



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง ผลของเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวอินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตต่อ
ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
Effect of anti-cancer peptides derived from organic rice brans in yogurt
on antiproliferation of cancer cells

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2559

จำนวน 289,700 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายมงคล ธิรบุญยานนท์

ผู้ร่วมโครงการ

นางวิจิตรา แดงปรก

นางสาวชุติมา คงจรรยา

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30 กรกฎาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง ผลของเปปไทด์ต้านมะเร็งจากร้าข้าวอินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้ดำเนินการวิจัยเป็นไปได้อย่างดี โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2559 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	3
คำนำ	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการวิจัย	19
วิจารณ์ผลการวิจัย	32
สรุปผลการวิจัย	36
เอกสารอ้างอิง	38

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 น้ำหนักรำข้าวปราศจากไขมัน	19
ตารางที่ 2 น้ำหนักโปรตีนรำข้าว	20
ตารางที่ 3 น้ำหนักเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าว	20
ตารางที่ 4 น้ำหนักเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง	21
ตารางที่ 5 น้ำหนักเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลอง	21



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้	22
ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็งลำไส้	23
ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมแดงต่อการยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็งลำไส้	24
ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็งลำไส้	25
ภาพที่ 5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้	26
ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็งตับ	27
ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็งตับ	28
ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมแดงต่อการยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็งตับ	29
ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญ ของเซลล์มะเร็งตับ	30
ภาพที่ 10 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ	31

ผลของเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวอินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ
เซลล์มะเร็ง

Effect of anti-cancer peptides derived from organic rice brans in yogurt on
antiproliferation of cancer cells

มงคล ธิรบุญยานนท์¹ วิจิตรา แดงปรก² ชุตินา คงจรรณ¹

MongKol Thirabunyanon¹, Wichitra Daengprok² and Chutima Kongjaroon¹

¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

²คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การผลิตและศึกษาประสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ
ประยุกต์ใช้ประโยชน์จากรำข้าวในเชิงการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็ง จากการนำเมล็ดข้าวที่ทำ
การเกษตรแบบอินทรีย์ 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดง และข้าวเหนียว กข6
สายพันธุ์ละ 40 กิโลกรัม นำมาสีเพื่อแยกรำข้าวและนำรำข้าวมากรองผ่านตะแกรงขนาด 354 ไมครอน พบว่า
ได้ปริมาณรำข้าว 1.86, 1.78, 1.81 และ 1.52 กิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อสกัดไขมันออกรำข้าวด้วยเฮกเซน
แล้ว พบว่าจากน้ำหนักรำข้าวเริ่มต้น 300 กรัม ได้รำข้าวปราศจากไขมันในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าว
หอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 271.6, 270.9, 271.3 และ 270.0 กรัม ตามลำดับ เมื่อนำ
รำข้าวที่ไม่มีไขมันไปสกัดโปรตีนแล้ว พบว่าได้โปรตีนจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าว
หอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 10.4, 11.1, 11.4 และ 10.2 กรัม ตามลำดับ และจากการนำโปรตีนรำ
ข้าวไปย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแล้ว พบว่าได้เปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าว
หอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 5.97, 7.19, 7.68 และ 3.41 กรัม ตามลำดับ ผลจากการ
นำเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวไปผ่านสภาวะกระเพาะอาหารจำลองแล้ว พบว่าได้เปปไทด์ชีวภาพจากรำ
ข้าวที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลองจากเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าว
หอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 2.17, 2.39, 2.89 และ 2.07 กรัม ตามลำดับ จากการ
นำเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวไปผ่านสภาวะลำไส้จำลองแล้ว พบว่าได้เปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวที่ทน
ต่อสภาวะลำไส้จำลองจากเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง
และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 1.42, 2.04, 2.61 และ 1.13 กรัม ตามลำดับฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพที่ระดับความ
เข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105
รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่ามี

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ ที่ระดับ 56 – 63, 41 – 51, 58 – 60 และ 46 - 53 เปอร์เซ็นต์ โดยฤทธิ์ยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มพบว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมแดง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ ในขณะที่ฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่ระดับ 53 – 60, 36 – 51, 49 – 52 และ 48 - 54 เปอร์เซ็นต์ โดยฤทธิ์ยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มพบว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ

ผลจากการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ที่ได้จากการวิจัยนี้อาจจะเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งลำไส้และมะเร็งตับได้ โดยคณะผู้วิจัยจะนำเปปไทด์ต้านมะเร็งที่ผลิตจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมแดงซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งสูงกว่ารำข้าวที่ผลิตจากสายพันธุ์อื่น ๆ ไปเสริมในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในรูปแบบอาหารฟังก์ชันต้านมะเร็งในการวิจัยต่อเนื่องต่อไป

Abstract

The aim of this research was to utilize rice bran as bioactive peptide for cancer protection and/or therapy. Organic rice brans of Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 varieties were applied in this experiment. These organic rice seeds of each 40 kg of each varieties were milled and sieved passage through 354 μm . The obtained rice bran weight of Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 were 1.86, 1.78, 1.81 and 1.52 kg, respectively. Amount of 300 g of each varieties of rice brans were further defatted using hexane, the defatted rice bran weight of Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 were 271.6, 270.9, 271.3 and 270.0 g, respectively. The rice bran protein was further isolated from defatted rice bran, the rice bran proteins weight of Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 were 10.4, 11.1, 11.4 and 10.2 g, respectively. Rice bran peptide production using an alcalase, the obtaining peptide from Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 were the rates of 5.97, 7.19, 7.68 and 3.41 g, respectively. The gastric and intestinal conditional models of resistant peptides were further investigated, the obtaining resistant peptides from gastric conditional model from Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 were 2.17, 2.39, 2.89 and 2.07 g, respectively. While the obtained peptides from intestinal conditional model from Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 were 1.42, 2.04, 2.61 and 1.13 g, respectively. The activities of these rice bran peptides against colon and liver cancers were further investigated and designed which each of 4 concentrations as of 75, 125, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$. The results showed that the colon cancer cell antiproliferation from Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 were 56 – 63, 41 – 51, 58 – 60 and 46 – 53%, respectively. While the liver cancer cell antiproliferation from Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 were 53 – 60, 36 – 51, 49 – 52 and 48 – 54%, respectively.

This study suggested that anticancer peptides derived from Hom Dok Mali 105, Hom Nil, Hom Dang and glutinous rice RD6 rice brans in this investigation may apply for colon and liver cancer protection and/or therapy. The higher potential of anticancer peptides obtained from Hom Dok Mali 105 and Hom Dang will continually further studied in yogurt as functional food against cancers.

คำนำ

อัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่งในประเทศไทยเราในปัจจุบันนี้ มีสาเหตุหลัก ๆ คือ มาจากโรคมะเร็ง โดยที่อัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งดังกล่าวนี้ มีมากกว่าการเสียชีวิตที่มีสาเหตุเกิดจากอุบัติเหตุหรือโรคหัวใจ ซึ่งโดยปกติจะมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงมากอยู่แล้ว ทั้งยังเคยครองสถิติที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับหนึ่ง ติดต่อกันมานาน ทั้งนี้ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว นั้นมาจากยารักษาโรคที่มีราคาแพง ด้วยเพราะยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันส่วนใหญ่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ดังนั้นด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งโดยทั่วไปมักจะเข้าไม่ถึงการบำบัดรักษาด้วยเคมีบำบัดที่ดี ดังนั้นการป้องกันโรคมะเร็งหรือการผลิตรายการโรคโดยใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรานั้น ถือเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดอัตราการเกิดโรคหรือลดอัตราการเสียชีวิตลง ทั้งยังช่วยประหยัดงบประมาณในการดูแลผู้ป่วยโรคมะเร็งดังกล่าวที่มีการจัดสรรงบประมาณมากขึ้นทุก ๆ ปีอีกด้วย

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากรำข้าว (rice bran) โดยการใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากและมีหลากหลายชนิดในรำข้าวเพื่อการประยุกต์ใช้ในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็ง โดยที่แนวคิดการประยุกต์ใช้ประโยชน์ดังกล่าวนี้เนื่องจากรำข้าว นั้นเป็นเศษเหลือจากการแปรรูปข้าวเปลือกที่มีราคาถูก แต่ทั้งนี้รำข้าวก็ยังคงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหลืออยู่เป็นจำนวนมากด้วยเช่นกัน นอกจากนั้นประเทศไทยของเราเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวและส่งออกข้าวสารไปยังต่างประเทศสูงเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ดังนั้นรำข้าวซึ่งเป็นเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปข้าวเปลือกไปเป็นข้าวสารนั้น ก็ยังคงเป็นทรัพยากรที่มีเหลือในปริมาณที่มากด้วยเช่นเดียวกัน

