



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

ปริญญา

ชีวเคมี

สาขา

ชีวเคมี

ภาควิชา

เรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรียและต้านมะเร็งของโปรตีนสะสมและไฮโดรไลเสท
ของข้าว

Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Activities of Storage Proteins and
Hydrolysates of rice

นามผู้วิจัย นางสาวกนกอร สุวรรณคำรงค์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลทิชา ตันติธาดาพิทักษ์, Ph.D)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนาโก, ปร.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิขสิขิ มทวทยาสยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรียและต้านมะเร็ง
ของโปรตีนสะสมและไฮโดรไลเสทของข้าว

Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Activities
of Storage Proteins and Hydrolysates of rice

โดย

นางสาวกนกอร สุวรรณคำรงค์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2558

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กนกอร สุวรรณคำรงค์ 2558:ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านแบคทีเรียและต้านมะเร็งของ
โพรตีนสะสมและไฮโดรไลเสทของข้าว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) สาขา
ชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลทิชา
ต้นธิดาพิทักษ์, Ph.D. 137 หน้า

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทยและยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ งานวิจัยนี้มี
วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของโพรตีนสะสมในเมล็ดข้าวและไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและเปป
ซิน-ทริปซินที่เตรียมจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวขาวพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการต้านเชื้อ
แบคทีเรียก่อโรค ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการ
เจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 14 สายพันธุ์พบว่าโพรตีนไฮโดรไลเสทจากข้าวสามารถต้านเชื้อ
แบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิดได้ในระดับหนึ่ง แต่เร่งการเจริญของเชื้อได้ 8 ชนิดและไม่ส่งผลใดๆ ต่อ
การเจริญ 2 ชนิด นอกจากนี้โพรตีนกลูเตลินซึ่งเป็นโพรตีนที่พบมากที่สุดและกลูเตลินไฮโดรไล
เสททั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ได้แก่ อนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระไฮดร
ออกซิลและการยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้ดี โดยกลูเตลินไฮโดรไลเสท
ชนิดเปปซิน-ทริปซินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ดีที่สุดเท่ากัน ($IC_{50} = 1.72$ ไมโครกรัม
โพรตีน/มิลลิลิตร) เมื่อใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นโพรตีนเท่ากัน นอกจากนี้ กลูเตลินไฮโดรไล
เสทชนิดเปปซิน-ทริปซินยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII ATCC
No.HTB103) อย่างไรก็ตาม กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินก็สามารถยับยั้งการเจริญ
ของเซลล์ตับปกติ [(Chang), CLS No. 300139] ได้เช่นกัน

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Kanok-orn Suwandumrong 2015: Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Activities of Storage Proteins and Hydrolysates of rice. Master of Science (Biochemistry), Major Field: Biochemistry, Department of Biochemistry. Thesis Advisor: Assistant Professor Chonticha Tantitadapitak, Ph.D. 137 pages.

Rice is a staple food of Thai people and is also an economically important plant of Thailand. This research aimed to study antibacterial activity, antioxidation and anticancer activity of rice storage protein and their protein hydrolysate : pepsin and pepsin-trypsin prepared from rice Khoa Dok Mali 105 and Phitsanulok 2. The result indicated that some rice protein hydrolysates inhibited the growth of 5 strains of pathogenic bacterias to some extent. However, the hydrolysates could promoted 8 strains and did not affected 2 strains of pathogenic bacterias. Glutelin and its hydrolysates possessed antioxidant activity against DPPH[•], OH[•] and linoleic acid autooxidation. Glutelin hydrolysate (pepsin-trypsin) showed the most potent scavenging activity against OH[•] (IC₅₀ = 1.72 ug protein/ml) when compared with glutelin and glutelin hydrolysate (pepsin). In addition, glutelin hydrolysate (pepsin-trypsin) was capable of inhibiting Human Stomach Carcinoma cell line (KATOIII ATCC No.HTB103) but also inhibited Human Liver cell line (Chang), CLS No. 300139.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ชลทิษา ตันติธาดาพิทักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยเป็นไปอย่างราบรื่น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุนันทา รัตนาโก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งคอยสนับสนุนช่วยเหลือ รวมทั้งยังให้ความรู้ต่างๆ ที่เกี่ยวกับงานวิจัยอีกด้วย

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) - สวก. (AGRICULTURAL RESEARCH DEVELOPMENT AGENCY) ที่สนับสนุนทุนวิจัยสำหรับงานวิจัยชิ้นนี้ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ซึ่งได้ให้คำแนะนำและสอนเทคนิคการทำวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งยังอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคให้กับผู้วิจัยเพื่อใช้ในการศึกษาในงานวิจัยชิ้นนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ-ไบโอเทค ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือและชี้แนะแนวทางในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยเป็นไปอย่างราบรื่น รวมทั้งยังอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคและเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ในการวิจัยนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ คุณชาติชาย ไชยชนะจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ-ไบโอเทค ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือและชี้แนะแนวทางแก้ปัญหา ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินต่อไปได้

ขอขอบพระคุณ พี่ๆ น้องๆ ในห้องแลป 7308 ที่คอยให้กำลังใจ ช่วยเหลือและสอนสิ่งต่างๆ เกี่ยวกับการทำงานวิจัยอีกด้วย

ขอขอบพระคุณ คุณแม่ คุณพ่อ น้องสาว ซึ่งได้ให้การสนับสนุนและคอยให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

กนกอร สุวรรณคำรงค์

มีนาคม 2558

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์และสารเคมี	24
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	39
ผล	39
วิจารณ์	89
สรุปและข้อเสนอแนะ	96
สรุป	96
ข้อเสนอแนะ	97
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	98
ภาคผนวก	112
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	137

สารบัญญัตินำ

ตารางที่	หน้า	
1	เปปไทด์ที่ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ	13
2	เปปไทด์ที่ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ	21
3	การตั้งค่าโปรแกรมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับ (RP – HPLC) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์	33
4	แสดงความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้นของอัลบูมิน, โกลบูลิน, กลูเตลินในข้าวขาว, โปรตีนที่ละลายน้ำจากรำพันธุ์พิชญโลก 2 และไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้เมื่อนำตะกอนโปรตีน 2 มิลลิกรัมละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตรซึ่งหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรตในการทดลองที่ 6 และความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย	42
5	แสดงความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของโกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนการย่อยและโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการระเหยแห้งจำนวน 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร	55
6	สรุปผลความสามารถของโกลบูลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินในการยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 11 สายพันธุ์	60
7	แสดงร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (%SE) ของโปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินเปรียบเทียบกับไฮโดรไลเสทของโปรตีนทั้งสองชนิดเมื่อชั่งตะกอนโปรตีนที่ผ่านการระเหยแห้ง 10 มิลลิกรัมในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่

	หน้า
8	
เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวของโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลเสท ชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซิน	81
9	
ทำนายโครงสร้างของเปปไทด์ซึ่งได้จากการย่อยโปรตีนกลูเตลิน ด้วยเปปซิน-ทริปซินซึ่งมีความน่าจะเป็นในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	93

ตารางผนวกที่

1	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและโปรตีนที่ละลายน้ำจากรำพันธุ์ พิษณุโลก 2 (PSL2) และโปรตีนไฮโดรไลเสทของรำแต่ละชนิด	113
2	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับหาความเข้มข้น (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการระเหยแห้งจำนวน 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร	115
3	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับหาความเข้มข้น (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	116

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
4	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีน โกลบูลินและกลูเตลินที่ไม่ผ่านการย่อยจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)	117
5	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีน โกลบูลินและกลูเตลินที่ไม่ผ่านการย่อยจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)	118
6	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของโกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)	119
7	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)	120
8	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)	121
9	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)	122

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
10	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนกลูเตลินรวมถึงไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก) สำหรับซ้ำที่ 1 และ 2	123
11	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนกลูเตลินรวมถึงไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก) สำหรับซ้ำที่ 3	124
12	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทำ serial dilution ครั้งแรก	125
13	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทำ serial dilution แบบที่มีเปปไทด์เล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน	126

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH	6
2 กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH	6
3 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลผ่านปฏิกิริยาเฟนตอน	7
4 กลไกการเข้าทำลายกรดนิวคลีอิกโดยอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลผ่านปฏิกิริยาเฟนตอนซึ่งจำลองในหลอดทดลอง	7
5 ขั้นตอนการเกิดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลและการเกิดลิปิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์	9
6 กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลโดยแอลฟา-โทโคฟีรอล	11
7 แบบจำลองกลไกการยับยั้งแบคทีเรียด้วยเปปไทด์	19
8 รูปแบบโปรตีน (ก) อัลบูมิน (ข) โกลบูลินและ (ค) กลูเตลินที่สกัดในข้าวขาว 16 พันธุ์	40
9 แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Acinetobacter anitratus</i> DMST 4183	44
10 แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19066	47
11 แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 15309	50

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
12	<p>แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิชณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	53
13	<p>แสดงความสามารถในการย่อยโปรตีน โกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเปปซินและเปปซิน – ทริปซิน</p>	56
14	<p>แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633</p>	61
15	<p>แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048</p>	62
16	<p>แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739</p>	63
17	<p>แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>	64
18	<p>แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> O157:H7</p>	65
19	<p>แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus aureus</i> ATCC 25923</p>	66

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
20 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและ กลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	67
21 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและ กลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	68
22 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและ กลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	69
23 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและ กลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	70
24 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและ กลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	71
25 เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ โปรตีนกลูเตลินที่ได้จากการสกัดข้าวขาวดอกมะลิ 105 และกลูเตลิน ไฮโดรไลสชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ	76
26 แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ	76
27 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ของโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลสชนิดเปปซินและเปปซิน- ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ	78

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
28	แสดงร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	78
29	เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของโปรตีนกลูเตลิน, กลูเตลินไฮโดรไลเซตชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินเมื่อใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างเท่ากับ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร	80
30	แสดงร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกของกลูเตลินไฮโดรไลเซตชนิดเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่วันที่ 2 – 5 ของการบ่มปฏิบัติการ	82
31	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเซตชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร	84
32	แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลินไฮโดรไลเซตชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรรวมถึงเปปซิน-ทริปซินทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด	86
33	แสดงความสามารถของกลูเตลินไฮโดรไลเซตชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรรวมถึงเปปซิน-ทริปซินและเปปซิน-ทริปซินซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตันในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang)	88
34	ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกลูเตลินในเอ็นโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว	90

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและโปรตีนที่ละลายน้ำจากรำพันธุ์พิชญ โลก 2 (PSL2) และโปรตีนไฮโดรไลเสทของรำแต่ละชนิด	113
2 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับหาความเข้มข้น (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการระเหยแห้งจำนวน 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร	115
3 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สำหรับหาความเข้มข้น (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	116
4 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีน โกลบูลินและกลูเตลินที่ไม่ผ่านการย่อยจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)	117
5 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีน โกลบูลินและกลูเตลินที่ไม่ผ่านการย่อยจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)	118

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
6 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของโกลบูลินและกลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)	119
7 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)	120
8 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)	121
9 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)	122
10 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนกลูเตลินรวมถึงไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกซ้ำที่ 1 และ 2)	123

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
11 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนกลูเตลินรวมถึงไฮโดรไลสเทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ 3)	124
12 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทำ serial dilution ครั้งที่ 1	125
13 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทำ serial dilution แบบที่มีเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน	126
14 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	127
15 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	128
16 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	129
17 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	130

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
<p>18 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลินและกลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 และ 150 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร</p>	131
<p>19 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร รวมถึงเปปซิน-ทริปซินทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด</p>	132
<p>20 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร รวมถึงเปปซิน-ทริปซินที่ใช้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด</p>	133
<p>21 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร รวมถึงเปปซิน-ทริปซินที่ใช้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด</p>	134
<p>22 แสดงความสามารถของกลูเตลิน ไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร รวมถึงเปปซิน-ทริปซินและเปปซิน-ทริปซินซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang)</p>	135

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

- 23 แสดงความสามารถของกลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรรวมถึงเปปซิน-ทริปซินและเปปซิน-ทริปซินซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตันในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang)

136

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรียและต้านมะเร็ง ของโปรตีนสะสมและไฮโดรไลเสทของข้าว

Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Activities of Storage Proteins and Hydrolysates of rice

คำนำ

อาหารที่คนเราบริโภคในชีวิตประจำวัน เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมันล้วนแล้วแต่ให้คุณประโยชน์แตกต่างกันไปตามชนิดของชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่ง เพราะนอกจากจะมีความสามารถในการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกายแล้วยังมีฤทธิ์อื่นๆ อาทิ กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนบางชนิด (McGregor and, Poppitt *et al.*, 2014) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น สภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระซึ่งมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species, ROS) และสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย สภาวะเหล่านี้จะสร้างความเสียหายแก่เซลล์ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ (Preza *et al.*, 2010) อาหารที่คนเราบริโภคในชีวิตประจำวันมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดได้แก่ วิตามินต่างๆ เช่นวิตามินซี วิตามินอี และสารในกลุ่มเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนในอาหาร เปปไทด์ที่มีรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้แก่ เปปไทด์จากน้ำนม (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2007) และเปปไทด์จากเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อาทิ ถั่วหัวช้าง (Li *et al.*, 2008) ข้าว (Zhang *et al.*, 2010) ข้าวบาร์เลย์ (Bamdad *et al.*, 2011) เรพซิด (Zhang *et al.*, 2008) เป็นต้น ซึ่งในเมล็ดพืชมีโปรตีนหลักอยู่ 4 ประเภท แบ่งตามความสามารถในการละลายได้ในตัวทำละลายต่างชนิด ได้แก่ อัลบูมิน (โปรตีนที่ละลายในน้ำ) โกลบูลิน (โปรตีนที่ละลายในน้ำเกลือ) กลูเตลิน (โปรตีนที่ละลายในกรด/ด่าง) และ โปรลามิน (โปรตีนที่ละลายในแอลกอฮอล์) โดยโกลบูลินและกลูเตลินเป็นโปรตีนหลักในเมล็ดข้าวคิดเป็นประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามลำดับ (Ju *et al.*, 2001) ในปัจจุบันมีรายงานฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนในเมล็ดพืช อาทิ โปรตีนกลูเตลินจากเมล็ดกระเจี๊ยบ (Tounkara *et al.*, 2013) โปรตีนกลูเตลินจากข้าวบาร์เลย์ (Xia *et al.*, 2012) และ

โปรตีนฮอรัคินซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม โปโรลามิน (Giese *et al.*, 1983) จากข้าวบาร์เลย์ (Bamdad *et al.*, 2011) เป็นต้น

โรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ ส่วนหนึ่งมาจากเชื้อแบคทีเรีย (pathogenic bacteria) บางชนิด ก่อให้เกิดโรคร้ายแรง และมักคือต่อยาปฏิชีวนะ การค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ จึงมีความสำคัญ ในปัจจุบันมีรายงานถึงเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด อาทิ เปปไทด์ซึ่งได้จาก แกรนูล (granule) ซึ่งถูกแยกออกจากไขแดงของไขไก่ ซึ่งมีรายงานว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการ เจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่ม Bacillus (Zambrowicz *et al.*, 2012) นอกจากนี้ โปรตีนจากสัตว์ เช่น โปรตีน RNase7 จากผิวหนังมนุษย์ (Harder and Schroder, 2002) และ โปรตีนที่ได้จากพืช เช่น ไบหม่อน (Manjula and Shubha, 2011) เมล็ดลิ้น (Mohammad H.H.T. *et al.*, 2014) โอคา (Flores *et al.*, 2002) ใบตำลึง (Satheesh and Murugan, 2011) ก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ แบคทีเรียและเชื้อราบางชนิด

มะเร็งเป็นโรคที่ทำให้ประชากรเสียชีวิตเป็นจำนวนมาก และยังไม่มียารักษาให้หายขาด อีกทั้ง ผู้ป่วยต้องทนทุกข์ทรมานจากวิธีการรักษาในปัจจุบัน เช่น การฉายรังสีหรือการทำเคมีบำบัด ปัจจุบันมีรายงานถึงเปปไทด์ที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน อาทิ เปปไทด์ซึ่งได้จากการย่อย โปรตีนจากรำข้าวสามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ [human colon cancer cell lines (HCT-116)] และเซลล์มะเร็งเต้านม [breast cancer cell lines (HTB-26)] (Kannan *et al.*, 2009) โปรตีนจากมันเทศสามารถยับยั้งการแบ่งตัวและการรุกรานของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก (human colorectal cancer SW480 cells) (Li *et al.*, 2013) เป็นต้น

จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โรคมะเร็งรวมถึงสารอนุมูลอิสระยังคง เป็นปัญหาที่ทำให้ประชากรต้องทนทุกข์ทรมานและเสียชีวิต ถึงแม้ว่าจะมีการค้นพบยาในการ รักษาโรคมะเร็งและโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้ว แต่ก็ยังเกิดปัญหาเรื่องเชื้อดื้อยาหรือไม่ สามารถรักษาให้หายขาดได้ ในปัจจุบันมีรายงานถึงเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ด้าน เชื้อแบคทีเรียก่อโรคและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเปปไทด์เหล่านี้ก็นำไปใช้ พัฒนาเป็นยารักษาโรคชนิดใหม่ หรือใช้เป็นอาหารสุขภาพได้ งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ของ โปรตีนและเปปไทด์จากข้าวซึ่งเป็นอาหารหลักของคนไทยโดยจำลองสภาวะในทางเดินอาหาร ผล

การศึกษาที่ได้ นอกจากจะเป็นประโยชน์ในทางเวชศาสตร์แล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ข้าว ซึ่งเป็น
พืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยอีกด้วย



วัตถุประสงค์

ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาฤทธิ์ของโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลิน โปรตีนที่ละลายน้ำจากรำและโปรตีนไฮโดรไลเสทซึ่งได้จากการย่อยโปรตีนแต่ละชนิดด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซินในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A.anitratus* DMST 4183, *A.baumannii* ATCC 19066, *A.lwoffii* ATCC 15309, *S.aureus* ATCC 25923 และฤทธิ์ของโกลบูลินและกลูเทลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *B.subtilis* ATCC 6633, *E.aerogenes* ATCC 13048, *E.coli* ATCC 8739, *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* O157:H7, *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 6538, *S.aureus* ATCC 6538P, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *S.epidermidis* ATCC 12228
2. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนโกลบูลิน กลูเทลินและโปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ของกลูเทลินและกลูเทลินไฮโดรไลเสททั้ง 2 ชนิดในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรคลิโนเลอิก
3. ศึกษาฤทธิ์ของกลูเทลินและไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Human Stomach Carcinoma cell line ; KATOIII ATCC No.HTB103) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ [Human Liver cell line (Chang), CLS No. 300139]

การตรวจเอกสาร

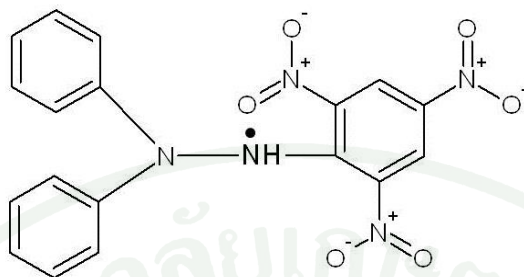
ในปัจจุบัน เชื้อแบคทีเรียและ โรคมะเร็งรวมถึงอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นยังคงเป็นปัญหาด้านสุขภาพของประชากรบน โลก จึงมีความพยายามมากมายในการค้นคว้าหาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาที่ผลิตจากวัตถุดิบที่มาจากธรรมชาติ ในปัจจุบันมีรายงานการวิจัยถึงเปปไทด์และ โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ แบคทีเรียก่อโรคและ มะเร็งอยู่มากมาย จึงอาจเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอีกทางหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยที่ต้องทนทุกข์ทรมานจากโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนและเปปไทด์

สภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) สร้างความเสียหายแก่เซลล์ และอาจนำไปสู่การเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ (Preza *et al.*, 2010) อนุมูลอิสระที่มักเกิดขึ้นในร่างกาย ได้แก่

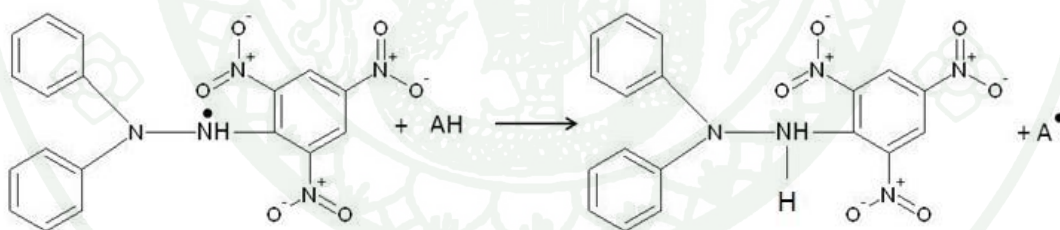
1. อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion radical)
2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)
3. อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical)
4. อนุมูลอิสระของกรดไขมัน (lipid peroxidation)
5. ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide)

สารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดมาจากการย่อยโปรตีนจากอาหารที่คนเราบริโภคในชีวิตประจำวันด้วยเอนไซม์ต่างๆ จนได้เปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเบื้องต้นนิยมใช้อนุมูลอิสระ DPPH ในการตรวจสอบฤทธิ์เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็ว โดยอนุมูลอิสระ DPPH มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 1 โดยดัดแปลงมาจากภาพของ (Li *et al.*, 2012)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH

กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เกิดขึ้นโดยสารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ (hydrogen donor) (Bamdad *et al.*, 2011) ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH กลายเป็น DPPH ที่มีโครงสร้างเสถียร ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยมาจากการตัดแปลงภาพของ (Li *et al.*, 2012)



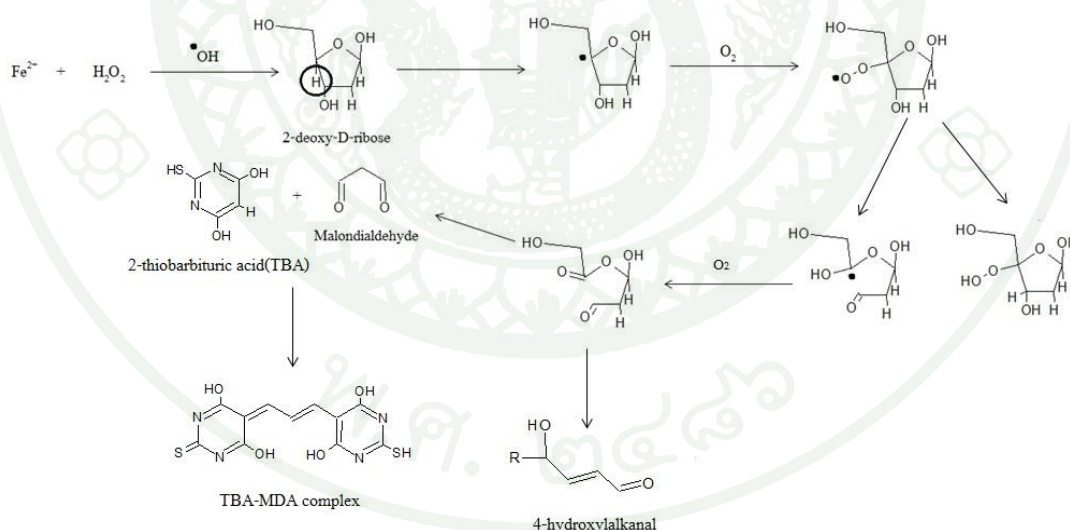
ภาพที่ 2 กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

นอกจากอนุมูลอิสระ DPPH แล้ว อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลก็เป็นอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายโดยอนุมูลอิสระชนิดนี้เกิดขึ้นจากการรั่วไหลของอิเล็กตรอนในระบบขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) ในไมโทคอนเดรียไปยังโมเลกุลของออกซิเจน ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Cadenas and Davies, 2000) ซึ่งอนุมูลอิสระชนิดนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และน้ำโดยเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และคะตะเลส (catalase) ตามลำดับ (Jena, 2012) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บางโมเลกุลที่ไม่ได้ถูก

เปลี่ยนเป็นน้ำและทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ เช่น Fe^{2+} เกิดเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล เรียกปฏิกิริยานี้ว่าปฏิกิริยาเฟนตอน (Fenton reaction) (Bektasoglu *et al.*, 2006) ดังแสดงในภาพที่ 3 ปฏิกิริยานี้สร้างความเสียหายต่างๆ แก่เซลล์ เช่น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเข้าทำลายดีเอ็นเอโดยเบสไพมีนจะถูกอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 6 ในขณะที่เบสกวานีนจะถูกอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และตำแหน่งที่ 8 ตามลำดับ (Cadet *et al.*, 1999) นอกจากนี้ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสามารถเข้าทำลายโปรตีนโดยเปลี่ยนกรดอะมิโนทริปโตฟานให้กลายเป็นไบโทโรซินไบฟีนอล (bityrosine biphenol) ทำให้โปรตีนตกตะกอน (Davies, 1987;Guptasarma *et al.*, 1992) กลไกการเข้าทำลายกรดนิวคลีอิกโดยอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลผ่านปฏิกิริยาเฟนตอนซึ่งจำลองในหลอดทดลองเป็นดังภาพที่ 4 โดยมาจากการตัดแปลงภาพของ (Cadet *et al.*, 1999;Cheeseman *et al.*, 1988)



ภาพที่ 3 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลผ่านปฏิกิริยาเฟนตอน



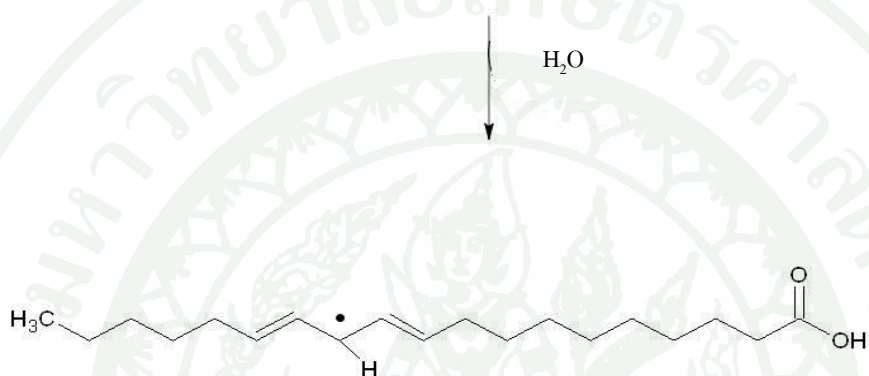
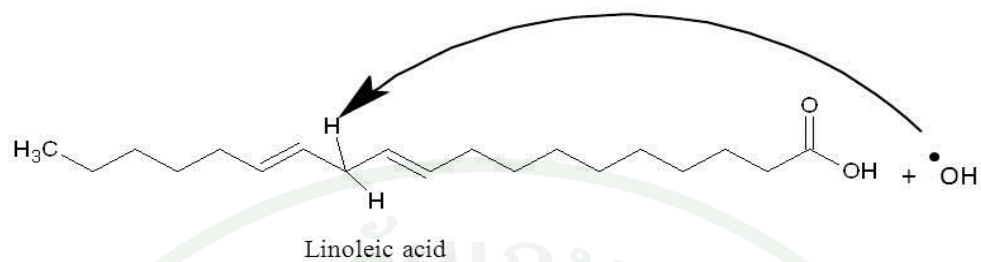
ภาพที่ 4 กลไกการเข้าทำลายกรดนิวคลีอิกโดยอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลผ่านปฏิกิริยาเฟนตอนซึ่งจำลองในหลอดทดลอง

การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันหรือออกซิเดชันของกรดไขมันก็เป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการนี้จะทำให้คุณลักษณะของอาหารเปลี่ยนแปลง (Zhang *et al.*, 2010) การเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันเกิดจากการที่อนุมูลอิสระดิงอะตอมของไฮโดรเจนที่หุ้มเมทิลีนของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Rajapakse *et al.*, 2005) (หรืออาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากปัจจัยอื่น เช่น ความร้อน แสง) (Halvorsen and Blomhoff, 2011) ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในกรดไขมันนั้น เมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงเกิดเป็นอนุมูลอิสระลิปิดเปอร์ออกซิล (lipid peroxy radical) ซึ่งขั้นตอนในการเกิดอนุมูลอิสระลิปิดเปอร์ออกซิลแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน (Vaca *et al.*, 1988) ได้แก่

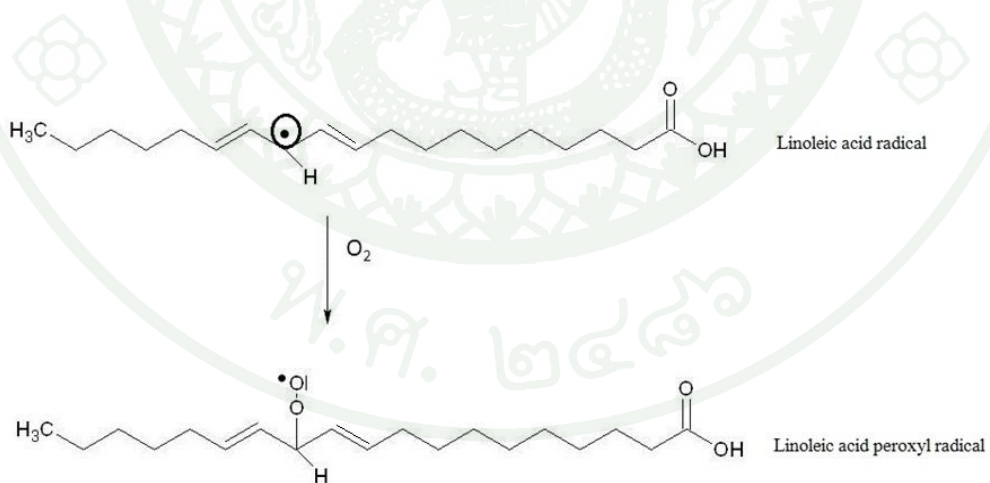
1. ขั้นเริ่มต้น (Initiation)
2. ขั้นการแพร่กระจาย (Propagation)
3. ขั้นสุดท้าย (Termination)

ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยตัดแปลงรูปภาพจาก (Uchida *et al.*, 1999) โดยอนุมูลอิสระเปอร์ลิปิดออกซิล (lipid peroxy radical) ที่เกิดขึ้นจะทำการดึงไฮโดรเจนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวโมเลกุลอื่นๆ ส่งผลให้เกิดลิปิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (lipid hydroperoxide) (Kehrer, 2000) และอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลจำนวนมากมาส่งผลให้ไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (Folden *et al.*, 2003)

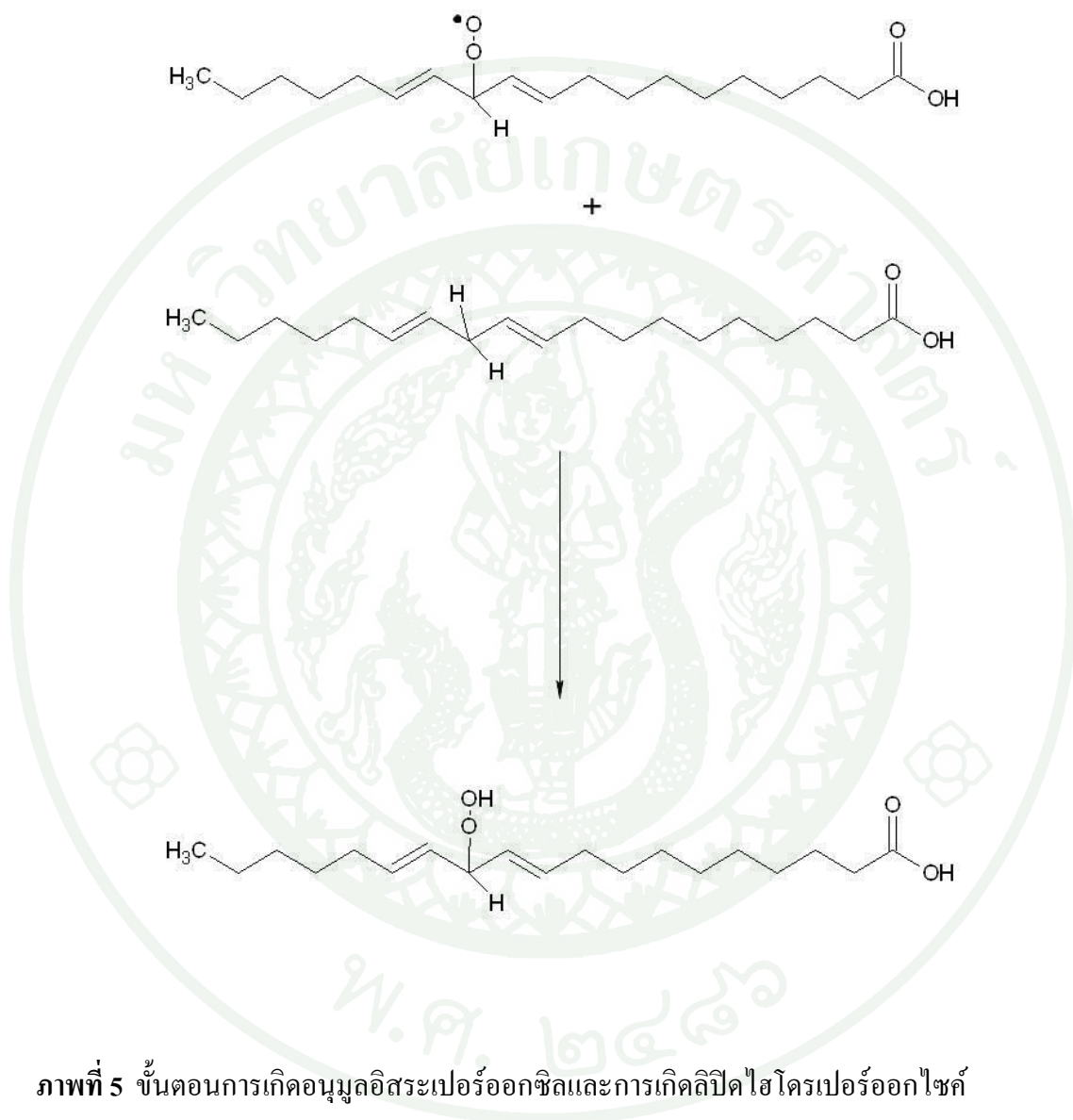
1. ขั้นเริ่มต้น (Initiation)



2. ขั้นการแพร่กระจาย (Propagation)

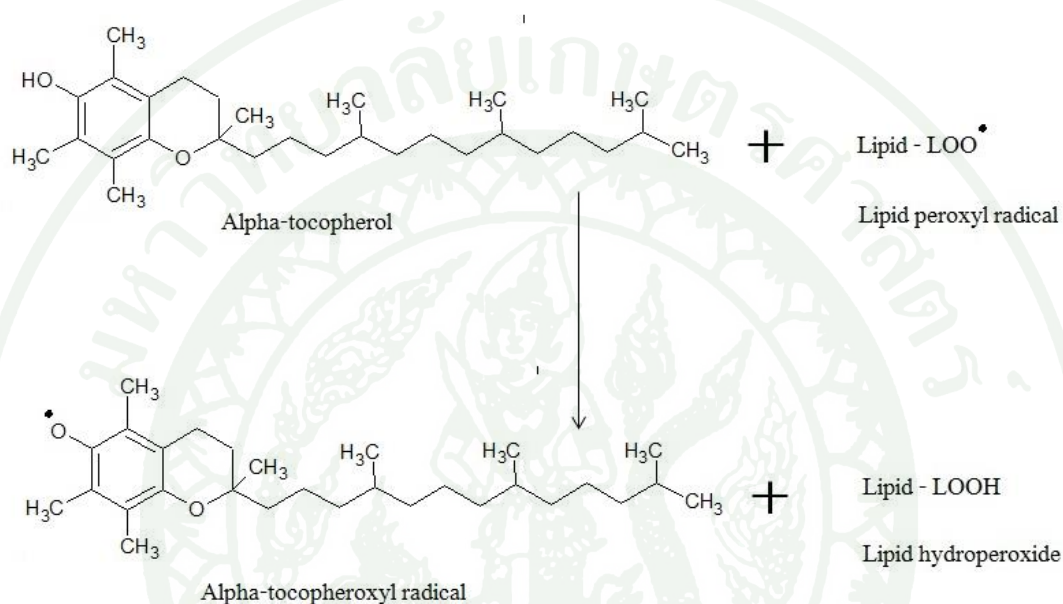


3. ขั้นสุดท้าย (Termination)



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการเกิดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลและการเกิดลิปิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์

สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น แอลฟา-โทโคฟีรอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด อาทิ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมัน (Min and Ahn, 2005) อนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล เป็นต้น โดยกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระของแอลฟา-โทโคฟีรอลเกิดขึ้นโดยอะตอมไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนวงเบนซีนจะถูกถ่ายโอนให้กับอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลดังแสดงให้เห็นดังภาพที่ 6 โดยคัดแปลงภาพจาก (Engin, 2009)



ภาพที่ 6 กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล โดยแอลฟา-โทโคฟีรอล

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะมีคุณสมบัติเป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้สามารถต้านทานการเกิดออกซิเดชันของธาตุเหล็กโดยเปลี่ยนจากเฟอร์ริกเป็นเฟอร์รัส (Ferreira *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008) นอกจากนี้ กรดอะมิโนทริปโตเฟน ไทโรซีน กรดอะมิโนที่ไม่มีซัลเฟอร์และลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ก็มีสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน (Chen *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2005)

ในปัจจุบัน การค้นหาสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเป็นที่นิยมมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากการใช้สารต้านอนุมูลอิสระแบบสังเคราะห์ เช่น BHA (butylhydroxyanisole) และ BHT (butylhydroxytoluene) ที่ความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลานานจะทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย (Kahl

and Kappus, 1993) เปปไทด์จึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่น่าทำการศึกษาค้นคว้าอีกอย่างหนึ่ง ซึ่งจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เปปไทด์ที่มีความสามารถในการจับไอออนของโลหะเหล็ก (Fe^{2+}) มีแนวโน้มที่จะทำให้อัตราการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลลดน้อยลงด้วย เนื่องจาก Fe^{2+} เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยาเฟนตอน (Fenton reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Rajapakse *et al.*, 2005) นอกจากนี้ ลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ก็มีส่วนสำคัญต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Chen *et al.*, 1996) เนื่องจากเมื่อนำกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมาทำการทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเท่ากันพบว่า กรดอะมิโนอิสระไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Chen *et al.*, 1995) น้ำหนักโมเลกุลก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Li *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009) จากผลการวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่าเปปไทด์จำนวนมากที่ได้จากการย่อยโปรตีนทั้งจากพืชและจากสัตว์ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปปไทด์ที่ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ

ชนิดของโปรตีน	กรดอะมิโน	ฤทธิ์ในการ ต้านอนุมูลอิสระ	โปรตีนเอสที่ใช้	แหล่งอ้างอิง
น้ำนมมนุษย์	1. HLPLP	Trolox Equivalent	เปปซิน –	(Hernandez-
	2. WSVQPK	Antioxidant Capacity (TEAC)	แพนกรีติน	Ledesma <i>et</i> <i>al.</i> , 2007)
egg yolk by- product (YP)	-	DPPH [•]	ทริปซิน	(Zambrowic
			ไคโมทริปซิน	<i>z et al.</i> , 2012)
(FBS) ก้าง กระดูก หนังปลาจากปลา ทรายแดง	-	ABTS (2,2'-azinobis (3-ethyl- benzothiazoline-6- sulphonate) และออกซิเดชันของ ธาตุเหล็ก (ferric reducing power activity)	เปปซิน	(Wiriyaphan
			<i>Virgibacillus</i> sp. SK3	<i>et al.</i> , 2012)
refinery discharge (RD) จากปลาทรายแดง	-	ABTS (2,2'-azinobis (3-ethyl- benzothiazoline-6- sulphonate) และออกซิเดชันของ ธาตุเหล็ก (ferric reducing power activity)	อัลคาเลส	(Wiriyaphan
			เปปซิน	<i>et al.</i> , 2012)
เวย์โปรตีนไอโซ เลต	-	DPPH [•] , OH [•] , O ₂ ^{•-}	ทริปซิน	(Peng <i>et al.</i> ,
			อัลคาเลส	2009)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของโปรตีน	กรดอะมิโน	ฤทธิ์ในการ ต้านอนุมูลอิสระ	โปรตีนที่ใช้	แหล่งอ้างอิง
ไข่ขาว	1. YLGAK 2. GGLEPINFQ	DPPH [•] , OH [•] , O ₂ ^{•-} ออกซิเดชันของโลหะ (reducing power)	ปาเปน	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
เวย์โปรตีนไอโซ เลต (whey protein isolate)	-	DPPH [•] , ABTS (2,2'- azino-bis-3- ethylbenzthiazo line-6-sulphonic acid) ออกซิเดชันของโลหะ (reducing power) จับ กับไอออนของเหล็ก (Fe ²⁺ chelating activity) การเกิดกรด ไทโอบาร์บิทูริกใน เนื้อสัตว์	<i>Chryseobacte rium</i> sp. kr6	(Oliveira <i>et al.</i> , 2014)
ถั่วหัวข้าง	-	DPPH [•] , OH [•] ลิปิด เปอร์ออกซิเดชันของ กรดลิโนเลอิก	อัลคาเลส	(Li <i>et al.</i> , 2008)
เอนโดสเปิร์มใน เมล็ดข้าว	- 1. FRDEHKK	DPPH [•] , OH [•] , O ₂ ^{•-} ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ของกรดลิโนเลอิก ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ของกรดลิโนเลอิก	นิวเทรส	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของโปรตีน	กรดอะมิโน	ฤทธิ์ในการ ต้านอนุมูลอิสระ	โปรตีนที่ใช้	แหล่ง อ้างอิง
อัลบูมิน โกลบูลิน และกลูเทลินจาก เมล็ดกระเจี๊ยบ	-	DPPH [•] ออกซิเดชันของ โลหะ (reducing power),	เปปซิน- แพนกรีติน	(Tounkara <i>et al.</i> , 2013)
ฮอร์ดีนในข้าว บาร์เลย์	-	DPPH [•] , O ₂ ^{•-} จับกับไอออนของเหล็ก (Fe ²⁺ chelating activity)	อัลคาเลส ฟลาโวไซม์	(Bamdad <i>et al.</i> , 2011)
กลูเทลินในข้าว บาร์เลย์	1.QKPFPPQQ PPF 2. PQIPEQF 3. LRTLPM 4. SVNVPPL	DPPH [•] , OH [•] จับกับไอออนของเหล็ก (Fe ²⁺ chelating activity), ออกซิเดชันของโลหะ (reducing power)	อัลคาเลส	(Xia <i>et al.</i> , 2012)
อัลบูมินจากเมล็ด ข้าวสาลี	-	ออกซิเดชันของโลหะ (reducing power)	Prolive PAC 30L (acid	(Boboev <i>et al.</i> , 2012)
อัลบูมินและ โกลบูล ลินจากเมล็ดฝ้าย	-	ออกซิเดชันของโลหะ (reducing power)	protease)และ นิวเทรส (neutral protease)	
ซอยโปรตีนไอโซ เลต (soy protein isolate)	-	DPPH [•] ลิปิดเปอร์ออกซิ เดชันในลิโปโซม	ฟลาโวไซม์ ไคโมทริปซิน	(Jimenez- Ruiz <i>et al.</i> , 2013)

*หมายเหตุ DPPH[•] คือ อนุมูลอิสระ DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)

OH^\bullet คือ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล(hydroxyl radical)

O_2^\bullet คือ อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ไอออน(superoxide anion radical)

นอกจากเปปไทด์จากพืชที่มีการรายงานว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โปรตีนจากพืชเองก็มีความสามารถเช่นกันในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น โปรตีนกลูเตลินจากเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก (unfermented seeds) และเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักแล้วตามด้วยการตากแดด (semi-fermented and sun-dried) พบว่าโปรตีนกลูเตลินจากเมล็ดโกโก้ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Preza *et al.*, 2010) โปรตีนจากถั่วลิสง (Sebei *et al.*, 2013) และถั่วสายพันธุ์ต่างๆก็พบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อีกทั้งยังพบความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของธาตุเหล็ก (ferric reducing power) (Petchiammal *et al.*, 2014) โปรตีนในเมล็ดของมะเขือพวง (sundakai seeds) ก็มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิดไฮดรอกซิล อนุมูลอิสระชนิด DPPH รวมถึงยังสามารถต้านการเกิดออกซิเดชัน (reducing power) และความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ (chelating activity) (Sivapriya and Srinivas, 2007) ได้อีกด้วย

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของโปรตีนและเปปไทด์

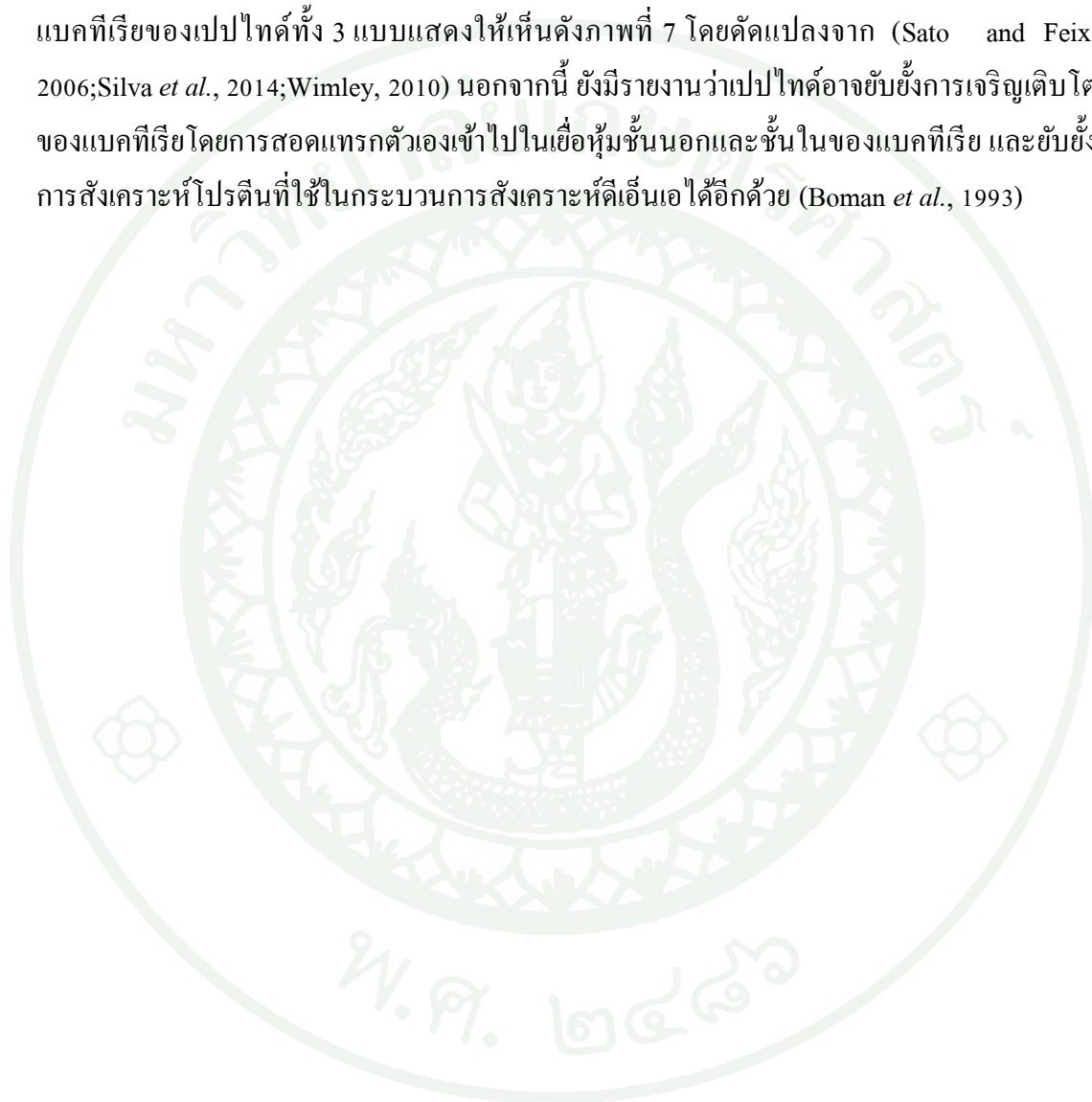
โรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ ส่วนหนึ่งมาจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ส่งผลให้มนุษย์ได้รับความเจ็บป่วยหรืออาจเสียชีวิต ยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคจากเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เริ่มมีประสิทธิภาพลดลงเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยา ดังนั้น การศึกษาหาทางด้านเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมามีพบว่า เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียมักมีทั้งส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic) และไม่มีขั้ว (hydrophobic) ในโมเลกุลเดียวกัน (Izadpanah and Gallo, 2005) รวมถึงมักอยู่ในรูปเกลียวแอลฟา (α -helix) และมีประจวบกันอยู่ที่ปลายซี (C-terminal domain) เช่น CAP18 (18-kDa cathelicidins) (Chen *et al.*, 1995; Gutschmann *et al.*, 2001)

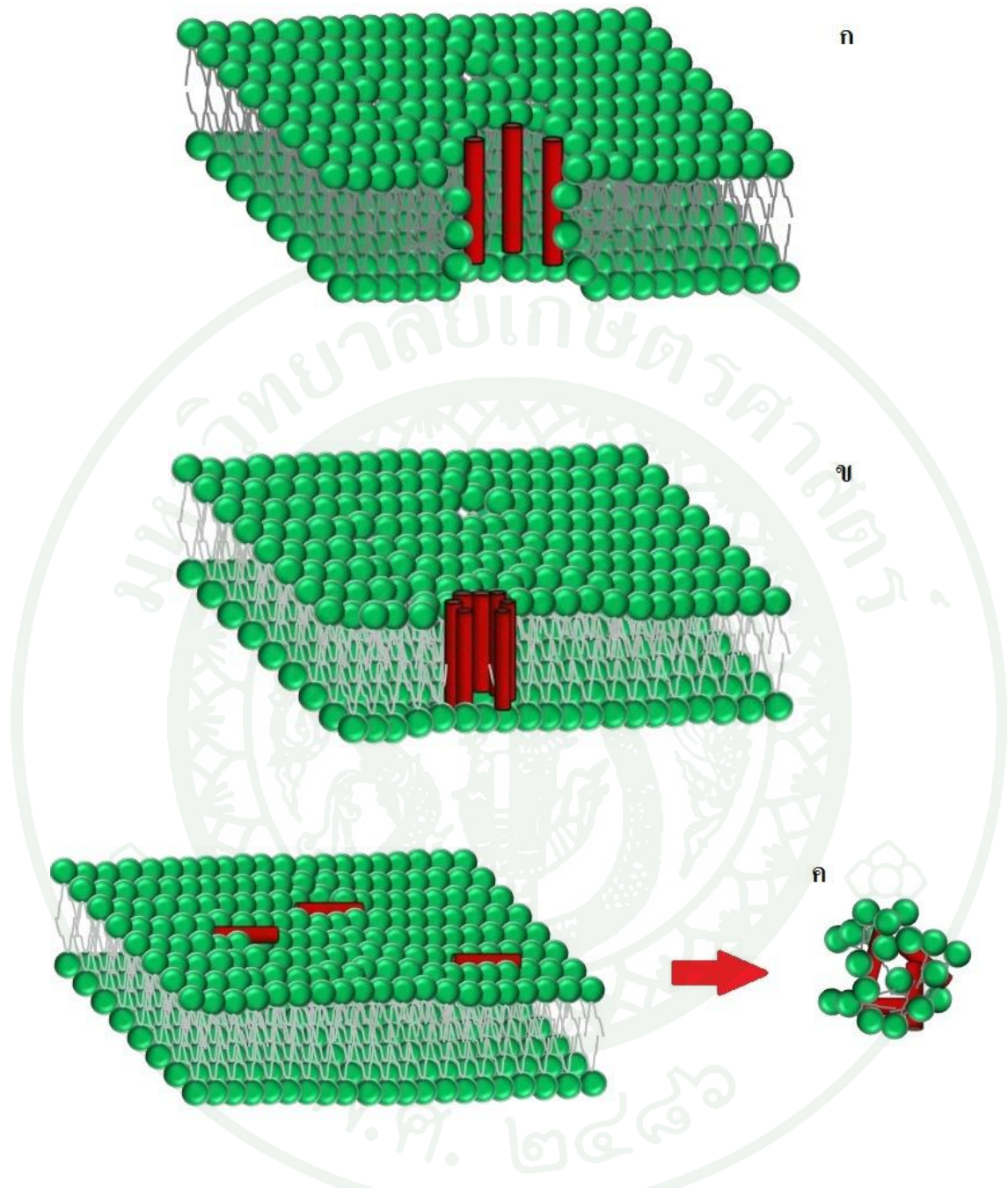
นอกจากนี้ เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนจำพวกอาร์จินีน (Skerlavaj *et al.*, 1990) และโพรีติน (Boman *et al.*, 1993) เป็นองค์ประกอบหลักก็มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งกลไกการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนั้นเกิดได้หลายแบบ อาทิ การที่เปปไทด์เข้าจับอย่างจำเพาะที่ตัวจับบริเวณพื้นผิวของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย (protein-lipid interaction) โดยการเข้าจับนี้จะทำให้เปปไทด์วางตัวในแนวระนาบและเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย (Gutschmann *et al.*, 2001) นอกจากนี้ นักวิจัยยังตั้งสมมติฐานถึงรูปแบบการเกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งอาจเกิดได้จาก

1. Torroidal-pore model เกิดจากการที่เปปไทด์เคลื่อนที่เข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์พร้อมกับเหนี่ยวนำให้เกิดการโด้งงอ (flip-flop) ของฟอสโฟลิปิด ส่งผลให้ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมและทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Matsuzaki *et al.*, 1996)

2. Barrel-stave model เกิดจากเปปไทด์รวมตัวกันเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (oligomer) แล้วแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเปปไทด์จะอยู่ติดกับ acyl chain ของกรดไขมันส่งผลให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Christensen *et al.*, 1988; Grant *et al.*, 1992)

3. Detergent-like “carpet” mechanism เกิดจากเปปไทด์ที่มีประจุบวกและมีรูปร่างแบบเกลียวแอลฟาจะจับกับเชื้อหุ้มเซลล์ซึ่งมีประจุเป็นลบโดยวางตัวในแนวขนานกับเชื้อหุ้มเซลล์ จากนั้นเปปไทด์จะเคลื่อนตัวเข้าไปด้านในชั้นไขมันและรบกวนการจัดเรียงตัวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อหุ้มเซลล์ (Gazit *et al.*, 1995; Pouny *et al.*, 1992) โดยแบบจำลองการยับยั้งแบคทีเรียของเปปไทด์ทั้ง 3 แบบแสดงให้เห็นดังภาพที่ 7 โดยดัดแปลงจาก (Sato and Feix, 2006; Silva *et al.*, 2014; Wimley, 2010) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าเปปไทด์อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยการสอดแทรกตัวเองเข้าไปในเชื้อหุ้มชั้นนอกและชั้นในของแบคทีเรีย และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้อีกด้วย (Boman *et al.*, 1993)





ภาพที่ 7 แบบจำลองกลไกการขยับยั้งแบคทีเรียด้วยเปปไทด์ ก. Torroidal-pore model – เปปไทด์จะเหนี่ยวนำให้เกิดการ flip-flop ของฟอสโฟลิปิด ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรู ข. Barrel-stave model – เปปไทด์จะจับกันเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน แล้วแทรกตัวลงไปทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ ค. Detergent-like “carpet” mechanism – เปปไทด์วางตัวในแนวระนาบกับเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียและรบกวนการจัดเรียงตัวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจากโปรตีนและเปปไทด์

โรคมะเร็งเป็นโรคร้ายแรงอีกชนิดหนึ่งที่ยังเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของมนุษย์ ดังนั้น ความพยายามในการค้นหาที่สามารถใช้รักษาโรคนี้อย่างคงดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง นักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจในการหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จากงานวิจัยที่ผ่านมา เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งมีคุณสมบัติและกลไกดังต่อไปนี้

1. การเกิดกระบวนการ apoptosis โดยเปปไทด์จะแทรกตัวเข้าไปในเซลล์โดยไม่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย จากนั้นจะเข้าไปรวมตัวกับนิวเคลียส ทำให้นิวเคลียสแตกออกเป็นส่วนย่อยๆ ดีเอ็นเอถูกทำลายจนไม่สามารถซ่อมแซมได้จะเป็นสัญญาณให้โปรตีนที่เกี่ยวกับการตายของเซลล์ (death promoting protein) เข้าไปจับกับไมโทคอนเดรีย ส่งผลให้ไซโตโครมซี (cytochrome c) ไหลออกมาจากไมโทคอนเดรีย โดยไซโตโครมซีจะกระตุ้น โปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้น caspase 9 (ซึ่งเป็น caspase ตัวแรกในกระบวนการ apoptosis) และจะกระตุ้น caspase ตัวต่อไปจนเซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์ (program cell death) (Lee *et al.*, 2008) หรืออาจเกิดจาก death receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์มีการแสดงออกมากกว่าปกติเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเปปไทด์ (Chen *et al.*, 2014)

2. การเกิดกระบวนการ necrosis โดยเปปไทด์จะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งและสอดแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ศักย์ไฟฟ้าภายในและภายนอกของเซลล์เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วทำให้เซลล์มะเร็งบวมและแตก (Papo *et al.*, 2003)

3. เปปไทด์ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีประจุบวกจะเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (Chen *et al.*, 1997) เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งมีโมเลกุลที่เป็นประจุลบ เช่น ฟอสฟาทีดิลซีรีน (phosphatidyl serine) มากกว่าเซลล์ปกติ (โดยการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของฟอสฟาทีดิลซีรีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ด้านในมาอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มะเร็งมีประจุลบมากกว่าเยื่อหุ้มเซลล์ปกติ ทำให้สามารถจับกับเปปไทด์ที่มีประจุบวกได้มากกว่าเซลล์ปกติ (Dobrzynska *et al.*, 2005; Hoskin and Ramamoorthy, 2008; Schwartz *et al.*, 1985)

4. เปปไทด์เข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วเข้าทำลายเซลล์มะเร็งในลักษณะเดียวกันกับเซลล์แบคทีเรีย (ดังแสดงในภาพที่ 7) (Schweizer, 2009)

ตารางที่ 2 เปปไทด์ที่ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

ชนิดของโปรตีน	กรดอะมิโน	ฤทธิ์ในการยับยั้ง		โปรตีนที่ใช้	แหล่งอ้างอิง
		แบคทีเรีย	มะเร็ง		
egg yolk by-product ; YP	-	<i>B. subtilis</i> B3, <i>B. cereus</i> B512, <i>B. cereus</i> B 3p, <i>B. laterosporum</i> B6	-	ทริปซิน	(Zambrowicz <i>et al.</i> , 2012)
LL-37 (เปปไทด์ที่สกัดจากกรานูโลไซต์ของมนุษย์)	-	ต้านการอักเสบของผิวหนัง	-	-	(Frohm <i>et al.</i> , 1997)
human beta-defensin-3 (สกัดจากผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	-	-	(Harder <i>et al.</i> , 2001)
รำข้าว	EQRPR	-	เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2, HCT-116), มะเร็งเต้านม (MCF-7, MDA-MB-231), มะเร็งตับ (HepG-2)	อัลคาเลส	(Kannan <i>et al.</i> , 2010)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเปปไทด์และโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและการเจริญของเซลล์มะเร็งมีมากมายหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้

โปรตีนทนความร้อน (heat stable protein) ซึ่งได้จากใบหม่อนบางชนิด มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้หลากหลาย อาทิ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* (ATCC type) (Manjula and Shubha, 2011) โปรตีนจากเมล็ดลินิน (flaxseed) ก็มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียชนิด *Salmonella typhimurium* ATCC: 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC: 29212, *Escherichia coli* ATCC: 8439 และ ATCC: 8739 รวมถึง *Klebsiella pneumonia* ATCC: 10031 (Mohammad H.H.T. et al, 2014) โอคา (*Oxalis tuberosa* Mol.) เป็นพืชหัวที่มีรายงานว่าโปรตีนสะสมในหัว (Tuber Storage Protein) ชื่อ ocatin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aureofaciens* (Flores et al., 2002)

รายงานอื่นๆที่เกี่ยวกับฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งของโปรตีนและเปปไทด์จากอาหาร อาทิ โปรตีนจากมันเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) การย้ายที่ (migration) และการรุกราน (invasion) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (human colorectal cancer SW480 cells) (Li et al., 2013) โปรตีนอัลบูมินจากเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักแล้วตามด้วยการตากแดด (Semi-fermented and sun-dried) ก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง murine lymphoma L5178Y เป็นต้น (Preza et al., 2010) .

โปรตีนหลักในเมล็ดพืชแบ่งออกเป็น 4 ประเภทตามความสามารถในการละลายได้ในตัวทำละลายต่างชนิด ได้แก่ 1. อัลบูมินเป็นโปรตีนที่ละลายในน้ำประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 2 สายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ โดยอัลบูมินจะถูกสังเคราะห์ให้อยู่ในรูป precursor albumin และถูกขนส่งจากเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัมไปยังเวคิวโอลเพื่อทำให้กลายเป็น mature albumin ที่สามารถใช้ในการเจริญของเมล็ดได้ (Hara-Hishimura et al., 1993; Shewry and Halford, 2002) 2. โกลบูลินเป็นโปรตีนที่ละลายในน้ำเกลือ โดยโปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีน 2 กลุ่ม ได้แก่ 11S-legumin และ 7S-vicilin ซึ่งถูกสังเคราะห์ที่เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัมและถูกขนส่งไปที่เวคิวโอลเพื่อใช้ในขั้นการพัฒนาของเมล็ด (Shewry et al., 1995; Tandang-Silvas et al., 2010) 3. กลูเตลินเป็นโปรตีนที่ละลายในกรด/ด่างและเป็นโปรตีนหลักที่มีปริมาณมากที่สุดในเมล็ดข้าว (Ju et al., 2001) ซึ่งแตกต่างจากธัญพืชชนิดอื่นที่จะมีโปรลามินเป็นองค์ประกอบมากที่สุด (Chrastil et al, 1994) กลูเตลินประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มี isoelectric point เป็นกรด (α subunit) และกลุ่มที่มี isoelectric point เป็นเบส (β subunit) น้ำหนักโมเลกุลของโพลีเปปไทด์ที่เป็นแอลฟาซัพยูนิตมี

ค่าประมาณ 30 กิโลคาลตัน ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเปปไทด์ที่เป็นเบต้าซูปพูนิตมีค่าประมาณ 21 กิโลคาลตัน (Wen and Luthé, 1985) 4. โปรรามินเป็นโปรตีนที่ละลายในแอลกอฮอล์ มีกรดอะมิโนโพรลีนและกลูตามีนเป็นองค์ประกอบหลัก โปรรามินถูกสร้างขึ้นที่เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม เพื่อใช้ในขั้นการพัฒนาของเมล็ด (Reyes *et al.*, 2011; Shewry and Tatham, 1990)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่าเปปไทด์และโปรตีนที่ได้จากพืชและสัตว์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น นำไปใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และมะเร็ง และยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมโทรมของร่างกายอีกด้วย ดังนั้นการแสวงหาเปปไทด์และโปรตีนจากแหล่งอื่นๆ นอกจากจะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์แล้ว ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้อีกด้วย ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทยและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ การนำข้าวมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ สามารถสร้างรายได้ให้แก่ผู้ผลิตเป็นจำนวนมาก ดังนั้น การนำข้าวมาศึกษาหาสารชนิดใหม่ ซึ่งอาจใช้เป็นยารักษาโรค นอกจากจะช่วยลดปัญหาทางด้านประสิทธิภาพในการรักษาเนื่องจากเชื้อดื้อยา ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง (WHATMAN No.1) (GE Healthcare : Austria)
2. คอลัมน์ไฮเปอร์ซิลซี 18 อนุภาคขนาด 5 ไมครอน ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (Hypersil C 18 Particle size 5 micron, length 250 x 4.6 mm.) (Thermo Scientific : USA)
3. Ultra High Pressure Liquid Chromatography ; UHPLC (Perkin Elmer : USA)
4. ตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน (0.45 micron syringe filter; Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane) (PALL Corporation : USA)
5. ตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน (0.2 micron nylon filter)
(VERTICAL CHROMATOGRAPHY : Thailand)
6. ถาดหลุม 96 หลุม (96-well microplate) (Thermo Scientific : USA)
7. ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (Thermo Scientific : USA)
8. หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร (Thermo Scientific : USA)
9. หลอดเซนตริฟิวส์แบบมีเยื่อเลือกผ่านขนาด 3 กิโลดาลตัน (3 kDa centrifugal filter)
(Merck : Germany)
10. ตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน ความจุ 500 มิลลิลิตร (500 mL Rapid-Flow Filter Unit; 0.2 micron aPES Membrane, 75 มิลลิเมตร)

สารเคมี

1. ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa L.* cv. KDML 105) จากร้าน farmer shop มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. ข้าวขาวพันธุ์พิษณุโลก 2 (PSL2) จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
3. น้ำกลั่น (Distilled water) จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
4. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) (Ajax Finechem : Australia)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) (Ajax Finechem : Australia)
6. เปปซิน (Pepsin) (Bio Basic Inc.: USA)

7. ทริปซิน (Trypsin) (Sigma–Aldrich : USA)
8. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) (QR&C; AR grade : New Zealand)
9. Albumin from bovine serum (Sigma–Aldrich : USA)
10. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate) (Merck : Germany)
11. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (Sodium potassium tartrate) (Ajax Finechem : Australia)
12. สารละลาย Bradford (Bradford reagent) (BIORAD : USA)
13. กรดไตรฟลูออโรแอซิดิก (Trifluoroacetic acid) (Merck : Germany)
14. แอซิโตไนไทร์ล (Acetonitrile) (Avantor : USA)
15. น้ำบริสุทธิ์สูง (Ultrapure water) จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
16. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ; DPPH• (Sigma–Aldrich : USA)
17. กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) (Sigma–Aldrich : USA)
18. เอทานอลบริสุทธิ์ (Absolute ethanol) (Avantor : USA)
19. เอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิดิกแอซิดไดโซเดียมซอลท์ (Ethylenediaminetetraacetic acid di-sodium salt ; EDTA-di-sodium salt) (Ajax Finechem : Australia)
20. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) (PANREAC QUIMICASA : Spain)
21. ดีออกซีไรโบส (2-deoxy-D-ribose) (Sigma–Aldrich : USA)
22. เฟอรัสซัลเฟต (Ferrous sulfate) (Ajax Finechem : Australia)
23. กรดไทโอบาร์บิฟูริก (2-thiobarbituric acid ;TBA) (Sigma–Aldrich : USA)
24. กรดไตรคลอโรแอซิดิก (Trichloroacetic acid ; TCA)(Fisher scientific : U.K.)
25. วิตามินอี (α -tocopherol) (Sigma–Aldrich : USA)
26. กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) (Sigma–Aldrich : USA)
27. แอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (Ammonium thiocyanate) (Sigma–Aldrich : USA)
28. เฟอรัสคลอไรด์ (Ferrous chloride) (Sigma–Aldrich : USA)
29. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย [Luria Bertani(LB) broth] (Becton, Dickinson and company : USA)
30. คานามัยซินซัลเฟต (Kanamycin sulfate) (T.P. DRUG LABORATORIES (1969) Co.,Ltd : Thailand)

31. อาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Iscove's Modified Dulbecco's Media ; IMDM) (GE Healthcare : Austria)
32. อาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (RPMI 1640 Medium)
33. อาหารเลี้ยงเซลล์ตับปกติ (Minimum Essential Media ; MEM) (GE Healthcare : Austria)
34. Fetal bovine serum ; FBS (GIBCO : USA)
35. สารต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพ (Antibiotic-microtic) (GIBCO : USA)
36. ทริปซิน-อีดีทีเอความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (0.05% Trypsin-EDTA)(GIBCO : USA)
37. กรดอะมิโนที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ (100X) (MEM non-essential amino acids (100X) (GE Healthcare : Austria)
38. แอล – อะลานิล- แอล – กลูตามีน (L-alanyl-L-glutamine) (GE Healthcare : Austria)
39. โซเดียมไพรูเวต (Sodium pyruvate) (GE Healthcare : Austria)
40. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ; MTT (Invitrogen : USA)
41. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide ; DMSO) (AMReSCO : USA)
42. Tris (hydroxymethyl) aminomethane) (Research Organics Inc : USA)
43. ไกลซีน (Glycine) (Ajax Finechem : Australia)
44. กรดแอซีติก (Glacial acetic acid) (QR&C : New Zealand)
45. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ajax Finechem : Australia)
46. N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamine (TEMED)
47. Comassie brilliant blue (Bio Basic Inc.: USA)
48. เมทานอลบริสุทธิ์ (Absolute methanol) (Burdick & Jackson : USA)
49. กลีเซอรอล (Glycerol) (Ajax Finechem : Australia)
50. 30% acrylamide/bis-acrylamide : 29 : 1 (BIORAD : USA)

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	แกรม	โรคที่เกิด
<i>A.anitratu</i> s DMST 4183	-	
<i>A.baumannii</i> ATCC 19066	-	โรคปอดบวม ติดเชื้อในกระแสเลือด
<i>A.lwoffii</i> ATCC 15309	-	
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	+	ฝีหนอง เกิดอาการช็อกจากสารพิษ ติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด
เชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ-ไบโอเทค		
เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	แกรม	โรคที่เกิด
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	+	ฝีหนอง เกิดอาการช็อกจากสารพิษ ติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	+	อาหารเป็นพิษ
<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048	-	ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ
<i>E.coli</i> ATCC 8739	-	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	อุจจาระร่วง ติดเชื้อในระบบทางเดิน ปัสสาวะ
<i>E.coli</i> O157:H7	-	
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	+	
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	+	ฝีหนอง เกิดอาการช็อกจากสารพิษ ติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ-ไบโอเทค

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	แกรม	โรคที่เกิด
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	+	
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	ฝีหนอง ติดเชื้อในระบบทางเดิน ปัสสาวะ
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	-	
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	+	โรคติดเชื้อในกระแสเลือด

เซลล์มะเร็ง

- เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร [Human Stomach Carcinoma cell line ; KATOIII ATCC No.HTB103] : ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ-ไบโอเทค
- เซลล์ตับปกติ [Human Liver cell line (Chang), CLS No. 300139] : ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ-ไบโอเทค

วิธีการ

- การเตรียมสารละลายไปยูเรต – นำคอปเปอร์ซัลเฟตและโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตจำนวน 0.375 กรัมและ 1.51 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (7.5% sodium hydroxide) จำนวน 100 มิลลิลิตร (น้ำกลั่นที่ใช้ในการเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ต้องผ่านการต้มเพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออก) ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 250 มิลลิลิตร
- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย – เตรียมตามวิธีการของผู้ผลิต โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 20 กรัม เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

- 3) การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด IMDM – เทออาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปชนิด Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรออกจากขวด จากนั้น เติม fetal bovine serum (FBS) และสารต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพ (Antibiotic-microtic) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรและ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในอาหาร IMDM
- 4) การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด RPMI – ชั่งผง RPMI จำนวน 10.4 กรัมละลายในน้ำบริสุทธิ์สูงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน ความจุ 500 มิลลิลิตร (500 mL Rapid-Flow Filter Unit; 0.2 micron aPES Membrane, 75 มิลลิเมตร)
- 5) อาหารเลี้ยงเซลล์ตับปกติชนิด MEM – เทออาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปชนิด Minimum Essential Media (MEM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรออกจากขวด จากนั้นเติม fetal bovine serum (FBS) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพปริมาตร 5 มิลลิลิตร กรดอะมิโนที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ (1%MEM non-essential amino acids) (100X) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แอล – อะลานิน- แอล – กลูตามีนความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ (200 mM L-Alanyl-L-glutamine) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โซเดียมไพรูเวตความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (100 mM Sodium pyruvate) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- 6) การเตรียมสารละลาย DPPH• - ชั่งอนุโมลอิสระ DPPH จำนวน 0.125 มิลลิกรัมละลายในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethanol) 1 มิลลิลิตร

1. การสกัดโปรตีนโกลบูลินและกลูเทลินจากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าวขาวพันธุ์ดอกมะลิ 105 และโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเทลินจากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าวขาวพันธุ์พิกุลโลก 2 (PSL2)

การสกัดโปรตีนโกลบูลินและกลูเทลินจากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 และโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเทลินจากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าวขาวพันธุ์พิกุลโลก 2 (PSL2) ดัดแปลงจากวิธีการของ Osborne (Agboola *et al.*, 2005) ทำโดยชั่งข้าวขาว 1 กิโลกรัมที่ผ่านการบดอย่างละเอียดด้วยเครื่องปั่น (kitchen blender) เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 4,000 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อสกัดโปรตีนอัลบูมินและกำจัดแป้งบางส่วนออก แยกกากข้าว

ออกด้วยผ้าขาวบางและนำกากข้าวที่ได้มาทำการสกัดโปรตีนอัลบูมินอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 4,000 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำส่วนใสทั้ง 2 ส่วนมารวมกันแล้วต้มเพื่อตกตะกอนโปรตีนอัลบูมิน (เฉพาะส่วนใสของอัลบูมินจากข้าวขาวพันธุ์พิษณุโลก 2) แยกกากข้าวออกด้วยผ้าขาวบางและนำกากข้าวที่ได้ไปสกัดโปรตีนโกลบูลินด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (5% sodium chloride) จำนวน 4,000 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แยกกากข้าวออกด้วยผ้าขาวบางและนำกากข้าวที่ได้มาทำการสกัดโปรตีนโกลบูลินอีกครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (5% sodium chloride) จำนวน 4,000 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน แยกกากข้าวออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสทั้ง 2 ส่วนมารวมกันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืนเพื่อให้แป้งตกตะกอน ปั่นเหวี่ยงส่วนใสที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (10,000 rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีตามด้วยการกรองด้วยกระดาษกรอง (WHATMAN No.1) เพื่อแยกแป้งออกจากโปรตีนโกลบูลิน จากนั้น ตกตะกอนโปรตีนโกลบูลินโดยทำให้สารละลายมีค่าพีเอช (pH) เท่ากับค่าไอโซอิเล็กทริก [isoelectric point (pI)] ของโกลบูลิน (pI = 4.3) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 M hydrochloric acid) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมงจึงปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โปรตีนโกลบูลินจะถูกนำไปประเหยแห้ง (lyophilize) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป กากข้าวที่เหลือจะถูกนำมาสกัดโปรตีนกลูเตลินด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M sodium hydroxide) จำนวน 4,000 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกกากข้าวออกด้วยผ้าขาวบางและนำกากข้าวที่ได้มาทำการสกัดโปรตีนกลูเตลินอีกครั้งด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M sodium hydroxide) จำนวน 4,000 มิลลิลิตร ด้วยวิธีเดิม นำส่วนใสทั้งสองส่วนมารวมกันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืนเพื่อให้แป้งตกตะกอน ปั่นเหวี่ยงส่วนใสที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีตามด้วยการกรองด้วยกระดาษกรอง (WHATMAN No.1) เพื่อแยกแป้งออกจากโปรตีนกลูเตลิน จากนั้น ตกตะกอนโปรตีนกลูเตลินโดยทำให้สารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับค่าไอโซอิเล็กทริกของกลูเตลิน (pI = 4.8) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 M hydrochloric acid) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมงจึงปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โปรตีนกลูเตลินจะถูกนำไปทำการระเหยแห้งเพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. การสกัดโปรตีนละลายน้ำจากรำพันธุ์พิษณุโลก 2 (PSL2)

การสกัดโปรตีนจากรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ทำโดยนำรำข้าว 30 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 120 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แยกกากรำข้าวออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนใสที่ผ่านการกรองเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้น ตักไขมันบริเวณผิวหน้าทิ้งและทำให้ส่วนใสมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมหงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) โดยใช้อัตราส่วนสารสกัดจากรำ 25 มิลลิลิตรต่อผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหรียญที่ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการกรองด้วยกระดาษกรอง (WHATMAN No.1) เพื่อแยกผงถ่านกัมมันต์ออก

3. การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลินจากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าวขาวและโปรตีนละลายน้ำจากรำพันธุ์พิษณุโลก 2 (PSL2) ด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซิน

นำโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเทลินมาอย่างละ 2 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการย่อยโปรตีนทั้งสามชนิดและสารละลายโปรตีนจากรำด้วยเปปซินที่พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนเอนไซม์ : สับสเตรตเท่ากับ 1 : 25 (w/w) ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 30 นาที จากนั้นทำการย่อยด้วยทริปซินต่อที่พีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนเอนไซม์ : สับสเตรตเท่ากับ 1 : 25 (w/w) ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 30 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ปรับพีเอชของสารตัวอย่างให้เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายจนเท่ากับ 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้น ปั่นเหรียญที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนโกลบูลินและกลูเทลินจากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซิน

ซังโปรตีนโกลบูลินและกลูเทลินมาอย่างละ 50 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 4 มิลลิลิตร ทำการย่อยโปรตีนทั้งสองชนิดด้วยเปปซินที่พีเอช 2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนเอนไซม์ : สับสเตรตเท่ากับ 1 : 25 (w/w) ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 30 นาที จากนั้นทำการย่อยด้วยทริปซินต่อที่พีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนเอนไซม์ : สับสเตรตเท่ากับ 1 : 25 (w/w) ทำการหยุดปฏิกิริยา

โดยการต้มในน้ำเดือด 30 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง ปรับพีเอชของสารตัวอย่างให้เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรสุดท้ายจนเท่ากับ 7.5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที กรองส่วนใสด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน (0.45 micron syringe filter; Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane) และทำการระเหยแห้งเพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

5. การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสัทที่มีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตันจากเปปซิน-ทริปซิน (ที่ไม่มีกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลสัททั้ง 2 ชนิดผสมอยู่)

นำไฮโดรไลสัทชนิดเปปซิน-ทริปซิน (ที่ไม่มีกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลสัททั้ง 2 ชนิดผสมอยู่) ที่ผ่านการระเหยแห้งจำนวน 672 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองส่วนใสด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน (0.2 micron nylon filter) (VERTICAL CHROMATOGRAPHY : Thailand) นำสารที่กรองมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยหลอดเซ็นตริฟิวส์ที่มีเยื่อเลือกผ่านขนาด 3 กิโลดาลตัน (3 kDa centrifugal filter) ที่แรงเหวี่ยง 4,000 g จากนั้น นำส่วนใสที่มีโปรตีนไฮโดรไลสัทขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตันไปทำการระเหยแห้งเพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

6. การวัดปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างด้วยสารละลายไบยูเรต

สร้างกราฟมาตรฐาน BSA (Albumin from bovine serum) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร สารตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร สารละลายไบยูเรต 900 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตรของแต่ละปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับสารตัวอย่างที่ต้องการวัด

7. การวัดปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างด้วยสารละลาย Bradford

สร้างกราฟมาตรฐาน BSA (Albumin from bovine serum) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.010 และ 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 800 ไมโครลิตร สารละลาย

Bradford (Bradford reagent, Biorad) 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรของแต่ละปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับสารตัวอย่างที่ต้องการวัด

8. การวิเคราะห์โปรตีนไฮโดรไลสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับ [Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)]

วิเคราะห์โกลบูลินไฮโดรไลสและกลูเทลินไฮโดรไลสจากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตามสภาวะในตารางที่ 3 ซึ่งปรับปรุงจาก (Devkota *et al.*, 2010) โดยตัวทำละลาย A คือ กรดไตรฟลูออโรแอซิดิคความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01%TFA) ในน้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure water) ตัวทำละลาย B คือ แอซิโตไนไทรล์ ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (100% Acetonitrile) คอลัมน์ที่ใช้ได้แก่ ไฮเปอร์ซิลซี 18 อนุภาคขนาด 5 ไมครอน ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (Hypersil C 18 Particle size 5 micron, length 250 x 4.6 mm.) นำโปรตีนโกลบูลิน กลูเทลินและโปรตีนไฮโดรไลสชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดผสมกับแอซิโตไนไทรล์ 1 เท่า แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน (0.2 micron nylon syringe filter) วิเคราะห์กราฟของสารตัวอย่างโดยใช้สภาวะตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การตั้งค่าโปรแกรมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับ (RP – HPLC) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์

ขั้นตอน	โปรแกรม	เวลา(นาที)	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	เปอร์เซ็นต์ตัวทำ ละลาย B
0	Equil	0-2	1	0%
1	Run	2-3	1	0-12%
2	Run	3-13.5	1	12-26%
3	Run	13.5-15	1	26%
4	Run	15-20	1	26-40%
5	Run	20-50	1	40-50%
6	Run	50-55	1	50-100%
7	Wash	55-60	1	100%

9. การเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ 12 เปอร์เซ็นต์สำหรับหารูปแบบโปรตีนจากข้าวขาว (Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE)

เตรียม separating gel ด้วย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 จำนวน 2.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่นจำนวน 3.25 มิลลิลิตร อะคริลาไมด์/บิสจำนวน 4 มิลลิลิตร โซเดียมโดเดคิลซัลเฟตความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์จำนวน 0.1 มิลลิลิตร กลีเซอรอลจำนวน 0.1 มิลลิลิตร แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์จำนวน 50 ไมโครลิตรและ TEMED จำนวน 5 ไมโครลิตร จากนั้นเทเจลลงไปในแผ่นกระจกของชุดเตรียมเจล รอนเจลแข็งตัวแล้วจึงเติม stacking gel ลงไป (เตรียมได้โดยใช้ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 จำนวน 1.25 มิลลิลิตร น้ำกลั่นจำนวน 3 มิลลิลิตร อะคริลาไมด์/บิสจำนวน 0.65 มิลลิลิตร โซเดียมโดเดคิลซัลเฟตความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์จำนวน 50 ไมโครลิตร กลีเซอรอลจำนวน 50 ไมโครลิตร แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์จำนวน 25 ไมโครลิตรและ TEMED จำนวน 5 ไมโครลิตร) เติบหัวเพื่อให้ชั้น stacking gel เป็นรู รอนเจลทั้งแผ่นแข็งตัวดี แล้วจึงโหลดโปรตีนที่ผสมกับ tracking dye ลงไป ทำการรันเจลโดยใช้ความต่างศักย์ที่ 150 โวลต์ 30 มิลลิแอมแปร์ใน 1X running buffer จากนั้นทำการย้อมเจลด้วยสีย้อม (เตรียมจาก Coomassie brilliant blue จำนวน 0.25 กรัม กรดแอสซิดิกจำนวน 25 มิลลิลิตร เอทานอลบริสุทธิ์จำนวน 100 มิลลิลิตร น้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการล้างสีย้อมซึ่งเตรียมจากเมทานอลบริสุทธิ์จำนวน 300 มิลลิลิตร น้ำกลั่นจำนวน 1,100 มิลลิลิตร และกรดแอสซิดิกจำนวน 100 มิลลิลิตร

10. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 4 สายพันธุ์ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม (96-well microplate)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. anitratus* DMST 4183, *A. baumannii* ATCC 19066, *A. lwoffii* ATCC 15309, *S. aureus* ATCC 25923 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรจนค่าการดูดกลืนแสง (optical density) เท่ากับ 0.5 ปิเปตต์เชื้อที่ทำการเจือจางนี้ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำการเลี้ยงเชื้อจนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 เติบสารตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมโปรตีน

ไฮโดรไลเสทของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากเอนโดสเปิร์มในข้าวขาวและโปรตีนละลายน้ำจากรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรซึ่งผ่านการกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน (0.2 micron nylon filter) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโรคแล้ว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรที่เวลา 0, 2, 4, 6, 24 ชั่วโมง

11. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 11 สายพันธุ์ในหลอดทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli*. ATCC 8739, *E. coli*. ATCC 25922, *E. coli*.O157:H7, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 6538P, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. epidermidis* ATCC 12228 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อจนค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.13 - 0.15 บีเปดต์เชื้อปริมาตร 800 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมโกลบูลินไฮโดรไลเสทและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการระเหยแห้งจำนวน 2.5 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 1,000 ไมโครลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรโดยสารตัวอย่างจะถูกกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน (0.2 micron nylon filter) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโรคแล้ว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรที่เวลา 0, 3, 6, 8, 24 ชั่วโมงโดยมีคานามัยซินซัลเฟต (kanamycin sulfate) เป็นสารควบคุม

12. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH[•])

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH[•] คัดแปลงมาจากวิธีของ (Zhang *et al.*, 2010) โดยโกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทำปฏิกิริยากับ DPPH[•] โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (50 mM potassium phosphate buffer pH7) สารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรหรือ 100 ไมโครลิตรและสารละลาย DPPH[•] ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตร

สุดท้ายของปฏิกิริยาให้เท่ากับ 1,000 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ Scavenging effect (\%SE)} = (1 - As/Ac) \times 100$$

โดย As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง
Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารควบคุม
(ไม่ใช่สารตัวอย่าง)

ใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) แทนโปรตีนและเปปไทด์

13. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^\bullet)

การหาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^\bullet) คัดแปลงจากวิธีของ (Malik *et al*, 2011) ในปฏิกิริยาปริมาตร 500 ไมโครลิตรประกอบด้วยสารละลายเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไดออกซีไรโบส (2-deoxy-D-ribose) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เฟอรัสซัลเฟต (ferrous sulfate) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โปรตีนกลูเตลินหรือกลูเตลินไฮโดรไลสเททชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.5, 15, 150 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร และ 1.5, 15 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทรिकความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ [(1% of 2-thiobarbituric acid (1%TBA)] และกรดไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้น 2.8 เปอร์เซ็นต์ [2.8% trichloroacetic acid (2.8%TCA)] อย่างละ 500 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสของปฏิกิริยามาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ Scavenging effect (\%SE)} = (1 - As/Ac) \times 100$$

โดย As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง
 Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรของสารควบคุม
 (ไม่ได้สารตัวอย่าง)
 ใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) แทน โปรีตินและเปปไทด์

14. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก (Inhibition of Linoleic acid autooxidation)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid) ทำโดยดัดแปลงวิธีของ (Nazeer and Kulandai, 2012) ในปฏิกิริยา 18.84 มิลลิ ลิตรประกอบด้วยเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ (99.5% ethanol) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โปรีตินกลูเตลิน และกลูเตลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ ละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและกรดไขมันลิโนเลอิก 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรจนได้ 18.84 มิลลิลิตร ด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศา เซลเซียสเป็นเวลา 5 วันในที่มืด จากนั้น ดูดสารในปฏิกิริยาที่บ่มในวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มา 25 ไมโครลิตร เติมลงในเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ (75% ethanol) จำนวน 1,175 ไมโครลิตร แอมโมเนียมไทโอไซยาเนต 30 เปอร์เซ็นต์ (30% ammonium thiocyanate) และเฟอร์รัสคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ [20 mM Ferrous chloride (ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์)] อย่างละ 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 500 นาโนเมตร ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก คำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = (1 - As/Ac) \times 100$$

โดย As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง
 Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรของสารควบคุม
 (ไม่ได้สารตัวอย่าง)
 ใช้วิตามินอี (α -tocopherol) แทน โปรีตินและเปปไทด์

15. การวัดความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII ATCC No.HTB103) ในอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) ทำการย่อยเซลล์มะเร็งที่เกาะอยู่ที่ผิวขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยทริปซิน-อีดีทีเอความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (0.05% Trypsin-EDTA) ทำให้เซลล์แยกออกจากกันโดยการปิเปตต์ขึ้น – ลง ปิเปตต์เซลล์ใส่ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุมๆละ 200 ไมโครลิตร โดยเจือจางเซลล์ให้มีจำนวนประมาณ 4,000 เซลล์ต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น ปิเปตต์อาหารเก่าออกแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป 200 ไมโครลิตร เติมโปรตีนกลูเทลินและกลูเทลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซิน และชนิดเปปซิน-ทริปซินที่ผ่านการกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน (0.45 micron syringe filter; Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปหลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปิเปตต์สารละลายเก่าทิ้ง แล้วเติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ [Human Liver cell line (Chang), CLS No. 300139] ที่เลี้ยงใน MEM (Minimum Essential Medium Eagle) คำนวณร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) จาก

$$\% \text{ cell viability} = (\text{As}/\text{Ac}) \times 100$$

โดย As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง
Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรของสารควบคุม
(ไม่ใช่สารตัวอย่าง)

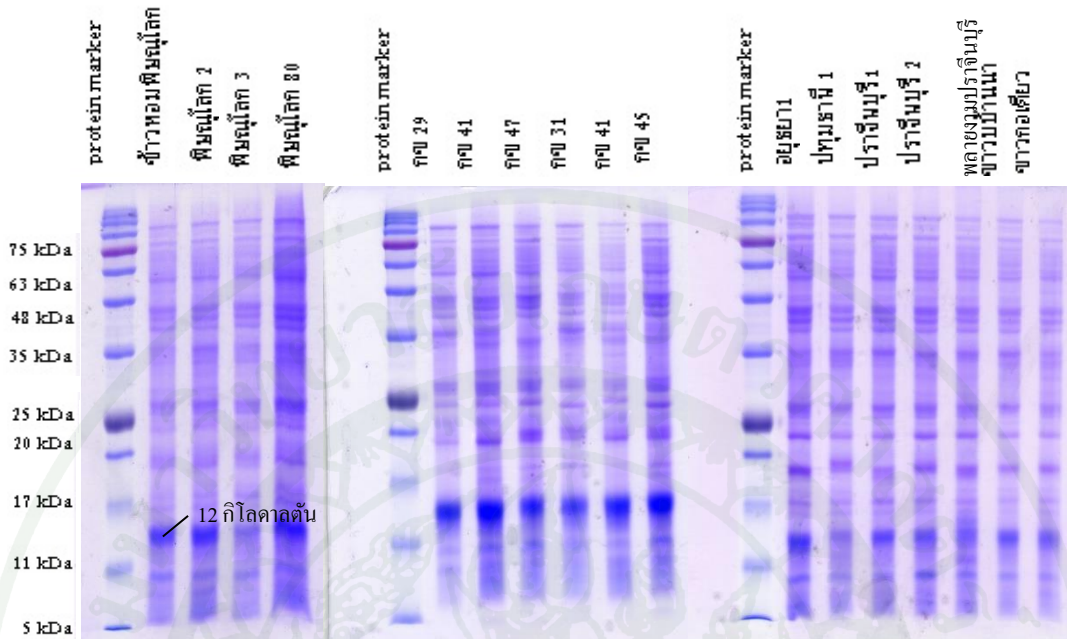
ผลและวิจารณ์

ผล

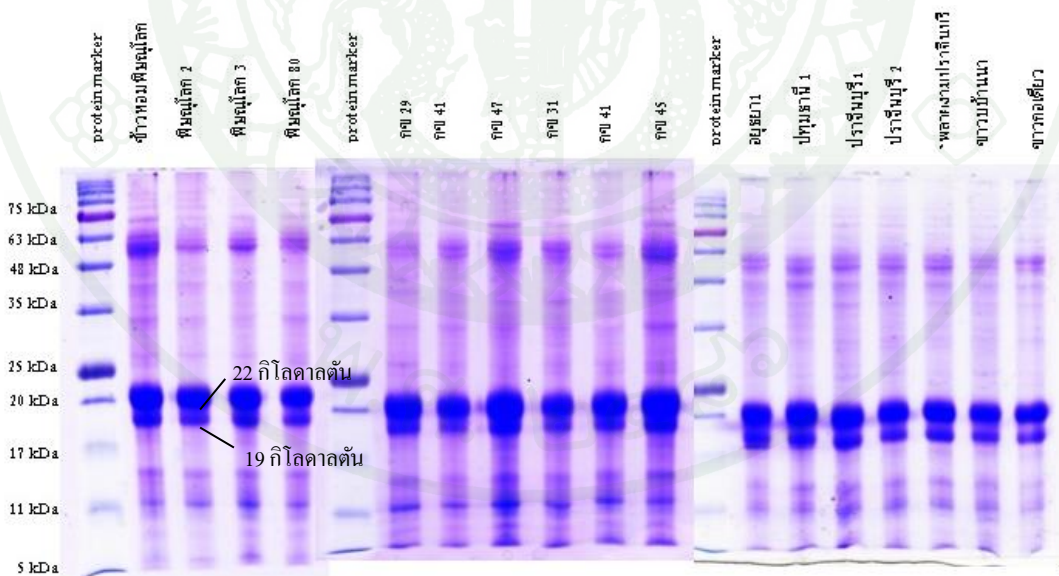
1. การศึกษารูปแบบโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเทลินในข้าวไทย 16 พันธุ์

เมื่อทำการสกัดข้าวขาวจำนวน 16 พันธุ์ด้วยวิธีในข้อ 1 พบว่าโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลิน และกลูเทลินในข้าวทั้ง 16 พันธุ์ มีลักษณะดังภาพที่ 8 (ก-ค) โดยพบว่ารูปแบบโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเทลินในข้าวขาว 16 พันธุ์ มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จากภาพที่ 8ก จะพบว่าข้าวทั้ง 16 สายพันธุ์มีอัลบูมินซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนหลัก 1 แถบ คือที่ประมาณ 12 กิโลดาลตัน ภาพที่ 8ข มีโกลบูลินซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนหลัก 2 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19 และ 22 กิโลดาลตัน ส่วนรูปที่ 8ค พบว่าในการสกัดกลูเทลินจากข้าวทั้ง 16 สายพันธุ์ พบแถบโปรตีนหลัก 4 แถบมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12, 21, 30 และ 83 กิโลดาลตัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดย (Wen and Luthe, 1985) พบว่ากลูเทลินมีแถบโปรตีนหลัก 2 แถบอยู่ที่ประมาณ 21 และ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งในการทดลองนี้กลูเทลินในข้าวจึงมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 และ 34 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตามยังพบแถบโปรตีนชนิดอื่นซึ่งคาดว่าอาจเป็นโปรลามินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12 กิโลดาลตัน จำนวน 1 แถบและโปรตีนชนิดอื่นซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า 75 กิโลดาลตันอีก 1 แถบ (Shewry and Halford, 2002) เนื่องจากโปรตีนที่พบมีความคล้ายคลึงกัน ในการทดลองขั้นถัดไปจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเลือกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมบริโภคมาทำการศึกษาทดลองเพิ่มเติม

ก

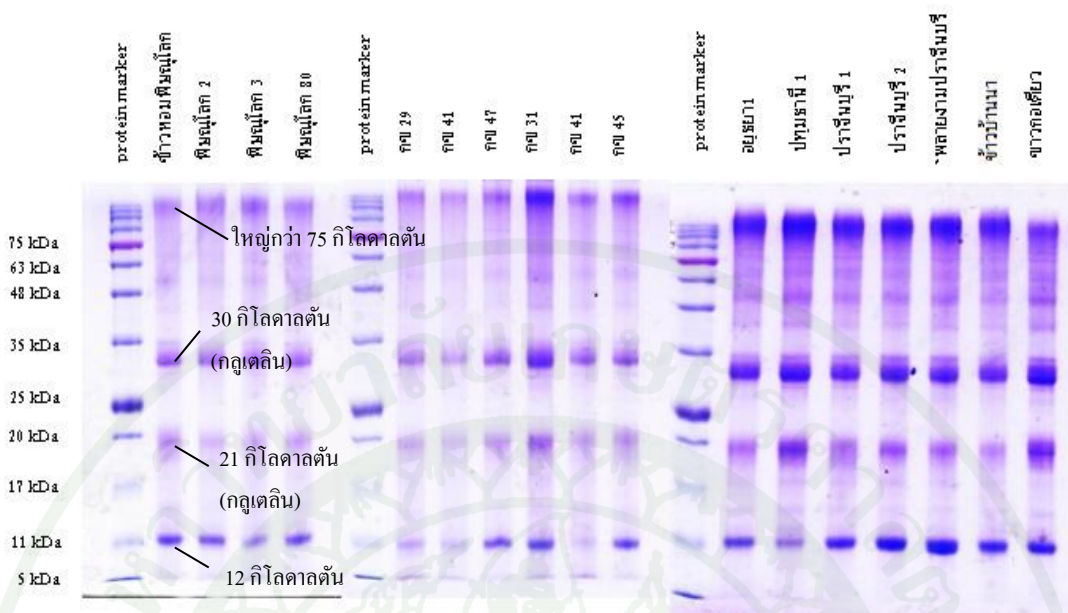


ข



ภาพที่ 8 รูปแบบโปรตีน (ก) อัลบูมิน (ข) โกลบูลินและ (ค) กลูเตลินที่สกัดจากข้าวขาว 16 พันธุ์

ก



ภาพที่ 8 (ต่อ)

2. การเตรียมโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเทลินจากเอนโดสเปิร์มของข้าวขาวและโปรตีนที่ละลายน้ำจากรำพันธุ์พิษณุโลก 2 และโปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซิน เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์

จากผลการทดลอง เมื่อทำการย่อยโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเทลินจากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าวขาวพันธุ์พิษณุโลก 2 (PSL2) และนำตะกอนโปรตีนได้แก่ อัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลิน และไฮโดรไลเสทของโปรตีนแต่ละชนิดมาอย่างละ 2 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตรพบว่าโปรตีนจากข้าวขาวและรำรวมทั้งไฮโดรไลเสทของโปรตีนแต่ละชนิดมีความเข้มข้นแตกต่างกันดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นโปรตีน(ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)เริ่มต้นของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลินในข้าวขาว โปรตีนที่ละลายน้ำจากรำพันธุ์พิษณุโลก 2 และไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้เมื่อนำตะกอนโปรตีน 2 มิลลิกรัมละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตรซึ่งหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรตในการทดลองที่ 6 และความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

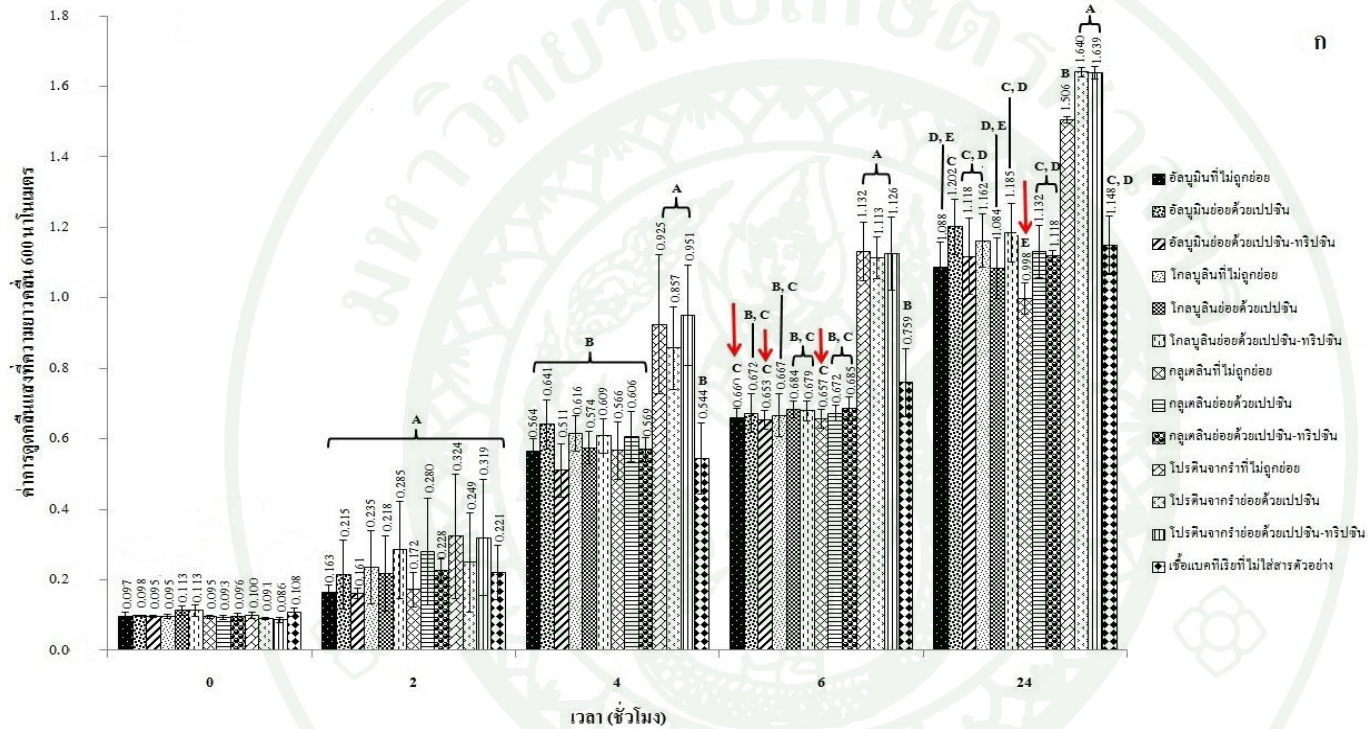
ชนิดของโปรตีน	ความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละชนิด (ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)					
	ไม่ผ่านการย่อย		ย่อยด้วยเปปซิน		ย่อยด้วยเปปซิน-ทริปซิน	
	เริ่ม	สุดท้าย	เริ่ม	สุดท้าย	เริ่ม	สุดท้าย
อัลบูมิน	38	7.6	133	26.6	398	79.6
โกลบูลิน	171	34.2	361	72.2	1,651	330.2
กลูเทลิน	0	0	361	72.2	778	155.6
รำ	1,139	227.8	1,082	216.4	1,120	224

*หมายเหตุ เริ่ม คือ ความเข้มข้นโปรตีนของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่เตรียมจากการนำตะกอน 2 มิลลิกรัมละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร
สุดท้าย คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างที่ใช้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

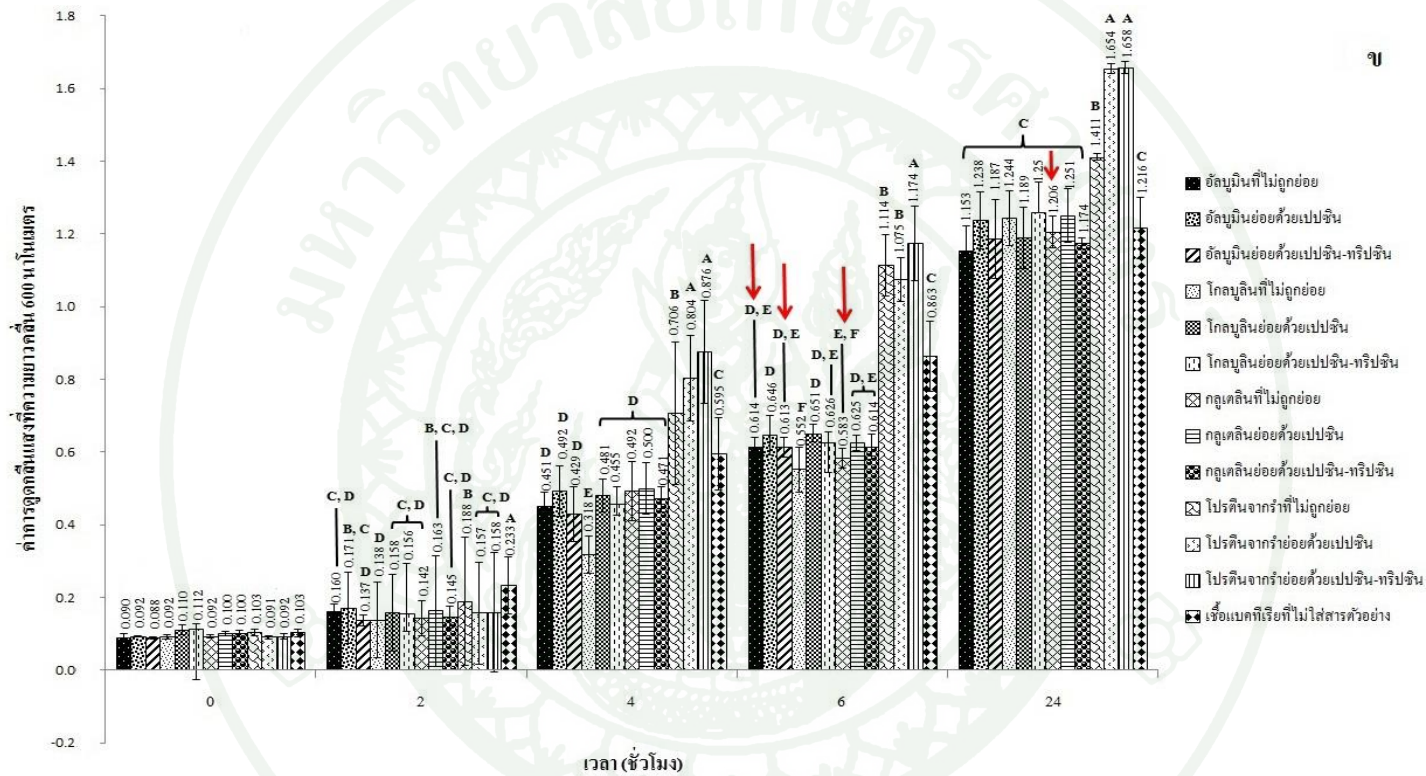
3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 4 สายพันธุ์ ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม (96-well microplate)

จากการเตรียมโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทของข้าวขาวทั้ง 9 ชนิดและรำ 3 ชนิด พบว่าเมื่อนำสารตัวอย่างมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. anitratus* DMST 4183, *A. baumannii* ATCC 19066, *A. lwoffii* ATCC 15309, *S. aureus* ATCC 25923 โดยใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในตารางที่ 4

โปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทบางชนิดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *A. anitratus* DMST 4183 โดยจากการทดลองทั้ง 2 ครั้งพบว่าเมื่อครบเวลา 6 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ใส่โปรตีนอัลบูมิน อัลบูมินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินและโปรตีนกลูเตลินมีการเจริญต่ำกว่าตัวอย่างอื่น และหาคควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง มีเพียงโปรตีนกลูเตลินเท่านั้นที่ยังยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนอัลบูมิน อัลบูมินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินและโปรตีนกลูเตลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ ตั้งแต่เวลา 4 ชั่วโมงขึ้นไป ตัวอย่างที่ใส่โปรตีนละลายน้ำจากรำและไฮโดรไลเสทจากรำทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญสูงกว่าตัวอย่างอื่นและหาคควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนละลายน้ำจากรำและไฮโดรไลเสทจากรำทั้ง 2 ชนิดส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียนี้ ดังแสดงในภาพที่ 9 (ก-ข)

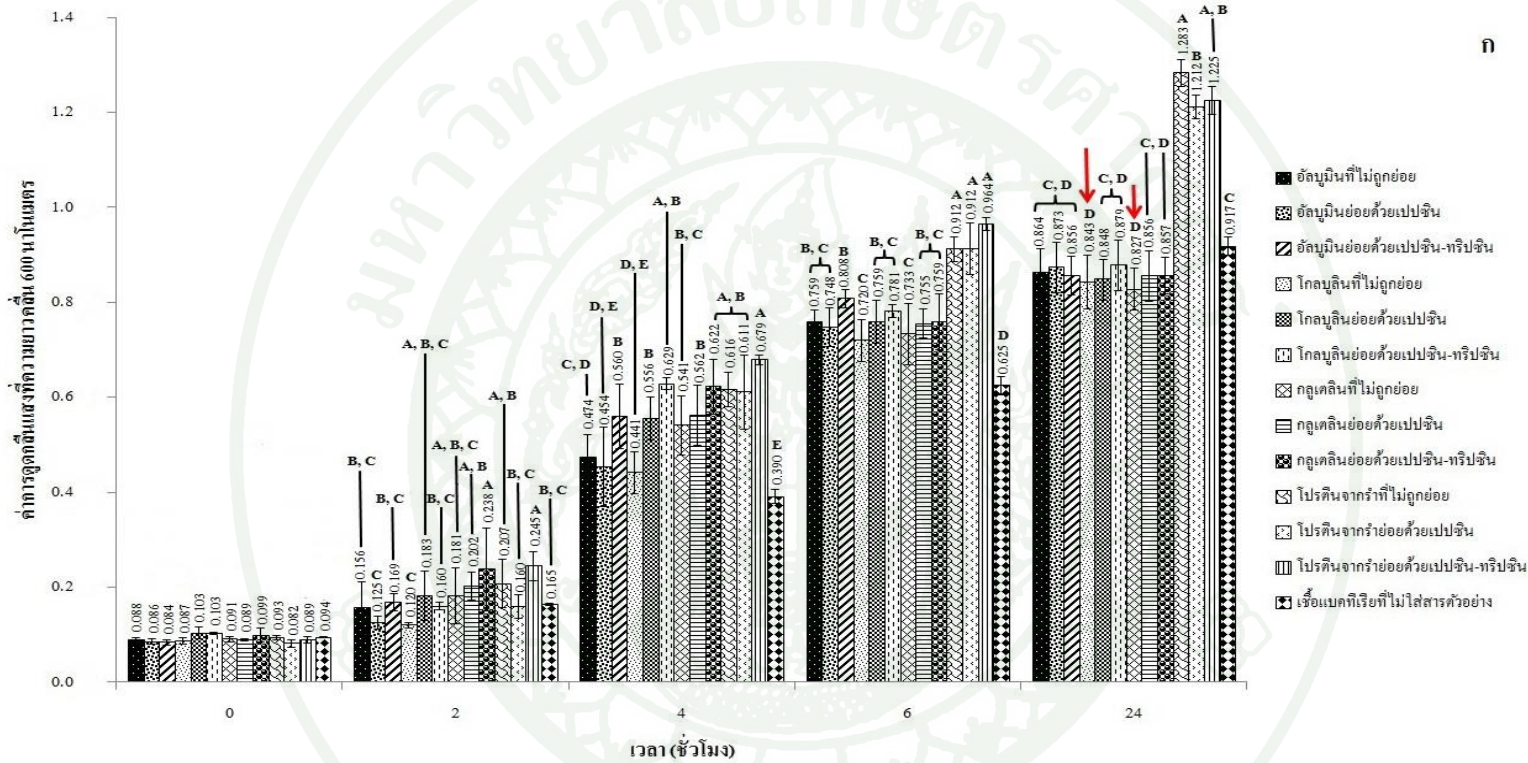


ภาพที่ 9ก แสดงความสามารถของ โปรตีนและ โปรตีนไฮโดรไลสของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิชณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. anitratus* DMST 4183 (ทดสอบครั้งที่ 1) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ใช้สารตัวอย่างเริ่มต้น 2 มิลลิกรัม น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)

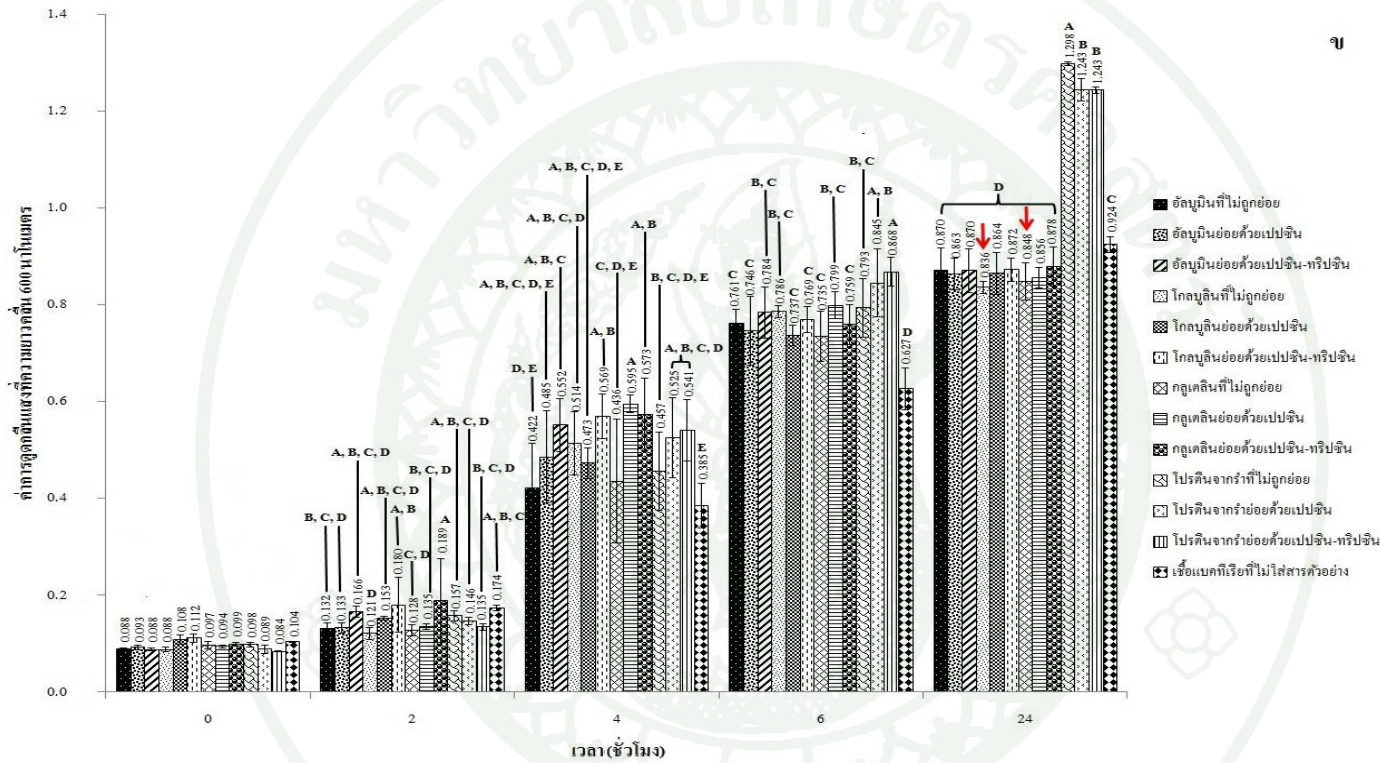


ภาพที่ 9 ข แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทของอัญมิน โกลบูลิน กลูเทลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. anitratus* DMST 4183 (ทดสอบครั้งที่ 2) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ใช้สารตัวอย่างเริ่มต้น 2 มิลลิกรัม น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)

โปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสจากบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิด *A. baumannii* ATCC 19066 โดยจากการทดลองทั้ง 2 ครั้งพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ใส่โปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินมีการเจริญของเชื้อต่ำกว่าตัวอย่างอื่นและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ในขณะที่ตัวอย่างที่ใส่โปรตีนละลายน้ำจากรำและไฮโดรไลสจากรำทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญของเชื้อสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเดียวกัน นอกจากนี้ที่เวลา 4 และ 6 ชั่วโมงพบว่าโปรตีนจากข้าวขาวและรำ รวมทั้งโปรตีนไฮโดรไลสของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด เร่งการเจริญของเชื้อชนิดนี้ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียนี้ได้ ในขณะที่โปรตีนละลายน้ำจากรำและไฮโดรไลสจากรำทั้ง 2 ชนิดส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ดังแสดงในภาพที่ 10 (ก-ข)



