



ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาว



ทัตติยา กัณทะษา

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาว



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาว"

ของ ทตติยา กัณทะษา

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรงค์ อรรถรัฐ)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรศักดิ์ แก้วก่อง)

อนุมัติ

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

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาว
ผู้วิจัย	ทัตติยา กัณทะษา
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรงค์ อรรถรัฐ
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. ชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2566
คำสำคัญ	เอนไซม์ไทโรซิเนส เอนไซม์คอลลาจีเนส เห็ดขอนขาว โปรตีนไฮโดรไลส และต้านอนุมูลอิสระ

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันภาวะเครียด มลภาวะ รวมทั้งการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตทำให้กระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระและภาวะการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินมากเกินไป (Hyperpigmentation) เช่นการเกิดฝ้า กระ รวมทั้งภาวะ photo aging หรือริ้วรอยก่อนวัย การกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน มีเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา คือ เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ผ่านปฏิกิริยา monophenolase และ diphenolase นอกจากนี้สารอนุมูลอิสระยังกระตุ้นการทำงานของ เอนไซม์คอลลาจีเนส หรือ Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) ซึ่งย่อยสลาย คอลลาเจน และ elastic fibers ก่อให้เกิดริ้วรอย และการชราของผิว ในทางเวชสำอางนิยมนำ วิตามินซี กรดโคจิกและอาร์บูติน ใช้ลดปัญหาภาวะดังกล่าว อย่างไรก็ตามหากมีการใช้ต่อเนื่อง อาจเกิดผลข้างเคียงต่อผิวหนัง ปัจจุบันสารสกัดเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากอาหารถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและกรดโคจิกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.747 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับเปปไทด์สังเคราะห์ RHAKF ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.086 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ เมื่อทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส โปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.205 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ซึ่งมีฤทธิ์สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.166 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ 1,10-phenanthroline และ เปปไทด์สังเคราะห์ GFSGLDGAKGD เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเห็ดขอนขาวแห้งและสดด้วยวิธี ABTS มีค่า IC_{50} อยู่ที่ 2.631 และ 2.632 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ ในขณะที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH จะมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.17 และ 3.13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง HaCaT เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วยวิธี LC-MS/MS ได้ทำการคัดเลือกเปปไทด์ที่น่าสนใจ 4 ลำดับ

จากตัวอย่างสารสกัดเปปไทด์จากเห็ดขอนขาวสดและเห็ดขอนขาวแห้งในการจำลองการจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ลำดับที่ 1 คือ LILGSSSS และ ลำดับที่ 2 LLLKPKVLL มีค่า GOLD fitness score ของการจำลองการจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) แบบ 3 มิติกับลำดับเปปไทด์ภายในสายคือลำดับ SSS เท่ากับ 72.70 และ LLLK มีเท่ากับ 76.67 และการจำลองการจับกับเอนไซม์คอลลาจีเนสในส่วนลำดับที่ 3 RLRTL L L L L FLM และลำดับที่ 4 LIPL L K L L R W มีค่าพลังงานจากการจับกับเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) แบบ 3 มิติ มีค่า PLP fitness score เท่ากับ 146.10 และ 134.00 และ อีกสองลำดับเปปไทด์ คือ LILLPLKP และ LLLKPKVL จากการวิเคราะห์จากค่า Free-radical scavenging (FRS) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับลำดับอื่นภายในกลุ่มสายลำดับเปปไทด์ เท่ากับ 0.43 และ 0.47 ตามลำดับจากการศึกษาสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินนี้สามารถให้ฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าสารสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวที่ไม่ได้ผ่านการย่อยสลาย ดังนั้นจึงเป็นแหล่งโปรตีนหรือเปปไทด์ชนิดใหม่เพิ่มมูลค่าให้แก่วัตถุดิบ เพื่อประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเพื่อลดการเกิดริ้วรอยแก่ชรา จุดต่างดำ ฝ้า กระ และความหมองคล้ำต่อไป



Title	BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PROTEIN HYDROLYSATE FROM <i>LENTINUS SQUARROSULUS</i> MONT.
Author	Tattiya Kantasa
Advisor	Assistant Professor Jongrak Attarat, Ph.D.
Academic Paper	M.S. Thesis in Biochemistry, Naresuan University, 2023
Keywords	Tyrosinase Collagenase <i>Lentinus squarrosulus</i> Mont. Protein hydrolysate and Antioxidant

ABSTRACT

Currently, stress, pollution and ultraviolet radiation (UVR) affects the reactive oxygen species (ROS). The ROS also contributes to the incidences of hyperpigmentation and skin aging such as dark spots, blotches or melasma, wrinkles and sunburn. Melanin is mainly synthesized by tyrosinase (polyphenol oxidase) through the monophenolase and di-phenolase reactions. Overactivity of the tyrosinase by ROS leads to hyperpigmentation. The ROS also activates collagenase or matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), which effect collagen and elastic fibers degradation causing wrinkles and skin aging. Therefore, multiple inhibitors such as kojic acid, ascorbic acid, and arbutin are added as ingredients in creams and skin care lotions to reduce those skin problems. These chemical products have a strong therapeutic effect, however, using them in large amount may affect in skin sensitivity (dermatitis) or irritation. Nowadays, bioactive peptides, protein hydrolysates, are popularly used cosmetic in products which inhibit tyrosinase activity, antioxidant and some peptides decrease the collagen degradation. In this study, biological activities of protein hydrolysate from *Lentinus squarrosulus* Mont. protein hydrolysate were reported. In tyrosinase inhibition experiments, the fresh *Lentinus squarrosulus* protein hydrolysate (FPH) (IC_{50} 2.747 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was more effectiveness in tyrosinase inhibitory than dried *Lentinus squarrosulus* protein hydrolysate (DPH). The tyrosinase inhibitory effect was similar to synthetic peptide (RHAKF) (IC_{50} 3.086 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). For collagenase inhibition assay, the FPH can inhibit collagenase (MMP-1) better than DPH. The half maximal inhibitory concentration of FPH and DPH was 3.205 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and

4.166 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively that was similar to 1,10-phenanthroline and synthetic peptide GFSGLDGAKGD. The antioxidant activity of FPH was similar to DPH by ABTS at IC_{50} 2.632 and 2.631 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectively. The free radical scavenging activity by DPPH assay, the FPH showed stronger than DPH by IC_{50} at 3.13 and 4.17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively. The cytotoxicity using MTT assay, both FPH and DPH are not toxicity using HaCaT cell. The peptides from protein hydrolysates of FPH and DPH were identified by LC-MS/MS, four peptides were selected by tyrosinase and collagenase docking. The selected tyrosinase peptides of FPH and DPH are; LILGGSSS and LLLKPKVLL, respectively. After chopping and docking the two peptides by GOLD fitness score (2Y9X; Tyrosinase), the highest score for 2Y9X were SSS and LLLK at 72.70 and 76.67 respectively. For collagenase docking using PLP fitness score (1CGL; collagenase), RLRTL L L L L L FLM and LIPLLKLLRWV were selected with highest score at 146.10 and 134.00 respectively. Another two peptides, LILLPLKP and LLLKPKVL were also selected with highest free-radical scavenging (FRS) score at 0.43 and 0.47 respectively. In conclusion, the fresh *Lentinus squarrosulus* protein hydrolyzed with pepsin was stronger bioactivities than crude protein and showed non-toxicity. The peptides/protein hydrolysate derived from *Lentinus squarrosulus* could be valuable sources to decrease hyperpigmentation and skin aging for skincare or food supplement in further studies.

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ในหัวข้อเรื่อง“ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ด
 ขอนขาว หรือ Biological activities of protein hydrolysate from *Lentinus squarrosulus*
 Mont.” สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยมีความช่วยเหลือและสนับสนุนในด้านสารเคมีและครุภัณฑ์ทาง
 วิทยาศาสตร์ของห้องปฏิบัติการกลาง ชีวเคมี และห้องปฏิบัติการ 345 ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
 และขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.จรงค์ อรรถรัฐ ประธานที่ปรึกษางานวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท คอยให้
 คำปรึกษา ความรู้ ตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และดูแลตลอดการทำวิจัยวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ -
 ขอขอบพระคุณดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ประธานกรรมการภายนอก และนักวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรม
 และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)
 ได้อนุเคราะห์ความช่วยเหลือในการการศึกษากาการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ด้วยวิธี Liquid
 Chromatography – Mass Spectrometer (LC-MS/MS) ให้ความรู้ และร่วมอภิปรายผลการทดลอง
 ขอขอบพระคุณรศ.ดร.วรศักดิ์ แก้วก่อง อาจารย์ที่เคารพรักในภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
 การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิสอบวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท และให้ความ
 อนุเคราะห์และช่วยเหลือในการทดลองการศึกษาอัตราการรอดชีวิตหรือทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
 ผิวหนัง HaCaT และนายจตุรงค์ อินผืด ผู้ช่วยผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล
 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ให้ความอนุเคราะห์การศึกษาการจำลอง
 การจับกันของเอนไซม์ (Molecular docking) รวมถึงการให้ความรู้และอภิปรายผลการทดลองใน
 วิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณทุนวิจัยเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่
 สำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) ส่งเสริมด้านการเงินและเพิ่มแหล่งพัฒนาทักษะของผู้วิจัยตลอดการ
 ศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทนี้ ขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยดูแลด้านการเงิน สุขภาพ
 ตลอดให้กำลังใจเสมอ ขอขอบคุณ นางสาววรรณกร สากระแสร์ คู่หู และผู้ร่วมช่วย และให้การปรึกษา
 ทำปฏิบัติการ และคอยช่วยเหลือกันตลอดเวลาทำงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ นางสาวณัฐภรณ์ เส็งเต้ และ
 นางสาวณิชาภัท สบายบัวโย น้องสาวที่น่ารัก คอยช่วยเหลือตลอดการทำวิทยานิพนธ์ ให้งานวิจัยใน
 รายวิชาวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทนี้สำเร็จไปด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอกล่าวขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ทัตติยา กัมพะษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ.....	ณ
บทที่ 1.....	21
บทนำ.....	21
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	21
2. วัตถุประสงค์.....	22
3. ความสำคัญของการวิจัย.....	23
4. ขอบเขตการวิจัย.....	23
5. นิยามศัพท์เฉพาะ.....	23
6. สมมุติฐานของการวิจัย.....	23
บทที่ 2.....	25
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	25
.....	25
เมลานิน (Melanin).....	25
เอนไซม์ไทโรซิเนส.....	26

วิตามินซี.....	29
กรดโคจิก.....	29
ผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV).....	31
เอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase; matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)).....	35
การสังเคราะห์และการสลายคอลลาเจน.....	36
เห็ดที่ใช้ศึกษาในงานวิจัย.....	43
เห็ดขอนขาว.....	44
เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา : เอนไซม์เปปซิน (Pepsin) (EC 3.4.23.1).....	48
บทที่ 3.....	49
วิธีการวิจัย.....	49
กลุ่มตัวอย่าง.....	49
พื้นที่ทำวิจัย.....	49
กลุ่มตัวอย่าง.....	49
ตัวอย่างเอนไซม์.....	50
เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์.....	50
สารเคมี.....	51
3.1.การศึกษาสายพันธุ์และความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว (phylogenetic tree).....	52
3.2. การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดขอนขาว.....	53
3.2.1. การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดลมและขอนขาวแห้ง (Yejun Deng et al., 2020).....	53
3.2.2 การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวสด.....	53

3.3. การเตรียมสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหลิน, ขอนขาวแห้ง และเห็ดขอนขาว สด โดยเอนไซม์เปปซิน.....	53
3.4. การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS method).....	54
3.5. การวิเคราะห์โปรไฟล์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวด้วยวิธี SDS-PAGE	54
3.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหลินแห้งและขอน ขาว (Biological activity).....	55
3.6.1. การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดหลิน และเห็ดขอนขาว	55
3.6.2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอน ด้วยวิธี ABTS.....	55
3.6.4. การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท จากเห็ดขอนขาว	56
3.7. การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ Human Keratinocyte Cell (HaCaT) และ เซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวที่ผ่าน การย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินด้วยเทคนิค MTT.....	56
3.7.1. ลักษณะของเซลล์.....	56
3.7.2. การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท จากเห็ดขอนขาวด้วยวิธี MTT.....	57
3.8. การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาว.....	57
3.9. การศึกษาการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส (Molecular docking).....	57
3.10. การวิเคราะห์ข้อมูล	58
บทที่4	59

ผลการวิจัย.....	59
1. การศึกษาสายพันธุ์และความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว (phylogenetic tree).....	59
2. การเตรียมเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเสทจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งและสด....	65
2.1. ปริมาณโปรตีนจากการเตรียมสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสท	65
3. การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS method).....	66
4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity test).....	68
4.1. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition)	68
4.2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1 inhibition)	71
4.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity).....	74
4.3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอน ขาวแห้งและสด ด้วยวิธี ABTS.....	74
4.3.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอน ขาวแห้งและสด ด้วยวิธี DPPH.....	76
5. การวิเคราะห์โปรไฟล์ของสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอน ขาวด้วยวิธี SDS-PAGE.....	79
6. การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอน ขาวด้วยวิธี MTT.....	81
7. การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ด้วยวิธี Liquid Chromatography – Mass Spectrometer (LC-MS).....	83
7.2. ผลการทดลองการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วย เอนไซม์เปปซินจากเห็ดขอนขาวสด.....	89

8. ผลการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์คอลลาจีเนส ด้วยโปรแกรมMolecular docking	93
8.1. ผลการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์	93
1. เปปไทด์ RHAKF จากมะตุมจีน.....	93
2. เปปไทด์ LLLKPVLL จากโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดขอนขาวแห้ง.....	95
3. เปปไทด์ KLKPLIIP จากโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดขอนขาวแห้ง.....	97
4. เปปไทด์ LILGSSS จากโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดขอนขาวสด.....	99
5. เปปไทด์ ARILLLLLLLL จากโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดขอนขาวสด....	101
8.2. ผลการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสและเปปไทด์	103
1. เปปไทด์ LIPLLKLLRWV จากโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดขอนขาวแห้ง ...	103
2. เปปไทด์ RLRTLFLM จากโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเห็ดขอนขาวสด .	106
3. เปปไทด์ GFSGLDGAKGD จากโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเปปไทด์สังเคราะห์ (Lu et al ., 2017).....	109
บทที่ 5.....	1
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	1
อภิปรายผลการทดลอง.....	1
สรุปผลการทดลอง.....	9
ภาคผนวก.....	12
ภาคผนวก.....	13
บรรณานุกรม.....	9
ประวัติผู้วิจัย.....	11

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากแหล่งธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	31
ตารางที่ 2 แสดงกลุ่มเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ที่ทำหน้าที่ในการย่อยคอลลาเจนและการย่อยสลายโปรตีนอื่น ๆ ใน Extracellular matrix (ECM)	37
ตารางที่ 3 แสดงลำดับเจลาตินเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากหนังปลาแปซิฟิกต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-1	42
ตารางที่ 4 แสดงสารโภชนาการเปรียบเทียบจากเห็ด 3 ชนิด ได้แก่ <i>L. squarrosulus</i> , <i>O. submucida</i> และ <i>T. aurantialba</i>	46
ตารางที่ 5 แสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของ <i>L. squarrosulus</i>	47
ตารางที่ 6 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลส	65
ตารางที่ 7 แสดงปริมาณโปรตีนจากการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแบบแห้ง และสด	65
ตารางที่ 8 ลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและสดที่เตรียมได้	66
ตารางที่ 9 แสดงผลค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ร้อยละ 50 และเปรียบเทียบค่า TEAC (umol Trolox/mg ตัวอย่าง) ด้วยวิธี ABTS และ DPPH	78
ตารางที่ 10 แสดงลักษณะของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาว ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	82
ตารางที่ 11 แสดงอัตราการรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน	83
ตารางที่ 12 แสดงค่า Free-radical scavenging (FRS) ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง	84

ตารางที่ 13 แสดงค่า Free-radical scavenging (FRS) ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสด.....	84
ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์คุณสมบัติของกลุ่ม Peptide Hydrophobicity หรือ Hydrophilicity ด้วย Peptide 2.0 Inc. software ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง.....	85
ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์คุณสมบัติของกลุ่ม Peptide Hydrophobicity หรือ Hydrophilicity ด้วย Peptide 2.0 Inc. software ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสด.....	86
ตารางที่ 16 แสดงฐานข้อมูลทางโปรตีนของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง.....	91
ตารางที่ 17 แสดงฐานข้อมูลโปรตีนของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสด	92
ตารางที่ 18 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ RHAKF และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X).....	94
ตารางที่ 19 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์ (GOLD fitness score).....	95
ตารางที่ 20 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ LLLK และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X).....	96
ตารางที่ 21 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์ (GOLD fitness score).....	97
ตารางที่ 22 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ KLK และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)	99
ตารางที่ 23 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์ (GOLD fitness score).....	100
ตารางที่ 24 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ SSS และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X).....	101

ตารางที่ 25 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์ (GOLD fitness score).....	102
ตารางที่ 26 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ LLLL และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X).....	103
ตารางที่ 27 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสและเปปไทด์ (PLP fitness score).....	104
ตารางที่ 28 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ LIPLLKLLRW และเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL).....	105
ตารางที่ 29 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสและเปปไทด์ (PLP fitness score).....	107
ตารางที่ 30 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ RLRTLKLLFLM และเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL).....	108
ตารางที่ 31 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสและเปปไทด์ (PLP fitness score).....	110
ตารางที่ 32 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ GFSGLDGAKGD และเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL).....	111
ตารางที่ 33 แสดงลำดับเปปไทด์ที่เลือกทำการศึกษา.....	115

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดง Flow chart แผนภาพรวมของงานวิจัย	24
ภาพที่ 2 แสดงผลกระทบจากรังสี UV ที่อยู่ในแสงแดดทำให้เกิด ผิวไหม้แดด (Sunburn)	25
ภาพที่ 3 แสดงเม็ดสีเมลานินจะถูกสร้างจากเซลล์ผิวหนังที่เรียกว่าเมลาโนไซต์ (melanocyte)	26
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากมนุษย์ (hTyr) และเห็ด (mTyr) ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาตำแหน่ง Copper B	27
ภาพที่ 5 กระบวนการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เมลาโนไซต์	28
ภาพที่ 6 โครงสร้างของเอนไซม์ tyrosinase และ บริเวณ active site ของ Agaricus bisporus	29
ภาพที่ 7 ผลข้างเคียงการเกิด Pro-oxidant จากวิตามินซี	30
ภาพที่ 8 แสดงผลข้างเคียงของการใช้ Kojic acid เกิดการระคายเคือง	30
ภาพที่ 9 แสดงผลกระทบจากปัจจัยภายนอกและภายในที่ทำให้เกิด ROS	32
ภาพที่ 10 แสดงการเกิด ROS ที่ทำให้เกิดการแก่ชราหรือการสลายคอลลาเจน	33
ภาพที่ 11 แสดงวิถีของ ROS ต่อการกระตุ้นให้ผิวเกิดการชราก่อนวัย	33
ภาพที่ 12 บทบาทของรังสียูวีบีหรือแสงแดดต่อการกระตุ้นให้เกิดการสลายของคอลลาเจน	34
ภาพที่ 13 แสดงโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ (Collagenase; matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)) ของมนุษย์ ในรูปแบบ inactive โครงสร้างติดกับ triple-helical peptide (THP)	37
ภาพที่ 14 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ MMP-1 ที่มี Zn ²⁺ เป็นองค์ประกอบบริเวณเร่งปฏิกิริยา ประกอบไปด้วย Histidine 3 โมเลกุล	38

ภาพที่ 15 แสดงเอนไซม์ MMP-1 สร้างจากชั้นผิว keratinocytes ของเซลล์ epithelium จากเซลล์ผิวหนัง จะทำการย่อยสาย Collagen triple helix ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของผิวหนังชั้นหนัง	38
ภาพที่ 16 แสดงกระบวนการสร้างและสลายคอลลาเจน	40
ภาพที่ 17 แสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารตั้งต้น (Tyrosine; A และ L-DOPA; B)	41
ภาพที่ 18 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของสารทั้งสองชนิด	41
ภาพที่ 19 แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-1 ของเปปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	42
ภาพที่ 20 เห็ดดลม (Lentinus Polychrous)	43
ภาพที่ 21 ตัวอย่างเห็ดดลมแห้ง	44
ภาพที่ 22 เห็ดขอนขาว (Lentinus squarrosulus Mont)	45
ภาพที่ 23 ตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง	45
ภาพที่ 24 แสดงการตายของเซลล์มะเร็งปอด H460 ต่อสารสกัดเปปไทด์จากเห็ดขอนขาว	47
ภาพที่ 25 Cleavage site ของเอนไซม์เปปซินที่นำมา : https://bit.ly/2H2xn3m	48
ภาพที่ 26 ตัวอย่างเห็ดดลมแห้ง	49
ภาพที่ 27 ตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง	49
ภาพที่ 28 แสดงลักษณะของเซลล์ผิวหนัง Human Keratinocyte (HaCaT)	56
ภาพที่ 29 แสดงการแสดงออกของแอมปีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวแห้ง (ก.) และเห็ดขอนขาวสด (ข.)	60

ภาพที่ 30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง(ก.) และเห็ด
 ขอนขาวสด(ข.) โดยแสดงด้วยแผนภาพ phylogenetic tree กับฐานข้อมูล GenBank;NCBI
62

ภาพที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง(ก.) และเห็ด
 ขอนขาวสด(ข.) โดยแสดงด้วยแผนภาพ phylogenetic tree กับฐานข้อมูล GenBank;NCBI
63

ภาพที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดขอนขาว
 แห้ง.....64

ภาพที่ 33 แสดงกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของสาร
 มาตรฐาน L-Leucine ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร.....67

ภาพที่ 34 แสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีน (Degree of hydrolysate) ของสารสกัด
 หน่อบรตและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแบบแห้งและเห็ดขอนขาว
 สดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 µg ด้วยวิธี TNBS.....68

ภาพที่ 35 แสดงร้อยละยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่เวลา 20 นาที ของ
 ตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและ.....70

ภาพที่ 36 แสดงร้อยละยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่เวลา 20 นาที ของ
 ตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดลมแห้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ..71

ภาพที่ 37 แสดงร้อยละยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ของตัวอย่าง
 สารสกัดโปรตีนไฮโดรไล-เสทจากเห็ดขอนขาวแบบแห้งและ.....73

ภาพที่ 38 แสดงร้อยละต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหน่อบรตและสาร
 สกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด.....75

ภาพที่ 39 แสดงร้อยละต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหน่อบรตและสาร
 สกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด.....77

ภาพที่ 40 แสดงโปรไฟล์ของสารสกัดหยาบโปรตีนและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก เห็ดขอนขาวแบบแห้ง (ก.)และเห็ดขอนขาวสด (ข.) ด้วยวิธี SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Silver และ Coomassie Brilliant Blue R-250 (ความเข้มข้นโปรตีน 100 µg).....	79
ภาพที่ 41 แสดงการวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image J software ของสารสกัด หยาบโปรตีนและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง (ก.) และสด (ข.) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (M).....	80
ภาพที่ 42 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไล เสทจากเห็ดขอนขาวแบบแห้งและสดที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, และ 2.0 µg/µL.....	82
ภาพที่ 43 แสดงการวิเคราะห์ชนิดการทำงานของลำดับเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีน ไฮโดรไลเสท.....	87
ภาพที่ 44 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของ เอนไซม์.....	94
ภาพที่ 45 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของ เอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง LLLK แบบจำลองการจับกัน แบบสองมิติ.....	96
ภาพที่ 46 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของ เอนไซม์.....	98
ภาพที่ 47 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของ เอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง SSS แบบจำลองการจับกัน แบบสองมิติ.....	100
ภาพที่ 48 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของ เอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง LLLL แบบจำลองการจับกัน แบบสองมิติ.....	102

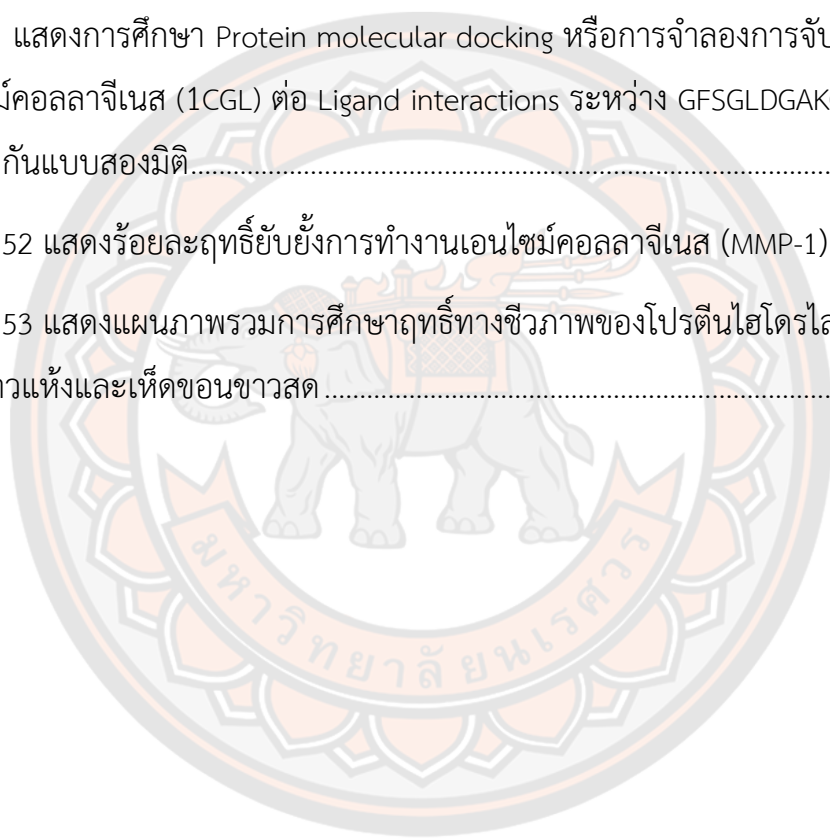
ภาพที่ 49 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของ
 เอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง LIPLKLLRWV แบบจำลอง
 การจับกันแบบสองมิติ..... 104

ภาพที่ 50 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของ
 เอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง RLRTLFLM แบบจำลอง
 การจับกันแบบสองมิติ..... 107

ภาพที่ 51 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของ
 เอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง GFSGLDGAKGD แบบจำลอง
 การจับกันแบบสองมิติ..... 110

ภาพที่ 52 แสดงร้อยละยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) (ก.), 117

ภาพที่ 53 แสดงแผนภาพรวมการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสเทสจากเห็ด
 ขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด..... 11



บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีการเกิดปัญหาทางผิวหนัง มีปัจจัยต่างๆมากมาย ได้แก่ ฮอร์โมน หรือพันธุกรรม และแสงแดด (Megaw L. et al., 2017) โดยการสังเคราะห์เมลานินจะเกิดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ชั้นบริเวณผิวหนังกำพร้า (epidermis) โดยมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา monophenolase คือ เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เกิดปฏิกิริยา hydroxylation ของกรดอะมิโนไทโรซีน เปลี่ยนไปเป็น L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) จากนั้นเกิดปฏิกิริยา diphenolase เปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น DOPA-quinone สังเคราะห์เป็นเม็ดสีเมลานิน (Akihito Ochiai et al., 2016) โดยเม็ดสีเหล่านี้จะทำให้เกิดสีน้ำตาล สีชมพู หรือสีผิวหนัง หากมีการสังเคราะห์เมลานินที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดภาวะ Hyperpigmentation หรือ ฝ้า กระ จุดด่างดำ (Sato K. et al., 2009 และ Banna, H et al., 2018) .

การได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตยังสามารถทำให้เกิด photo aging หรือริ้วรอยก่อนวัย ซึ่ง reactive oxygen species (ROS) มีบทบาทกระตุ้นการถ่ายทอดสัญญาณ Mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ P13/AKT pathway ในวิถี AKT pathway มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ และวิถี MAPK จะควบคุมกระตุ้น activator protein-1 (AP-1) และ NF- κ B ในนิวเคลียสให้เกิดการแสดงออกกระตุ้น activator protein-1 (AP-1) ให้สร้าง Matrix metalloproteinase (MMP) เป็นกลุ่มของ extracellular proteinases ซึ่งย่อยสลาย เช่น คอลลาเจน และ elastic fibers ก่อให้เกิดริ้วรอย และการชราของผิว (Jesumani V. et al., 2019)

อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชสำอางในรูปแบบยา อาหารเสริม ครีม โลชั่น เซรั่ม และ โทนนเนอร์บำรุงผิว เริ่มมีการนำสารจากธรรมชาติ เช่น กรดโคจิก ไฮโดรควิโนน วิตามินซีและอาร์บูติน มาใช้ลดปัญหาดังกล่าว โดยสารเหล่านี้จะเข้าไปทำการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Vijayakumar, R et al., 2017, Ochiai, A et al., 2016) อีกทั้งวิตามินซีมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสามารถลดการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส ซึ่งหากมีการใช้สารเหล่านี้ปริมาณที่มากจะทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น ผิวบอบบางไวต่อแสง ระคายเคือง ผิวหนังอักเสบ รวมไปถึงมีฤทธิ์เป็น pro-oxidant (Sato K. et al., 2009) ทั้งนี้สารประกอบเหล่านี้ยังก่อให้เกิดอาการแพ้ต่อผู้ใช้ ทางอุตสาหกรรมอาหารและยาได้ให้ความสำคัญในเรื่องของความปลอดภัยต่อผู้บริโภคเป็นหลัก ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์หรือเครื่องสำอาง มีการค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีผลต่อการลดภาวะเครียดออกซิเดทีฟ ที่มีบทบาทสำคัญของการลดการเสื่อมสภาพของผิวหนัง หรือลดการ

เกิดภาวะเครียดออกซิเดทีฟที่เป็นตัวการทำให้เกิดผลเสียต่อผิว และความสามารถในการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส และคอลลาจีเนส ได้แก่ flavonoid, kaempferol, quercetin, gallic acid และ kurarinone (Chen, Q. and Kubo I. et al, 1995-2002) และสารในกลุ่มเปปไทด์ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) โดยในขณะนี้กำลังได้รับความนิยมอย่างมากในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆอย่างกว้างขวาง เปปไทด์ขนาดเล็กจากการย่อยโปรตีนมีความสามารถซึมเข้าสู่ผิวหนังได้ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยังมีคุณสมบัติต้านการอักเสบ (Piyanan C. และ Romanee S. et al., 2014) และยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ลดริ้วรอย เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ (Kurosawa K. et al, 1991) โดยงานวิจัยนี้ได้สนใจเกี่ยวกับการศึกษา เห็ดขอนขาว ซึ่งเห็ดขอนขาวเป็นเห็ดที่พบอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รายงานว่าเห็ดชนิดนี้อุดมไปด้วยสารอาหาร มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าสารโภชนาการอื่น ๆ มีไขมันในสัดส่วนน้อย มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถต้านเซลล์มะเร็ง กระตุ้นการทำงานของลำไส้ ระบบเลือด หัวใจ และมีส่วนช่วยลดระดับความดันและคอเลสเตอรอลในเลือด (De Leon et al., 2017)

ดังนั้นงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองและเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสารสกัดเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.) ด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส (*In vitro*) และศึกษาลำดับกรดอะมิโนภายในสารสกัดเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำเปปไทด์มาประยุกต์ใช้ในเวชสำอาง ยา หรืออาหารในการลดระดับเมลานินต่อไปในเซลล์ผิวหนัง เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่เห็ดขอนขาวที่เป็นวัตถุดิบที่มีอยู่ในประเทศ

2. วัตถุประสงค์

- 2.1. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาวเพื่อระบุความจำเพาะของสายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการศึกษา
- 2.2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสารสกัดเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด (*Lentinus squarrosulus* Mont.) ด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส (*in vitro*)
- 2.3. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและรูปแบบของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส
- 2.4. ศึกษาผลของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง

2.5. วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนหรือองค์ประกอบภายในสารสกัดเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด

3. ความสำคัญของการวิจัย

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าเห็ดขอนขาวมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถต้านเซลล์มะเร็ง และมีส่วนช่วยลดระดับความดันและคอเลสเตอรอลในเลือด อีกทั้งเห็ดขอนขาวยังเป็นแหล่งโปรตีนสูงอีกหนึ่งแหล่ง ซึ่งเหมาะแก่การนำมาศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส ซึ่งผลการศึกษาศึกษาสามารถใช้บอกเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้ต่อไปในอนาคต

4. ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาวเพื่อระบุความจำเพาะของสายพันธุ์เห็ดที่ใช้จาก DNA barcode โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาวและเห็ดสปีชีส์อื่นๆ (phylogenetic tree)

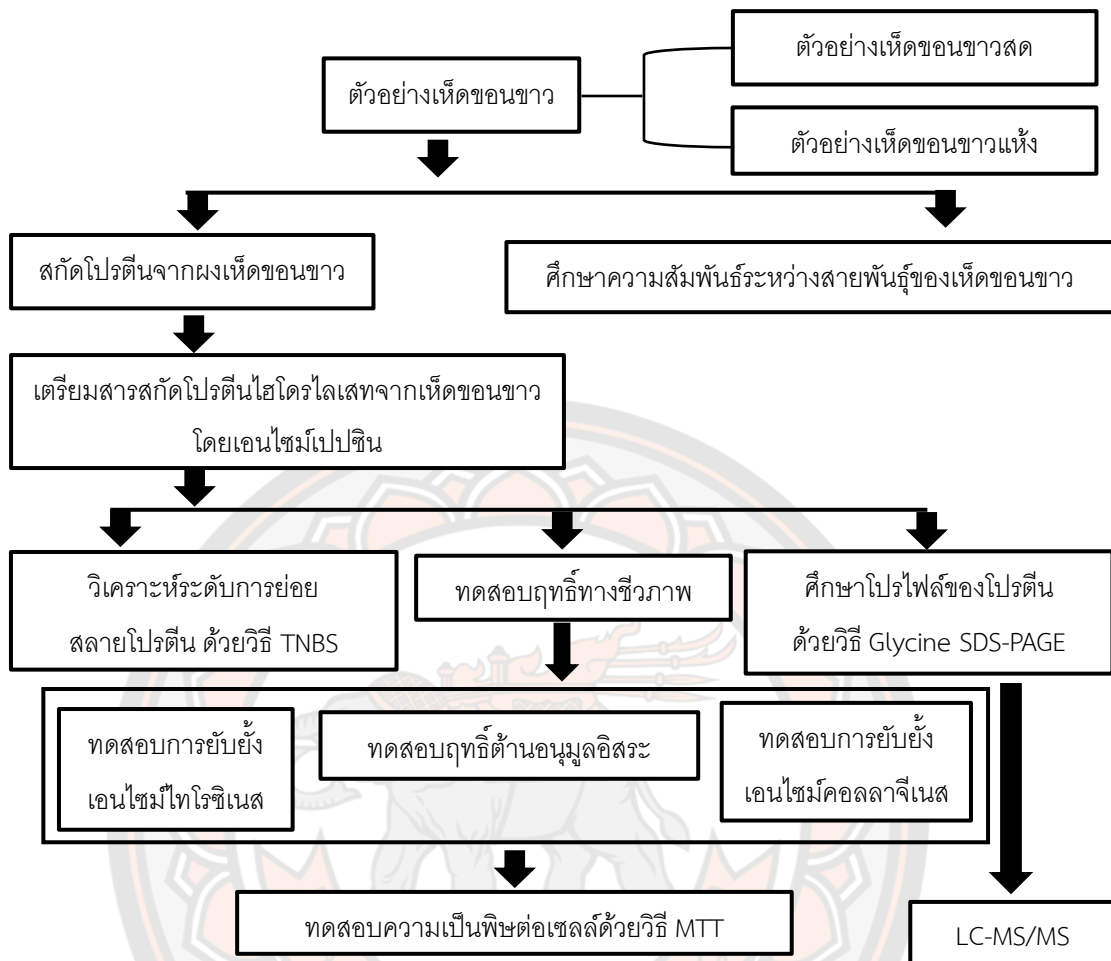
เตรียมสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวเพื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) และคัดแยกขนาดของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสให้มีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน ศึกษาระดับการย่อยสลายของโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH) ด้วยวิธี TNBS (Trinitrobenzenesulfonic acid) และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนสเบื้องต้น (*in vitro*) ศึกษาสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดต่อความเป็นพิษในเซลล์ Human Keratinocyte Cell (HaCaT) รวมถึงวิเคราะห์ลำดับองค์ประกอบเปปไทด์ภายในสารสกัดเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

5. นิยามศัพท์เฉพาะ

เอนไซม์ไทโรซิเนส, เอนไซม์คอลลาจีเนส, เห็ดขอนขาว, โปรตีนไฮโดรไลส, สารต้านอนุมูลอิสระ Tyrosinase, Collagenase, *Lentinus squarrosulus* Mont, Protein hydrolysate, Antioxidant

6. สมมุติฐานของการวิจัย

สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินสามารถมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์คอลลาจีเนส อีกทั้งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง เซลล์ผิวหนัง Human Keratinocyte (HaCaT)



ภาพที่ 1 แสดง Flow chart แผนภาพรวมของงานวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เมื่อร่างกายผลิตหรือสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่มีปริมาณที่มากเกินไป ทำให้เกิดภาวะ Hyperpigmentation (Zhong S.M. et al, 2015) ปัจจัยที่ทำให้เกิดผิวหมองคล้ำ กระ ฝ้า จุดต่างดํา และผิวไหม้เกรียม (ดังภาพที่2) มีหลายปัจจัย ได้แก่แสงแดด, ฮอร์โมน, พันธุกรรม การมีผิวหน้า อักเสบจากการแพ้สัมผัส หรือการแพ้เครื่องสำอาง ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อและทำให้เกิดปัญหา มากที่สุด คือ แสงแดด (Megaw L. et al., 2017) โดยจะพบรังสีอัลตราไวโอเล็ตซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อมากที่สุด ซึ่งทำให้เกิดผิวไหม้, เกิดริ้วรอยก่อนวัย, ความเสียหายต่อดวงตา, ระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ, ผื่นแพ้แดด (Photoallergic) และผื่นที่เหมือนกับถูกแดดเผาไหม้ (Phototoxic reactions) และแม้แต่โรคมะเร็งผิวหนัง โดยพบว่ากว่า 90% ของมะเร็งผิวหนังเป็นผลมาจากแสงแดด

การสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน มีการสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนไทโรซีนเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนสให้ได้เป็นเมลานิน ซึ่งเมลานินมี 2 ชนิด ได้แก่

1. ยูเมลานิน (Eumelanin) เม็ดสีเมลานินจะเป็นเม็ดสีน้ำตาล-ดํา
2. พีโอเมลานิน (Pheomelanin) เม็ดสีเมลานินจะเป็นเม็ดสีเหลือง-แดง (จรัสพล, 2548)



(ก.)

(ข.)

(ค.)

ภาพที่ 2 แสดงผลกระทบจากรังสี UV ที่อยู่ในแสงแดดทำให้เกิด ผิวไหม้แดด (Sunburn)

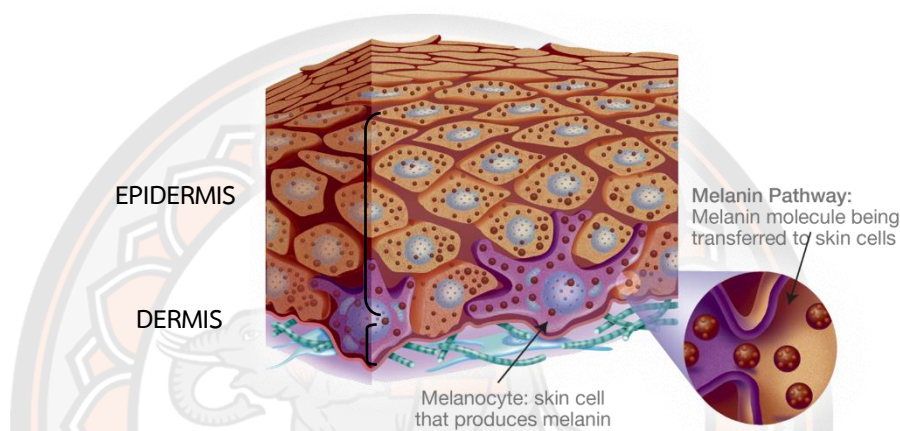
(ก.) ผิวหมองคล้ำ เกิดฝ้ากระ และจุดต่างดํา (ข.) และ ผิวไหม้เกรียม (ค.)