เปปไทด์ชีวภาพ (bioactive peptide) เป็นเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพที่ดี ซึ่งโดยการศึกษาคุณสมบัติและการศึกษาประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าว ทั้งนี้เพื่อนำไปเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งนั้น เป็นแนวคิดที่ใหม่และน่าสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะผลิตเปปไทด์จากรำข้าวที่มีราคาถูกให้มีประสิทธิภาพในการป้องกัน และหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้ พร้อมกันนั้นยังมีแนวคิดที่จะนำเปปไทด์ที่ผลิตได้ไปใส่ในผลิตภัณฑ์นมหมัก (โยเกิร์ต) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มอรรถประโยชน์ของนมหมัก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่คนไทยนิยมบริโภคให้มีประโยชน์ในการป้องกันโรคมะเร็งให้กับผู้บริโภคอีกแนวทางหนึ่งด้วย นอกจากนั้นเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพจะมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารสังเคราะห์ เนื่องจากเปปไทด์เป็นสารชีวโมเลกุลที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นกระบวนการปกติในร่างกาย และมีประโยชน์ต่อร่างกายอยู่แล้ว (Wang and Gonzalez De Mejia, 2005; Phelan *et al.*, 2009) ผู้วิจัยคาดหวังว่าเปปไทด์ที่ผลิตจากรำข้าวในโครงการวิจัยนี้ จะเป็นส่วนหนึ่งของการประยุกต์ใช้ทรัพยากรที่มีราคาถูกที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรา ทั้งนี้เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นยาหรือสารชีวภาพในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้ในอนาคต ทั้งยังประยุกต์ใช้ในรูปแบบอาหารฟังก์ชัน คือ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อผลิตเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวอินทรีย์ 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดง และข้าวเหนียว กข6
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวอินทรีย์ 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดง และข้าวเหนียว กข6 ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เปปไทด์ต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ลำไส้และมะเร็งตับ
2. ได้ประสิทธิภาพของเปปไทด์ต้านมะเร็งที่อยู่ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ

การตรวจเอกสาร

โรคมะเร็ง (cancer) เป็นโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่ DNA หรือที่สารพันธุกรรม ซึ่งส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติ ซึ่งส่งผลทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อที่ผิดปกติ หรือโรคมะเร็งโดยปกติแล้วถ้ามะเร็งเกิดขึ้นที่อวัยวะใดในร่างกายก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้น ๆ เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2560) โดยปกติแล้วในประเทศไทยของเราพบว่าผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นมากกว่าในอดีตอย่างเห็นได้ชัด โดยจากรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (Hospital – Based Cancer Registry) ปี 2558 พบว่ามีผู้ป่วยใหม่มารับการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวน 25,376 คน ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งรายใหม่มารับบริการ 3,439 คน (อาคมและคณะ, 2560) โดยข้อมูลดังกล่าวนี้จะไม่รวมผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งที่ทำการรักษาในสถานที่อื่น ๆ หรือเสียชีวิตโดยไม่ได้รับการรักษาเลย ซึ่งหากรวมผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งทั้งหมดที่รวมทั้งผู้ป่วยเก่าและผู้ป่วยใหม่แล้ว ในประเทศไทยของเราจะมีผู้ป่วยเป็นมะเร็งจำนวนมาก ดังนั้นจึงส่งผลให้โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากที่สุด ซึ่งมีอัตราสูงกว่าสาเหตุมาจากอุบัติเหตุหรือโรคหัวใจมาประมาณหลาย ๆ ปีที่ผ่านมาแล้ว โดยสถิติโรคมะเร็งที่พบมากในผู้ชายประจำปี 2558 เรียงตามอันดับ 1, 2 และ 3 ก็คือ มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ และมะเร็งปอด ตามลำดับ ในขณะที่ผู้หญิงมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 1, 2 และ 3 ก็คือ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ตามลำดับ (อาคมและคณะ, 2560)

โดยปกติแล้วการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันนี้มีหลาย ๆ วิธี ซึ่งวิธีการรักษาที่ได้มาตรฐาน อาทิเช่น การผ่าตัด การใช้เคมีหรือยาบำบัด และการฉายรังสี เป็นต้น โดยวิธีที่กล่าวมาข้างต้นดังกล่าวไม่สามารถที่จะฆ่าเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมด นอกจากนั้นการรักษาโรคมะเร็งนั้นยังมีค่าใช้จ่ายในการบำบัดรักษาโรคที่สูงมาก รวมทั้งอาจเกิดอาการแพ้ยาบำบัดหรือเกิดผลข้างเคียง เป็นต้น ดังนั้นการค้นหาสารชีวภาพหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรา เพื่อนำมาป้องกันหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งก็จะต้องมีการศึกษาวิจัยกันอย่างจริงจัง ทั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดอัตราการเกิดโรคและหรือลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งดังกล่าว

รำข้าว (rice bran) เป็นเศษเหลือ (by-product) จากกระบวนการแปรรูปข้าวเปลือกไปเป็นข้าวสารขาว โดยปกติแล้วรำข้าวนั้นมีราคาถูกและบางครั้งหลังจากสกัดน้ำมันรำข้าวแล้วก็อาจจะถูกทิ้งเป็นของเศษเหลือทิ้ง (Wiboonsirikul, *et al.*, 2007) แต่อย่างไรก็ตามส่วนประกอบหรือสารชีวภาพที่สำคัญในรำข้าวนั้นมีมากมาย เช่น มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นจำนวนทั้งปริมาณและชนิด (Rao *et al.*, 2010) มีส่วนสารประกอบที่สำคัญ อาทิเช่น โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ คาร์โบไฮเดรต ฟอสโฟลิปิด และกรดไขมันที่จำเป็น เป็นต้น (Saunders, 1990; Bandyopadhyay *et al.*, 2008) รำข้าวมีส่วนประกอบของโปรตีนประมาณ 10 - 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดีและมีความสำคัญต่อร่างกาย ดังนั้นโปรตีนจากรำข้าวจึงมีคุณค่าทางโภชนาการ และมีคุณสมบัติด้านยาที่เหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ (Fabian and Ju, 2011)

ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าว นั้นว่ามีประโยชน์ต่อร่างกายได้อย่างหลากหลาย โดยเฉพาะบทบาทในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง ดังตัวอย่างเช่น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิด arabinoxylan จากรำข้าวมีประสิทธิภาพเสริมช่วยกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Ghoneum and Gollapudi, 2003) และช่วยกระตุ้นให้เคมีบำบัดชนิด daunorubicin ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมได้มากขึ้น (Gollapudi and Ghoneum, 2008) เช่นเดียวกับสารออกฤทธิ์ tocotrienol ที่สกัดแยกออกมาจากรำข้าวที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Sun *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2010; Kannappan *et al.*, 2010; Bi *et al.*, 2010) จากการรายงานของ Kim *et al.* (2012) ที่พบว่าหนูที่ได้รับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิด alpha-oryzanol ซึ่งเป็นสารที่มีส่วนประกอบในรำข้าว นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (tumor) ได้ นอกจากนั้นยังพบว่าสารในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) ชนิด cycloartenylferulate สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติของลำไส้ (Kong *et al.*, 2009) เป็นต้น

เปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดเปปไทด์ (bioactive peptide) ก็มีการศึกษาวิจัยว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งเช่นเดียวกัน เปปไทด์ได้จากกระบวนการย่อยหรือกระบวนการหมักของโปรตีนที่มีอยู่ในอาหาร โดยอาศัยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ที่มีอยู่หลายๆ ชนิด (Walther and Sieber, 2011; Udenigwe and Aluko, 2012) เปปไทด์แต่ละชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัย อาทิเช่น แหล่งของโปรตีนว่ามาจากพืชหรือสัตว์ชนิดใด โปรตีนมีองค์ประกอบอย่างไรชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน กระบวนการย่อยที่รวมไปถึงระดับความเป็นกรดหรือด่าง เวลา หรืออุณหภูมิที่ใช้ย่อย (Wang and Gonzalez De Mejia, 2005; Udenigwe and Aluko, 2012) เปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพจะมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบต่อเชื่อมกัน 2 – 9 ชนิดและเมื่อทำการหาชนิดของกรดอะมิโนส่วนใหญ่ในเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพพบว่าเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ เช่น โพรลีน (proline) อาร์จินีน (arginine) และไลซีน (lysine) (Dziuba *et al.*, 1999; Kitts and Weiler, 2003; Korhonen and Pihlanto, 2003) โดยปกติแล้วเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพนั้นจะมีความปลอดภัย เพราะร่างกายของพวกเราที่ย่อยโปรตีนแล้วได้เปปไทด์และนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายอยู่แล้ว (Wang and Gonzalez De Mejia, 2005; Phelan *et al.*, 2009) นอกจากนั้นในกระบวนการในการผลิตเปปไทด์จะต้องอาศัยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนที่เป็นชนิดที่ใช้ในอาหาร ทั้งนี้ก็เพื่อเพิ่มความมั่นใจต่อการนำเปปไทด์ไปใช้ในมนุษย์ (Udenigwe and Aluko, 2012) การศึกษาผลของเปปไทด์ต่อการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง พบว่าการใช้เอนไซม์ในการแยกเปปไทด์ออกจากถั่วเหลืองหลาย ๆ พันธุ์มีเปปไทด์ชนิด beta-conglycinins ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ (Wang *et al.*, 2008) เช่นเดียวกันกับเปปไทด์ที่แยกมาจากเนื้อของปลาทูน่า (tuna dark muscle) โดยใช้เอนไซม์ชนิด papain และ protease ในการย่อยเปปไทด์ ผลที่ได้พบว่าสามารถผลิตเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ 2 ชนิด โดยทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ (Hsu *et al.*, 2011)

นมหมัก (fermented milk) เป็นผลิตภัณฑ์จากน้ำนมที่ผ่านการหมักนมด้วยแลคติกแอซิกแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต ในปัจจุบันนักวิจัยกำลังพัฒนาผลิตภัณฑ์นม