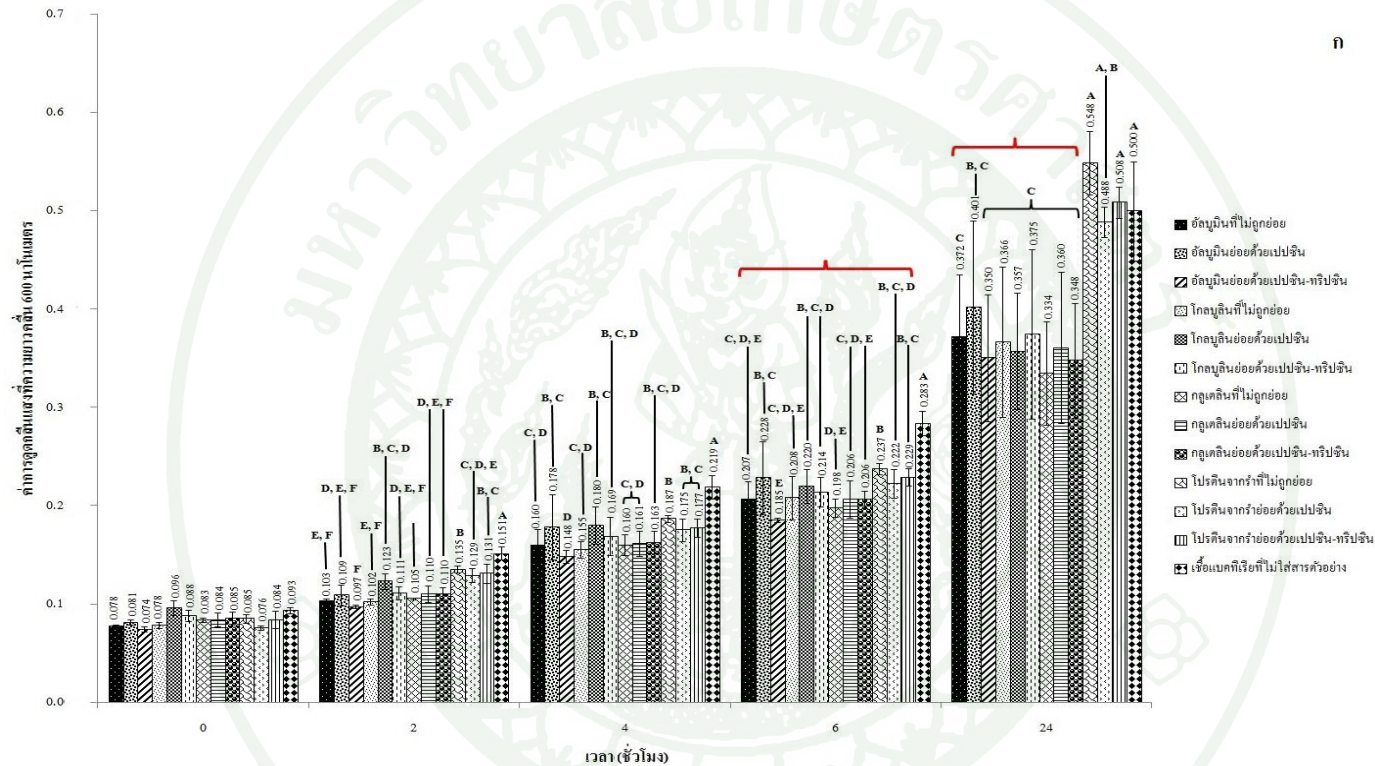
ภาพที่ 10ก แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พืชญูโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19066 (ทดสอบครั้งที่ 1) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ใช้สารตัวอย่างเริ่มต้น 2 มิลลิกรัม น้ำกลั่น 1 มิลลิตร)



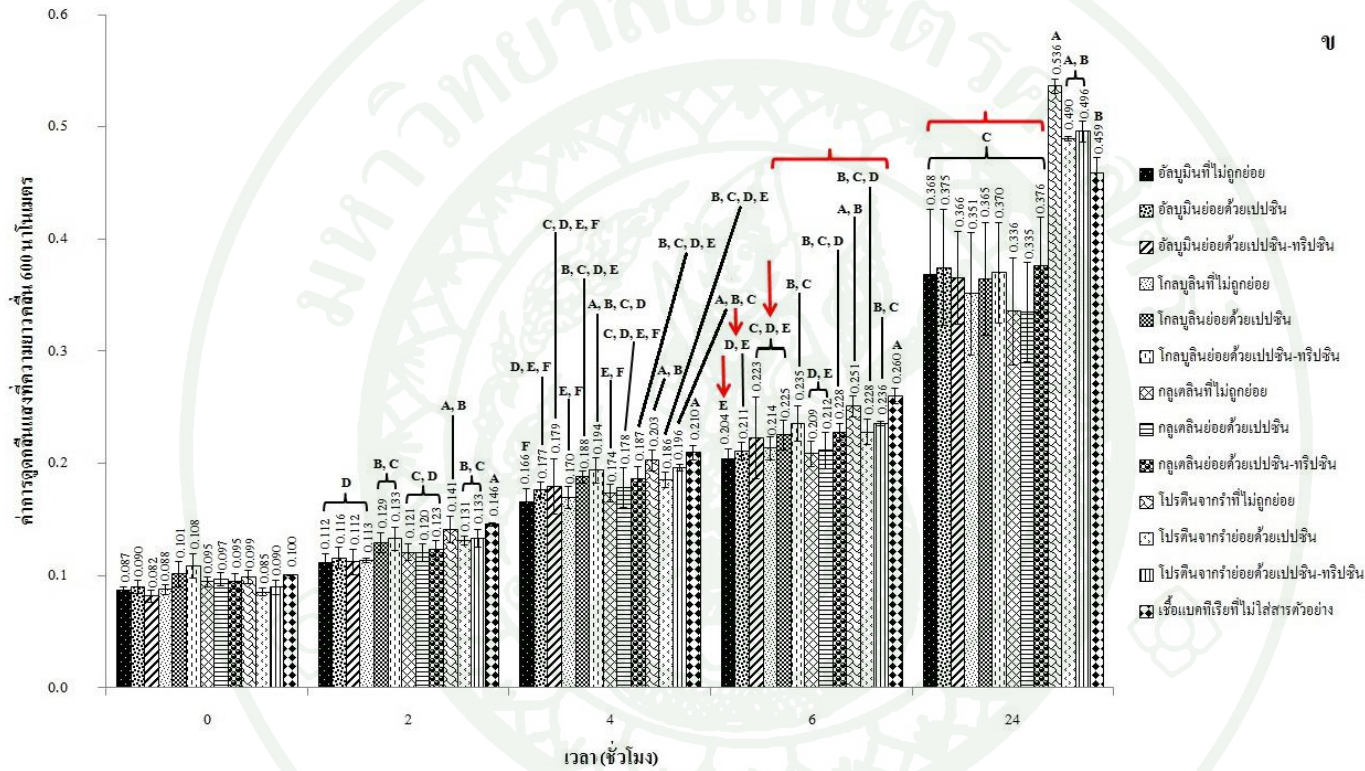
ข

ภาพที่ 10 ข แสดงความสามารถของ โปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิชณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. baumannii* ATCC 19066 (ทดสอบครั้งที่ 2) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ใช้สารตัวอย่างเริ่มต้น 2 มิลลิกรัม น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)

โปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสัททั้งหมดบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิด *A. lwoffii* ATCC 15309 โดยจากการทดลองทั้ง 2 ครั้งพบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ใส่โปรตีนจากข้าวขาวและรารวมทั้งไฮโดรไลสัทของโปรตีนแต่ละชนิดมีการเจริญต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่เวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ใส่โปรตีนและไฮโดรไลสัทจากข้าวขาวเท่านั้นที่มีการเจริญต่ำกว่าตัวอย่างอื่นและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่โปรตีนละลายน้ำจากรำและไฮโดรไลสัททั้ง 2 ชนิดจากรำเร่งการเจริญของเชื้อชนิดนี้ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนและไฮโดรไลสัทของโปรตีนแต่ละชนิดจากข้าวขาวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียนี้ได้ ในขณะที่โปรตีนละลายน้ำจากรำและไฮโดรไลสัททั้ง 2 ชนิดจากรำส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ดังแสดงในภาพที่ 11 (ก-ข)



ภาพที่ 11ก แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทของอัญมูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. lwoffii* ATCC 15309 (ทดสอบครั้งที่ 1) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ใช้สารตัวอย่างเริ่มต้น 2 มิลลิกรัม น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)

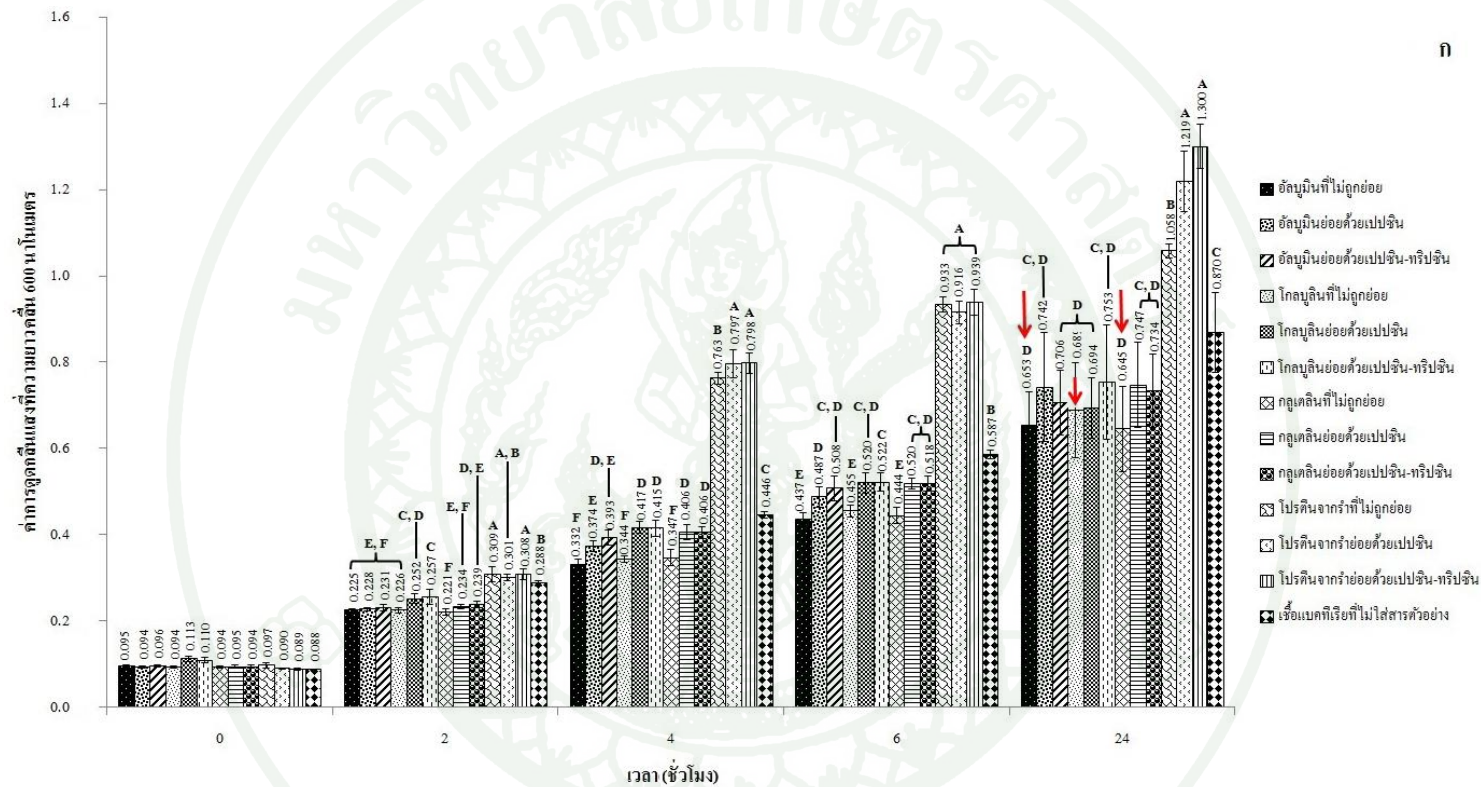


ป

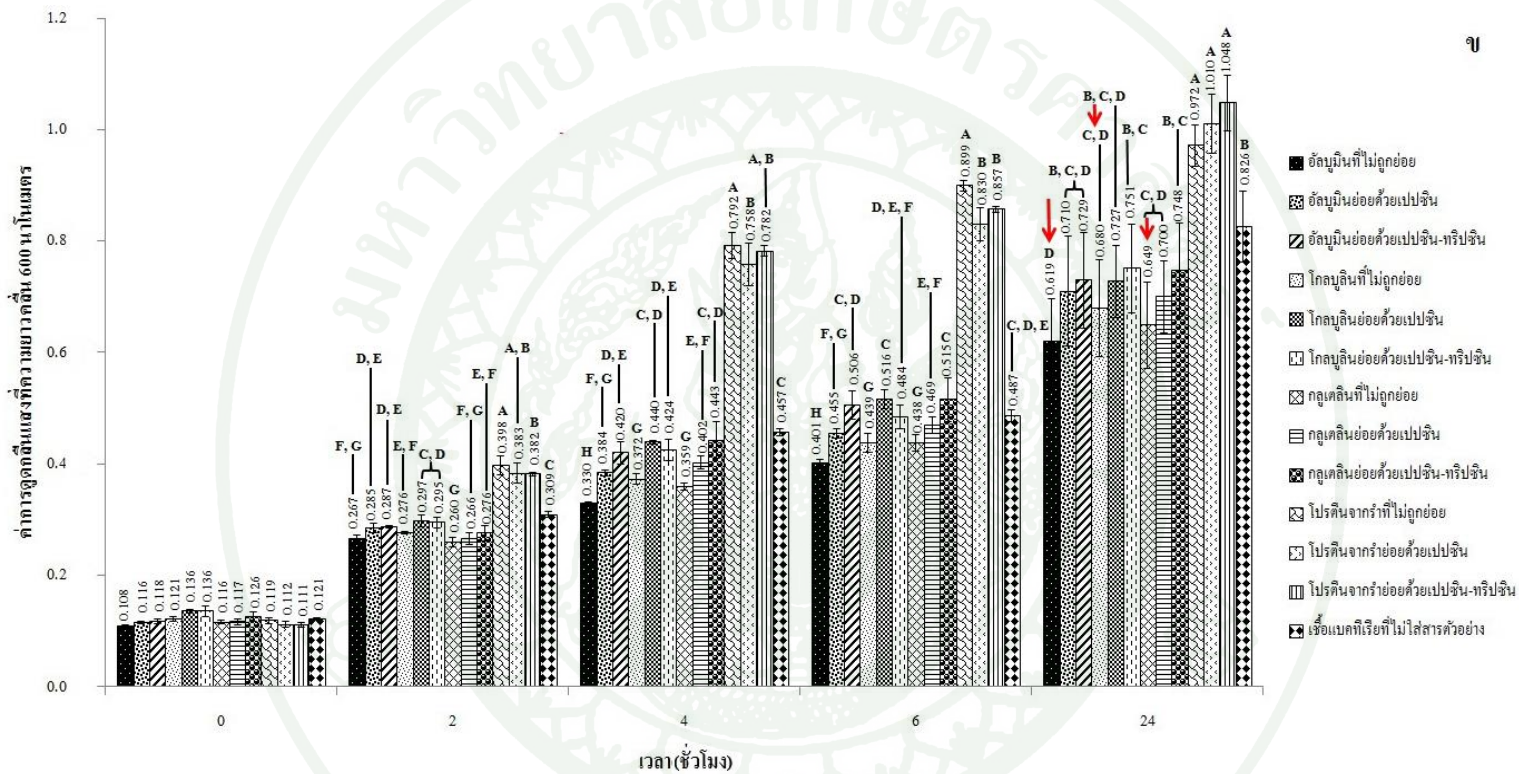
ภาพที่ 11 ข แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลสของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. Iwoffii* ATCC 15309 (ทดสอบครั้งที่ 2) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ใช้สารตัวอย่างเริ่มต้น 2 มิลลิกรัม น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)

โปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิด *S.aureus* ATCC 25923 โดยจากการทดลองทั้ง 2 ครั้งพบว่าที่เวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ใส่โปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเตลินมีการเจริญต่ำกว่าตัวอย่างอื่นและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเตลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียนี้ได้ ในขณะที่ที่เวลา 4 ชั่วโมงขึ้นไป ตัวอย่างที่ใส่โปรตีนละลายน้ำจากรำและไฮโดรไลเสทจากรำทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญสูงกว่าตัวอย่างอื่นและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนละลายน้ำจากรำและไฮโดรไลเสทจากรำทั้ง 2 ชนิดส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 12 (ก-ข)





ภาพที่ 12ก แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 (ทดสอบครั้งที่ 1) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ใช้สารตัวอย่างเริ่มต้น 2 มิลลิกรัม น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)



ภาพที่ 12ข แสดงความสามารถของโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเสทของอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวและรำพันธุ์พิษณุโลก 2 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 (ทดสอบครั้งที่ 2) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ใช้สารตัวอย่างเริ่มต้น 2 มิลลิกรัม น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร)

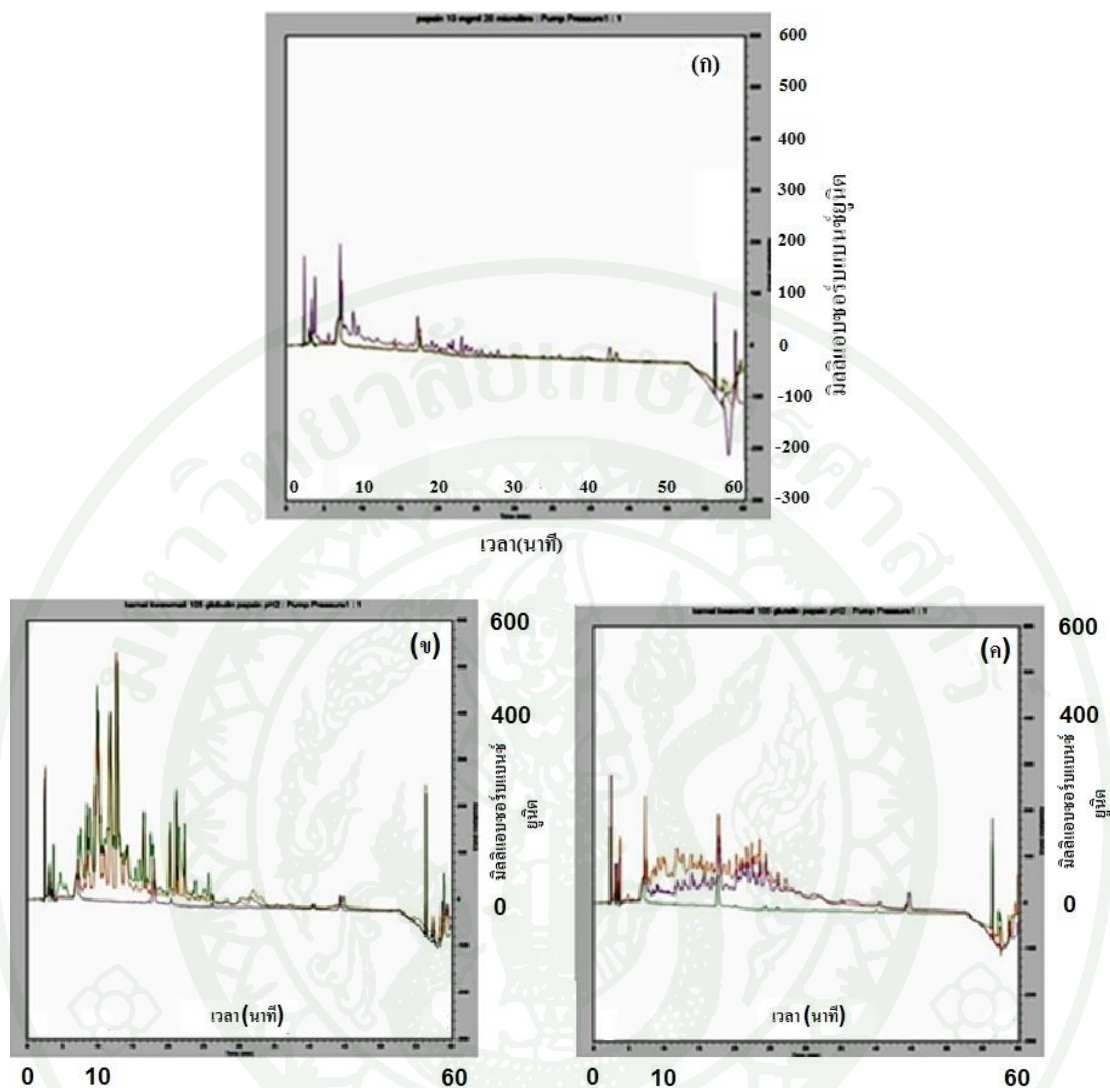
4. การเตรียมโปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินจากเอนโดสเปิร์มของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และโปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซิน

โปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินที่สกัดได้จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 1 กิโลกรัมเมื่อผ่านการระเหยแห้งแล้วมีประมาณ 0.8 กรัมและ 16 กรัมตามลำดับ และเมื่อทำการย่อยโปรตีนทั้งสองชนิดด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซินและตรวจสอบการย่อยของโปรตีนด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับ (RP – HPLC) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโครมาโทแกรมเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนก่อนย่อยซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองชนิดถูกย่อยโดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงให้เห็นในภาพที่ 13 (ข) และ (ค) โดยรูป (ก) คือโครมาโทแกรมของตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารตัวอย่าง (น้ำ) และเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสารตัวอย่าง

เมื่อนำตะกอนโปรตีนของโกลบูลิน กลูเตลินที่ไม่ผ่านการย่อยและโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนทั้งสองชนิดจำนวน 10 มิลลิกรัมที่ผ่านการระเหยแห้งแล้ว เติมน้ำกลั่น (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ลงไป 1 มิลลิลิตร พบว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านการย่อยและโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนทั้งสองชนิดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของโกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก่อนการย่อยและโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการระเหยแห้งจำนวน 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)		
	ก่อนย่อย	เปปซิน	เปปซิน – ทริปซิน
โกลบูลิน	3.4±0.2	1.5±0.1	0.1±0.0
กลูเตลิน	5.1±0.2	1.2±0.1	0.2±0.0



รูปที่ 13 แสดงความสามารถในการย่อยโปรตีน โกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซิน โดย (ก) เบียร์รายน: น้ำ (เขียว) – เปปซิน (ม่วง) – ทริปซิน (แดง) (ข) โกลบูลินที่ไม่ถูกย่อย (ม่วง) – โกลบูลินย่อยด้วยเปปซิน (แดง) – โกลบูลินย่อยด้วยเปปซิน-ทริปซิน (เขียว) (ค) กลูเตลินที่ไม่ถูกย่อย (เขียว)- กลูเตลินย่อยด้วยเปปซิน (ม่วง) – กลูเตลินย่อยด้วยเปปซิน - ทริปซิน (แดง)

5. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 11 สายพันธุ์ ในหลอดทดลอง

เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *B.subtilis* ATCC 6633, *E.aerogenes* ATCC 13048, *E.coli* ATCC 8739, *E.coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 6538, *S.aureus* ATCC 6538P, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *S.epidermidis* ATCC 12228 ด้วยโกลบูลินไฮโดรไลสและกลูเตลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซิน-ทริปซิน (จากข้าวขาวดอกมะลิ 105) ที่เวลา 0, 3, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 14-24

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ATCC 6633 พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมงขึ้นไป กลูเตลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซิน-ทริปซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ถูกทดสอบด้วยโกลบูลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซิน-ทริปซิน

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E.aerogenes* ATCC 13048 ทั้งโกลบูลินไฮโดรไลสและกลูเตลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซิน-ทริปซินไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ATCC 8739 พบว่าที่เวลา 3, 6 และ 24 ชั่วโมง โกลบูลินไฮโดรไลสและกลูเตลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซิน-ทริปซินสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ATCC 25922 พบว่าที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง โกลบูลินไฮโดรไลสและกลูเตลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซิน-ทริปซินส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนที่เวลา 24 ชั่วโมงโกลบูลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซิน-ทริปซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ

ของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ถูกทดสอบด้วยกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* O157:H7 ที่เวลา 3 ชั่วโมง โกลบูลินไฮโดรไลเสทและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และที่เวลา 6 ชั่วโมงมีเพียงโกลบูลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินเท่านั้นที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ถูกทดสอบด้วยกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* ATCC 25923 ที่เวลา 6 ชั่วโมงขึ้นไป ทั้งโกลบูลินไฮโดรไลเสทและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* ATCC 6538 พบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง โกลบูลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ถูกทดสอบด้วยกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* ATCC 6538P ทั้งโกลบูลินไฮโดรไลเสทและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P.aeruginosa* ATCC 27853 พบว่าที่เวลา 3, 6 และ 8 ชั่วโมง ทั้งโกลบูลินไฮโดรไลเสทและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

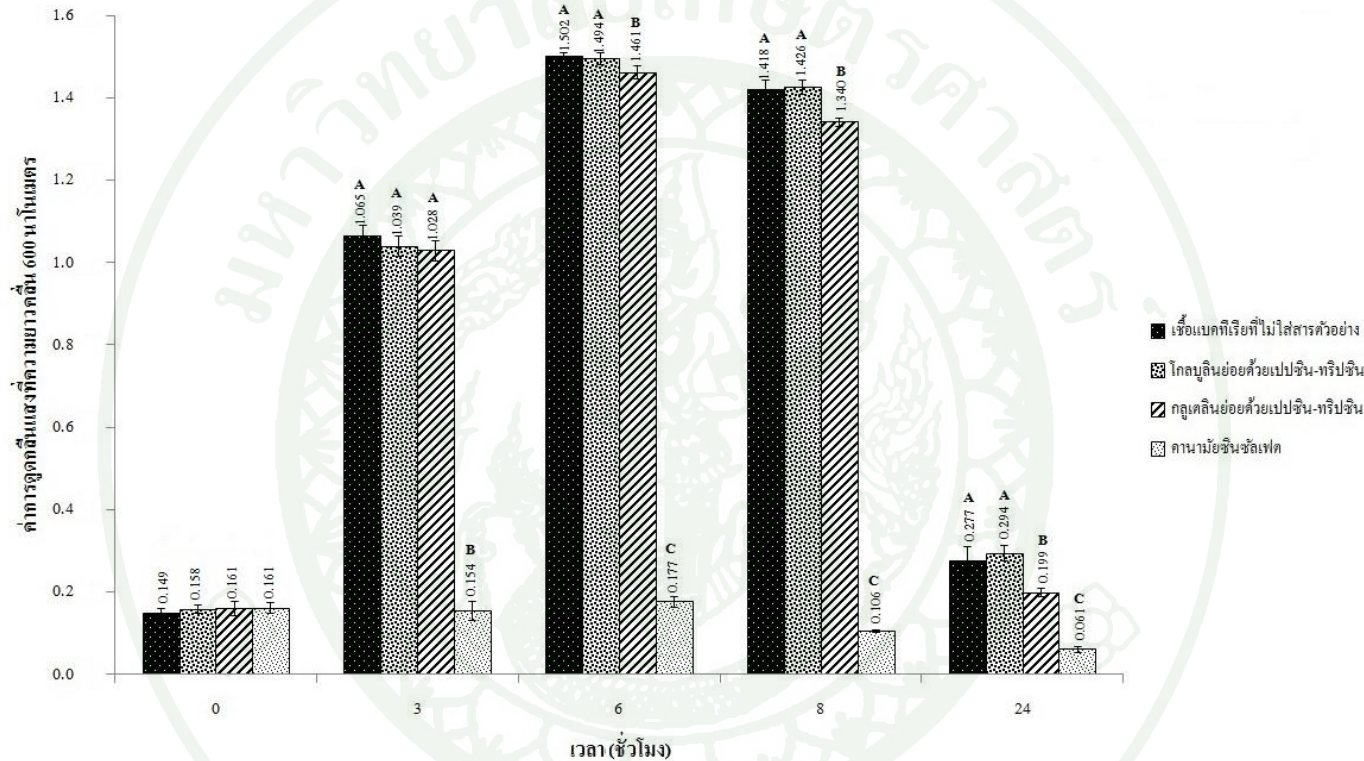
เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P.aeruginosa* ATCC 9027 พบว่าที่เวลา 8 ชั่วโมง โกลบูลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ถูกทดสอบด้วยกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S.epidermidis* ATCC 12228 จำนวน 2 ซ้ำที่ไม่ขึ้นต่อกัน พบว่าที่เวลา 3, 6 และ 8 ชั่วโมงทั้งโกลบูลินไฮโดรไลเสทและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

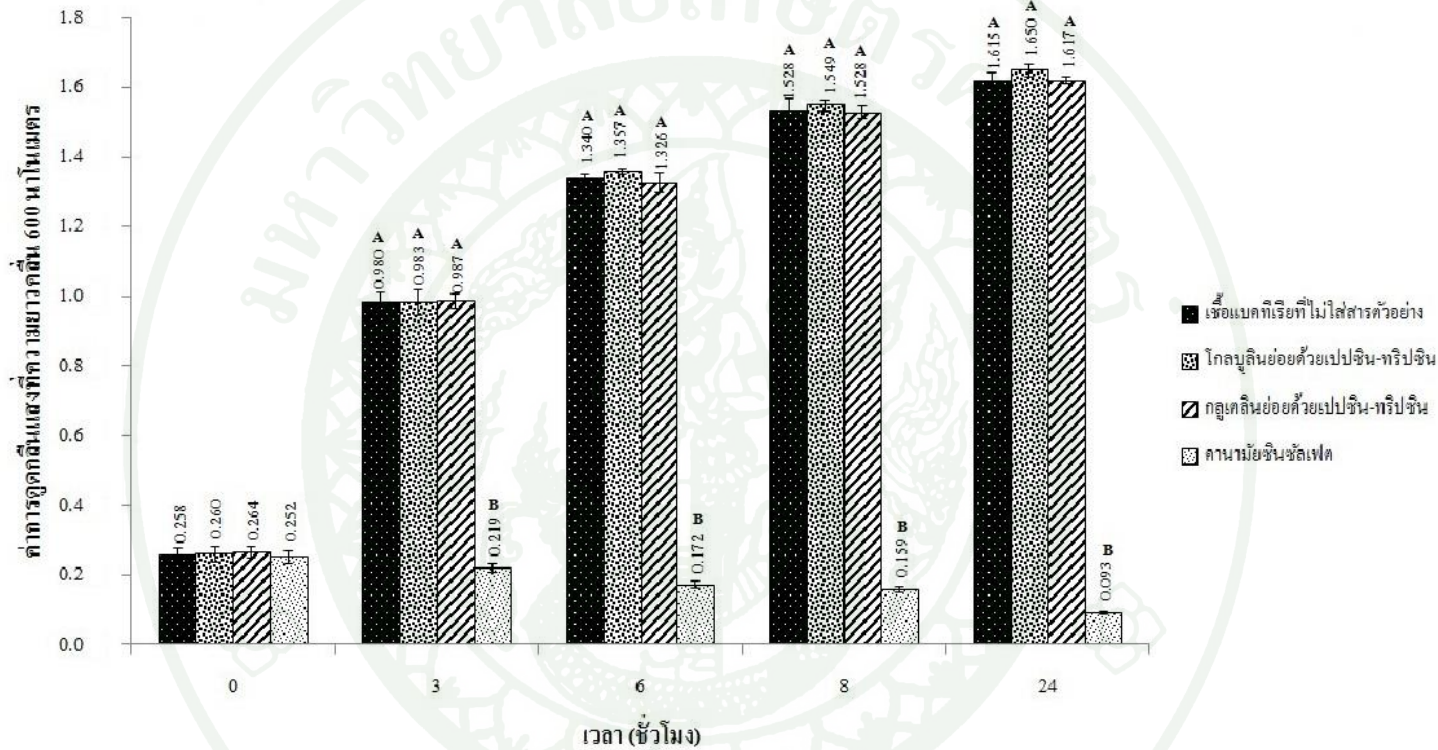
จากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่าโกลบูลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 11 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สรุปผลความสามารถของโกลบูลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซิน-ทริปซินและกลูเตลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซิน-ทริปซินในการยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 11 สายพันธุ์

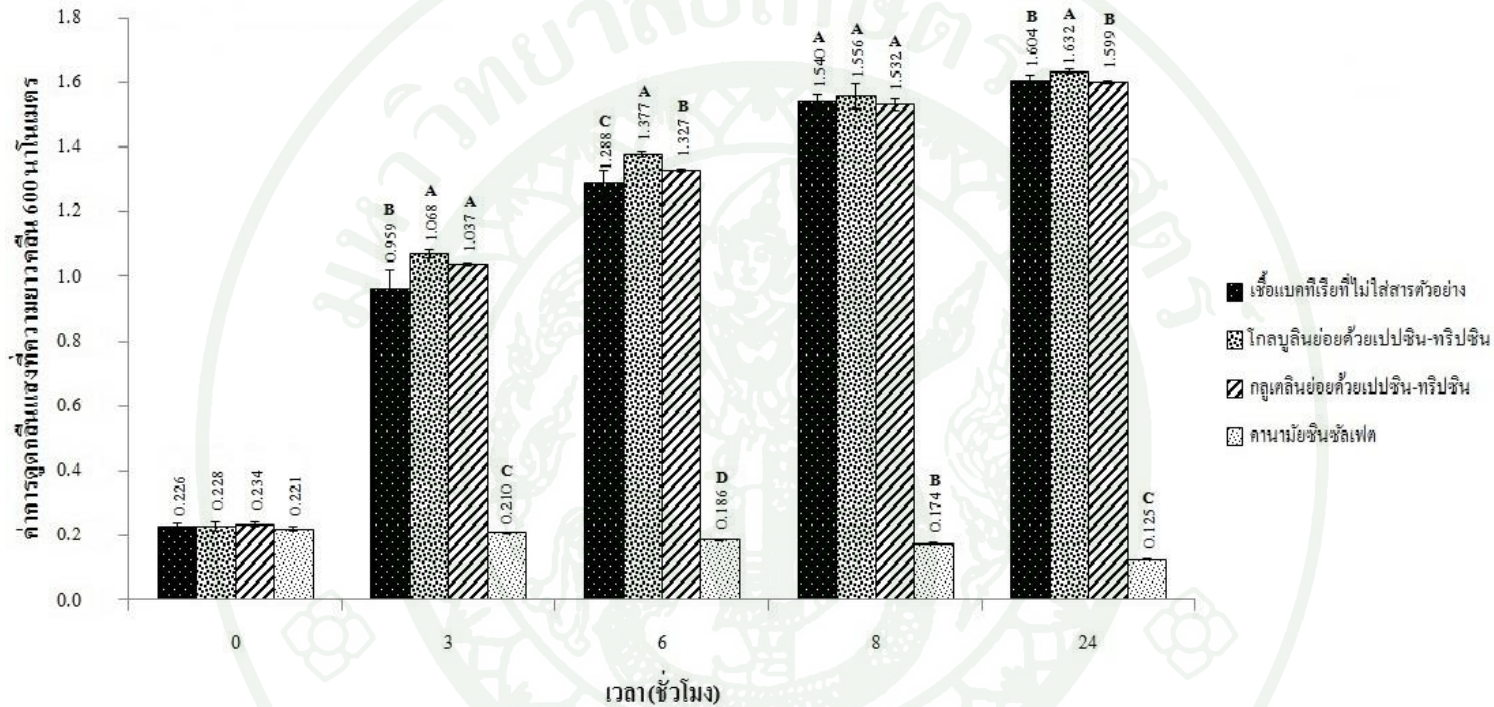
เชื้อแบคทีเรีย	โกลบูลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซิน-ทริปซิน		กลูเตลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซิน-ทริปซิน	
	ยับยั้ง	ส่งเสริม	ยับยั้ง	ส่งเสริม
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	-	-	√	-
<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	-	-
<i>E.coli.</i> ATCC 8739	-	√	-	√
<i>E.coli.</i> ATCC 25922	-	√	-	√
<i>E.coli.</i> O157:H7	-	√	-	√
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	√	-	√
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	-	√	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	-	√	-	√
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	-	√	-	-
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	-	√	-	√



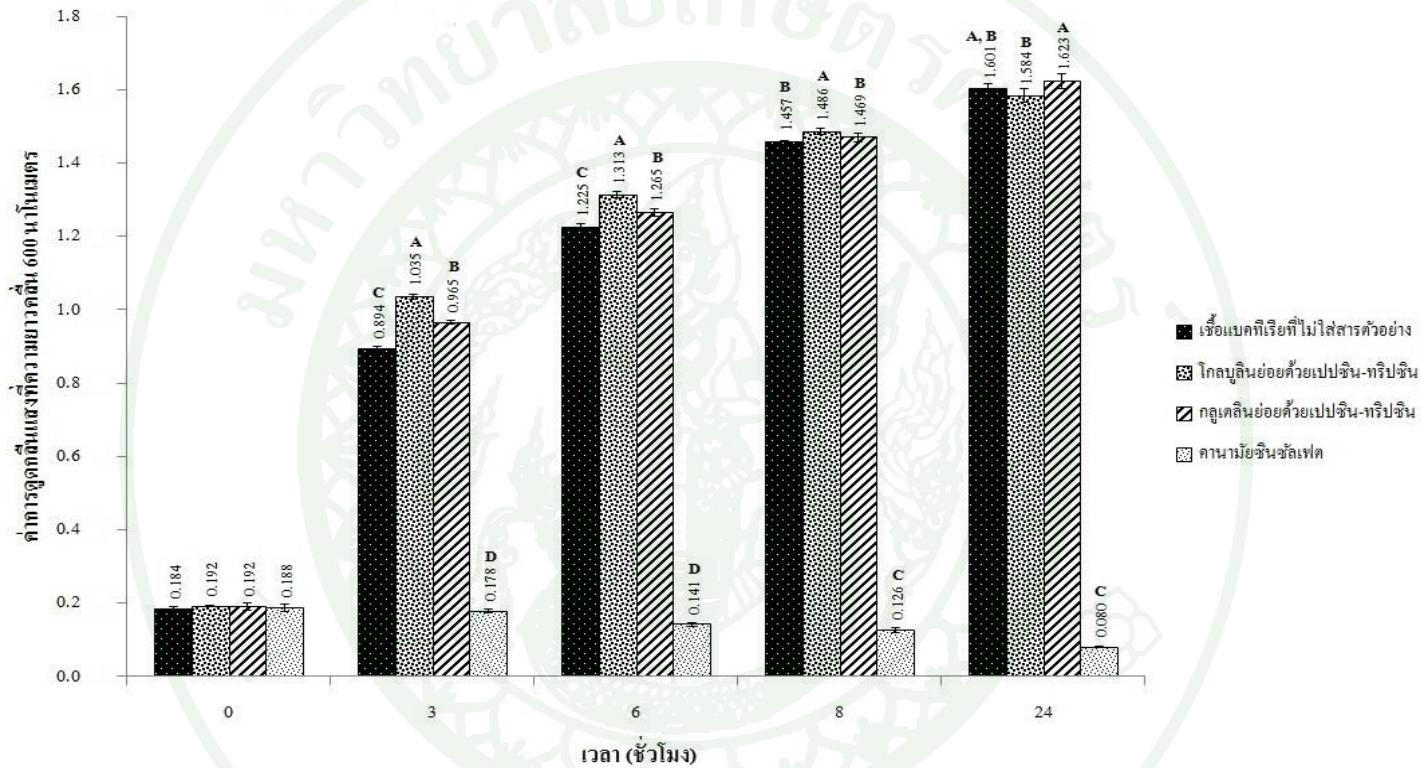
ภาพที่ 14 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของไกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B.subtilis* ATCC 6633 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของไกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลสชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร)