ที่มา : <https://bit.ly/2T7nV58>

เมลานิน (Melanin)

เมลานินเป็นเม็ดสีน้ำตาลหรือสีดําที่พบในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดทั้งใน คน สัตว์ เห็ดหรือเชื้อรา นอกจากนี้เมลานินมีบทบาทสำคัญในการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ในสภาพธรรมชาติ มีประโยชน์ทางชีวภาพมากมาย เช่น ป้องกันความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงยูวี ตัวออกซิโดซ์และรังสีก่อประจุ (ionizing radiation) ยังมีส่วนช่วยให้กลุ่มฟังไจอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและก่อให้เกิดโรคเชื้อรา อีกทั้งเป็นโพลีเมอร์เม็ดสีทำให้เกิดการแสดงออกของสีผิว สีตาและสีผมในมนุษย์ ซึ่งเมลานินจะถูกสร้างจากเซลล์ผิวหนังที่เรียกว่าเมลานโนไซต์ (melanocyte) โดยเมลานโนไซต์จะสร้างสารเมลานิน บรรจุอยู่ในแคปซูลที่เรียกว่าเมลานโนโซม เมื่อถูกสร้างเสร็จจะส่งไปตามร่างแหเข้าสู่เซลล์

ผิวหนัง สีน้ำตาล และสีชมพู (ดังภาพที่3) ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ โดยกระบวนการสังเคราะห์เมลานินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือมนุษย์จะมีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ tyrosinase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ของสารตั้งต้นกรดอะมิโน tyrosine ไปเป็นสารตัวกลาง คือ DOPAquinone และการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินสามารถสังเคราะห์ได้ 2 ทาง คือ การสังเคราะห์ eumelanin เป็นเม็ดสีเข้ม (น้ำตาล-ดำ) และ pheomelanin เป็นเม็ดสี (เหลือง-แดง) ซึ่งยูเมลานินที่พบมากในแถบแอฟริกาและเอเชีย ในขณะที่ฟีโอเมลานินจะพบในแถบกลุ่มประชากร ตะวันตก (Pillaiyar, T et al., 2017)



ภาพที่ 3 แสดงเม็ดสีเมลานินจะถูกสร้างจากเซลล์ผิวหนังที่เรียกว่าเมลานोไซต์ (melanocyte) ในชั้นผิวหน้า epidermis

ที่มา : D'Mello SA et al., 2016

เอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) (EC 1.14.18.1) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นหลักของการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ถูกสังเคราะห์ที่ Rough Endoplasmic Reticulum (RER) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ของกระบวนการ Monophenol และปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของกระบวนการ Diphenol บริเวณ Active site ประกอบไปด้วย Copper A binding site และ Copper B binding site ในแต่ละโมเลกุลของ Copper (Cu) (ดังภาพที่ 6) จะประกอบไปด้วย Histidine 3 โมเลกุล ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (Melanogenesis) (Li, X., Li, S., Liang, X. et al., 2020)

กระบวนการนี้ทำให้ผิวหนังมีสีหมองคล้ำลง โดยจะเร่งปฏิกิริยาในขั้นเริ่มต้นของกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ของ Tyrosine และ 3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) ให้เป็น DOPAquinone ทำปฏิกิริยาสองทางได้เป็นยูเมลานิน (Eumelanin) เม็ดสีเมลานินจะเป็นเม็ดสีน้ำตาล-ดำ และฟีโอเมลานิน (Pheomelanin)เม็ดสีเมลานินจะเป็นเม็ดสีเหลือง-แดง โดยยูเมลานิน

จะมี DOPAchrome tautomerase (TRP2) และ 5,6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase (TRP1) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจนเกิดเป็นเม็ดสีสีน้ำตาลหรือดำ ส่วนฟีโอเมลานิน จะเกิดการรวมตัวระหว่าง DOPAquinone และ กรดอะมิโน Cysteine หรือ Glutathione ได้เป็นเม็ดสีสีเหลืองหรือสีแดง (Ebanks, J. P., Wickett, R. R., & Boissy, R. E. et al., 2009) (ดังภาพที่ 5)

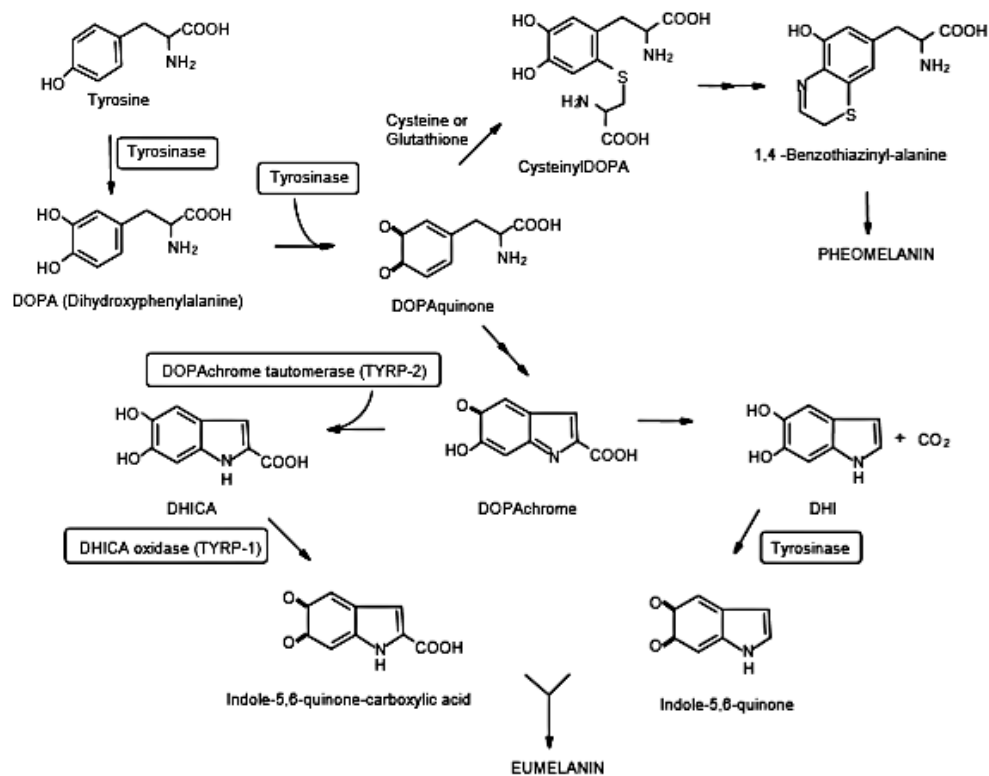
โดยมีการศึกษาในปี 2018 ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของสารยับยั้งของโมเลกุลเอนไซม์ไทโรซิเนสระหว่างเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดและมนุษย์ โดยใช้สาร Thiamidol ที่มีองค์ประกอบคือ isobutylamido, thiazolyl และ resorcinol เป็นสารยับยั้งในการศึกษาเบื้องต้น ในปัจจุบัน การศึกษาส่วนใหญ่เอนไซม์ไทโรซิเนส จากเห็ดจะแยกจากเห็ด *Agaricus bisporus* (mTyr; mushroom tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ไทโรซิเนสชนิดเดียวที่มีจำหน่าย โดยกรดอะมิโนที่ประกอบภายในเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดหรือ mTyr ของไอโซเอนไซม์ PPO3 และ PPO4 ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาดำแหน่ง Copper B; CuB จะมีพบกรดอะมิโนภายในโครงสร้างของเอนไซม์ที่เหมือนกันกับเอนไซม์ไทโรซิเนสจากมนุษย์ (hTyr; human tyrosinase) ได้แก่ กรดอะมิโน Histidine ที่ตำแหน่ง 363, 367 และ 390 (ในแถบสีแดง; รูปภาพที่ 4), มีลำดับกรดอะมิโน asparagine ที่ตำแหน่ง 364, ลำดับกรดอะมิโน glycine ที่ตำแหน่ง 372, ลำดับกรดอะมิโน methionine ที่ตำแหน่ง 374, กรดอะมิโน valine ที่ตำแหน่ง 377, กรดอะมิโน alanine ที่ตำแหน่ง 381, กรดอะมิโน aspartic acid ที่ตำแหน่ง 383, กรดอะมิโน proline ที่ตำแหน่ง 384, กรดอะมิโน isoleucine ที่ตำแหน่ง 365, กรดอะมิโน phenylalanine ที่ตำแหน่ง 366, และกรดอะมิโน histidine ที่ตำแหน่ง 389 (ในแถบสีเทา; รูปภาพที่ 3) จากการศึกษาโครงสร้างจำลองการจับกันระหว่างสารยับยั้งอะเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังนั้นแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงระหว่างโครงสร้างลำดับกรดอะมิโนของ hTyr และ mTyr และความเหมาะสมในการนำเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดมาศึกษาในหลอดทดลอง *Agaricus bisporus* (mTyr)

		363	367			390
hTyr		SMH	NALHI	YMN	GTMSQVQGSANDPIFLHHA
mTyr PPO3		MVH	NTVHF	LIGR	DPTLD	PLVPGHMGSVPHAAFDPIFWMHHC
mTyr PPO4		AVH	DDIH	GFVGR	GA.....	IRGHMTHALFAAFDPIFWLHHS

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากมนุษย์ (hTyr) และ

เห็ด (mTyr) ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาดำแหน่ง Copper B

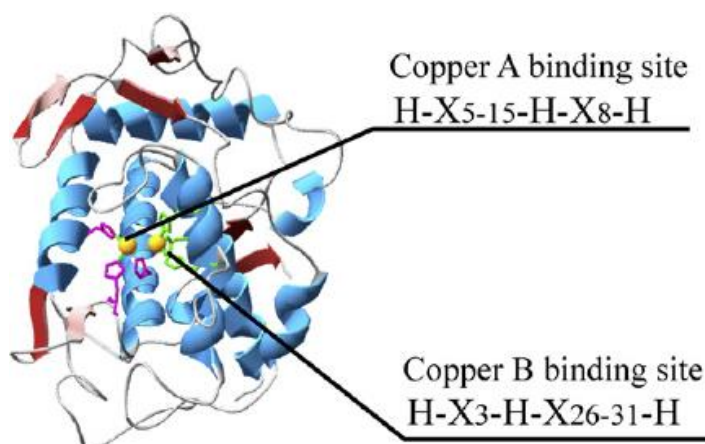
ที่มา : Tobias Mann et al., 2018



ภาพที่ 5 กระบวนการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เมลานोไซต์

ที่มา : Ebanks, J. P., Wickett, R. R., & Boissy, R. E. Et al., 2009

การถูกกระตุ้นจากรังสี UV ในปริมาณที่มากทำให้เกิดการคล้ำเสียของบริเวณที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ดังนั้นจึงมีการนำสารชนิดต่างๆที่ได้จากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ มาใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยปัจจุบันทางอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชสำอางได้นำสารเหล่านั้นเข้ามายับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ไม่ว่าจะเป็นกรดโคจิก วิตามินซี และอาร์บูติน ซึ่งจะอยู่ในรูปอาหารเสริม ครีม โลชั่น เซรั่ม และโทนเนอร์บำรุงผิว ซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียง ก่อให้เกิดผิวยุบบาง ระคายเคือง ผิวน้ำอักเสบ ไวต่อแสง มีฤทธิ์เป็น Pro-oxidant และเป็นอันตรายหากถูกดูดซึมผ่านผิวหนังโดยตรงในปริมาณที่มากและเป็นประจำ (Sato K. et al, 2009)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของเอนไซม์ tyrosinase และ บริเวณ active site ของ *Agaricus bisporus*

ที่มา : W. L. DeLano and Palo Alto, et al, 2003

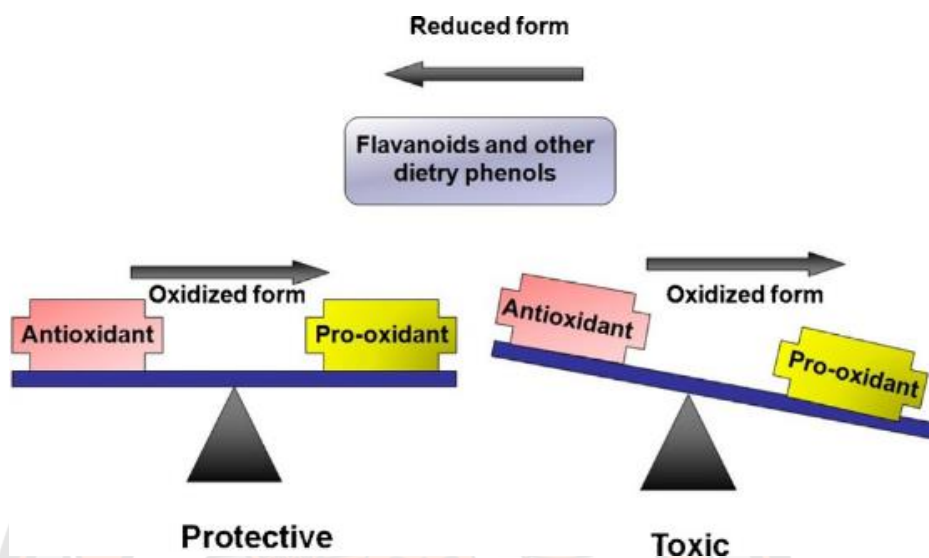
วิตามินซี

วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นสารจากธรรมชาติ สามารถพบได้ทั่วไปใน ผัก ผลไม้ ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นต่อร่างกาย ส่วนใหญ่นิยมนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและขัดขวางกระบวนการ oxidation ของ DOPA quinone และ 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) โดยเข้าไปจับกับโมเลกุลของ Cu^{2+} A และ Cu^{2+} B ซึ่งเป็นบริเวณ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้และไม่สามารถสังเคราะห์เมลานินได้ ส่งผลให้ผิวกระจ่างใสขึ้น แต่ผลข้างเคียงของสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อได้รับในปริมาณมากมีฤทธิ์เป็น Pro-oxidant ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งจะส่งข้างเคียงให้แก่ร่างกาย (Putchala, M. et al, 2013) (ดังภาพที่ 7) .

กรดโคจิก

กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารที่สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการจับตัวกับ Cu^{2+} A และ Cu^{2+} B ซึ่งเป็นบริเวณ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้และขัดขวางปฏิกิริยา tautomerization การเปลี่ยน 5,6-Dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-indole-2-carboxylic acid (DOPA chrome) เป็น DHICA ในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Ebanks J.P. et al, 2009) ทำให้มีการสังเคราะห์เมลานินน้อยลง ส่งผลให้ผิวขาว โดยทั่วไปใช้กรดโคจิก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-4 ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งกรดโค

จิก ข้อจำกัดและผลข้างเคียง เช่น ผิวลอก ผิวมีความไวต่อแสง เกิดผื่นแดงและทำให้เกิดผิวหนังอักเสบระคายเคืองจากการแพ้สัมผัส (Saghaie L. et al, 2013) (ดังภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 ผลข้างเคียงการเกิด Pro-oxidant จากวิตามินซี

ที่มา : <https://bit.ly/2YnnVR0>



ภาพที่ 8 แสดงผลข้างเคียงของการใช้ Kojic acid เกิดการระคายเคือง

ที่มา : <https://bit.ly/2GOSCDN>

สารยับยั้งจากแหล่งธรรมชาติ

สารยับยั้งจากแหล่งธรรมชาติ (Natural Sources) ซึ่งมีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายหากได้รับในความเข้มข้นที่สูงและถูกนำมาใช้ต่อเนื่อง (Sung-Yum Seo and, Vinay k. Sharma. Et al, 2003) โดยฤทธิ์ของสารประกอบแต่ละชนิดจะมีความแรงของการเป็นพิษแต่ละชนิดและประเภท เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ได้แก่ Flavanoid (Kubo I and Kinst-Hori. et al,

1999), Kaempferol, Quercetin, Gallic acid และ Kurarinone (Chen, Q. and Kubo I. et al, 2002) (ตารางที่ 1) ถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับลดภาวะการเกิด Hyperpigmentation ซึ่งถูกนำมาเป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมอาหาร ยา (Espin, J. C. Et al, 2001) และสารเคมี (Chemicals) ที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส สามารถทำให้เกิดอาการแพ้ได้ (Andrawis, A. and Kahn, V. et al, 1985)

ผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV)

นอกจากผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) หรือ UVB ต่อการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อผิวหนังและทำให้เกิดริ้วรอย รังสีอัลตราไวโอเล็ตทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) และยังทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant โดย ROS เหล่านี้ก่อให้เกิดความผิดปกติของผิวหนัง เช่น ริ้วรอยก่อนวัย ความแห้งกร้าน จุดต่างดำ เป็นต้น

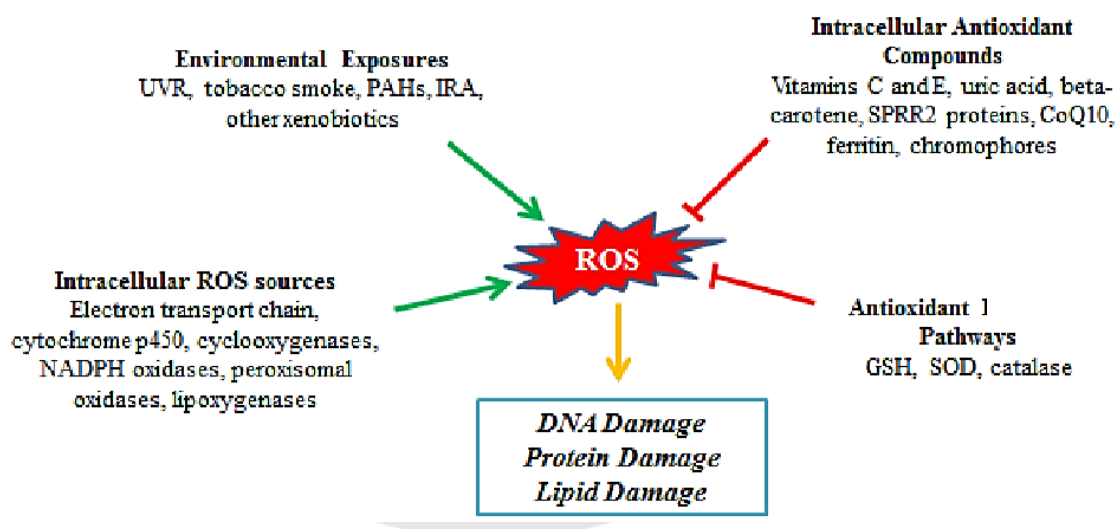
ตารางที่ 1 แสดงสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากแหล่งธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

(ที่มา : Sung-Yum Seo and, Vinay k. Sharma. et al, 2003)

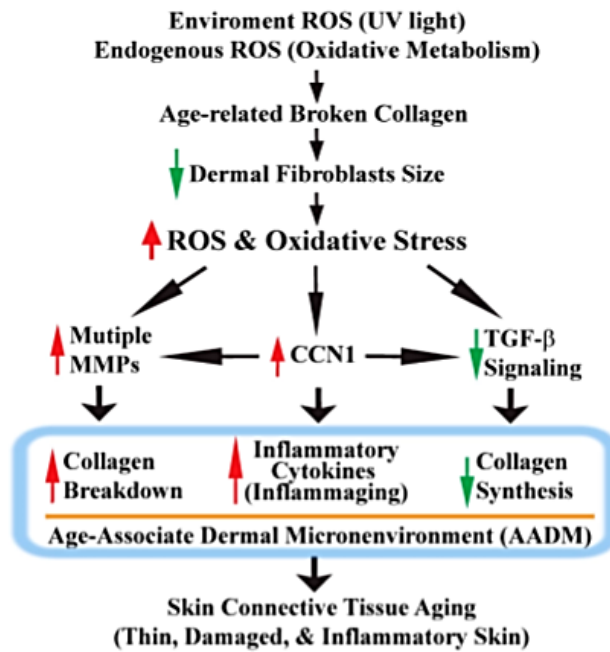
inhibitor	source	type of inhibition	ID ₅₀ (mM)	ref ^a
kaempferol	<i>Crocus sativus</i>	competitive ^b	0.230	49
quercetin	<i>Heterotheca inuloides</i>	competitive ^b	0.070	49
kurarinone	<i>Sophora flavescens</i>	noncompetitive ^c	0.005	52
ECG	green tea	competitive ^c	0.035	55
GCG	green tea	competitive ^c	0.017	55
EGCG	green tea	competitive ^c	0.034	55
1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose	<i>Galla rhois</i>	noncompetitive ^b	50	56
oxyresveratrol	<i>Morus alba</i>	noncompetitive ^b	0.001	62
anacardic acid	<i>Anacardium occidentale</i>	competitive ^b		60
p-coumaric acid	<i>Panax ginseng</i>	mixed ^b	3.65	61
arbutin	<i>Gvae grsi</i>	¹ competitive uncompetitive ^b	0.04	112
aloesin	<i>Aloe vera</i>	¹ noncompetitive	0.10	112
3,4-dihydroxycinnamic acid	<i>Pulsatilla cernua</i>	noncompetitive ^b	0.97	68
4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid	<i>Pulsatilla cernua</i>	noncompetitive ^b	0.33	68
cuminaldehyde	cumin seed	noncompetitive ^b	0.05	67
cumic acid	cumin seed	noncompetitive ^b	0.26	67
anisaldehyde	anise oil	noncompetitive ^b	0.38	68
anisic acid	anise oil	noncompetitive ^b	0.68	68
trans-cinnamaldehyde	<i>Cinnamomum cassia</i>	competitive ^b	0.85	63
(2E)-alkenal (C ₇)	<i>Oliva olea</i>	noncompetitive ^b	1.3	64
2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde	<i>Mondia whitei, Rhus vulgaris, Scleroca calfra</i>	mixed ^b	0.03	65
la	<i>Agaricus hortensis</i>	competitive ^b		74
lb	<i>Agaricus hortensis</i>	noncompetitive ^b		74
agariline	<i>Agaricus bisporus</i>	uncompetitive ^b competitive ^c		76
metallothionein	<i>Aspergillus niger</i>	mixed ^d mixed ^e	0.22 20.2	75

^a Reference cited for ID₅₀ values. ^b wrt dopa. ^c wrt tyrosine. ^d wrt catechin. ^e wrt chlorogenic acid.

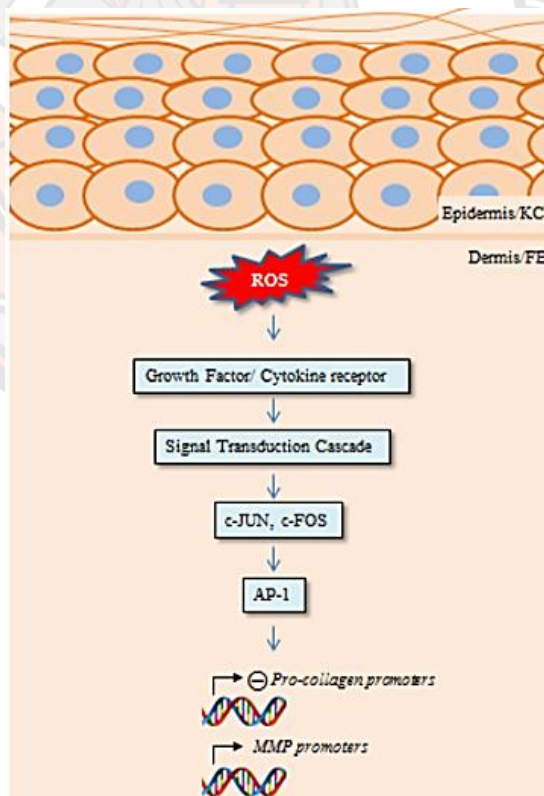
การเสื่อมสภาพของผิวหนังเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่เกิดจากสองปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายใน การเกิดริ้วรอยหรือผิวที่แก่เกิดจากพันธุกรรม และปัจจัยภายนอกเกิดจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต ริ้วรอยประเภทนี้เรียกว่า photo-aging หรือริ้วรอยก่อนวัย มีบทบาทสำคัญของการเสื่อมสภาพของผิวหนัง ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) เป็นตัวทำให้เกิดการออกซิไดซ์ของสารชีวโมเลกุลต่างๆภายในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก (ดังภาพที่ 9) (Ahsanuddin, S et al., 2016) เกิดเป็นภาวะเครียดออกซิเดทีฟ ผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อผิวหนังคือ เพิ่มการทำงานของ Matrix metalloproteinase (MMP) (ดังภาพที่ 11) หลายกลุ่มในเกิดการ ทำงานเพิ่มขึ้น ทำให้คอลลาเจนเกิดการแตกหักและสลาย กระตุ้นการทำงานของ CCN1 ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไซโตไคน์ทำให้เกิดการอักเสบ และลดการแสดงออกของวิถี TGF- β ที่กระตุ้นการสังเคราะห์คอลลาเจน (ดังภาพที่ 10) (Tu, Y., & Quan, T. et al., 2016)



ภาพที่ 9 แสดงผลกระทบจากปัจจัยภายนอกและภายในที่ทำให้เกิด ROS และสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถลดการเกิด ROS
ที่มา : Ahsanuddin, S et al., 2016

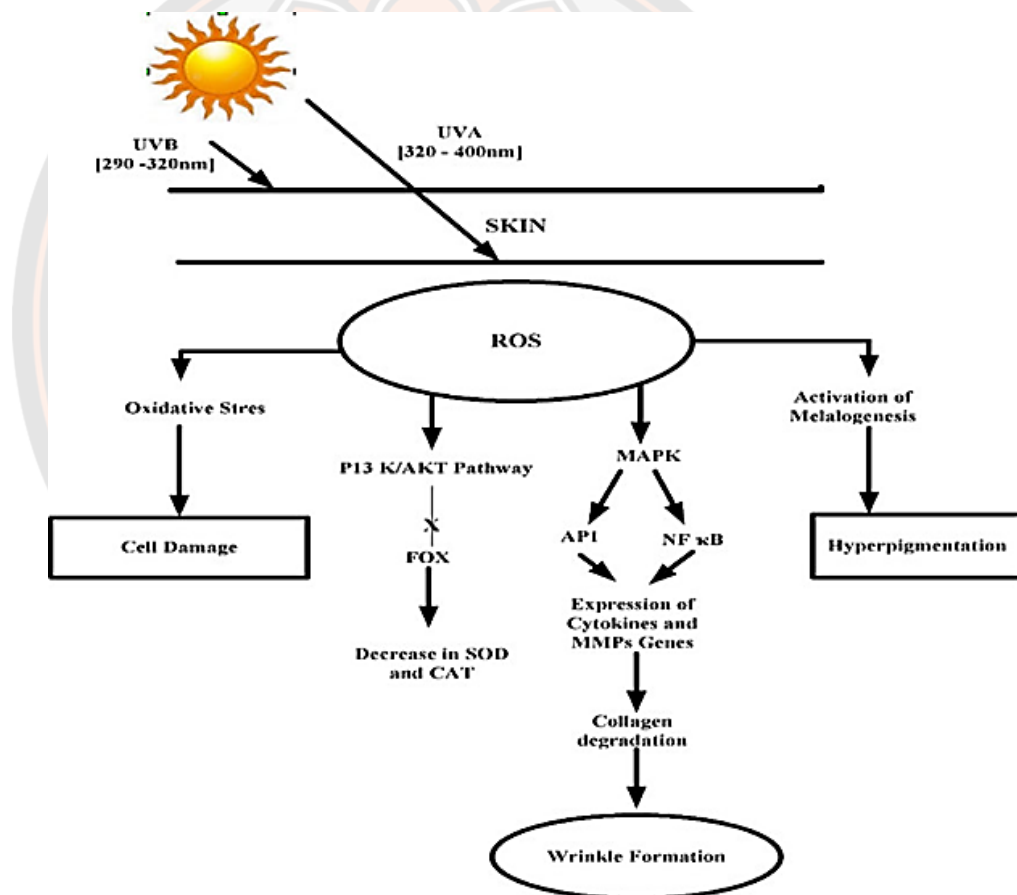


ภาพที่ 10 แสดงการเกิด ROS ที่ทำให้เกิดการแก่ชราหรือการสลายคอลลาเจน
ที่มา : Tu, Y., & Quan, T. et al., 2016



ภาพที่ 11 แสดงวิธีของ ROS ต่อการกระตุ้นให้ผิวเกิดการชราก่อนวัย
ที่มา : Ahsanuddin, S et al., 2016

กระบวนการสร้าง Matrix metalloproteinase (MMP) ซึ่งกระตุ้นปัจจัยการเจริญเติบโตต่างๆ และตัวรับไซโตไคน์ โดยกระตุ้นการถ่ายทอดสัญญาณ Mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ P13/AKT pathway วิธี AKT pathway จะไปปิดการใช้งานของ Fox ซึ่งยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ โดยวิธี MAPK จะควบคุมกระตุ้น activator protein-1 (AP-1) และ NF- κ B ในนิวเคลียสให้เกิดการแสดงออก การกระตุ้น activator protein-1 (AP-1) ให้สร้าง Matrix metalloproteinase (MMP) เป็นกลุ่มของ extracellular proteinases ซึ่งย่อยสลาย เช่น คอลลาเจน และ elastic fibers ซึ่งก่อให้เกิดริ้วรอย และการชราของผิว (ดังภาพที่ 12) (Jesumani, V., Du, H., Aslam, M., Pei, P., & Huang, N. Et al., 2019).



ภาพที่ 12 บทบาทของรังสีวีบีหรือแสงแดดต่อการกระตุ้นให้เกิดการสลายของคอลลาเจน

ที่มา : Jesumani, V., Du, H., Aslam, M., Pei, P., & Huang, N. Et al., 2019

เอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase; matrix metalloproteinase-1 (MMP-1))

เอนไซม์ matrix metalloproteinases เป็นกลุ่มเอนไซม์แบบสารคัดหลั่งและยึดติดบนผิวเซลล์ อาศัย Zn^{2+} เป็นตัวร่วมปฏิกิริยาในการทำงาน มีบทบาทควบคุมที่สำคัญในการเคลื่อนย้ายเซลล์ในร่างกายด้วยการออกฤทธิ์ต่อกับเป็นลำดับขั้น (cascade) และกระบวนการจัดการสารต่างๆภายในร่างกาย เช่น โปรตีนเมทริกนอกเซลล์ (extracellular matrix: ECM) (Shalini Iyer et al., 2006), cytokines, growth factors และ adhesion molecules โดยเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์คอลลาจีเนส จะประกอบไปด้วย MMP-1 (Collagenase-1), MMP-8 (Collagenase-2) และ MMP13 (Collagenase-3) (Warispreet Singh et al., 2016)

- MMP-1 (collagenase-1) สร้างจาก basal keratinocytes ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไวต่อการสร้าง เซลล์ epithelium จะถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นโดย growth factor และ cytokines ในภาวะปกติ เช่น การพัฒนาของเอ็มบริโอหรือการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ หรือมีการสลายของสารตั้งต้น คือ คอลลาเจน
- MMP-8 (Collagenase-2) สร้างจากเซลล์ polymorphonuclear leukocyte ในไขกระดูก เซลล์ chondrocyte และเซลล์ fibroblast like cell ใน rheumatoid synovium รวมทั้งการติดเชื้อแบคทีเรีย
- MMP13 (Collagenase-3) ในภาวะปกติสร้าง เฉพาะในช่วงที่มีการเจริญของกระดูกในตัวอ่อน (fetalbone development) เช่น ฟัน, สามารถกระตุ้น proMMP-9 และ สามารถพบได้ใน ภาวะที่มีการอักเสบเรื้อรัง chronic cutaneous ulcer รวมทั้งการติดเชื้อแบคทีเรียและมะเร็งหลายชนิด

โดยเอนไซม์คอลลาจีเนสจะทำหน้าที่ในการย่อยสลายคอลลาเจนเป็นหลัก ซึ่ง MMP-1 จะทำหน้าที่ควบคุมการย่อยสลายของคอลลาเจนเพื่อให้เกิดสมดุลภายในร่างกาย โดยมี Zn^{2+} และ Ca^{2+} เป็นตัวร่วมทำงานเร่งปฏิกิริยาบริเวณเร่งปฏิกิริยา (Zn^{2+} และ Ca^{2+} บริเวณสีน้ำเงินและสีเขียวตามลำดับ;บริเวณสีแดงแสดงเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา (ดังรูปภาพที่ 13 และ 15) (สหพัฒน์ บรัศวร์รักษ์ et al., 2007)

โดยเอนไซม์ Matrix metalloproteinase 1 หรือ MMP-1 สร้างจากชั้นผิว keratinocytes ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไวต่อการสร้าง เซลล์ epithelium ของเซลล์ผิวหนัง จะถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นโดย growth factor และ cytokines ในภาวะปกติ เช่น การพัฒนาของเอ็มบริโอ การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ หรือมีการสลายคอลลาเจน โดยจะทำการย่อยสลาย Collagen triple (Helena Laronha et al., 2020) โดย MMP-1 หรือเอนไซม์คอลลาจีเนสนี้ จะทำหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจนให้กลายเป็นเจ

ลาติน และจะมีเอนไซม์ gelatinase มาทำการย่อยให้สมบูรณ์ ครบกระบวนการย่อยสลายคอลลาเจน (ดังรูปภาพที่ 14)

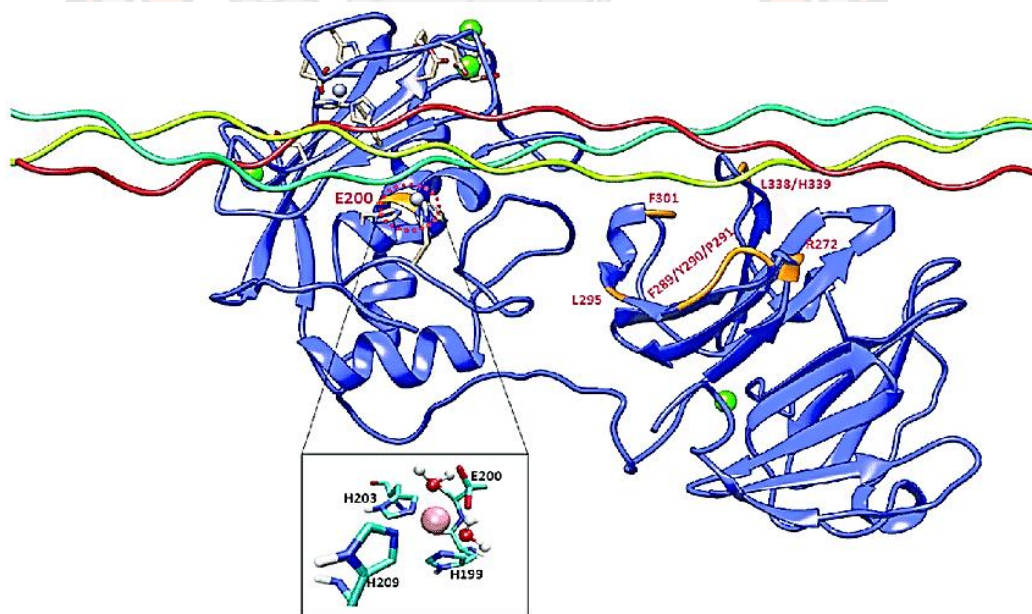
การสังเคราะห์และการสลายคอลลาเจน

การสังเคราะห์คอลลาเจนสามารถเกิดขึ้นได้ภายในร่างกายโดยการสร้างโปรตีน ซึ่ง mRNA จะถูกถอดรหัสด้วยไรโบโซม และได้เป็น procollagen จากนั้นจะเกิดการดัดแปลงโปรตีนโดยปฏิกิริยา hydroxylation หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) จะถูกเติมบริเวณกรดอะมิโนโพรลีน และกรดอะมิโนไลซีน บางตำแหน่งได้เป็นกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน และกรดอะมิโนไฮดรอกซีไลซีน โดยเอนไซม์ไฮดรอกซีเลส (hydroxylase) จากนั้นสายโพลีเปปไทด์สามสายจะพันเป็นเกลียว triple helix โดยการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ทั้งภายในสายเดียวกัน และระหว่างสาย ซึ่ง procollagen จะถูกตัดปลาย N-terminal และ C-terminal โดยเอนไซม์คอลลาเจนเปปติเดสแล้วเกิดการเรียงตัวกันเป็นเส้นใยคอลลาเจน (Cleutjens, & J. Et al., 1996 and Li & Wu., 2018) โดยคอลลาเจนมีโครงสร้างลักษณะเป็นเส้นใย และมักจะอยู่ร่วมกับอีลาสติน ซึ่งหากเกิดการเสียหาย หรือการเสื่อมสภาพเกิดขึ้น จะทำให้มีเอนไซม์เข้ามาจัดการทำลาย โดยเอนไซม์ชนิดนั้นคือ matrix metalloproteinases (MMPs) โดย Matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยคอลลาเจนและการย่อยสลายโปรตีนอื่น ๆ ใน Extracellular matrix (ECM) มี Zn^{2+} จัดเป็นบริเวณ binding site โดย MMPs ประกอบไปด้วย 6 กลุ่มคือ collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilyns, membrane-type MMPs และกลุ่มที่ไม่จำเพาะเจาะจง (ดังตารางที่2) (Trypuć et al., 2016) เพื่อให้เกิดความสมดุลในการสังเคราะห์คอลลาเจนภายในร่างกายจะมีกระบวนการสลายคอลลาเจน หรือที่เรียกว่า Collagen degradation โดย Pro-Matrix metalloproteinases (Pro-MMPs) สามารถเกิดขึ้นได้ภายในร่างกายโดยการสร้างโปรตีน ซึ่ง mRNA จะถูกถอดรหัสด้วยไรโบโซม และได้เป็น procollagen ซึ่งจะถูกระตุ้นให้เกิดการทำงานด้วย urokinase-type plasminogen activator (uPA) ให้ได้เป็น MMP-1 หรือ interstitial collagenase และ MMP-8 คือ neutrophil collagenase ทำลายให้เส้นใยคอลลาเจนเกิดการแตกหักขึ้น (ดังภาพที่16)

ตารางที่ 2 แสดงกลุ่มเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ที่ทำหน้าที่ในการย่อยคอลลาเจนและการย่อยสลายโปรตีนอื่น ๆ ใน Extracellular matrix (ECM)

ที่มา Cleutjens, & J. Et al., 1996

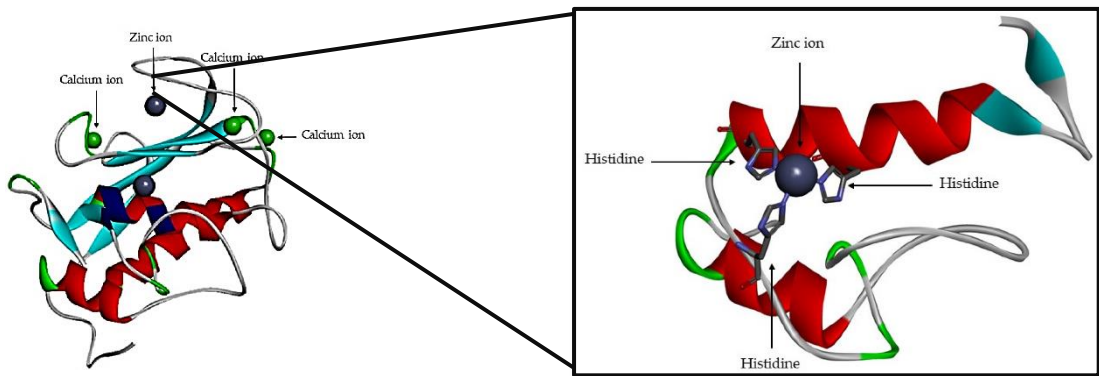
Matrix metalloproteinases			
Enzyme	MMP		Substrate
Collagenases	MMP-1	Interstitial collagenase (EC 3.4.24.7)	Type I, II, III, VII, X collagens, gelatins, proteoglycans, entactin
	MMP-8	Neutrophil collagenase (EC 3.4.24.34)	Type I, II, III collagens
Gelatinases	MMP-2	Gelatinase A, 72 kDa type IV Collagenase (EC 3.4.24.24)	Gelatins, type IV, V, VII, XI collagens, fibronectin, laminin, elastin, proteoglycans
	MMP-9	Gelatinase B, 92 kDa type IV Collagenase (EC 3.4.24.35)	Gelatins, type IV, V collagens, elastin, entactin, proteoglycans
Stromelysins	MMP-3	Stromelysin 1 (EC 3.4.24.17)	Gelatins, type III, IV, IX, X collagens, collagen telopeptides, proteoglycans, fibronectin, laminin
	MMP-10	Stromelysin 2 (EC 3.4.24.22)	Type IV collagen, proteoglycans, laminin, fibronectin
	MMP-11	Stromelysin 3	Unknown
Others	MMP-7	Matrilysin, PUMP-1 (EC 3.4.24.33)	Proteoglycans, fibronectin, gelatins, type IV collagen, elastin, entactin
	MMP-12	Metalloelastase (EC 3.4.24.65)	Elastin
	MT-MMP	Membrane-type MMP	Type IV collagen, gelatin, proMMP-2