หมักให้เป็นอาหารฟังก์ชัน (functional food) ซึ่งอาหารฟังก์ชันดังกล่าวหมายถึงผลิตภัณฑ์อาหารที่ประกอบด้วยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยที่อาหารฟังก์ชันดังกล่าวนี้จะมีประโยชน์ต่อร่างกายของผู้บริโภคทั้งในเชิงของการป้องกันและรักษาโรคอีกด้วย (Martirosyan, 2011) การประยุกต์ใช้อาหารฟังก์ชันในรูปแบบของโยเกิร์ตเพื่อการป้องกันและรักษาโรคนั้น ก็มีความสำคัญและมีการศึกษาวิจัยเช่นเดียวกัน (Urbanska *et al.*, 2010; Hemsworth *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2011) ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นที่รู้จักและเป็นที่ยอมรับบริโภคสำหรับประชาชนทั่วไป ดังนั้นการพัฒนาอาหารฟังก์ชันในรูปแบบของโยเกิร์ตเพื่อให้ผู้บริโภคได้รับเปปไทด์ต้านมะเร็งนั้น จะเป็นวิธีการที่สะดวกและประหยัด เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานที่พบว่าการใส่เปปไทด์ชนิด casein hydrolysates ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้น จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติที่ดีของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเลย (Sodini *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006)

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากรำข้าวในรูปแบบต่าง ๆ ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งในประเทศไทยเรานั้นมีน้อยมาก ทั้ง ๆ ที่ในบ้านเรายังมีรำข้าวซึ่งเป็นเศษเหลือทางการเกษตรจากการแปรรูปข้าวเปลือกไปเป็นข้าวสารขาวนั้น ก็มีเหลืออยู่จำนวนมากและมีราคาถูกนอกจากนั้นเรายังสามารถที่จะผลิตเปปไทด์ต้านมะเร็งที่เป็นชนิดใหม่ของเราได้ เนื่องจากบ้านเรามีพันธุ์ข้าวที่แตกต่างจากประเทศอื่นๆ ด้วยเหตุที่ความแตกต่างของเปปไทด์ที่ผลิตขึ้นได้แต่ละชนิดนั้น จะขึ้นอยู่กับแหล่งของโปรตีนในที่นี้ก็คือโปรตีนรำข้าวที่เป็นของประเทศไทยนั่นเอง การพัฒนาอาหารฟังก์ชันในรูปแบบของการใส่เปปไทด์ต้านมะเร็งในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้น จะเป็นนวัตกรรมที่สามารถใช้เปปไทด์ต้านมะเร็งทั้งใช้เพื่อป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 เมล็ดพันธุ์ข้าว

1.1.1. ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดง และข้าวเหนียว กข6 เป็นข้าวที่ทำการเกษตรแบบอินทรีย์จาก อำเภอพริ้ว จังหวัดเชียงใหม่

1.2 เซลล์สายพันธุ์ของเซลล์มะเร็ง

2.1.1. เซลล์ HepG2 (ATCC, USA) เซลล์มะเร็งตับ

2.1.2. เซลล์ HT-29 (ATCC, USA) เซลล์มะเร็งลำไส้

1.3 อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

1.3.1 อาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Gibco™)

1.3.2 Fetal bovine serum (Gibco™)

1.4 เอนไซม์ สารเคมี และวัสดุวิทยาศาสตร์

1.4.1 Alcalase, Alcalase® 2.4 L.	(Sigma, USA)
1.4.2 Pancreatin	(Sigma, USA)
1.4.3 Pepsin	(Sigma, USA)
1.4.4 Gallic acid	(Sigma, USA)
1.4.5 Sodium chloride (NaCl)	(Merk, Germany)
1.4.6 Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	(Merk, Germany)
1.4.7 Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA)	(Ajax Finechem, Austraria)
1.4.8 Emulsion oil	(Merk, Germany)
1.4.9 Trypan blue	(Sigma-Aldrich, USA)
1.4.10 Trysin EDTA	(Hyclone, USA)
1.4.11 Absolute ethanol	(Merk, Germany)
1.4.12 Glycerol	(Merk, Germany)

1.4.13 Hydrochloric acid	(Merk, Germany)
1.4.14 Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	(Merk, Germany)
1.4.15 Sodium hydroxide	(Merk, Germany)
1.4.16 Fetal calf serum	(Hyclone, USA)
1.4.17 Non-essential amino acid	(Hyclone, USA)
1.4.18 Penicillin-streptomycin	(Hyclone, USA)
1.4.19 Methoxyamine hydrochloride	(Sigma, USA)
1.4.20 N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide	(Sigma, USA)
1.4.21 Trimethylchlorosilane	(Sigma, USA)
1.4.22 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	(Sigma, USA)
1.4.23 Folin-Ciocalteus's phenol reagent	(Merk, Germany)
1.4.24 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	(Sigma, Germany)
1.4.25 Potassium persulphate	(Ajax, Australia)
1.4.26 Sodium acetate (trihydrate)	(Labscan, Thailand)
1.4.27 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	(Sigma, Switzerland)
1.4.28 IRON(III) chloride anhydrous	(Ajax, Australia)
1.4.29 IRON(II) sulphate	(Ajax, Australia)
1.4.30 Acetic acid	(Merck, Germany)

1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.5.1 ตู้บ่ม (Oven, ยี่ห้อ Menmert, Germany)
- 1.5.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 และ 4 ตำแหน่ง
- 1.5.3 เครื่องเขย่า
- 1.5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 1.5.5 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 1.5.6 ตู้บ่ม (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240(E2), USA)
- 1.5.7 ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator, ยี่ห้อ Forma Scientific, รุ่น 3111, USA)
- 1.5.8 ตู้อบเครื่องแก้ว (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED115 (E2), USA)
- 1.5.9 ตู้อบเครื่องแก้ว (High Performance Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240 (E2), USA)

- 1.5.10 ตู้เขี่ยเชื้อ (Horizontal type laminar flow, ยี่ห้อ Triwork 2000 รุ่น CLEAN H2-3, ประเทศไทย)
- 1.5.11 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer, ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-592, Japan)
- 1.5.12 ตู้ฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave, ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50, Japan)
- 1.5.13 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscope, ยี่ห้อ Olympus รุ่น UM 500)
- 1.5.14 กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope, Olympus, ULWCD 0.30)
- 1.5.15 พีเอชมิเตอร์ (pH/Ion/Conductivity, ยี่ห้อ WTW รุ่น PP50)
- 1.5.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath/Unsteirred digital bath, ยี่ห้อ Julabo Labortechnik GMBH รุ่น TW12)
- 1.5.17 ถังไนโตรเจนเหลว (TAYLOR-WHARTON, XT-20, USA)
- 1.5.18 ไมโครปิเปต ปรับปริมาตรได้ขนาด 0-20, 20-200 และ 100-1,000 มิลลิลิตร
- 1.5.19 Nylon syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)
- 1.5.20 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
- 1.6 ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์และภาชนะอื่นๆ
- 1.6.1 ฟลาสค์เลี้ยงเซลล์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.6.2 ถาดหลุม 24 หลุม
- 1.6.3 ถาดหลุม 96 หลุม
- 1.6.4 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- 1.6.5 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
- 1.6.6 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
- 1.6.7 ปีกเกอร์ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.6.8 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

2. วิธีการวิจัย

2.1 การผลิตเปปไทด์จากรำข้าวอินทรีย์

2.1.1 การเตรียมตัวอย่างรำข้าว

โดยตัวอย่างรำข้าวในการวิจัยครั้งนี้จะรวบรวมข้าวที่มีการปลูกแบบอินทรีย์ เพื่อป้องกันการเจือปนของสารเคมีในรำข้าว ซึ่งทำการซื้อพันธุ์ข้าวอินทรีย์เองเพื่อทำการคัดเมล็ดพันธุ์อื่นทิ้งก่อน ซึ่งปกติมักจะมี การปลอมปนอยู่เสมอ โดยซื้อพันธุ์ข้าว 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดง และ ข้าวเหนียว กข6 โดยจะต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวให้มีจำนวนที่เหมาะสมเพื่อให้ได้รำข้าวเพียงพอสำหรับการทดลอง จากนั้นนำไปสีด้วยเครื่องสีขนาดเล็ก แล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 60 mesh ซึ่งมีรูขนาด 354 ไมครอน (Kannan *et al.*, 2008) จากนั้นจะนำรำข้าวมาผ่านกระบวนการที่ทำให้เกิดความเสถียรภาพ (heat stabilized) โดยอบความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น (Ryan *et al.*, 2011)

2.1.2 การสกัดน้ำมันรำข้าว

โดยการนำรำข้าวมาสกัดแยกน้ำมันรำข้าวออก โดยใช้เฮกเซน (food grade) เป็นสารสกัด โดยใช้ อัตราส่วนของเฮกเซนและรำข้าวเท่ากับ 3 : 1 จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการสกัด น้ำมันรำข้าวออกจำนวน 2 รอบ จากนั้นนำรำข้าวที่สกัดไขมันออกแล้วไประเหยให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 1 คืน (Wang *et al.*, 1999)