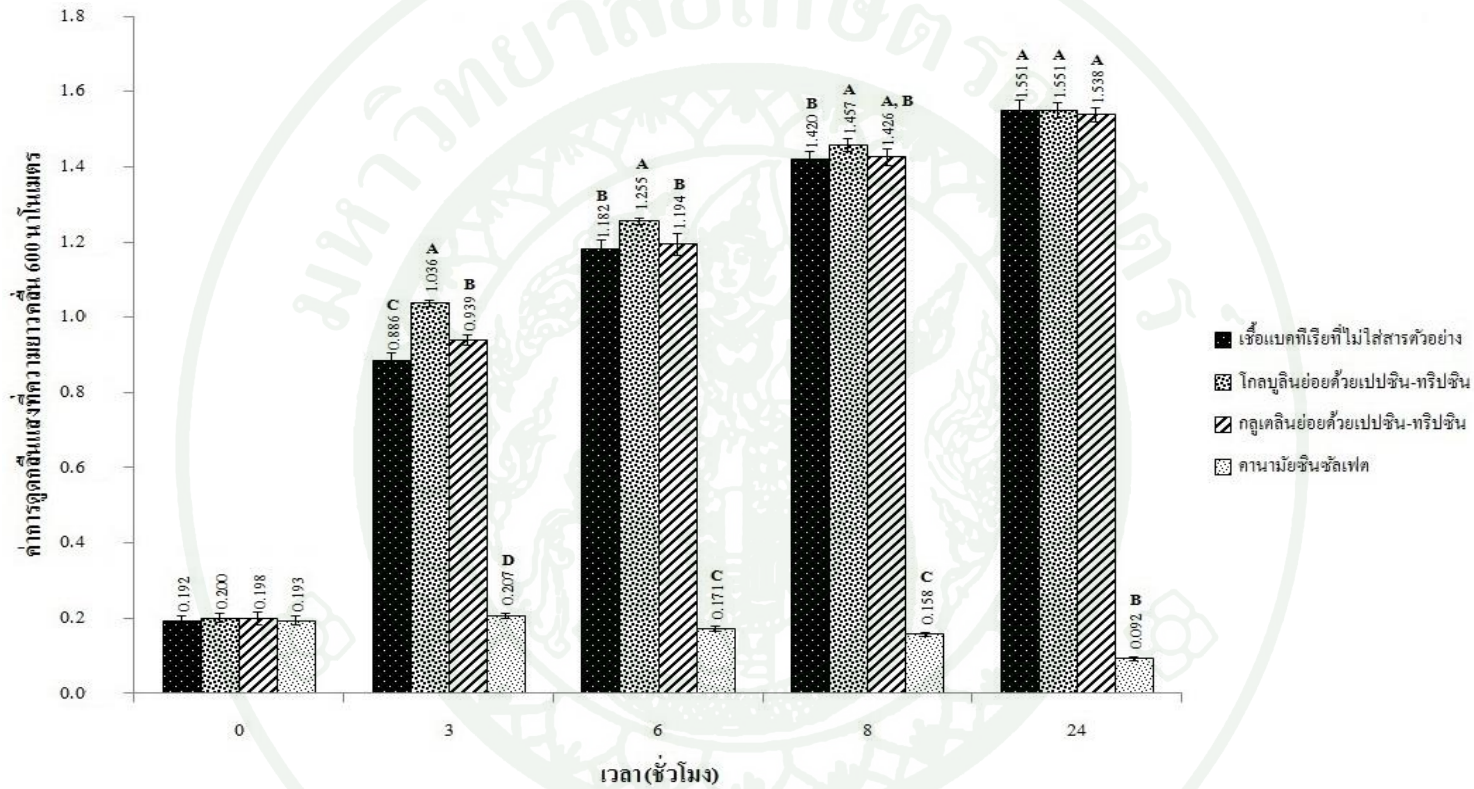
ภาพที่ 15 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทของไกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.aerogenes* ATCC 13048 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษ แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของไกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)



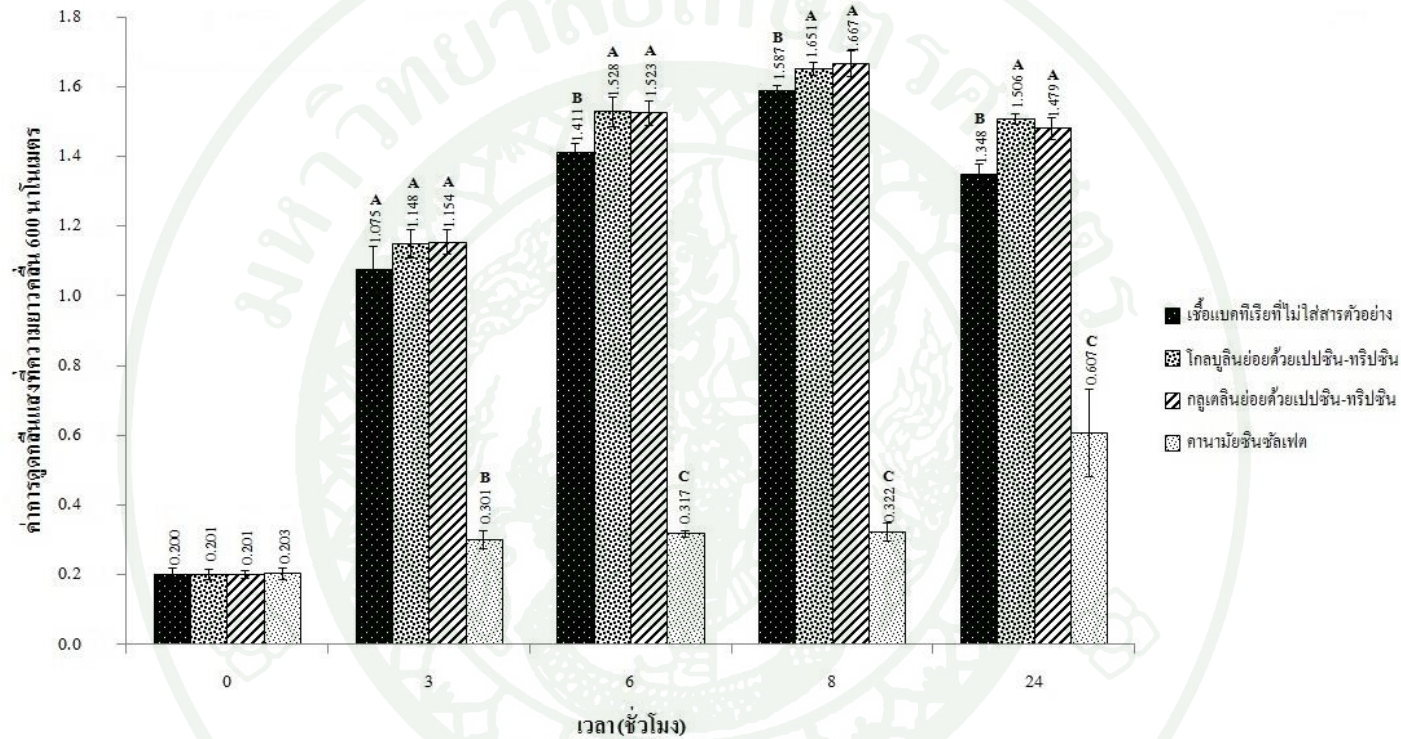
ภาพที่ 16 แสดงความสามารถของ โปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli* ATCC 8739 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษ แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของโกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลสชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)



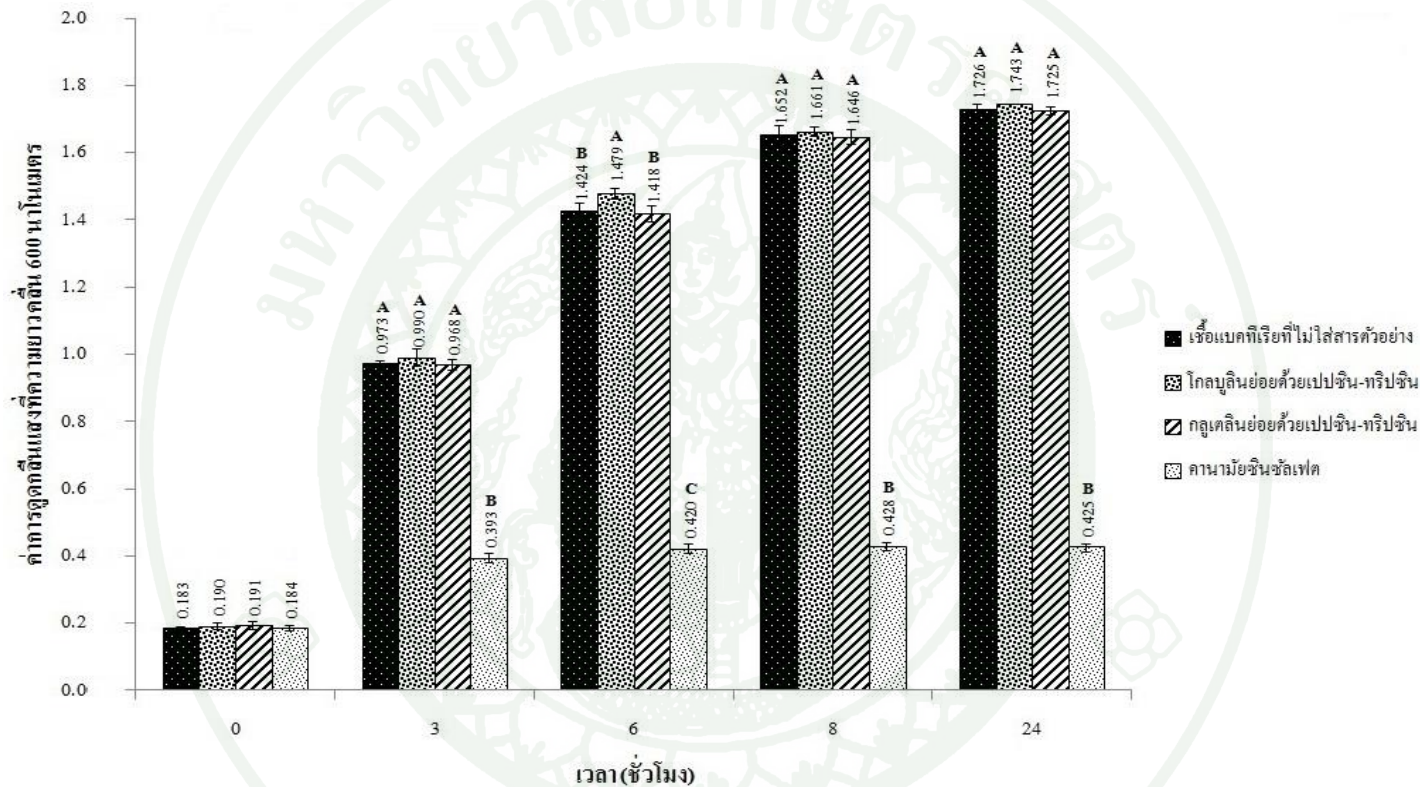
ภาพที่ 17 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทของโกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของโกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)



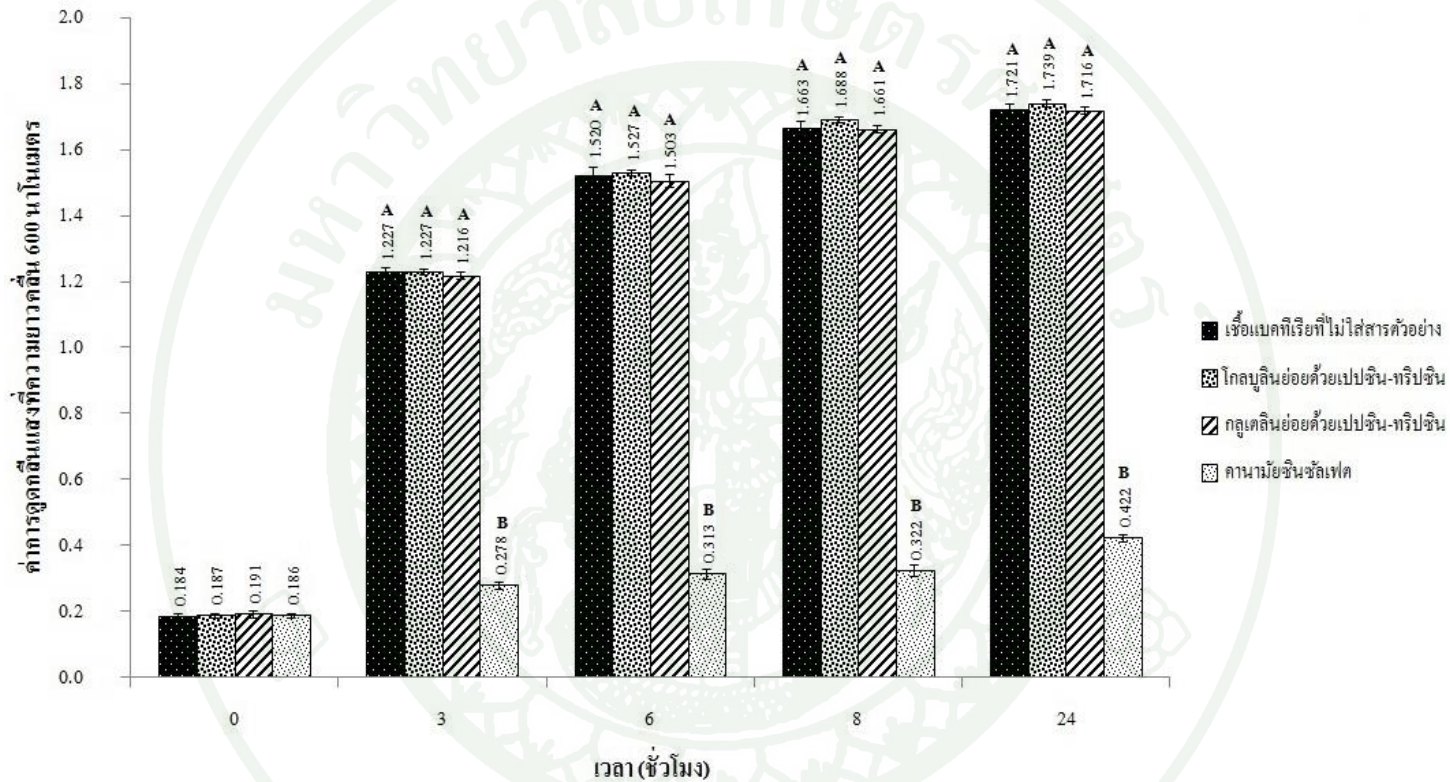
ภาพที่ 18 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทของโกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli* O157:H7 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของโกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)



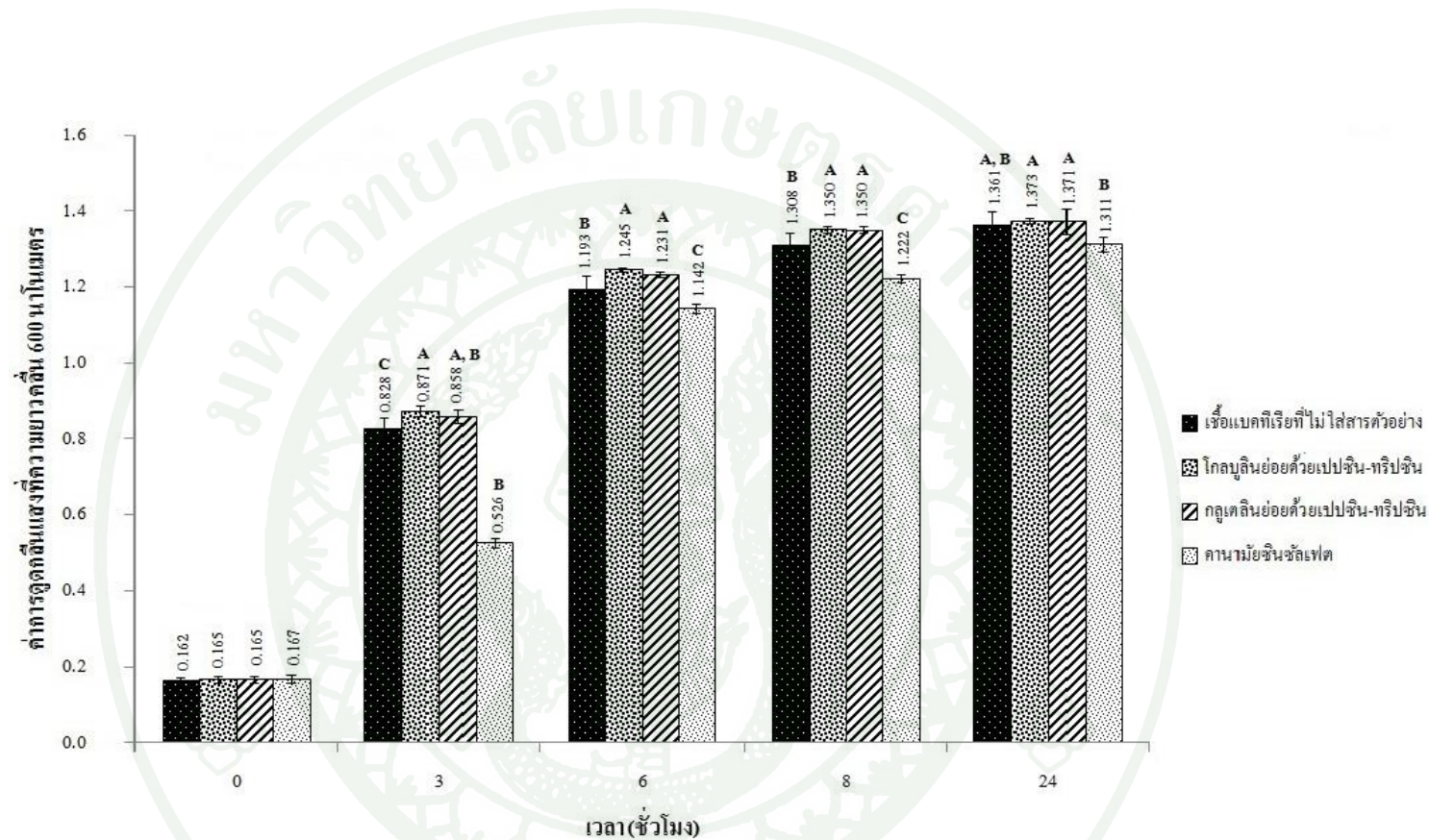
ภาพที่ 19 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทของโกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของโกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)



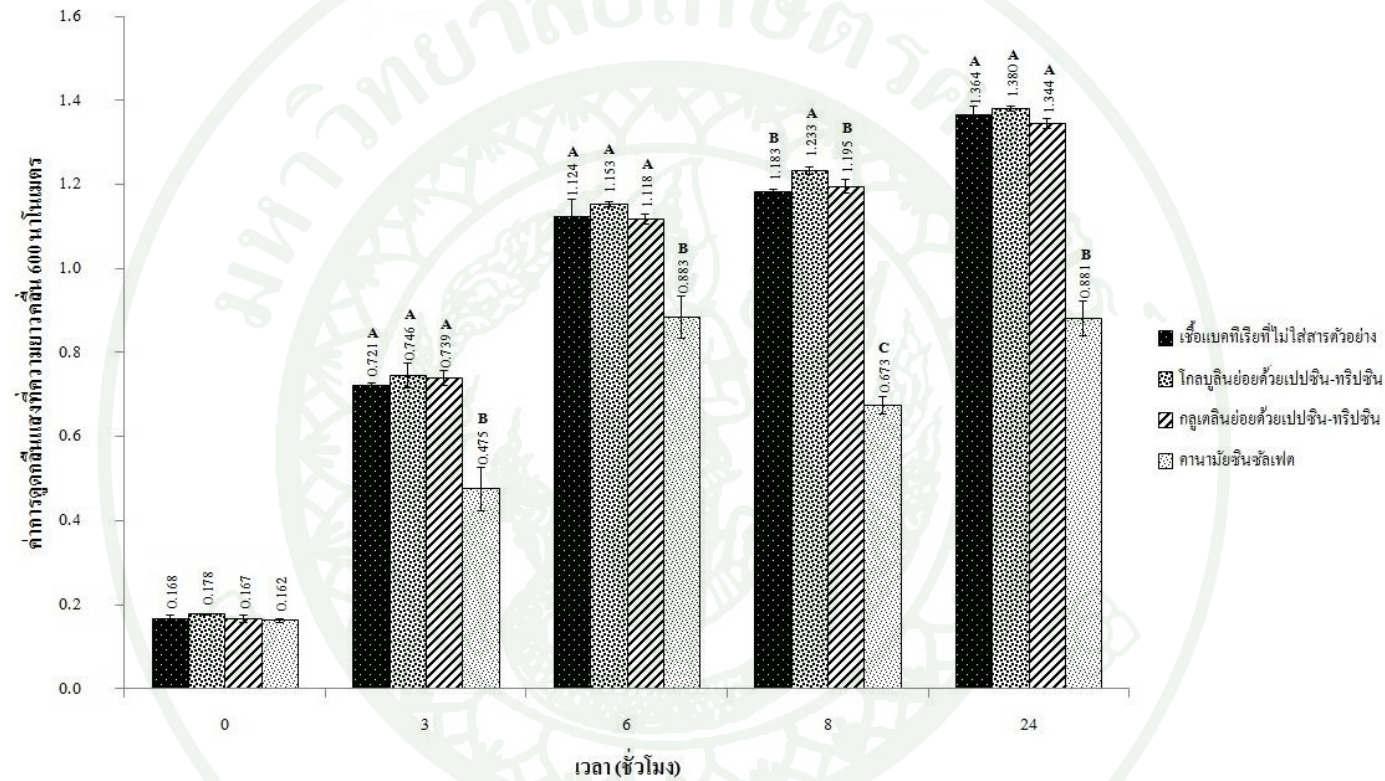
ภาพที่ 20 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสของโกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.aureus* ATCC 6538 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของโกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลสชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร)



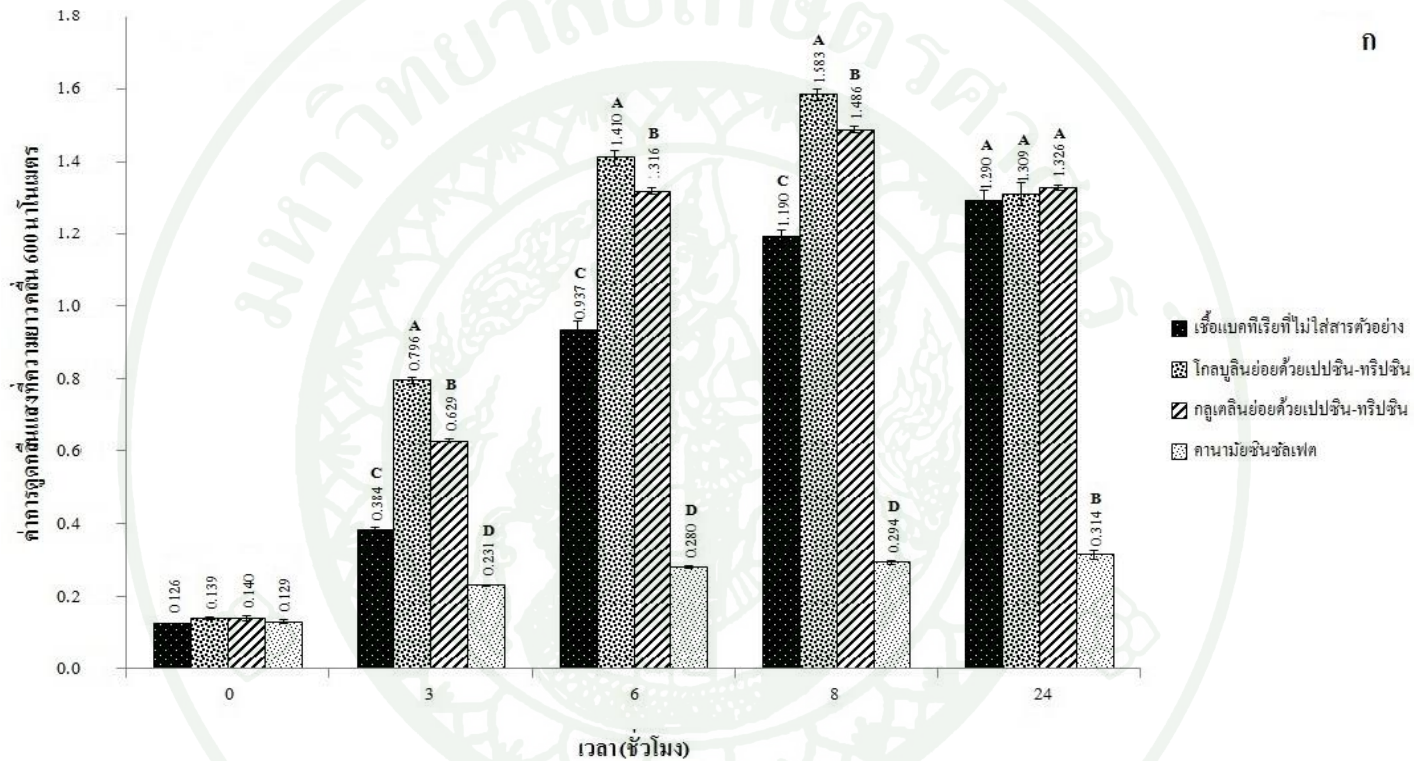
ภาพที่ 21 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทของไกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.aureus* ATCC 6538P โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของไกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)



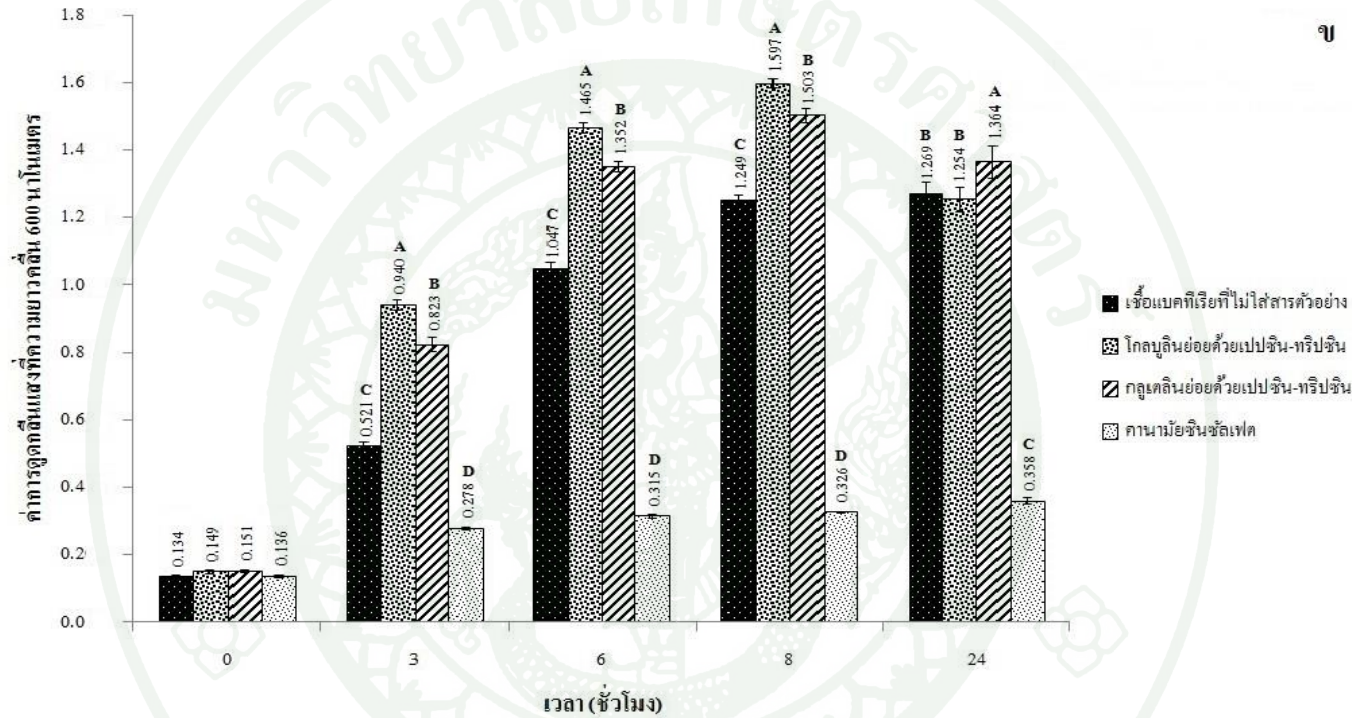
ภาพที่ 22 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทของไกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* ATCC 27853 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษ แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของไกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสท ชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)



ภาพที่ 23 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทของโกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* ATCC 9027 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษ แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของโกลบูลินและกลูเทลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร)



ภาพที่ 24 ก แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเตสของโกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.epidermidis* ATCC 12228 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษ แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของโกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลเตส ชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร)



ภาพที่ 24 แสดงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทของโกลบูลินและกลูเทลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวัดด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษ แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของโกลบูลินและกลูเทลินไฮโดรไลเสท ชนิดเปปซิน-ทริปซิน = 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร)

6. การศึกษาความสามารถเบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระชนิด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) ของโปรตีนโกลบูลิน กลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และโปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด

เมื่อชั่งตะกอนโกลบูลิน กลูเตลินและโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการระเหยแห้งอย่างละ 10 มิลลิกรัม ละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทละลายได้หมดในขณะที่โปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินละลายได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ดังนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงโปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินและนำเฉพาะส่วนใสมาใช้ในการทดสอบเมื่อทดลองหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 50 และ 100 ไมโครลิตร พบว่าโปรตีนโกลบูลินและกลูเตลินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซิน เมื่อใช้ปริมาณตะกอนโปรตีนเริ่มต้นเท่ากันโดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงในรูป %scavenging effect (%SE) หรือร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระดังแสดงในตารางที่ 7

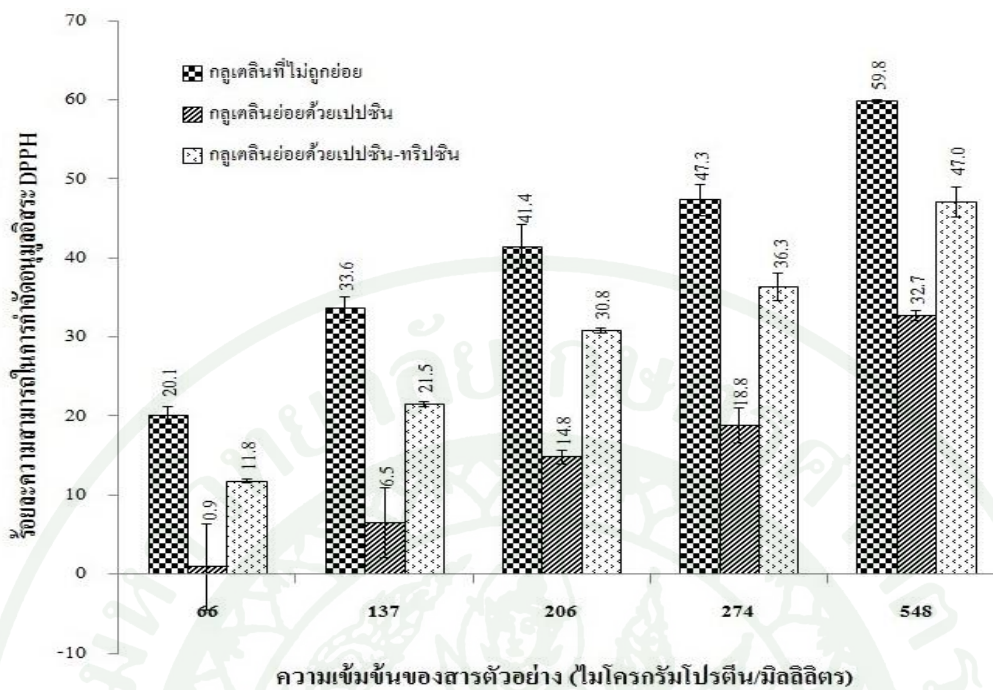
ตารางที่ 7 แสดงร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (%SE) ของโปรตีน โกลบูลินและกลูเตลิน
เปรียบเทียบกับไฮโดรไลเสทของโปรตีนทั้งสองชนิดเมื่อชั่งตะกอน โปรตีนที่ผ่านการ
ระเหยแห้ง 10 มิลลิกรัมในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 50 มิลลิ
โมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารตัวอย่าง	ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ	
	50 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
โกลบูลิน	8.3 ± 0.9%	13.9 ± 0.3%
โกลบูลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซิน	8.6 ± 2.0%	11.6 ± 0.7%
โกลบูลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซิน-ทริปซิน	-1.1 ± 6.2%	4.0 ± 0.6%
กลูเตลิน	28.4 ± 2.7%	38.0 ± 4.7%
กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซิน	4.6 ± 1.2%	8.4 ± 2.0%
กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซิน-ทริปซิน	2.8 ± 0.5%	-0.5 ± 1.1%

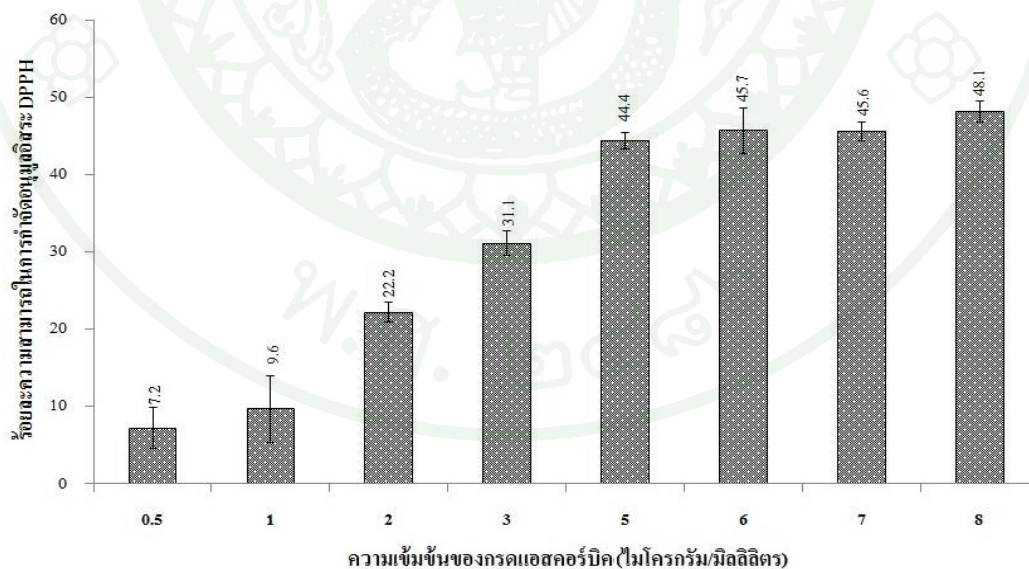
จากผลการทดลองในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลูเตลินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล
อิสระ DPPH มากกว่าโปรตีนโกลบูลิน ไฮโดรไลเสทของโกลบูลินและกลูเตลินชนิดเปปซินและ
ชนิดเปปซิน-ทริปซิน ดังนั้น ในการทดลองขั้นถัดไป เฉพาะ โปรตีนกลูเตลินเท่านั้นที่ถูกเลือกมา
เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุดและเป็นโปรตีนที่สามารถสกัดออกมาได้เป็น
ปริมาณมาก

7. การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH•) ของโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสท

เมื่อนำโปรตีนกลูเตลินและโปรตีนไฮโดรไลเสททั้งสองชนิดมาทดสอบหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยเพิ่มปริมาณของตะกอนเพื่อให้ได้ความเข้มข้นโปรตีนที่ใช้ทดสอบเท่ากัน ดังนั้น สารตัวอย่างจะมีความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนเท่ากับ 66, 137, 206, 274 และ 548 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร พบว่าโปรตีนกลูเตลินมีร้อยละความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด แต่เมื่อผ่านการย่อยด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซินแล้ว ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH กลับมีค่าลดลงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองแรก ดังแสดงในภาพที่ 25 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของกรดแอสคอร์บิก (ภาพที่ 26) แล้ว พบว่าต้องใช้โปรตีนกลูเตลินถึง 274 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรจึงจะมีร้อยละความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ใกล้เคียงกับเมื่อใช้กรดแอสคอร์บิก 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยค่า IC_{50} ของกลูเตลินและกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ 0.19 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



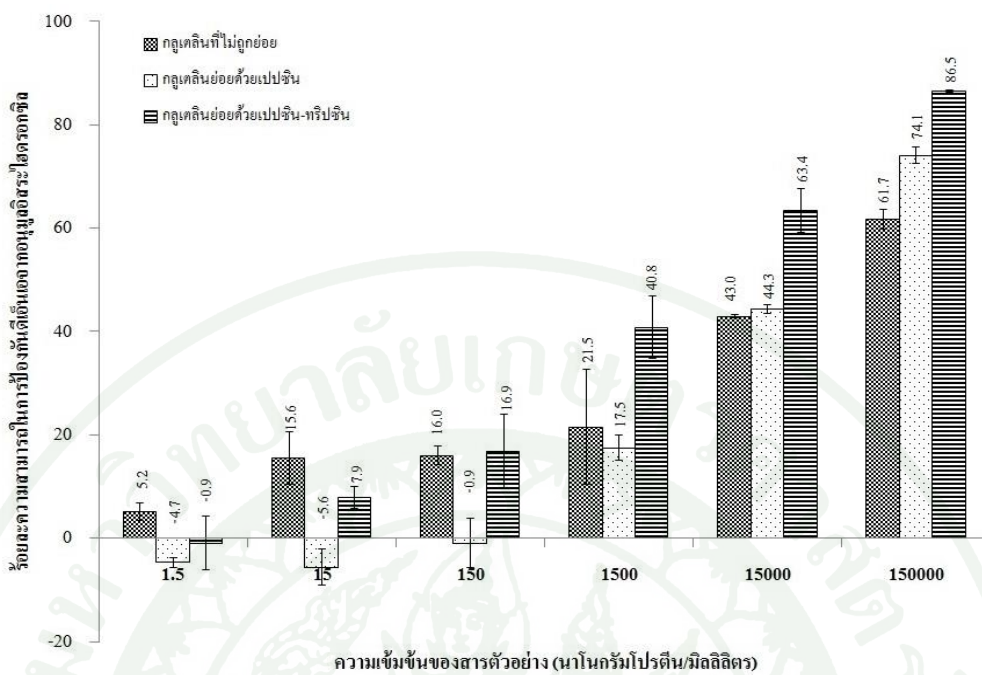
ภาพที่ 25 เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนกลูเตลีนที่ได้จากการสกัดข้าวดอกกะเมติ 105 และกลูเตลีนไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ



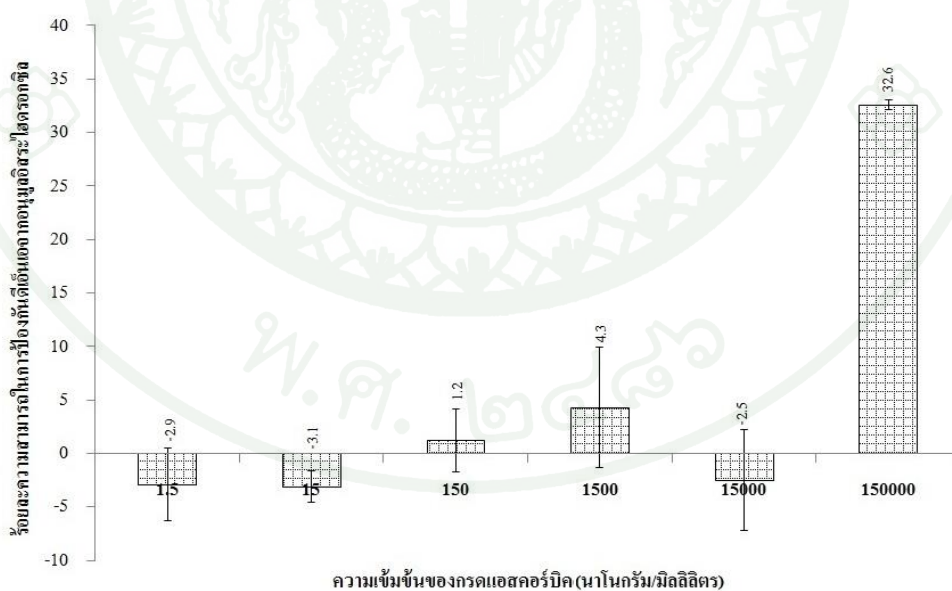
ภาพที่ 26 แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

8. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^\bullet)

เมื่อนำโปรตีนกลูเตลินและโปรตีนไฮโดรไลเซททั้ง 2 ชนิดมาทำการทดสอบร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^\bullet) โดยให้ปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างเท่ากับ 1.5, 15, 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรและ 1.5, 15 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร พบว่าทั้งกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเซททั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล โดยกลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างตั้งแต่ 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไป ดังแสดงในภาพที่ 27 นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลระหว่างกลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินและกรดแอสคอร์บิก พบว่า เมื่อใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเดียวกัน กลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้สูงกว่ามาก ดังแสดงในภาพ 27-28 โดยค่า IC_{50} ของกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซินและกลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินเท่ากับ 1.91, 5.80 และ 1.72 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร ในขณะที่กรดแอสคอร์บิกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 29.74 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ เมื่อทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้งพบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งแรกดังแสดงในภาพผนวกที่ 14-17



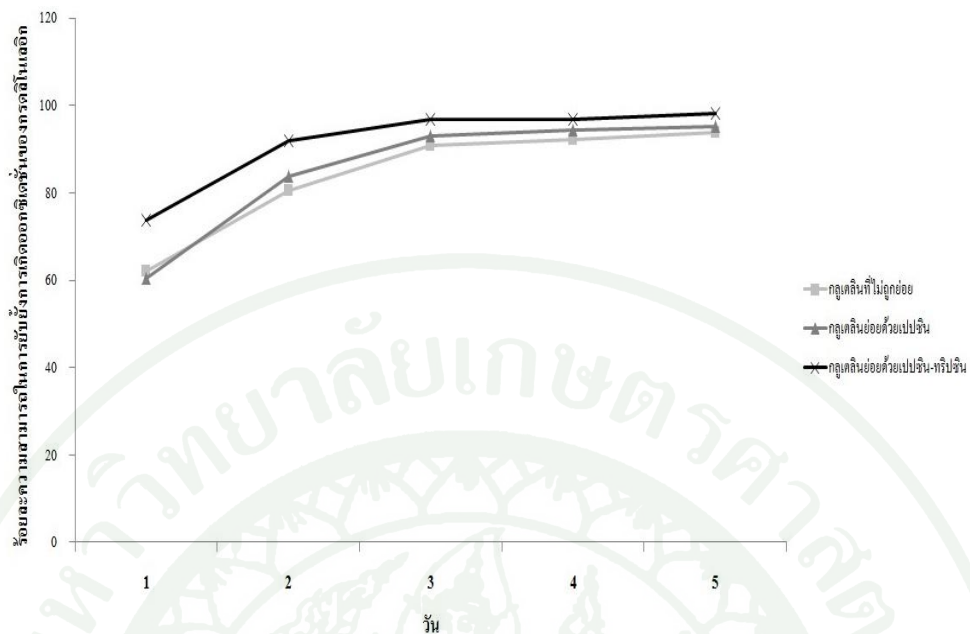
ภาพที่ 27 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุภาคนิวเคลียสไฮดรอกซิลของโปรตีนกลูเทลิน กลูเทลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซินและเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 28 แสดงร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุภาคนิวเคลียสไฮดรอกซิลของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

9. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก (Inhibition of Linoleic autooxidation)

เมื่อนำโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก โดยให้ทุกปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างเท่ากับ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร พบว่าตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 5 ของการบ่มปฏิกิริยา พบว่าทั้งกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ โดยกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้มากที่สุดดังแสดงในภาพ 29 นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถนี้กับแอลฟา-โทโคฟีรอล (วิตามินอี) และกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นเดียวกันจะเห็นว่ากลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้มากกว่า แอลฟา-โทโคฟีรอล (วิตามินอี) และกรดแอสคอร์บิก ดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีที่สุด ดังนั้น จึงเลือกใช้กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินในการทดลองการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกขั้นต่อไป



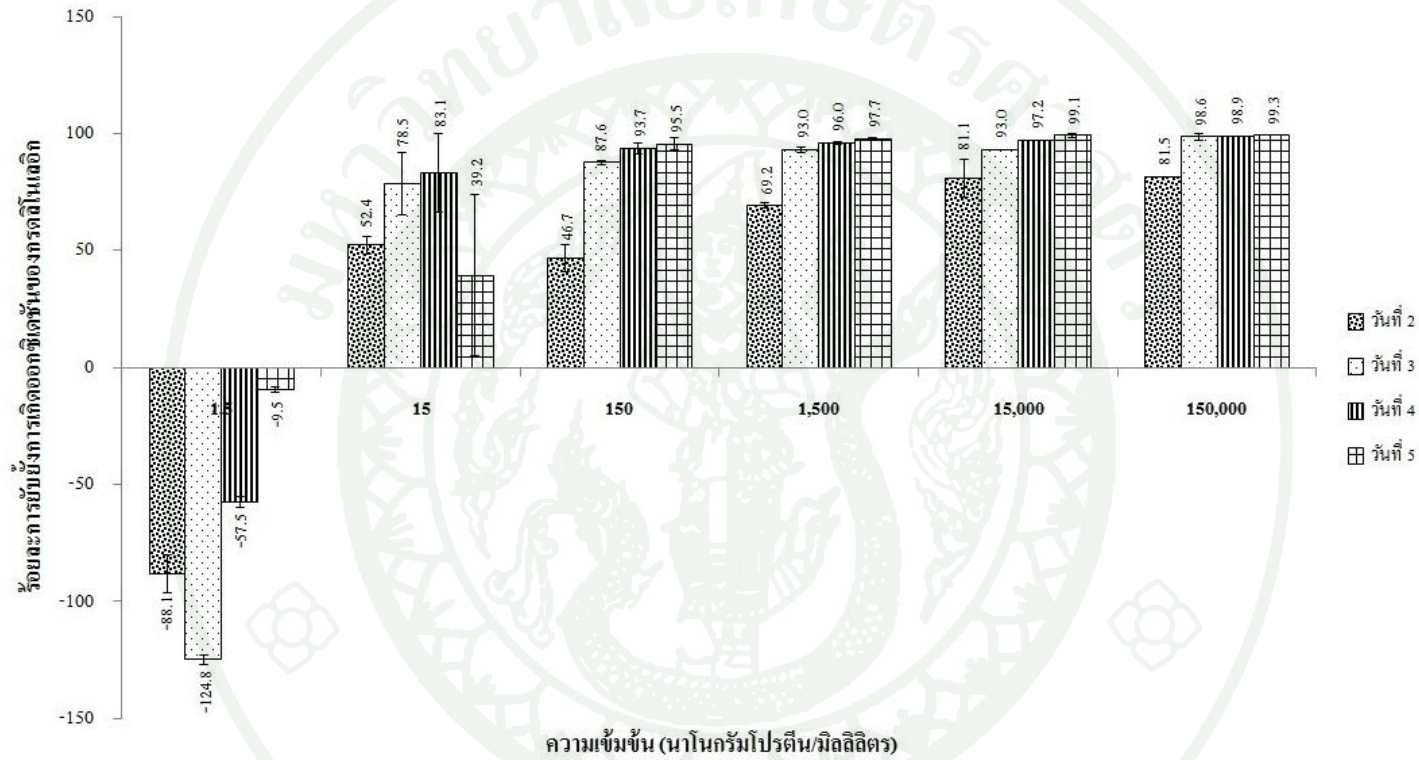
ภาพที่ 29 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการขยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันในเต้านมของโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน และชนิดเปปซิน – ทริปซินเมื่อใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างเท่ากับ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวของโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน – ทริปซิน

	ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว				
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
กลูเตลิน	62.0 ± 5.9	80.5 ± 2.5	90.8 ± 1.3	92.1 ± 2.1	93.8 ± 2.4
กลูเตลินไฮโดรไลสเสท	60.5 ± 12.8	83.9 ± 3.2	93.0 ± 3.5	94.3 ± 3.0	95.1 ± 3.2
ชนิดเปปซิน					
กลูเตลินไฮโดรไลสเสท	73.8 ± 7.7	92.0 ± 1.6	96.9 ± 2.0	96.7 ± 3.6	98.1 ± 3.5
ชนิดเปปซิน-ทริปซิน					
แอลฟา-โทโคฟีรอล	41.0 ± 15.7	72.2 ± 5.6	80.1 ± 4.4	78.0 ± 4.1	71.5 ± 5.8
กรดแอสคอร์บิก	84.1 ± 6.5	19.9 ± 10.4	-11.1 ± 6.0	-5.5 ± 9.5	8.1 ± 4.5

*หมายเหตุ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างในปฏิกิริยาเท่ากับ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร

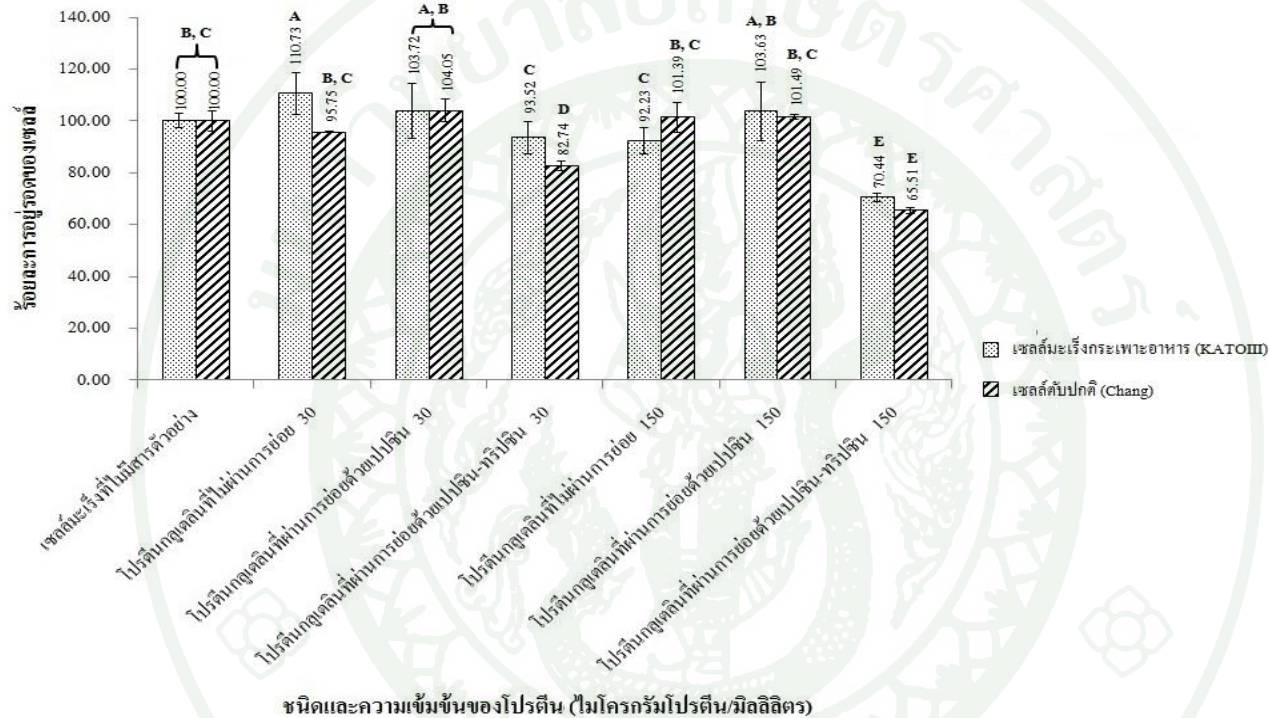
เมื่อนำกลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินมาทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยให้ปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.5, 15, 150 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรและ 1.5, 15 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 วัน และเก็บผลการทดลองในวันที่ 2 – 5 พบว่ากลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างตั้งแต่ 15 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรขึ้นไป และความสามารถนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อบ่มปฏิกิริยานานขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 30 โดยค่าของสารตัวอย่าง IC_{50} ในวันที่ 2, 3, 4 และ 5 เท่ากับ 8.47, 8.82, 9.09 และ 17.06 นาโนกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร



ภาพที่ 30 แสดงร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรตลีโนเลอิกของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่วันที่ 2 – 5 ของการบ่มปฏิบัติการ

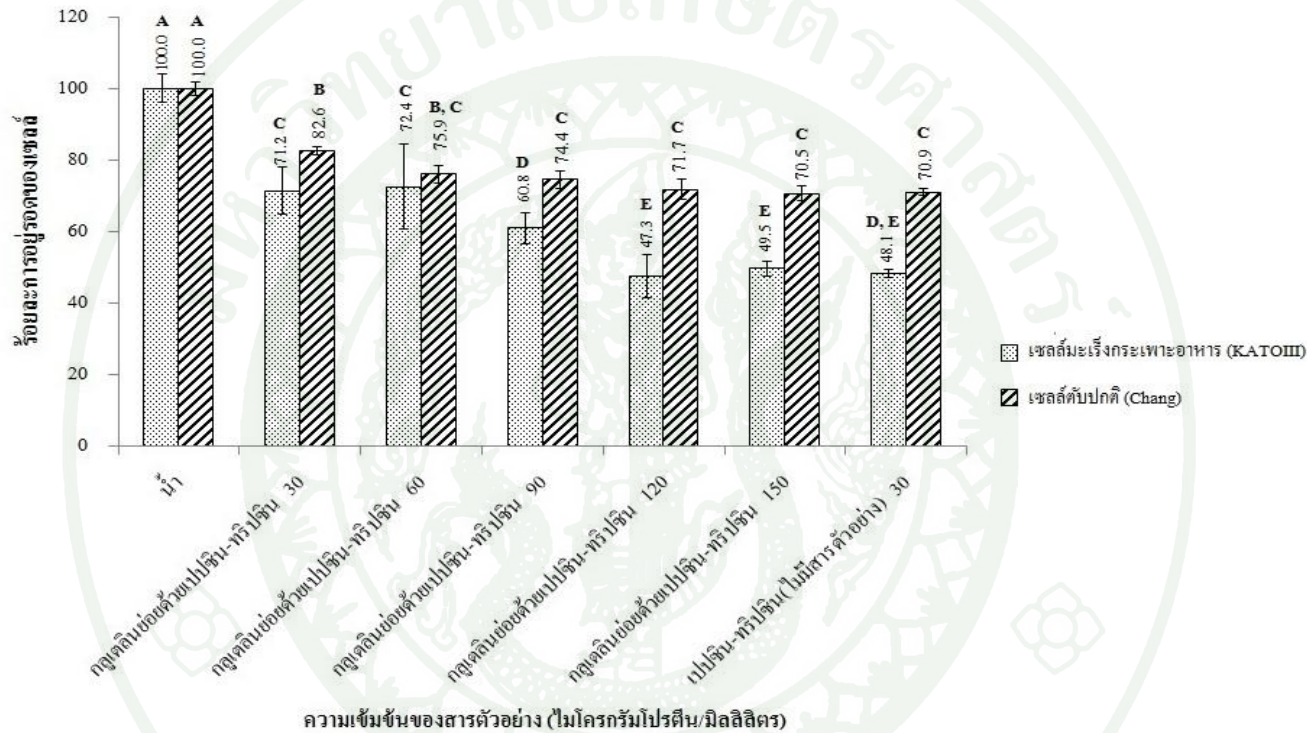
10. การวัดความสามารถของโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ

เมื่อนำโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน – ทริปซินมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติโดยให้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร พบว่าเฉพาะกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน – ทริปซินที่มีความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารและเซลล์ตับปกติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 31 และเมื่อทำการทดลองซ้ำอีก 1 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งแรก ดังแสดงในภาพผนวกที่ 18 ดังนั้น จึงเลือกกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



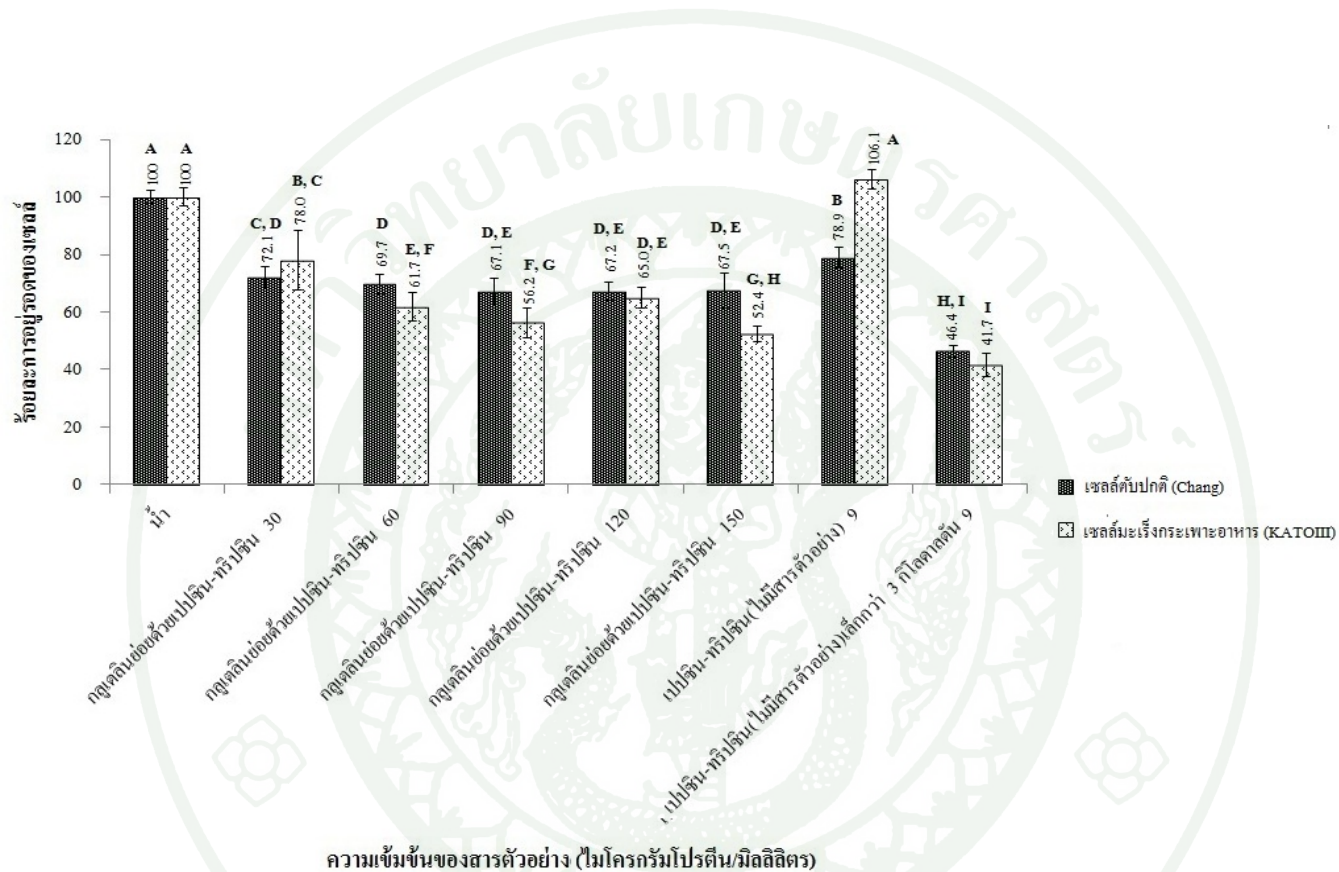
ภาพที่ 31 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 และ 150 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

เมื่อนำกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน – ทริปซินมาทำการทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติโดยใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร พบว่าเมื่อใช้กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน – ทริปซินทุกชุดการทดลองสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารและเซลล์ตับปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบการกับชุดการทดลองที่มีเฉพาะเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายตั้งแต่ 30 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร พบว่าการทดลองชุดควบคุมนี้ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ในระดับเดียวกับชุดทดลองที่ใช้ตัวอย่างจากข้าวที่ความเข้มข้น 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 32 และเมื่อทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้งพบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับครั้งแรก ดังแสดงในภาพผนวกที่ 19-21



ภาพที่ 32 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลินไฮโดรไลเซชันชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรรวมถึงเปปซิน-ทริปซินทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษ แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

จากนั้น เมื่อทำการทดลองซ้ำอีกครั้งโดยใช้กลูเตลินไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้นสุดท้าย
ต่างๆ (30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับเปปซิน-ทริปซิน
(ที่ไม่มีกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทผสมอยู่) และเปปซิน-ทริปซิน (ที่ไม่มีกลูเตลินและกลูเต
ลินไฮโดรไลเสทผสมอยู่) ซึ่งผ่านการแยกขนาดให้เหลือแต่กรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ที่มีขนาด
เล็กกว่า 3 กิโลดาลตันและมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 9 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร พบว่า ชุด
การทดลองเปปซิน-ทริปซินที่มีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลดาลตันสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
กระเพาะอาหารและเซลล์ตับปกติได้ดีที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 33 และเมื่อทำการทดลองซ้ำอีก 2
ครั้งพบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับครั้งแรก ดังแสดงในภาพผนวกที่ 22-23 จากผลการทดลอง
แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารและเซลล์ตับปกติอาจมา
จากทั้งกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและเปปซิน-ทริปซิน (ที่ไม่มีกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดร
ไลเสทผสมอยู่)



ภาพที่ 33 แสดงความสามารถของกุลเดลินไฮโดรไลสเทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรและเปปซิน-ทริปซินและเปปซิน-ทริปซินซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลคาลตันในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

วิจารณ์

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทยและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวรวมถึงการศึกษาวิจัยเพื่อใช้ในการรักษาโรคจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียและโรคมะเร็งรวมถึงอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นยังคงเป็นปัญหาทางด้านสุขภาพของประชากรบนโลก โปรตีนหลักในข้าวแบ่งออกเป็น 4 ชนิดตามความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย โดยโปรตีนกลูเตลินซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายในกรด/ด่างและมีปริมาณมากที่สุดในเอ็นโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว (Ju *et al.*, 2001) มีลำดับกรดอะมิโนดังแสดงในภาพที่ 34 กลูเตลินจะถูกสร้างขึ้นในรูปแบบของ glutelin precursor ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57 กิโลดาลตัน หลังจากผ่านกระบวนการต่างๆ จะได้โพลีเปปไทด์ 2 สายคือ α -subunit และ β -subunit (Takemoto *et al.*, 2002) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกลูเตลินในเอ็นโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว ในภาพที่ 34 มาทำนายน้ำหนักโมเลกุลด้วยเว็บไซต์ ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกลูเตลินในภาพที่ 34 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 56.51 กิโลดาลตันซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของ glutelin precursor ดังนั้น ผู้วิจัยจึงคาดว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกลูเตลินในภาพที่ 34 เป็น glutelin precursor

MASSVFSRFSIYFCVLLLCHGSMAQLFNPSTNPWHSPRQGSFRECREFDRLQAFEPLRKVR
 SEAGVTEYFDEKNELFQCTGTFVIRRVIQPQGLLVPRYTNTPGVVYIIQGRGSMGLTFPGC
 PATYQQQFQQFSSQGSQSQKFRDEHQKIHFQRQGDIVALPAGVAHWFYNDGDAPVVA
 VYVYDVNNNANQLEPRQKEFLLAGNNNRAQQQVYGSSEIQQHSGQNIFSGFGVEMLSSE
 LGINAVAAKRLQSQNDQRGEIHHVKNGLQLLKPTLTQQQEQAQAQDQYQQVQYSERQQ
 TSSRWNGLEENFCTIKARVNIENPSRADSYPNPRAGRITSVNSQKFPILNLIQMSATRVNLY
 QNAILSPFWNVNAHSLVYMIQGRSRVQVVSNFGKTVFDGVLRPQGLLIIPQHYAVLKKA
 EREGCQYIAIETNANAFVSHLAGKNSVFRALPVDVVANAYRISREQARSLKNNRGEEHG
 AFTPRFQQQYYPGLSNESESETSE

ภาพที่ 34 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกลูเตลินในเอ็นโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว

(ที่มา : National Center for Biotechnology Information; GenBank: AGT59178.1)

จากนั้น เมื่อทำการย่อยโปรตีนกลูเตลินด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซินแล้วทำนายตำแหน่งตัดของกลูเตลินด้วยโปรแกรม Peptide Cutter (ที่มา : http://web.expasy.org/peptide_cutter/) พบตำแหน่งตัดจำนวนมาก โดยเกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ขนาดเล็ก โดยเปปไทด์ที่มีขนาดตั้งแต่ 5 อะมิโนขึ้นไปอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ดังแสดงให้เห็นดังตารางที่ 9

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าโปรตีนจากรำและไฮโดรไลเสทจากรำสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ อาจมีสาเหตุมาจากเมื่อย่อยโปรตีนจากรำข้าวด้วยเปปซินและเปปซิน-ทริปซินแล้ว อาจได้กรดอะมิโนและเปปไทด์ขนาดเล็กที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ รวมถึงในสารสกัดจากรำข้าวเองก็อาจมีสารอาหารอื่นๆ ที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ด้วย อย่างไรก็ตาม โปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินและกลูเตลินจากข้าวขาวพันธุ์พิษณุโลก 2 ที่ไม่ผ่านการย่อยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด (*A. anitratus* DMST 4183, *A. baumannii* ATCC 19066, *A. lwoffii* ATCC 15309, *S. aureus* ATCC 25923) ดังแสดงในภาพที่ 9-12 (ก-ข) โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Mohammad H.H.T. *et al*, 2014) ซึ่งพบว่าโปรตีนจากเมล็ดลินินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ จากผลการทดลองอาจสันนิษฐานได้ว่าโปรตีนอัลบู

มิน โกลบูลินและกลูเตลินอาจสามารถจับกับลิโปลิแซคคาไรค์ (lipopolysaccharide) ที่อยู่ที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียได้ (Matsuzaki, 1999) ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซทบางชนิดของข้าวขาวพันธุ์พิษณุโลก 2 ก็มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดนี้ได้เช่นกัน โดยอาจเกิดจากการที่เปปไทด์มีขนาดเล็กกว่าโปรตีนทำให้เข้าจับอย่างจำเพาะที่ตัวจับบริเวณพื้นผิวของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย (protein-lipid interaction) และเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียได้ง่ายกว่า โดยความลึกในการสอดแทรกของเปปไทด์เข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์จะขึ้นอยู่กับชนิดของลิโปลิแซคคาไรค์ (lipopolysaccharide) ที่อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Gutsmann *et al.*, 2001) นอกจากนี้เมื่อนำโกลบูลินไฮโดรไลเซทและกลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 11 สายพันธุ์ พบว่ากลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิด *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ ในขณะที่โกลบูลินไฮโดรไลเซทและกลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 กลับเร่งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ โดยเฉพาะเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 โดยอาจเกิดจากเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโกลบูลินและกลูเตลินด้วยเปปซิน-ทริปซินอาจถูกใช้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย

มีรายงานการวิจัยแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 – 16 เรซิดิวส์และมีกรดอะมิโนที่ไม่มีซัลเฟอร์ประกอบ (Chen *et al.*, 1995) รวมถึงมักมีกรดอะมิโนไทโรซีน ทริปโตเฟน แอสปาราจिन กลูตามีน (Chen *et al.*, 2012) กลูเตลินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน ทริปโตเฟน แอสปาราจिन กลูตามีนและซิสเทอีนคิดเป็นร้อยละ 3.8, 0.8, 6.8, 11 และ 1.4 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ โปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเซทมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเซททั้ง 2 ชนิดจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (hydrogen donor) (Bamdad *et al.*, 2011) ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH กลายเป็น DPPH ที่มีโครงสร้างเสถียร กลูเตลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยกว่าโปรตีนกลูเตลินเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Xia *et al.*, 2012) ที่

พบว่าเปปไทด์จากข้าวบาร์เลย์ที่มีขนาดใหญ่จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และต้านทานการเกิดออกซิเดชันของโลหะ (reducing power) ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก สำหรับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเป็นอนุมูลอิสระที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บางโมเลกุลที่ไม่ได้ถูกเปลี่ยนเป็นน้ำและทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ (Bektasoglu *et al.*, 2006) โดยอนุมูลอิสระชนิดนี้ส่งผลกระทบต่อร่างกายมากมายรวมถึงเป็นสารตั้งต้นของการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้คุณลักษณะของอาหารเปลี่ยนแปลง (Zhang *et al.*, 2010) ด้วย ดังนั้น หากสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้มาก อัตราการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันก็จะยิ่งน้อยลง จากผลการทดลองจะเห็นว่ากลูเทลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ดีกว่าโปรตีนกลูเทลินและกลูเทลินไฮโดรไลเซทชนิดเปปซินซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Xia *et al.*, 2012) ซึ่งเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและจับกับ Fe^{2+} ได้ดีกว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง นอกจากนี้ การศึกษาการย่อยโปรตีนจากถั่วหัวข้างด้วยอัลคาเลส พบว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ดีกว่าเปปไทด์ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Li *et al.*, 2008) ดังนั้นขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์จึงมีผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ นอกจากนี้กรดอะมิโนจำพวกไทโรซีนและทริปโตเฟน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของฟีโนลิกและอินโดลิกก็มีความสามารถในการถ่ายโอนไฮโดรเจนให้แก่อนุมูลอิสระ (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2005) ซึ่งกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระนี้จะคล้ายคลึงกับกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระของแอลฟา-โทโคฟีรอลที่เกิดขึ้นโดยอะตอมไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนวงเบนซีนจะถูกถ่ายโอนให้กับอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ดังแสดงให้เห็นดังภาพที่ 6 (Engin, 2009; Hernandez-Ledesma *et al.*, 2005)

ตารางที่ 9 แสดงลำดับกรดอะมิโนและผลการทำนายโครงสร้างเปปไทด์ด้วยเว็บไซต์ PSIPRED 3.3

([http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=PEP-](http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=PEP-FOLD#forms::psipred)

FOLD#forms::psipred) ที่มีขนาดตั้งแต่ 5 อะมิโนขึ้นไปที่ได้จากการย่อยโปรตีนกลูเต

ลินด้วยเปปซิน-ทริปซินและทำนายฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยเว็บไซต์

เว็บไซต์ <http://acpp.bicpu.edu.in/predict.php>

(Vijayakumar and Lakshmi, 2015).

ตำแหน่ง ตัด	เปปไทด์ที่ได้	ความยาว เปปไทด์	ประจุ สุทธิ	โครงสร้างแบบ ทุติยภูมิ	ฤทธิ์ต้าน มะเร็ง
5	MASSV	5	0	CCCCC	-
25	CHGSMAQ	7	+1	CCCCCCC	√
33	FNPSTNP	7	0	CCCCCCC	-
38	WHSPR	5	+2	CCCCC	-
67	SEAGVTE	7	-2	CCCCCCC	-
81	QCTGT	5	0	CCCCC	-
92	VIQPQG	6	0	CCCCCC	-
105	TNTPGVV	7	0	CCCCCCC	-
111	IIQGR	5	+1	CCCCC	-
124	PGCPAT	6	0	CCCCCC	-
142	SSQGQSQSK	10	+1	CCCCHHHHCC	-
149	DEHQK	5	0	CCCCC	-
161	QGDIVAL	7	-1	CCCEEEC	-
167	PAGVAH	6	+1	CCCCCC	-
180	NDGDAPVVAV	10	-2	CCCCCEEEC	-
191	DVNNANQ	8	-1	CCCCCCCC	-
207	AGNNNR	6	+1	CCCCCC	-
213	AQQQV	6	0	CCCCCC	-
247	GINAVAAK	8	+1	CCEEHHCC	√

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ตำแหน่งตัด	เปปไทด์ที่ได้	ความยาว เปปไทด์	ประจุ สุทธิ	โครงสร้างแบบ ทุติยภูมิ	ฤทธิ์ต้าน มะเร็ง
256	LQSQNDQR	8	0	CCCCCCCC	-
263	GEIIHVK	7	+1	CEEEEEEC	-
273	LKPTL	5	+1	CCCCC	-
285	TQQQEQAQAQDQ	12	-2	CHHHHHHHHHHC	-
300	QQTSSR	6	+1	CCCCCC	-
372	NVNAHS	6	+1	CCCCCC	-
380	MIQGR	5	+1	CCCCC	-
388	VQVVSN	6	0	CEEEEC	-
402	LRPGQ	5	+1	CCCCC	-
409	IIPQH	5	+1	CCCCC	-
432	IAIETNANA	9	-1	CEEEECCCC	-
455	ALPVDVVANA	10	-1	CCCEEEEECC	-
480	GEEHGAFTPR	10	0	CCCCCCCCC	-
499	SNESESETSE	10	-4	CCCCHHHHCC	-

*หมายเหตุ H = α -helix (เกลียวแอลฟา), E = β -sheet (เบต้าชีท), C = Random coil (แรนดอม คอยล์), \sqrt = anticancer peptide, - = non-anticancer peptide

มะเร็งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความทุกข์ทรมานและคร่าชีวิตผู้ป่วยไปเป็นจำนวนมาก ในปัจจุบัน นักวิจัยพยายามค้นหาสารรักษามะเร็งจากธรรมชาติ อาทิ โปรตีนจากมันเทศ (Li *et al.*, 2013) เปปไทด์จากรำข้าว (Kannan *et al.*, 2008) เป็นต้น โดยเปปไทด์จากธรรมชาติเป็นสิ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจเป็นอย่างยิ่ง จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านมะเร็งมักมีกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobicity) เป็นองค์ประกอบในสายเปปไทด์และมีโครงสร้างระดับทุติยภูมิเป็นแบบเกลียวแอลฟา เบต้าชีทหรือแรนดอมคอยล์ก็ได้ (Ghavami *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Lehrer *et al.*, 1993; Prabhu *et al.*, 2014) รวมถึงมักมีประจุสุทธิเป็นบวกซึ่ง

ทำให้เข้าจับกับเชื้อหุ้มเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นลบ (Chen *et al.*, 1997) จากการทดลองนำกลูเตลินไฮโดรไลสชนิดเปปซิน-ทริปซินมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเปรียบเทียบกับเซลล์ดัดปกติพบว่า เมื่อใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้จากการใช้โปรแกรมเว็บไซต์ PSIPRED 3.3 (<http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=PEP-FOLD#forms::psipred>) และทำนายประจุสุทธิของเปปไทด์ด้วยเว็บไซต์ The Antimicrobial Data Base (<http://aps.unmc.edu/AP/main.html>) (Wang and Wang, 2004) พบเปปไทด์ที่อาจมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ซึ่งจากการทำนายเปปไทด์ที่อาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ 1) CHGSMAQ มีลักษณะเป็นแรนคอมคอยล์และมีโอกาสที่จะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้เนื่องจากมีประจุสุทธิเท่ากับ +1 ทำให้มีโอกาสที่จะจับกับเชื้อหุ้มเซลล์มะเร็งที่มีประจุลบได้ดี นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วเป็นองค์ประกอบซึ่งอาจทำให้สามารถแทรกตัวเข้าไปในเชื้อหุ้มเซลล์ได้ และ 2) GINAVAAK มีลักษณะเป็นแรนคอมคอยล์เกลียวแอลฟาและบีต้าชีทอยู่ในสายเดียวกันและมีประจุสุทธิเท่ากับ +1 และไม่มีกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วเป็นองค์ประกอบ จึงคาดว่าน่าจะจับกับเชื้อหุ้มเซลล์มะเร็งที่มีประจุลบได้ดีและสามารถแทรกตัวเข้าไปในเชื้อหุ้มเซลล์มะเร็งได้

อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารอาจไม่ได้มาจากกลูเตลินไฮโดรไลสชนิดเปปซิน-ทริปซินเพียงอย่างเดียว เนื่องจากเปปซินที่ถูกใช้เป็นโปรตีนตัวแรกในการย่อยกลูเตลินยังคงผสมรวมอยู่กับกลูเตลินไฮโดรไลสชนิดเปปซิน และเมื่อทำการย่อยกับกลูเตลินไฮโดรไลสชนิดเปปซินด้วยทริปซิน เปปซินก็จะถูกย่อยด้วยเช่นกัน ดังนั้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารอาจมาจากเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยเปปซินด้วยทริปซินก็เป็นได้ จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่ได้จากข้าวขาวแสดงให้เห็นว่า กลูเตลินซึ่งเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดในเมล็ดข้าว เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารแล้วมักมีความสามารถในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้ชัดเจน ในขณะที่เดียวกันก็มีความสามารถในการยับยั้งและส่งเสริมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ในปัจจุบัน โรคมะเร็ง เชื้อแบคทีเรียก่อโรคและอนุมูลอิสระที่มักเกิดขึ้นภายใต้สภาวะความเครียดส่งผลร้ายต่อคุณภาพชีวิตของประชากรบนโลก การหาสารธรรมชาติเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาจึงเป็นที่สนใจและเป็นที่น่าสนใจมากขึ้น งานวิจัยชิ้นนี้ต้องการศึกษาฤทธิ์ของกลูเตลินไฮโดรไลสเสทซึ่งผ่านการย่อยด้วยเปปซินและทริปซินซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้งโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้ โดยโปรตีนกลูเตลินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่ากลูเตลินไฮโดรไลสเสททั้ง 2 ชนิด ในขณะที่กลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้ดีกว่าโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซิน นอกจากนี้ ทั้งโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII ATCC No.HTB103) แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ตับปกติ [(Chang), CLS No. 300139] ได้เช่นกัน นอกจากนี้ เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 11 สายพันธุ์ พบว่ากลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis* ATCC 6633 ได้ ในขณะที่โกลบูลินไฮโดรไลสเสทและกลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เหลือเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะ *S.epidermidis* ATCC 12228 โปรตีนอัลบูมิน โกลบูลินกลูเตลินและไฮโดรไลสเสทของโปรตีนบางชนิดจากข้าวขาวพันธุ์พิษณุโลก 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *A.anitratus* DMST 4183, *A.baumannii* ATCC 19066, *A.lwoffii* ATCC 15309 และ *S.aureus* ATCC 25923 ในขณะที่รำและไฮโดรไลสเสทของรำจะกระตุ้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียข้างต้น จากผลการทดลองมีความเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและมะเร็งจะเกิดขึ้นที่ลำไส้เนื่องจากอาหารที่คนเราบริโภคเข้าไปต้องผ่านการย่อยด้วยเปปซินในกระเพาะอาหารก่อน แล้วจึงถูกย่อยต่อด้วยทริปซินในลำไส้

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองจะเห็นว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเป็นฤทธิ์ที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคและมะเร็ง เนื่องจากแม้ว่าจะใช้สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำก็สามารถต้านอนุมูลอิสระได้
2. ผู้ที่จะนำโปรตีนและเปปไทด์จากข้าวไปใช้ควรมีความระมัดระวัง เนื่องจากโปรตีนและเปปไทด์จากข้าวมีฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่
3. กลูเตลินไฮโดรไลเซชันเทคนิคเปปซิน-ทริปซินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้ อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ที่เกิดขึ้นอาจมาจากเปปซินที่ถูกย่อยด้วยทริปซิน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Agboola, S., D. Ng and D. Mills. 2005. Characterisation and Functional Properties of Australian Rice Protein Isolates. **Journal of Cereal Science**. 41(3): 283-290.
- Bamdad, F., J. P. Wu and L. Y. Chen. 2011. Effects of Enzymatic Hydrolysis on Molecular Structure and Antioxidant Activity of Barley Hordein. **Journal of Cereal Science**. 54(1): 20-28.
- Bektasoglu, B., S. E. Celik, M. Ozyurek, K. Guclu and R. Apak. 2006. Novel Hydroxyl Radical Scavenging Antioxidant Activity Assay for Water-Soluble Antioxidants Using a Modified Cuprac Method. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 345(3): 1194-1200.
- Boboev, A., A. Hasanov, L. Yotova and H. Hasanov. 2012. Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Wheat and Cottonseed Proteins. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. 18(1): 103-111.
- Boman, H. G., B. Agerberth and A. Boman. 1993. Mechanisms of Action on Escherichia Coli of Cecropin P1 and Pr-39, Two Antibacterial Peptides from Pig Intestine. **INFECTION AND IMMUNITY**. 61(7): 2978-2984.
- Cadenas, E. and K. J. Davies. 2000. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. **Free Radical Biology and Medicine**. 29(3-4): 222-230.
- Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat and S. Sauvaigo. 1999. Hydroxyl Radicals and DNA Base Damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 424(1-2): 9-21.

