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขณะที่มิกส์เอนไซม์อาจช่วยเรื่องต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ทั้งยังพบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดสดทั้ง FHm, FHp และ FPp มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (HaCaT) หรือไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในทางตรงข้ามเห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์ (DHm) มีอัตราการรอดของเซลล์ต่ำลงหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/mL เป็นต้นไป

ผลวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบลำดับเปปไทด์ที่สนใจ 5 สาย ได้แก่ เปปไทด์ลำดับที่ 1 PATVSIPGV และเปปไทด์ลำดับที่ 2 LTLEEGESVG จากตัวอย่าง FPp และเปปไทด์ลำดับที่ 3 LGERTLDEI จากตัวอย่าง FHp เป็นลำดับที่มีความน่าสนใจต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเปปไทด์ทั้ง 3 สายแสดงการจำลองการจับกันผ่านเทคนิค Molecular docking พบว่าการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและลิแกนด์ TLEE (LTLEEGESVG) มีการจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดในขณะที่เปปไทด์ลำดับที่ 4 SVTPATIPPY จากตัวอย่าง FHm และเปปไทด์ลำดับที่ 5 VGGLPGGG จากตัวอย่าง DHm เป็นลำดับที่มีความน่าสนใจต่อการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทมีประสิทธิภาพยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านอนุมูลอิสระได้ และสามารถพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีศักยภาพเป็นเครื่องสำอางและยาได้ในอนาคต

และผลการทดลองการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดโดยใช้ ITS region สามารถจำแนกสายพันธุ์ดอกเห็ดหอมและเห็ดเป่าฮื้อ โดยระบุความเหมือน (identity) ชนิดของเห็ดหอม (*L. edodes*) ได้คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ CC7 (MK940837) มากกว่าร้อยละ 99

ในขณะที่ความเหมือน (identity) ชนิดของเห็ดเป่าฮื้อสด (*P. cystidiosus*) ได้คล้ายคลึงกับ *P. cystidiosus* isolate XH004 small subunit ribosomal RNA gene (MW947478.1), *P. cystidiosus* isolate XH006 small subunit ribosomal RNA gene (MW947480.1), *P. cystidiosus* isolate XH008 small subunit ribosomal RNA gene (MW947482.1), *P. cystidiosus* var. *formosensis* CBS 100129 (NR103594.1), *P. cystidiosus* สายพันธุ์ S396 clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882573.1), CGMCC 3.7470 small subunit ribosomal RNA gene (KX787086.1) และ Biao clone B 18S ribosomal RNA gene (DQ882571.1) มากกว่าร้อยละ 94 ตามลำดับ



ภาพ 82 แผนภาพสรุปผลงานวิจัย

ข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท (PH) จากดอกเห็ดหอมและเห็ดเป่าฮื้อที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ดระดับหลอดทดลอง พบว่ามีข้อเสนอแนะดังนี้

1. สารสกัดเปปไทด์ที่เตรียมได้จากผงเห็ดหอมมีกลิ่นค่อนข้างแรง ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี รวมถึงวิธีการกำจัดกลิ่นของสารสกัด
2. ศึกษาความคงตัวทางชีวภาพและความเสถียรของสารสกัด เป็นต้น
3. ศึกษาการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทในการทดสอบเพื่อให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น
4. ศึกษาการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vivo*) หรือการลดระดับปริมาณเมลานิน (Melanin content)
5. วิเคราะห์เทคนิค Molecular docking โดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสจากมนุษย์เป็นแบบจำลอง
6. นำลำดับเปปไทด์ที่สนใจมาสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาจลนศาสตร์เทียบกับสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทอีกครั้ง
7. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน (amino composition) ในแหล่งเห็ดที่นำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งข้อมูลให้กับนักวิชาการทั่วไป

บรรณานุกรม



1. จันทร์สุดา จรรย์วัฒนวิจิตร, อภิญญา จุฑาทงกูร และ จันทร์เพ็ญ แสงประกาย. (2554). ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีผลต่อรสชาติในเห็ดหอมสดที่ผลิตจากภาคเหนือของประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 42(ฉบับพิเศษ 1): 171-174.
2. จารุภา วิโยชน์. (2560). ตัวชี้วัดทางชีวภาพของเซลล์ผิวหนัง จากความรู้พื้นฐานสู่การนำไปประยุกต์ใช้เพื่อประเมินเวชสำอาง. *พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร*, 520 หน้า.
3. ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรัตน์ และสนทยา ลิ้มมัทวาทิรัตน์. (2552). เห็ดหอม: อาหารเพื่อสุขภาพ. *พาร์มาไทน์ อุตสาหกรรมยาไทย*, 7(76).
4. ณัฐชา แสงศรี, จตุพร กุลอึ้ง และวิภา หงษ์ตระกูล. (2019) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอสในบัวประดับสกุล *Nymphaea* ของประเทศไทย. *Thai Journal of Science and Technology*, 8: 258-270.
5. ดวงพร อมรเลิศพิศาล และคณะ. (2551). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *Sargassumpolycystum* C. Agardh. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 2(2): 96-103.
6. ทิพย์วลี จุลมัญญิก และศศิธร คงเรือง. (2562). สมบัติเชิงหน้าที่และการประยุกต์ใช้โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*, 14(1).
7. บุญเดช เบิกฟูา. (2560). เคมีคอมพิวเตอร์. กรุงเทพฯ: สำนักส่งเสริมและฝึกอบรมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
8. บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3): 257-286.
9. ประไพพิศ อินเสน. (2561). การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รี่ไทย. *วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย, ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 12(12).
10. พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา. (2546). ปาเปน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1081/papain%E0%B8%9B%E0%B8%B2%E0%B9%80%E0%B8%9B%E0%B8%99>, สืบค้นเมื่อ 26 มีนาคม 2562.
11. เกสัชกรรม คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. (ม.ป.ป). อันตรายจากสารต้องห้ามในเครื่องสำอาง. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://med.mahidol.ac.th/ramapharmacy/th/knowledge/general/04072016-2055-th>, สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2562.
12. ยอดยิ่ง เทพธรรานนท์. (2554). พฤกษเคมี สรรพคุณและผลงานวิจัย. ศูนย์วิจัยแบคทีเรียและไวรัส มหาชัย. หน้า 2-6.

13. รวีโรจน์ จันทรหอม. (2551). รู้รอบ - รอบรู้ พลศึกษา กับ แสงแดด. *รัฐมิแล*, 29(2), หน้า 19-29.
14. สกลเทพ ศรีรักษ์, สุพัตรา ประศุพัฒนา, อีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง และอรุณศรี ปรีเปรม. (2553). การศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนังของซีโอไลต์ในรูปแบบอนุภาคนาโนโดยใช้แบบทดสอบเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง. *วารสารพิษวิทยาไทย มหาวิทยาลัยขอนแก่น* 25(1): 39-46.
15. สารพันความรู้เกี่ยวกับการดูแลสุขภาพและความงาม. (2554). เปปไทด์. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://oknation.nationtv.tv/blog/BeautyTips/2011/01/26/entry-2>, สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2562.
16. สารสุขภาพ. (ม.ป.ป.). เมลานิน/เม็ดสีผิว (Melanin) หน้า ที่ และสารลดเมลานิน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://thaihealthlife.com/%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B8%A5%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%B4%E0%B8%99/>, สืบค้นเมื่อ 4 มีนาคม 2562.
17. สาวิตรี ตาสุดิน. (2549). การทดสอบหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต). กรุงเทพฯ: คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
18. ลีรี เชี่ยวชาญวิทย์. (ม.ป.ป.). แสงแดดกับผิวหนัง [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.med.cmu.ac.th>princefund>file>8.pdf, สืบค้นเมื่อ 4 มีนาคม 2562.
19. สุชาดา จันทรพรหมมา. (2554). การสังเคราะห์และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารอนุพันธ์ *chalcones* และ *bisalcones* (รายงานผลการวิจัย). สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
20. สุวิชา อั้งตระกูล และคนอื่นๆ. (2551). การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง, *Beauveria sp.* ด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism ของบริเวณ ITS. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
21. หนึ่ง เตียอำรุง และสุรียลักษณ์ รอดทอง. (2543). ความหลากหลายของเห็ดที่บริโภคได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี: นครราชสีมา.
22. เห็ด ชู ไทย . (ม .ป .ป) . เห็ด ห อ ม . [ระ บ บ อ น ล ั น]. แห ล ง ที่ มา <https://sites.google.com/site/hedchoothai/-hed/-hed-kin-di-edible-mushrooms/-hed-hxm-shiitake>, สืบค้นเมื่อ 19 มีนาคม 2562.

23. อภัย ราษฎร์วิจิตร. (2558). ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://haamor.com/th/%E0%B9%84%E0%B8%AE%E0%B9%82%E0%B8%94%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B8%A7%E0%B8%B4%E0%B9%82%E0%B8%99%E0%B8%99/#article101>, สืบค้นเมื่อ 20 มีนาคม 2562.
24. อรอนงค์ รักสวนจิก, ศศมล ผาสุข, จริยา หาญจนวนวงศ์และวัชรีย์ คุณกิตติ. (2559). ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากสารสกัดรกแพะ. *ว.เภสัชศาสตร์อีสาน*, 12(3), หน้า 61-71.
25. Aaslyng, M.D., Martens, M., Poll, L., Nielsen, P.M., Flyge, H. and Larsen, L.M. (1998). Chemical and sensory characterization of hydrolyzed vegetable protein, a savory flavoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 481–489.
26. Abu Ubeid, A., Zhao, L., Wang, Y., & Hantash, B. M. (2009). Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase. *The Journal of investigative dermatology*, 129(9): 2242–2249. doi.org/10.1038/jid.2009. 124.
27. Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6): 1256–1262. doi:10.1021/jf60226a042.
28. Adler-Nissen. (1986). Enzymatic hydrolysis of food protein. *Elsevier Applied Science Publishers*, New York.
29. Adoui, F., Boughera, F., Chataigne, G., Chihib, N. E., El Hameur, H., Dhulster, P., Nedjar-Arroume, N. (2013). A simple method to separate the antimicrobial peptides from complex peptic casein hydrolysate and identification of a novel antibacterial domain within the sequence of bovine α s-casein. *International Review of Chemical Engineering*, 5: 179–187.
30. Alam, N., Yoon, K. N., Lee, K. R., Shin, P. G., Cheong, J. C., Yoo, Y. B., Shim, J. M., Lee, M. W., Lee, U. Y., & Lee, T. S. (2010). Antioxidant Activities and Tyrosinase Inhibitory Effects of Different Extracts from *Pleurotus ostreatus* Fruiting bodies. *Mycobiology*, 38(4): 295–301.
31. Alcohol Dehydrogenases. *KKU Res. J.*, 6(18): 1003-1020.

32. Aletor, V.A. (1995). Compositional studies on edible tropical species of mushrooms. *Food Chem*, 54(3): 265-268.
33. Aluko, R.E. (2015). Antihypertensive peptides from food proteins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 6: 235–262.
34. Ao T., Deb C.R. and Rao S.R., (2020). Molecular strategies for identification and characterization of some wild edible mushrooms of Nagaland, India. *Mol Biol Rep*, 47(1): 621-630.
35. Ashraf, Z., Rafiq, M., Nadeem, H., Hassan, M., Afzal, S., Waseem, M., Afzal, K., & Latip, J. (2017). Carvacrol derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors; synthesis, kinetics mechanism and molecular docking studies. *PLoS one*, 12(5): e0178069.
36. Badalyan, S.M., Barkhudaryan, A. and Rapior, S. (2019). Recent Progress in Research on the Pharmacological Potential of Mushrooms and Prospects for Their Clinical Application. *Medicinal Mushrooms Recent Progress in Research and Development*. Springer Nature Singapore Pte Ltd.
37. Baek HS, Rho HS, Yoo JW, Ahn SM, Lee JY, Lee J, Kim MK, Kim DH, Chang IS. (2008). The inhibitory effect of new hydroxamic acid derivatives on melanogenesis. *Bull Korean Chem Soc*, 29: 43–46.
38. Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. and Donoghue M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard*, 82: 247-277.
39. Banjongsinsiri, P., Pasakawee, K., Noojuy, N., Taksima, T., & Rodsuwan, U. (2017). Production of mushroom protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis and their physicochemical properties. *Food and Applied Bioscience Journal*, 4(3): 161–170.
40. Banlangsawan, N., Sripanidkulchai, B., & Sanoamuang, N. (2016). Investigation of antioxidative, antityrosinase and cytotoxic effects of extract of irradiated oyster mushroom. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 38(1): 31-39.