2.1.3 การสกัดโปรตีนรำข้าว

การสกัดโปรตีนจากรำข้าวมีวิธีการเตรียมและสกัดดังนี้ (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2008; Fabian *et al.*, 2010) โดยจะเริ่มจากการนำรำข้าวที่สกัดน้ำมันออกไปแล้วมาบดและ นำรำข้าว 10 กรัม มาผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยปรับให้ได้ pH 10 แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 - 55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเอาส่วนใส (supernatant) ไปปรับให้ได้ pH 4 ด้วย 1N HCl นำไปเขย่าด้วย เครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 - 55 องศาเซลเซียสแล้วนำตัวอย่างไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 20 นาที ส่วนที่ตกตะกอนจะเป็นโปรตีนรำข้าว การเก็บรักษาโปรตีนรำข้าว นั้น จะนำโปรตีนไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (freeze dry) แล้วเก็บรักษาไว้เพื่อทำการทดลอง ต่อไปการหาจำนวนเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่ได้โดยใช้วิธี Kjeldahl method โดยใช้ปัจจัยตัวคูณเท่ากับ 5.95

2.1.4 การย่อยโปรตีนรำข้าวให้เป็นเปปไทด์

โดยการนำโปรตีนรำข้าว 10 กรัม มาผสมด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำส่วนผสมดังกล่าวไปปรับ pH 8 แล้วเติมเอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) ที่มีความเข้มข้น 2.4 U/g ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า โดยกำหนดสภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm ใช้เวลาในการย่อย 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 15 นาที เปปไทด์ที่ได้จะอยู่ส่วนใส จากนั้นจะนำส่วนใสไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (freeze dryer) แล้วเก็บรักษาเปปไทด์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการทดลองต่อไป (Li *et al.*, 2007; Kannan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012)

2.1.5 การทดสอบเปปไทด์ที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลองของมนุษย์

โดยการนำเปปไทด์รำข้าว 5 กรัม มาเติมในของเหลวที่จำลองสภาวะที่อยู่บริเวณกระเพาะอาหารของมนุษย์ (Takagi *et al.*, 2003; Ohnuki and Otani, 2005; Kannan *et al.*, 2008) ซึ่งของเหลวดังกล่าวประกอบด้วยน้ำกลั่นประมาณ 90 มิลลิลิตร NaCl 0.2 กรัม และ HCl 0.7 กรัม ผสมของเหลวให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับให้ได้ pH 2 แล้วเติมเอนไซม์เปปซิน 0.32 กรัม และปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเติมเปปไทด์รำข้าวลงไปแล้วต้องกวนของเหลวให้สม่ำเสมอเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับ pH ไปที่ pH 7.2 เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที เปปไทด์รำข้าวที่ทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารดังกล่าวจะอยู่ในส่วนใส และนำส่วนใสไปเข้าเครื่องทำแห้งด้วยความเย็นเพื่อทำให้แห้งแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.1.6 การทดสอบเปปไทด์ที่สภาวะบริเวณลำไส้จำลองของมนุษย์

โดยการเตรียมเปปไทด์ที่ผ่านการทดสอบต่อสภาวะกระเพาะอาหารแล้วที่อยู่ในรูปผง โดยนำมาเติมในของเหลวที่จำลองสภาวะที่อยู่บริเวณลำไส้ของมนุษย์ (Takagi *et al.*, 2003; Israel-Ballard *et al.*, 2005; Kannan *et al.*, 2008) โดยของเหลวดังกล่าวประกอบด้วยน้ำกลั่นประมาณ 90 มิลลิลิตร โพตัสเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิก 0.68 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 N ปริมาตร 7.7 มิลลิลิตร ทำการผสมของเหลวให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับให้ได้ pH 8 แล้วเติมเอนไซม์แพนครีเอติน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเติมเปปไทด์รำข้าวที่ผ่านการทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลองแล้ว ทำการกวนของเหลวให้สม่ำเสมอเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับอุณหภูมิไปที่ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที เปปไทด์รำข้าวที่ทนต่อสภาวะจำลองของลำไส้ดังกล่าวจะอยู่ในส่วนใส จะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ

โดยการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในครั้งนี้ จะทดสอบกับเซลล์มะเร็งของโรคมะเร็งที่พบเป็นอันดับต้นๆ ของโรคมะเร็งที่พบทั้งหมดในประเทศไทยของเรา ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ซึ่งแหล่งของเซลล์มะเร็งดังกล่าวจะมาจาก American type culture collection (ATCC)

2.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

โดยเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ดังกล่าวนั้น จะเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) ซึ่งเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ดังกล่าวจะนำมาเลี้ยงเพื่อทำการเก็บสำรองไว้เป็นหลาย ๆ หลอดที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จากนั้นจะนำเซลล์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในพลาสติกเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร DMEM ที่เสริมด้วย fetal bovine serum 10% ซึ่งก่อนจะเติมซีรัมดังกล่าวจะต้องนำไปให้อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เสริมด้วย 1% (v/v) non-essential amino acid และยาปฏิชีวนะ 1% penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml และ 10,000 µg/ml) เซลล์มะเร็งจะเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีการปรับสภาพให้ปลอดเชื้อ มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ทั้งนี้เพื่อเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์มะเร็งให้ได้จำนวนที่เพียงพอสำหรับการศึกษาทดลอง

2.2.2 การทดสอบอัตราการตายของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT Assay

โดยเริ่มจากการทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งให้โตเต็มที่และมีปริมาณเพียงพอต่อการทดลองในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเซลล์มะเร็งโตเต็มที่และมีจำนวนเพียงพอแล้ว นำเซลล์มะเร็งมานับจำนวนที่มีชีวิตโดยใช้สีย้อม trypan blue และปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์ 100 ไมโครลิตร ไปหยอดลงในภาชนะหลอด 96 หลุมต่อหลอด บ่มในตู้บ่มเพื่อให้เซลล์มะเร็งได้ปรับสภาพ 24 ชั่วโมง การทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์โดยการนำเปปไทด์ที่มาจากเจี๊ยงความเข้มข้นที่ 0, 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์มะเร็งในตู้บ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ก็นำเปปไทด์ที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้นในปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาหยอดใส่หลอดในภาชนะหลอด 96 หลุม แล้วนำไปบ่มต่อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเติมด้วยสารละลาย MTT (0.5 mg/ml DMSO) 10 ไมโครลิตรนำไปบ่มต่อในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 4 ชั่วโมงแล้วนำมาตรวจวัดจำนวนเซลล์มะเร็งที่รอดชีวิตด้วย microplate reader ที่ 595 nm โดยการทดลองดังกล่าวได้ทำการทดลอง 3 ครั้ง โดยการทดลองแต่ละครั้งได้ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันและใช้เซลล์มะเร็งที่ลำดับ passage ไม่เหมือนกัน (ศึกษาตามวิธีการของ Thirabunyanon *et al.*, 2009; Thirabunyanon and Hongwittayakorn, 2013)

2.3 การหมักผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและการใส่เปปไทด์ด้านมะเร็งในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

การผลิตผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต และการใส่เปปไทด์ด้านมะเร็งที่ผลิตได้จากรำข้าวอินทรีย์ในครั้งนี้ โดยการใส่เปปไทด์ด้านมะเร็งในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในการวิจัยครั้งนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ผู้บริโภคได้รับเปปไทด์ด้านมะเร็งสำหรับการป้องกันโรคมะเร็งตั้งแต่เนิ่น ๆ แต่ทั้งนี้จะต้องไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติที่ดีของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยเปปไทด์ด้านมะเร็งที่จะนำมาใส่ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในครั้งนี้จะเลือกเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด 2 เปปไทด์ โดยมีวิธีการผลิตและการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตดังต่อไปนี้ (Sodini *et al.*, 2002; Maragkoudakis *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Hemsworth *et al.*, 2011)

2.3.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการหมักโยเกิร์ต

การใส่เปปไทด์ด้านมะเร็งในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในครั้งนี้จะผลิตโดยการใช้หัวเชื้อโยเกิร์ต 2 ชนิด คือ *Streptococcus thermophilus* TISTR 458 และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 895 (*L. bulgaricus*) การเตรียมหัวเชื้อโยเกิร์ตจะเลี้ยงในอาหาร MRS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 g จากนั้นทำการล้างเซลล์แบคทีเรีย 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และนำไปปรับจำนวนเซลล์ให้เท่ากับ McFarland No. 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของแบคทีเรียเท่ากับ 3×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 g แล้วทำการกระจายเซลล์แบคทีเรียใน skim milk ที่ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.2 การเตรียมน้ำนมสำหรับการผลิตโยเกิร์ต

การผลิตโยเกิร์ตในงานวิจัยนี้โดยการใช้นม UHT ชนิดขาดมันเนยที่มีขายในท้องตลาด โดยนำนมมาวัดของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง hand refractometer จากนั้นทำการเติม skim milk และน้ำตาลทรายขาว 7 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดให้มีค่าเท่ากับ 16 °Brix ปรับค่า pH ให้ได้ 6.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ จากนั้นนำนมที่เตรียมไว้ไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นลงทันทีโดยย้ายนมที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วไปใส่ในอ่างน้ำเย็น

2.3.3 การใส่เปปไทด์ในโยเกิร์ตและการหมักโยเกิร์ต

การหมักและผลิตโยเกิร์ตในการวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ใส่เปปไทด์ 1 และกลุ่มที่ใส่เปปไทด์ 2 ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยทุกกลุ่มจะเติมหัวเชื้อหมักโยเกิร์ต คือ *S. thermophilus* TISTR 458 และ *L. bulgaricus* TISTR 895 ชนิดละ 4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่ใส่เปปไทด์ 1 และเปปไทด์ 2 จะแบ่งออกเป็นกลุ่มทดลองย่อยตามความเข้มข้นของเปปไทด์ คือ 0, 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของโยเกิร์ต กระบวนการหมักและผลิตโยเกิร์ตในงานวิจัยครั้งนี้ จะเริ่มจากการนำนมที่ผ่านการปรับค่าความแข็งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว มาอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เติมหหัวเชื้อหมักและเปปไทด์ด้านมะเร็งตาม

สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ที่กำหนดไว้ จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทำการวัดค่า pH ทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนกว่าค่า pH ลดลงจนถึงค่า pH 4.6 หลังจากนั้นจะทำการเก็บรักษาโยเกิร์ตไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาคูณสมบัติหรือคุณภาพด้านต่างๆ ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยจะทำการศึกษาในช่วงเวลาที่ทำการเก็บรักษาโยเกิร์ตเป็นเวลา 28 วัน

2.3.4 จำนวนของแลคติกแอซิคแบคทีเรีย

โยเกิร์ตทุกกลุ่มจะนำมานับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการตรวจนับแต่ละช่วงเวลาของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต วิธีการตรวจนับโดยการนำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมา 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการคัดเลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำมา 100 ไมโครลิตร เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงและตรวจนับในอาหารแข็ง MRS agar โดยวิธีการ spread plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไร้อากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.5 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

การวัดค่าความเป็นกรดต่างของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ทำการวัดด้วยเครื่อง pH meter ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา คือ วันที่ 1, 7, 14, 21 และ 28 วัน

2.3.6 ปริมาณกรดทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์ของกรดแลคติก)

การไตเตรทเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของกรดทั้งหมด โดยการนำโยเกิร์ตมาไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 0.1 M โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอินดิเคเตอร์ (AOAC, 2000)

2.3.7 ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนทั้งหมดโดยการนำโยเกิร์ตมาชั่งน้ำหนัก และวิเคราะห์ตามวิธีการของ Kjeldahl โดยการนำโยเกิร์ตไปย่อยด้วยเครื่องย่อย แล้วนำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน และนำไปไตเตรทด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 N (AOAC, 2007)

2.3.8 ปริมาณของแข็งทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยการนำตัวอย่างโยเกิร์ตมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นให้ตัวอย่างเย็นลง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AOAC, 2007)

2.3.9 ปริมาณเถ้า

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าโดยการนำโยเกิร์ตมาใส่ถ้วยครุชิลและชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจะนำตัวอย่างนี้ไปใส่ในโถดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างเย็นลงแล้วก็ทำการชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AOAC, 2007)

2.3.10 ปริมาณไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธีการใช้กรวยแยกไขมัน แล้วนำไขมันไปใส่ถ้วยครุชิลไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นให้ตัวอย่างเย็นลง แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AOAC, 2007)

2.3.11 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

เป็นกระบวนการทดสอบการยอมรับในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ใส่เปปไทด์ต้านมะเร็ง โดยใช้วิธีการ 9-point hedonic scale ซึ่งผู้ทำการวิจัยทำการสุ่มติดฉลากรหัสของโยเกิร์ตก่อนการให้ผู้ชิมได้ทดลองชิม คุณลักษณะที่สำคัญของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ให้ผู้ชิมทำการประเมินก็คือ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยกำหนดให้คะแนนตั้งแต่ 1 - 9 คะแนน จากระดับ 1 คือ ไม่ชอบมากที่สุด จนถึงระดับ 9 คือ ชอบมากที่สุด

2.4 การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ใส่เปปไทด์ต้านมะเร็งต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ

ประสิทธิภาพของโยเกิร์ตที่ใส่เปปไทด์ต้านมะเร็งต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ และมะเร็งตับ จะมีวิธีการทดสอบเป็นลำดับดังนี้

2.4.1 การเตรียมส่วนใส (supernatant) จากผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

วิธีการเตรียมโดยการนำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 13,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสามารถทดสอบความทนต่ออุณหภูมิสูงของเปปไทด์ต้านมะเร็งด้วย

2.4.2 การทดสอบอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งตับ

การศึกษาลงของโยเกิร์ตใส่เปปไทด์ต้านมะเร็งต่อการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็ง โดยทำการศึกษาด้วยวิธี MTT ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการศึกษาของ Thirabunyanon *et al.* (2009) โดยเริ่มต้นศึกษาจากการเตรียมเซลล์มะเร็งโดยการเจือจางเซลล์เริ่มต้นให้ได้ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมส่วนใสของโยเกิร์ต

ที่ใส่เปปไทด์ต้านมะเร็งที่เตรียมไว้ข้างต้นลงในภาชนะเซลล์ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยกลุ่มควบคุมจะเป็นส่วนของโยเกิร์ตที่ไม่ใส่เปปไทด์ และนำเซลล์มะเร็งไปบ่มต่อในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO ในปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan ที่ไว้นาน 5 นาที และทำการวัดค่าโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมให้มีค่าการรอดชีวิตของเซลล์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง} = (\text{sample O.D} / \text{control O.D}) \times 100$$

หมายเหตุ sample O.D เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง
control O.D เป็นค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

2.4.2 Apoptosis และ cell morphology

เพื่อตรวจดูอัตราการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis โดยดูกลไกที่เกิดการตายผ่าน Caspase-2, 3, 6, 8, 9 ซึ่งวิเคราะห์โดยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป caspase colorimetric protease assay (ApoTarget; KHZ1001) และดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งที่ตายแบบอะพอพโทซิส โดยการใช้สีย้อม propidium iodide (PI) และ acridine orange (AO) และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งด้วยกล้อง fluorescence microscope (ศึกษาตามวิธีการของ Abdel Wahabet *et al.*, 2009)

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่เก็บรวบรวมได้จะนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 16.0) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มโดยวิธี Duncan' multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

1. ปริมาณรำข้าวที่คัดแยกได้จากข้าวเปลือกที่มีการทำการเกษตรอินทรีย์

ข้าวเปลือกอินทรีย์ที่ซื้อมาจากกลุ่มเกษตรอินทรีย์ อำเภอฟัว จังหวัดเชียงใหม่ ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดง และข้าวเหนียว กข6 สายพันธุ์ละ 40 กิโลกรัม จากนั้นนำมาคัดแยกสิ่งเจือปนออกให้หมด แล้วนำมาสีด้วยเครื่องสีข้าวขนาดเล็กเพื่อแยกรำข้าว นำรำข้าวมากรองผ่านตะแกรงเบอร์ 60 (ขนาดรูกรอง 354 ไมครอน) พบว่าได้ปริมาณรำข้าวหอมดอกมะลิ 1.86 กิโลกรัม ข้าวหอมนิล 1.78 กิโลกรัม ข้าวหอมแดง 1.81 กิโลกรัม และข้าวเหนียว กข6 1.52 กิโลกรัม หลังจากนั้นได้นำรำข้าวไปอบ (heat stabilize) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และเก็บรำข้าวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. ปริมาณของรำข้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว

เมื่อนำรำข้าวไปสกัดไขมันด้วยเฮกเซนแล้ว โดยพบว่าจากน้ำหนักเริ่มต้น 300 กรัม พบว่าได้รำข้าวปราศจากไขมันในรำข้าวแต่ละสายพันธุ์ดังนี้ รำข้าวหอมดอกมะลิ 271.8 กรัม รำข้าวหอมนิล 270.9 กรัม รำข้าวหอมแดง 271.3 กรัม และรำข้าวเหนียว กข6 270.0 กรัม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 น้ำหนักรำข้าวปราศจากไขมัน

สายพันธุ์	รำข้าวก่อนสกัดน้ำมัน (g)	รำข้าวปราศจากไขมัน (g)	ปริมาณผลผลิต (%)
รำข้าวหอมดอกมะลิ 105	300.0	271.6 ± 1.11	90.52 ± 0.37
รำข้าวหอมนิล	300.0	270.9 ± 1.10	90.30 ± 0.37
รำข้าวหอมแดง	300.0	271.3 ± 1.35	90.44 ± 0.45
รำข้าวเหนียว กข6	300.0	270.0 ± 1.30	90.00 ± 0.43

หมายเหตุ : (Means ± SD, n = 3)

3. ปริมาณโปรตีนรำข้าว

โดยเมื่อนำรำข้าวที่ไม่มีไขมันไปสกัดโปรตีนแล้ว พบว่าได้โปรตีนจากรำข้าวที่เป็นน้ำหนักแห้งของแต่ละสายพันธุ์ดังนี้ โปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 10.4 กรัม โปรตีนรำข้าวหอมนิล 11.1 กรัม โปรตีนรำข้าวหอมแดง 11.4 กรัม และโปรตีนรำข้าวเหนียว กข6 10.2 กรัม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 น้ำหนักโปรตีนรำข้าว

สายพันธุ์	รำข้าวปราศจากไขมัน (g)	โปรตีนรำข้าว (g)	ปริมาณผลผลิต (%)
รำข้าวหอมดอกมะลิ 105	271.3	10.4 ± 0.90	3.84 ± 0.33
รำข้าวหอมนิล	270.3	11.1 ± 0.81	4.08 ± 0.30
รำข้าวหอมแดง	270.7	11.4 ± 1.00	4.21 ± 0.37
รำข้าวเหนียว กข6	269.3	10.2 ± 1.01	3.78 ± 0.38

หมายเหตุ : (Means ± SD, n = 3)

4. ปริมาณเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าว

โดยเมื่อนำโปรตีนรำข้าวที่เป็นน้ำหนักแห้งของแต่ละชนิดไปผลิตเปปไทด์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแล้ว น้ำหนักของเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนรำข้าวแต่ละสายพันธุ์มีดังนี้ เปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 5.97 กรัม เปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวหอมนิล 7.19 กรัม เปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวหอมแดง 7.68 กรัม และเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวเหนียว กข6 3.41 กรัม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 น้ำหนักเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าว

สายพันธุ์	โปรตีนรำข้าว (g)	เปปไทด์โปรตีนรำข้าว (g)	ปริมาณผลผลิต (%)
รำข้าวหอมดอกมะลิ 105	10.00	5.97 ± 0.91	59.70 ± 8.24
รำข้าวหอมนิล	10.00	7.19 ± 1.06	71.93 ± 9.39
รำข้าวหอมแดง	10.00	7.68 ± 1.03	76.83 ± 7.36
รำข้าวเหนียว กข6	10.00	3.41 ± 0.08	34.13 ± 2.80

หมายเหตุ : (Means ± SD, n = 3)

5. ปริมาณเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง

โดยเมื่อนำเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ไปผ่านสภาวะกระเพาะอาหารจำลองแล้ว พบว่า น้ำหนักของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลองมีปริมาณที่แตกต่างกันดังนี้ น้ำหนักของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจากเปปไทด์โปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 2.17 กรัม เปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจากเปปไทด์โปรตีนรำข้าวหอมนิล 2.39 กรัม เปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจาก

เปปไทด์โปรตีนรำข้าวหอมแดง 2.89 กรัม และเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจากเปปไทด์โปรตีนรำข้าวเหนียว กข6 2.07 กรัม (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 น้ำหนักเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง

สายพันธุ์	เปปไทด์โปรตีนรำข้าว (g)	เปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะ กระเพาะอาหาร (g)	ปริมาณผลผลิต (%)
รำข้าวหอมดอกมะลิ 105	5.00	2.17 ± 0.15	43.47 ± 3.04
รำข้าวหอมนิล	5.00	2.39 ± 0.23	47.87 ± 4.61
รำข้าวหอมแดง	5.00	2.89 ± 0.13	57.73 ± 2.50
รำข้าวเหนียว กข6	5.00	2.07 ± 0.07	41.40 ± 1.41

หมายเหตุ : (Means ± SD, n = 3)

6. ปริมาณเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลอง

โดยเมื่อนำเปปไทด์ที่ทนสภาวะกระเพาะอาหารจำลองจากเปปไทด์ของโปรตีนรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ไปผ่านสภาวะลำไส้จำลองแล้ว พบว่าน้ำหนักของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลองมีปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนี้ น้ำหนักของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จากเปปไทด์โปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 1.42 กรัม น้ำหนักของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จากเปปไทด์โปรตีนรำข้าวหอมนิล 2.04 กรัม น้ำหนักของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จากเปปไทด์โปรตีนรำข้าวหอมแดง 2.61 กรัม และน้ำหนักของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จากเปปไทด์โปรตีนรำข้าวเหนียว กข6 1.13 กรัม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 น้ำหนักเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลอง (Means ± SD, n = 3)

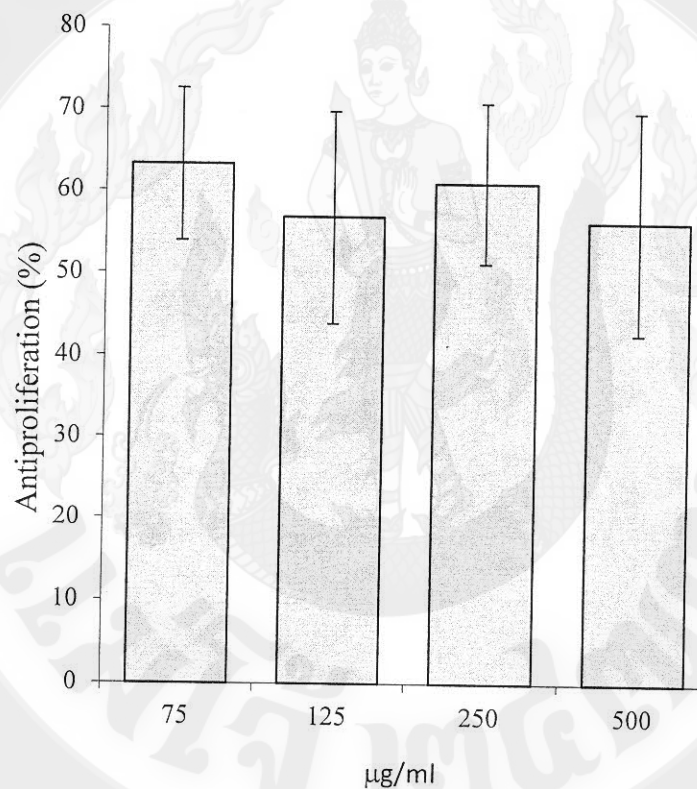
สายพันธุ์	เปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะ กระเพาะอาหาร (g)	เปปไทด์ที่ทนต่อ สภาวะลำไส้ (g)	ปริมาณผลผลิต (%)
รำข้าวหอมดอกมะลิ 105	2.17	1.42 ± 0.66	62.25 ± 16.90
รำข้าวหอมนิล	2.39	2.04 ± 0.08	85.48 ± 5.22
รำข้าวหอมแดง	2.89	2.61 ± 0.75	89.83 ± 4.97
รำข้าวเหนียว กข6	2.07	1.13 ± 0.33	53.91 ± 2.95

หมายเหตุ : (Means ± SD, n = 3)

7. ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

การศึกษาผลของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มีอัตราการยับยั้งการเจริญ 56 – 63 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1)

ทั้งนี้อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างระหว่าง เปปไทด์ในแต่ละความเข้มข้น โดยอัตราการยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันทุกระดับความเข้มข้น

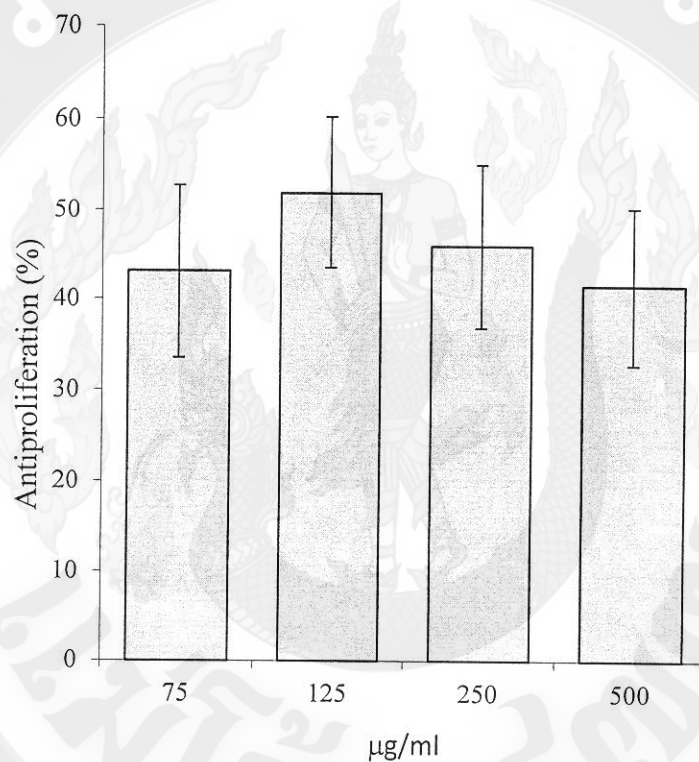


ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Means $\pm$ SE, n = 3)

8. ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

โดยผลของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ พบว่าอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้อยู่ในช่วง 41 – 51 เปอร์เซ็นต์

การศึกษานี้ พบว่าอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังกล่าวนี้ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างระหว่างเปปไทด์ในแต่ละความเข้มข้น และอัตราการยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกันทุกระดับความเข้มข้น (ภาพที่ 2)

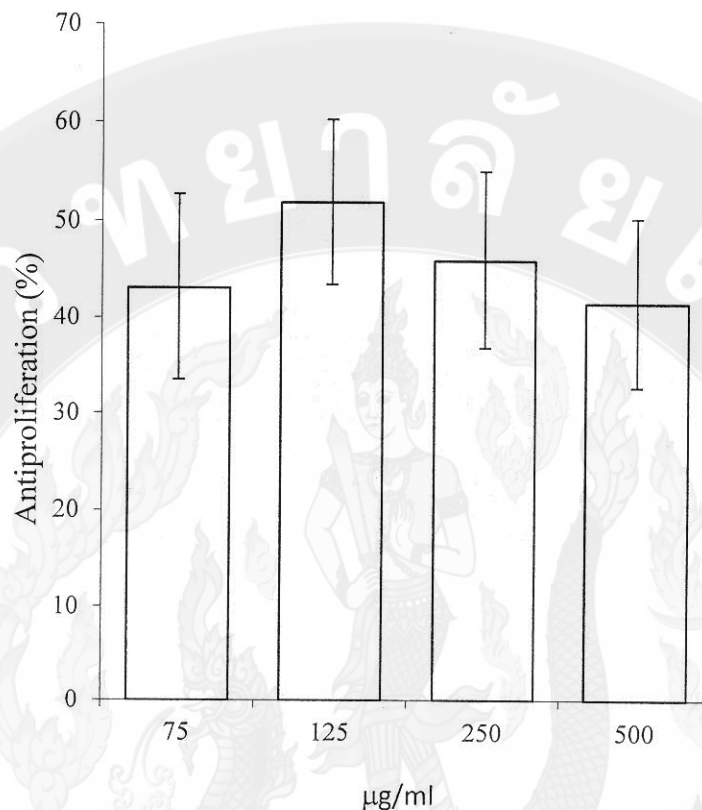


ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้
(Means $\pm$ SE, n = 3)

9. ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมแดงต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ผลของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมแดงที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมแดงดังกล่าว มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในช่วง 58 – 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)

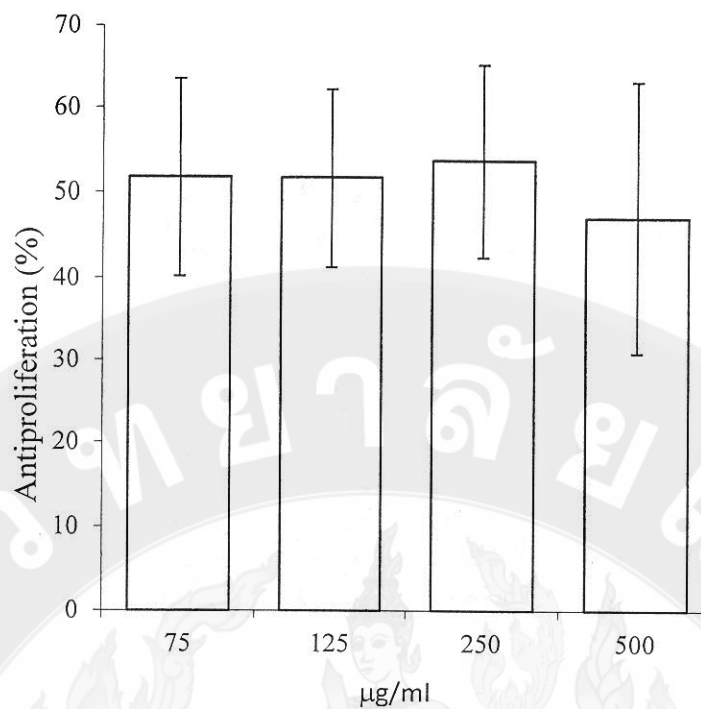
โดยอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างระหว่างเปปไทด์ในแต่ละความเข้มข้น และอัตราการยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันทุกระดับความเข้มข้น



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมแดงต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้
(Means $\pm$ SE, n = 3)

10. ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้
ฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวเหนียว กข6 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มีอัตราการยับยั้งการเจริญ 46 – 53 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4)

ทั้งนี้อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างระหว่างเปปไทด์ในแต่ละความเข้มข้น และอัตราการยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันทุกระดับความเข้มข้น

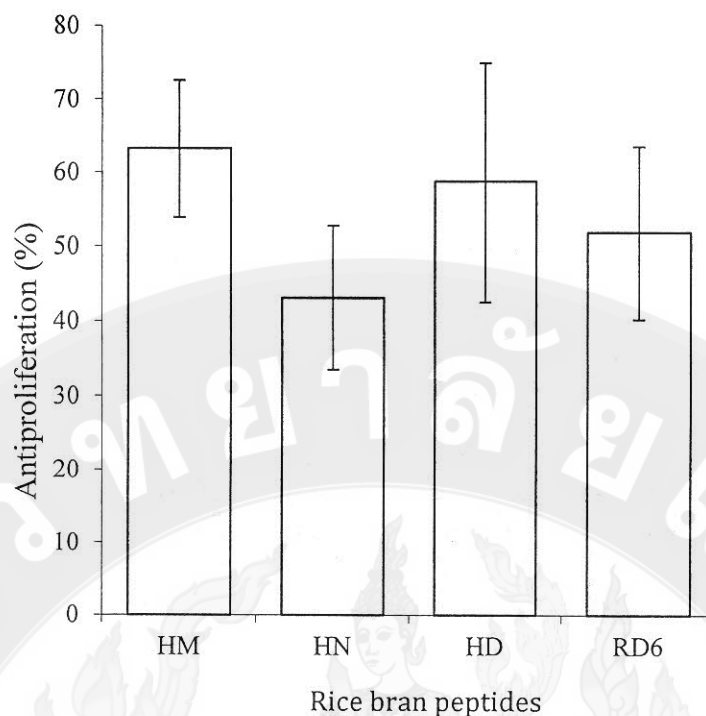


ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้
(Means $\pm$ SE, n = 3)

11. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน รำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 โดยเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยพบว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ 63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ระดับ 43, 58 และ 51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

ทั้งนี้พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญดังกล่าวนี้ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างเปปไทด์ชีวภาพในแต่ละสายพันธุ์ แต่มีแนวโน้มพบว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมแดงนั้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มากที่สุดและรองลงมาตามลำดับ

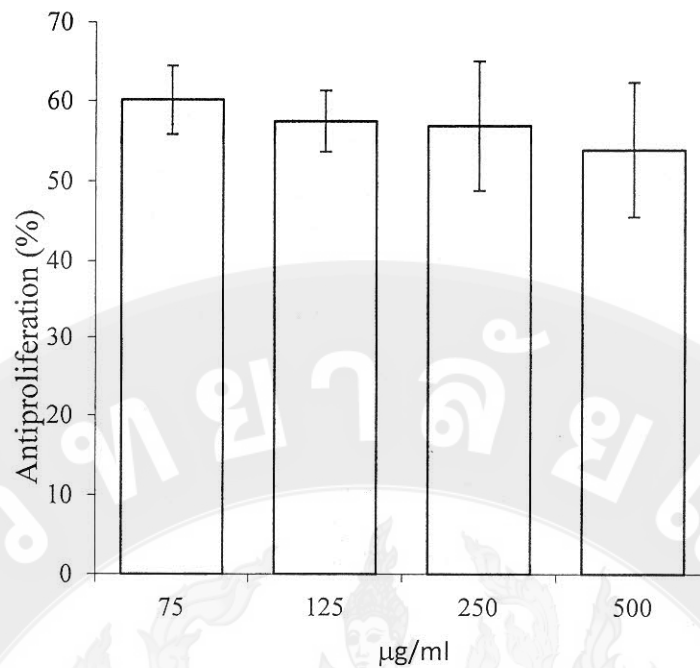


ภาพที่ 5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HM; รำข้าวหอมดอกมะลิ 105, HN; รำข้าวหอมนิล HD; รำข้าวหอมแดง และ RD6; รำข้าวเหนียว กข6) (Means $\pm$ SE, n = 3)

12. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

ฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับในครั้งนี้ พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับมีอัตราการยับยั้งการเจริญ 53 – 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6)

ทั้งนี้อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างระหว่างเปปไทด์ชีวภาพในแต่ละความเข้มข้น โดยอัตราการยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันในทุกๆระดับความเข้มข้น (ภาพที่ 6)

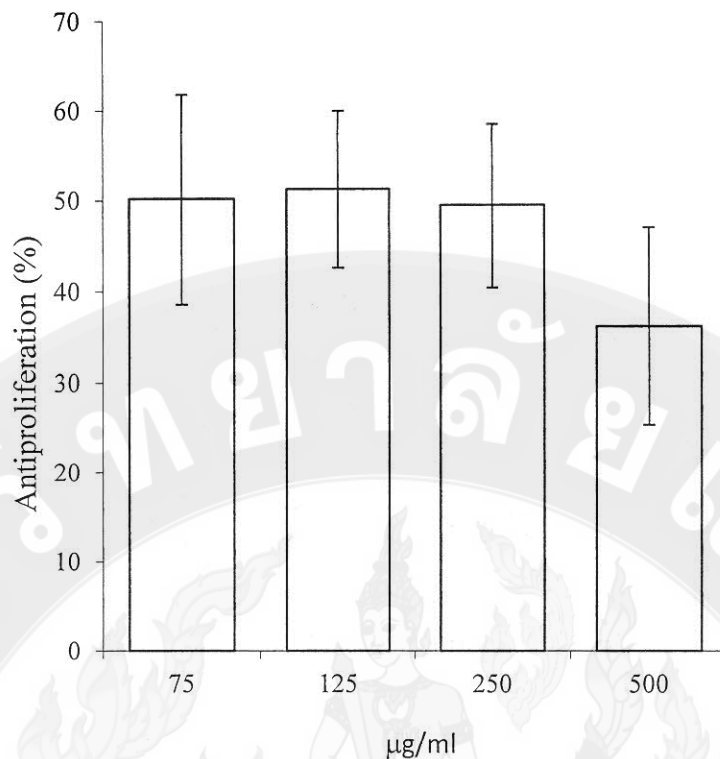


ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (Means $\pm$ SE, n = 3)

13. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ โดยพบว่าเปปไทด์ชีวภาพดังกล่าวนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่อัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 36 – 51 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7)

โดยอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างระหว่างเปปไทด์ชีวภาพในแต่ละความเข้มข้น แต่ทั้งนี้อัตราการยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันในทุกๆระดับความเข้มข้นอีกด้วย (ภาพที่ 7)