- Cheeseman, K. H., A. Beavis and H. Esterbauer. 1988. Hydroxyl-Radical-Induced Iron-Catalysed Degradation of 2-Deoxyribose. Quantitative Determination of Malondialdehyde. **Biochemical Journal**. 252(3): 649-653.
- Chen, C., Y. J. Chi, M. Y. Zhao and L. Lv. 2012. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Egg White Protein Hydrolysate. **Amino Acids**. 43(1): 457-466.
- Chen, C., J. Hu, P. Zeng, F. Pan, M. Yaseen, H. Xu and J. R. Lu. 2014. Molecular Mechanisms of Anticancer Action and Cell Selectivity of Short Alpha-Helical Peptides. **Biomaterials**. 35(5): 1552-1561.
- Chen C., R. Brock, F. Luh, P.J. Chou, J.W. Larrick, R.F. Huang and T.H. Huang. 1995. The solution structure of the active domain of CAP18--a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. **The Journal for rapid publication of short reports in molecular biosciences**. 370(1-2) : 46–52.
- Chen, H. M., W. Wang, D. Smith and S. C. Chan. 1997. Effects of the Anti-Bacterial Peptide Cecropin B and Its Analogs, Cecropins B-1 and B-2, on Liposomes, Bacteria, and Cancer Cells. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**. 1336(2): 171-179.
- Chen, H.M., K. Muramoto and F. Yamauchi. 1995. Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean beta-Conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43 : 574-578.
- Chen, H.M., K. Muramoto, F. Yamauchi and K. Nokihara. 1996. Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44(9) : 2619–2623

- Chen, H.M., K. Muramoto, F. Yamauchi, K. Fujimoto and K. Nokihara. 1998. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46(1) : 49-53.
- Chrastil J., Z. Zarins. 1994. Changes in Peptide Subunit Composition of Albumins, Globulins, Prolamins, and Oryzenin in Maturing Rice Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42 : 2152-2155.
- Christensen, B., J. Fink, R.B. Merrifield and D. Mauzerall. 1988. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 85 : 5072-5076.
- Davies, K. J. 1987. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. I. General Aspects. **The Journal of Biological Chemistry**. 262(20): 9895-9901.
- Devkota, A., S. Dall'Acqua, S. Comai, G. Innocenti and P. K. Jha. 2010. Centella Asiatica (L.) Urban from Nepal: Quali-Quantitative Analysis of Samples from Several Sites, and Selection of High Terpene Containing Populations for Cultivation. **Biochemical Systematics and Ecology**. 38(1): 12-22.
- Dobrzynska, I., B. Szachowicz-Petelska, S. Sulkowski and Z. Figaszewski. 2005. Changes in Electric Charge and Phospholipids Composition in Human Colorectal Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 276(1-2): 113-119.
- Engin, K. N. 2009. Alpha-Tocopherol: Looking Beyond an Antioxidant. **Molecular Vision**. 15(84-88): 855-860.

- Ferreira, I. C. F. R., P. Baptista, M. Vilas-Boas and L. Barros. 2007. Free-Radical Scavenging Capacity and Reducing Power of Wild Edible Mushrooms from Northeast Portugal: Individual Cap and Stipe Activity. **Food Chemistry**. 100(4): 1511-1516.
- Flores, T., A. Alape-Giron, M. Flores-Diaz and H. E. Flores. 2002. Ocatin. A Novel Tuber Storage Protein from the Andean Tuber Crop Oca with Antibacterial and Antifungal Activities. **Plant Physiology**. 128(4): 1291-1302.
- Folden, D. V., A. Gupta, A. C. Sharma, S. Y. Li, J. T. Saari and J. Ren. 2003. Malondialdehyde Inhibits Cardiac Contractile Function in Ventricular Myocytes Via a P38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism. **British Journal Pharmacology**. 139(7): 1310-1316.
- Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stähle-Bäckdahl, S. Lidén, H. Wigzell and G.H. Gudmundsson. 1997. The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders. **The Journal of Biological Chemistry**. 272(24) : 15258-15263.
- Gazit, E., A. Boman, H. G. Boman and Y. Shai. 1995. Interaction of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 with Phospholipid Vesicles. **Biochemistry**. 34(36): 11479-11488.
- Ghavami, S., A. Asoodeh, T. Klonisch, A. J. Halayko, K. Kadkhoda, T. J. Krocak, S. B. Gibson, E. P. Booy, H. Naderi-Manesh and M. Los. 2008. Brevinin-2r(1) Semi-Selectively Kills Cancer Cells by a Distinct Mechanism, Which Involves the Lysosomal-Mitochondrial Death Pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. 12(3): 1005-1022.

- Giese, H., B. Andersen and H. Doll. 1983. Synthesis of the Major Storage Protein, Hordein, in Barley : Pulse-Labeling Study of Grain Filling in Liquid-Cultured Detached Spikes. **Planta**. 159(1): 60-65.
- Grant, E., Jr., T.J. Beeler, K.M. Taylor, K. Gable and M.A. Roseman. 1992. Mechanism of magainin 2a induced permeabilization of phospholipid vesicles. **Biochemistry**. 31(41) : 9912-9918.
- Guptasarma, P., D. Balasubramanian, S. Matsugo and I. Saito. 1992. Hydroxyl Radical Mediated Damage to Proteins, with Special Reference to the Crystallins. **Biochemistry**. 31(17): 4296-4303.
- Gutsmann, T., S.O. Hagge, J.W. Larrick, U. Seydel and A. Wiese. 2001. Interaction of CAP18-Derived Peptides with Membranes Made from Endotoxins or Phospholipids. **Biophysical Journal**. 80 : 2935–2945.
- Halvorsen, B. L. and R. Blomhoff. 2011. Determination of Lipid Oxidation Products in Vegetable Oils and Marine Omega-3 Supplements. **Food & Nutrition Research**. 55
- Hara-Hishimura, I., Y. Takeuchi, K. Inoue and M. Nishimura. 1993. Vesicle Transport and Processing of the Precursor to 2s Albumin in Pumpkin. **The Plant Journal** 4(5): 793-800.
- Harder, J. and J. M. Schroder. 2002. Rnase 7, a Novel Innate Immune Defense Antimicrobial Protein of Healthy Human Skin. **Journal of Biological Chemistry**. 277(48): 46779-46784.

- Harder, J., J. Bartels, E. Christophers and J. M. Schroder. 2001. Isolation and Characterization of Human Beta -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. **The Journal of Biological Chemistry**. 276(8): 5707-5713.
- Hernandez-Ledesma, B., A. Davalos, B. Bartolome and L. Amigo. 2005. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from Alpha-Lactalbumin and Beta-Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by Hplc-Ms/Ms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(3): 588-593.
- Hernandez-Ledesma, B., A. Quiros, L. Amigo and I. Recio. 2007. Identification of Bioactive Peptides after Digestion of Human Milk and Infant Formula with Pepsin and Pancreatin. **International Dairy Journal**. 17(1): 42-49.
- Hoskin, D. W. and A. Ramamoorthy. 2008. Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**. 1778(2): 357-375.
- Huang, Y. B., X. F. Wang, H. Y. Wang, Y. Liu and Y. X. Chen. 2011. Studies on Mechanism of Action of Anticancer Peptides by Modulation of Hydrophobicity within a Defined Structural Framework. **Molecular Cancer Therapeutics**. 10(3): 416-426.
- Izadpanah, A. and R. L. Gallo. 2005. Antimicrobial Peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 52(3): 381-392.
- Jena, N. R. 2012. DNA Damage by Reactive Species: Mechanisms, Mutation and Repair. **Journal of Biosciences**. 37(3): 503-517.

- Jimenez-Ruiz, E. I., A. M. C. de la Barca, R. R. Sotelo-Mundo, G. E. Arteaga-Mackinney, M. Valenzuela-Melendez and E. A. Pena-Ramos. 2013. Partial Characterization of Ultrafiltrated Soy Protein Hydrolysates with Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities. **Journal of Food Science**. 78(8): C1152-C1158.
- Ju, Z. Y., N. S. Hettiarachchy and N. Rath. 2001. Extraction, Denaturation and Hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. **Journal of Food Science**. 66(2): 229-232.
- Kahl, R. and H. Kappus. 1993. [Toxicology of the Synthetic Antioxidants Bha and Bht in Comparison with the Natural Antioxidant Vitamin E]. **Z Lebensm Unters Forsch**. 196(4): 329-338.
- Kannan, A., N. Hettiarachchy, M. G. Johnson and R. Nannapaneni. 2008. Human Colon and Liver Cancer Cell Proliferation Inhibition by Peptide Hydrolysates Derived from Heat-Stabilized Defatted Rice Bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56(24): 11643-11647.
- Kannan, A., N. S. Hettiarachchy, J. O. Lay and R. Liyanage. 2010. Human Cancer Cell Proliferation Inhibition by a Pentapeptide Isolated and Characterized from Rice Bran. **Peptides**. 31(9): 1629-1634.
- Kannan, A., N. Hettiarachchy, S. Narayan. 2009. Colon and Breast Anti-cancer Effects of Peptide Hydrolysates Derived from Rice Bran. **The Open Bioactive Compounds Journal**. 2 : 17-20.
- Kehrer, J. P. 2000. The Haber-Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity. **Toxicology**. 149(1): 43-50.

- Lee, H. S., C. B. Park, J. M. Kim, S. A. Jang, I. Y. Park, M. S. Kim, J. H. Cho and S. C. Kim. 2008. Mechanism of Anticancer Activity of Buforin Iib, a Histone H2a-Derived Peptide. **Cancer Letters**. 271(1): 47-55.
- Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein and T. Ganz. 1993. Defensins: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells. **Annual Review of Immunology**. 11(105-128).
- Li, P. G., T. H. Mu and L. Deng. 2013. Anticancer Effects of Sweet Potato Protein on Human Colorectal Cancer Cells. **World Journal of Gastroenterology**. 19(21): 3300-3308.
- Li, X. C., J. Lin, Y. X. Gao, W. J. Han and D. F. Chen. 2012. Antioxidant Activity and Mechanism of Rhizoma Cimicifugae. **Chemistry Central Journal**. 6
- Li, Y. H., B. Jiang, T. Zhang, W. M. Mu and J. Liu. 2008. Antioxidant and Free Radical-Scavenging Activities of Chickpea Protein Hydrolysate (Cph). **Food Chem**. 106(2): 444-450.
- Malik, A., A. Kushnoor, V. Saini, S. Singhal, S. Kumar and Y. Chand Yadav. 2011. In vitro antioxidant properties of Scopoletin. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. 3(3) : 659-665.
- Manjula, A.C. and Shubha. 2011. Screening of Antibacterial Activity of Total Soluble Protein of Mulberry Varieties. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**. 3(2): 60-61.
- Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii and K. Miyajima. 1996. An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation. **Biochemistry**. 35(35): 11361-11368.

- Matsuzaki, Katsumi. 1999. Why and How Are Peptide–Lipid Interactions Utilized for Self-Defense? Magainins and Tachyplesins as Archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. 1462(1-2): 1–10.
- McGregor, R.A. and S.D. Poppitt. 2014. Milk Proteins and Human Health. **Milk Proteins (Second Edition) From Expression to Food**. 541–555.
- Min, B. and D. U. Ahn. 2005. Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products - a Review. **Food Science and Biotechnology**. 14(1): 152-163.
- Mohammad, H.H.T., B. Rumeysa, K. Mohammad and M. Arash. 2014. Extraction and purification of flaxseed proteins and studying their antibacterial activities. **Journal of Plant Sciences**. 2(1) : 70-76.
- National Center for Biotechnology Information. Available Source:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; GenBank: AGT59178.1
- Nazeer, R. A. and K. A. Kulandai. 2012. Evaluation of Antioxidant Activity of Muscle and Skin Protein Hydrolysates from Giant Kingfish, *Caranx Ignobilis* (Forsskal, 1775). **International Journal of Food Science and Technology**. 47(2): 274-281.
- Oliveira, C. F., D. Coletto, A. P. F. Correa, D. J. Daroit, R. Toniolo, F. Cladera-Olivera and A. Brandelli. 2014. Antioxidant Activity and Inhibition of Meat Lipid Oxidation by Soy Protein Hydrolysates Obtained with a Microbial Protease. **International Food Research Journal**. 21(2): 775-781.

- Papo, N., M. Shahar, L. Eisenbach and Y. Shai. 2003. A Novel Lytic Peptide Composed of D1-Amino Acids Selectively Kills Cancer Cells in Culture and in Mice. **Journal of Biological Chemistry**. 278(23): 21018-21023.
- Peng, X. Y., Y. L. L. Xiong and B. H. Kong. 2009. Antioxidant Activity of Peptide Fractions from Whey Protein Hydrolysates as Measured by Electron Spin Resonance. **Food Chemistry**. 113(1): 196-201.
- Petchiammal, C. and W. Hopper. 2014. Antioxidant activity of proteins from fifteen varieties of legume seeds commonly consumed in india. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 6 : 476-479.
- Pouny, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas and Y. Shai. 1992. Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and Its Fluorescently Labeled Analogues with Phospholipid Membranes. **Biochemistry**. 31(49): 12416-12423.
- Prabhu, S., S. R. Dennison, M. Mura, R. W. Lea, T. J. Snape and F. Harris. 2014. Cn-Amp2 from Green Coconut Water Is an Anionic Anticancer Peptide. **Journal of Peptide Science**. 20(12): 909-915.
- Preza, A. M., M. E. Jaramillo, A. M. Puebla, J. C. Mateos, R. Hernandez and E. Lugo. 2010. Antitumor Activity against Murine Lymphoma L5178y Model of Proteins from Cacao (Theobroma Cacao L.) Seeds in Relation with in Vitro Antioxidant Activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 10
- Rajakapase, N., E. Mendis, W. K. Jung, J. Y. Je and S. K. Kim. 2005. Purification of a Radical Scavenging Peptide from Fermented Mussel Sauce and Its Antioxidant Properties. **Food Research International**. 38(2): 175-182.

- Reyes, F. C., T. Chung, D. Holding, R. Jung, R. Vierstra and M. S. Otegui. 2011. Delivery of Prolamins to the Protein Storage Vacuole in Maize Aleurone Cells. **Plant Cell**. 23(2): 769-784.
- Satheesh, L. S. and K. Murugan. 2011. Antimicrobial Activity of Protease Inhibitor from Leaves of *Coccinia Grandis* (L.) Voigt. **Indian Journal of Experiment Biology**. 49(5): 366-374.
- Sato, H. and J. B. Feix. 2006. Peptide-Membrane Interactions and Mechanisms of Membrane Destruction by Amphipathic Alpha-Helical Antimicrobial Peptides. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)**. 1758(9): 1245-1256.
- Schwartz, R. S., Y. Tanaka, I. J. Fidler, D. T. Chiu, B. Lubin and A. J. Schroit. 1985. Increased Adherence of Sickled and Phosphatidylserine-Enriched Human Erythrocytes to Cultured Human Peripheral Blood Monocytes. **Journal of Clinical Investigation**. 75(6): 1965-1972.
- Schweizer, F. 2009. Cationic Amphiphilic Peptides with Cancer-Selective Toxicity. **European Journal of Pharmacology**. 625(1-3): 190-194.
- Sebei, K., A. Gnouma, W. Herchi, F. Sakouhi and S. Boukhchina. 2013. Lipids, Proteins, Phenolic Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Seeds of Peanuts (*Arachis Hypogaea* L) Cultivated in Tunisia. **Biological Research**. 46(3): 257-263.
- Shewry, P. R. and A. S. Tatham. 1990. The Prolamin Storage Proteins of Cereal Seeds: Structure and Evolution. **Biochemical Journal**. 267(1): 1-12.

- Shewry, P. R. and N. G. Halford. 2002. Cereal Seed Storage Proteins: Structures, Properties and Role in Grain Utilization. **Journal of Experimental Botany**. 53(370): 947-958.
- Shewry, P. R., J. A. Napier and A. S. Tatham. 1995. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. **Plant Cell**. 7(7): 945-956.
- Silva, P. M., S. Goncalves and N. C. Santos. 2014. Defensins: Antifungal Lessons from Eukaryotes. **Frontiers in Microbiology**. 5(97).
- Sivapriya, M. and L. Srinivas. 2007. Isolation and Purification of a Novel Antioxidant Protein from the Water Extract of Sundakai (*Solanum Torvum*) Seeds. **Food Chemistry**. 104(2): 510-517.
- Skerlavaj, B., D. Romeo and R. Gennaro. 1990. Rapid Membrane Permeabilization and Inhibition of Vital Functions of Gram-Negative Bacteria by Bactenecins. **INFECTION AND IMMUNITY**. 58(11): 3724-3730.
- Takemoto, Y., S. J. Coughlan, T. W. Okita, H. Satoh, M. Ogawa and T. Kumamaru. 2002. The Rice Mutant Esp2 Greatly Accumulates the Glutelin Precursor and Deletes the Protein Disulfide Isomerase. **Plant Physiology**. 128(4): 1212-1222.
- Tandang-Silvas, M. R., T. Fukuda, C. Fukuda, K. Prak, C. Cabanos, A. Kimura, T. Itoh, B. Mikami, S. Utsumi and N. Maruyama. 2010. Conservation and Divergence on Plant Seed 11s Globulins Based on Crystal Structures. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)**. 1804(7): 1432-1442.

- Toukara, F., S. Bernard, T. Amza, L. Guo-Wei, and S. Yong-Hui. 2013. Antioxidant Effect and Water-Holding Capacity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Seed Protein Hydrolysates. **Advance Journal of Food Science and Technology**. 5(6) : 752-757.
- Uchida, K., M. Shiraishi, Y. Naito, Y. Torii, Y. Nakamura and T. Osawa. 1999. Activation of Stress Signaling Pathways by the End Product of Lipid Peroxidation. 4-Hydroxy-2-Nonenal Is a Potential Inducer of Intracellular Peroxide Production. **The Journal of Biological Chemistry**. 274(4): 2234-2242.
- Vaca, C. E., J. Wilhelm and M. Harms-Ringdahl. 1988. Interaction of Lipid Peroxidation Products with DNA. A Review. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 195(2): 137-149.
- Vijayakumar, S. and P. T. V. Lakshmi. 2015. Acpp: A Web Server for Prediction and Design of Anti-Cancer Peptides. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. 21(1): 99-106.
- Wang, Z. and G. S. Wang. 2004. Apd: The Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research**. 32(D590-D592).
- Wen, T. N. and D. S. Luthe. 1985. Biochemical Characterization of Rice Glutelin. **Plant Physiology**. 78(1): 172-177.
- Wimley, W. C. 2010. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. **Acs Chemical Biology**. 5(10): 905-917.

- Wiriyaphan, C., B. Chitsomboon and J. Yongsawadigul. 2012. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates Derived from Threadfin Bream Surimi Byproducts. **Food Chemistry**. 132(1): 104-111.
- Xia, Y. C., F. Bamdad, M. Ganzle and L. Y. Chen. 2012. Fractionation and Characterization of Antioxidant Peptides Derived from Barley Glutelin by Enzymatic Hydrolysis. **Food Chemistry**. 134(3): 1509-1518.
- Zambrowicz, A., M. Pokora, E. Eckert, M. Szołtysik, A. Dąbrowska, J. Chrzanowska and T. Trziszka. 2012. Antioxidant and antimicrobial activity of lecithin free egg yolk protein preparation hydrolysates obtained with digestive enzymes. **Functional Foods in Health and Disease**. 2(12) : 487-500.
- Zhang, J. H., H. Zhang, L. Wang, X. N. Guo, X. G. Wang and H. Y. Yao. 2010. Isolation and Identification of Antioxidative Peptides from Rice Endosperm Protein Enzymatic Hydrolysate by Consecutive Chromatography and Maldi-Tof/Tof Ms/Ms. **Food Chemistry**. 119(1): 226-234.
- Zhang, S. B., Z. Wang and S. Y. Xu. 2008. Antioxidant and Antithrombotic Activities of Rapeseed Peptides. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 85(6): 521-527.



ตารางผนวกที่ 1 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลินจากข้าวขาว และโปรตีนที่ละลายน้ำจากรำพันธุ์พิชญ์โลก 2 (PSL2) และโปรตีนไฮโดรไลเสทของรำแต่ละชนิด

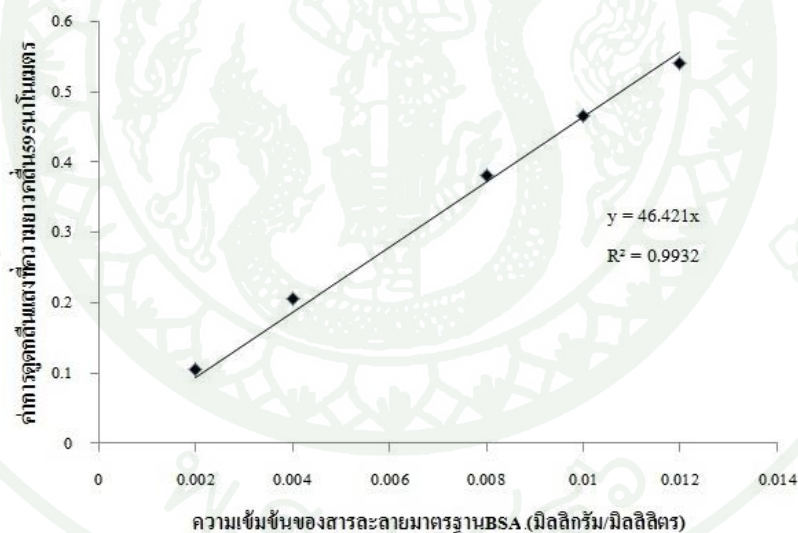
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร
0.01	0.001
0.05	0.003
0.1	0.006
0.25	0.015
0.5	0.026
0.75	0.041
1	0.057
1.25	0.070
1.5	0.084
2	0.109
2.5	0.134
5	0.257



ภาพผนวกที่ 1 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนอัลบูมิน โกลบูลิน กลูเทลินจากข้าวขาวและโปรตีนที่ละลายน้ำจากรำพันธุ์พิชณูโลก 2 (PSL2) และโปรตีนไฮโดรไลเสทของรำแต่ละชนิด

ตารางผนวกที่ 2 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับหาความเข้มข้น (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการระเหยแห้งจำนวน 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

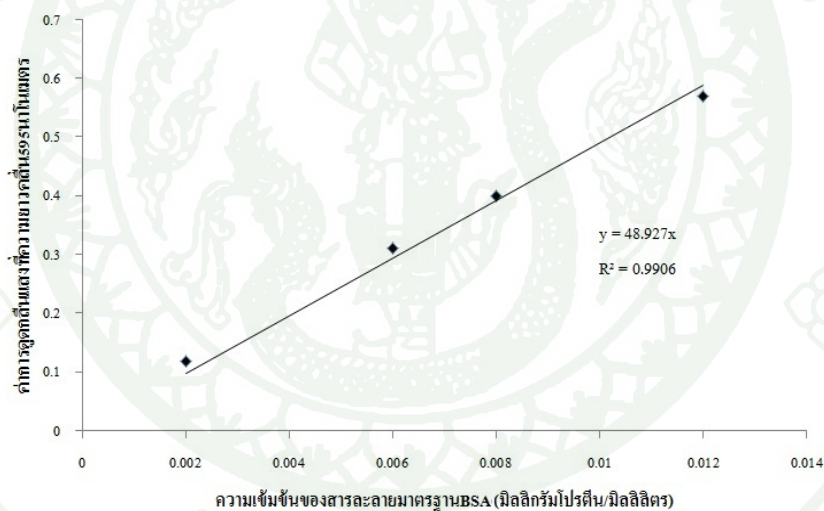
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.105
0.004	0.206
0.008	0.38
0.010	0.466
0.012	0.541



ภาพผนวกที่ 2 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับหาความเข้มข้น (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการระเหยแห้งจำนวน 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 3 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับหาความเข้มข้น (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

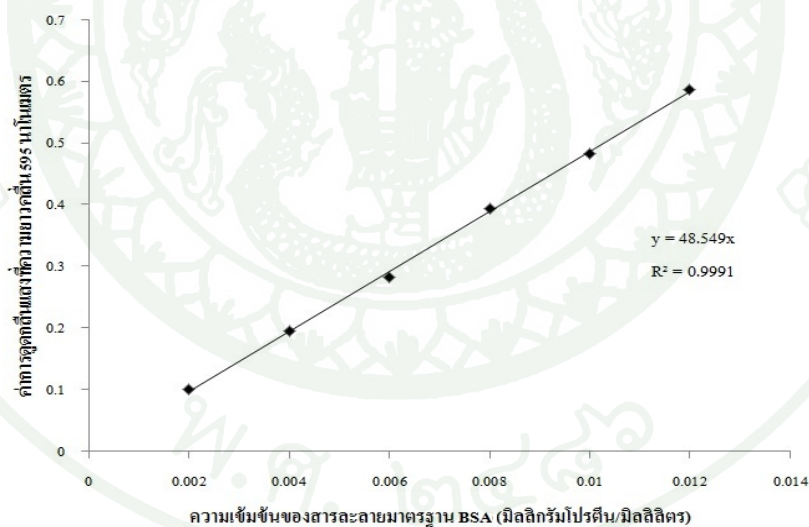
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.117
0.006	0.310
0.008	0.400
0.012	0.570



ภาพผนวกที่ 3 กราฟระหว่างสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับหาความเข้มข้น (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร) ของโปรตีนกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ตารางผนวกที่ 4 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีน โกลบูลินและกลูเตลีนที่ไม่ผ่านการย่อยจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)

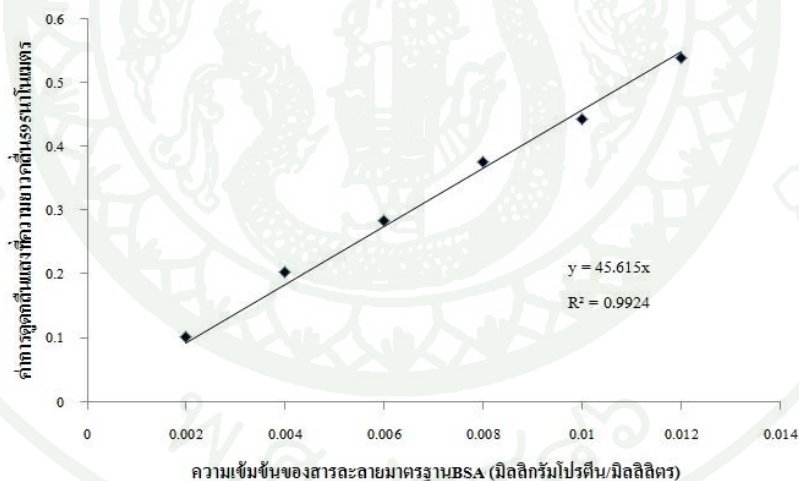
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.100
0.004	0.194
0.006	0.282
0.008	0.394
0.010	0.482
0.012	0.586



ภาพผนวกที่ 4 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีน โกลบูลินและกลูเตลีนที่ไม่ผ่านการย่อยจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)

ตารางผนวกที่ 5 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีน โกลบูลินและกลูเทลินที่ไม่ผ่านการย่อยจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)

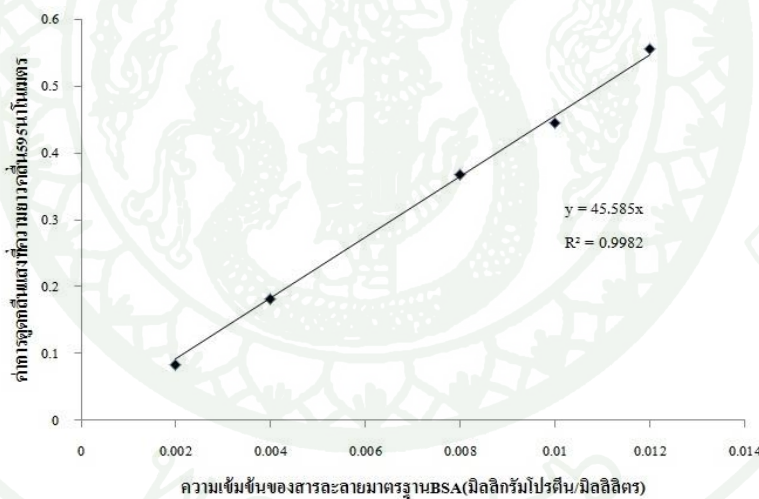
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.102
0.004	0.202
0.006	0.284
0.008	0.375
0.010	0.442
0.012	0.539



ภาพผนวกที่ 5 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีน โกลบูลินและกลูเทลินที่ไม่ผ่านการย่อยจากข้าวขาว ดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)

ตารางผนวกที่ 6 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของ โกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซิน จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)

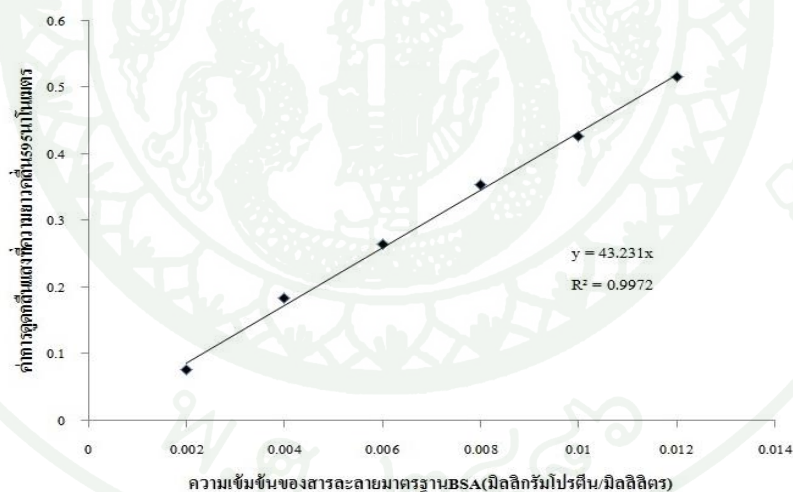
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.083
0.004	0.182
0.008	0.367
0.010	0.445
0.012	0.556



ภาพผนวกที่ 6 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของ โกลบูลินและกลูเตลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)

ตารางผนวกที่ 7 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)

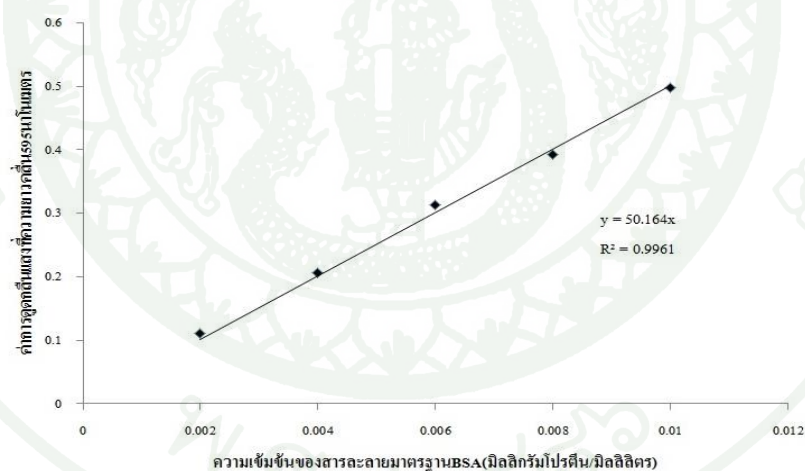
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.076
0.004	0.184
0.006	0.264
0.008	0.353
0.010	0.426
0.012	0.515



ภาพผนวกที่ 7 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)

ตารางผนวกที่ 8 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)

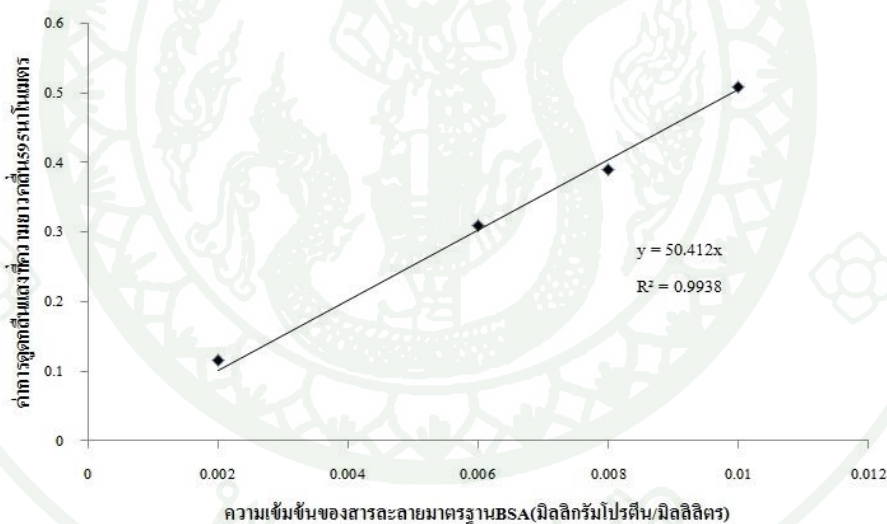
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.110
0.004	0.206
0.006	0.313
0.008	0.393
0.010	0.497
0.012	0.550



ภาพผนวกที่ 8 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณโปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 1)

ตารางผนวกที่ 9 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้ง อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)

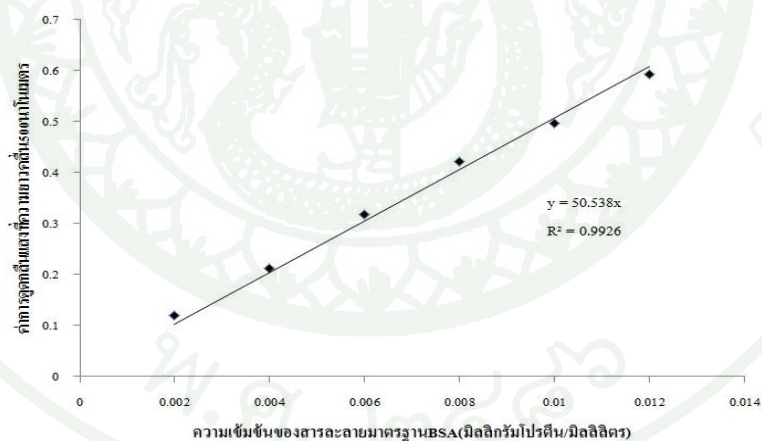
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.116
0.006	0.310
0.008	0.389
0.010	0.508



ภาพผนวกที่ 9 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้ง อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลครั้งที่ 2 และ 3)

ตารางผนวกที่ 10 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนกลูเตลินรวมถึงไฮโดรไลเซต ชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันเลอิก) สำหรับซ้ำที่ 1 และ 2