41. BARAMI LABORATORIES. (2015). แสงแดดและรังสี UV มีผลอย่างไรกับผิวหนัง. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://brecosmeticlab.com/newslet/>, สืบค้นเมื่อ 5 มีนาคม 2562.
42. Bechaux, J., Gatellier, P., Le Page, J. F., Drillet, Y., & Sante-Lhoutellier, V. (2019). A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. *Food & Function*, 10(10): 6244–6266.
43. Bhutia, S.K.; Maiti, T.K. (2008). Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends Biotechnol*, 26: 210–217.
44. Bigliardi, P.L., Rout, B., Pant, A. *et al.* (2017). Specific Targeting of Melanotic Cells with Peptide Ligated Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Sci Rep*, 7: 15750.
45. Biji T. Kurien & R. Hal Scofield *et al.* (2012). Tricine SDS-PAGE. *Protein Electrophoresis*, 81-91.
46. Biswas, R., Chanda, J., Kar, A., Mukherjee, P.K., (2017). Tyrosinase inhibitory mechanism of betulinic acid from *Dillenia indica*. *Food Chem*, 232: 689–696.
47. Blagodatski, A.; Yatsunskaya, M.; Mikhailova, V.; Tiasto, V.; Kagansky, A.; Katanaev, V.L. (2018). Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget*, 9: 29259–29274
48. Boonsong, S., Klaypradit, W., Wilaipun, P. (2016). Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources*, 50(2): 89-97.
49. Borges, C. R., Roberts, J. C., Wilkins, D. G., & Rollins, D. E. (2001). Relationship of Melanin Degradation Products to Actual Melanin Content: Application to Human Hair. *Analytical Biochemistry*, 290(1): 116–125. doi:10.1006/abio.2000.4976.
50. Breathnach, A. C., Nazzaro-Porro, M., Passi, S. & Zina, G. (1989). Azelaic acid therapy in disorders of pigmentation. *Clin Dermatol*, 7: 106–119.
51. Bruns, T. D., R. Vilgalys, S. M. Barns, D. Gonzalez, D. S. Hibbett and D.J. Lane. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molec. Phylog. Evol*, 1(3): 231-241.

52. Carbonero, E.R. and et al. (2008). *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chemistry*, 111(3): 531-537.
53. Chakrabarti, S.; Guha, S.; Majumder, K. (2018). Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients*, 10: 1738.
54. Chang T-S. (2009). An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6): 2440-2475.
55. Chen, W. C., Tseng, T. S., Hsiao, N. W., Lin, Y. L., Wen, Z. H., Tsai, C. C., Lee, Y. C., Lin, H. H., & Tsai, K. C. (2015). Discovery of highly potent tyrosinase inhibitor, T1, with significant anti-melanogenesis ability by zebrafish in vivo assay and computational molecular modeling. *Scientific reports*, 5: 7995. doi.org/10.1038/srep07995.
56. Chen, Y. M., Li, C., Zhang, W. J., Shi, Y., Wen, Z. J., Chen, Q. X., & Wang, Q. (2019). Kinetic and computational molecular docking simulation study of novel kojic acid derivatives as anti-tyrosinase and antioxidant agents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1): 990–998. doi.org/10.1080/14756366.2019.1609467.
57. Cheng, S.; Tu, M.; Liu, H.; Zhao, G.; Du, M. (2019). Food-derived antithrombotic peptides: Preparation, identification, and interactions with thrombin. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 59: S81–S95.
58. Chihara, G. et al. (1970). Lentinan and its Related Polysaccharides as Host Defence Potentiators: Their Application to Infectious Diseases and Cancer. *Immunotherapeutic Prospects of Infectious Diseases*, pp 9-18.
59. Chirinang, P., & Intarapichet, K. (2009). Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms , *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *ScienceAsia*, 35: 326–331.
60. Cohen L, Persky Y, Hadar R. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5): 582–594.

61. Cooper, K. L., Yager, J. W., & Hudson, L. G. (2014). Melanocytes and keratinocytes have distinct and shared responses to ultraviolet radiation and arsenic. *Toxicology letters*, 224(3): 407–415.
62. Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*, 31(2): 99–112. doi:10.1016/j.fbr.2016.12.003.
63. Cordes P, Sun W, Wolber R, Kolbe L, Klebe G, Roßhm KH. Expression in nonmelanogenic systems and purification of soluble variants of human tyrosinase. *Biol Chem*, 394: 685e93.
64. Corrons MA et al. (2017). ACE-inhibitory peptides from bovine caseins released with peptidases from *Maclura pomifera* latex. *Food Research International*, 93: 8-15.
65. Couteau, C.; Coiffard, L. (2016). Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products. *Cosmetics*, 3: 27.
66. Cui, H. X., Duan, F. F., Jia, S. S., Cheng, F. R., & Yuan, K. (2018). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of seed oils from *Torreya grandis* fort. ex Lindl. *BioMed research international*, 5314320.
67. Curto, E. V. et al. (1999). Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 57: 663–672.
68. D’Mello, S., Finlay, G., Baguley, B., & Askarian-Amiri, M. (2016). Signaling Pathways in Melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1144. doi:10.3390/ijms17071144.
69. Davenport, A. P., Scully, C. C. G., de Graaf, C., Brown, A. J. H., & Maguire, J. J. (2020). Advances in therapeutic peptides targeting G protein-coupled receptors. *Nature reviews. Drug discovery*, 19(6): 389–413.
70. Denga, Y., Huang, L., Zhang, C., Xie, P., Cheng, J., Wang, X., & Liu, L. (2020). Skin-care functions of peptides prepared from Chinese quince seed protein: Sequences analysis, tyrosinase inhibition and molecular docking study. *Industrial Crops and Products*, 148: 112331. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112331.

71. Diez, V.A. and A. Alvarez. (2001). Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chem*, 75: 417-422.
72. Dong Y., Qi G., Yang Z., Wang H., Wang S., Chen G. (2015): Preparation, separation and antioxidant properties of hydrolysates derived from *Grifola frondosa* protein. *Czech J. Food Sci*, 33: 500–506.
73. Ebanks, J. P., Wickett, R. R., & Boissy, R. E. (2009). Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9): 4066-4087.
74. Eberle, A. N. (1988). The Melanotropins; Chemistry, Physiology and Mechanisms of Action. *Basel, Karger*. DOI:10.1159/000415272
75. Eisenman HC, Casadevall A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology*. 93(3): 931-40.
76. El-Enshasy HA, Selvamani S, Dailin DJ, Abd Malek R, Hanapi SZ, Ambehabati KK, Sukmawati D, Leng OM, Moloi N. (2018). Antioxidant compounds of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 8(1): 1-14.
77. Elhusseiny, S. M., El-Mahdy, T. S., Awad, M. F., Elleboudy, N. S., Farag, M. M. S., Yassein, M. A., & Aboshanab, K. M. (2021). Proteome Analysis and In Vitro Antiviral, Anticancer and Antioxidant Capacities of the Aqueous Extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* Edible Mushrooms. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(15): 4623.
78. Erdmann, K.; Cheung, B.W.; Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem*, 19: 643–654.
79. Espin JC, Varon R, Fenoll LG, Gilabert MA, Garcia-Ruiz PA, Tudela J, et al. (2000). Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur J Biochem*, 267:1270e9.
80. F.M. Netto, and M.A.M. Galeazzi. "Production and characterization of enzymatic hydrolysate from soyprotein isolate". *Lebensm.-wiss. U.-Technol*, 31,1998, pp. 624-631.

81. Felipe Jimenez, P. D. (2009). Novel Tyrosinase-Inhibiting Oligopeptide for the Treatment of Hyperpigmentary Dyschromias. A Translational Overview. *Envy specialized skincare*.
82. Ferreira, I.C.; Vaz, J.A.; Vasconcelos, M.H.; Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents Med. Chem*, 10: 424–436.
83. Fischer, M. and Binder, M. (2004). Species recognition, geographic distribution and host-pathogen relationships: a case study in a group of lignicolous basidiomycetes, *Phellinus* s.l. *Mycologia*, 96: 799-811.
84. Fogal S, Carotti M, Giaretta L, Lanciai F, Nogara L, Bubacco L, Bergantino E. (2015). Human tyrosinase produced in insect cells: a landmark for the screening of new drugs addressing its activity. *Mol Biotechnol*, 57: 45e57.
85. Galappaththi MCA, Dauner L, Madawala S & Karunarathna SC. (2021). Nutritional and medicinal benefits of Oyster (*Pleurotus*) mushrooms: a review. *Fungal Biotec*, 1(2): 65–87.
86. Garcia-Molina F, Hiner AN, Fenoll LG, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Ruiz PA, Garcia-Canovas F, et al. (2005). Mushroom tyrosinase: catalase activity, inhibition, and suicide inactivation. *J Agric Food Chem*, 53: 3702e9.
87. Georgios, I. Zervakis, Moncalvo, J-M and Vilgalys, R. (2004). Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology*, 150: 715–726.
88. Glico nutrition Co.,Ltd. (2019). **α**-Arbutin. [ระบอบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.glico.com/nutrition/en/product/finechemical/arbutin/>, สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2562.
89. Gupta, M., Sharma, R., Kumar, A. (2018). Docking techniques in pharmacology: How much promising. *Computational Biology and Chemistry*, 76: 210-217. doi:10.1016/j.compbiolchem.2018.06.005.
90. H.S. Mason. (1965). Oxidases, *Annu. Rev*, 34: 595-634.
91. H.S. Raper. (1928). The aerobic oxidases. *Physiol. Rev*, 8: 245-282.

92. Hao, D.C., Chen, S.L., Xiao, P.G. and Peng, Y. (2010). Authentication of medicinal plant by DNA-based marker and genomics. *Chin. Herb. Med*, 2: 250-261.
93. Hao, D.C., Chen, S.L., Xiao, P.G. and Peng, Y. (2010). Authentication of medicinal plant by DNA-based marker and genomics, *Chin. Herb. Med*, 2: 250-261.
94. Hatami, T., Emami, S. A., Miraghaee, S. S., & Mojarab, M. (2014). Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the Aerial parts of artemisia biennis Willd. *Iranian Journal of pharmaceutical research: IJPR*, 13(2): 551–559.
95. Hearing VJ Jr, Ekel TM, Montague PM, Nicholson JM. (1980). Mammalian tyrosinase. Stoichiometry and measurement of reaction products. *Biochim Biophys Acta*, 611: 251e68.
96. Heilgemeir, G. P. & Balda, B. R. (1981). Irreversible toxic depigmentation. Observations following use of hydroquinonemonobenzylether-containing skin bleaching preparations. *MMW Munch Med Wochenschr*, 123: 47–48.
97. Helle, O. and Boyce, C.O., (1990). Microbial proteinase and biotechnology. *Microbial Enzyme and Biotechnology*. New York, USA: Elsevier Applied Science. 240-241.
98. Herbs Botany. (2014). เห็ดหอม. รวมข้อมูลพืช สมุนไพร ผัก ผลไม้เพื่อสุขภาพ ไม้ดอกไม้ประดับ ว่านมหามงคล พฤษศาสตร์และรุกขชาตินานาชาติ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://herbsbotany.blogspot.com>. สืบค้นเมื่อ 27 มีนาคม 2562.
99. Hermanns, J. F., Pierard-Franchimont, C. & Pierard, G. E. (2000). Skin colour assessment in safety testing of cosmetics. An overview. *Int J Cosmet Sci*, 22: 67–71, doi:10.1046/j.1467-2494.2000.00021.
100. Hill RL. (1965) Hydrolysis of proteins. 20: 37-107.
101. Himanshi Rathore and Shaline. (2017). Prasad Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *Pharma Nutrition*. 5(2): 35-46.