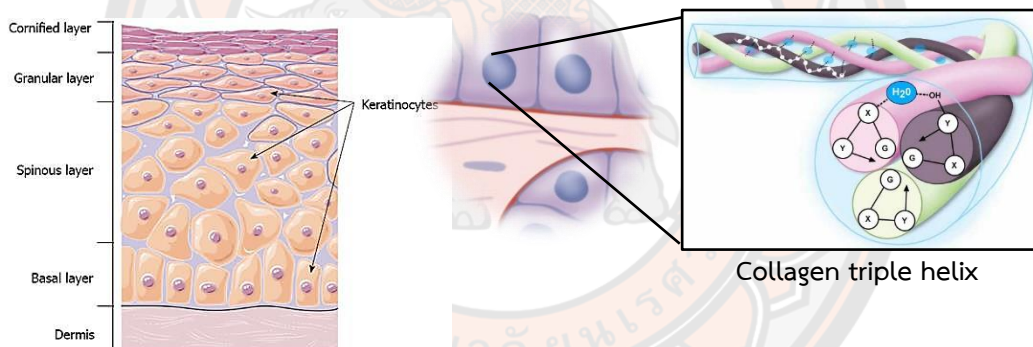
ภาพที่ 13 แสดงโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ (Collagenase; matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)) ของมนุษย์ ในรูปแบบ inactive โครงสร้างติดกับ triple-helical peptide (THP)

โดย Zn^{2+} และ Ca^{2+} จะแสดงเป็นบริเวณสีน้ำเงินและสีเขียวตามลำดับ

ที่มา : Warispreet Singh et al., 2016



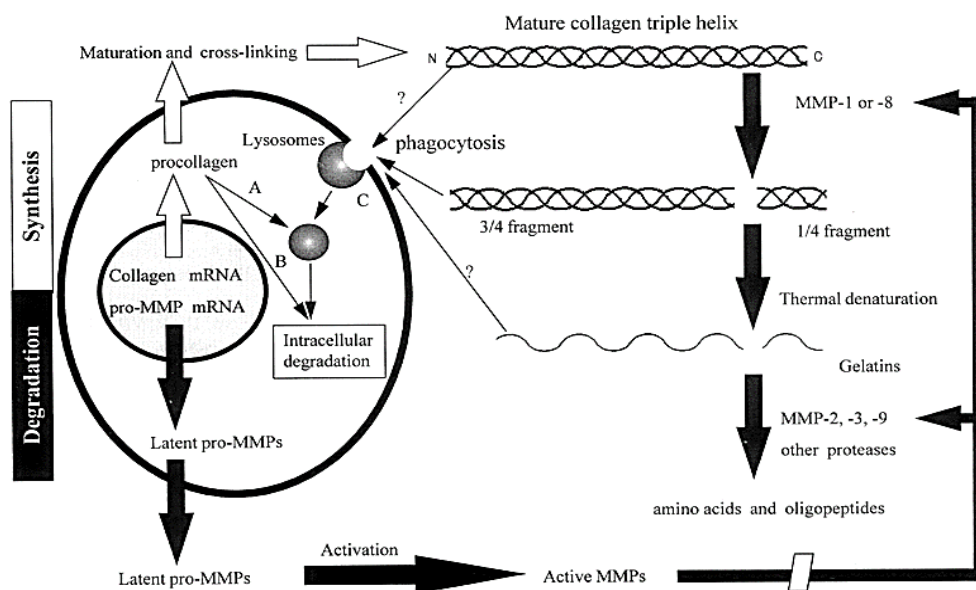
ภาพที่ 14 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ MMP-1 ที่มี Zn^{2+} เป็นองค์ประกอบบริเวณเร่งปฏิกิริยา ประกอบไปด้วย Histidine 3 โมเลกุล
ที่มา : Helena Laronha et al., 2020



ภาพที่ 15 แสดงเอนไซม์ MMP-1 สร้างจากชั้นผิว keratinocytes ของเซลล์ epithelium จากเซลล์ผิวหนัง จะทำการย่อยสลาย Collagen triple helix ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของผิวหนังชั้นหนัง
ที่มา : Helena Laronha et al., 2020

การใช้สารต้านอนุมูลอิสระมีผลดีต่อการลดภาวะเครียดออกซิเดทีฟ ที่มีบทบาทสำคัญของการลดการเสื่อมสภาพของผิวหนัง หรือลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดทีฟที่เป็นตัวการทำให้เกิดผลเสียต่อผิวเช่น การแก่ก่อนวัย การกระตุ้นให้เกิดการสลายของคอลลาเจน เป็นต้น เช่น วิตามินซี วิตามินอี ฟลาโวนอยด์และโพลีฟีนอล เป็นต้น (Pizzino et al., 2017) และการค้นหาสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่ไม่ส่งผลเสียต่อร่างกายทั้งภายในและภายนอก นำมาทดแทนสารที่ส่งผลข้างเคียงดังข้างต้น เพื่อลดการสังเคราะห์เมลานินหรือยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์โปรซีเนสและคอลลาจีเนส ปัจจุบันความสำคัญของความปลอดภัยในอุตสาหกรรมอาหารได้ ชี้นำนักวิจัยในการค้นหาสารยับยั้งที่ดีกว่าจากแหล่งธรรมชาติเพราะไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย (Meisel et al, 2004) โดยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้รับความนิยมและมีรายงานวิจัยอย่าง แพร่หลาย คือเปปไทด์ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive peptide) เนื่องจากมีรายงานการ วิจัยว่าเปปไทด์ หรือโปรตีนที่มีขนาดเล็กมาก สามารถซึมซับเข้าสู่ผิวหนังได้ดี มีคุณสมบัติเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระ มีส่วนช่วยในการควบคุมระดับความดันและคอเลสเตอรอลในเลือด และยังมีคุณสมบัติยว ครงทน (Piyanan C. And Romanee S. et al, 2014) มีการกระตุ้นสมานแผล ยับยั้งการหดตัวของ กล้ามเนื้อ (Mohammad Hassan Baig. et al, 2018) และยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ในทางอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้มีการนำเปปไทด์มาใช้บำรุงรักษาในส่วนของการลดริ้วรอย รอย แผลเป็น ป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้ผิวกระจ่างใส และมี ฤทธิ์คงทน (Kurosawa K. et al, 1991) ซึ่งการเตรียมเปปไทด์ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถ เตรียมได้จากการทำโปรตีนไฮโดรไลเซส (Protein hydrolysate) โดยการใช้สารเคมีและเอนไซม์ โปรตีเอสในการเร่งการตัดพันธะเปปไทด์ในสายโปรตีน ทำให้สายพอลิเปปไทด์ถูกตัดเป็นโอลิโก เปปไทด์และกรดอะมิโน ซึ่งจะส่งผลให้โปรตีนที่ได้มีสมบัติเปลี่ยนแปลงไป ถือเป็น การตัดแปลงสมบัติ ของโปรตีนวิธีหนึ่ง การควบคุมระดับการย่อยสลาย ซึ่งจะส่งผลต่อคุณสมบัติของโปรตีนที่ได้ เกิดการ เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีนหลายประการ โดยเปปไทด์ที่ได้จะมีความจำเพาะในการทำงาน ขึ้นอยู่กับลำดับและองค์ประกอบของกรดอะมิโน เอนไซม์โปรตีเอสเร่งการตัดพันธะเปปไทด์ใน โปรตีน ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ทำให้สายพอลิเปปไทด์ถูกตัดเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดสั้นลง และเกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระ ผลลัพธ์จากการแยกสลายโปรตีน เรียกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซส การ แยกสลายโปรตีนด้วย ข้อดีคือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง ดังนั้นจึงไม่ต้องใช้เอนไซม์ใน ปริมาณมาก และมีสถานะในการย่อยที่ไม่รุนแรง การใช้เอนไซม์ยังมีระดับการย่อยของโปรตีนค่อนข้าง สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ กรดหรือด่าง รวมถึงช่วยลดข้อจำกัดจากการใช้กรด และต่างในการ แยกสลายโปรตีน โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย มีความสำคัญ ในการเข้าตัดพันธะเปปไทด์ในสาย โปรตีน ซึ่งฤทธิ์ในการทำงาน ของเอนไซม์โปรตีเอสที่มีหลายชนิด จะสามารถเร่งการตัดพันธะเปปไทด์ ในสายโปรตีน ทำให้สายพอลิเปปไทด์ถูกตัดเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดสั้นลง และมีความหลากหลายของ สายเปปไทด์มากขึ้น และเกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระ ผลลัพธ์จากการย่อยสลายโปรตีน มีคุณสมบัติ และออกฤทธิ์ชีวภาพในการทำงานที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น .

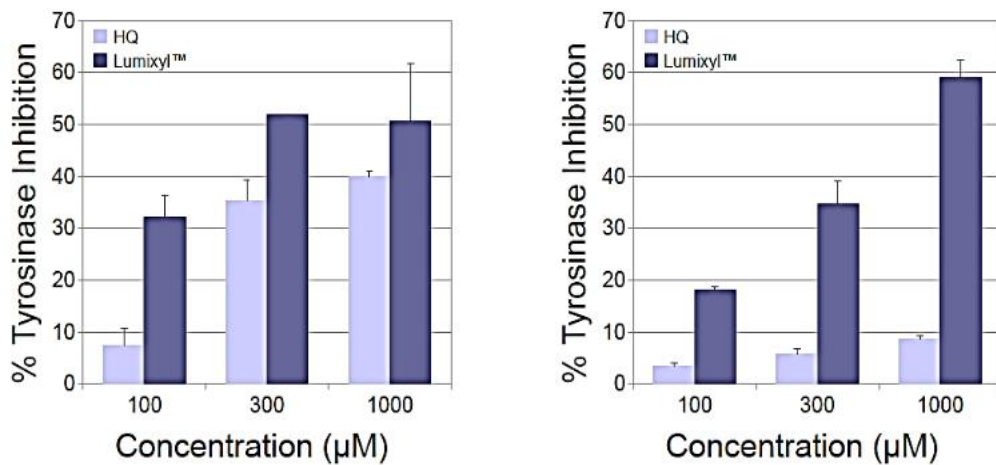


ภาพที่ 16 แสดงกระบวนการสร้างและสลายคอลลาเจน
ที่มา Cleutjens, & J. Et al., 1996

จากงานวิจัย ได้มีการศึกษาสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ Lumixyl ทดสอบการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินเปรียบเทียบกับสารไฮโดรควิโนน (HQ) ผลจากการศึกษาพบว่าสารสกัดเปปไทด์ Lumixyl มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินได้ดีกว่าสารไฮโดรควิโนน (Felipe Jimenez et al., 2009) (แสดงดังภาพที่ 17) และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง พบว่าสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ Lumixyl ที่ความเข้มข้น 1-1,000 μM ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่สารไฮโดรควิโนนมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (แสดงดังภาพที่ 18)

จากงานการศึกษาเจลาตินเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเสทจากหลังปลาแปซิฟิกพบลำดับเปปไทด์ 23 ลำดับ (ดังตารางที่ 3) เมื่อทำการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสพบว่าเปปไทด์ 2 ลำดับ ได้แก่ GEIGPSGGRGKPGKDGDAGPK (1935 Da) และ GFSGLDGAKGD (1022 Da) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสสูงที่สุด โดยสามารถยับยั้งการทำงานผ่านส่งสัญญาณของ MAPK signaling pathway (ดังภาพที่ 19)

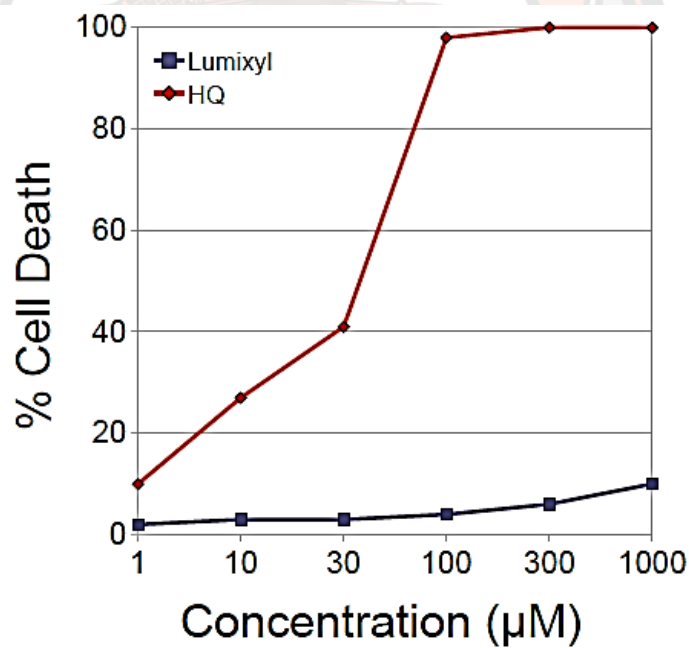
ในปี 2012 รายงานวิจัยของคุณ Pyun ได้ทำการรายงานว่าลำดับเปปไทด์ LMWCP จาก Sutchi catfish (*Pangasius hypophthalmus*) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ ซึ่งในปี 2013 คุณ Sun ได้ทำการรายงานว่าลำดับเปปไทด์ LSGYGP สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส ได้เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 17 แสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารตั้งต้น (Tyrosine; A และ L-DOPA; B)

ที่มา : Felipe Jimenez et al., 2009

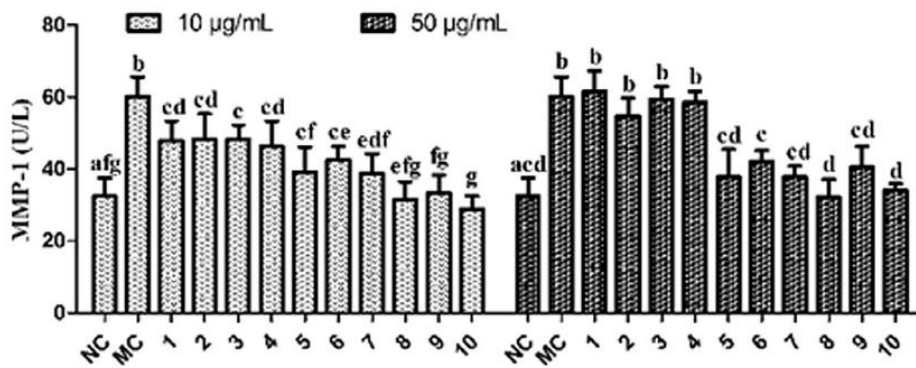
เมื่อ สีฟ้า แทนด้วยสารไฮโดรควิโนน (HQ) และ สีน้ำเงิน แทนด้วยสารสกัดโพลิโกเปปไทด์ (Lumixyl)



ภาพที่ 18 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของสารทั้งสองชนิด

ที่มา : Felipe Jimenez et al., 2009

เมื่อ สีแดง แทน ด้วยสารไฮโดรควิโนน สีน้ำเงิน แทน ด้วยสารสกัดโพลิโกเปปไทด์



ภาพที่ 19 แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-1 ของเปปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ของเจลาตินเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเสทจากหนังปลาแปซิฟิก

ที่มา : Lu et al.,2017

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเจลาตินเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเสทจากหนังปลาแปซิฟิกต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-1

Peptide sequence	Molecular mass (Da)
Glu-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ser-Gly-Gln-Asp-Gly-Arg	1117.53
Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala	469.24
Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ser-Gly-Ile-Arg	811.44
Gly-Pro-Ala-Gly-Ser-Pro-Gly-Leu-Arg	811.44
Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg	994.51
Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Gln	526.26
Gly-Ser-Pro-Gly-Leu-Val-Gly-Pro-Lys	811.47
Gly-Gln-Pro-Gly-Leu-Pro-Gly-Pro-Arg	878.49
Gly-Pro-Ala-Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Lys-Gly-Asp-Arg	1109.58
Ala-Pro-Gly-Gly-Pro-Leu-Gly-Asp-Ala-Arg	910.47
Gly-Leu-Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Arg	1387.69
Gly-Glu-Thr-Gly-Asp-Ile-Gly-Pro-Met-Gly-Leu-Pro-Gly-Arg	1356.67
Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Lys	1265.62
Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Ala	495.26
Gly-Phe-Ser-Gly-Leu-Asp-Gly-Ala-Lys	851.43
Gly-Asp-Thr-Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Lys	799.4
Gly-Glu-Ala-Gly-Ala-Lys	532.28
Gly-Phe-Ser-Gly-Leu-Pro-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Lys	1270.62
Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Gln-Gly-Ser-Arg	842.41
Ala-Asp-Gly-Leu-Ala-Pro-Ala-Arg	770.43
Gly-Thr-Glu-Gly-Glu-Arg	648.3
Gly-Pro-Glu-Gly-Gln-Arg	643.31
Gly-Asp-Arg-Gly-Tyr-Glu-Pro-Arg	1006.47

เห็ดที่ใช้ศึกษาในงานวิจัย

เห็ดตลม

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Lentinus Polychrous*

ชื่อสามัญ : เห็ดตลม

ชื่ออื่น : เห็ดกระด้าง หรือเห็ดบด

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : หมวกเห็ดเป็นรูปกรวยลึกคล้ายพัด สีขาวนวลหรือสีน้ำตาลอ่อนปนเทา เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-8 ซม. ขอบงอเล็กน้อย ผิวมีขนสั้นๆสีน้ำตาลรวมกันคล้ายเกล็ดเล็กๆปลายงอน ขึ้นเล็กน้อย เกล็ดเรียงกันกระจายอยู่บริเวณขอบหมวก ใต้ดอก มีครีบเป็นร่องลึกสีน้ำตาล ดอกอ่อนมีขอบบางและม้วนงอลง เมื่อแห้งเนื้อจะแข็งและเหนียว และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงหรือสีน้ำตาลเข้ม (ดังภาพที่ 20 และ 21)

สรรพคุณ : *Lentinus polychrous* Lév. เห็ดกินได้ ในวงศ์ *Lentinaceae* มีคุณค่าทางอาหารและยา ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก, โพลีแซคคาไรด์ และโปรตีนหลายชนิด มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ต่อด้านอนุมูลอิสระ, ด้านการอักเสบ, ต้านมะเร็ง, ต้านฮอร์โมนเอสโตรเจน, ด้านการสร้างเอนไซม์ I-angiotensin และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Niramai Fangkrathok et al., 2019)



ภาพที่ 20 เห็ดตลม (*Lentinus Polychrous*)

ที่มา : <https://tinyurl.com/4jd4f687>



ภาพที่ 21 ตัวอย่างเห็ดลมแห้ง

ที่มา : <https://tinyurl.com/4974ycse>

เห็ดขอนขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Lentinus squarrosulus* Mont.

ชื่อสามัญ : เห็ดขอนขาว

ชื่ออื่น : เห็ดมันมะม่วง เห็ดมัน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : มีลักษณะดอกคล้ายเห็ดนางฟ้า เนื้อบางและเหนียวเล็กน้อย บนหมวกเห็ดจะมีลักษณะเป็นหลุมลงไปเล็กน้อย ดอกเห็ดมีสีขาวจะเรียกเห็ดขอนขาว โดยทั่วไปแล้วลักษณะก้านจะชูออกมา ขนาดของหมวกเห็ดจะไม่ใหญ่มาก เป็นเห็ดที่กินได้ และเห็ดสามารถเจริญเติบโตได้บนพื้นผิวที่หลากหลายและแห้ง ส่วนมากจะขึ้นบนไม้เนื้อแข็ง (Morais et al. 2000 and Philippousis et al. 2001) (ดังภาพที่ 22 และ 23)



ภาพที่ 22 เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont)

ที่มา : <https://bit.ly/2H1vpQQ>



ภาพที่ 23 ตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง

ที่มา : <https://tinyurl.com/2p97wf25>

สรรพคุณ : มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถต้านเซลล์มะเร็ง บำรุงน้ำสุจิ ตับ ไต ปอด กระเพาะอาหาร ลดไข้ กระตุ้นการทำงานของลำไส้ ระบบเลือด หัวใจ และสมองขับเสมหะ (De Leon et al. 2017) รายงานว่าเห็ดชนิดนี้อุดมไปด้วยสารอาหารมากมายไม่ว่าจะเป็นโปรตีน

(56.7%), ไขมัน(0.4%), วิตามินบี3 (0.2%), โปแทสเซียม (0.4%) และแมกนีเซียม (3.8%) (Royse et al. 1990) และการหมักของเห็ดขอนขาวยังเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (MHD Omar et Al. 2011)

ทั้งนี้มีรายงานวิจัย ที่ได้ทำการศึกษาศาารประกอบที่อยู่ในเห็ดขอนขาวพบว่า มีปริมาณ Phenolic compound อยู่ด้วย ไม่ว่าจะเป็น Flavonoids, Catechin และ Tannins และมีรายงานวิจัยที่สารโภชนาการจากเห็ดขอนขาว พบว่า ปริมาณโปรตีนสูง และมีไขมันน้อย (Mhd Omar et al. 2011) จากรายงานวิจัยในปี 2015 ได้ทำการศึกษาศาารโภชนาการของ *L. squarrosulus*, *O.submucida* และ *T.aurantialba* พบว่า *L. squarrosulus* มีปริมาณของโปรตีนสูงสุดและมีปริมาณไขมันที่น้อยเช่นเดียวกัน (ดังตารางที่ 4) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกรดอะมิโนพบว่า ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน glutamic acid, leucine, lysine และ threonine สูงเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ (ดังตารางที่ 5)

การศึกษาในปี 2017 ของ Arisara Prateep ได้ทำการสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ต่อเซลล์มะเร็งปอด H460 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สารสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสามารถออกฤทธิ์เพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งปอดได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเปปไทด์จากเห็ดขอนขาว ซึ่งสารสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวนี้ยังไม่มีรายงานการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ (Arisara Prateep et al., 2017) (ดังภาพที่ 24)

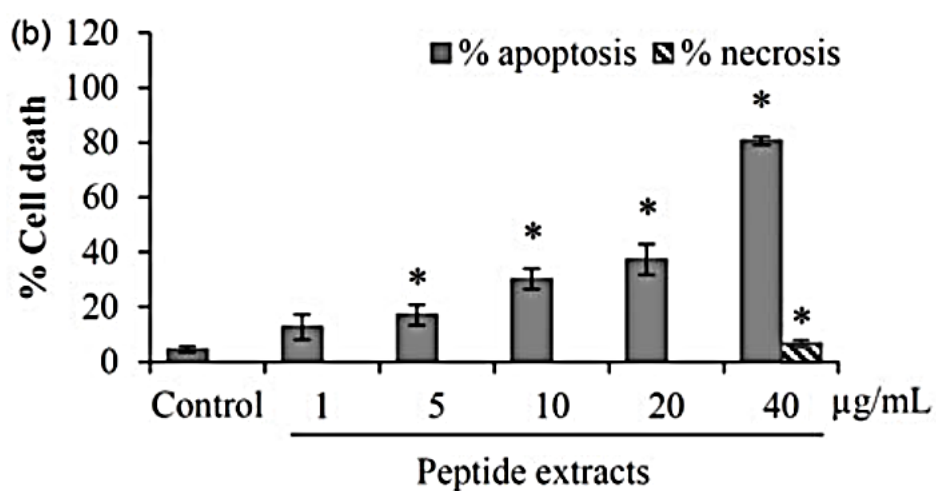
และจากศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่พบการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ด เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส ดังนั้นเห็ดขอนขาวจึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการนำมาเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ 4 แสดงสารโภชนาการเปรียบเทียบจากเห็ด 3 ชนิด ได้แก่ *L. squarrosulus*, *O.submucida* และ *T.aurantialba*

Content (%)	<i>O. submucida</i>	<i>L. squarrosulus</i>	<i>T. aurantialba</i>
Protein	14.70 (0.17)	26.32 (0.29)	7.38 (0.09)
Fat	7.10 (0.08)	3.28 (0.11)	3.34 (0.03)
Moisture	3.91 (0.10)	2.46 (0.07)	5.01 (0.03)
Total carbohydrate	27.41 (0.44)	20.66 (0.77)	46.17 (0.65)
Ash	11.48 (0.46)	5.70 (0.06)	5.81 (0.13)
The values given in parentheses are standard deviations.			

ตารางที่ 5 แสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของ *L. squarrosulus*

Amino acid (%)	<i>L. squarrosulus</i>
Alanine	2.26 (0.10)
Arginine	1.98 (0.06)
Aspartic acid	4.14 (0.04)
Glutamic acid	6.54 (0.44)
Glycine	1.86 (0.07)
Histidine	0.46 (0.05)
Isoleucine	1.33 (0.00)
Leucine	2.74 (0.07)
Lysine	2.22 (0.07)
Phenylalanine	1.53 (0.08)
Proline	1.35 (0.28)
Serine	1.60 (0.06)
Threonine	3.53 (0.02)
Tyrosine	1.30 (0.04)
Valine	1.10 (0.05)
Total	33.26 (0.33)

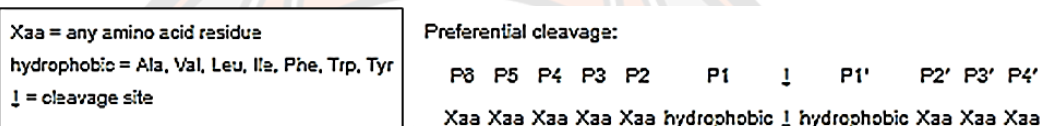


ภาพที่ 24 แสดงการตายของเซลล์มะเร็งปอด H460 ต่อสารสกัดเปปไทด์จากเห็ดขอนขาว ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis

ที่มา : Arisara Prateep et al., 2017

เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา : เอนไซม์เปปซิน (Pepsin) (EC 3.4.23.1)

เอนไซม์เปปซิน เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Endopeptidase ถูกสร้างจากกระเพาะอาหารและเป็นหนึ่งในเอนไซม์ย่อยอาหารหลักในระบบย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์อื่นๆ และมีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงจนเป็นเปปไทด์ เอนไซม์เปปซินมีประสิทธิภาพในการแยกแยะระหว่างกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และกรดอะมิโนที่อยู่ในกลุ่มอะโรมาติก (ดังภาพที่ 25) เช่น กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), กรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) และกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyrosine) หรือกรดอะมิโนที่เป็นกรด คือ มีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) 2 หมู่ (Dicarboxylic acid) อยู่ในโมเลกุล เช่น กรดอะมิโนกลูตามิก (Glutamic acid) และ กรดอะมิโนแอสพาร์ติก (Aspartic acid) เป็นต้น (Jordan T et al., 1979)



ภาพที่ 25 Cleavage site ของเอนไซม์เปปซินที่มา : <https://bit.ly/2H2xn3m>

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

พื้นที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

กลุ่มตัวอย่าง

เห็ดขอนขาว, เห็ดลม (ผงอบแห้ง) : จากฟาร์ม จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

เห็ดขอนขาวสด : จากฟาร์ม จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย



ภาพที่ 26 ตัวอย่างเห็ดลมแห้ง



ภาพที่ 27 ตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง

ตัวอย่างเอนไซม์

เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*)

เอนไซม์คอลลาจีเนส

เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

1. 5% CO₂ Incubator
2. 96 well-plates
3. Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units
4. Autoclave
5. Autopipette
6. Beaker
7. Centrifuge tube
8. Duran glass bottles
9. Dialysis tube 10,000 Da MWCO
10. Erlenmeyer flask
11. Forceps
12. Freeze dryer
13. Gel electrophoresis
14. Glass rod
15. Glove
16. Graduated Cylinder
17. Hot air oven
18. Image J software
19. Incubate shaker
20. Liquid Chromatography – Mass Spectrometer (LC-MS/MS)
21. Magnetic Stir Bar
22. Micropipette tips
23. Microplate reader
24. Molecular image Gel documentation system
25. Mortar
26. Overhead stirrer
27. Parafilm

28. PCR Thermal Cyclers
29. pH meter
30. Rack
31. Refrigerated centrifuge
32. Sequencing จาก 3730 XL Sequencer, Applied Biosystems
33. Spatula chemistry
34. Spin down
35. Stirring hotplate
36. Ultracentrifuge and centrifuge adapter
37. Volumetric flask
38. Vortex mixer
39. Water bath
40. Weighing papers

สารเคมี

1. Acetonitrile
2. Agarose
3. Albumin from bovine serum (BSA)
4. Ammonium sulfate
5. Boric acid
6. Copper sulfate
7. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
8. Ethanol
9. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
10. Fetal bovine serum (FBS)
11. Folin – Ciocalteu’s phenol reagent (FCR)
12. Gallic acid
13. Hydrochloric acid
14. Kojic acid
15. OneMarkB (GeneDireX, Inc)
16. OnePCR Plus (GeneDireX, Inc)
17. PCR Clean-up and Gel extraction Kit (PureDirecx, Taiwan)

18. Phosphate-buffered saline
19. Plant genomic DNA Kit (Tiangen Biotech Co.)
20. Potassium persulfate
21. Potassium phosphate
22. Dipotassium hydrogenphosphate (K_2HPO_4)
23. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
24. Sodium Carbonate
25. Sodium chloride
26. Sodium dodecyl sulfate (SDS; $NaC_{12}H_{25}SO_4$)
27. Sodium Hydroxide
28. Sodium phosphate
29. Sodium potassium tartrate
30. Trifluoroacetic acid
31. Pepsin
32. 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS)
33. Di (phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH)
34. 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris-base)
35. L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)
36. 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
37. 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)
38. Tyrosinase (EC 1.14.18.1) ในเห็ด *Agaricus bisporus*
39. Trolox
40. Peptide Synthesis RHAKF (Denga et al., 2020)
41. GFSGLDGAKGD ลำดับเปปไทด์สังเคราะห์

3.1. การศึกษาสายพันธุ์และความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว (phylogenetic tree)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดขอนขาวแห้ง ด้วย Plant genomic DNA Kit (Tiangen Biotech Co.) วัดความเข้มข้นของ DNA ที่ 260 นาโนเมตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5-Forward (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') และ ITS4- Reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ซึ่งขั้นตอน Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที

จำนวน 1 รอบ, ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที และทำการตรวจสอบลำดับด้วยวิธีการ Sequencing จาก 3730 XL Sequencer, Applied Biosystems และวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว หรือ phylogenetic tree ด้วย CondonCode Aligner V.3 นำข้อมูลลำดับเบสมาทำการ Blast กับฐานข้อมูล NCBI

3.2. การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดขอนขาว

3.2.1. การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดลมและขอนขาวแห้ง (Yejun Deng et al., 2020)

นำผงเห็ดลมแห้ง และเห็ดขอนขาวแห้ง 200 มิลลิกรัม ต่อ น้ำกลั่น 2 ลิตร อัตราส่วน 1:10 (w/v) ปรับ pH ให้เป็น 10 ด้วย 1 M NaOH แล้วนำไปสกัดด้วยเครื่อง overhead stirrer ที่ 1,000 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยง ที่ 10,000xg 20 นาที แล้วเก็บส่วนใสปรับ pH ให้เป็น 4.2 ด้วย 1 M HCl เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและเก็บส่วนที่เป็นตะกอนทำการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000xg 20 นาที แล้วทำการละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วทำการแช่แข็งและทำให้ตัวอย่างแห้งด้วยเครื่อง Freeze-dry

3.2.2 การสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวสด

นำตัวอย่างเห็ดขอนขาวสด ส่วน fruiting body มาทำการสับและปั่น Homogenized ด้วย 0.15 M NaCl ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 (w/v) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นเก็บส่วนสารละลาย (Supernatant) ทำการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ 60 % และบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนตะกอนโปรตีน และละลายกลับด้วยน้ำกลั่น ทำการไดอะไลซิสเพื่อนำ 60% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแยกออกจากสารละลายโปรตีนในน้ำกลั่น แล้วทำการแช่แข็งและทำให้ตัวอย่างแห้งด้วยเครื่อง Freeze-dry

3.3. การเตรียมสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดลม, ขอนขาวแห้ง และเห็ดขอนขาวสด โดย เอนไซม์เปปซิน

นำโปรตีนจากการทำ Freeze-dry ที่ทำการสกัดโปรตีนทั้งเห็ดลมแห้ง, เห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด มาชั่งในอัตราส่วน 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ใช้เอนไซม์เปปซินในอัตราส่วน 5 % และปรับ pH เป็น 3.7 เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ด้วยเครื่อง Incubated shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาว มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ความเร็ว

5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แล้วทำการเก็บส่วนใส โดยนำส่วนใสที่ได้มาตัดแยกให้ได้โปรตีนไฮโดรไลสขนาดเล็กลงกว่า 10 และ 3 กิโลดาลตัน (kDa) นำส่วนใสที่ทำการตัดแยกไปทำการ freeze-Dry ตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ได้ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน

3.4. การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS method)

เตรียม 10 ไมโครลิตร ตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 µg หรือ Standard solution ใน 0.21 M Sodium phosphate buffer pH 8.2 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เติมสารละลาย TNBS ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทำการผสมแล้วนำไป บ่มด้วย Water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในความมืด หลังจากนั้น หยุดปฏิกิริยา ด้วย 0.1 N HCl 160 ไมโครลิตร แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องในความมืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร นำมาคำนวณวิเคราะห์หาระดับการย่อยสลายของโปรตีน

จากสูตร

$$\text{Degree of hydrolysis (DH\%)} = 100 \times \left(\frac{\text{AN}}{\text{Npd}} \right)$$

เมื่อ AN แทนด้วยความเข้มข้นตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ จากสมการมาตรฐาน
Npd แทนด้วยค่าคงตัวหรือปริมาณไนโตรเจนของพันธะเปปไทด์ในสารตั้งต้นโปรตีน

3.5. การวิเคราะห์โปรไฟล์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวด้วยวิธี SDS-PAGE

การวิเคราะห์ศึกษาการแสดงผลการแยกของโปรตีนจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส โดยนำสารสกัดหยาบโปรตีน, สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 และ 3 กิโลดาลตัน ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน มาวิเคราะห์ศึกษาองค์ประกอบและรูปแบบการแสดงผลของโปรตีน ด้วยเทคนิค Glycine SDS-PAGE โดย Gel electrophoresis (15% SDS-PAGE) ผ่านความต่างศักย์ 120 โวลต์ 400 mA โดยใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง ภายหลังจากการแยกโปรตีน ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ถูกแยกออกจากกันจะนำมาย้อมด้วยสี Silver และ Coomassie blue R-250 และวิเคราะห์การแสดงผลของโปรตีนเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยโปรแกรม ImageJ Software

3.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดลมแห้งและขอนขาว (Biological activity)

3.6.1. การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดลมแห้งและเห็ดขอนขาว

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจาก commercial tyrosinase จากเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) โดยเปรียบเทียบการทำงานระหว่างตัวอย่างสารสกัดหยาบโปรตีน สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเห็ดลมแห้ง เห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ทำการเติม 5 mM L-DOPA ซึ่งเป็นสารตั้งต้น และ 5 mM Potassium phosphate buffer pH 6.8 จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 20 นาที ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เทียบกับ positive control 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Kojic acid และ 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Peptide synthesis (RHAKF

$$\text{ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{sample}}} \times 100$$

3.6.2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนด้วยวิธี ABTS

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวด้วยวิธี ABTS โดยนำตัวอย่างสารสกัดหยาบโปรตีน และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเห็ดลมแห้ง, เห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ผสมกับ 2.45 mM Potassium persulfate และ 7 mM ABTS 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{sample}}} \times 100$$

3.6.3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวด้วยวิธี DPPH โดยนำตัวอย่างสารสกัดหยาบโปรตีน และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเห็ดลมแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ เติม 0.1 mM DPPH solution จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ 0.1 µg/µL Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{sample}}} \times 100$$

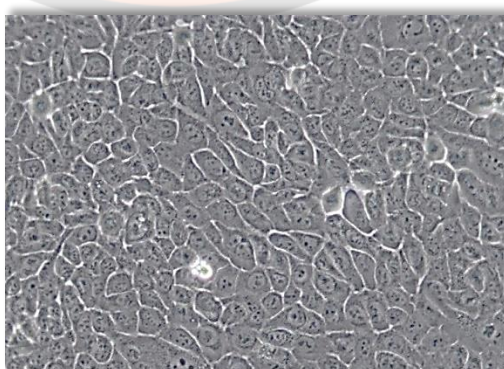
3.6.4. การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาว

เตรียม Reaction mix โดยทำการเติมสารตั้งต้น FALGPA ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับ MMP-1 collagenase (0.35 U/mL) 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเห็ดขอนขาว 10 ไมโครลิตร หรือ positive control คือ 1 M ของ 1,10-Phenanthroline เติมสารตั้งต้น FALGPA ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-15 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 345 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เทียบกับ positive control คือ 1,10-Phenanthroline และเปปไทด์ GFSGLDGAKGD จากเจลาตินของหนังปลา

3.7. การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ Human Keratinocyte Cell (HaCaT) และเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินด้วยเทคนิค MTT

3.7.1. ลักษณะของเซลล์

- เซลล์ผิวหนัง Human Keratinocyte (HaCaT) มี morphology เป็นเซลล์ Epidermal ยึดเกาะอยู่กับพื้นผิว (Adherent) ซึ่งพบ Epidermal keratinocytes ได้ที่ผิวหนังชั้นนอกสุด ซึ่งมีส่วนของ melanocyte ในบริเวณของเซลล์



ภาพที่ 28 แสดงลักษณะของเซลล์ผิวหนัง Human Keratinocyte (HaCaT)

ที่มา : <https://cutt.ly/nGATUmR>

3.7.2. การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ด ขอนขาวด้วยวิธี MTT

ทำการเลี้ยงเซลล์ HaCaT ทำการเลี้ยงในอาหาร ที่มี Fetal bovine serum (FBS) และยาปฏิชีวนะ บ่มในตู้บ่มเซลล์ภายใต้สภาวะ อุณหภูมิคงที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงขยายเซลล์เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80-90 % .เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT ลง 96 well plate จำนวน 2,000 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้สารสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 600 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงล้างด้วย PBS แล้วเติมสารละลาย 1mg/ml MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นละลายผลึกด้วย DMSO 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

3.8. การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาว

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และคอลลาจีเนส มาแยกโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งจะเลือกแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 10 kDa มาตัดแถบเจลและส่งตรวจเพื่อแยกวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ด้วยวิธี Liquid Chromatography – Mass Spectrometer (LC-MS/MS)

นำแถบโปรตีนที่สนใจของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย Ziptip แล้ววัดความเข้มข้นของเปปไทด์ด้วยเทคนิคของ Lowry โดยใช้โปรตีน BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นนำเปปไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography – Mass Spectrometer (LC-MS/MS) แล้วหามวลโมเลกุลและกรดอะมิโนภายในสายลำดับเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Maxquant version 2.1.3.0 (Tyanova et al., 2015) ใช้ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot ของสายพันธุ์ *Lentinus*

3.9. การศึกษาการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส (Molecular docking)

การทดสอบการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) และเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) กับ Ligand หรือลำดับเปปไทด์ที่คัดเลือก โดยจำลองแบบ 3 มิติ เพื่อแสดงการจับกันที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยเลือกลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดและเปปไทด์สังเคราะห์ (RHAKF) นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GOLD V.2022.2.0 และ Discovery Studio 2021 Client software

3.10. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 26.0 วิเคราะห์ ข้อมูลกลุ่มเดียวตามความเข้มข้นของกลุ่มตัวอย่าง แบบ Analysis of Variance (ANOVA) ศึกษาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * Least significant differences (LSD, $P \leq 0.05$), การวิเคราะห์หาค่า Free-radical scavenging (FRS) ของวิธี ABTS และ DPPH โดยฐานข้อมูล ANTIAGE-DB software ซึ่งเป็นการคำนวณความน่าจะเป็นในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือลด free radical ของลำดับสายเปปไทด์ และวิเคราะห์คุณสมบัติของกลุ่มเปปไทด์ Hydrophobicity หรือ Hydrophilicity ด้วย Peptide 2.0 Inc. software ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด



บทที่ 4

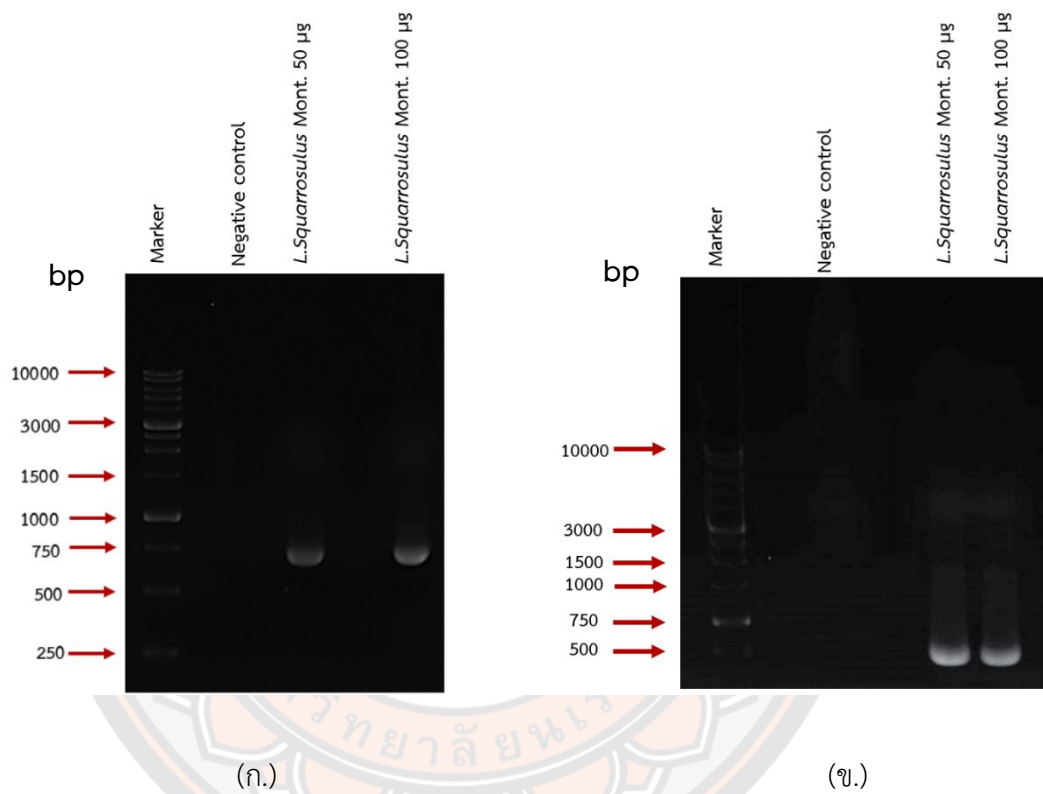
ผลการวิจัย

1. การศึกษาสายพันธุ์และความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว (phylogenetic tree)

การสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ด้วย Plant genomic DNA Kit (Tiangen Biotech Co.) (Yan-Yan Su et al., 2016) วัดความเข้มข้นของ DNA ที่ 260 นาโนเมตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และทำการตรวจสอบลำดับ DNA ด้วยวิธีการ Sequencing จาก 3730 XL Sequencer, Applied Biosystems และวิเคราะห์แยกความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว หรือ phylogenetic tree ด้วย CondonCode Aligner V.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการเปรียบเทียบ (Blast) กับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI)

จากผลการทดลองการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดขอนขาวแห้งและสด มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 29.60 และ 7.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ internal transcribed spacer (ITS) region ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัม เพื่อดูการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ซึ่งพบขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 500-750 bp (ดังภาพที่ 29)

เมื่อนำไปตรวจสอบลำดับของดีเอ็นเอด้วยวิธีการ DNA Sequencing และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว หรือ phylogenetic tree นำข้อมูลลำดับเบสมาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank;NCBI จากผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งที่ใช้ในการสกัดโปรตีนเพื่อทำโปรตีนไฮโดรไลเสทมีสายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกับ KT273380.1 *Lentinus squarrosulus* voucher WARRIPt 18S ribosomal RNA gene; KR155105.1 *Lentinus* sp BAB-5060 18S ribosomal RNA gene; KT120037.1 *Lentinus squarrosulus* clone 1 18S ribosomal RNA gene partial sequence และ KT273364.1 *Lentinus squarrosulus* voucher IBD43 18S ribosomal RNA gene ซึ่งมีค่าระดับความคล้ายคลึงของสายพันธุ์ที่ร้อยละ 98 (ดังภาพ 30 (ก.)) และเห็ดขอนขาวสดที่ใช้ในการสกัดโปรตีนเพื่อทำโปรตีนไฮโดรไลเสทมีลำดับสายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกับ MN856299.1:45-689 *Lentinus squarrosulus* strain WZ-159 ซึ่งมีค่าระดับความคล้ายคลึงของสายพันธุ์ที่ร้อยละ 60 (ดังภาพ 30 (ข.))