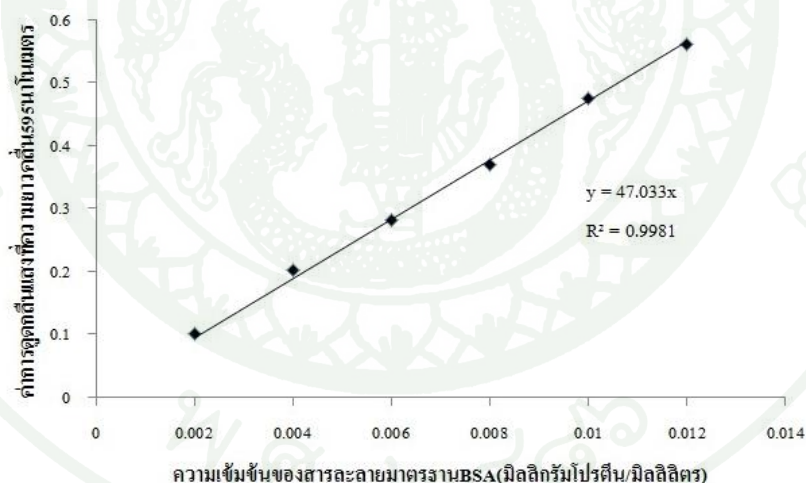
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.134
0.004	0.214
0.006	0.312
0.008	0.407
0.010	0.481
0.012	0.574



ภาพผนวกที่ 10 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนกลูเตลินรวมถึงไฮโดรไลเซต ชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันเลอิก) สำหรับซ้ำที่ 1 และ 2

ตารางผนวกที่ 11 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนกลูเตลินรวมถึงไฮโดรไลเสท ชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว) สำหรับซ้ำที่3

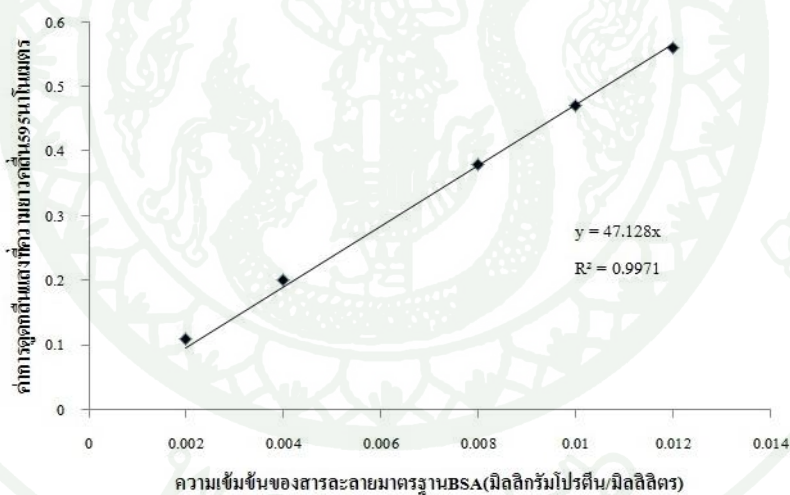
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.100
0.004	0.201
0.006	0.281
0.008	0.370
0.010	0.475
0.012	0.560



ภาพผนวกที่ 11 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนกลูเตลินรวมถึงไฮโดรไลเสท ชนิดเปปซินและชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สำหรับการทดลองฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว) สำหรับซ้ำที่3

ตารางผนวกที่ 12 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิด เปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเปปซิน-ทริปซินที่ไม่มีกลูเตลิน และกลูเตลินไฮโดรไลเสทผสมอยู่สำหรับทำ serial dilution ครั้งแรก (ภาพที่ 32)

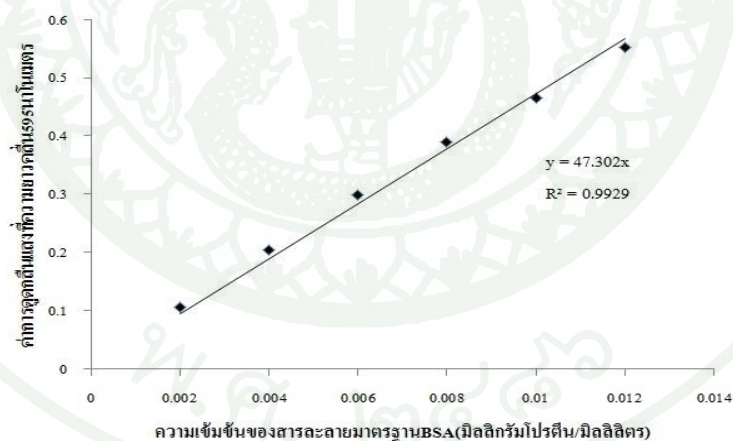
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.109
0.004	0.200
0.008	0.379
0.010	0.470
0.012	0.559



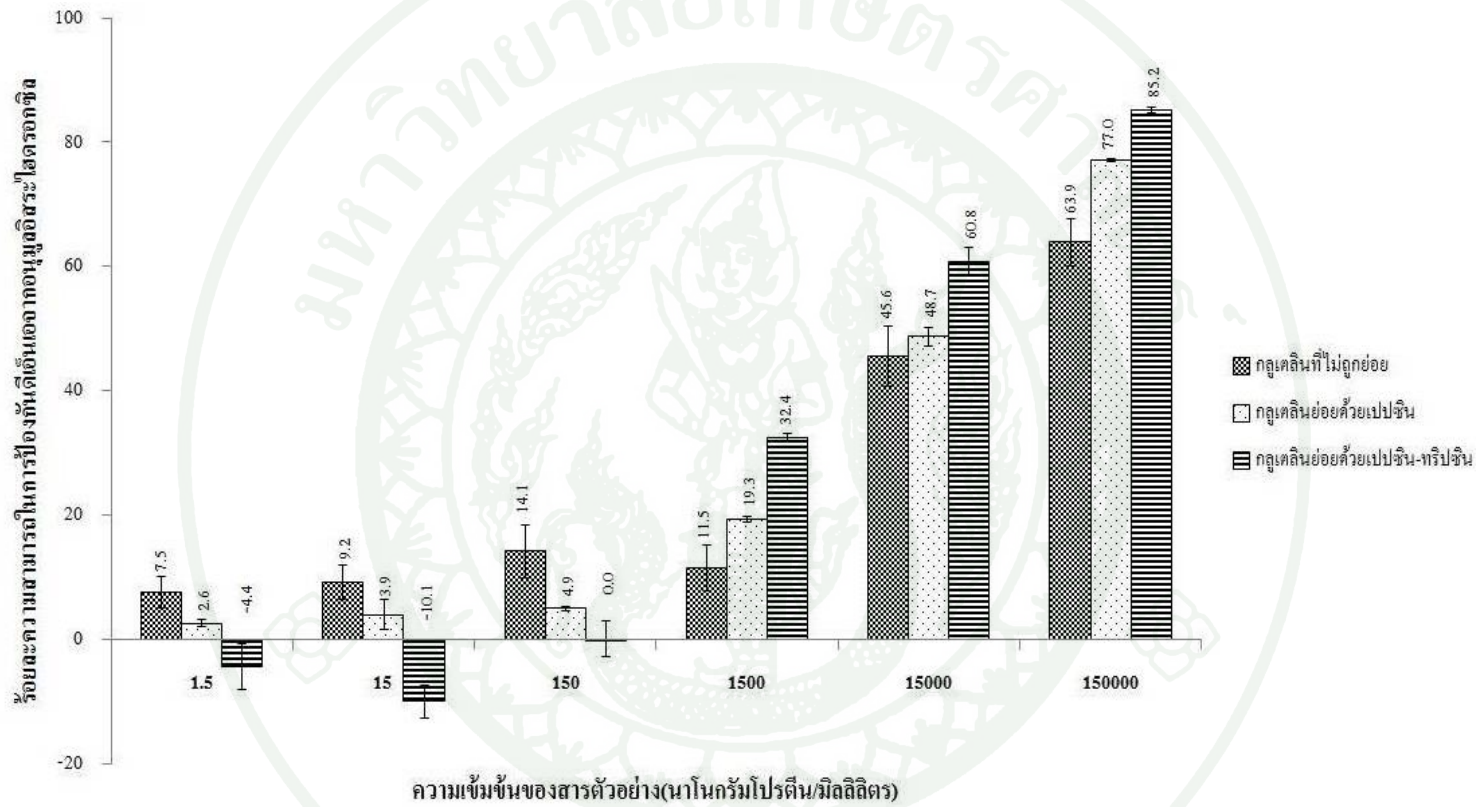
ภาพผนวกที่ 12 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทำ serial dilution ครั้งแรก (ภาพที่ 32)

ตารางผนวกที่ 13 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของกลูเตลินไฮโดรไลสเททชนิด เปปซิน-ทริปซินจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเปปซิน-ทริปซิน (ที่ไม่มีกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลสเททผสมอยู่) สำหรับทำ serial dilution แบบที่มีเปปไทด์เล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน

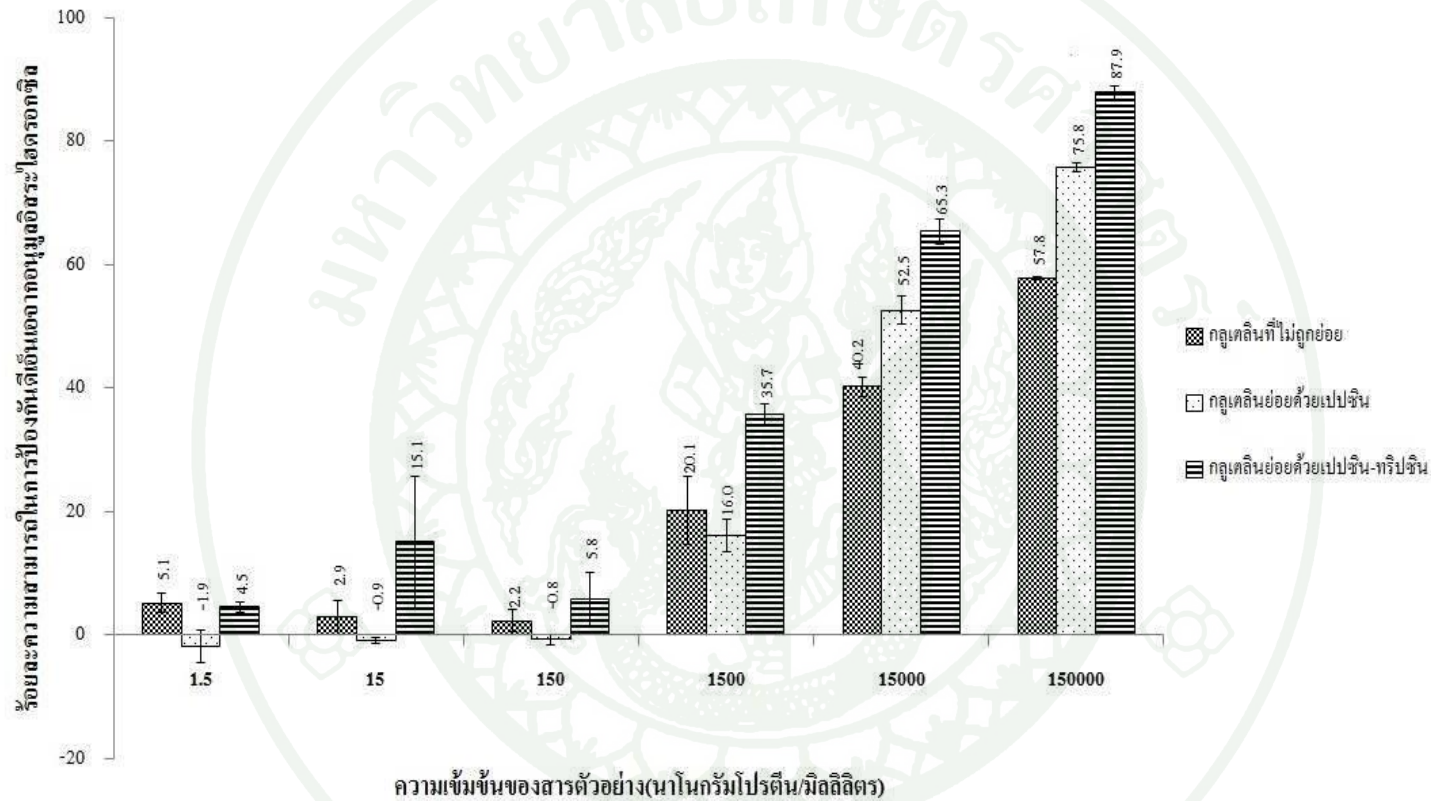
สารละลายมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
0.002	0.106
0.004	0.204
0.006	0.299
0.008	0.389
0.010	0.466
0.012	0.552



ภาพผนวกที่ 13 กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนสำหรับการหาปริมาณ โปรตีนของเปปซิน-ทริปซิน (ที่ไม่มีกลูเตลินและกลูเตลินไฮโดรไลสเททผสมอยู่) จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับทำ serial dilution แบบที่มีเปปไทด์เล็กกว่า 3 กิโลดาลตัน



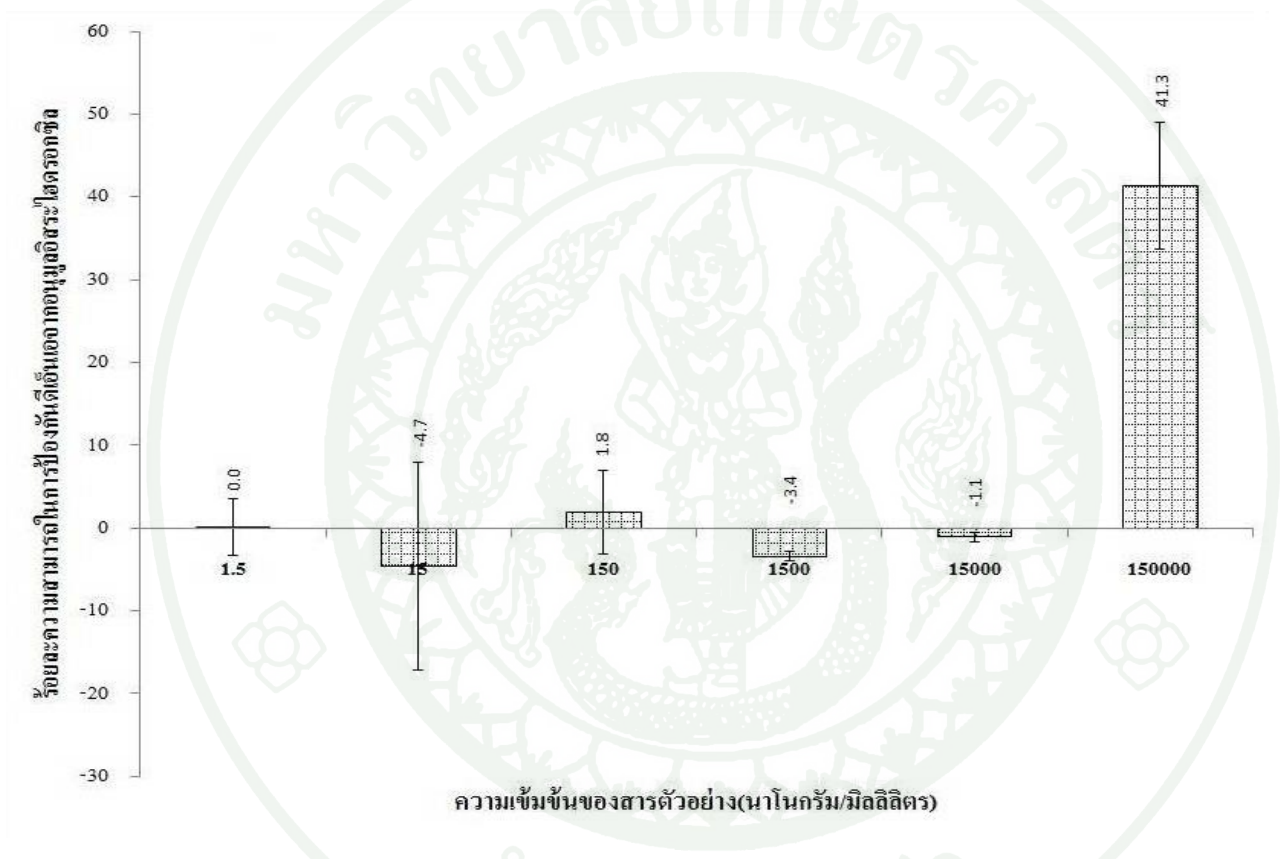
ภาพผนวกที่ 14 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของโปรตีนกลูเตลิน กลูเตลินไฮโดรไลสเทคนิคเปปซินและเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ



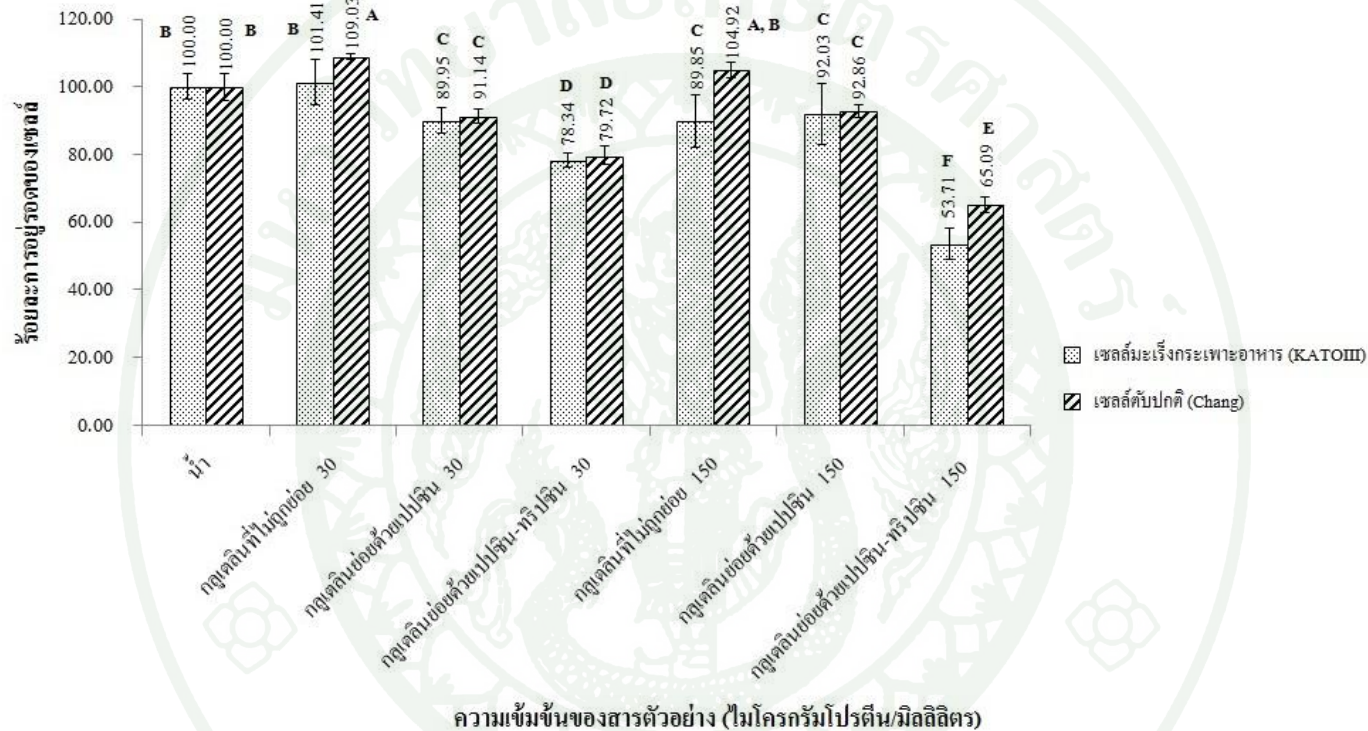
ภาพผนวกที่ 15 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุภาคมูลอิสระไฮดรอกซิลของโปรตีนกลูเตลิน กลุ่มเคลื่อนไฮโดรไลสเทคนิคเปปซินและเปปซิน-ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ



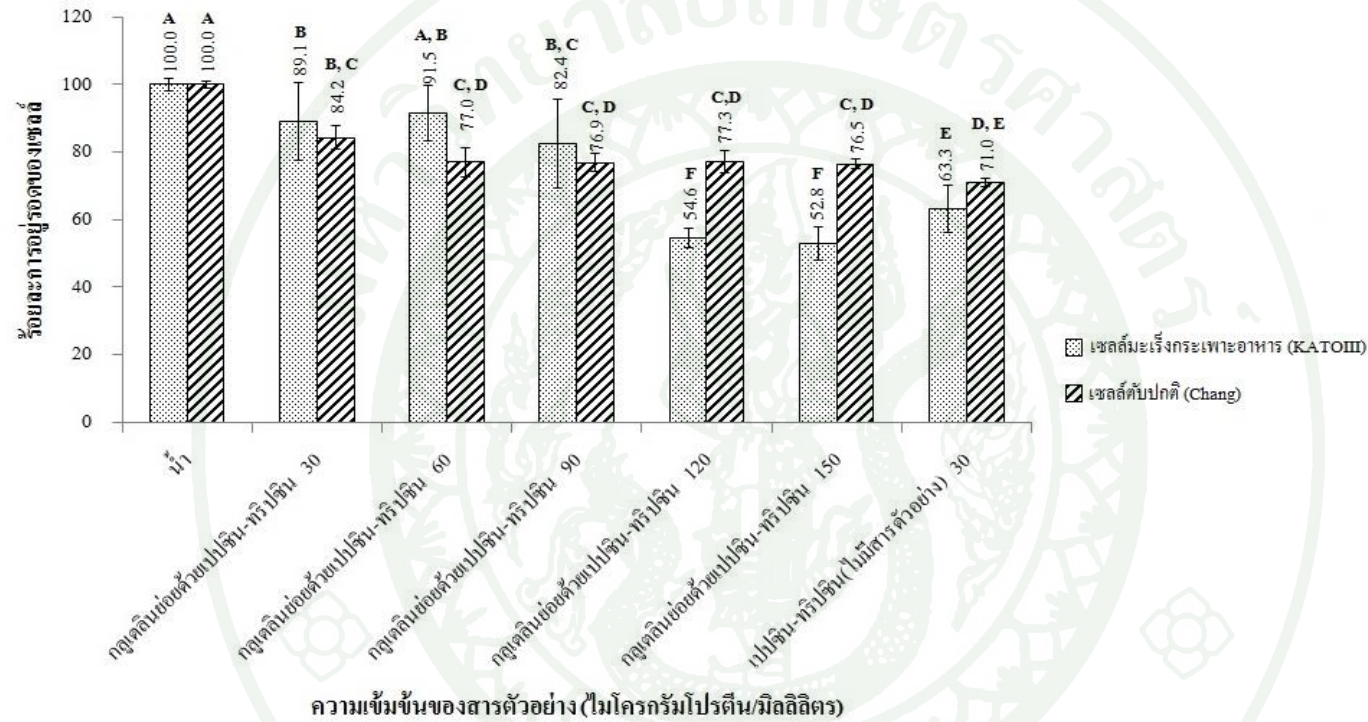
ภาพผนวกที่ 16 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียไฮดรอกซิลของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ



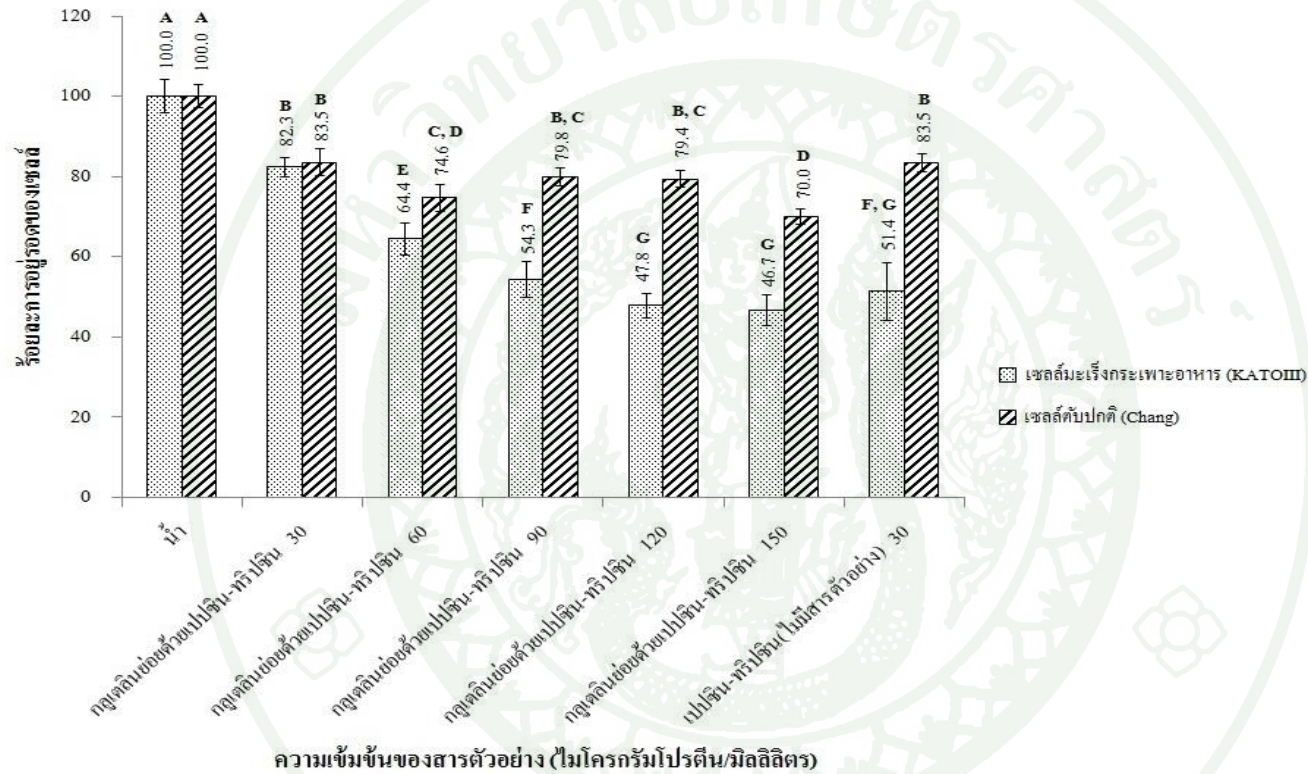
ภาพผนวกที่ 17 เปรียบเทียบร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุภาคนาโนไฮดรอกซิลของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ



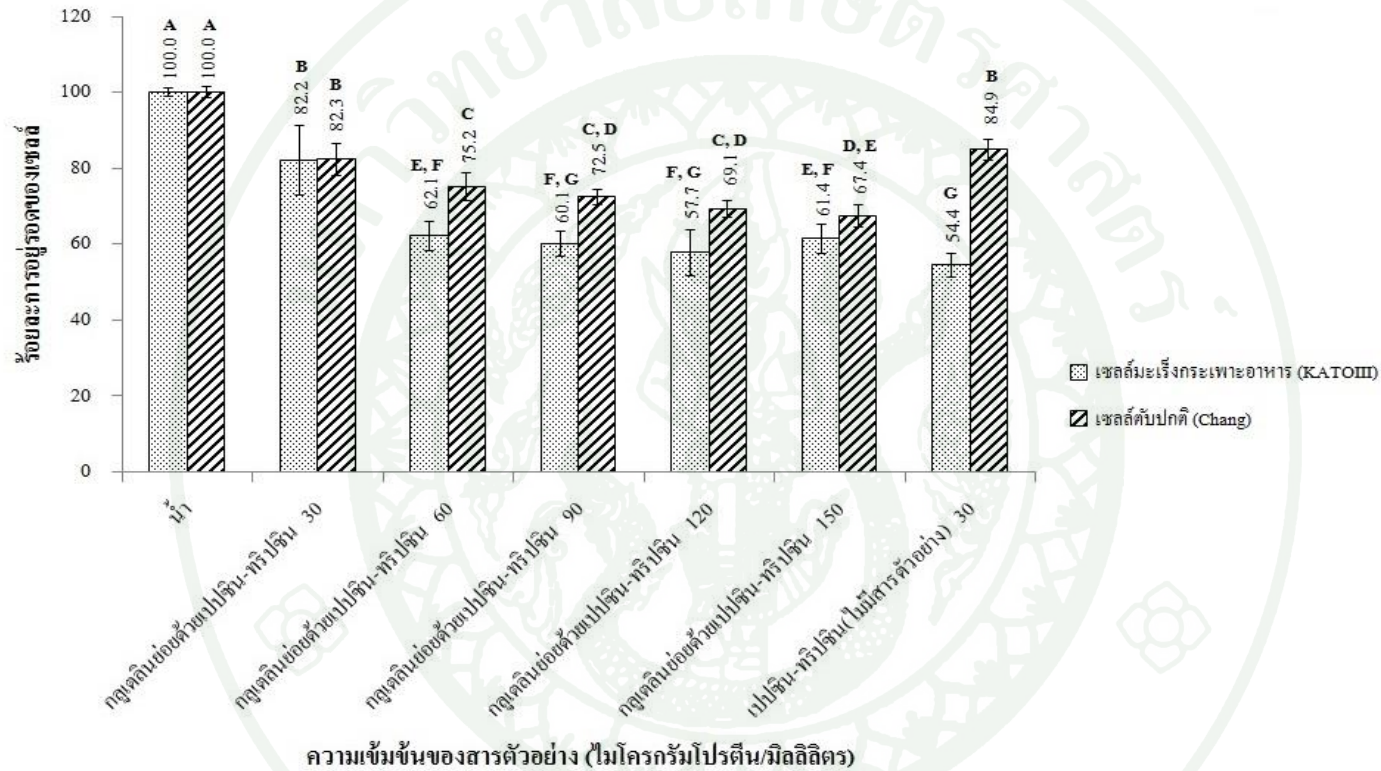
ภาพผนวกที่ 18 ร้อยละความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลลุ่มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลลุ่มะเร็งตับ (Chang) เมื่อใช้กุลูเตลินและกุลูเตลินไฮโดรไลสเสทชนิดเปปซินและเปปซิน-ทวีปซินที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน



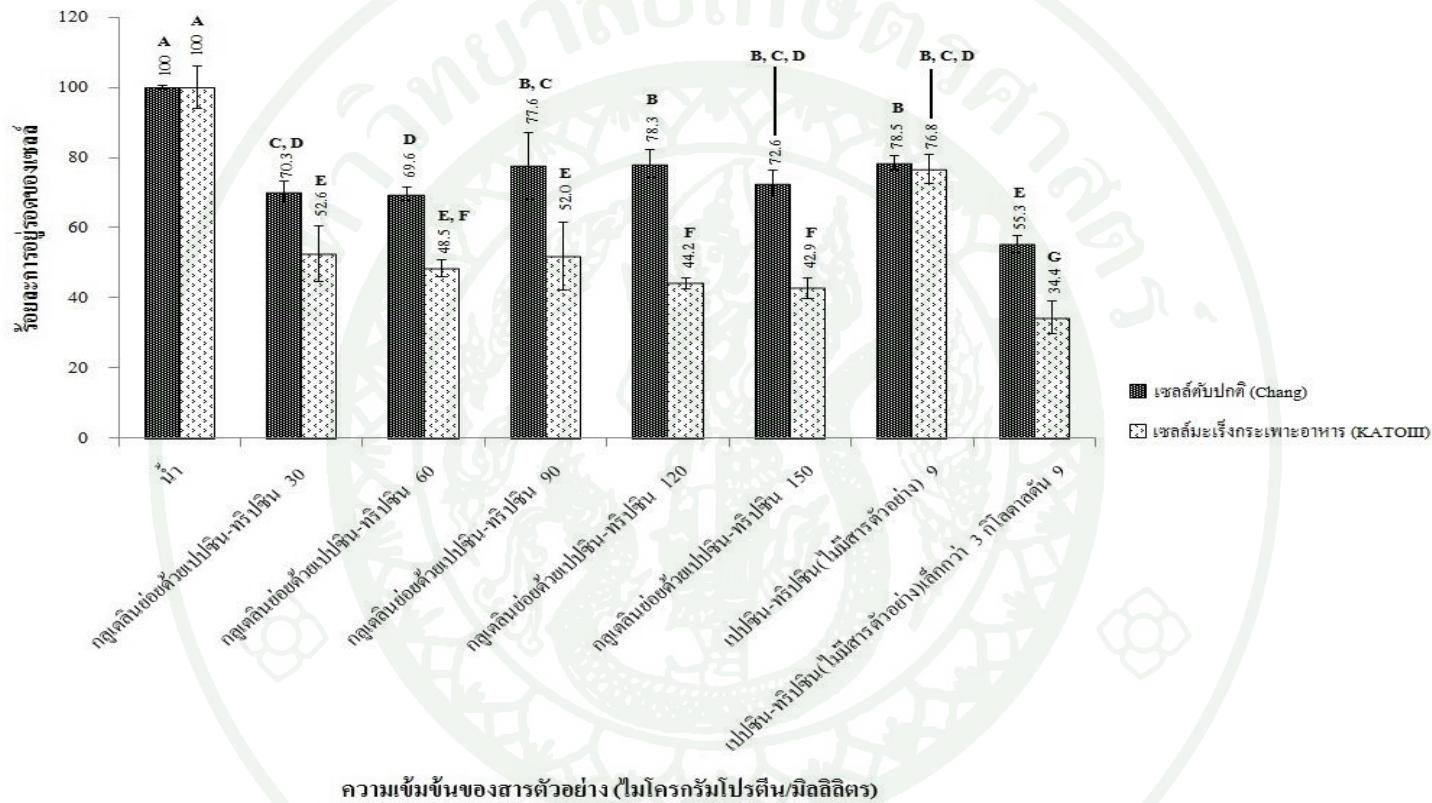
ภาพผนวกที่ 19 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูตาไธนไฮโดรไลสเอนไซม์เปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรรวมถึงเปปซิน-ทริปซินทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน



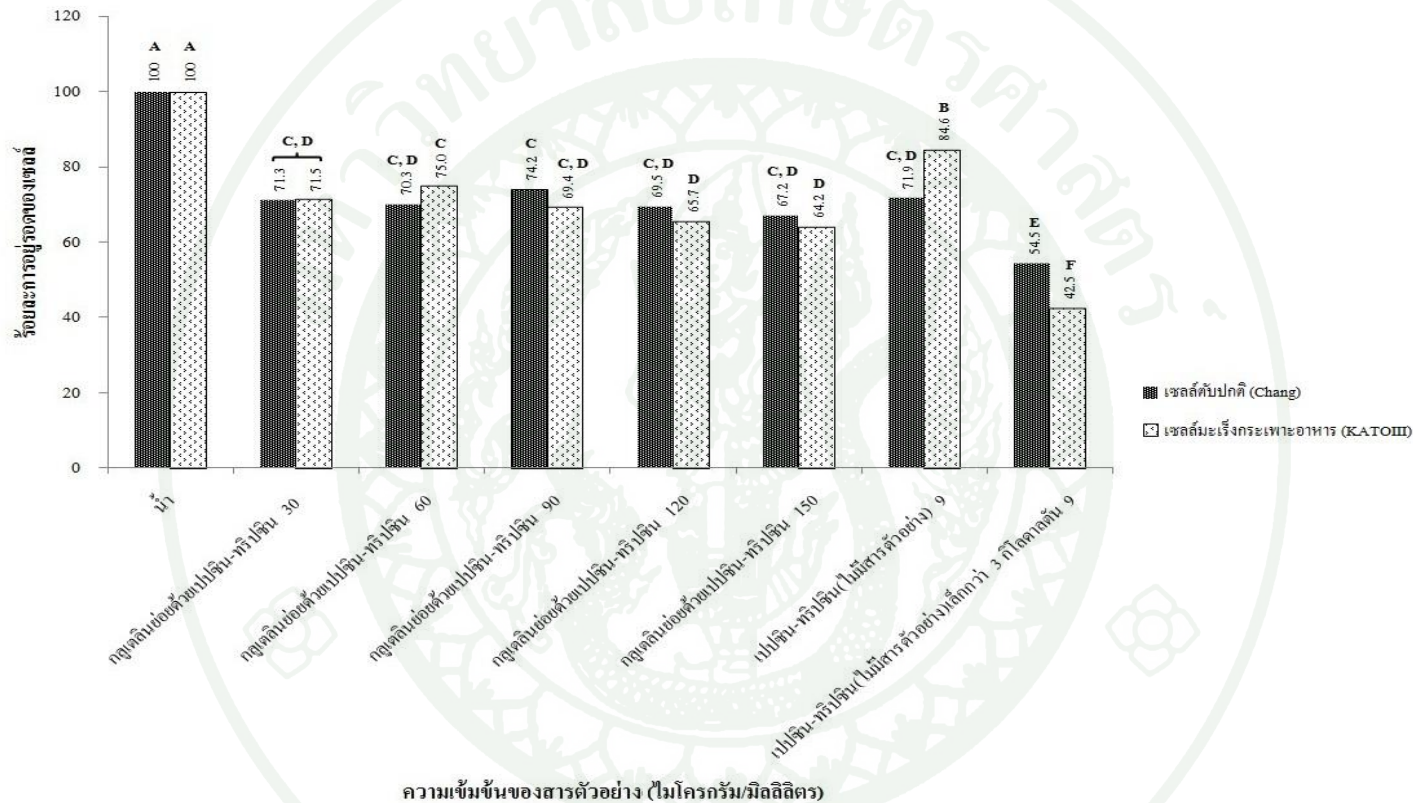
ภาพผนวกที่ 20 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร รวมถึงเปปซิน-ทริปซินทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพผนวกที่ 21 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ตับปกติ (Chang) เมื่อใช้กลูเตลินไฮโดรไลเสทชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร รวมถึงเปปซิน-ทริปซินทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพผนวกที่ 22 แสดงความสามารถของกุญแจลินไฮโดรไลสเททชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรรวมถึงเปปซิน-ทริปซินและเปปซิน-ทริปซินซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 3 กิโลคาลตันในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเซลล์ทับปกติ (Chang) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพผนวกที่ 23 แสดงความสามารถของกล้วยคลินไฮดรอลิเซชันชนิดเปปซิน-ทริปซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30, 60, 90, 120 และ 150 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตรรวมถึงเปปซิน-ทริปซินและเปปซิน-ทริปซินซึ่งมีขนาดน้อยกว่า 3 กิโลดาลตัน ในการยับยั้งการเจริญของเชลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATOIII) เปรียบเทียบกับเชลล์ดัมปกติ (Chang) โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวกนกอร สุวรรณดำรงค์
เกิดวันที่	5 กันยายน 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประวัติการทำงาน	บริษัท อินเทอร์เน็ตไทยฟาร์มาซูติคัล แมนูแฟกเจอร์ริง จำกัด บริษัท เอส แอนด์ เจ อินเทอร์เน็ตเนชั่นแนล เอนเตอร์ไพรส์ จำกัด (มหาชน) บริษัท เกสซ์กรรมศรีประสิทธิ์ จำกัด
ผลงานวิจัยที่นำเสนอ ในที่ประชุมวิชาการ	Antioxidant Activities of Rice Storage Proteins and Their Protein Hydrolysate (The 4 th International Biochemistry and Molecular Biology Conference 2014)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนวิจัยโครงการการใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ศึกษาวิถีการผลิตโปรตีนหลักในเมล็ดข้าวและการเตรียมเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดและรำข้าวจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) - สวท. (AGRICULTURAL RESEARCH DEVELOPMENT AGENCY)