102. Hordur G Kristinsson, Barbara A. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process. Biochem*, 36: 131-139.
103. Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of Mixed Melanogenesis—Pivotal Roles of Dopaquinone. *Photochemistry and Photobiology*, 84(3), 582–592. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00238.
104. Jaworska, G., Pogon, K., Bernas, E. and Duda-Chodak, A. (2015). Nutraceuticals and Antioxidant Activity of Prepared for Consumption Commercial Mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *J Food Qual*, 38: 111-122.
105. Jeong, M., Jin W., Lim, YW., Lee, JS. and Jung, HS. (2005). Phylogeny of *Phellinus* and Related genera inferred from combined data of ITS and mitochondrial SSU rDNA sequences. *Journal of microbiology and biotechnology*, 15: 1028-38.
106. Jimbow, K. (1991). N-acetyl-4-S-cysteaminyphenol as a new type of depigmenting agent for the melanoderma of patients with melasma. *Arch Dermatol*, 127: 1528–1534.
107. Joompang, A., Jangpromma, N., Choowongkamon, K., Payoungkiattikun, W., Tankrathok, A., Viyoch, J., Luangpraditkun, K. & Klaynongsruang, S. (2020). Evaluation of tyrosinase inhibitory activity and mechanism of Leucrocinn I and its modified peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(3): 239-246.
108. JS Inno Tech Co.,Ltd. (2017). เมลานิน (Melanin) มีความสำคัญต่อผิวอย่างไร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://pione.co.th/ipl-solutions/what-is-melanin/>, สืบค้นเมื่อ 4 มีนาคม 2562.
109. Kumpol Aiempanakit. (2015). Cutaneous Hyperpigmentation in General Practice. *Songkla Med J*, 33(3): 165-175.
110. Khan MA, Tania M. (2012). Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushrooms: An overview. *Food Reviews International*, 28(3): 313–329. Doi 10.1080/87559129.2011.637267.

111. Khwadow Kunchana, Linda Chularojmontri, Wattanased Jarisarapurin, Wasan Sedtawong, Suvara Wattanapitayakul. (2017). Extraction of Primary Human Keratinocytes and Fibroblasts from Adult Foreskin. *Thai J Pharmacol*, 39(2).
112. Kiddle Encyclopedia. (2019). Polypeptide facts for kids. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://kids.kiddle.co/Polypeptide> , สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2562.
113. Kim YJ, Kang KS, Yokozawa T. (2008). The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. *Food Chem Toxicol*, 46: 2466–2471.
114. Kim, Y. M., Yun, J., Lee, C. K., Lee, H., Min, K. R., & Kim, Y. (2002). Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18): 16340-16344.
115. Kriengsak T, Unaro JB & Kevin C. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669–675.
116. Kubglomsong, S., Theerakulkait, C., Reed, R. L., Yang, L., Maier, C. S., & Stevens, J. F. (2018). Isolation and Identification of Tyrosinase-Inhibitory and Copper-Chelating Peptides from Hydrolyzed Rice-Bran-Derived Albumin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(31): 8346–8354.
117. KUS NJ, DOLINSKA MB, YOUNG KL 2ND, DIMITRIADIS EK, WINGFIELD PT & SERGEEV YV. (2018). Membrane-associated human tyrosinase is an enzymatically active monomeric glycoprotein. *PLoS One*, 13: e0198247.
118. Lai X, Soler-Lopez M, Wichers HJ, Dijkstra BW. (2016). Large-scale recombinant expression and purification of human tyrosinase suitable for structural studies. *PLoS One*, 11: e0161697.
119. LAI X, WICHERS HJ, SOLER-LOPEZ M & DIJKSTRA BW. (2017). Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important for Melanogenesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 56: 9812–9815.
120. Liu, M. C., Yang, S. J., Hong, D., Yang, J. P., Liu, M., Lin, Y., Huang, C. H., Wang, C. J. (2016). A simple and convenient method for the preparation of

- antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Chemistry Central journal*, 10:39.
121. Longvah, T. and Y.G. Deosthale. (1998). Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chem*, 63: 331-334.
122. M Memarpour-Yazdi, A Asoodeh, JK Chamani. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4(1): 278–286.
123. M.B. Alam, V.K. Bajpai, J.I. Lee, *et al.* (2017). Inhibition of melanogenesis by jineol from *Scolopendra subspinipes mutilans* via MAP–Kinase mediated MITF downregulation and the proteasomal degradation of tyrosinase. *Sci. Rep*, 7: 45858.
124. M.J. Alves, I.C.F.R. Ferreira, H.J.C. Froufe, R.M.V. Abreu, A. Martins, M. Pintado. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies, *Journal of Applied Microbiology*, 115(2): 346–357,
125. Maeda. K & Fukuda. M. (1996). Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 276(2): 765-9.
126. Mann, T., Gerwat, W., Batzer, J., Eggers, K., Scherner, C., Wenck, H., Stäb, F., Hearing, V. J., Röhm, K. H., & Kolbe, L. (2018). Inhibition of Human Tyrosinase Requires Molecular Motifs Distinctively Different from Mushroom Tyrosinase. *The Journal of investigative dermatology*, 138(7): 1601–1608.
127. Mann, T., Gerwat, W., Batzer, J., Eggers, K., Scherner, C., Wenck, H., Stäb, F., Hearing, V. J., Röhm, K. H., & Kolbe, L. (2018). Inhibition of Human Tyrosinase Requires Molecular Motifs Distinctively Different from Mushroom Tyrosinase. *The Journal of investigative dermatology*, 138(7): 1601–1608.
128. Mattila, P., Suonpää, K., & Piironen, V. (2000). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 16(7-8): 694–696. doi.org/10.1016/s0899-9007(00)00341-5.
129. Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro

- antioxidant effects. *Life sciences*, 77(17): 2166–2178. doi.org/10.1016/j.lfs.2005.03.016.
130. Michelle. (2014). What are the skin lightening alternatives to hydroquinone. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://labmuffin.com/what-are-the-skin-lightening-alternatives-to-hydroquinone/>, สืบค้นเมื่อ 23 มีนาคม 2562.
131. Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y. & Inazu, M. (1988). Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res* 1: 367–374.
132. Mongkonkamthorn, N.; Malila, Y.; Regenstein, J.M.;Wangtueai, S. (2021). Enzymatic hydrolysis optimization for preparation of tuna dark meat hydrolysate with antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities. *J. Aquat. Food. Prod. Technol*, 30: 1090–1108.
133. Mongkonkamthorn, N.; Malila, Y.; Yarnpakdee, S.; Makkhum, S.; Regenstein, J.M.;Wangtueai, S. (2020). Production of protein hydrolysate containing antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities from tuna (*Katsuwonus pelamis*) blood. *Processes*, 8: 1518.
134. Morris, G. M., Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Molecular modeling of proteins*, 443: 365-382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19.
135. Mu Y, Li L, Hu SQ. (2013). Molecular inhibitory mechanism of triclin on tyrosinase. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 107: 235–40.
136. Muham mad&Duangporn. (2016). Synthesis of Oseltamivir derivatives with anti-tyrosinase for making whitening skin. *Veridian E-Journal*, Science and Technology Silpakorn University, 5(3): 2408 – 1248.
137. Mustafin K.G., Bysko N.A., Akhmetsadykov N.N., Suleimenova Zh.B., Zhakipbekova A.S. & Narmuratova Zh.B. (2020). Determination of amino acid and fatty acid composition of depth mycelium *Lentinus edodes*. *Eco. Env. & Cons*, 26(2): 931-934.
138. Muszynska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kała, K., & Gdula-Argasinska, J. (2018). Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food chemistry*, 243: 373–381.

139. Nakchum, L., & Kim, S. M. (2016). Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(2): 123–130. doi.org/10.1080/10826068.2014.995808
140. Naraian R, Dixit B. (2017). Nutritional Value of Three Different Oyster Mushrooms Grown on Cattail Weed Substrate. *Arch Biotechnol Biomed*, 1: 061–066.
141. Ochiai, A., Tanaka, S., Tanaka, T., & Taniguchi, M. (2016). Rice Bran Protein as a Potent Source of Antimelanogenic Peptides with Tyrosinase Inhibitory Activity. *J Nat Prod*, 79(10): 2545-2551.
142. Oh, J.-Y.; Je, J.-G.; Lee, H.-G.; Kim, E.-A.; Kang, S.I.; Lee, J.-S.; Jeon, Y.-J. (2020). Anti-Hypertensive Activity of Novel Peptides Identified from Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Surimi. *Foods*, 9: 647.
143. Olcott and Fraenkel. (1974). Formation and loss of cysteine during acid hydrolysis of proteins. Role of tryptophan. *Journal of Biological Chemistry*. 171. 583-586.
144. Olivares C, Garcia-Borron JC, Solano F. (2002). Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. *Implications to the catalytic cycle. Biochemistry*, 41: 679e86.
145. Olivares C, Jimenez-Cervantes C, Lozano JA, Solano F, Garcí'a-Borro'n JC. (2001). The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem J*, 354(Part 1): 131–9.
146. Ooi, V.E.; Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr. Med. Chem*, 7: 715–729.
147. Park, M.S., Fong, J. J. , Lee, H. , Oh S-Y, Jung, P.E. , Min, Y. J., Soon, S.J. and Lim, Y. (2013). Delimitation of *Russula* Subgenus *Amoenula* in Korea Using Three Molecular Markers. *The Korean Society of Mycology*, 41(4): 191-201. doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.4.191.
148. Parvez, S. et al. (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res*, 20: 921–934. doi:10.1002/ptr.1954.

149. Patrabansh S, Madan M. (1997). Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) SINGER on different bio-wastes. *Acta Biotechnologica*, 17(2): 107–122.
150. Paweena kaewsringam, S. R. (2018). Purification and partial characterization of tyrosinase from straw mushroom. *Abstract Journal, Science and Technology*.
151. Peterson J. (1974). *Encyclopedia of Food Technology*. New York: Van Nostrand Reinhold.
152. Prakot, P.; Chaitanawisuti, N.; Karnchanatat, A. (2015). In vitro anti-tyrosinase activity of protein hydrolysate from spotted Babylon (*Babylonia areolata*). *Food Appl. Biosci. J*, 3: 109–120.
153. Praphatsorn Santhi, J. M. a. P. T. (2016). A study of the antioxidant activities and Polyphenol-oxidase inhibitory effects of everal commercial mushroom trimming extracts and its application on inhibiting melanosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Naresuan University Journal: Science and Technology*, 2(24).
154. Praphrute R., Charerntantanakul W. (2014). Rapid identification of poisonous mushroom species by real-time PCR-based technique. *Agri Research and Extension*, 31(3): 45-53.
155. Promden, W. (2013).
156. R. Halaban, R.S. Patton, E. Cheng, et al. (2002). Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem*, 277: 14821-14828.
157. R.M. Epand. (2016). Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents. *Anticancer Res*, 36: 4375.
158. Ranathunga, S., Rajapakse, N. & Kim, SK. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *Eur Food Res Technol*, 222: 310–315. doi.org/10.1007/s00217-005-0079.
159. Reddy, K.V.; Yedery, R.D.; Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: Premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 24: 536–547.