ภาพที่ 29 แสดงการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวแห้ง (ก.) และเห็ดขอนขาวสด (ข.) ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker) ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ที่ 1% TBE agarose gel

จากผลการตรวจสอบลำดับของดีเอ็นเอหรือนิวคลีโอไทด์ของเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดด้วยวิธีการ DNA Sequencing พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดขอนขาวแห้งจะมีสายยาว 600 bp และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดขอนขาวสดจะมีสายยาว 609 bp ตามลำดับ

1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดขอนขาวแห้งเมื่อผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA sequencing

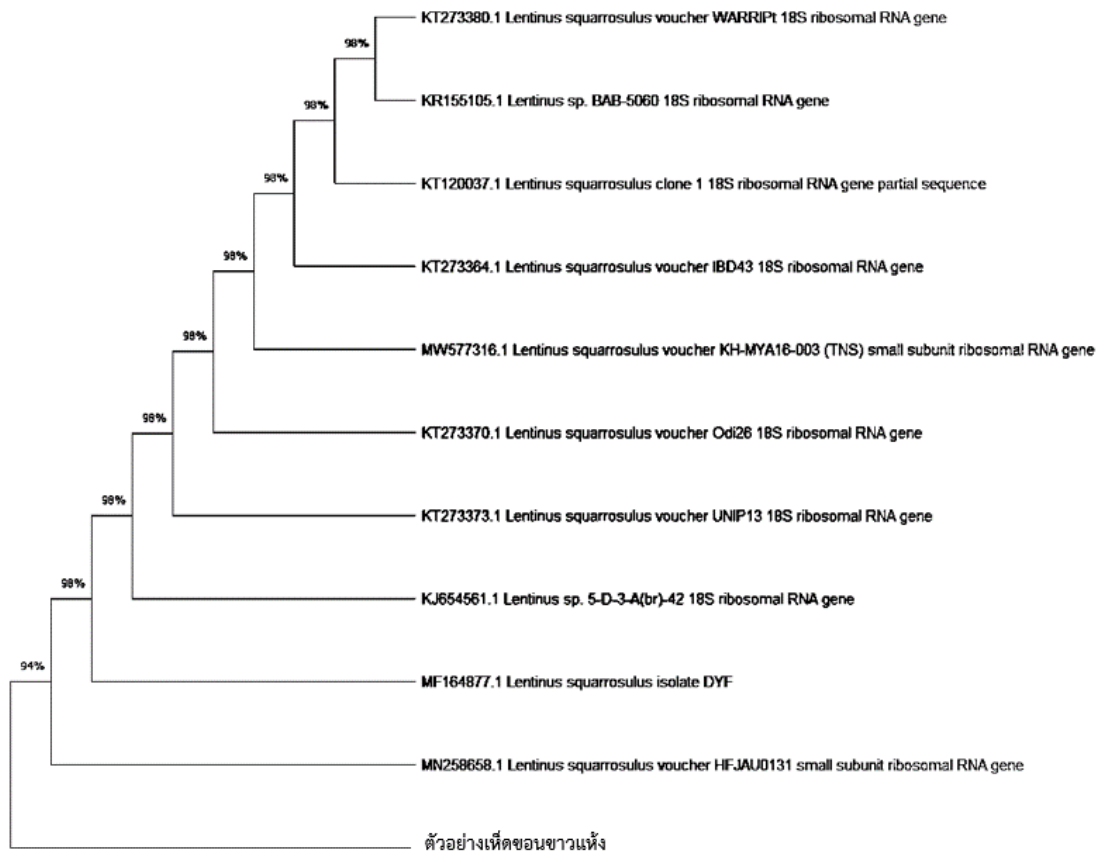
> Dried mushroom : *Lentinus squarrosulus*

TCATTATCGAGTTTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCC
ACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTCAGGAGCTTCGAAAGCGAGAAAGGGGGCTTTCCG
GGGCTTTTTCTTGCTAGTTGTTACTGGCCTACGTTTCACTACAAACACTTATAAAGTATCAGAA
TGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATTCTCAA
CCTAACGGGTTCTTAACGGGACTTGCTTAAGGCTGGAAGTTCTGGCCGTTGGCTTC
ATGGCCAATCCGGTCCCCCTTAATGGCTTTACTTGGGTTCCGGGGCGAACCGGTCCACGGGGGG
ATAATTGCCAACCCCGCAACCGTTAAACCGTTTTTATGCGCCATTTTCTACTCCTCTTTTTAAGAC
ACTATACTCATCAAT

1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดขอนขาวสดเมื่อผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA sequencing

> Fresh mushroom : *Lentinus squarrosulus*

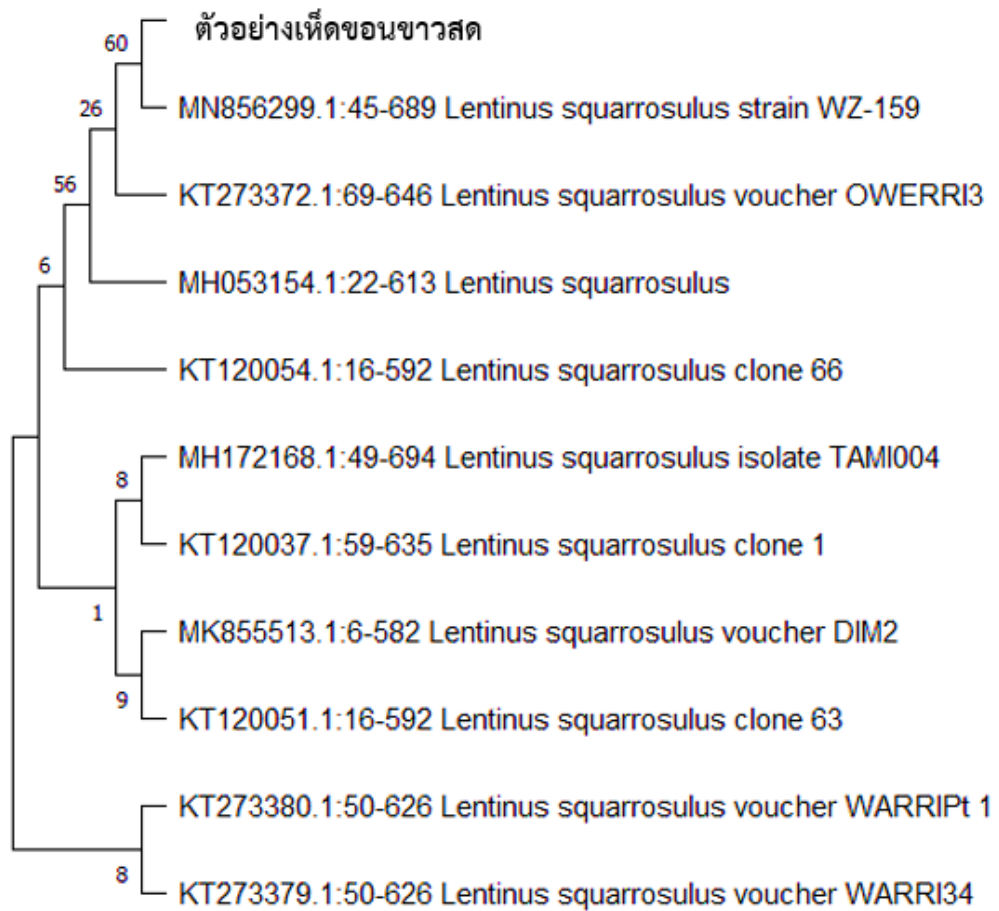
GTAGCTGGCCTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTG
GGTTTCAGGAGCTTCGAAAGCGAGAAAAGGGCCTTCCCGGTTTTTTCTTGCTAGTTGTTAC
TGGCCTACGTTTCACTACAAACACTTATAAAGTATCAGAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTA
TATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTA
TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATTCTCAACCTAACGAGTTCTTAACGGGACTT
GCTTAAGGCTGGAATTGGAAGGTCCTGGCCGCTGGTTCATGGCCAGTCCGGTCCCCCTAAAT
GGCTTAACCTTGGGTCCCGGGGGGAACCGCTCCAGGGGGGGATAATGGCTACCCCCCACCAGGTG
AAACGTTTTATAGGCGACCTTTTCTTCGCTCTCTATAAGACAATAATCTCCTAAAACCTGACACCT
CATATCGGGTGACTIONAACCCCTGAA



(ก.) ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง

ภาพที่ 30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง(ก.) และเห็ดขอนขาวสด

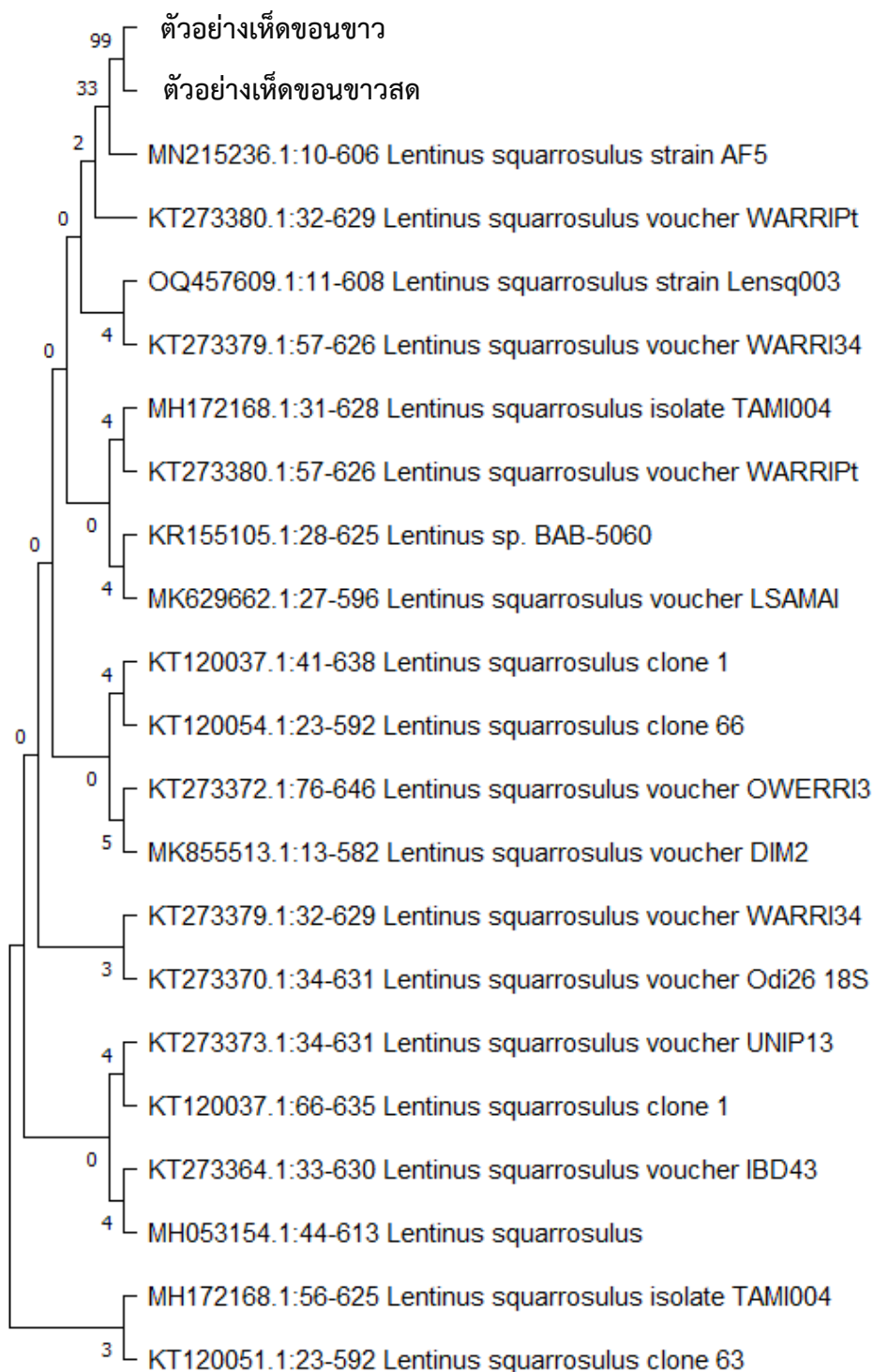
(ข.) โดยแสดงด้วยแผนภาพ phylogenetic tree กัพื้นฐานข้อมูล GenBank;NCBI



(ข.) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดขอนขาวสด

ภาพที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง(ก.) และเห็ดขอนขาวสด

(ข.) โดยแสดงด้วยแผนภาพ phylogenetic tree กับฐานข้อมูล GenBank;NCBI



ภาพที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้ง และเห็ดขอนขาวสด โดยแสดงด้วยแผนภาพ phylogenetic tree กู้ฐานข้อมูล GenBank;NCBI

2. การเตรียมเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งและสด

2.1. ปริมาณโปรตีนจากการเตรียมสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลส

เมื่อทำการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งและสด ก่อนนำมาทำการย่อยด้วย เอนไซม์เปปซินในอัตราส่วน 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 3.7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในปี 2562 โดยนางสาวทัศนีย์ กัมทะษา ในหัวข้อเรื่องการย่อยโปรตีนจากเห็ดขอนขาวด้วยโปรตีนเอสต่างชนิดกันเพื่อยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนส โดยทำการศึกษาสภาวะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เปปซินและ มิกซ์เอนไซม์ ที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าการย่อยสลายโปรตีนที่ 24 ชั่วโมง ด้วย เอนไซม์เปปซินให้ค่าตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมีฤทธิ์ดีที่สุด(ใส่ผลใน ภาคผนวก) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งและ เห็ดขอนขาวสด (ดังตารางที่ 6) จากนั้นนำมาคัดแยกขนาดโปรตีนให้ได้โปรตีนไฮโดรไลสขนาดเล็ก กว่า 3 กิโลดาลตัน (kDa) แล้วทำการ Freeze-Dry ตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอน ขาวแห้งและสดเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (ดังตารางที่ 8)

ตารางที่ 6 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลส

ชนิดของดอกเห็ด	วิธีการสกัด โปรตีน	เอนไซม์ที่ใช้อยู่ (Protease)	สภาวะในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลส			
			ค่า pH	อุณหภูมิ (c°)	Incubate shaking (rpm)	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)
เห็ดขอนขาวแห้ง/ เห็ดลมแห้ง	การสกัดด้วย กรด-เบส	เปปซิน	3.7	37	200	24
เห็ดขอนขาวสด	การสกัดและ ตกกะกอนด้วย เกลือ(NH ₄) ₂ SO ₄ อิ่มตัวที่ 60%					

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณโปรตีนจากการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแบบแห้ง และสด

ตัวอย่าง	ผงเห็ดขอน ขาว (g)	ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (g)	ปริมาณของ โปรตีนไฮโดรไลส (g)	%Yield
ผงเห็ดขอนขาวสด	100	1.14	0.08	0.10±0.09
ผงเห็ดขอนขาวแห้ง	100	9.81	0.39	1.26±0.21
ผงเห็ดลมแห้ง	100	7.04	0.23	0.94±0.16

ตารางที่ 8 ลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและสดที่เตรียมได้

ชนิดของดอกเห็ด	วิธีการสกัด	ผงโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้	ลักษณะทางกายภาพ
เห็ดขอนขาวสด	การสกัดและตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อิ่มตัวที่ 60%		<ul style="list-style-type: none"> - เป็นผงสีขาวเหลืองละเอียด - สามารถละลายน้ำได้ดี - ไม่มีกลิ่น - เมื่อโดนความชื้นสามารถละลายได้
ผงเห็ดขอนขาวแห้ง	การสกัดด้วยกรด-เบส		<ul style="list-style-type: none"> - เป็นผงสีน้ำตาลเหลือง - น้ำหนักเบาเป็นปุยผง - สามารถละลายน้ำได้ - มีกลิ่น - เมื่อโดนความชื้นจะจับกันเป็นผงก้อน

จากผลการทดลองการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากตัวอย่างเห็ดลมแห้ง, เห็ดขอนขาวแห้ง และเห็ดขอนขาวสด โดยคำนวณตัวอย่างเห็ดลมและเห็ดขอนขาวในอัตราส่วน 100 g เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและการคัดเลือกขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa จะได้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จริงของตัวอย่างเห็ดลมแห้ง เห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด 7.04, 9.81 และ 1.14 กรัม ตามลำดับ ซึ่งพบว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จริงของตัวอย่าง เห็ดขอนขาวแห้งมากกว่าเห็ดขอนขาวสด และเห็ดลมแห้ง เมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนตัวอย่างเห็ดลมแห้ง, เห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดด้วยวิธี Lowry ได้ปริมาณโปรตีนสุดท้ายร้อยละ 0.94 ± 0.16 , 0.10 ± 0.09 และ 1.26 ± 0.21 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 7)

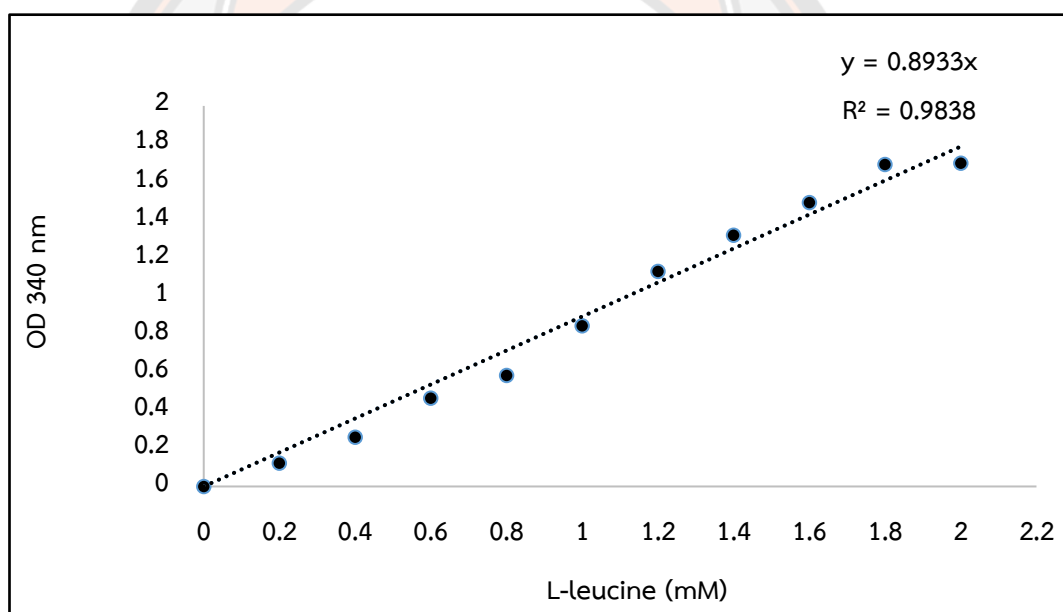
3. การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS method)

การศึกษาระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้คือเอนไซม์เปปซิน เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบโปรตีนตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส โดยจะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรและ นำมาคำนวณวิเคราะห์หาระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน (ดังภาพที่ 33)

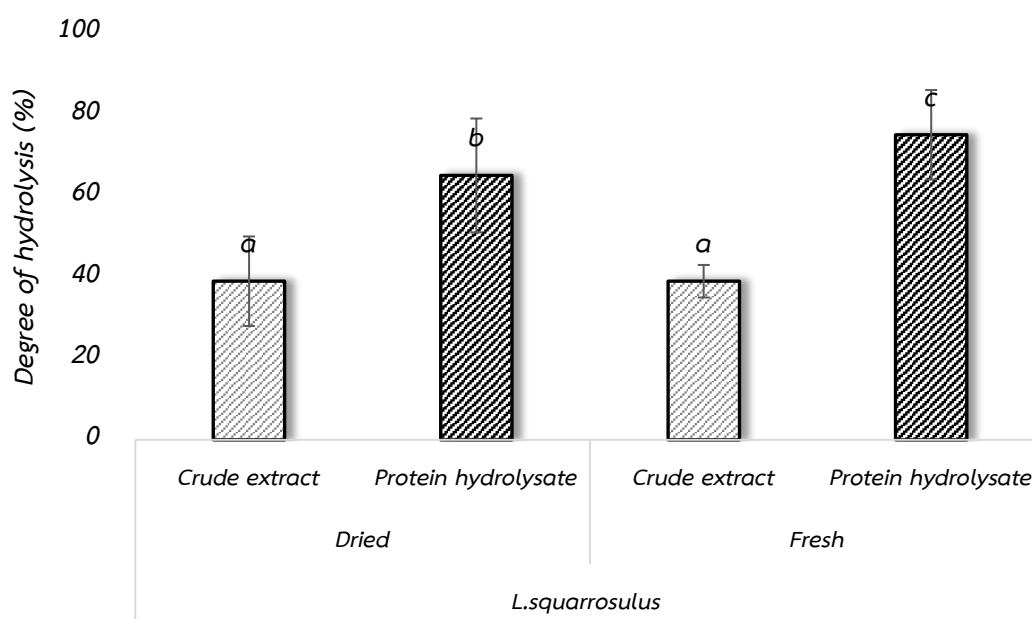
จากผลการทดลองพบว่าการวัดระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากสารสกัดหยาบโปรตีนและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแบบแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 μg จะเห็นได้ว่าเมื่อเกิดการย่อยจะทำให้โปรตีนจะมีขนาด

เล็กลง และระดับการย่อยสลายของโปรตีนจะมีปริมาณที่สูงขึ้น โดยสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้ง จะมีระดับการย่อยสลายอยู่ที่ร้อยละ 39 และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง จะมีระดับการย่อยสลายอยู่ที่ร้อยละ 65 และสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสด จะมีระดับการย่อยสลายอยู่ที่ร้อยละ 39 และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสด จะมีระดับการย่อยสลายอยู่ที่ร้อยละ 75 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

สารสกัดหยาบโปรตีนจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ดังภาพที่ 34) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าการย่อยจะทำให้โปรตีนจะมีขนาดเล็กลงกลายเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส



ภาพที่ 33 แสดงกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของสารมาตรฐาน L-Leucine ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร



ภาพที่ 34 แสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีน (Degree of hydrolysate) ของสารสกัดหยาบโปรตีนและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแบบแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 μg ด้วยวิธี TNBS
 หมายเหตุ : โดยสัญลักษณ์ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (n=3)

4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity test)

4.1. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition)

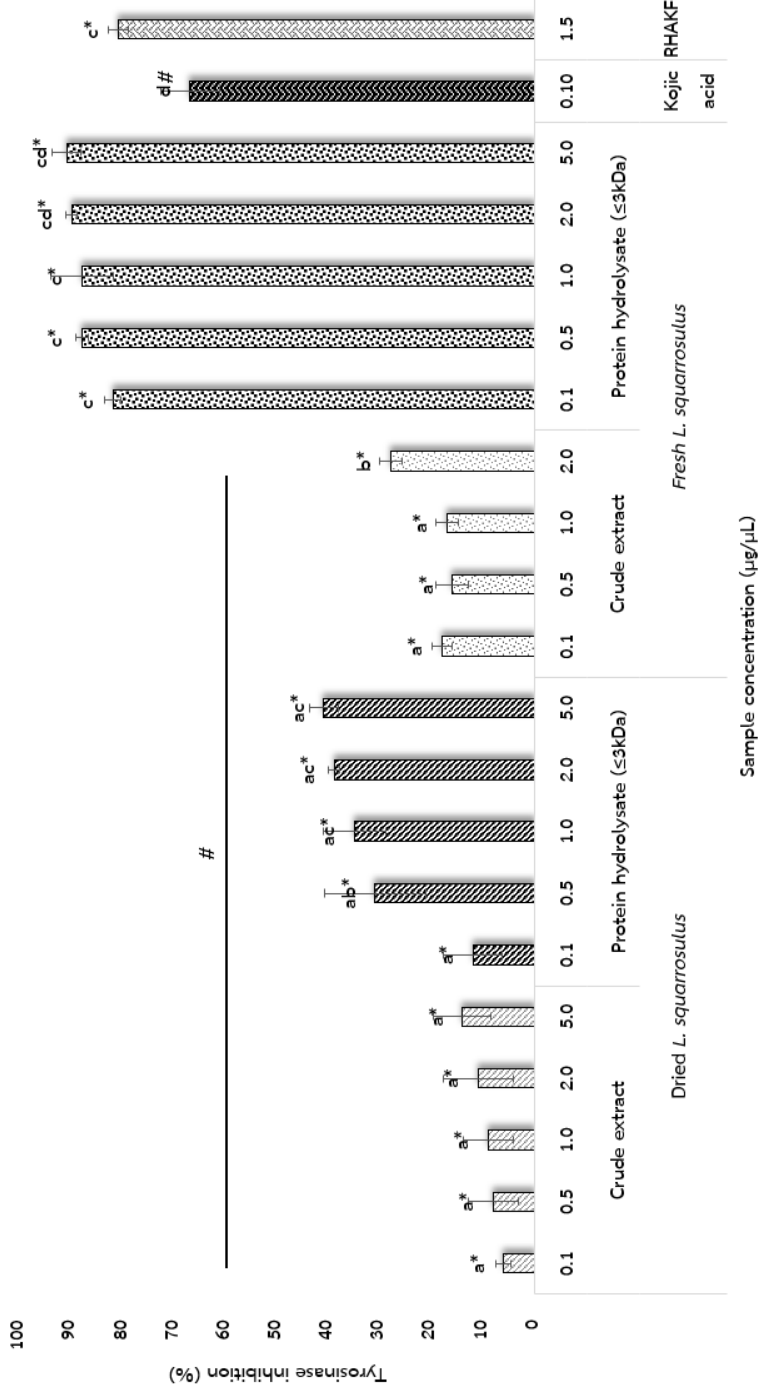
การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (commercial tyrosinase ของเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*)) ซึ่งใช้ L-DOPA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา diphenolase โดยตัวอย่างสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดลม ขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเทียบกับ 0.1 μg Kojic acid และ 1.5 μg Positive synthetic peptide (RHAKF)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดลมแห้ง, เห็ดขอนขาวแห้ง และเห็ดขอนขาวสด พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีว่าโปรตีนไฮโดรไลส

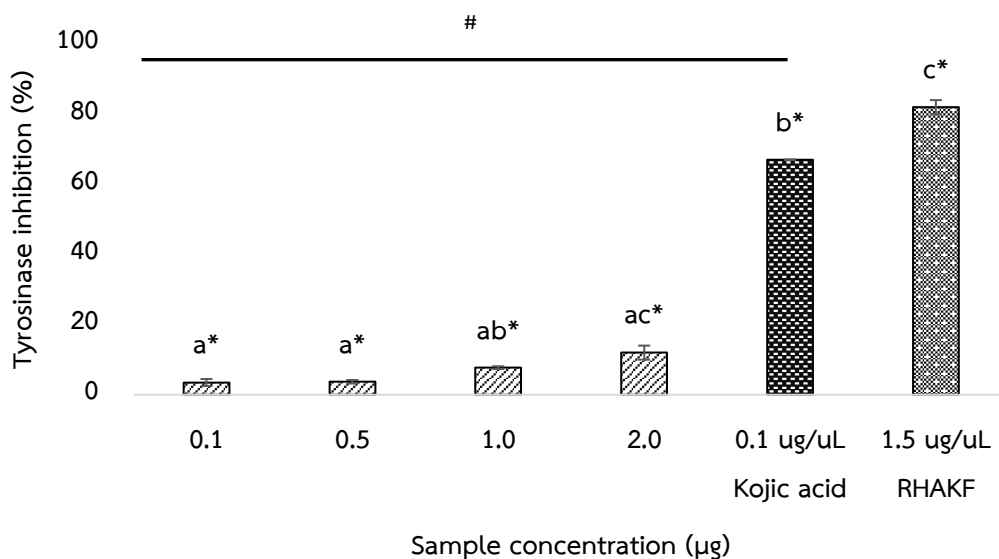
จากเห็ดลมแห้ง โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดลมแห้ง ที่ 2.0 μg สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 12 (ดังภาพที่ 35)

สารสกัดหยาบโปรตีน และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg โดยสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้ง สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดได้เพียงร้อยละ 14 ที่ความเข้มข้นโปรตีนสูงสุด 5.0 μg และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแบบแห้ง สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดได้ร้อยละ 41 ที่ความเข้มข้น 5.0 μg โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1 μg ของ Kojic acid และ 1.5 μg RHAKF ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ 67 และ 82 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดได้ร้อยละ 28 ที่ความเข้มข้น 2.0 μg และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแบบสด ที่ความเข้มข้นเพียง 0.1-5.0 μg สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 82-91 ซึ่งมีร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่า 0.1 μg Kojic acid โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 แต่มีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสใกล้เคียงกับ 1.5 μg RHAKF โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ดังภาพที่ 36)

ดังนั้นแหล่งของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด จะให้ฤทธิ์ที่ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดลมแห้ง ซึ่งจะเห็นได้ชัดว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดลม ที่ความเข้มข้นโปรตีนสูงสุด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เพียงร้อยละ 12 ในรายงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวเพียงชนิดเดียว และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า สารสกัดหยาบโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อย โดยเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินจากเห็ดขอนขาวสดจะให้ฤทธิ์ที่สูงกว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินจากเห็ดขอนขาวแห้ง และให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงและใกล้เคียงกับ 0.1 μg Kojic acid และ 1.5 μg RHAKF ตามลำดับ



ภาพที่ 35 แสดงร้อยละการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่เวลา 20 นาที ของตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน
 หมายเหตุ : โดยสัญลักษณ์ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (n=3)
 *, # แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับกรโคจิก และ RHAKF จากเอนไซม์เปปซิน ตามลำดับ



ภาพที่ 36 แสดงร้อยละฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่เวลา 20 นาที ของตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดลมแห้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน
 หมายเหตุ : โดยสัญลักษณ์ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (n=3) ; *, # แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับกรดโคจิก และ RHAKF จากมะตูมจีน ตามลำดับ

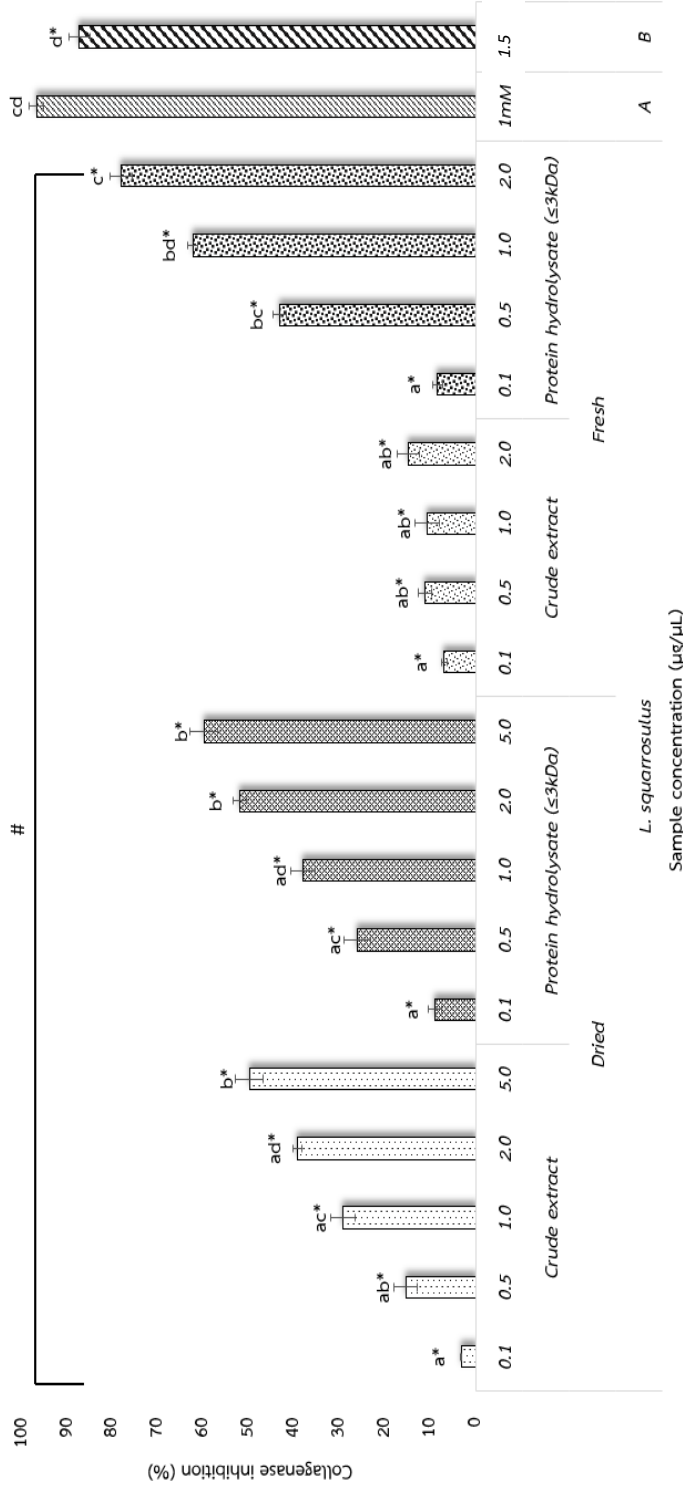
4.2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1 inhibition)

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสหรือ MMP-1 สารตั้งต้นของปฏิกิริยา คือ FALGPA โดยตัวอย่างสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 µg และทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 432 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เทียบกับ 1 mM 1,10-Phenantroline และ 1.5 µg synthetic peptide (GFSGLDGAKGD)

จากผลการศึกษาการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ด้วยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาว พบว่าสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 µg มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสร้อยละ 3, 16, 29, 39 และ 50 โดยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 µg มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสร้อยละ 9, 26, 38, 52 และ 60 ซึ่งสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0,

และ 2.0 μg มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสร้อยละ 7, 11, 11 และ 25 ในขณะที่ สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแบบสดความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 μg สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสร้อยละ 9, 43, 62 และ 78 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 1 mM 1,10-Phenantroline และ เปปไทด์ GFSGLDGAKGD (1022 Da) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ร้อยละ 97 และ 87 ตามลำดับ (ดังภาพที่ 36)