160. Ro, H-S, Kim, S.S., Ryu, J.S., Jeon, C-O, Lee, T.S. and Lee, H-S. (2007). Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting, and physiological characteristics. *Mycological research*, 710 –715.
161. Rumpf, J., Burger, R., & Schulze, M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International journal of biological macromolecules*, 233: 123470. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470
162. Saghaie, L., Pourfarzam, M., Fassihi, A., & Sartippour, B. (2013). Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. *Research in pharmaceutical sciences*, 8(4): 233–242.
163. Saiprajong, R. (2009). *Purification and characterization of cysteine proteinase from some vegetables and fruits*. Thai Chamber of Commerce University, 60: 3-9.
164. Sangtitanu, T.; Sangtanoo, P.; Srimongkol, P.; Saisavoey, T.; Reamtong, O.; Karnchanatat, A. (2020). Peptides obtained from edible mushrooms: *Herichium erinaceus* offers the ability to scavenge free radicals and induce apoptosis in lung cancer cells in humans. *Food Funct*, 11: 4927–4939.
165. Sapkota K et al. (2010). *Bulletin- Korean Chemical Society*. 31(5): 1319.
166. Sarkar, R., Garg, V., & Chugh, S. (2016). Newer and upcoming therapies for melasma. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 78(4): 417. doi:10.4103/ 0378-6323.98071.
167. Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10): 1949–1956.
168. Schurink, M., van Berkel, W. J. H., Wichers, H. J., & Boeriu, C. G. (2007). Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides*, 28(3), 485–495. doi.org/10.1016/j.peptides. 2006.11.023
169. Schweikardt T, Olivares C, Solano F, Jaenicke E, Garcia-Borrón JC, Decker H. (2007). A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations. *Pigment Cell Res*, 20: 394e401.

170. Shen, Y., Ford-lloyd, B. & Newbury, H. (1998). Genetic relationships within the genus *Beta* determined using both PCR-based marker and DNA sequencing techniques. *Heredity*, 80: 624–632. doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00332.x.
171. Shen, Z., Wang, Y., Guo, Z., Tan, T., & Zhang, Y. (2019). Novel tyrosinase inhibitory peptide with free radical scavenging ability. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1): 1633–1640. doi.org/10.1080/14756366.2019.1661401.
172. Shih FF. (1992). Modification of food proteins by non-enzymatic methods. In: BJF Hudson (ed.) *Biochemistry of Food Proteins*, Elsevier Applied Science, London.
173. Siegrist W, Girard J, Eberle AN. (1991). Quantification of MSH receptors on mouse melanoma tissue by receptor autoradiography. *J. Recept. Res*, 11: 323–331. doi: 10.3109/10799899109066411.
174. Siegrist W, Solca F, Stutz S, Giuffr. L, Carrel S, Girard J, Eberle AN. (1989). Characterization of receptors for α -melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer Res*, 49(22): 6352–6358.
175. Sim KS, Nurestri AM, Norhanom AW. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. *Pharmacogn Mag*, 6(23): 248-254.
176. Slominski, A. T., Slominski, R. M., & Zmijewski, M. A. (2019). Targeting melanocortin receptor type 1 with small peptides. *The British journal of dermatology*, 181(1): 17–18. doi.org/10.1111/bjd.18022.
177. Su, Y., Tang, H., Xiwen, L., Wei, S., Chen, Z., & Xiang, L. (2016). Identification of Common Edible and Medicinal Mushrooms by DNA Barcoding. *Traditional Chinese Medicine*, 2: 10-16.
178. Sun, J.; He, H.; Xie, B.J. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J. Agric. Food Chem*, 52: 6646–6652.
179. Suryanarayana R.S.V., Saraswathi C.R. and Dwarakanath C.T. (1998). Studies on the utilization of fishery wastes for the production of microbiological media. In Proceeding of the 18th symposium on fish utilization technology and marketing in the IPFC region. 62: 597-635.

180. Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Martins, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics —A review. *Industrial Crops and Products*, 90: 38-48.
181. Taofiq, O., Heleno, S. A., Calhella, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Barreiro, M. F., González-Paramás, A. M., & Ferreira, I. C. (2016). Development of Mushroom-Based Cosmeceutical Formulations with Anti-Inflammatory, Anti-Tyrosinase, Antioxidant, and Antibacterial Properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(10): 1372. doi.org/10.3390/molecules21101372.
182. Tomsovsky, M. and Jankovsky, L. (2007). DNA sequence analysis of extraordinary fruiting specimens of *Fuscoporia torulosa* (*Phellinus torulosus*) on *Pyrus* spp. *Czech Mycology*, 59(1): 91–99.
183. Tripathi RK, Hearing VJ, Urabe K, Aroca P, Spritz RA. (1992). Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J Biol Chem*, 267: 23707e12.
184. Turenne, C. Y., S. E. Sauche, D. J. Hoban, J. A. Karlowsky and A. M. Kabini. (2000). Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J. Clin. Microbiol*, 37(6): 1846-1851.
185. 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. doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x
186. Upata, M., Siriwoharn, T., Makkhun, S., Yarnpakdee, S., Regenstein, J. M., & Wangtueai, S. (2022). Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Activity of Enzymatic Protein Hydrolysate from Jellyfish (*Lobonema smithii*). *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(4): 615.
187. Vagadia, B., Vanga, S., Singh, A., Gariepy, Y., & Raghavan, V. (2017). Comparison of Conventional and Microwave Treatment on Soymilk for Inactivation of Trypsin Inhibitors and In Vitro Protein Digestibility. *Foods*, 7(1): 6, doi:10.3390/foods7010006.

188. Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International journal of microbiology*, 2015, 376387.
189. Verallo-Rowell, V. M., Verallo, V., Graupe, K., Lopez-Villafuerte, L. & Garcia-Lopez, M. (1989). Double-blind comparison of azelaic acid and hydroquinone in the treatment of melasma. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 143: 58–61.
190. Viborg, A. H., Terrapon, N., Lombard, V., Michel, G., Czjzek, M., Henrissat, B., & Brumer, H. (2019). A subfamily roadmap of the evolutionarily diverse glycoside hydrolase family 16 (GH16). *The Journal of biological chemistry*, 294(44): 15973–15986. doi.org/10.1074/jbc.RA119.010619.
191. Wang, S., Guo, H., Li, J., Li, W., Wang, Q., & Yu, X. (2019). Evaluation of five regions as DNA barcodes for identification of *Lepista* species (Tricholomataceae, Basidiomycota) from China. *PeerJ*, 7.
192. Wang, S., Guo, H., Li, J., Li, W., Wang, Q., & Yu, X. (2019). Evaluation of five regions as DNA barcodes for identification of *Lepista* species (Tricholomataceae, Basidiomycota) from China. *PeerJ*, 7: e7307. doi.org/10.7717/peerj.7307.
193. Wang, W., Gao, Y., Wang, W., Zhang, J., Yin, J., Le, T., Xue, J., Engelhardt, U. H., & Jiang, H. (2022). Kojic Acid Showed Consistent Inhibitory Activity on Tyrosinase from Mushroom and in Cultured B16F10 Cells Compared with Arbutins. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(3): 502. doi.org/10.3390/antiox11030502.
194. Wasser, S.P.; Weis, A.L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Crit. Rev. Immunol*, 19: 65–96.
195. Wattanasiritham, L., Theerakulkait, C., Wickramasekara, S., Maier, C. S., & Stevens, J. F. (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food chemistry*, 192: 156–162. doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.057.

196. Wen Li, Jinbin Wang, Wanchao Chen and Yan Yang (2019). Analysis of volatile compounds of *Lentinula edodes* grown in different culture substrate formulations. *Food Research International*, 125: 108517.
197. Wendt M. (2006). Rationales design neuer tyrosinase-inhibitoren. PhD thesis. Marburg, Germany: University of Marburg Medical School.
198. White, T. J., T. D. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322.
199. Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S. (1998). Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of bacteriology*, 15;180(6): 1570-2.
200. Y. Cuptapun, H. Duangchan, M. Wanpen and S. Yaieiam. (2010). Quality and quantity of protein in certain kinds of edible mushroom in Thailand, *Kasetsart J. Nat. Sci.*, 44: 664–670.
201. Y. Yang, X. Sun, H. Ni, *et al.* (2019). Identification and characterization of the tyrosinase inhibitory activity of caffeine from camellia pollen. *J. Agric. Food Chem*, 67: 12741-12751.
202. Yang JH, Lin HC, Mau JL. (2001). Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 72(4): 465–471. Doi 10.1016/S0308-8146(00)00262-4.
203. Yang, B.K *et al.* (2002). Hypolipidemic effect of exo-polymer produced in submerged mycelial culture of five different mushrooms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(6): 957-961.
204. Yijie Li, Mingyang Zhang, Haijie Han, *et al.* (2022). Peptide-based supramolecular photodynamic therapy systems: From rational molecular design to effective cancer treatment. *Chemical Engineering Journal*, 436.
205. Yoon *et al.* (2011). Detection of Phenolic Compounds Concentration and Evaluation of Antioxidant and Antityrosinase Activities of Various Extracts from the Fruiting Bodies of *Lentinus edodes*. *World Applied Sciences Journal*, 12(10): 1851-1859.
206. Zaidi, K. U., Ali, A. S., & Ali, S. A. (2014). Purification and Characterization of Melanogenic Enzyme Tyrosinase from Button Mushroom. *Enzyme Research*, 1–6. doi:10.1155/2014/120739.

207. Zaidi, K. U., Ali, A. S., & Ali, S. A. (2014). Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme research*, 120739.
208. Zaidman, B.Z.; Yassin, M.; Mahajna, J.; Wasser, S.P. (2005). Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 453–468.
209. Zhai, H., & Maibach, H. I. (2001). Effects of Skin Occlusion on Percutaneous Absorption: An Overview. *Skin Pharmacology and Physiology*, 14(1): 1–10. doi:10.1159/000056328.
210. Zhao, Y.; Zhao, Q.; Lu, Q. (2020). Purification, structural analysis, and stability of antioxidant peptides from purple wheat bran. *BMCCChem*, 14: 58.
211. Zhou, J., Chen, M., Wu, S., Liao, X., Wang, J., Wu, Q., Zhuang, M., & Ding, Y. (2020). A review on mushroom-derived bioactive peptides: Preparation and biological activities. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 134: 109230. doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109230.
212. Zhou, R.; Liu, Z.K.; Zhang, Y.N.; Wong, J.H.; Ng, T.B.; Liu, F. (2019). Research Progress of Bioactive Proteins from the Edible and Medicinal Mushrooms. *Curr. Protein Pept. Sci*, 20: 196–219.
213. Zhuang, Y., Zhao, X., & Li, B. (2009). Optimization of antioxidant activity by response surface methodology in hydrolysates of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) umbrella collagen. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(8): 572–579. doi.org/10.1631/jzus.B0920081.
214. Zhuang, Y.; Sun, L.; Zhao, X.; Wang, J.; Hou, H.; Li, B. (2009). Antioxidant and melanogenesis-inhibitory activities of collagen peptide from jellyfish (*Rhopilema esculentum*). *J. Agric. Food Chem*, 89: 1722–1727.





ภาคผนวก ก.

ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้



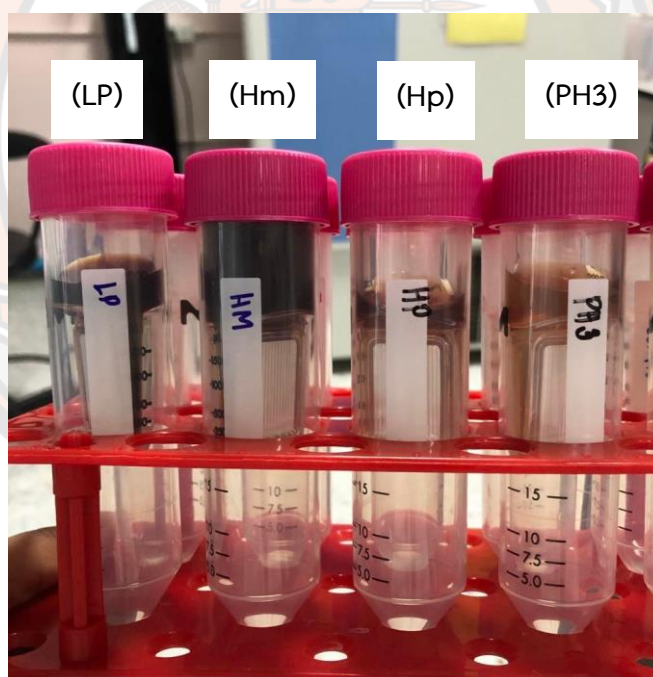
ภาพผนวกที่ ก1 ลักษณะทางกายภาพของดอกเห็ดหอมแห้งจากจังหวัดลำปาง



ภาพผนวกที่ ก2 ลักษณะทางกายภาพของดอกเห็ดหอมสดจากจังหวัดพิษณุโลก




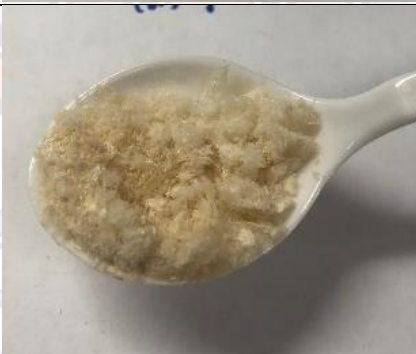


ภาคผนวกที่ ก3 ลักษณะทางกายภาพของดอกเห็ดเป่าฮื้อสดจากจังหวัดพิษณุโลก



ภาคผนวกที่ ก4 สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทหลังย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

- LP: เห็ดหอมแห้งที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์
- Hm: เห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยมิกส์เอนไซม์
- HP: เห็ดหอมสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน
- PH3: เห็ดเป่าฮื้อสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน

ตารางภาคผนวกที่ ก5 ลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้

ชนิดของเห็ด	เอนไซม์ โปรตีเอส	ผงโปรตีนไฮโดรไลเสท	ลักษณะทางกายภาพ
เห็ดหอมแห้ง (DHm)	มิกส์ เอนไซม์		<ul style="list-style-type: none"> - ไม่ละลายน้ำ, ตกตะกอน - ละลายน้ำแล้วเป็นสีน้ำตาลขุ่น - มีกลิ่นค่อนข้างเหม็น - ผงมีสีน้ำตาลเหลือง - เป็นผงก้อนๆ จับกลุ่ม - มีความชื้นเหนียว
เห็ดหอมสด (FHm)	มิกส์ เอนไซม์		<ul style="list-style-type: none"> - ไม่ละลายน้ำ, ตกตะกอน - ละลายน้ำแล้วเป็นสีครีมขุ่น - ผงมีสีครีมขาว - เป็นผงก้อนๆ ปุยุๆ ลักษณะผงเหมือนผลึก (คล้ายผงชูรส)
เห็ดหอมสด (FHp)	เปปซิน		<ul style="list-style-type: none"> - ไม่ละลายน้ำ, ตกตะกอน - ละลายน้ำแล้วเป็นสีน้ำตาลขุ่น - ผงมีสีน้ำตาลเข้ม - เป็นผงก้อนๆ จับกลุ่ม - มีความชื้นเหนียว
เห็ดเป่าฮื้อ สด (FPP)	เปปซิน		<ul style="list-style-type: none"> - ไม่ละลายน้ำ, ตกตะกอน - ผงมีสีน้ำตาลครีม - เป็นผงร่วน - แห้ง ไม่ชื้น ไม่เหนียว



ภาคผนวก ข.

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยพระนคร

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

วิธีการ

- เตรียมสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 mg/mL เป็นสารมาตรฐาน
- เปิดลง 96 well plate ทั้งหมด 5 หลุม (ทำซ้ำ) โดยกำหนดให้

หลุมที่1 น้ำกลั่น ปริมาตร 5 μL

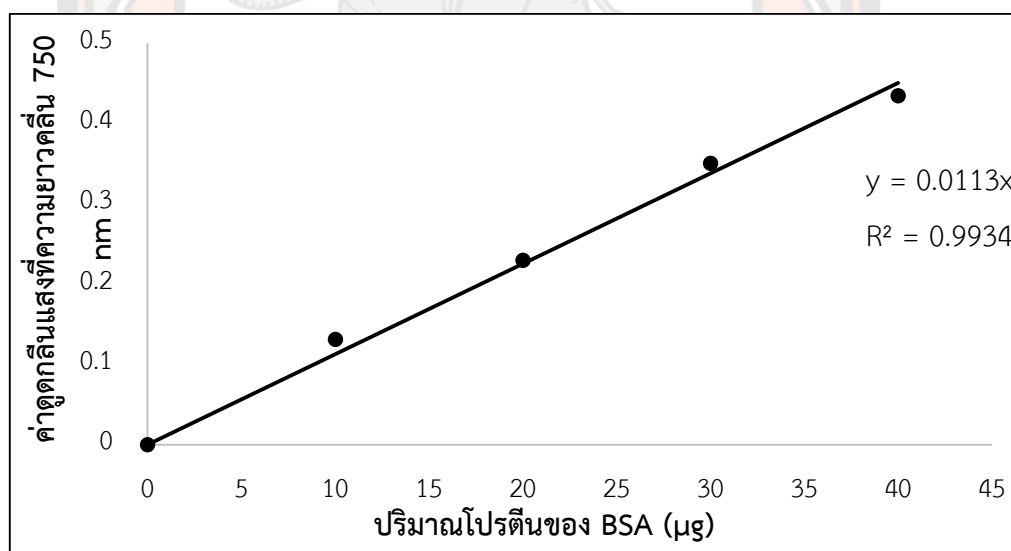
หลุมที่4 เป็น BSA 10 mg/mL ปริมาตร 3 μL

หลุมที่2 เป็น BSA 10 mg/mL ปริมาตร 1 μL

หลุมที่5 เป็น BSA 10 mg/mL ปริมาตร 4 μL

หลุมที่3 เป็น BSA 10 mg/mL ปริมาตร 2 μL

- เติม Solution A+B ทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 200 μL ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 15 นาที
- เติม $1/1$ (v/v) Folin-ciocalteu reagent ทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 20 μL
- ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm
- นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนช่วง 10-50 μg กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm



ภาคผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย Gallic acid ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ($\mu\text{g/mL}$) เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

2. ปิเปตลง 96 well plate ทั้งหมด 6 หลุม ปริมาตรหลุมละ 20 μL (ทำซ้ำ) โดยกำหนดให้

หลุมที่1 น้ำกลั่น

หลุมที่4 Gallic acid ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$

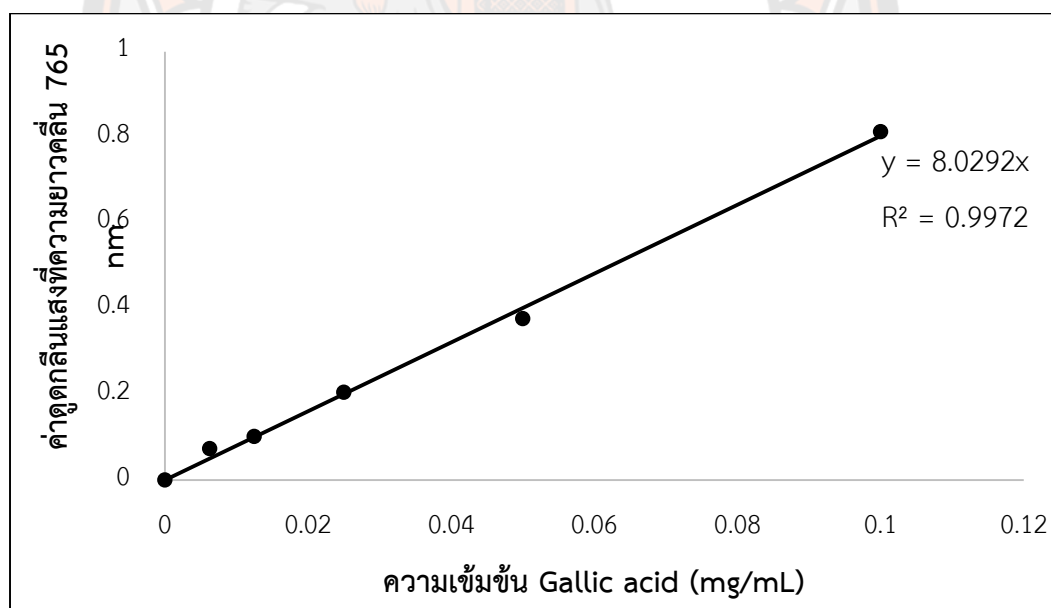
หลุมที่2 Gallic acid ความเข้มข้น 6.25 $\mu\text{g/mL}$

หลุมที่5 Gallic acid ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$

หลุมที่3 Gallic acid ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$

หลุมที่6 Gallic acid ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$

3. เติม $\frac{1}{4}$ (V/V) folin-ciocalteu ทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 μL ตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที
4. เติม 10% Na_2CO_3 ทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 75 μL ตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid ($\mu\text{g/mL}$) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm



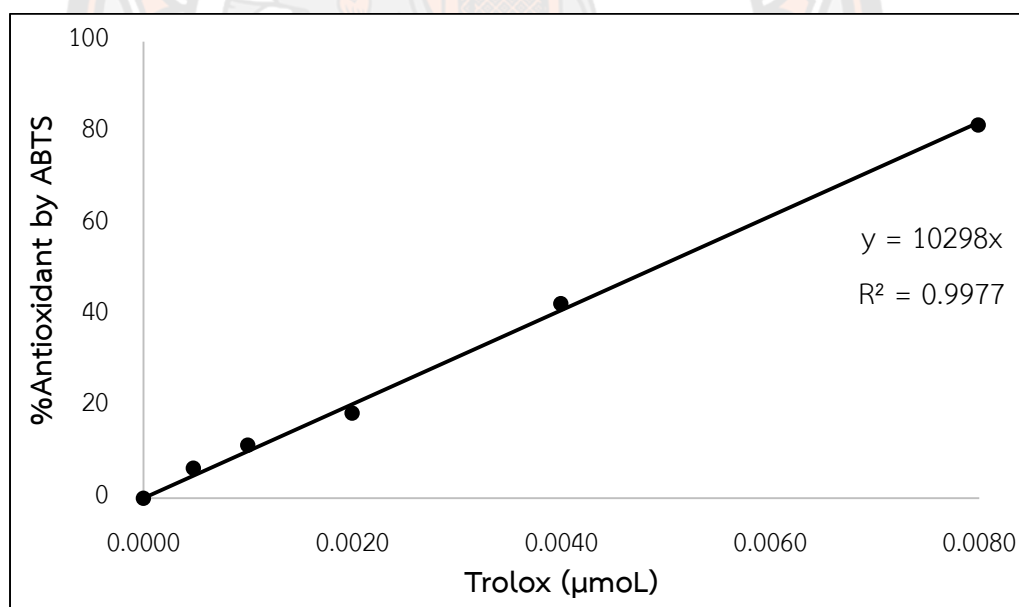
ภาคผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐาน Gallic acid หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด วิธี Folin-Ciocalteu

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานวัดปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

วิธีการ

1. Trolox ความเข้มข้น 0, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.004 และ 0.008 (μmol) เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)
2. ปิเปตลง 96 well plate ทั้งหมด 8 หลุม ปริมาตรหลุมละ 20 μL (ทำซ้ำ) โดยกำหนดให้

หลุมที่1 น้ำกลั่น หลุมที่2 Trolox ความเข้มข้น 0.0005 (μmol) หลุมที่3 Trolox ความเข้มข้น 0.001 (μmol)	หลุมที่4 Trolox ความเข้มข้น 0.002 (μmol) หลุมที่5 Trolox ความเข้มข้น 0.004 (μmol) หลุมที่6 Trolox ความเข้มข้น 0.0005 (μmol)
--	--
3. เติม 2.45 mM Potassium persulfate ทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 μL
4. เติม 7mM ABTS ปริมาตร 100 μL ทุกหลุม ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เวลา 30 นาที
5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Trolox (μmol) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm



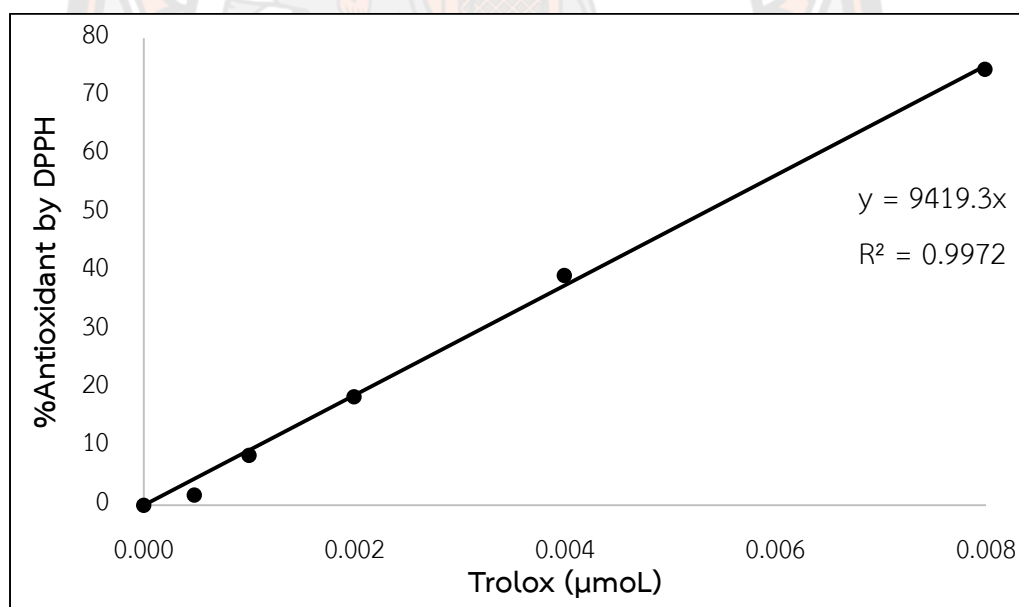
ภาคผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐาน %Antioxidant Index (%AI) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
วิธี ABTS

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานวัดปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

วิธีการ

3. Trolox ความเข้มข้น 0, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.004 และ 0.008 (μmol) เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)
4. ปิเปตลง 96 well plate ทั้งหมด 8 หลุม ปริมาตรหลุมละ 20 μL (ทำซ้ำ) โดยกำหนดให้

หลุมที่1 Methanol	หลุมที่4 Trolox ความเข้มข้น 0.002 (μmol)
หลุมที่2 Trolox ความเข้มข้น 0.0005 (μmol)	หลุมที่5 Trolox ความเข้มข้น 0.004 (μmol)
หลุมที่3 Trolox ความเข้มข้น 0.001 (μmol)	หลุมที่6 Trolox ความเข้มข้น 0.0005 (μmol)
5. เติม 0.1 mM DPPH solution ทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 200 μL
6. ใ้อุณหภูมิจึง ในที่มืด เวลา 30 นาที
7. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Trolox (μmol) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm



ภาคผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐาน %Antioxidant Index (%AI) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
วิธี DPPH

5. การเตรียมกราฟมาตรฐานวัดระดับการย่อยสลายด้วยวิธี TNBS

วิธีการ

1. L-Leucine ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, และ 2.0 mM เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) ในตัวทำละลาย 1% SDS
2. ปิเปตสารมาตรฐานลง 96 well plate ทั้งหมด 11 หลุม ปริมาตรหลุมละ 10 μL (ทำซ้ำ) โดยกำหนดให้

หลุมที่¹ 1% SDS

หลุมที่⁷ L-Leucine ความเข้มข้น 1.2 mM

หลุมที่² L-Leucine ความเข้มข้น 0.2 mM

หลุมที่⁸ L-Leucine ความเข้มข้น 1.4 mM

หลุมที่³ L-Leucine ความเข้มข้น 0.4 mM

หลุมที่⁹ L-Leucine ความเข้มข้น 1.6 mM

หลุมที่⁴ L-Leucine ความเข้มข้น 0.6 mM

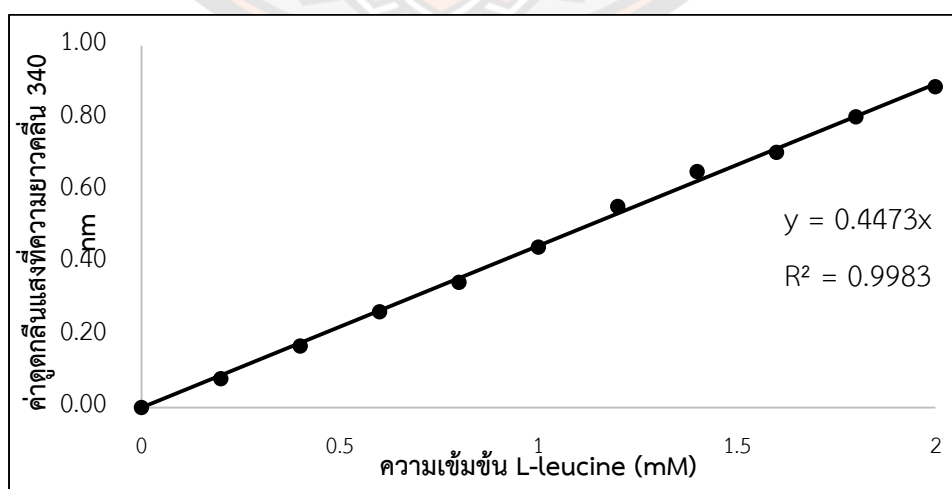
หลุมที่¹⁰ L-Leucine ความเข้มข้น 1.8 mM

หลุมที่⁵ L-Leucine ความเข้มข้น 0.8 mM

หลุมที่¹¹ L-Leucine ความเข้มข้น 2.0 mM

หลุมที่⁶ L-Leucine ความเข้มข้น 1.0 mM

3. เติม 0.2125 M Sodium phosphate buffer (pH8.2) ทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 80 μL
4. เติม 0.05% TNBS reagent 80 μL
9. ตั้งทิ้งไว้ที่ 50° C ในที่มืด เวลา 1 ชั่วโมง
10. เติม 1 N HCl 160 μL
11. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เวลา 30 นาที
12. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm
13. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ L-Leucine (mM) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm



ภาคผนวกที่ ข5 กราฟมาตรฐาน L-Leucine วัดระดับการย่อยสลายด้วยวิธี TNBS



ภาคผนวก ค.

ค่า GOLD fitness score แต่ละลิแกนด์

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ค่า GOLD fitness score ของเปปไทด์ RHAKF แต่ละลิแกนด์

Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	intcor	RMS(heavy)	time	Ligand name
67.49	0.02	49.87	0.00	-1.11	-10.11	7.748	767	HAKF
59.06	14.25	39.55	0.00	-9.57	-9.27	3.577	576	RHA
67.95	10.47	42.90	0.00	-1.51	-11.39	9.945	521	RHAK
75.24	2.16	54.83	0.00	-2.31	-22.60	5.536	665	RHAKF
64.01	5.84	44.09	0.00	-2.46	-10.56	7.511	288	AKF
62.26	6.24	42.91	0.00	-2.99	-7.51	7.622	146	HAK

ตารางภาคผนวกที่ ค2 ค่า GOLD fitness score ของเปปไทด์ LTLEEGESVG แต่ละลิแกนด์

Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	intcor	RMS(heavy)	time	Ligand name
65.51	18.09	37.25	0.00	-3.79	-6.89	6.855	403	EEG
74.54	22.82	38.42	0.00	-1.11	-12.75	3.257	652	EEGE
76.77	25.20	39.16	0.00	-2.27	-7.13	8.059	371	EGE
74.52	25.24	36.57	0.00	-0.99	-11.74	6.841	606	EGES
66.09	20.38	34.93	0.00	-2.31	-8.92	4.989	542	ESV
71.09	22.66	38.25	0.00	-4.17	-11.49	4.588	372	ESVG
63.33	17.01	33.90	0.00	-0.30	-6.26	5.700	133	GES
69.32	27.01	34.46	0.00	-5.07	-10.78	4.701	298	GESV
77.16	26.03	38.51	0.00	-1.82	-11.60	7.769	291	LEE
71.61	15.66	41.98	0.00	-1.77	-13.62	9.947	356	LEEG
56.06	5.40	38.44	0.00	-2.20	-15.48	4.757	322	LTL
73.49	24.83	36.03	0.00	-0.88	-19.19	8.276	484	LTLE
50.86	6.84	35.65	0.00	-4.99	-56.98	10.841	1001	LTLEEGESVG
61.35	18.40	35.03	0.00	-5.21	-8.96	6.926	123	SVG
72.65	25.59	35.59	0.00	-1.89	-12.78	5.753	290	TLE
79.07	25.27	44.26	0.00	-7.06	-16.77	8.955	440	TLEE
63.46	6.00	44.82	0.00	-4.16	-18.57	9.398	928	LTLEE

ตารางภาคผนวกที่ ค3 ค่า GOLD fitnefss score ของเปปไทด์ PATVSIPGV แต่ละลิแกนด์

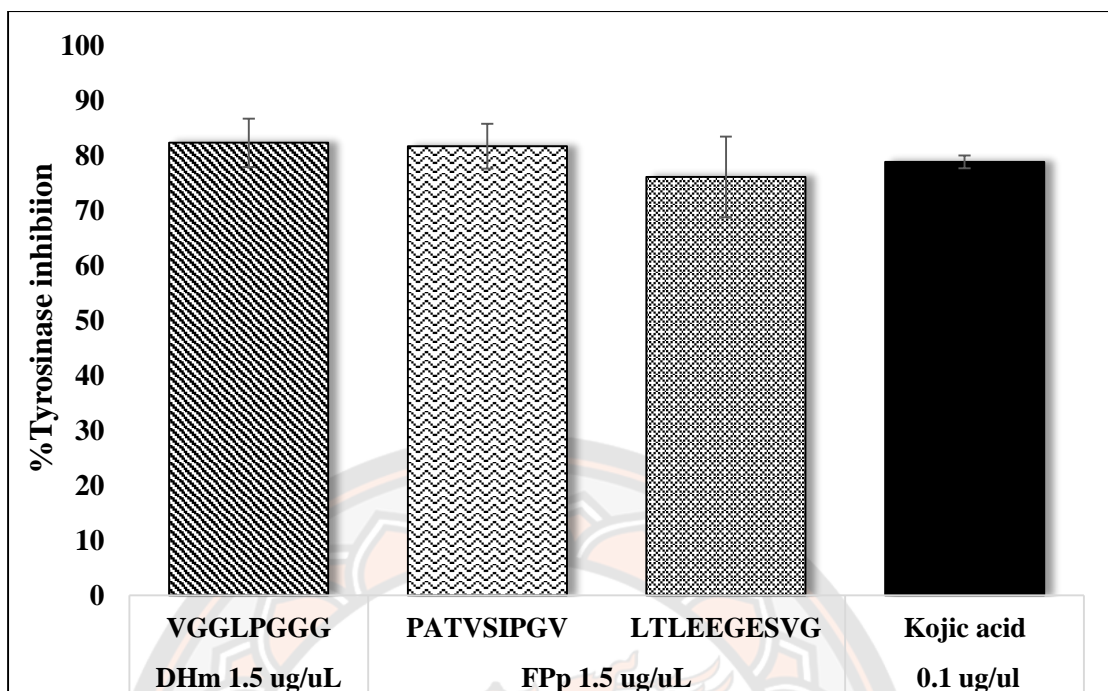
Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	intcor	RMS(heavy)	time	Ligand name
53.12	0.47	41.09	0.00	-3.85	-29.50	10.878	442	PATVSIPGV
48.79	1.97	34.31	0.00	-0.35	-8.01	10.260	151	PATV
51.13	0.78	38.10	0.00	-2.04	-3.75	3.747	89	PAT
59.92	6.26	39.44	0.00	-0.57	-7.33	7.191	145	IPGV
54.92	15.34	32.99	0.00	-5.77	-4.07	6.236	36	IPG
59.77	19.65	30.75	0.00	-2.16	-13.39	7.563	81	ATVS
50.91	0.56	38.47	0.00	-2.55	-8.27	4.662	115	ATV
52.05	0.79	40.93	0.00	-5.02	-10.93	4.089	191	VSIP
57.49	4.68	39.46	0.00	-1.45	-10.80	7.115	145	VSI
58.36	6.30	39.75	0.00	-2.59	-14.83	10.253	209	TVSI
56.33	17.45	30.71	0.00	-3.35	-10.49	7.621	127	TVS
58.70	13.07	33.97	0.00	-1.07	-7.49	5.988	40	SIPG
46.93	0.57	35.64	0.00	-2.65	-5.65	2.623	114	SIP
51.97	1.06	37.85	0.00	-1.14	-2.21	3.452	82	SIPG
54.74	3.26	39.96	0.00	-3.47	-12.64	4.309	870	SIPGV

ตารางภาคผนวกที่ ค4 ค่า GOLD fitness score ของเปปไทด์ LGERTLDEI แต่ละลิแกนด์

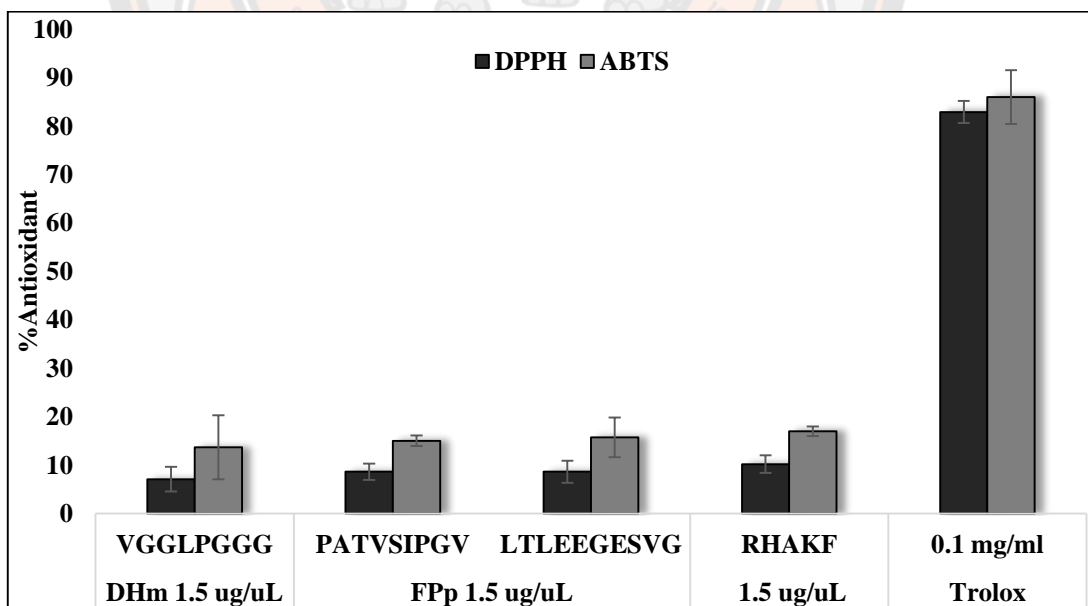
Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)	intcor	RMS(heavy)	time	Ligand name
64.43	7.97	47.86	0.00	-9.35	-19.38	4.267	518	RTL
64.80	21.59	33.23	0.00	-2.47	-9.69	5.956	285	TLD
68.02	26.97	34.95	0.00	-7.01	-13.68	3.120	346	ERT
64.35	0.67	54.22	0.00	-10.87	-17.22	7.571	557	ERTL
65.47	14.00	41.96	0.00	-6.23	-9.87	8.127	284	GER
64.11	28.77	30.25	0.00	-6.26	-13.37	6.568	408	GERT
72.39	25.34	34.48	0.00	-0.36	-10.06	6.543	290	LDE
60.05	5.55	42.65	0.00	-4.13	-14.51	4.358	490	LDEI
73.48	24.91	39.66	0.00	-5.96	-7.53	8.533	237	LGE
75.39	14.45	48.34	0.00	-5.53	-15.07	8.050	446	LGER
26.80	1.04	26.11	0.00	-10.14	-64.54	11.811	1201	LGERTLDEI
57.91	13.76	36.43	0.00	-5.94	-15.98	3.623	384	RTL

ภาคผนวก ง.
ผลเพิ่มเติม: แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์
สังเคราะห์ใหม่





ภาคผนวกที่ ง1 แสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปปไทด์สังเคราะห์ใหม่
 หมายเหตุ DHm หมายถึง โพรตีนไฮโดรไลสที่สกัดด้วยมิกส์เอนไซม์
 FPs หมายถึง โพรตีนไฮโดรไลสที่สกัดด้วยเอนไซม์เปปซิน



ภาคผนวกที่ ง2 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์สังเคราะห์ใหม่
 หมายเหตุ DHm หมายถึง โพรตีนไฮโดรไลสที่สกัดด้วยมิกส์เอนไซม์
 FPs หมายถึง โพรตีนไฮโดรไลสที่สกัดด้วยเอนไซม์เปปซิน



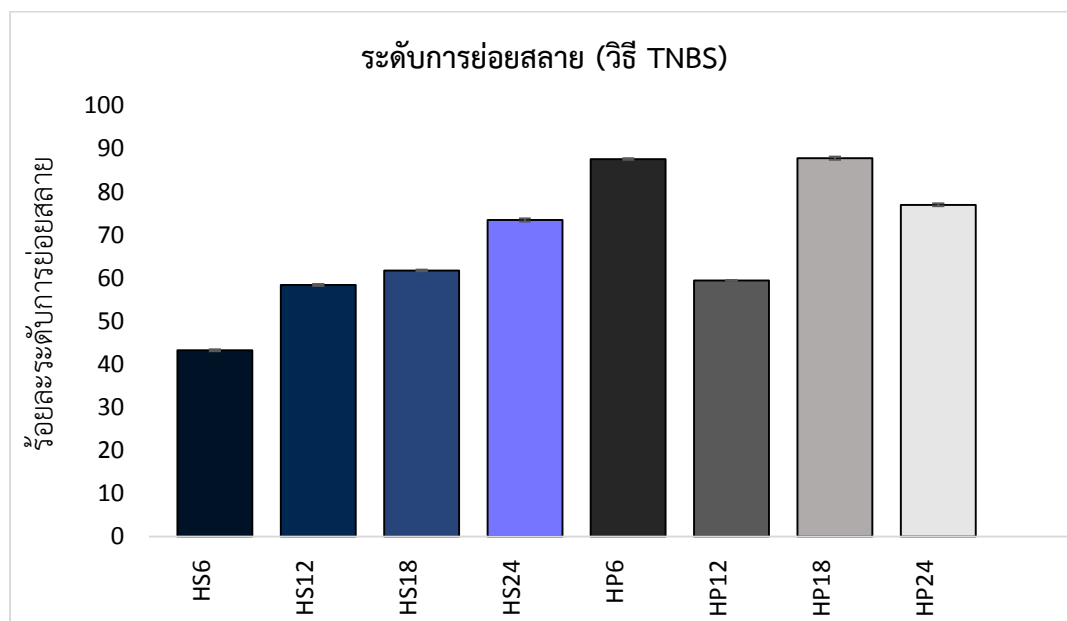
ภาคผนวก จ.

ผลงานวิจัยก่อนหน้า ในปี 2562

วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรีเสนอหลักสูตรชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล
เรื่อง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดหอม

1. การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS method)

การศึกษาหาระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซส หรือ Degree of hydrolysis (DH%) ด้วย วิธี TNBS โดยนำค่าที่ได้จะถูกนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของระดับการย่อยสลาย



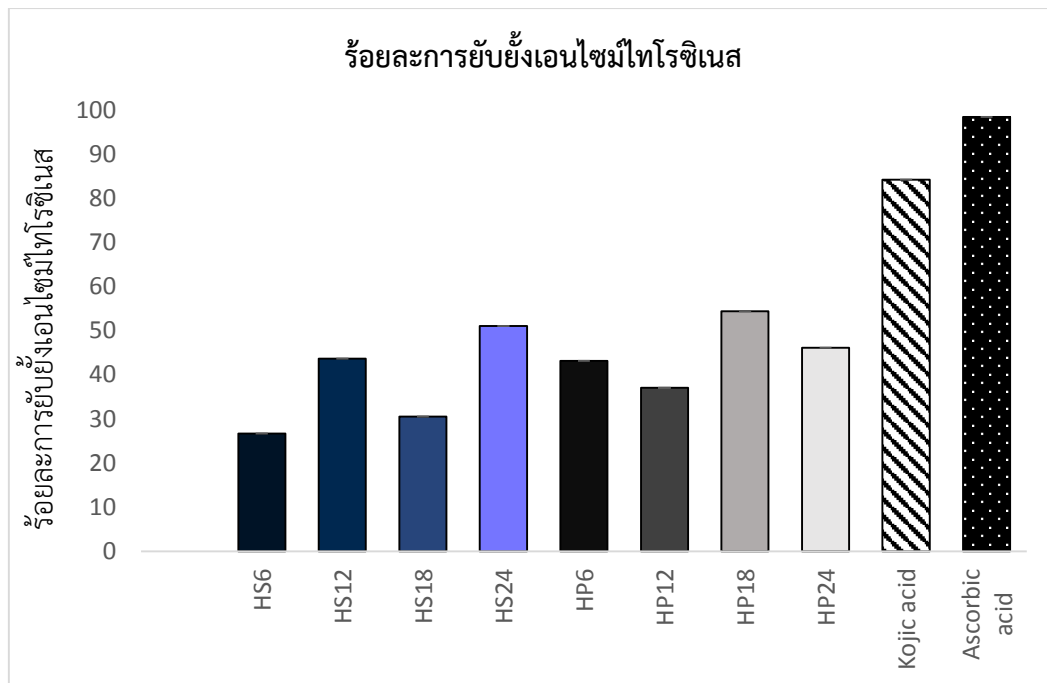
ภาคผนวกที่ จ1 แผนภูมิแท่งแสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซสด้วยวิธี TNBS

หมายเหตุ HP หมายถึง เห็ดหอมโปรตีนไฮโดรไลเซสด้วยเอนไซม์ปาเปน,
HS หมายถึง เห็ดหอมโปรตีนไฮโดรไลเซสด้วยมิกส์เอนไซม์

จากผลการทดลอง ผลจากกราฟแสดงความไม่สอดคล้องกันระหว่างระดับของการไฮโดรไลเซสของเอนไซม์ปาเปนต่อระยะเวลาการย่อยโปรตีน ซึ่งผลชี้ให้เห็นว่าการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซสด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ 18 ชั่วโมง มีระดับของไฮโดรไลเซสสูงที่สุด คือร้อยละ 88 ในขณะที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซสด้วยมิกส์เอนไซม์มีการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา ซึ่งมิกส์เอนไซม์ที่ 24 ชั่วโมง มีระดับของไฮโดรไลเซสสูงที่สุด คือร้อยละ 74 ตามลำดับ

2. การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (เบื้องต้น)

เมื่อนำค่าดูดกลืนแสงของเอนไซม์ไทโรซิเนส จาก Commercial tyrosinase ในเห็ดตระดุมที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซสทั้งหมด จากผลการทดลองการศึกษา ณ เวลาที่ 20 นาที โดยค่าที่ได้นำมาคำนวณ %Inhibition