ซึ่งจากผลการศึกษานี้จะทราบว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด จะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ได้มากกว่าสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเดียวกัน และจะเห็นได้ชัดว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน จนกลายเป็นเปปไทด์ทำให้เกิดการส่งเสริมการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสให้สูงขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้น้อยกว่า โดยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีนสูงสุด 2 μg จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีที่สุดร้อยละ 78 ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้มากกว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 5 μg สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีที่สุดร้อยละ 50 ในขณะเดียวกันสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีนสูงสุด 2 μg สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน 1 mM 1,10-Phenantroline และ เปปไทด์ (GFSGLDGAKGD) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ร้อยละ 97 และ 87 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสท มีระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 กับ positive control ที่เป็นสารมาตรฐาน และเปปไทด์เจลาตินจากหนังปลา (ดังภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 แสดงร้อยละยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ของตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส-เสทจากเห็ดขอมขาวแบบแห้งและเห็ดขอมขาวแบบสดผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน

เมื่อ แทน A คือ 1 mM 1,10-Phenanthroline และแทน B คือ 1.5 $\mu g/\mu L$ GFSLDGGAKGD (1022 Da)

หมายเหตุ : โดยสัญลักษณ์ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงค่าเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่างๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (n=3)

*, # แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับ 1 mM 1,10-Phenanthroline และ เปปไทด์ GFSLDGGAKGD ตามลำดับ

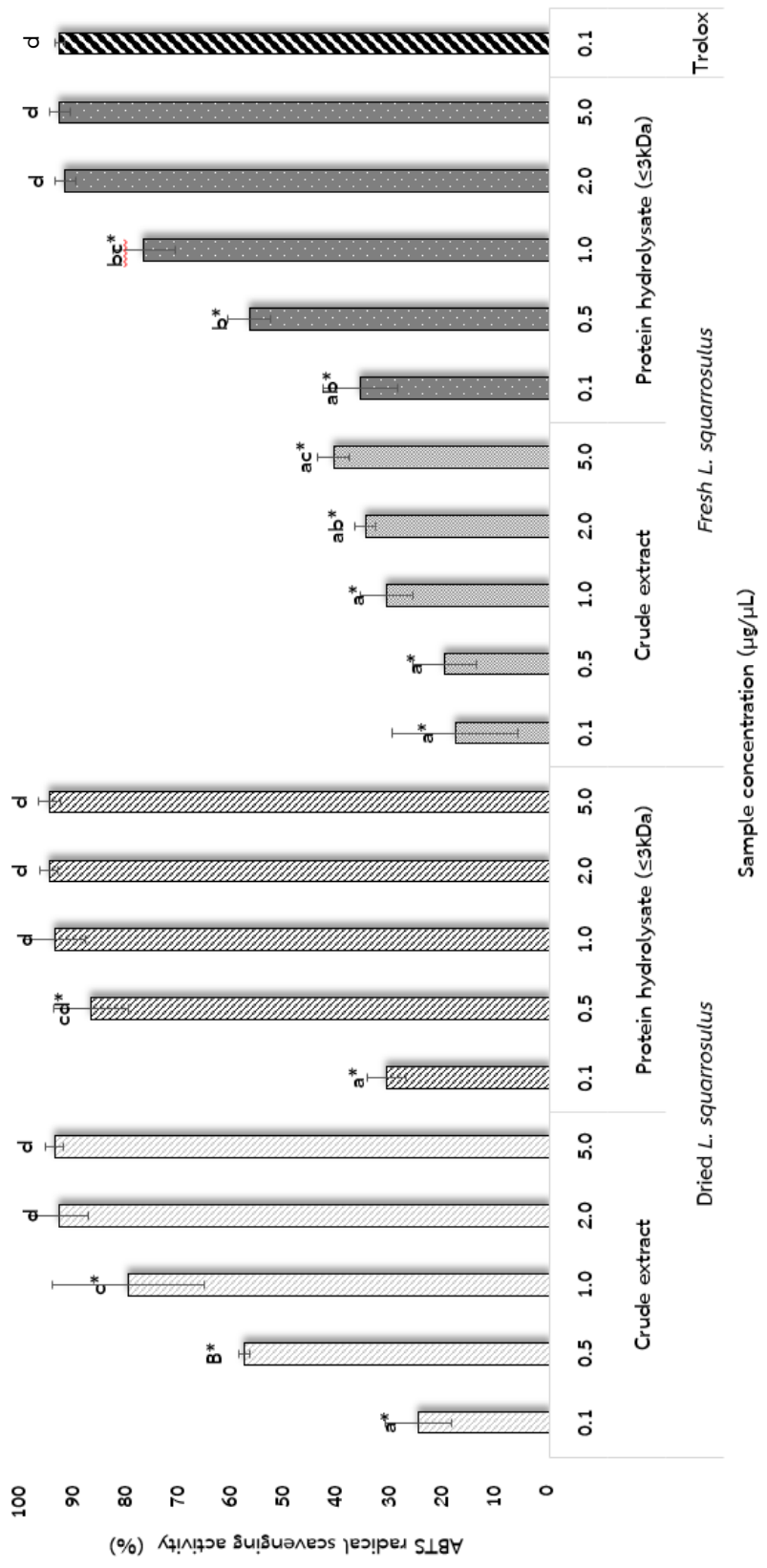
4.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

4.3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง และสด ด้วยวิธี ABTS

การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg ด้วยวิธี ABTS โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณ radical scavenging activity เปรียบเทียบกับ Trolox เป็นสารมาตรฐาน (Positive control)

จากผลการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg พบว่าสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้ง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงร้อยละ 25-94 และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงร้อยละ 31-95 ในขณะที่โดยสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงร้อยละ 18-41 และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงร้อยละ 36-93 เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1 μg Trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐานพบว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบโปรตีนและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีน 2.0 และ 5.0 μg มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงกับ 0.1 μg Trolox โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ดังภาพที่ 38)

ซึ่งจากผลการศึกษาจะพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งใกล้เคียงกับสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีนสูงสุด และสารสกัดโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดหยาบโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในเห็ดขอนขาวสด แสดงให้ทราบถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเตรียมเปปไทด์โดยการทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสท อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน 0.1 μg Trolox



ภาพที่ 38 แสดงร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด

ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน เปรียบเทียบกับ 0.1 µg Trolox โดยวิธี ABTS

หมายเหตุ : โดยสัญลักษณ์ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงค่าเฉลี่ยที่ตัวอย่างความเข้มข้นต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (n=3)

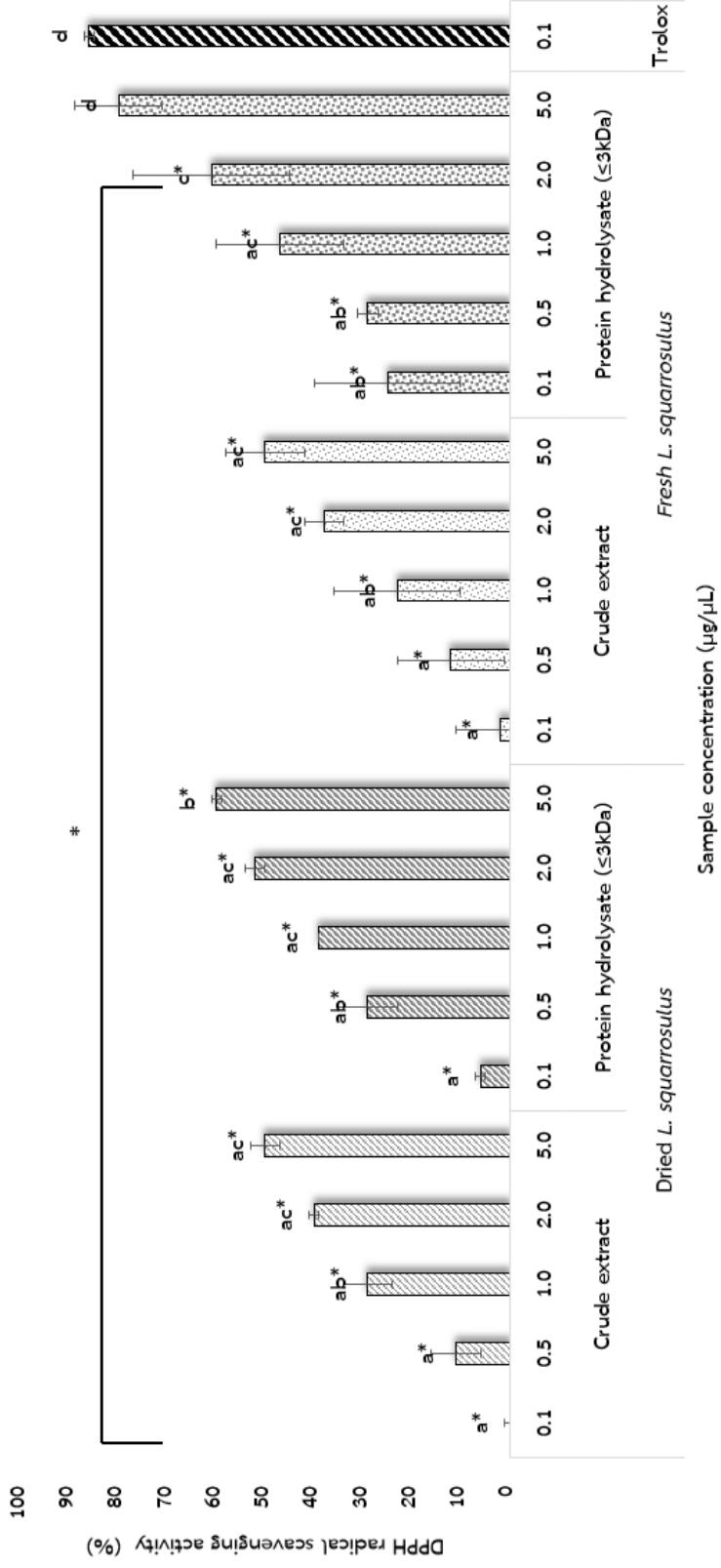
* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับ 0.1 µg Trolox

4.3.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและสด ด้วยวิธี DPPH

การศึกษาคูณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg ด้วยวิธี DPPH โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณ radical scavenging activity เปรียบเทียบกับ Trolox เป็นมาตรฐาน (Standard solution)

จากผลการศึกษารวบรวมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาว ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg โดยสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้ง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 11-50 และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแบบแห้ง ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดได้ร้อยละ 6-60 และสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 2-50 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ สารมาตรฐาน 0.1 μg Trolox มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดได้ร้อยละ 86 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ในขณะที่สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแบบสด ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดได้ร้อยละ 25-79 ซึ่งที่ความเข้มข้นโปรตีน 5.0 μg มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ 0.1 μg Trolox มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดได้ร้อยละ 86 โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ดังภาพที่ 39)

จากผลการศึกษาจะพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งและสดที่ไม่ผ่านการย่อยเอนไซม์เปปซิน และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้นสูงสุดให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกับ Trolox



ภาพที่ 39 แสดงร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบโปรตีนและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด

ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน เปรียบเทียบกับ 0.1 µg Trolox โดยวิธี DPPH

หมายเหตุ : โดยสัญลักษณ์ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงค่าเฉลี่ยที่ได้อย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (n=3)

* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับ 0.1 µg Trolox

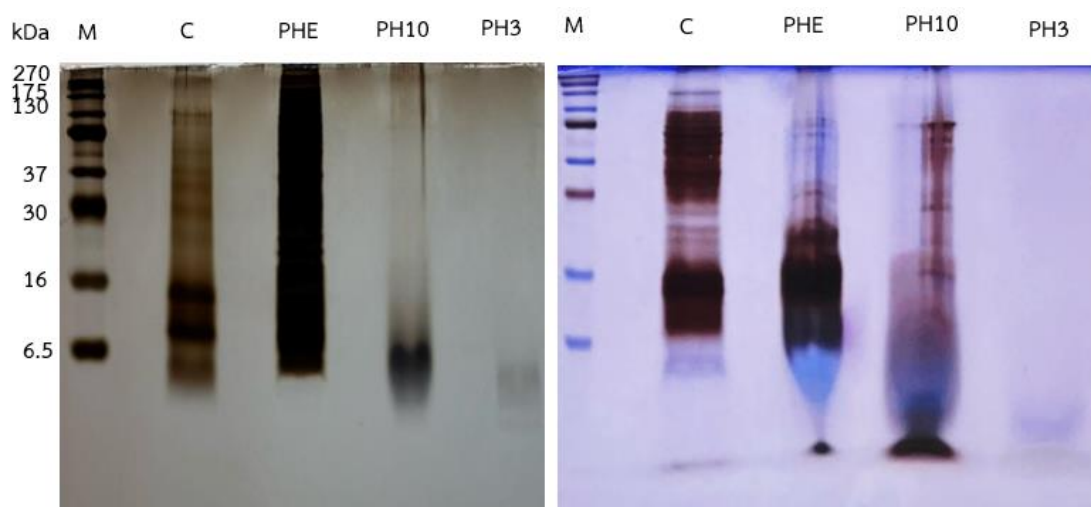
ตารางที่ 9 แสดงผลค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทีรียอลอะ 50 และเปรียบเทียบค่า TEAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$ ตัวอย่าง) ด้วยวิธี ABTS และ DPPH ของสารสกัดหยาบโปรตีนและสารสกัดเปปไทด์จากเห็ดโคนขาวแห้งและเห็ดโคนขาวสด

ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสท	ผลค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทีรียอลอะ 50 ; IC ₅₀ (μg)					
	Tyrosinase inhibition	Collagenase inhibition	ABTS assay		DPPH assay	
			TEAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$ samples)	IC ₅₀	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$ samples)	IC ₅₀
เห็ดโคนขาวแห้ง	สารสกัดหยาบโปรตีน	5.000	0.228	2.659	0.133	4.99
	สารสกัดเปปไทด์	4.166	0.231	2.631	0.159	4.17
เห็ดโคนขาวสด	สารสกัดหยาบโปรตีน	*ND	0.099	*ND	0.132	5.00
	สารสกัดเปปไทด์	2.747	0.226	2.632	0.212	3.13
กรดโคจิก	3.731	-	-	-	-	-
RHAKF	3.086	-	-	-	-	-
1,10-Phenantroline	-	2.577	-	-	-	-
GF5GLDGAKGD	-	2.873	-	-	-	-

*Not determine (ND) คือ ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ทีรียอลอะ 50

5. การวิเคราะห์โปรไฟล์ของสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวด้วยวิธี SDS-PAGE

การศึกษาวិเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจากสารสกัดหยาบและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทของเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ที่โปรตีนความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม นำมาย้อมด้วยสี Silver และ Coomassie Brilliant Blue R-250 แล้ววิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยด้วยโปรแกรม Image J software



ก.

ข.

ภาพที่ 40 แสดงโปรไฟล์ของสารสกัดหยาบโปรตีนและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแบบแห้ง (ก.)และเห็ดขอนขาวสด (ข.) ด้วยวิธี SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Silver และ Coomassie Brilliant Blue R-250 (ความเข้มข้นโปรตีน 100 μg)

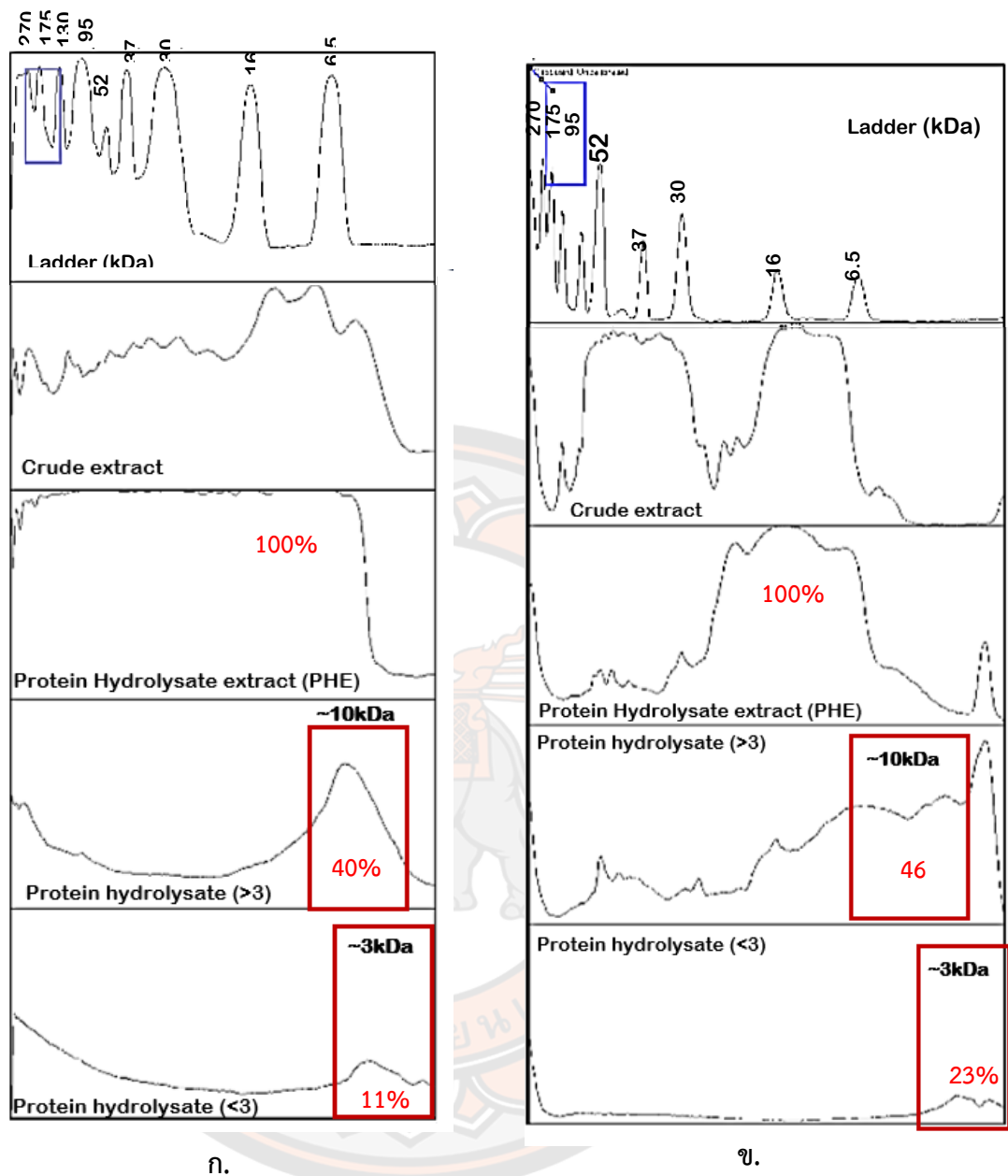
เมื่อ แถบ M คือ Protein molecular weight marker

แถบ C คือ สารสกัดหยาบโปรตีนเห็ดขอนขาว

แถบ PHE คือ สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน

แถบ PH10 คือสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาด ≤ 10 kDa

แถบ PH3 คือ สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาด ≤ 3 kDa



ภาพที่ 41 แสดงการวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image J software ของสารสกัดหยาบโปรตีนและสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง (ก.) และสด (ข.) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (M)

เมื่อ ก. คือ โปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง

ข. คือโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด ส่วน Fruiting body

แถบ M คือ Protein molecular weight marker

แถบ C คือ สารสกัดหยาบโปรตีนเห็ดขอนขาว

แถบ PHE คือ สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน

แถบPH10 คือสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาด ≤ 10 kDa

แถบ PH3 คือ สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาด ≤ 3 kDa

จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของแถบโปรตีนจากสารสกัดเห็ดขอนขาวโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดมีการแสดงออกของแถบโปรตีนในช่วง 6.5-270 และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือกขนาดจะพบแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กลงมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแถว C หรือสารสกัดเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด

และเมื่อทำการคัดเลือกขนาดโปรตีนที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 kDa จะพบแถบโปรตีนในแถว PH10 ขนาดน้อยกว่า 16 kDa และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาด ≤ 3 kDa จะพบแถบโปรตีนในแถว PH3 ซึ่งจะมีการแสดงออกของแถบโปรตีนขนาดน้อยกว่า 6.5 kDa ทั้งในสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด (ดังภาพที่ 40) และจากการนำไปศึกษาทาง Software โดยนำไปวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image J software (ดังภาพที่ 41) พบว่า แถบโปรตีนของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแบบแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ขนาดคัดเลือกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa (PH3) พบโปรตีนในช่วงน้อยกว่า 6.5 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับ Marker (แถบ M) และมีขนาดของ peak โปรตีนเล็กลง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสารสกัดเห็ด (Crude extract ; แถบ C) การวิเคราะห์ %yield เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และ 3 กิโลดาลตัน กับโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ไม่ผ่านการคัดแยกขนาดของโปรตีน พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง ขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และ 3 กิโลดาลตัน มี %yield เท่ากับร้อยละ 40 และ 11 และโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด ขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 และ 3 กิโลดาลตัน มี %yeild เท่ากับร้อยละ 46 และ 23

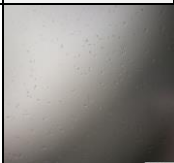




6. การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวด้วยวิธี MTT

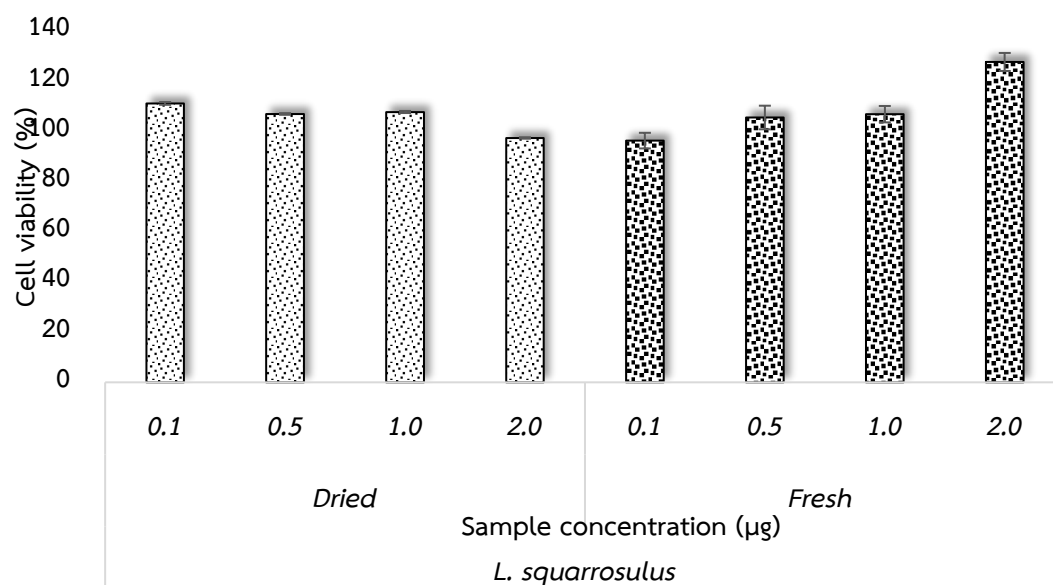
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด โดยนำเซลล์ HaCaT (Human epidermal keratinocytes cell) ให้สารสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแบบแห้งและสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm

จากการทดสอบสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแบบแห้งและสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน โดยผลการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 μg สามารถมองเห็นลักษณะ Morphology ของเซลล์ HaCaT หลังทำการทดสอบ (ดังตารางที่ 10)

จากการทดสอบผลความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT พบว่า สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแบบแห้ง และสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, และ 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถออกฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT ร้อยละ 96, 105, 106, 127 และ 96, 105, 107 และ 128 ตามลำดับ ดังนั้น สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ไม่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชั้นเคอราติโนไซต์ หรือ เซลล์ HaCaT (ดังภาพที่ 42 และ ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 แสดงลักษณะของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาว ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

ชนิดของเซลล์	ความเข้มข้นของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				
	0	0.1	0.5	1.0	2.0
เซลล์ HaCaT					



ภาพที่ 42 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแบบแห้งและสดที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, และ 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

ตารางที่ 11 แสดงอัตราการรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ HaCaT ต่อสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน

ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลส	ความเข้มข้นของสารสกัด (μg)	อัตราการรอดชีวิต (%)
เห็ดขอนขาวแห้ง	0.1	111 \pm 0.54
	0.5	107 \pm 0.33
	1.0	108 \pm 0.42
	2.0	97 \pm 0.28
เห็ดขอนขาวสด	0.1	96 \pm 3.11
	0.5	105 \pm 4.70
	1.0	107 \pm 3.26
	2.0	128 \pm 3.58

7. การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ด้วยวิธี Liquid Chromatography – Mass Spectrometer (LC-MS)

ผลการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ด้วยวิธี LC-MS จะถูกนำมาวิเคราะห์หาค่า Free-radical scavenging (FRS) วิธี ABTS และ DPPH โดยฐานข้อมูล ANTIAGE-DB software ซึ่งเป็นการคำนวณความน่าจะเป็นในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือลด free radical ของลำดับสายเปปไทด์ โดยนำค่า FRS นี้มาคัดเลือกสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ดังตารางที่ 12 และ 13) และวิเคราะห์คุณสมบัติการชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของกลุ่ม Peptide ด้วย Peptide 2.0 Inc. software ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติของกลุ่มเปปไทด์ พบว่าลำดับเปปไทด์จากเห็ดขอนขาวแห้งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม hydrophobic amino acid หรือประกอบด้วย hydrophobic residue ได้แก่ LKPIVKLLL, AMRLVGP, LSLNPLLEELVIQAKWNYRTNS, KLKPLIIP, LLLKPKVLL, WVILHLLLI, LIPLLKLLRVV และ FKGDGMHP และบางลำดับเปปไทด์มีคุณสมบัติความเป็น acid residue, Basic residues และ Neutral residues ได้แก่ DDEGMGDEEDDDDNM, TAPGGGGGG และ RRYRREHTA (ดังตารางที่ 14)

และในกลุ่มลำดับเปปไทด์จากเห็ดขอนขาวสด ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติ hydrophobic residue ส่วนมาก ได้แก่ PQKLILL, AKTESLLLN, WGKTIEYLEFRDHLDMAS, RAIRYAIL, LILLPLKP, KILLPLLQPLL, IKPLIAAV, HPAKVAAY, ARLKAKILPLRL, LCLLLTVLVF, AYLLLSLLRRRK, ARLLLLLLLLL, PTPAILML และRLRTLIIIIIFLM มีเพียงลำดับเปปไทด์จาก LILGGSSS มีคุณสมบัติ Neutral residues มากกว่า hydrophobic residue (ดังตารางที่ 15)

ตารางที่ 12 แสดงค่า Free-radical scavenging (FRS) ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง

ลำดับเปปไทด์	ชื่อโปรตีน	Free-radical scavenging (FRS)
1. LKPIVKLLL	Multiple ankyrin repeats single kh-domain	0.30
2. AMRLVGP	NAD(P)-binding protein	0.42
3. DDEGMGDEEDDDNM	WD40 repeat-like protein	0.38
4. TAPGGGGGG	PI-Nc domain-containing protein	0.48
5. LSLNPLLEELVIQAKWNYRTNS	F-box domain-containing protein	0.37
6. KLKPLIIP	Glutathione s-transferase	0.32
7. LLLKPKVLL	Uncharacterized protein	0.38
8. VVILHLLLI	Uncharacterized protein	0.45
9. RRYRREHTA	Uncharacterized protein	0.41
10. LIPLLKLLRVV	Uncharacterized protein	0.31
11. FKGDGMHP	Uncharacterized protein	0.47

ตารางที่ 13 แสดงค่า Free-radical scavenging (FRS) ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด

ลำดับเปปไทด์	ชื่อโปรตีน	Free-radical scavenging (FRS)
1. LILGGSSS	GroES-like protein	0.33
2. PQKLILL	Origin recognition complex subunit 3-like protein	0.30
3. AKTESLLLN	V-type proton ATPase subunit H	0.30
4. WGKTIEYLEFRDHLDMAS	F-box domain-containing protein	0.40
5. RAIKYAIL	HET-domain-containing protein	0.41
6. LILLPLKP	MFS general substrate transporter	0.43

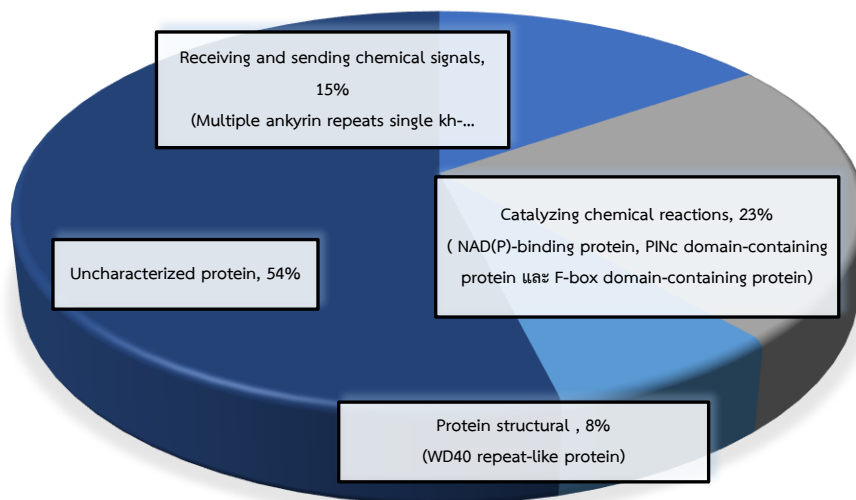
7. KILLPLLQPLL	Amidohydrolase 2	0.39
8. IKPLIAAV	Enoyl-hydratase	0.28
9. HPAKVAAY	(4-O-methyl)-D-glucuronate-- lignin esterase	0.31
10. ARLKAKILPLRL	Autophagy-related protein-2	0.29
11. LCLLLTVLVF	SUN domain-containing protein	0.35
12. AYLLLSLLRRRK	Cytochrome p450	0.33
13. ARLLLLLLLLLL	Uncharacterized protein	0.36
14. PTPAILML	Uncharacterized protein	0.36
15. RLRTLMLLFLM	Uncharacterized protein	0.38

ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์คุณสมบัติของกลุ่ม Peptide Hydrophobicity หรือ Hydrophilicity ด้วย Peptide 2.0 Inc. software ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง

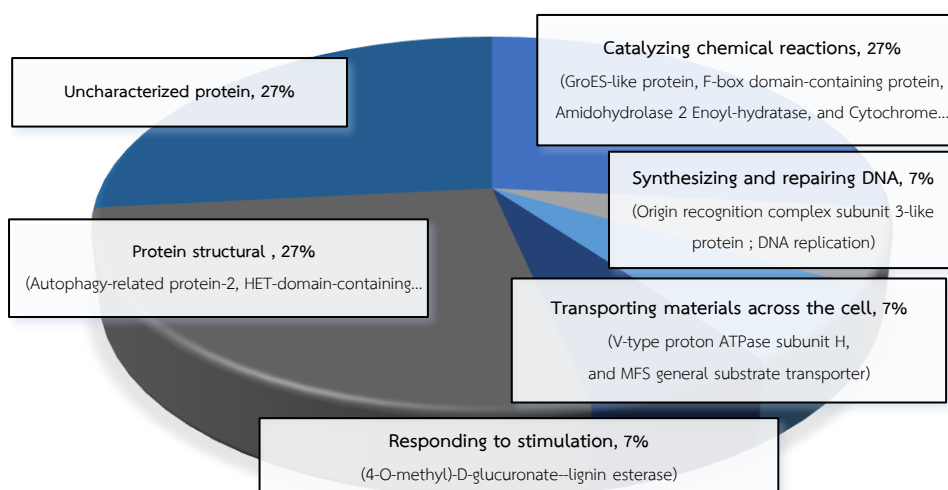
ลำดับเปปไทด์	Type peptide residue			
	Hydrophobic residues	Acidic residues	Basic residues	Neutral residues
1. LKPIVKLLL	77.78	0.00	22.22	0.00
2. AMRLVGP	75.00	0.00	12.50	12.50
3. DDEGMGDEEDDDNM	13.33	56.67	0.00	20.00
4. TAPGGGGGG	22.22	0.00	0.00	77.77
5. LSLNPLLEELVIQAKWNYRTNS	45.45	9.09	9.09	36.36
6. KLKPLIIP	75.00	0.00	25.00	0.00
7. LLLKPKVLL	77.78	0	22.22	0
8. VVILHLLLI	88.89	0	11.11	0
9. RRYRREHTA	11.11	11.11	55.56	22.22
10. LIPLLKLLRVV	81.82	0.00	18.18	0.00
11. FKGDGMHP	37.50	12.50	25.00	25.00

ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์คุณสมบัติของกลุ่ม Peptide Hydrophobicity หรือ Hydrophilicity ด้วย Peptide 2.0 Inc. software ของลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสด

ลำดับเปปไทด์	Type peptide residue (%)			
	Hydrophobic residues	Acidic residues	Basic residues	Neutral residues
1. LILGSSS	37.50	0.00	0.00	62.50
2. PQKLILL	75.00	0.00	12.50	12.50
3. AKTESLLLN	44.44	11.11	11.11	33.33
4. WGKTIEYLEFRDHLDMAS	41.18	23.53	17.65	17.65
5. RAIRYAIL	62.50	0.00	25.00	12.50
6. LILLPLKP	87.50	0.00	12.50	0.00
7. KILLPLLQPLL	81.82	0.00	3.09	9.09
8. IKPLIAAV	87.50	0.00	12.50	0.00
9. HPAKVAAY	62.50	0.00	25.00	12.50
10. ARLKAKILPLRL	50.00	0.00	33.33	16.67
11. LCLLLTVLVF	80.00	0.00	0.00	20.00
12. AYLLLSLLRRRK	50.00	0.00	33.33	16.67
13. ARLLLLLLLLLL	91.67	0.00	8.33	0.00
14. PTPAILML	87.50	0.00	0.00	12.50
15. RLRTLFLM	75.00	0.00	16.67	8.33



(ก.) ลำดับเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากหัตถ์ของทารก



(ข.) ลำดับเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากหัตถ์ของทารก

ภาพที่ 43 แสดงการวิเคราะห์ชนิดการทำงานของลำดับเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากหัตถ์ของทารก (ก.) และหัตถ์ของทารก (ข.)

เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดการทำงานของลำดับเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากหัตถ์ของทารก พบว่าลำดับเปปไทด์ที่มีการทำงานของรับและส่งสัญญาณ (Responding to stimulation), การเร่งปฏิกิริยาทางเคมี (Catalyzing chemical reactions) และโครงสร้างของโปรตีน (Protein structural) ร้อยละ 54, 23 และ 8 ตามลำดับ ในขณะที่ ลำดับเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากหัตถ์ของทารก พบลำดับเปปไทด์ที่มีการทำงานของรับและส่งสัญญาณ (Responding to stimulation), การเร่งปฏิกิริยาทางเคมี (Catalyzing chemical reactions), การควบคุมการทำงานและเคลื่อนย้ายของเซลล์ (Transporting materials across the

cell), การสร้างและซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Synthesizing and repairing DNA) และโครงสร้างของโปรตีน (Protein structural) ร้อยละ 27, 27, 7, 7 และ 7 ตามลำดับ ทั้งนี้จากการวิเคราะห์กลุ่มของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสดมีความหลากหลายของกลุ่มโปรตีนมากกว่าเห็ดขอนขาวแห้ง (ดังภาพที่ 43)

7.1. ผลการทดลองการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีนไฮโดรไลสด้วยเอนไซม์เปปซินจากเห็ดขอนขาวแห้ง

จากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง จะได้ลำดับเปปไทด์ 11 ลำดับ ได้แก่

ลำดับที่ 1 LKPIVKLLL ขนาด 1,036 Da ฤทธิ์เป็นโปรตีน Multiple ankyrin repeats single kh-domain ทำหน้าที่จับกับ protein kinase มีส่วนร่วมในกระบวนการ morphogenesis ของเซลล์ และควบคุมการทำงานในกระบวนการ RNA polymerase II transcription

ลำดับที่ 2 AMRLVGPL ขนาด 855 Da ฤทธิ์เป็นโปรตีน NAD(P)-binding protein ทำหน้าที่จับกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์

ลำดับที่ 3 DDEGMGDEEDDDNM ขนาด 1,700 Da ฤทธิ์เป็นโปรตีน WD40 repeat-like protein ทำหน้าที่เป็นโครงร่าง protein interaction scaffolds

ลำดับที่ 4 TAPGGGGGG ขนาด 629 Da ฤทธิ์เป็นโปรตีน PINc domain-containing protein

ลำดับที่ 5 LSLNPLLEELVIQAKWNYRTNS ขนาด 2600 Da ฤทธิ์เป็นโปรตีน F-box domain-containing protein ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ phosphorylation-mediated ubiquitination

ลำดับที่ 6 KLKPLIIP ขนาด 922 Da ฤทธิ์เป็นโปรตีน Glutathione s-transferase ทำหน้าที่ในกระบวนการ detoxification ภายในพืช, เกี่ยวข้องในกระบวนการ secondary metabolism

และโปรตีนที่ยังไม่ถูกวิเคราะห์ (Uncharacterized protein) 5 ลำดับ ได้แก่

ลำดับที่ 7 LLLKPKVLL ขนาด 1035 Da

ลำดับที่ 8 VWLHLLLI ขนาด 1,031 Da

ลำดับที่ 9 RRYRREHTA ขนาด 1,243 Da

ลำดับที่ 10 LIPLLKLLRVV ขนาด 1,275 Da

ลำดับที่ 11 FKGDGMHP ขนาด 887 Da (ดังตารางที่ 16)

7.2. ผลการทดลองการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีนไฮโดรไลสเสทด้วยเอนไซม์เปปซินจากเห็ด ขอนขาวสด

จากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งจะได้
ลำดับเปป-ไทด์ 15 ลำดับ ได้แก่

ลำดับที่ 1 LILGGSSS ขนาด 732 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน GroES-like protein เป็นหนึ่งใน
เอนไซม์กลุ่ม oxidoreductase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ใน electron
transport chains

ลำดับที่ 2 PQKLILLL ขนาด 937 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน Origin recognition complex
subunit 3-like protein ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA replication ของการ
จดจำกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ

ลำดับที่ 3 AKTESLLLN ขนาด 987 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน V-type proton ATPase
subunit H เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งโปรตอน (proton-transporting) ของเอนไซม์
ATPase

ลำดับที่ 4 WGKTIEYLEFRDHLDMAS ขนาด 2,210 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน F-box
domain-containing protein ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ phosphorylation-
mediated ubiquitination

ลำดับที่ 5 RAIRYAIL ขนาด 974 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน HET-domain-containing
protein

ลำดับที่ 6 LILLPLKP ขนาด 905 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน MFS general substrate
transporter เป็นโปรตีนสำคัญที่พบส่วนเนื้อเยื่อ ทำหน้าที่เป็น transmembrane
transporter

ลำดับที่ 7 KILLPLLOPLL ขนาด 1,259 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน Amidohydrolase 2 เป็น
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม hydrolase

ลำดับที่ 8 IKPLIAAV ขนาด 823 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน Enoyl-hydratase ในกลุ่ม
กระบวนการเร่งปฏิกิริยา (catalytic activity) ของกระบวนการ Fatty acid metabolism

ลำดับที่ 9 HPAKVAAY ขนาด 855 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน (4-O-methyl)-D-glucuronate--
lignin esterase เป็นโปรตีนสำคัญที่พบส่วนเนื้อเยื่อ เป็น transmembrane transporter
และเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม hydrolase

ลำดับที่ 10 ARLKAKILPLRL ขนาด 1,391 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน Autophagy-related
protein-2 เป็นโปรตีนสำคัญที่พบใน phagophore และ endoplasmic reticulum
membrane

ลำดับที่ 11 LCLLLTVLVF ขนาด 1,132 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน SUN domain-containing protein ซึ่งถูกพบที่บริเวณ membrane

ลำดับที่ 12 AYLLLSLLRRRK ขนาด 1,501 Da ถูกระบุเป็นโปรตีน Cytochrome p450 เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม monooxygenase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ electron transport chain โดยจะถูกรีดิวซ์ให้จับกับคาร์บอนมอนอกไซด์ มีหน้าที่หลัก 2 แบบคือ ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบกำจัดสารพิษในสิ่งมีชีวิต และมีส่วนร่วมในกระบวนการเมแทบอลิซึม

และโปรตีนที่ยังไม่ถูกวิเคราะห์ (Uncharacterized protein) 3 ลำดับ ได้แก่

ลำดับที่ 13 ARLLLLLLLLL ขนาด 1,376 Da

ลำดับที่ 14 PTPAILML ขนาด 854 Da

ลำดับที่ 15 RLRTLFLM ขนาด 1,501 Da (ดังตารางที่17)



ตารางที่ 16 แสดงฐานข้อมูลทางโปรตีนของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง

Leading razor protein	Protein name	Sequence	Mass (Da)	Score	Organism
A0A5C2SXE0	Uncharacterized protein	LSSTTFPRH	1044.535	54.549	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2SQ83	G-protein alpha subunit	KPKVILL	922.6579	51.456	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-6
A0A1Q3EC00	Multiple ankyrin repeats single kh domain	LKPIVKLLL	1035.742	50.898	<i>Lentinula edodes</i>
A0A5C2TS63	NAD(P)-binding protein	AMRLVGPL	855.5000	46.37	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2T6F6	Uncharacterized protein	LLLKPKVLL	1035.742	44.692	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2TAG3	Uncharacterized protein	LIPLLKLLRVV	1275.900	18.268	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A1Q3DX82	Glutathione s-transferase	KLKPLIIP	920.6422	9.4706	<i>Lentinula edodes</i>
A0A5C2SV92	Uncharacterized protein	FKGDGMHP	887.3959	9.2405	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-6
A0A5C2T7G9	F-box domain-containing protein	LSLNPLLEELVI QAKWNYRTNS	2600.396	7.4461	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2TB82	PINc domain-containing protein	TAPGGGGGG	629.2769	6.8241	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2TT52	Uncharacterized protein	RRYRREHTA	1243.664	4.2986	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2T5D5	Uncharacterized protein	VVILHLLLI	1031.710	3.1401	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2T6L8	WD40 repeat-like protein	DDEGMGDEED DDDNM	1700.493	1.2281	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7

ตารางที่ 17 แสดงฐานข้อมูลโปรตีนของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด

Leading razor protein	Protein name	Sequence	Mass (Da)	Score	Organism
A0A5C2T6P1	GroES-like protein	LILGGSSS	732.4017	44.611	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A1Q3E4S4	Origin recognition complex subunit 3-like	PQKLILLL	936.6371	29.573	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake mushroom)
A0A1Q3DYL5	V-type proton ATPase subunit H	AKTESLLLN	987.5600	22.74	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake mushroom)
A0A5C2TFW6	F-box domain-containing protein	WGKTIEYLEFRDH LDMA	2210.046	22.435	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2T1G5	HET-domain-containing protein	RAIRYAIL	974.6025	15.439	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2SE75	Uncharacterized protein	ARLLLLLLLLLL	1375.989	14.258	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-6
A0A1Q3E6U6	MFS general substrate transporter	LILLPLKP	905.6313	14.157	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake mushroom)
A0A1Q3E3E5	Amidohydrolase 2	KILLPLLQPLL	1259.858	11.49	<i>Lentinula edodes</i>
A0A1Q3ERZ0	Enoyl-hydratase	IKPLIAAV	823.5531	10.828	<i>Lentinula edodes</i>
A0A5C2U0Z5	Uncharacterized protein	PTPAILML	854.4935	9.7496	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A5C2TQD1	4-O-methyl)-D-glucuronate--lignin esterase, EC 3.1.1.117	HPAKVAAY	855.4602	9.7496	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A1Q3E1U2	Autophagy-	ARLKAKILPLRL	1390.95	7.9109	<i>Lentinula edodes</i>

	related protein 2				(Shiitake mushroom)
A0A5C2T5I3	SUN domain-containing protein	LCLLLTVLVF	1132.693	7.1934	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7
A0A1Q3DW5	Cytochrome p450	AYLLLSLLRRRK	1500.961	6.8532	<i>Lentinula edodes</i> (Shiitake mushroom)
A0A5C2T7Q7	Uncharacterized protein	RLRTL L L L L L FLM	1500.957	6.6893	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7

8. ผลการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์คอลลาจีเนส ด้วยโปรแกรมMolecular docking

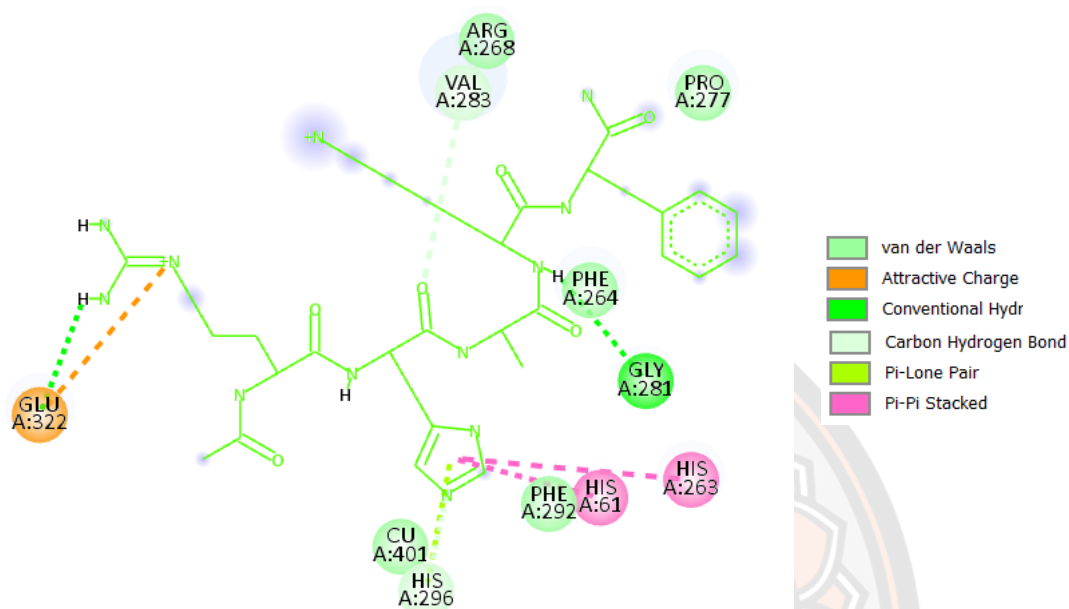
8.1. ผลการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์

1. เปปไทด์ RHAKF จากมะตุ่มจีน

ทำการตัดเปปไทด์ให้สั้น 3-4 กรดอะมิโน : RHAKF, RHA, HAK, AKF, RHAK และ HAKF

จากผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) โดยค่า GOLD fitness score และลิแกนด์ RHAKF (RHAKF, RHA, HAK, AKF, RHAK และ HAKF)

แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ RHAKF มีค่าเท่ากับ 75.24 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกันของสาร (binding energy) ที่ดีที่สุด 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 จะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ RHAKF จับกับ GLU322, HIS29, VAL283 และ GLY281 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจนและจับกับ HIS61 และ HIS263 ด้วย Hydrophobic (Pi-Pi Stacked) (ดังภาพที่ 44 และตารางที่ 18) ซึ่งการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนมีบทบาทสำคัญต่อ binding affinity และอาจมีผลต่อการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Biswas et al., 2017) และการจับกันด้วย Hydrophobic category ระหว่างกรดอะมิโนอาจส่งผลยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เช่นเดียวกัน (Yan-xia Feng et al.,2021)



ภาพที่ 44 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง RHAKE แบบจำลองการจับกันแบบสองมิติ

ตารางที่ 18 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ RHAKE และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

ชื่อลำดับเปปไทด์	Peptide residues	RHAKE-tyrosinase	Interaction type/bond length
RHAKE	R	Arg:N14 - GLU322:OE1	Conventional Hydrogen Bond/5.45
		Arg:H27 - GLU322:OE1	Hydrogen Bond/2.43
	H	His2 - HIS61	Hydrophobic (Pi-Pi Stacked)/4.15
		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	-	-	

2. เปปไทด์ LLLKPVLL จากโปรตีนไฮโดรไลสเทสจากเห็ดขอนขาวแห้ง
ทำการตัดเปปไทด์ให้สั้น 3-4 กรดอะมิโน : LLLK, LLKP, LKPV, KPV, PVLL, LLL, LLK, LKP,
KPV, PVL, และ VLL

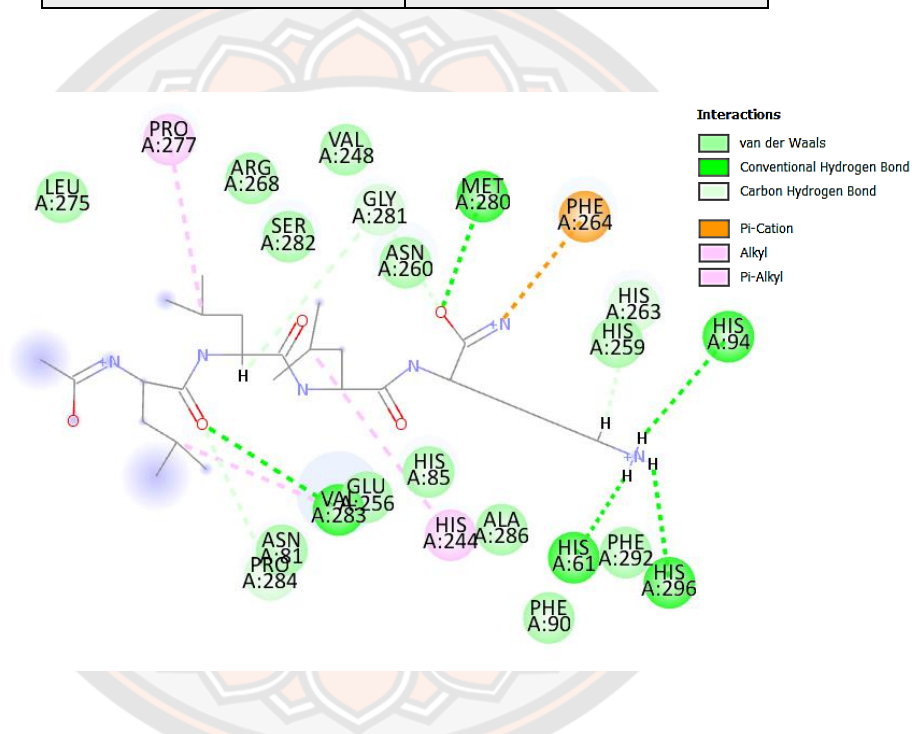
จากผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) โดยค่า GOLD fitness score และลิแกนด์ LLLKPVLL (LLLK, LLKP, LKPV, KPV, PVLL, LLL, LLK, LKP, KPV, PVL และ VLL) แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ LLLK มีเท่ากับ 76.67 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ tyrosinase มี interaction 6 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ van der Waals, conventional hydrogen bond, carbon hydrogen bond, Pi-cation, Alkyl, และ Pi-Alkyl

จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ LLLK จับกับ MET280, VAL283, HIS61, HIS296 และ HIS94 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน และจับกับ HIS224, PRO277, VAL283 ด้วยหมวดหมู่พันธะ Hydrophobic (Alkyl และ Pi-Alkyl) (ดังภาพที่ 45 และตารางที่ 19 และ 20) ซึ่งการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนมีบทบาทสำคัญต่อ binding affinity และอาจมีผลต่อการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Biswas et al., 2017) และการจับกันด้วย Hydrophobic category ระหว่างกรดอะมิโนอาจส่งผลยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เช่นเดียวกัน (Yan-xia Feng et al., 2021)

ตารางที่ 19 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์ (GOLD fitness score)

Ligand name	Fitness score
2Y9X	41.36
KPK	60.31
KPKV	48.64
KVL	52.34
KVLL	51.11
LKP	51.29
LKPK	62.83
LLK	67.20

LLKP	51.63
LLL	57.59
LLLK	76.67
LLLKPKVLL	10.28
PKV	51.50
PKVL	59.73
VLL	55.48



ภาพที่ 45 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง LLLK แบบจำลองการจับกันแบบสองมิติ

ตารางที่ 20 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ LLLK และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

ชื่อลำดับเปปไทด์	Peptide residues	Amino acid interaction	Interaction type/bond length
L1		LEU:O10 – VAL283	Conventional Hydrogen Bond /2.511
		LEU:O10 – PRO284	Carbon Hydrogen Bond/2.832
		LEU:C12 – VAL283	Hydrophobic (Alkyl)/4.429
L2		LEU:H35 – GLY281	Carbon Hydrogen Bond/3.086

LLLK	LEU:C31 – PRO277	Hydrophobic (Alkyl)/4.697
L3	LEU:O67 – MET280	Conventional Hydrogen Bond /2.636
	LEU:C50 – HIS224	Hydrophobic (Pi-Alkyl)/4.599
K	LYS:H83 – HIS94	Conventional Hydrogen Bond /2.679
	LYS:H84 – HIS296	Conventional Hydrogen Bond /2.392
	LYS:H85 – HIS61	Conventional Hydrogen Bond /1.731
	LYS:H86 – PHE264	Pi-cation/2.991

3. เปปไทด์ KLKPLIIP จากโปรตีนไฮโดรไลสเทสจากเห็ดขอนขาวแห้ง
ทำการตัดเปปไทด์ให้สั้น 3-4 กรดอะมิโน : KLKP, LKPL, KPLI, PLII, LIIP, **KLK**, LKP, KPL, PLI, LII, และ IIP

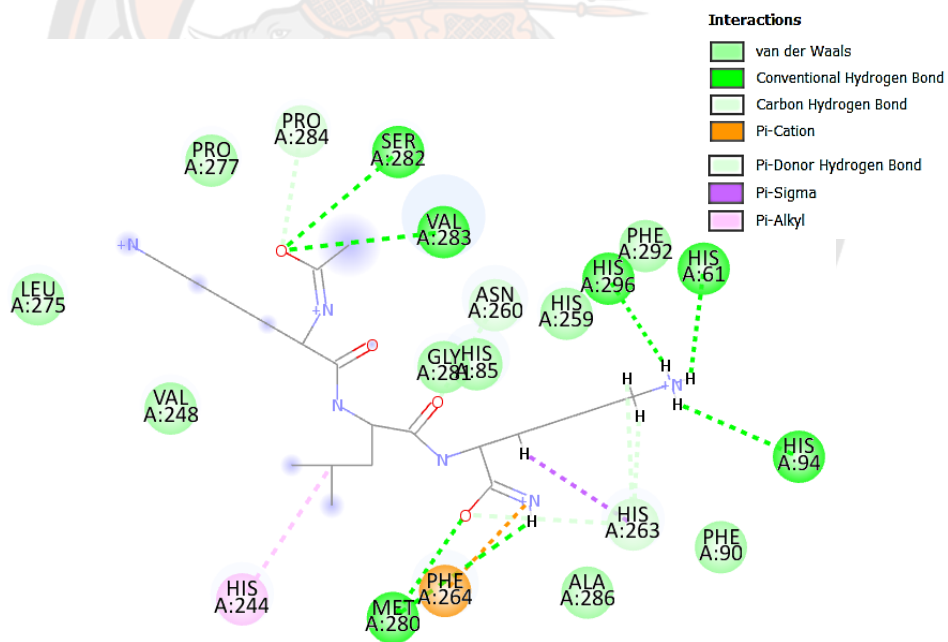
จากผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) โดยค่า GOLD fitness score และลิแกนด์ KLKPLIIP (KLKP, LKPL, KPLI, PLII, LIIP, KLK, LKP, KPL, PLI, LII, และ IIP) แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ KLK มีเท่ากับ 68.25 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ tyrosinase มี interaction 7 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ van der Waals, conventional hydrogen bond, carbon hydrogen bond, Pi-cation, Pi-Sigma, Pi-Donor Hydrogen bond และ Pi-Alkyl

จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ KLK จับกับ SER282, VAL283, HIS61, HIS296, MET280, HIS263 และ HIS94 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน และจับกับ HIS224, HIS263 ด้วยหมวดหมู่พันธะ Hydrophobic (Pi-Alkyl และ Pi-Sigma) (ดังภาพที่ 46 และตารางที่ 21 และ 22) จากการรายงานพบว่าการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนมีบทบาทสำคัญต่อ binding affinity และอาจมีผลต่อการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Biswas et al., 2017) และการจับกันด้วย Hydrophobic category ระหว่างกรดอะมิโนอาจส่งผลยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เช่นเดียวกัน (Yan-xia Feng et al.,2021)

ตารางที่ 21 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์ (GOLD fitness score)

Ligand name	GOLD Fitness score
2Y9X	41.94
IIP	49.36
KLK	68.25

KLKP	61.73
KPL	53.49
KPLI	51.81
LII	55.34
LIIP	45.57
LKP	48.28
LKPL	51.90
PLI	50.45
PLII	58.98
KLKPLIIP	52.20



ภาพที่ 46 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของแอนิเมียมไทโรซิเนส (2Y9X) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง KLK แบบจำลองการจับกันแบบสองมิติ

ตารางที่ 22 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ KLK และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

ชื่อลำดับเปปไทด์	Peptide residues	Amino acid interaction	Interaction type/bond length	
KLK	K1	LYS:O2 – SER282:HG	Conventional Hydrogen Bond /2.431	
		LYS:O2 – VAL283:HN	Conventional Hydrogen Bond /2.189	
		LYS:O2 – PRO284:HD2	Carbon Hydrogen Bond /2.491	
	L	LEU:H71 – MET280:O	Conventional Hydrogen Bond /2.898	
		LEU:O32 – ASN260:HA	Carbon Hydrogen Bond /3.061	
		LEU:C34 – HIS244	Hydrophobic:Pi-Alkyl/4.851	
	KLK	K2	LYS:O51 – MET280:O	Conventional Hydrogen Bond /2.586
			LYS:H67 – HIS296:NE2	Conventional Hydrogen Bond /1.784
			LYS:H68 – HIS61:NE2	Conventional Hydrogen Bond /2.001
LYS:H69 – HIS94:NE2			Conventional Hydrogen Bond /2.794	
LYS:H65 – HIS263:NE2			Carbon Hydrogen Bond /2.352	
LYS:H66 – HIS263:NE2			Carbon Hydrogen Bond /2.663	
LYS:O51 – HIS263			Carbon Hydrogen Bond /3.977	
LYS:H60 – HIS263			Hydrophobic:Pi-Sigma/2.466	

4. เปปไทด์ LILGSSSS จากโปรตีนไฮโดรไลสเทสจากเห็ดขอนขาวสด

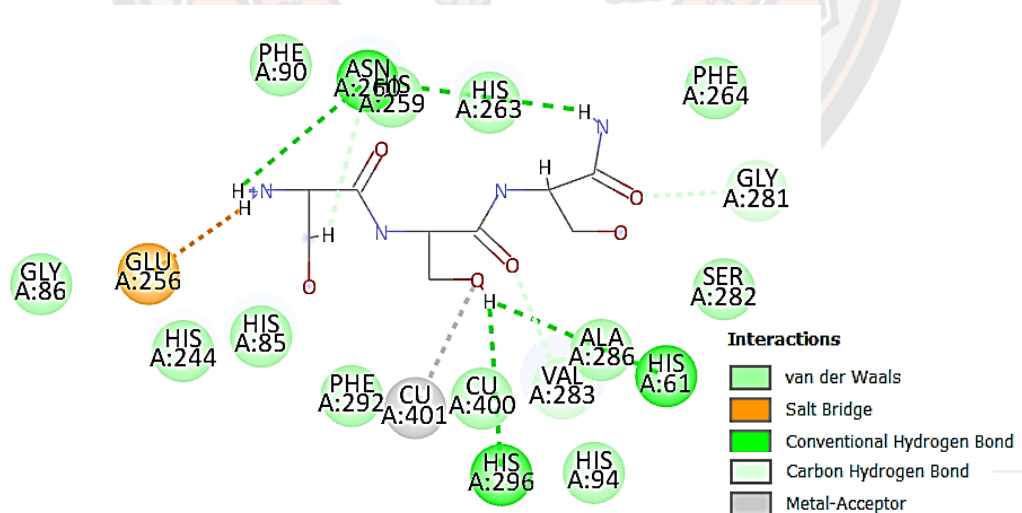
ทำการตัดเปปไทด์ให้สั้น 3-4 กรดอะมิโน : LILG, ILGG, LGGS, GGSS, GSSS, LIL, ILG, LGG, GGS, GSS, SSS

จากผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) โดยค่า GOLD fitness score และลิแกนด์ LILGSSSS (LILG, ILGG, LGGS, GGSS, GSSS, LIL, ILG, LGG, GGS, GSS, และ SSS) แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ SSS มีเท่ากับ 72.70 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ tyrosinase มี interaction 5 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ van der Waals, conventional hydrogen bond, carbon hydrogen bond, Salt-Bridge และ Metal-Acceptor

จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ SSS จับกับ ASN260, HIS296, GLU256, VAL283, MET280 และ HIS61 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน และจับกับ Copper 401 จากการ interaction ด้วย Metal acceptor ซึ่งจากการรายงานพบว่าการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนมีบทบาทสำคัญต่อ binding affinity และอาจมีผลต่อการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Biswas et al., 2017) (ดังภาพที่ 47 และตารางที่ 23 และ 24)

ตารางที่ 23 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์ (GOLD fitness score)

Ligand name	Fitness score
2Y9X	41.54
GGS	58.38
GGSS	71.88
GSS	68.77
GSSS	67.07
ILG	50.21
ILGG	65.19
LGG	54.55
LGGS	65.85
LIL	55.28
LILG	61.07
LILGSSS	72.35
SSS	72.70



ภาพที่ 47 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง SSS แบบจำลองการจับกันแบบสองมิติ

ตารางที่ 24 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ SSS และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

ชื่อลำดับ เปปไทด์	Peptide residues	Amino acid interaction	Interaction type/bond length
SSS	S1	SER:H11 – GLU256:OE2	Hydrogen Bond:(Salt-bridge)/1.734
		SER:H11 – ASN260:OD1	Conventional Hydrogen Bond/1.834
		SER:H8 – ASN260:OD1	Conventional Hydrogen Bond/2.355
	S2	SER:H24 – HIS61:NE2	Conventional Hydrogen Bond/2.829
		SER:H24 – HIS296:NE2	Conventional Hydrogen Bond/2.598
		SER:O17 – VAL283:HA	Conventional Hydrogen Bond/2.149
		SER:O19 – CU401:CU	Metal-acceptor/1.972
	S3	SER:H37 – ASN260:O	Conventional Hydrogen Bond/2.397
		SER:H32 – MET280:O	Conventional Hydrogen Bond/2.693

5. เปปไทด์ ARLLLLLLLLLL จากโปรตีนไฮโดรไลสเททจากเห็ดขอนขาวสด

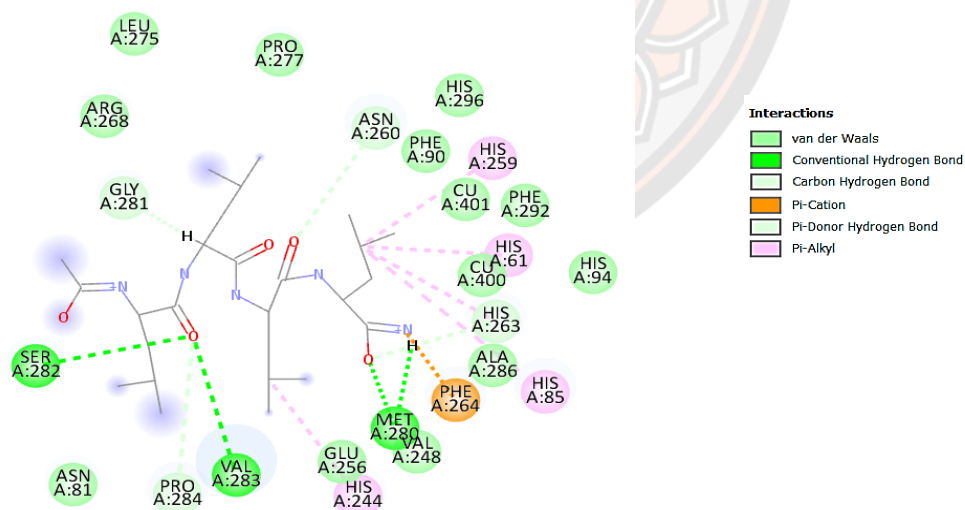
ทำการตัดเปปไทด์ให้สั้น 3-4 กรดอะมิโน : ARIL, RILL, ILLL, LLLL, ARI, RIL, ILL, LLL

จากผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) โดยค่า GOLD fitness score และลิแกนด์ ARLLLLLLLLLL (ARIL, RILL, ILLL, LLLL, ARI, RIL, ILL, และ LLL) แสดงให้เห็นว่า GOLD fitness score ของ LLLL มีเท่ากับ 64.47 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ tyrosinase มี interaction 6 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ van der Waals, conventional hydrogen bond, carbon hydrogen bond, Pi-cation, Pi-Donor Hydrogen bond และ Pi-Alkyl

จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ LLLL จับกับ SER282, VAL283, PRO284, GLY281, ASN260, MET280, และ HIS263 ด้วยปฏิสัมพันธ์พันธะไฮโดรเจน และจับกับ HIS61, HIS85, HIS259, HIS224, และ HIS263 ด้วยหมวดหมู่พันธะ Hydrophobic (Pi-Alkyl) จากการรายงานพบว่าการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนมีบทบาทสำคัญต่อ binding affinity และอาจมีผลต่อการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Biswas et al., 2017) และการจับกันด้วย Hydrophobic category ระหว่างกรดอะมิโนอาจส่งผลยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เช่นเดียวกัน (Yan-xia Feng et al., 2021) (ดังภาพที่ 48 และตารางที่ 25 และ 26)

ตารางที่ 25 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเปปไทด์ (GOLD fitness score)

Ligand name	Fitness score
2Y9X	42.05
ARI	55.06
ARIL	54.03
ARLLLLLLLLLL	0.00
ILL	56.11
ILLL	54.55
LLL	57.08
LLLL	64.47
RIL	57.08
RILL	58.36



ภาพที่ 48 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง LLLL แบบจำลองการจับกันแบบสองมิติ

ตารางที่ 26 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ LLLL และเอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X)

ชื่อลำดับ เปปไทด์	Peptide residues	Amino acid interaction	Interaction type/bond length
LLLL	L1	-	-
	L2	LEU:O10 – SER282:HG	Conventional Hydrogen Bond /2.269
		LEU:O10 – VAL283:HN	Conventional Hydrogen Bond /2.129
		LEU:O10 – SER282:HA	Conventional Hydrogen Bond /3.008
		LEU:O10 – PRO284:HD2	Conventional Hydrogen Bond /2.439
		LEU:H39 – GLY281:O	Conventional Hydrogen Bond /3.070
	L3	LEU:O48 – ASN260:HA	Conventional Hydrogen Bond /2.398
		LEU:C50 – HIS244	Hydrophobic:Pi-Alkyl/4.636
	L4	LEU:O67 – MET280:O	Conventional Hydrogen Bond /2.417
		LEU:H84 – MET280:O	Conventional Hydrogen Bond /1.784
		LEU:N83 – PHE264	Pi-cation/4.910
		LEU:O67 – HIS263	Hydrogen Bond:Pi-Donor/3.057
		LEU:C69 – HIS61	Hydrophobic:Pi-Alkyl/5.297
		LEU:C69 – HIS85	Hydrophobic:Pi-Alkyl/4.843
		LEU:C69 – HIS259	Hydrophobic:Pi-Alkyl/4.227
		LEU:C69 – HIS263	Hydrophobic:Pi-Alkyl/3.673

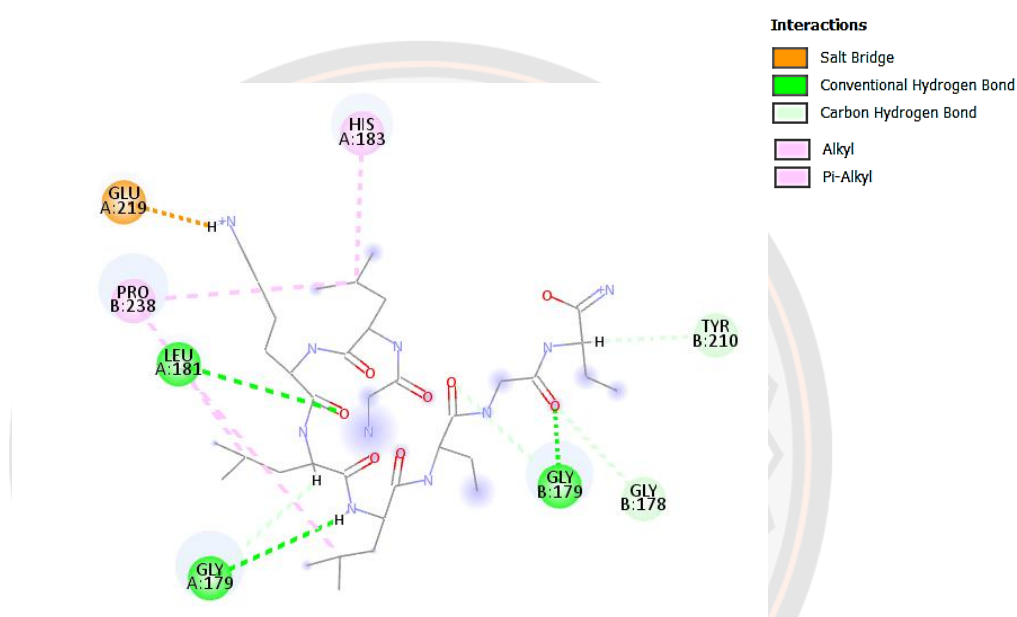
8.2. ผลการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสและเปปไทด์

1. เปปไทด์ LIPLLKLLRVV จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง

ทำการตัดเปปไทด์ให้สั้น 3-4 กรดอะมิโน : LIPL, IPLL, PLLK, LLKL, LKLL, KLLR, LLRV, LRVV, LIP, IPL, PLL, LLK, LKL, KLL, LLR, LRV, RVV, **LIPLLKLLRVV**

จากผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) โดยค่า PLP fitness score สูงสุดที่ 113.14 (GA:20) และลิแกนด์ **LIPLLKLLRVV** (LIPL, IPLL, PLLK, LLKL, LKLL, KLLR, LLRV, LRVV, LIP, IPL, PLL, LLK, LKL, KLL, LLR, LRV, RVV, และ LIPLLKLLRVV (ไม่ได้ทำการ Chop)) แสดงให้เห็นว่า PLP fitness score ของ LIPLLKLLRVV (ไม่ได้ทำการ Chop) มีเท่ากับ 146.10 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ Collagenase มี interaction 5 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ conventional hydrogen bond, carbon hydrogen bond, Salt-Bridge, Alkyl และ Pi-Alkyl

จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ LIPLKLLRVV จับกับ LEU181, GLY178, GLY179, และ TYR210 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน และจับกับ HIS183 และ PRO238 ด้วยหมวดหมู่พันธะ Hydrophobic (Alkyl และ Pi-Alkyl) ซึ่งจากการรายงานพบว่าการจับกันของสารที่แข็งแรงส่งผลให้เกิดการสร้าง contact point ที่บริเวณ active site อาจมีผลเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Hicham M. et al., 2022) (ดังภาพที่ 49 และตารางที่ 27 และ 28)



ภาพที่ 49 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง LIPLKLLRVV แบบจำลองการจับกันแบบสองมิติ

ตารางที่ 27 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสและเปปไทด์ (PLP fitness score)

Ligand name	Fitness score
1CGL	112.74
IPL	73.88
IPLL	81.53
KLL	85.91

KLLR	100.65
LIP	77.56
LIPL	91.78
LIPLLKLLRVV	146.10
LKL	84.55
LKLL	88.61
LLK	89.32
LLKL	85.40
LLR	89.22
LLRV	86.29
LRV	76.84
LRVV	84.54
PLL	78.64
PLLK	95.08
RVV	78.44

ตารางที่ 28 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ LIPLLKLLRVV และเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL)

ชื่อลำดับ เปปไทด์	Peptide residues	Amino acid interaction	Interaction type/bond length
L1	LEU:C63	HIS222	Hydrophobic:Pi-Alkyl/3.716
I	ILE:C83	PRO283	Hydrophobic : Alkyl/4.722
	ILE:C83	HIS183	Hydrophobic:Pi-Alkyl/5.025
P	-	-	-
L2	-	-	-
L3	-	-	-
K	LYS:H116	-	Hydrogen Bond: (Salt-bridge)/2.102

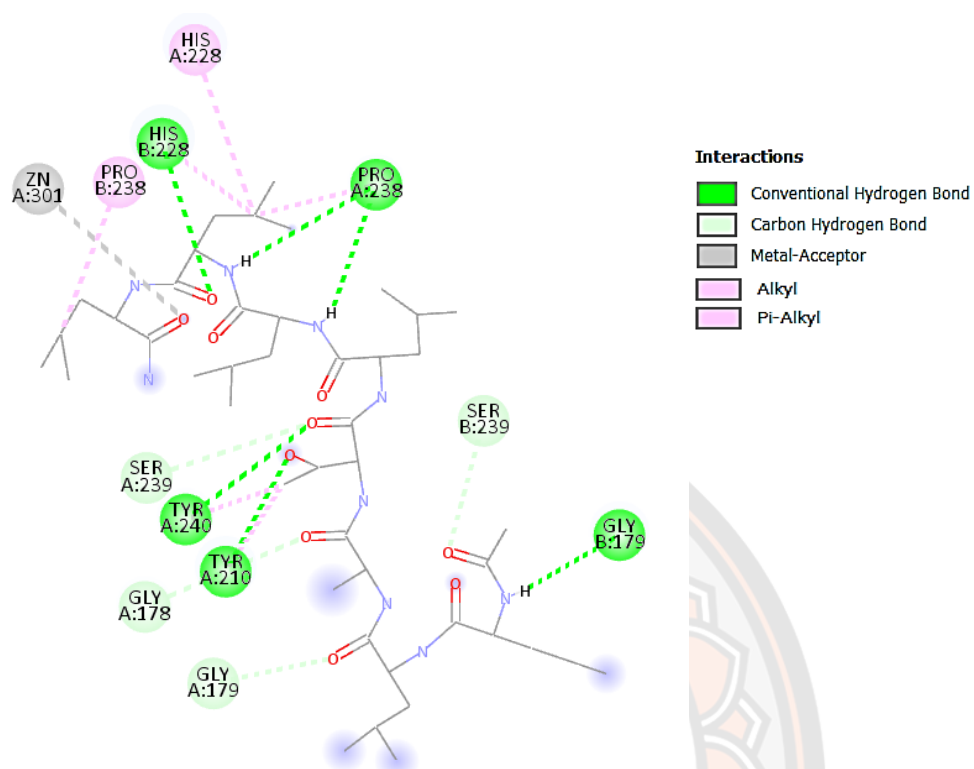
		GLU219:OE2	
LIPLLKLLRVV	L4	LEU:O100 – LEU181:HN	Conventional Hydrogen Bond /2.725
		LEU:O128 – GLY179:O	Conventional Hydrogen Bond /2.914
		LEU:C124 – PRO238	Hydrophobic : Alkyl/4.404
	L5	LEU:H146 – GLY179:O	Conventional Hydrogen Bond /2.706
		LEU:C143 – LEU181	Hydrophobic : Alkyl/4.613
	R	ARG:O160 – GLY179:HA2	Conventional Hydrogen Bond /2.531
	V1	VAL:O184 – GLY179:HN	Conventional Hydrogen Bond /2.057
		VAL:O184 – GLY178:HA2	Conventional Hydrogen Bond /2.921
		V2	VAL:H205 – TYR210:OH

2. เปปไทด์ RLRTL L L L L L FLM จากโปรตีนไฮโดรไลเอสจากเห็ดขอนขาวสด

ทำการตัดเปปไทด์ให้สั้น 3-4 กรดอะมิโน : RLRT, LRTL, RTLL, TLLL, LLLL, LLLF, LLFL, LFLM, RLR, LRT, RTL, TLL, LLL, LLF, LFM, **RLRTL L L L L L FLM**

จากผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) โดยค่า PLP fitness score สูงสุดที่ 113.14 (GA:20) และลิแกนด์ **RLRTL L L L L L FLM** (RLRT, LRTL, RTLL, TLLL, LLLL, LLLF, LLFL, LFLM, RLR, LRT, RTL, TLL, LLL, LLF, LFM, **RLRTL L L L L L FLM** (ไม่ได้ทำการ Chop)) แสดงให้เห็นว่า PLP fitness score ของ LIPLLKLLRVV (ไม่ได้ทำการ Chop) มีเท่ากับ 134.00 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ Collagenase มี interaction 5 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ conventional hydrogen bond, carbon hydrogen bond, Metal acceptor, Alkyl และ Pi-Alkyl

จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ RLRTL L L L L L FLM จับกับ LEU181, GLY178, GLY179, และ TYR210 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน และจับกับ HIS183 และ PRO238 ด้วยหมวดหมู่พันธะ Hydrophobic (Alkyl และ Pi-Alkyl) เกิด interaction กับ Zn301 ด้วย Metal-acceptor ซึ่งจากรายงานพบว่าการจับกันของสารที่แข็งแรงส่งผลให้เกิดการสร้าง contact point ที่บริเวณ active site อาจมีผลเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Hicham M. et al., 2022) (ดังภาพที่ 50 และตารางที่ 29 และ 30)



ภาพที่ 50 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์ คอลลาจีเนส (1CGL) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง RLRTLLLLFLM แบบจำลองการจับกัน แบบสองมิติ

ตารางที่ 29 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสและเปปไทด์ (PLP fitness score)

Ligand name	Fitness score
1CGL	122.65
LLFL	86.80
LLL	84.27
LLLF	88.37
LLLL	90.61
LRT	78.35

LRTL	84.06
RLR	92.97
RLRT	96.44
RTL	83.00
RTLL	98.55
TLL	83.44
TLLL	88.44
FLM	87.26
LFL	95.46
LFLM	93.98
LLF	94.53
RLRTL L L L L L FLM	134.00

ตารางที่ 30 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ RLRTL L L L L L FLM และเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL)

ชื่อลำดับเปปไทด์	Peptide residues	Amino acid interaction	Interaction type/bond length
	R1	-	-
	L1	-	-
	R2	-	-
	T	-	-
	L2	LEU:O129 – HIS228:HE1	Carbon Hydrogen Bond/2.835
		LEU:O148 – ZN:301	Metal-Acceptor/3.125
		LEU:O134 – PRO238:O	Conventional Hydrogen Bond /2.131
		LEU:C150 – PRO238:	Hydrophobic : Alkyl/4.064
RLRTL L L L L L FLM	L3	LEU:C131 – PRO238	Hydrophobic : Alkyl/3.741
		LEU:C131 – HIS228	Hydrophobic : Pi-Alkyl/5.322
	L4	-	-