ภาคผนวกที่ จ2 แสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส

0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

หมายเหตุ HP หมายถึง เห็ดหอมโปรตีนไฮโดรไลสด้วยเอนไซม์ปาเปน,

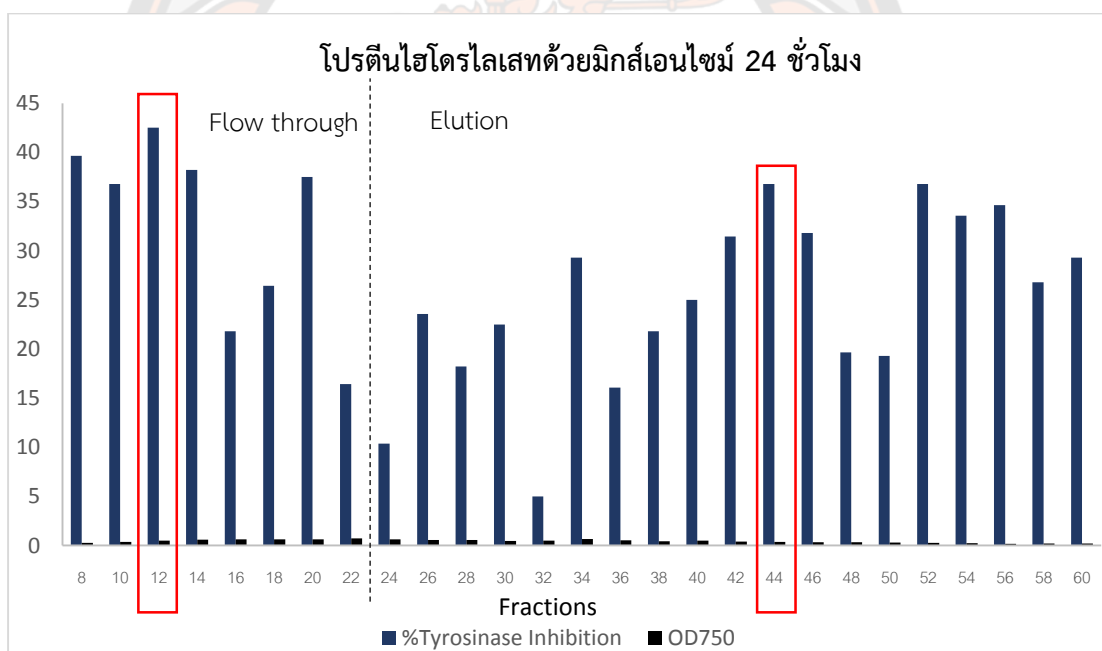
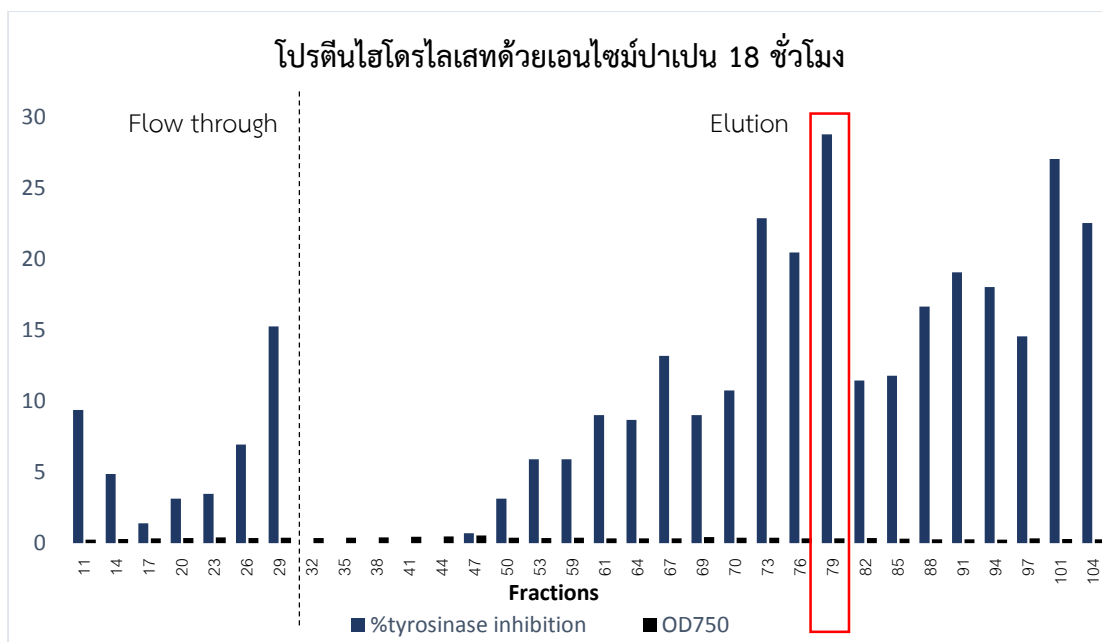
HS หมายถึง เห็ดหอมโปรตีนไฮโดรไลสด้วยมิกส์เอนไซม์

จากผลการทดลองข้างต้นจึงสรุปได้สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส(เปปไทด์)ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ 18 ชั่วโมง และมิกส์เอนไซม์ที่ 24 ชั่วโมง มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดทั้งหมด ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 54 และ 51 ตามลำดับ ด้วยประสิทธิภาพการออกฤทธิ์นี้โปรตีนไฮโดรไลส(เปปไทด์)ดังกล่าว จึงถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีคุณสมบัติแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchange chromatography) ชนิดคอลัมน์ DEAE-Sephacel ต่อไป

3. ผลการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารสกัดเปปไทด์บริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีคุณสมบัติแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchange chromatography) (DEAE-Sephacel)

3.1 การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารสกัดเปปไทด์บริสุทธิ์บางส่วน

เปปไทด์ส่วนที่ถูกระบายออกจากคอลัมน์ภายใต้จุดสูงสุดของการชะนั้น จะถูกแยกเก็บเป็น Fractions เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส



ภาคผนวกที่ 33; ผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโปรตีนไฮโดรไลสเสทบริสุทธิ์บางส่วน (Fraction) จากเอนไซม์เปปซินที่ 18 ชั่วโมง และมิกส์เอนไซม์ที่ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

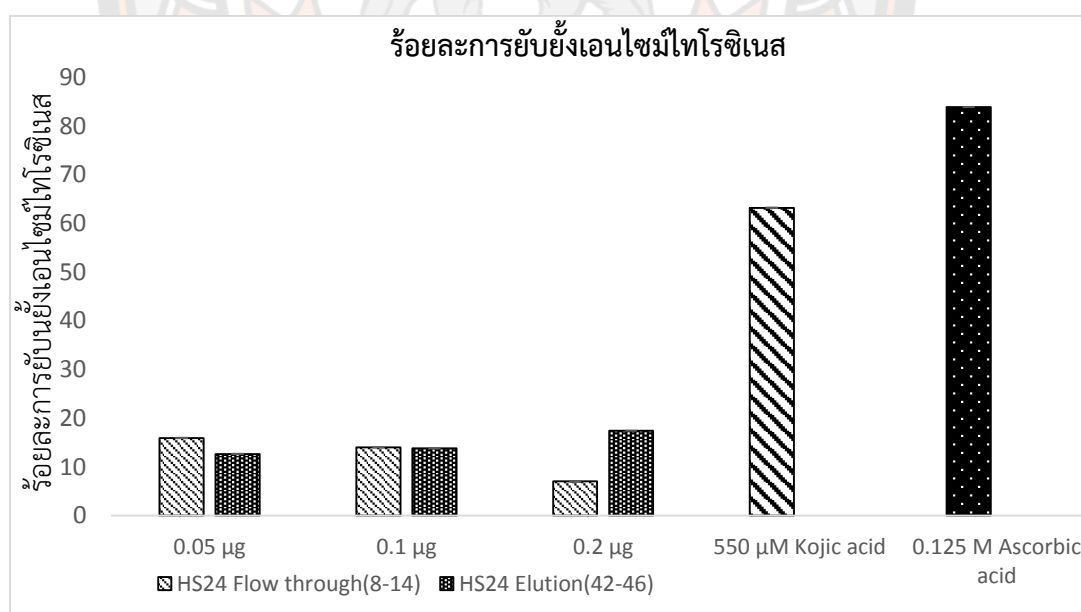
จากผลการทดลองพบว่าเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ 18 ชั่วโมง ส่วนที่จับและถูกชะออกจากคอลัมน์ (Elution) หรือ fraction ที่ 79 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 29 ในขณะที่เปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเสทด้วยมิกส์เอนไซม์ที่ 24 ชั่วโมง มี

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้ร้อยละ 43 และ 37 ทั้งในส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (Flow through) และส่วนที่จับกับคอลัมน์ (Elution) ได้แก่ fraction ที่ 12 และ 44 ตามลำดับ

จากผลการทดลองทั้งหมดจึงชี้ให้เห็นว่าเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยมิกส์เอนไซม์มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าเอนไซม์ปาเปน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำเปปไทด์ชนิดดังกล่าว fraction ที่ 8-14 และ 42-46 มาทดสอบหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดเปปไทด์ที่เหมาะสมต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพปริมาณโปรตีนของสารสกัดเปปไทด์บริสุทธิ์บางส่วนต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากผลการทดสอบปริมาณโปรตีนของสารสกัดเปปไทด์ที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนสูงขึ้น สารสกัดส่วนที่จับกับคอลัมน์ (Elution) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงขึ้น ในขณะที่สารสกัดส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (Flow through) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ลดลง โดยชี้ให้เห็นว่าส่วน Flow through สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 15.9 และส่วน Elution ยับยั้งได้ร้อยละ 17.4 โดยมีการออกฤทธิ์การทำงานได้สูงสุดที่ปริมาณโปรตีน 0.05 และ 0.2 μg ตามลำดับ

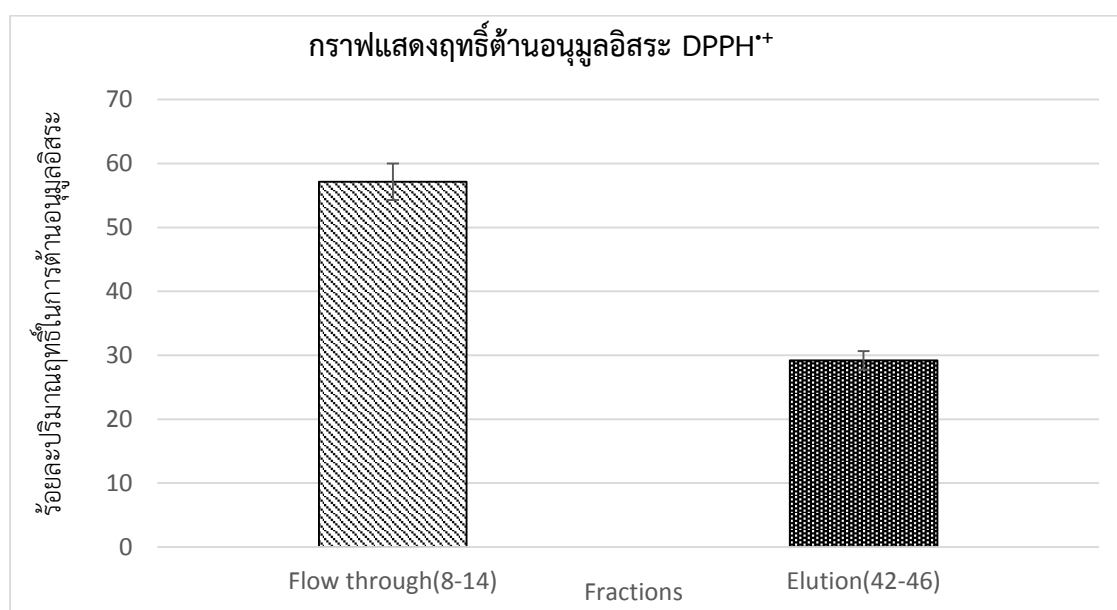


ภาคผนวกที่ ๑๔ แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณโปรตีนของสารสกัดเปปไทด์ต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

หมายเหตุ HS24 หมายถึง เห็ดหอมโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยมิกส์เอนไซม์ที่ 24 ชั่วโมง

แต่อย่างไรก็ตามสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบกลุ่มอื่นที่ไม่จับกับคอลัมน์ DEAE สามารถถูกชะออกมาจากคอลัมน์ในส่วน Flow through ส่งผลให้มีฤทธิ์ช่วยส่งเสริมการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านอนุมูลอิสระได้ จึงต้องทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บางส่วนอีกครั้ง โดยการทดลองนี้เลือกวิธี DPPH เป็นตัวทดสอบ

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH



ภาคผนวกที่ จ5 แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH⁺ ในเปปไทด์ จากมิกซ์เอนไซม์ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ในส่วน Flow through และ Elution

จากกราฟผลการทดลองพบว่าเปปไทด์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์มิกซ์ที่ 24 ชั่วโมง ในส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (Flow through) และส่วนที่จับกับคอลัมน์ (elution) ได้แก่ fraction ที่ 8-12 และ 42-46 มีปริมาณต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 57 และ 29 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (Flow through) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า