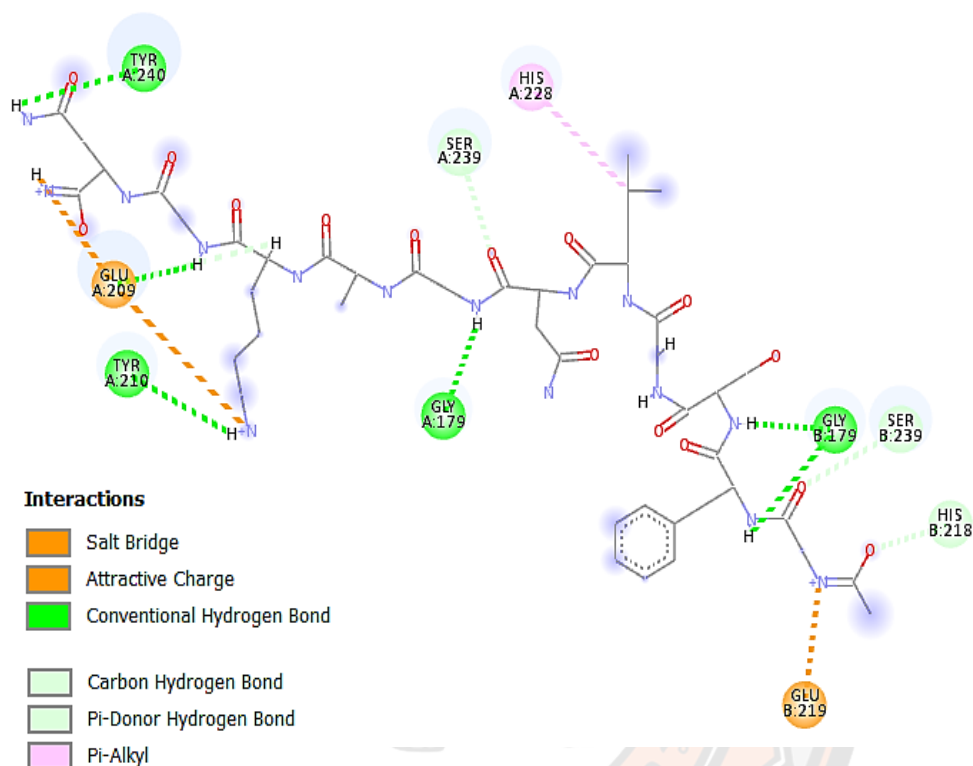
L5	LEU:H115 – PRO238:O	Conventional Hydrogen Bond /2.803
L6	LEU:O53 – GLY178:HA2	Conventional Hydrogen Bond /2.932
F	PHE:O79 – TYR210:HH	Conventional Hydrogen Bond /1.906
	PHE:O77 – TYR240:HD1	Conventional Hydrogen Bond /2.275
	PHE:O77 – SER239:HB2	Conventional Hydrogen Bond /2.678
	PHE:C80 – TYR210	Hydrophobic : Pi-Alkyl/5.178
	PHE:C80 – TYR240	Hydrophobic : Pi-Alkyl/4.673
L7	LEU:O2 – SER239:HB2	Conventional Hydrogen Bond /3.037
	LEU:O34 – GLY179:HA2	Conventional Hydrogen Bond /2.764
M	MET:H30 – GLY179:O	Conventional Hydrogen Bond /1.914

3. เปปไทด์ *GFSGLDGAKGD* จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเปปไทด์สังเคราะห์ (Lu et al., 2017) ทำการตัดเปปไทด์ให้สั้น 3-4 กรดอะมิโน : GFS, FSG, SGL, GLD, LDG, DGA, GAK, AKG, KGD, GFSG, FSGL, SGLD, GLDG, LDGA, DGAK, GAKG, AKGD และ **GFSGLDGAKGD**

จากผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) โดยค่า PLP fitness score สูงสุดที่ 113.14 (GA:20) และลิแกนด์ **GFSGLDGAKGD** (GFS, FSG, SGL, GLD, LDG, DGA, GAK, AKG, KGD, GFSG, FSGL, SGLD, GLDG, LDGA, DGAK, GAKG, AKGD และ GFSGLDGAKGD (ไม่ได้ทำการ Chop)) แสดงให้เห็นว่า PLP fitness score ของ GFSGLDGAKGD (ไม่ได้ทำการ Chop) มีเท่ากับ 103.46 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่ม โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ Collagenase มี interaction 5 ชนิดที่พบจากการจำลอง ได้แก่ conventional hydrogen bond, carbon hydrogen bond, Salt-Bridge, Pi-Donor hydrogen bond และ Pi-Alkyl

จากผลจะเห็นว่าพันธะไฮโดรเจนเป็นปฏิสัมพันธ์หลัก โดยแสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ GFSGLDGAKGD จับกับ GLU209, TYR210, HIS218, SER239, PRO238, GLY179 และ TYR240 ด้วยปฏิกิริยาพันธะไฮโดรเจน และจับกับ HIS228 ด้วยหมวดหมู่พันธะ Hydrophobic (Pi-Alkyl) ซึ่ง

จากการรายงานพบว่าการจับกันของสารที่แข็งแรงส่งผลให้เกิดการสร้าง contact point ที่บริเวณ active site อาจมีผลเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Hicham M. et al., 2022) (ดังภาพที่ 51 และตารางที่ 31 และ 32)



ภาพ 51 แสดงการศึกษา Protein molecular docking หรือการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL) ต่อ Ligand interactions ระหว่าง GFSGLDGAKGD แบบจำลองการจับกันแบบสองมิติ

ตารางที่ 31 แสดงการวิเคราะห์ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสและเปปไทด์ (PLP fitness score)

Ligand name	Fitness score
DGA	78.33
DGAK	87.61
FSG	72.67
FSGL	82.87
GAK	84.21

GAKG	74.85
GFS	86.83
GFSG	73.96
GFSGLDGAKGD	103.46
GLD	73.45
GLDG	74.59
KGD	82.57
LDG	81.02
LDGA	72.57
SGL	72.03
SGLD	94.96
AKG	75.48
AKGD	81.22

ตารางที่ 32 แสดงการ interactions ระหว่างลิแกนด์ GFSGLDGAKGD และเอนไซม์คอลลาจีเนส (1CGL)

ชื่อลำดับ เปปไทด์	Peptide residues	Amino acid interaction	Interaction type/bond length
G1		GLY:H144 – TYR240:O	Conventional Hydrogen Bond/2.0931
F		PHE:H147 – GLU209:OE2	Salt Bridge;Attractive Charge/1.95104
		PHE:N110 – GLU209:OE1	Electrostatic;Attractive Charge/4.69884
		PHE:H128 – GLU209:OE2	Conventional Hydrogen Bond/2.4480
S		SER:H123 – TYR210:OH-	Conventional Hydrogen Bond/2.7707
		SER:H112 – GLU209:OE2	Carbon Hydrogen Bond/2.52896
G2		-	-
L		LEU:O2 – HIS218	Pi-Donor Hydrogen Bond/3.51916

GFSGLDGAAGD	D1	GLU:O10 – SER239:HA	Carbon Hydrogen Bond/2.55879
	G3	-	-
	A	ALA:H49 – PRO238:O	Conventional Hydrogen Bond/2.88796
	K	LEU:H40 – GLY179:O	Conventional Hydrogen Bond/2.71273
	G4	GLY:H25 – GLY179:O	Conventional Hydrogen Bond/3.05677
		GLY:O74 – SER239:HA	Carbon Hydrogen Bond/2.66471
GLY:H51 – PRO238:O		Carbon Hydrogen Bond/2.60922	
D2	GLU:N7 – GLU219:OE2	Electrostatic;Attractive Charge/3.54222	
	GLU:C57 – HIS228	Hydrophobic: Pi-Alkyl/4.34377	

จากการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจากลำดับเปปไทด์ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ผู้วิจัยทำการคัดเลือกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1)

ซึ่งจะได้สายเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสด 3 ลำดับ ได้แก่ ลำดับที่ 1 GroES-like protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LILGGSSS, ลำดับที่ 2 MFS general substrate transporter มีลำดับกรดอะมิโน คือ LILLPLKP และลำดับที่ 3 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ RLRTL L L L L L FLM และสายเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง 3 ลำดับ ได้แก่ ลำดับที่ 4 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LLLKPKVLL, ลำดับที่ 5 PINc domain-containing protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ TAPGGGGGG และลำดับที่ 6 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LIPLKLLRVV

จากการคัดเลือกจากการทำการศึกษาโครงสร้างการจำลองการจับกันแบบ 3 มิติระดับโมเลกุล (Molecular docking) เพื่อแสดงจับกันที่จับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสกับสายลำดับเปปไทด์หรือสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด โดยพบว่าลำดับคัดเลือกที่ 1 GroES-like protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LILGGSSS มีค่า GOLD fitness score ของลำดับเปปไทด์ภายในสายคือลำดับ SSS เท่ากับ 72.70 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่มลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสด และ ลำดับที่ 4 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LLLKPKVLL มีค่า GOLD fitness score ของของลำดับเปปไทด์ภายในสายคือ LLLK มีเท่ากับ 76.67 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่มลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง ซึ่งมีรายงานวิจัยในปี 2007 ได้ทำการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ขึ้นอยู่กับ การจับกับตำแหน่ง active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดย SPOT synthesis เพื่อตรวจสอบดูเปป

ไทด์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยตรง พบว่า เปปไทด์ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic amino acid), กลุ่มมีซั่ว, และไม่มีประจุ ได้แก่ กรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) วาลีน (Valine), และ ลิวซีน (Leucine) เป็นกรดอะมิโนที่มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Marloes Schurink et al., 2007) และรายงานวิจัยในปี 2020 ทำการศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเมล็ดมะตูมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน กล่าวว่าเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำ คือ กรดอะมิโนอะลานีน (Ala) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg) สามารถจับกับคอปเปอร์ที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ อาจส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Yejun Deng et al., 2020) (Maytamart Upata et al., 2022) จากงานวิจัยในปี 2016 ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสจากจากรำข้าว พบกรดอะมิโน Serine(S) สามารถช่วยส่งเสริมการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Ochiai, A et., 2016) โดยสอดคล้องกับเปปไทด์ในลำดับที่ 1 และ 4 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสภายในลำดับสายเปปไทด์คือ ลิวซีน (L), อะลานีน(A), อาร์จินีน(R), เซอร์รีน (S) และวาลีน (V)

และจากผลการทดสอบทางชีวภาพของเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาว พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการคัดเลือกลำดับที่ 2 MFS general substrate transporter มีลำดับกรดอะมิโน คือ LILLPLKP และลำดับที่ 4 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LLLKPKVLL โดยจากการวิเคราะห์ทราบค่า Free-radical scavenging (FRS) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับลำดับอื่นภายในกลุ่มสายลำดับเปปไทด์ เท่ากับ 0.43 และ 0.47 ตามลำดับ

โดยมีรายงานวิจัยในปี 2012 ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสและทำบริสุทธิ์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลไม้ *Zizyphus jujuba* โดยเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์ทริปซินเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กล่าวว่ากรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำภายในลำดับสายเปปไทด์มีบทบาทสำคัญในการส่งผลให้ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง โดยได้แก่ กรดอะมิโน ไทโรซีน (Tyr;Y), ลิวซีน (Lys;K), อาร์จินีน (Arg;R), ไกลซีน (Gly;G), ลิวซีน (Leu;L) และ ฮิสติดีน (His) ทั้งนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโน ฮิสติดีน จะมีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระสูงเนื่องจากมีวงแหวน imidazole (Mina Memarpoor-Yazdi et al., 2012) ซึ่งรายงานวิจัยในปี 2014 ต่อมาทำการศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนไฮโดรไลสจากห้วปลา bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) กล่าวว่าลำดับเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำ ได้แก่ ทริปโตแฟน (Trp) และไอโซลิวซีน (Ile), กรดอะมิโนกลุ่ม acidic amino acid ได้แก่ Asparagine (Asn) และรวมถึง กรดอะมิโน Tyr, His, Pro, Trp และ Met ที่สูงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง (Mina Memarpoor-Yazdi et al., 2014) และรายงานวิจัยในปี 2021 ศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดส้มที่ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน กล่าวว่ากรดอะมิโน

histidine, proline, serine, aspartic acid, และ glutamic acid นี้ เป็นกรดอะมิโนสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Seyadeh Narges Mazloomi et al., 2021)

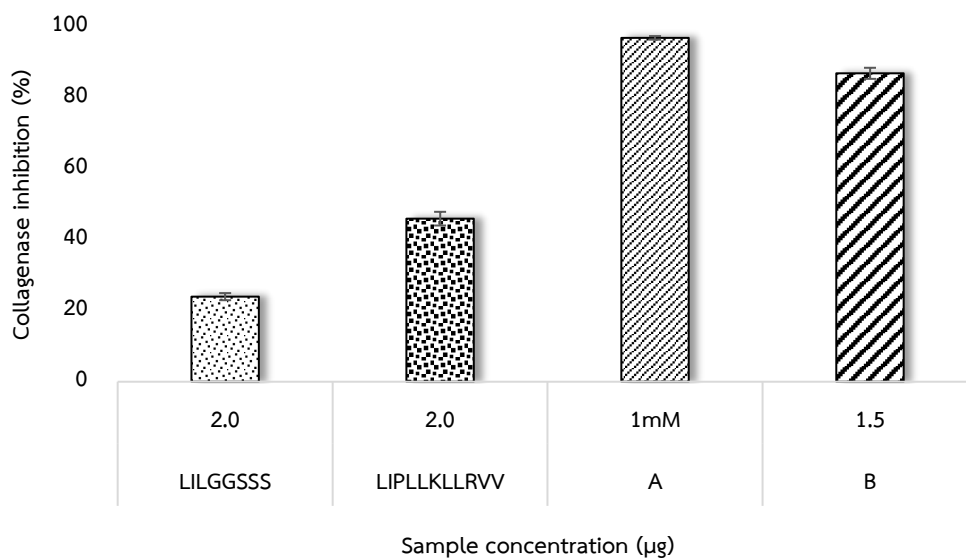
จากลำดับเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน Leucine, Proline, Methionine, Tyrosine, Isoleucine และ Glycine ซึ่งมีผลในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และจากการคัดเลือกจากการทำการศึกษาโครงสร้างการจำลองการจับกันแบบ 3 มิติระดับโมเลกุล (Molecular docking) เพื่อแสดงจับกันที่จับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คอลลาจีเนสกับสายลำดับเปปไทด์หรือสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ได้ลำดับที่ 3 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ RLRTLLLLFLM แสดงให้เห็นค่า PLP fitness score ของ LIPLLKLLRVV มีเท่ากับ 146.10 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่มลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด โดยถูกคาดการณ์ว่าจะจับกับ active site ของ Collagenase และลำดับที่ 6 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LIPLLKLLRVV แสดงให้เห็นค่า PLP fitness score ของ LIPLLKLLRVV มีเท่ากับ 134.00 ซึ่งมีค่าพลังงานจากการจับกัน (binding energy) ที่ดีที่สุดในกลุ่มลำดับเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง

โดยมีงานวิจัยในปี 2016 ศึกษาเจลาตินเปปไทด์จากหนังปลาจากแปซิฟิก เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) กล่าวว่ากรดอะมิโนที่ประกอบด้วย Glycine-Proline หรือ Glycine-Leucine จากลำดับของเปปไทด์สามารถออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Tiejun Chen และ Hu Hou et al., 2016) และงานวิจัยถัดมาในปี 2017 พบว่า ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสหรือ MMP-1 จะส่งผลดีหากกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนกลุ่ม positive charge และ hydrophobicity (Jiaohan Lu, Hu Hou et al., 2017) และรายงานวิจัยในปี 2020 ทำการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสจากผลวอลนัท (walnut protein hydrolysates ; WPH) กล่าวว่า ภายในลำดับสายเปปไทด์หากมีปลาย C-terminal คือ Arginine (R) อาจส่งผลให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 ซึ่งจากผลการทดลองของการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด พบว่าถึงภายในลำดับเปปไทด์ RLRTLLLLFLM ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน Leucine และ Arginine ข้างต้น และลำดับ LIPLLKLLRVV, ถึงแม้กรดอะมิโนจะไม่ได้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับรายงานข้างต้น แต่ยังคงพบกรด อะมิโนดังกล่าวภายในลำดับสายเปปไทด์ ได้แก่ Leucine, Proline และ Arginine เป็นต้น ที่อาจจะสามารถช่วยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) (ดังตารางที่ 33)

ตารางที่ 33 แสดงลำดับเปปไทด์ที่เลือกทำการศึกษา

ตัวอย่าง	หมายเลข	Leading razor	ชื่อโปรตีน	ลำดับกรดอะมิโน	ขนาด (Da)
เห็นชัดเจน	1	A0A5C2T6P1	GroES-like protein	LILGGSSS	732
	2	A0A1Q3E6U6	MFS general substrate transporter	LILLPLKP	906
	3	A0A5C2T7Q7	Uncharacterized protein	RLRTLFLM	1501
เห็นชัดเจน	4	A0A5C2T6F6	Uncharacterized protein	LLLPKVL	1036
	5	A0A5C2TB82	PINc domain-containing protein	TAPGGGGG	629
	6	A0A5C2TAG3	Uncharacterized protein	LIPLKLRV	1276

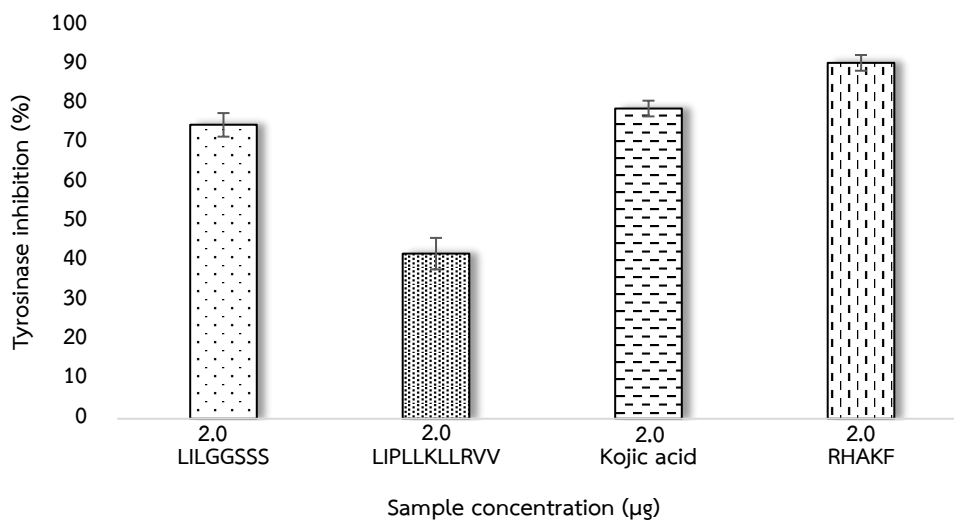
ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเปปไทด์ที่คาดว่าจะสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ได้ดีที่สุด 2 ลำดับ ได้แก่ ลำดับ Leu-Ile-Leu-Gly-Gly-Ser-Ser-Ser (LILGGSSS) และลำดับ Leu-Ile-Pro-Leu-Leu-Lys-Leu-Leu-Arg-Val-Val (LIPLKLRV) มาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส, ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH จากผลการศึกษาพบว่า เปปไทด์สังเคราะห์ลำดับ LILGGSSS ที่ความเข้มข้น 2 μg สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าเปปไทด์สังเคราะห์ลำดับ LIPLKLRV ร้อยละ 75 และ 42 ตามลำดับ และ เปปไทด์สังเคราะห์ลำดับ LILGGSSS ที่ความเข้มข้น 2 μg มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ใกล้เคียงกับ 0.1 μg กรดโคจิก แต่มีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่า 2 μg Peptide synthesis (RHAKF) (ดังภาพ 52 (ข.)) และเปปไทด์สังเคราะห์ลำดับ LIPLKLRV ที่ความเข้มข้น 2 μg สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ได้สูงกว่าลำดับ LILGGSSS เท่ากับ 46 และ 24 ตามลำดับ (ดังภาพ 52 (ก.)) และ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จะมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าวิธี DPPH ซึ่งลำดับเปปไทด์สังเคราะห์ LILGGSSS และ LIPLKLRV ที่ความเข้มข้น 2 μg สามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ร้อยละ 20 และ 13 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ 0.1 μg Trolox สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ร้อยละ 83 ในขณะที่ลำดับเปปไทด์สังเคราะห์ LILGGSSS ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และลำดับเปปไทด์สังเคราะห์ LIPLKLRV สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ร้อยละ 9 เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1 μg Trolox สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ร้อยละ 83



ก. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1)

เมื่อ แทน A คือ 1 mM 1,10-Phenantroline

และ แทน B คือ 1.5 µg เปปไทด์สังเคราะห์ (GFSGLDGAKGD)

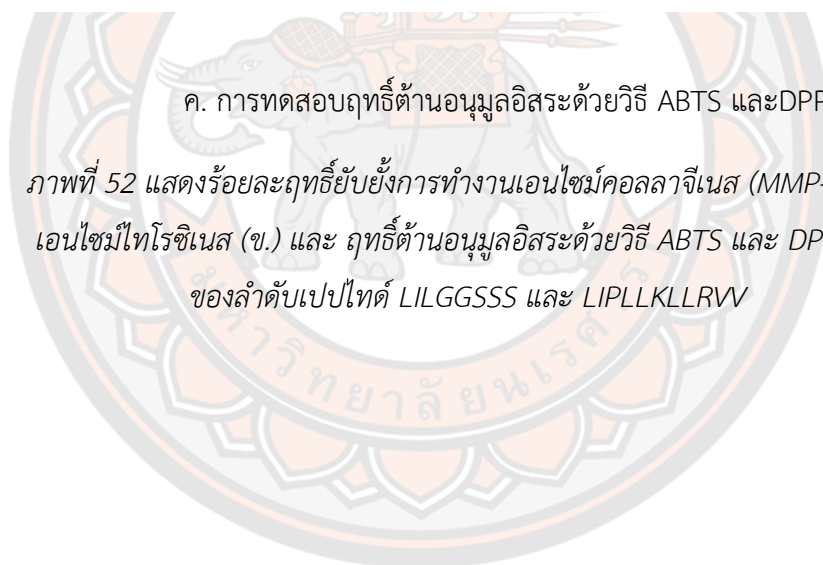
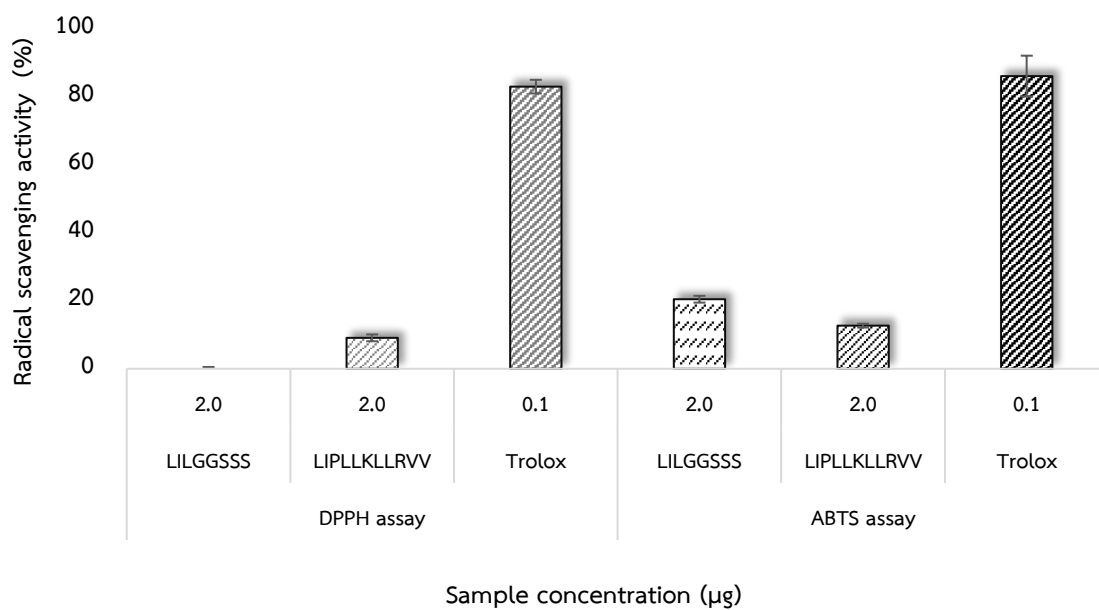


ข. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ภาพที่ 52 แสดงร้อยละฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) (ก.),

เอนไซม์ไทโรซิเนส (ข.) และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH (ค)

ของลำดับเปปไทด์ LILGGSSS และ LIPLLKLLRVV



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารในกลุ่มเปปไทด์จากแหล่งธรรมชาติเป็นโปรตีนขนาดเล็กสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Piyanan C. and Romane S. et al, 2014) และเอนไซม์คอลลาจีเนส และสามารถพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอาหารเสริม เพื่อลดปัญหาการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่มากเกินไป หรือภาวะแก่ชราที่ส่งผลเสียต่อผิวหนัง เนื่องจากปลอดภัยต่อเซลล์และอาจมีผลข้างเคียงน้อย (Ochiai, et al., 2016) โดยการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสเป็นการทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้นๆ โดยใช้กรด-เบสแก่ หรือการใช้เอนไซม์โปรตีเอส ในการย่อยโมเลกุลของโปรตีนให้ได้เป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่นิยมในปัจจุบัน เนื่องจากปลอดภัย ให้เปปไทด์ที่มีโมเลกุลต่ำ (Juanjuan Zhou et al., 2020) และสามารถควบคุมระดับการย่อยสลายของโปรตีนได้ (Zarei, M. และ Ebrahimpour, A. Et al., 2014) โดยการศึกษาท่อนำผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลส จากเห็ดขอนขาวแห้ง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ถูกเตรียมด้วยมิกซ์เอนไซม์ อีกทั้งเอนไซม์เปปซินเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร เปปไทด์ที่ได้จะมีความเสถียร และสามารถดูดซึมได้ดีเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางอาหารเสริม (Juanjuan Zhou et al., 2020) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เอนไซม์เปปซินเป็นโปรตีเอสในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลส ซึ่งการศึกษานี้ได้นำเอนไซม์เปปซินมาทำการย่อยโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งเปรียบเทียบกับเห็ดลมแห้ง พบว่าแหล่งโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งให้สารสกัดเปปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลสที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดลมแห้ง ดังนั้นจึงเลือกแหล่งโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งมาทำการเปรียบเทียบกับเห็ดขอนขาวสด ศึกษาประสิทธิภาพฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลส ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และเอนไซม์คอลลาจีเนส รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH

ซึ่งผลจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและกรดโคจิก ในขณะเดียวกันให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสใกล้เคียงกับเปปไทด์จากมะตูมจีน RHAKF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ซึ่งไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสเสท พบลำดับเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดขอนขาวสด 15 ลำดับ ในขณะที่ลำดับเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดขอนขาวแห้ง 11 ลำดับ ทั้งนี้การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และเอนไซม์คอลลาจีเนส ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน และโครงสร้างของเปปไทด์ภายในลำดับสาย โดยมีรายงานวิจัยในปี 2007 ได้ทำการศึกษากายยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ขึ้นอยู่กับการจับกับตำแหน่ง active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดย SPOT synthesis เพื่อตรวจสอบดูเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยตรง พบว่า เปปไทด์ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำ, กลุ่มมีขี้, และไม่มีประจุ ได้แก่ กรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine, R) หรือฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine, F) ร่วมกับกรดอะมิโนอะลานีน (Alanine, A), วาลีน (Valine, V), และ ลิวซีน (Leucine, L) เป็นกรดอะมิโนที่มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Marloes Schurink et al., 2007) โดยงานวิจัยในปี 2016 ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากรำข้าว พบกรดอะมิโน Serine (S) เป็นกรดอะมิโนในกลุ่มมีขี้หรือชอบน้ำ สามารถช่วยส่งเสริมการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Ochiai, A et., 2016) ทั้งนี้รายงานวิจัยในปี 2020 ทำการศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเมล็ดมะตูมจีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน กล่าวว่าเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำ คือ กรดอะมิโนอะลานีน (Ala) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg) สามารถจับกับคอปเปอร์ที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ อาจส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Yejun Deng et al., 2020) (Maytamart Upata et al., 2022) และรายงานวิจัยในปี 2021 ที่ได้ทำการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสเสทจาก walnut (*Juglans regia* L.) ได้โพลิเปปไทด์ คือ FPY (Phenylalanine-Proline-Tyrosine) ดังนั้นการมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติกที่ปลายสายของเปปไทด์มีผลในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยตำแหน่งปลาย C-terminal คือ ฟี-นิลอะลานีน (F) และตำแหน่ง N-terminal คือ ไทโรซีน (Y) ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรตีนไฮโดร-เสทจากเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เปปซิน ได้แก่ ลำดับ LILGGSSS, PQKLILL, AKTESLLL, WGKTIEYLEFRDHLDMAS, RAIRYAIL, LILLPLKP, KILLPLLQPLL, IKPLIAAV, ARLKAKILPLRL, LLLLLTVLVF, AYLLLSLLRRRK, ARLLLLLLLLL, PTPAILML, และ RLRTLFLM มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสภายในลำดับสายเปปไทด์คือ ลิวซีน (L), อะลานีน (A), อาร์จินีน (R), และวาลีน (V) อีกทั้งลำดับ HPAKVAAY มีกรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติกที่ปลายสายของเปปไทด์มีผลในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยปลาย C-terminal คือ ไทโรซีน (Y) ในขณะเดียวกันแม้ลำดับเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งจะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนข้างต้นภายในสาย

เปปไทด์น้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด แต่พบว่า ลำดับเปป-ไทด์ แต่ละสาย ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ ลำดับ LKPIVKLLL, AMRLVGPL, TAPGGGGG, LSLNPLLEELVIQAKWNYRTNS, KLKPLIIP, LLLKPVLL, VWLHLLLI, RRYRREHTA และ LIPLKLLRVV ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนส ภายในลำดับสายเปปไทด์คือ เซอร์รีน (S), ลิวซีน (L), อะลานีน (A), อาร์จินีน (R), และวาเลีน (V) อีกทั้ง ลำดับ FKGDGMHP มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติกที่ตำแหน่งปลายสาย N-terminal คือ ฟีนอลอะลานีน (F) ซึ่งอาจจะมีผลช่วยในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนส

ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ด ขอนขาวสด ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกสายเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง 2 สาย ได้แก่ LLLKPVLL และ KLKPLIIP ซึ่งเปปไทด์ทั้งสองสายนี้ ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีรายงาน กล่าวว่าการดื้ออะมิโนลิวซีน, ลิวซีน และวาเลีน นี้ มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่ออยู่ภายในสายเปปไทด์จำนวนหลายตำแหน่ง และเมื่อนำไปวิเคราะห์การจำลองการจับกันของ เอนไซม์ไทโรซิเนส (2Y9X) กับสายเปปไทด์ที่คัดเลือก ซึ่งจากการทดลองทำการตัดสายเปปไทด์ให้มี ขนาดเล็กลง 3-4 ลำดับกรดอะมิโน เพื่อให้เกิดการเข้าจับที่จำเพาะได้หลากหลายตำแหน่งมากขึ้น พบว่าลำดับ LLLKPVLL ค่า binding energy ของสายยาวเท่าไร 1035 ซึ่งถูกตัดให้เหลือกรดอะมิโน คือ Leucine-Leucine-Leucine-Lysine (LLLK) มีค่าพลังงานการจับกัน (binding energy) สูงที่สุด เท่ากับ 76.67 ในทางเดียวกันคัดเลือกสายเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด 2 สาย ได้แก่ LILGGSSS และ ARILLLLLLLLL โดยเปปไทด์ทั้งสองสายนี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มี รายงานวิจัยข้างต้น กล่าวคือ เซอร์รีน (S), ลิวซีน (L), อะลานีน (A) และอาร์จินีน (R) เมื่อนำไป วิเคราะห์การจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสกับสายเปปไทด์ที่คัดเลือก ผลการทดลองทำการ ตัดสายเปปไทด์ให้มีขนาดเล็กลง 3-4 ลำดับกรดอะมิโน พบว่า ลำดับ LILGGSSS มีค่าพลังงานการจับ กัน (binding energy) เท่ากับ 72.35 ซึ่งถูกตัดให้เหลือกรดอะมิโน คือ Serine-Serine-Serine (SSS) มีค่าพลังงานการจับกัน (binding energy) สูงที่สุดเท่ากับ 72.70 ในรายงานวิจัยในปี 2020 คุณ Anupong Joompang ได้ทำการศึกษาการดัดแปลงหรือการเปลี่ยนตำแหน่งของกรดอะมิโนภายใน สายเปปไทด์ เพื่อเพิ่มศักยภาพฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าดัดแปลง กรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์สามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และมี ผลการศึกษาการจำลองการจับกันระหว่างเอนไซม์และเปปไทด์พบว่าให้ค่าพลังงานการจับกันที่สูงขึ้น อีกทั้งการดัดแปลงสายเปปไทด์ เมื่อทำการศึกษาการจำลองการจับกันจะทำให้ทราบบริเวณในการเข้า จับหรือมี interaction กับโครงสร้างของเอนไซม์กับสายเปปไทด์ได้ดี (Anupong Joompang et al., 2020)

และจากผลการทดสอบทางชีวภาพของเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจากการทดลองด้วยวิธี ABTS จะแสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งจะให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้ง จะพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ของสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้อาจเกิดจากสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งรายงานวิจัยในปี 2014 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดขอนขาว ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเห็ดขอนขาวมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ gallic acid, tannic acid, catechin, quercetin และ isoquercetin เป็นต้น (Jongrak A. และ Tatsanee P. et al., 2014) และงานวิจัยในปี 2017 ได้

จากการศึกษาสารประกอบทางโภชนาการทางอาหารจากเห็ดขอนขาว พบว่าเห็ดขอนขาวมีสารประกอบฟีนอลิกหลากหลายชนิดเช่นเดียวกัน ได้แก่ Gallic acid, catechin และ kaempferol เป็นต้น ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก กลุ่มที่สามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวโดยวิธีทำการสกัดโปรตีน สามารถพบสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มที่ละลายน้ำได้ดี (Beng Fye Lau et al., 2017) โดยสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่เดียวกันสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสด จะมีวิธีการสกัดโปรตีนและตกตะกอนโปรตีน รวมถึงการนำเกลือออกจากโปรตีนด้วยการทำ dialysis ก่อนนำมาเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสดด้วยเอนไซม์เปปซิน ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิกอาจเกิดการกำจัดออกไป ทำให้ผลการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสดให้ฤทธิ์น้อยกว่าสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้ง ทั้งนี้สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่ความเข้มข้น 2 และ 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูง ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ทั้งนี้มีการวิจัยในปี 2012 ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสและทำบริสุทธิ์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลไม้ *Zizyphus jujuba* โดยเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์ทริปซินเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กล่าวว่าการศึกษาการมีกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำภายในลำดับสายเปปไทด์มีบทบาทสำคัญในการส่งผลให้ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง โดยได้แก่ กรดอะมิโน ไทโรซีน (Y), ไลซีน (K), อาร์จินีน (R), ไกลซีน (G), ลิวซีน (L) และ ฮิสติดีน (H) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโน leucine ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง (Mina Memarpoor-Yazdi et al., 2012) และรายงานวิจัยในปี 2014 ต่อมาทำการศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนไฮโดรไลสจากหัว

ปลา bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) กล่าวว่าลำดับเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและ มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำได้แก่ ทริปโตแฟน (W) และไอโซลิวซีน (I), กรดอะมิโน กลุ่ม acidic amino acid ได้แก่ Asparagine (N) และรวมถึง กรดอะมิโน Tyrosine, Histidine, Proline, Valine, Alanine, Tryptophan และ Methionine ที่สูงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง (Mina Memarpour-Yazdi et al., 2014) ซึ่งการศึกษาวิจัยในปี 2021 ทำการศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดส้มที่ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์ เปปซิน กล่าวว่ากรดอะมิโน Histidine, Proline, Serine, Aspartic acid, และ Glutamic acid นี้ เป็นกรดอะมิโนสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Seyadeh Narges Mazloomi et al., 2021) ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจากสายเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด พบว่าลำดับ LILGGSSS, POKLILL, AKTESLLLN, RAIRYAIL, LILLPLKP, KILLPLLQPLL, IKPLIAAV, ARLKAKILPLRL, LCLLLTVLVF, AYLLLSLLRRRK, ARILLLLLLLLL, PTPAILML, และ RLRTL LLLLFLM จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน Leucine, Proline, Methionine, Tyrosine, Isoleucine และ Glycine ซึ่งมีผลในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งลำดับ HPAKVAAY และ WGKTIEYLEFRDHLDMAS มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน Histidine และ Asparagine ที่มีฤทธิ์แข็งแรงต้านอนุมูลอิสระ ขณะเดียวกันลำดับเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง มีลำดับเปปไทด์ ได้แก่ LKPIVKLLL, AMRLVGPL, TAPGGGGGG, LSLNPLLEELVIQAKWNYRTNS, KLKPLIIP, LLLKPKVLL, และ LIPLLKLLRVV ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ฤทธิ์ดังกล่าว อีกทั้งพบลำดับ RRYRREHTA และ WVILHLLLI ประกอบด้วยกรดอะมิโน Histidine ที่มีฤทธิ์แข็งแรงในการต้านอนุมูลอิสระ โดยจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดด้วยวิธี ABTS จะให้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า วิธี DPPH เนื่องจากวิธี ABTS สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลายที่เป็นสารมีขั้วหรือกลุ่มชอบน้ำได้ดีกว่า วิธี DPPH ที่สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเมทานอลซึ่งเป็นสารไม่มีขั้วหรือกลุ่มไม่ชอบน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กลุ่มของลำดับเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติ hydrophobicity ของลำดับกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่เป็นกลุ่มไม่ชอบน้ำเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้จากการทดลองทั้งสองวิธีสามารถบ่งบอกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดอะมิโนแต่ละกลุ่มที่อยู่ภายในสายเปปไทด์ ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สูงกว่า DPPH อาจเกิดจากกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนในกลุ่มมีขั้วหรือชอบน้ำ เป็นต้น (Mina Memarpour-Yazdi et al., 2014)

นอกจากนี้การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1)

เนื่องจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตยังสามารถทำให้เกิด photo aging หรือริ้วรอยก่อนวัย ซึ่ง reactive oxygen species (ROS) มีบทบาทกระตุ้นการถ่ายทอดสัญญาณ Mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ P13/AKT pathway ในวิถี AKT pathway จะไปปิดการใช้งานการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ และวิถี MAPK จะควบคุมกระตุ้น activator protein-1 (AP-1) และ NF- κ B ในนิวเคลียสให้เกิดการแสดงออกกระตุ้น activator protein-1 (AP-1) ให้สร้าง Matrix metalloproteinase (MMP) เป็นกลุ่มของ extracellular proteinases ซึ่งย่อยสลาย เช่น คอลลาเจน และ elastic fibers ก่อให้เกิดริ้วรอย และการชราของผิว (Jesumani, V., Du, H., Aslam, M., Pei, P., & Huang, N. et al., 2019) โดยจากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) พบว่าสารสกัดหยาบและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส ซึ่งมีรายงานวิจัยในปี 2016 ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) จากสารสกัด *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* และ silymarin ผ่านการสกัดด้วยเอทานอล พบว่าสารประกอบฟีนอลิก catechin และในกลุ่ม flavonoid สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส หรือ matrix metalloproteinases type 1 (MMP-1) ได้ ดังนั้นสารสกัดหยาบจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดอาจจะมีสารประกอบฟีนอลิกข้างต้น จึงสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้เช่นเดียวกัน การศึกษาในปี 2015 ได้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก Mycosporine-like Amino Acids (MMAs) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิจากแหล่งสาหร่ายทะเลสกัดด้วยเมทานอลและทำบริสุทธิ์ ได้แก่ Shinorine, Porphyrin และ Palythine พบว่ามีความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 104.0, 105.9 และ 158.9 ตามลำดับ กล่าวหาว่าสารประกอบซึ่งได้แก่ flavonoids, catechines, และ polyphenols (เช่น resveratrol) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ โดยสารเหล่านี้จะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระจะมีบทบาทในกระบวนการชะลอหรือลดกระบวนการสลายคอลลาเจน (Anja Hartmann et al., 2015) ในขณะเดียวกันสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการเตรียมด้วยเอนไซม์เปปซินจะให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีกว่าสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด โดยมีงานวิจัยในปี 2016 ศึกษาเจลาตินเปปไทด์จากหนังปลาจากแปซิฟิก เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) กล่าวหาว่ากรดอะมิโนที่ประกอบด้วย Glycine-Proline หรือ Glycine-Leucine จากลำดับของเปปไทด์สามารถออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Tiejun Chen และ Hu Hou et al., 2016) และงานวิจัยถัดมาในปี 2017 พบว่าผลการยับยั้ง การทำงานของ เอนไซม์คอลลาจีเนสหรือ MMP-1 จะส่งผลดีหากกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนกลุ่ม positive charge และ hydrophobicity (Jiaohan

Lu, Hu Hou et al., 2017) และรายงานวิจัยในปี 2020 ทำการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสจากผลวอลนัท (walnut protein hydrolysates ; WPH) กล่าวว่า ภายในลำดับสายเปปไทด์หากมีปลาย C-terminal คือ Arginine (R) อาจส่งผลให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ MMP-1 ซึ่งจากผลการทดลองของการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด พบว่าถึงภายในลำดับเปปไทด์ มีลำดับ LILGGSSS, WGKTIEYLEFRDHLDMAS, RAIRYAIL, ARLKAKILPLRL, AYLLLSLLRRRK, ARLLLLLLLLL และ RLRTLLLLFLM ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน Glycine หรือ Arginine ข้างต้น และลำดับ PQLLILL, LILLPLKP, KILLPLLQPLL, IKPLIAAV, PTPAILML, และ HPAKVAAY ที่องค์ประกอบของกรดอะมิโน Proline ในลำดับเปปไทด์ เช่นเดียวกับลำดับเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง พบลำดับกรดอะมิโน LKPIVKLLL, AMRLVGPL, TAPGGGGGG, LSLNPLLEELVIQAKWNYRTNS, KLKPLIIP, LLLKPKVLL, LIPLLKLLRVV, และ RRYRREHTA ถึงแม้กรดอะมิโนจะไม่ได้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับรายงานข้างต้น แต่ยังพบกรดอะมิโนดังกล่าวภายในลำดับสายเปปไทด์ ได้แก่ Glycine, Proline และ Arginine เป็นต้น ที่อาจจะสามารถช่วยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) โดยโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสดและแห้ง ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินที่ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-1 ร้อยละ 90 และ 85 เมื่อนำไปวิเคราะห์การจำลองการจับกันของเอนไซม์คอลลาจีเนสกับสายเปปไทด์ที่คัดเลือกได้แก่ ลำดับ LIPLLKLLRVV จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง และลำดับ RLRTLLLLFLM จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด ผลการทดลอง พบว่า ลำดับ LIPLLKLLRVV จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง มีค่าพลังงานการจับกัน (binding energy) สูงที่สุดเท่ากับ 146.10 ซึ่งมีค่าการจับกันที่สูงกว่าลำดับ RLRTLLLLFLM จากโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด ที่มีค่าพลังงานการจับกัน (binding energy) เท่ากับ 134.00 ในขณะเดียวกันเปปไทด์มาตรฐานคือลำดับ GFSGLDGAKGD ที่มีค่าพลังงานการจับกัน (binding energy) เท่ากับ 103.46 ซึ่งผลจากการทดลองการจับกันของโครงสร้าง 3 มิตินี้ อาจบ่งบอกถึงลักษณะการเข้าจับกันของเอนไซม์และโครงสร้างของสายเปปไทด์แบบจำเพาะเจาะจง ในขณะเดียวกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสจากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสอาจมีรูปแบบการยับยั้งหลายชนิด ดังนั้นทำให้ผลการทดลองใน *In vitro* ไม่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทาง software ที่เป็นการจำลองการจับกันแบบ 3 มิติ เป็นต้น

จากการศึกษาก่อนหน้าในปี 2019 ของนางสาวทตติยา กัญหะษา ได้ทำการวัดระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งผ่านการย่อยด้วยมิกซ์เอนไซม์ และเอนไซม์เปปซิน ที่ช่วงเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด โปรตีนจะมีขนาดเล็กลงและระดับการย่อยสลายที่สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงจะมีระดับการย่อยสลายสูง

ที่สุด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวด้วยเอนไซม์เปปซินที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดหยาบโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดจะพบว่า เมื่อทำย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กกลายเป็นเปปไทด์ จะส่งผลให้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส, คอลลาจีเนส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มากกว่าโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อย โดยโปรตีนที่ได้เมื่อถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะมีขนาดเล็กกว่าปกติเป็นโปรตีนไฮโดรไลสหรือเปปไทด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการศึกษา การผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการย่อยแมงกะพรุน โดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน ซึ่งพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนมากที่สุดเมื่อระยะเวลาในการย่อยมากที่สุด ซึ่งได้กล่าววาระยะเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้นทำให้การย่อยสลายของโปรตีนให้กลายเป็นสายเปปไทด์ขนาดสั้นลง โดยจากผลการทดลองโปรตีนไฮโดรไลสจากแมงกะพรุนจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นตามระดับการย่อยสลาย อันเนื่องมาจากสายเปปไทด์ถูกตัดเพิ่มขึ้นและมีจำนวนสายเปปไทด์ขนาดสั้นมากขึ้น ทำให้ได้เปปไทด์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่อยู่ปลายสายเปปไทด์ ที่มีความสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (Nalinanon et al., 2011) ซึ่งการยับยั้งอนุมูลอิสระจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น โครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนอิสระที่อยู่ภายในลำดับสายเปปไทด์ เป็นต้น (Wu et al., 2003; Jun et al., 2004; Batista et al., 2010) และจากการศึกษาขนาดของเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการคัดเลือกขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 kDa ของโปรตีนไฮโดรไลสซึ่งแสดงโปรไฟล์ของโปรตีนไฮโดรไลสที่มีการแสดงออกในช่วงน้อยกว่า 6.5 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดโปรตีนหยาบที่มีการแสดงออกหลากหลายแถบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งแสดงให้เห็นศักยภาพในการย่อยสลายของเอนไซม์เปปซิน โดยโมเลกุลของเปปไทด์ที่ต่ำอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลาย โปรตีนไฮโดรไลสที่ได้ อุดมไปด้วยเปปไทด์น้ำหนักรวมเลกุลต่ำ ส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนสที่สูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Norman A. et al, 2018) และในงานวิจัยปี 2020 จากการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสจากมะตูมจีน กล่าวว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากมะตูมจีนที่มีเปปไทด์ ขนาดมากกว่า 3, 1-3 และน้อยกว่า 1 kDa พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa จะให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด (Yejun Deng et al., 2020) จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังพบว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสารสกัดโอลิโกเปปไทด์ ในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเทียบกับสารไฮโดรควิโนน (HQ) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเปปไทด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าที่เท่ากัน สารสกัดเปปไทด์มีความสามารถในการลดระดับเมลานินภายในเซลล์เมลานocytes ของมนุษย์ได้ (Felipe Jimenez et al., 2009) และเมื่อนำไปทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า

ณ ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น สารไฮโดรควิโนนมีผลเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นเช่นกันเมื่อเทียบกับสารสารสกัดเปปไทด์โกลีโคเปปไทด์ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลการทดลองการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบ พบว่าดีเอ็นเอมีขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 500-750 bp ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Toshinungla Ao ในปี 2020 ที่ทำการศึกษานาตดีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวด้วย ITS region ซึ่งพบว่ามีขนาดแถบดีเอ็นเอระหว่าง 500-800 bp ใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอจากเห็ดขอนขาวที่ทำการสกัดดีเอ็นเอ (Toshinungla Ao et al., 2020) เมื่อนำไปตรวจสอบลำดับของดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว หรือ เรียกว่า phylogenetic tree นำข้อมูลลำดับเบสมาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI database ในรูปแบบแผนผังต้นไม้ พบว่าตัวอย่างเห็ดขอนขาวแห้งที่ใช้ในการสกัดโปรตีนเพื่อทำโปรตีนไฮโดรไลเสทมีสายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกับ KT273380.1 *Lentinus squarrosulus* voucher WARRIPt 18S ribosomal RNA gene; KR155105.1 *Lentinus* sp BAB-5060 18S ribosomal RNA gene; KT120037.1 *Lentinus squarrosulus* clone 1 18S ribosomal RNA gene partial sequence และ KT273364.1 *Lentinus squarrosulus* voucher IBD43 18S ribosomal RNA gene ซึ่งมีค่าระดับความคล้ายคลึงของสายพันธุ์ที่ร้อยละ 98 และเห็ดขอนขาวสดที่ใช้ในการสกัดโปรตีนเพื่อทำโปรตีนไฮโดรไลเสทมีลำดับสายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกับ MN856299.1:45-689 *Lentinus squarrosulus* strain WZ-159 ซึ่งมีค่าระดับความคล้ายคลึงของสายพันธุ์ที่ร้อยละ 60 ปัจจุบันยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาวที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่พบเป็น สายพันธุ์ประเทศไทย

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเปปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด (*Lentinus squarrosulus* Mont.) ด้วยเอนไซม์เปปซิน โดยเปปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทโดยการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดหยาบโปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อย และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเห็ดขอนขาวสดจะให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงกว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เปปซินจากเห็ดขอนขาวแห้ง และให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงและใกล้เคียงกับ 0.1 μg Kojic acid และ 1.5 μg Peptide synthesis (RHAKF) ตามลำดับ

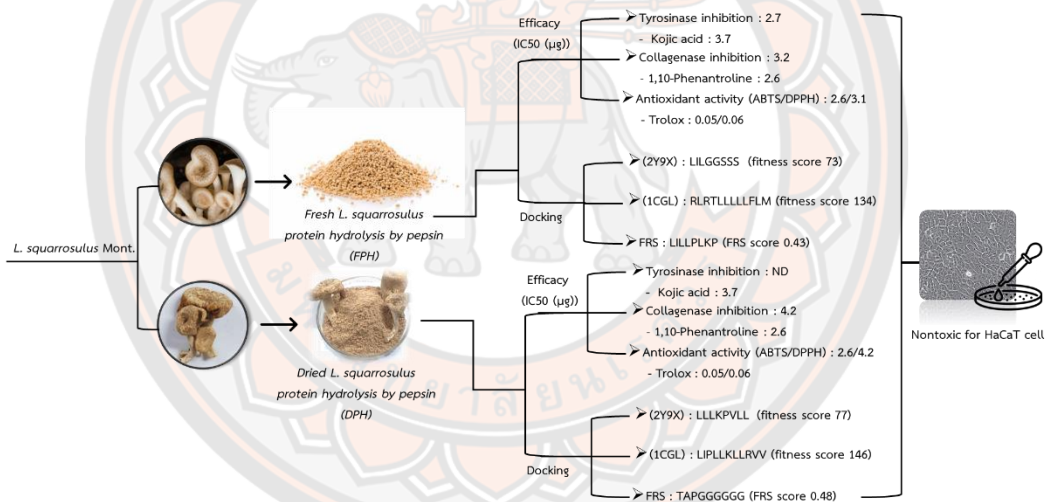
เมื่อทำการศึกษาสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด จะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (MMP-1) ได้มากกว่าสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสดเมื่อเปรียบเทียบที่ความ

เข้มข้นเดียวกัน จะเห็นได้ชัดว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสดที่ผ่านการย่อยด้วย เอนไซม์เปปซิน จนกลายเป็นเปปไทด์สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวสดที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์คอลลาจีเนส โดยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด จะออกฤทธิ์ยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้มากกว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง และมี ศักยภาพออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน 1 mM 1,10-Phenantroline และ เปปไทด์เจลาตินจากหนังปลา (GFSGLDGAKGD)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งจะมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสดที่ความเข้มข้น โปรตีนสูงสุด และสารสกัดโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า สารสกัดหยาบโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในเห็ดขอนขาวสด แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์การต้าน อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเตรียม เปปไทด์โดยการทำให้โปรตีนไฮโดรไลส อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน 0.1 μg Trolox นอกจากนี้สารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอนขาวที่ สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระได้เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสด้วยเอนไซม์เปปซินจนกลายเป็น สารสกัดเปปไทด์จะให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบโปรตีนจากเห็ดขอน ขาวที่ไม่ได้ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จะสูงกว่าวิธี DPPH เนื่องจากผู้วิจัยคาดว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดอะมิโนแต่ละกลุ่มที่อยู่ภายในสายเปปไทด์ อาจเกิด จากกรดอะมิโนภายในสายเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้งและเห็ดขอนขาวสด ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนในกลุ่มมีซิวหรือชอบน้ำจึงส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สูง กว่าวิธี DPPH

เมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนภายในสารสกัดเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จากผลการทดสอบ ฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เอนไซม์คอลลาจีเนสและฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ จะได้ลำดับเปปไทด์ที่น่าสนใจ ซึ่งคัดเลือกจากลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญ และการจำลอง การจับกันแบบ 3 มิติ โดยสายเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวสด 3 ลำดับ ได้แก่ ลำดับที่ 1 GroES-like protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LILGGSSS, ลำดับที่ 2 MFS general substrate transporter มีลำดับกรดอะมิโน คือ LILLPLKP และลำดับที่ 3 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ RLRTLFLM และสายเปปไทด์จากสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจาก เห็ดขอนขาวแห้ง 3 ลำดับ ได้แก่ ลำดับที่ 4 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LLLKPKVLL, ลำดับที่ 5 PINc domain-containing protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ TAPGGGGG และลำดับที่ 6 Uncharacterized protein มีลำดับกรดอะมิโน คือ LIPLKLLRVV

อย่างไรก็ตามสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลสจากดอกเห็ดขอนขาวสดที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในกระเพาะอาหารของมนุษย์ เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสและได้เปปไทด์ขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกทั้งยังไม่พบการรายงานข้อมูล เกี่ยวกับโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวที่สามารถให้ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ทั้งนี้การศึกษาในอนาคตอาจจะมีการศึกษาทดสอบความเป็นพิษต่อในทาง *in vivo* ต่อผิวหนังมนุษย์ เพื่อเกิดประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง ซึ่งเห็ดขอนขาวสดนี้ จึงเป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญและน่าสนใจในการนำมาพัฒนา เพื่อเป็นเปปไทด์โดยวิธีการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสเพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่เห็ดขอนขาวที่เป็นวัตถุดิบที่มีอยู่ในประเทศไทย และสามารถประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเพื่อลดการสังเคราะห์เมลานิน และชะลอความแก่ชรา ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดริ้วรอยแก่ชรา จุดต่างดำ ฝ้า กระ และความหมองคล้ำ รวมถึงเป็นอาหารเสริมหรืออาหารทางเลือกให้แก่ผู้บริโภคมังสวิรัต เป็นต้น



ภาพที่ 53 แสดงแผนภาพรวมการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากเห็ดขอนขาวแห้ง และเห็ดขอนขาวสด



ภาคผนวก

การเตรียมสาร

1. การวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry Assay

- สารละลาย Lowry (A) 500 mL (ซึ่ง 10.6 g Sodium carbonate (2% w/v), 2 g Sodium hydroxide ปรับปริมาตรเป็น 500 mL)
- สารละลาย Lowry (B) 50 mL (ซึ่ง 0.5 g Sodium potassium tartrate ละลายในน้ำกลั่น 10 mL เติม 5 mL 5% Copper Sulfate Pentahydrate; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ โดย 2.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 50 mL)
- สารละลาย Lowry (A+B) 50 mL (สารละลาย A 10 mL ผสมกับสารละลาย B 5 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL)
- สารละลาย Folin-ciocalteu (1:1) 20 mL (สารละลาย Folin-ciocalteu 10 mL เติมน้ำกลั่น 10 mL)

2. Degree of protein hydrolysate: TNBS reagent

- 0.1% (w/w) TNBS reagent 10 mL จาก 1% TNBS (เตรียม 1% TNBS 100 μL เติมน้ำกลั่น 9,900 μL)
- 0.2125 Sodium phosphate buffer pH 8.2 (ซึ่ง NaH_2PO_4 138 g/mol และซึ่ง Na_2HPO_4 142 g/mol)
- 0.1 N Hydrochloric acid; HCL 10 mL จาก 1 N HCL (เตรียม 1 N HCL 1 mL และเติมน้ำกลั่น 9 mL)
- 1% SDS 10 mL เตรียมจาก Stock 10% SDS (ซึ่ง SDS 0.05 g ใน 50 mL)

3. DPPH Assay

- สารละลาย 0.1 mM DPPH 10 mL เตรียมจาก Stock 0.5 mM DPPH (ซึ่ง 4 mg DPPH ละลายใน Methanol 20 mL)
- 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Trolox เตรียมจาก Stock 1 mg/mL (ซึ่ง Trolox 1 mg ละลายในน้ำกลั่น 1 mL)

4. ABTS Assay

- 2.45 mM ABTS: ชั่ง ABTS 0.0384 g ละลายใน 10 mM Potassium persulfate buffer 10 mL
- 10 mM Potassium persulfate buffer

5. PCR

- master mix : Tag DNA polymerase, PCR reactions buffer, dNTPs, Gel loading dyes และ Fluorescence dye

1) Component	volume (μL)	Final conc.	
OnePCR™ Plus	25	1x	
Forward primers (10 μM)	1		
Reverse primers (10 μM)	1		
DNA template	-		
double-distilled water (ddH ₂ O)	-		
2) Process	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time (min)	Cycle
Initial Denaturation	94	5	1
Denaturation	94	0.2 – 0.4	
Annealing	50	1	30
Extension	72		2
Final Extension	72		5

6. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

- 20% SDS 50 mL
- 1 M Tris-HCL (pH 6.8) 100 mL
- 5X Loading dye 15 mL
- Coomassie Blue R-250
- β -mercapto
- Glycerol

7. Electrophoresis & Zymogram

- 30% Acrylamide/bis
- 0.5 M Tris-HCL (pH 6.8)

- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
- 10% SDS
- TEMED
- 10% Ammonium persulphate solution; APS
- 1X Native buffer
- 0.05 M Sodium acetic acid buffer (pH 3.7)

8. Gel Digestion

8.1 Digest Gel

- 50% Methanol; MeOH
- 5% Acetic acid
- 5% Hydrogen peroxide; H₂O₂
- 50 mM Ammonium bicarbonate

8.2 Dehydration

- 100% Acetonitrile; ACN 30 μ L
- 10 mM Dithiothreitol; DTT 30 μ L
- 10 mM Ambric
- 100 mM Iodoacetamide; IAA 30 μ L
- 10 ng/ μ L Trypsin 20 μ L

8.3 Extract gel

- 50% Acetonitrile; ACN 60 μ L
- 0.1% Formic acid

โดยงานวิจัยนี้ทำการทดลองสภาวะการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เวลาในการย่อยด้วย เอนไซม์ และชนิดของเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนจากเห็ดขอนขาว ของนางสาวทัศนีย์ กัณทะษา ในปี 2561

9.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากตัวอย่างสารสกัดโปรตีนจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน และมิกส์ เอนไซม์

ผลการหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน และมิกส์ เอนไซม์ และตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน และมิกส์ เอนไซม์ (ที่ผ่านขั้นตอนการทำ Freeze-Dry และไม่ผ่านขั้นตอนการทำ Freeze-Dry) ด้วยวิธี Bradford (Bradford M. et al.1976) โดยใช้สารละลาย BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน จากผลการทดลอง พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเห็ดขอนขาวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน และมิกส์ เอนไซม์ ณ เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง

ตารางแสดงผลปริมาณโปรตีนทั้งหมด

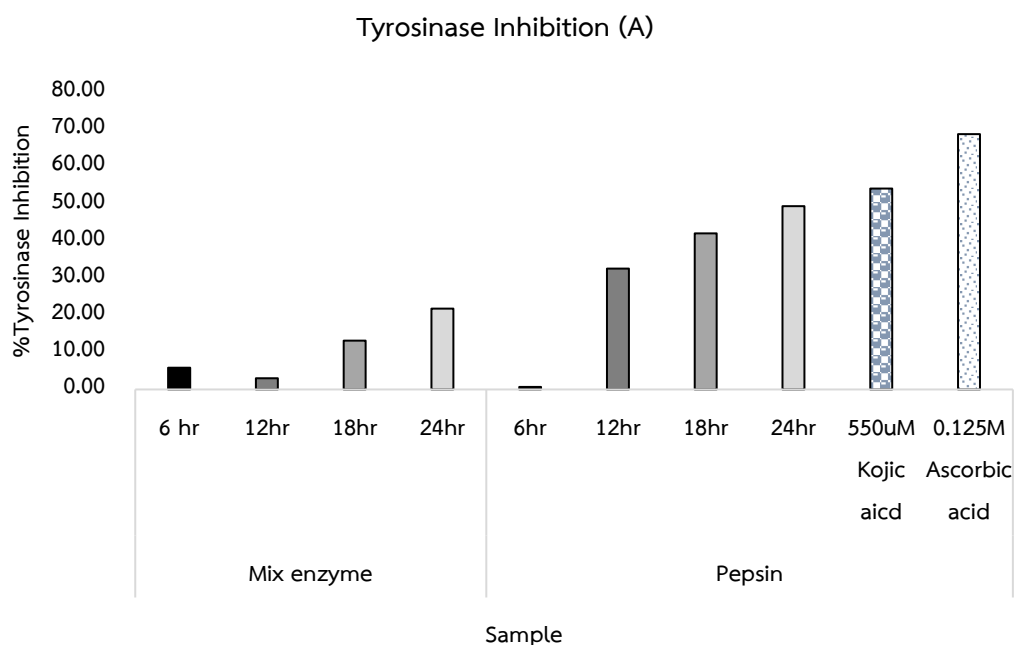
ตัวอย่างสารสกัด	ความเข้มข้นของโปรตีน (มก./มคล.)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก.)
สารสกัดโปรตีนเห็ดขอนขาว	5.292	3175.10
สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซท ย่อยด้วยมิกส์ เอนไซม์	6 ชั่วโมง	3.441
	12 ชั่วโมง	3.558
	18 ชั่วโมง	3.519
	24 ชั่วโมง	3.429
สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซท ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน	6 ชั่วโมง	4.196
	12 ชั่วโมง	3.820
	18 ชั่วโมง	3.482
	24 ชั่วโมง	3.506

(หมายเหตุ ปริมาณโปรตีนทั้งหมดยังไม่ผ่านขั้นตอนในการทำ Freeze-Dry)

9.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

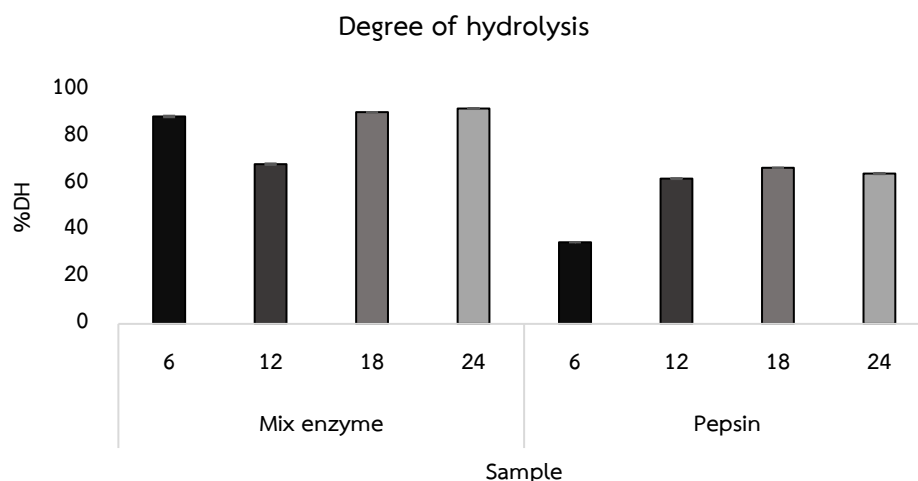
เมื่อนำตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวผ่านการย่อยด้วยมิกส์ เอนไซม์ และเอนไซม์เปปซิน ณ ช่วงเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม

(Control) จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสง ที่เวลา 20 นาที ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด มาคำนวณหาร้อยละฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส



รูปภาพ แสดงร้อยละยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่เวลา 20 นาที ของตัวอย่างสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเห็ดขอนขาวผ่านการย่อยด้วยมิกส์ เอนไซม์ และเอนไซม์เปปซิน (หมายเหตุ A หมายถึง ปริมาณโปรตีนทั้งหมดยังไม่ผ่านขั้นตอนในการทำ Freeze-Dry (เบื้องต้น) 6, 12, 18 และ 24 hr หมายถึง ระยะเวลาที่ทำการไฮโดรไลซิส)

9.3 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS method) (Adler-Nissen, et al. 1979):



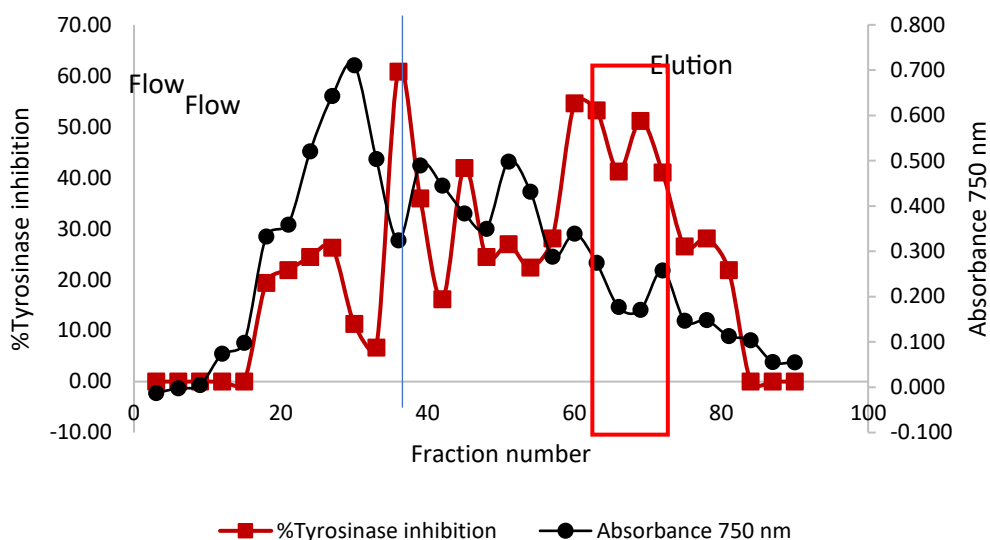
รูปภาพแสดงระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท ด้วยวิธี TNBS (หมายเหตุ ปริมาณโปรตีนทั้งหมดยังไม่ผ่านขั้นตอนในการทำ Freeze-Dry 6, 12, 18 และ 24 hr หมายถึง ระยะเวลาที่ทำการไฮโดรไลซิส)

9.3 ผลการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทบริสุทธิ์บางส่วน

การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารสกัดเปปไทด์บริสุทธิ์บางส่วน

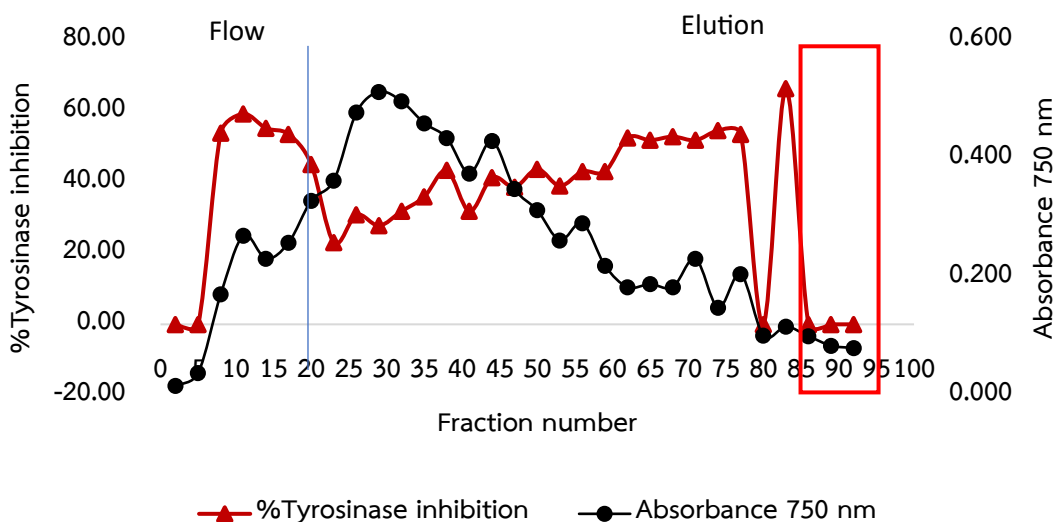
จากทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซท จากตัวอย่างเห็ดขอนขาวผ่านการย่อยด้วยมิกซ์ เอนไซม์ ณ ช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมง และสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ณ ช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด จึงนำสารสกัดมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE-sepharose chromatography) และนำมาวิเคราะห์ผลโดยแสดงด้วยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

L. squarosulus (hydrolysis by Mix enzyme at 18 hr)



รูปภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวผ่านการย่อยด้วยมิกซ์ เอนไซม์ ณ ช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมง

L. squarosulus (hydrolysis by Pepsin at 24 hr)



รูปภาพ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรของสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ณ ช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวผ่านการย่อยด้วย
มิกส์ เอนไซม์ ณ ช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมง Fraction ที่ 54 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุดถึง
ร้อยละ 61 ในขณะที่สารสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากตัวอย่างเห็ดขอนขาวผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป
ปซิน ณ ช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมง มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงถึงร้อยละ 55



บรรณานุกรม

1. Christopher A. Ramsden, Patrick A. Riley a Lennard-Jones Laboratories, School of Physical and Geographical Sciences, Keele University, Staffordshire ST5 5BG, UK
Totteridge Institute for Advanced Studies, the Grange, Grange Avenue, London N20 8AB, UK.
2. Zaidi, K. U., Ali, S. A., & Ali, A. S. (2016). Effect of Purified Mushroom Tyrosinase on Melanin Content and Melanogenic Protein Expression. *Biotechnology research international*, 2016, 9706214.
3. Kamal Uddin Zaidi,¹ Ayesha S. Ali,² and Sharique A. Ali² Molecular Biotechnology Laboratory Centre for Scientific Research & Development, People's University, Bhopal 462010, India ²Department of Biotechnology, Saifia College of Science, Bhopal 462001, India.
4. Zaidi, K. U., Ali, A. S., & Ali, S. A. (2014). Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme research*, 2014, 120739.
5. Zaidi KU., Ali AS, Ali SA, Naaz I. Microbial Tyrosinases: Promising Enzymes for Pharmaceutical, Food Bioprocessing, and Environmental Industry. *Biochemistry Research International* 2014; 1:1-16.
6. 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. doi:10.1186/s13065-016-0184xDong 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.
7. Marloes Schurink a,b,* , Willem J.H. van Berkel a, Harry J. Wichers b, Carmen G. Boeriu b, a Laboratory of Biochemistry, Wageningen University, P.O. Box 9101, 6700 HB Wageningen, The Netherlands b Agrotechnology and Food Sciences Group, Wageningen University, P.O. Box 17, 6700 AA Wageningen, The Netherlands.

8. Panda Banjongsinsi, K. P., Nowwapan Noojuy, Takunrat Taksima & Ubonphan Rodsuwan. (2016). Production of mushroom protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis and their physicochemical properties. *Food and Applied Bioscience Journal*, 4(3), 161-170.
9. Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation, and inactivation. *Bioorganic&MedicinalChemistry*, 22(8), 2388-2395.
10. Ryuji Uchida^{a,b}, Seiko Ishikawa^a, Hiroshi Tomoda^{a,b,n,a} Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Tokyo 108-8641, Japan ^bSchool of Pharmacy, Kitasato University, Tokyo 108-8641, Japan.
11. Sato K, Toriyama M. Depigmenting effect of catechins. *Molecules* 2009; 14(11):4425-32
12. Uchida, R., Ishikawa, S., & Tomoda, H. (2014). Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(2), 141-145. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.12.008>.
13. Zaidi, K. U., Ali, A. S., & Ali, S. A. (2014). Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme research*, 2014, 120739.
14. Zaidi KU., Ali AS, Ali SA, Naaz I. Microbial Tyrosinases: Promising Enzymes for Pharmaceutical, Food Bioprocessing, and Environmental Industry. *Biochemistry Research International* 2014; 1:1-16.
15. Zhong SM, Sun N, Liu HX., Niu YQ, Wu Y. Reduction of facial pigmentation of melasma by topical lignin peroxidase: A novel fast-acting skin-lightening agent. *Experimental and therapeutic medicine* 2015; 9: 341-4.
16. Addar L, Bensouici C, Si Ahmed Zennia S, Boudjenah Haroun S, Mati A. Antioxidant, tyrosinase and urease inhibitory activities of camel α S-casein and its hydrolysate fractions. *Small Ruminant Research*. 2019; 173:30-5.

17. De Avelar Alchorne MM, De Abreu MAMM. 35 - Pigmentary Disorders. In: Tying SK, Lupi O, Hengge UR, editors. *Tropical Dermatology (Second Edition)*: Elsevier; 2017. p. 433-42.
18. De Leon AM1, Guinto LJZG1, De Ramos PDV1, Kalaw SP1,. Enriched cultivation of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer: A newly domesticated wild edible mushroom in the Philippines. 2017.
19. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(9):4066-87.
20. El-Sayed ST, Al- Azzouny RA, Ali OS. Purification and functional characterization of a novel tyrosinase (diphenolase) inhibitory peptides prepared from *Solunum tuberosum* peels protein via enzymatic hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019; 17:331-8.
21. Insain P. Inhibition of Melanogenesis from Thai Berries. 2018.
22. Ismaya WT, Rozeboom HJ, Weijn A, Mes JJ, Fusetti F, Wichers HJ, et al. Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochemistry*. 2011; 50(24):5477-86.
23. Jahanbani R, Ghaffari SM, Salami M, Vahdati K, Sepehri H, Sarvestani NN, et al. Antioxidant and Anticancer Activities of Walnut (*Juglans regia* L.) Protein Hydrolysates Using Different Proteases. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*. 2016; 71(4):402-9.
24. Jongrak ATTARAT1 ATP. *Bioactive Compounds in Three Edible Lentinus Mushrooms*. 2014
25. Kanteev M, Goldfeder M, Fishman A. Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2015; 24(9):1360-9.
26. Lafarga T, Aluko RE, Rai DK, O'Connor P, Hayes M. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an

antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*. 2016; 81:91-9.

27. Malaikaew P. Photocleavage of avidin and streptavidin by a new Pyrenyl probe: Srinakharinwirot University; 2010.

28. Mazorra-Manzano MA, Ramírez-Suarez JC, Yada RY. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018; 58(13):2147-63.

29. Megaw L, Clemens T, Dibben C, Weller R, Stock S. Pregnancy outcome and ultraviolet radiation; A systematic review. *Environmental Research*. 2017; 155:335-43.

30. Mhd Omar NA, Abdullah S, Abdullah N, Kuppusamy UR, Abdulla MA, Sabaratnam V. *Lentinus squarrosulus* (Mont.) mycelium enhanced antioxidant status in rat model. *Drug design, development and therapy*. 2015; 9:5957-64.

31. Ochiai A, Tanaka S, Tanaka T, Taniguchi M. Rice Bran Protein as a Potent Source of Antimelanogenic Peptides with Tyrosinase Inhibitory Activity. *Journal of Natural Products*. 2016; 79(10):2545-51.

32. Rawdkuen S, Rodzi N, Pinijsuwan S. Characterization of sachal inchi protein hydrolysates produced by crude papain and Calotropis proteases. *LWT*. 2018; 98:18-24.

33. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 110:582-93.

34. Saiphruk K. Bivalent peptidic inhibitor: Syntheses and biological activities Thammasat university; 2015.

35. Singh BK, Park SH, Lee H-B, Goo Y-A, Kim HS, Cho SH, et al. Kojic Acid Peptide: A New Compound with Anti-Tyrosinase Potential. *Annals of dermatology*. 2016; 28(5):555-61.

36. Thongthip C. Protein hydrolysate from tilapia and perch frame: Antioxidant and ace - inhibitor properties: *Management (Bio Technology)* 2559.

37. Yamboo1 P, KY, PK, NP, and, Keawsa-ard3 S. Comparison of antioxidant activities and total phenolic contents of leaves, flower, And seed extracts from *Mimusops elengi* Linn.: Payap University; 2018
38. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
39. 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.
40. Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956.
41. 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.
42. Kim, S.-Y., Je, J.-Y., & Kim, S.-K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 31–38.
43. Kubo, I.; Yokokawa, Y. Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*. *Phytochemistry* 1992, 31, 1075-1077
44. Kubo, I.; Yokokawa, Y. Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*. *Phytochemistry* 1992, 31, 1075-1077. (48) Kubo, I.; Yokokawa, Y.; Kinst-Hori, I. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. *J. Nat. Prod.* 1995, 58, 739-743.
45. Kubo, I.; Kinst-Hori, I. Flavonols from Saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4121-4125.
46. Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Ishiguro, K.; Chaudhuri, S. K.; Sanchez, Y.; Ogura, T. Tyrosinase inhibitory flavonoids from *Heterotheca inuloides* and their structural functions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994, 4, 1443-1446.

47. Chen, Q. X.; Kubo, I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4108-4112.
48. Ha, T. J.; Yang, M. S.; Jang, D. S.; Choi, S. U.; Park, K. H. Inhibitory activities of flavanone derivatives isolated from *Sophora flavescens* for melanogenesis. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2001, 22, 97-99. (53) Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 1749-1755
49. Elin Novia Sembiring,: Phytochemical and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb et al.2018
50. Junping Zhuang, Ying Liu, Zhen Wu, Yong Sun, Lu Lin (2009) : HYDROLYSIS OF WHEAT STRAW HEMICELLULOSE AND DETOXIFICATION OF THE HYDROLYSATE FOR XYLITOL PRODUCTION (919) 513-3022,
51. Jens Adler-Nissen (1979) : Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysate by trinitrobenzensulfonic acid :Journal of Agricultural and Food Chemistry 27(6):1256-62
52. Ladda Wattanasiritham a , Chockchai Theerakulkait a, Samanthi Wickramasekara b , Claudia S. Maier b , Jan F. Stevens (2016) : Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein
53. Adom, K., & Liu, R. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182–6187.
54. Chen, H. M., Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidant peptides from soybean b-Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574–578.
55. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidant properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 49–53

56. Pisit Wongsan-Ngasri* Benjawan Thumthanaruk and Wanvisa Youngyai: Production of Bioactive Peptides from Jellyfish Hydrolyzed by Bromelain Enzyme 2017;
57. ภัทรารวรรณ มหาสิงห์, ญัฐฐา เลหากุลจิตต์ และอรพิน เกิดชูชื่น. 2555. ศักยภาพของโปรตีนไอโซเลตข้าวเป็น สารตั้งต้นของสารให้กลีโนรสด้วยกระบวนการให้ความร้อน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 43: 609-612.
58. รัชনীไสย ประจง และ สุรพงษ์ พิณีกลาง. 2555. การยับยั้ง Angiotension I-Converting Enzyme ของเพปไทด์ที่แยกได้จากการใช้เอนไซม์ทริปซินไฮโดรไลซ์โปรตีนสกัดจากถั่ว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. ปีที่ 43(2) (พิเศษ): 545-548.
59. Batista, I, C. Ramos, J. Coutinho, N.M. Bandarr, and M.L. Nunes. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45: 18-24.
60. Nalinanon, S., S. Benjakul, H. Kishimura, and F. Shahidi. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*. 124: 1354-1362.
61. Sakanaka, S., Y. Tachibana, N. Ishihara, and L.R. Juneja. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86: 99- 103.
62. Su, G., J. Ren, B. Yang, C. Cui, and M. Zhao. 2011. Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from *Aspergillus Oryzae* and commercial protease. *Food Chemistry*, 126(3): 1306-1311.
63. Wang, J.S., M.M. Zhao, Q.Z. Zhao and Y. Jiang. 2007. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different systems. *Food Chemistry*. 101: 1658-1663.
64. Wu, H. C., H.M. Chen and C.Y. Shiau. 2003. Free amino acid and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomberau strisicus*) . *Food Research International*, 36: 949-957.

65. Zhou, K, S. Sun and C. Canning. 2012. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Food Chemistry*, 135: 1192-1197
- Praphatsorn Santhi, J. M. a. P. T. (2016). A study of the antioxidant activities and Polyphenoloxidase inhibitory effects of several commercial mushroom trimming extracts and its application on inhibiting melanosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Naresuan University Journal: Science and Technology*, 2(24).
66. Promden, W. (2013). Biochemistry of Bacterial Alcohol Dehydrogenases. *KKU Res. J.*, 6(18), 1003-1020.
67. Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(8), 2388-2395.
68. Saeedi, M., Eslamifar, M., & Khezri, K. (2019). Kojic acid applications in cosmetic and Pharmaceutical preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 582-593.
69. Saghaie L et al. (2013). Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. *Research in pharmaceutical sciences*, 8(4): 233-242.
70. Saiprajong, R. (2009). *Purification and characterization of cysteine proteinase from some vegetables and fruits*. Thai Chamber of Commerce University, 60, 3-9.
71. Sapkota K et al. (2010). *Bulletin- Korean Chemical Society*. 31(5): 1319.

บรรณานุกรม