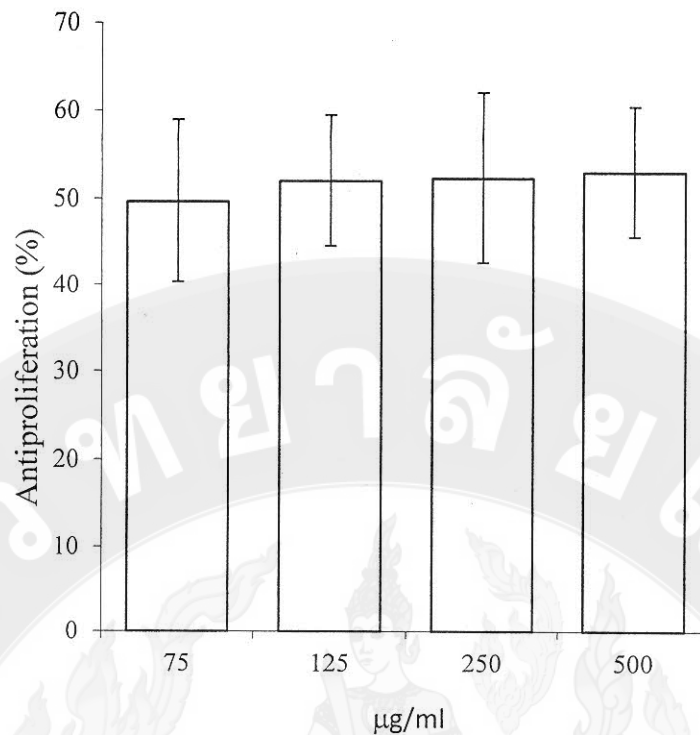


ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ
(Means $\pm$ SE, n = 3)

14. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมแดงต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

ฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมแดงที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเปปไทด์ชีวภาพดังกล่าวนี้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่อัตราการยับยั้งการเจริญ 49 – 53 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8)

ทั้งนี้พบว่าอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างระหว่างเปปไทด์ชีวภาพในแต่ละความเข้มข้น และอัตราการยับยั้งการเจริญดังกล่าวนี้ยังมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันในทุกะดับความเข้มข้นอีกด้วย (ภาพที่ 8)

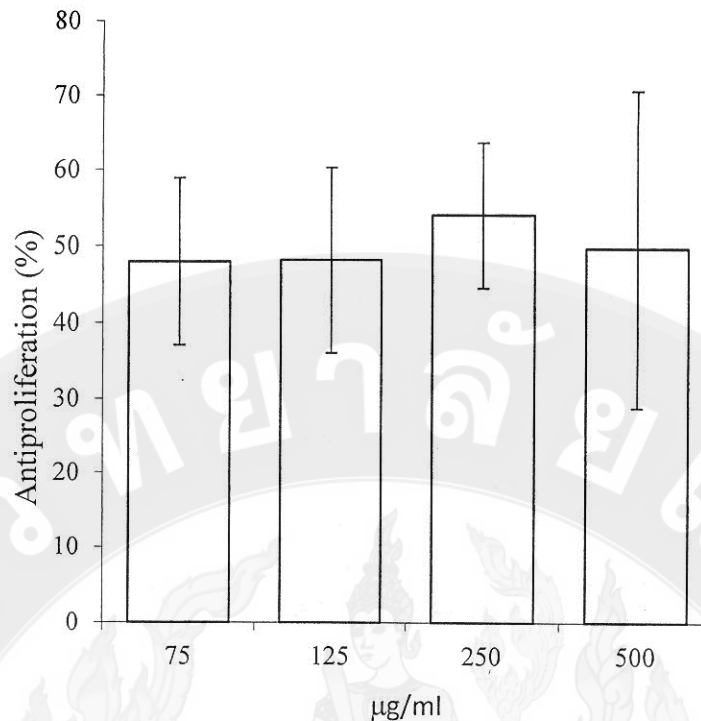


ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมแดงต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ
(Means $\pm$ SE, n = 3)

15. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

การศึกษาฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวเหนียว กข6 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับในครั้งนี้ พบว่า เปปไทด์ชีวภาพดังกล่าวนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ ที่อัตราการยับยั้งการเจริญ 48 – 54 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9)

โดยอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างระหว่างเปปไทด์ชีวภาพในแต่ละความเข้มข้น และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันในทุกๆระดับความเข้มข้นอีกด้วย (ภาพที่ 9)

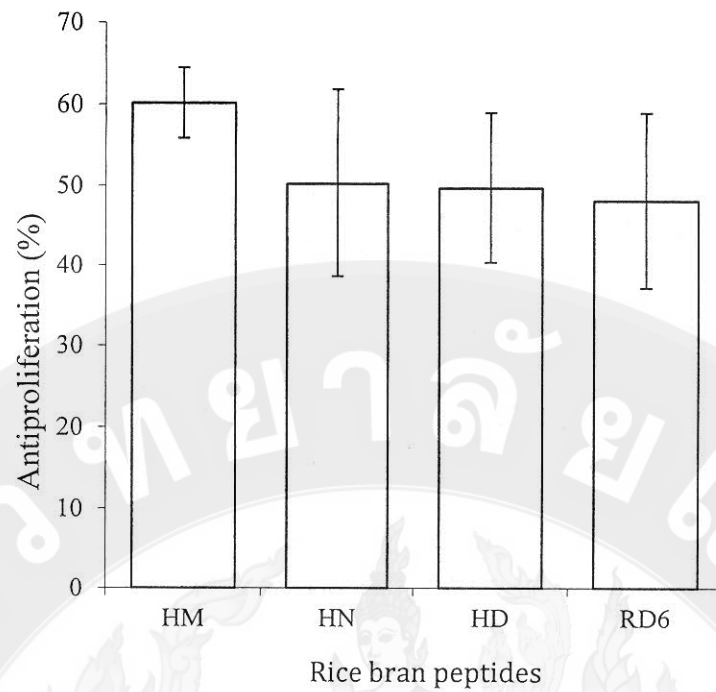


ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ
(Means $\pm$ SE, n = 3)

16. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

การศึกษาฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน คือ รำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 โดยเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาพบว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับที่ระดับ 50, 49 และ 48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญดังกล่าวนี้ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างเปปไทด์ชีวภาพในแต่ละสายพันธุ์ แต่มีแนวโน้มพบว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับมากที่สุด (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ตับ (HM; รำข้าวหอมดอกมะลิ 105, HN; รำข้าวหอมนิล HD; รำข้าวหอมแดง และ RD6; รำข้าวเหนียว กข6) (Means $\pm$ SE, n = 3)

วิจารณ์ผลการวิจัย

เปปไทด์ชีวภาพและการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเปปไทด์ชีวภาพ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ชนิดหนึ่งจากรำข้าว นั้นนับว่าเป็นวิธีการที่ใช้ประโยชน์จากทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรา ทั้งนี้ เนื่องจากในรำข้าวประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่เป็นจำนวนมากและมีหลากหลายชนิด ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลัก ๆ โดยศึกษาเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวที่ได้จากการทำการเกษตรอินทรีย์ คือ รำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวข้าวหอมแดง และรำข้าวข้าวเหนียว กข6 ทั้งนี้เมื่อได้เปปไทด์จากรำข้าวที่มีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งแล้ว จะนำเปปไทด์ดังกล่าวไปเสริมในโยเกิร์ต และทำการศึกษาโยเกิร์ตที่เสริมเปปไทด์ต่อประสิทธิภาพการต้านมะเร็ง ซึ่งหากผลวิจัยพบว่าโยเกิร์ตเสริมเปปไทด์สามารถต้านมะเร็งได้ก็สามารถนำเปปไทด์ดังกล่าวนี้ไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบอาหารฟังก์ชัน ทั้งนี้เพื่อนำไปใช้ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งในอนาคตต่อไป

การศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาเปปไทด์จากข้าวสายพันธุ์ที่มีบทบาทหรือมีส่วนสำคัญต่อประเทศไทยของเรามาก โดยข้าวหอมดอกมะลิ 105 เป็นข้าวที่มีการเพาะปลูกมากที่สุดและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดในประเทศไทยของเรา ในขณะที่ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดง และข้าวเหนียว กข6 ก็เป็นข้าวที่นับว่ามีคุณค่าทางโภชนาการมากเช่นเดียวกัน โปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวแต่ละสายพันธุ์พบว่ามีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก โดยได้น้ำหนักโปรตีน 10.2 – 11.4 กรัม จากรำข้าวเริ่มต้น 300 กรัม โดยพบว่ามีโปรตีนดังกล่าวสอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว ของ Moongngarm *et al.* (2012) ที่พบสัดส่วนของโปรตีนในแต่ละสายพันธุ์ คือ รำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวดำ (black rice) และข้าวแดง (red rice) มีค่าเท่ากับ 13.66, 13.27 และ 12.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีสัดส่วนของโปรตีนที่แตกต่างกันกับการศึกษาในครั้งนี้ ทั้งนี้อาจจะมาจากกระบวนการที่คัดแยกรำข้าวแตกต่างกัน โดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะกรองรำข้าวผ่านตะแกรงร่อนขนาดเล็กขนาด 354 ไมครอนเท่านั้น โดยโปรตีนรำข้าวดังกล่าวสามารถนำไปผลิตเปปไทด์ชีวภาพต่อไปได้

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากรำข้าว นั้นพบว่ารำข้าวมีฤทธิ์หรือมีสรรพคุณหลาย ๆ ประการ เช่น ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และลดโคเลสเตอรอล (Rohrer *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011) เป็นต้น โดยในรำข้าวประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า 120 ชนิด (Kahlon *et al.*, 2009) ซึ่งรวมไปถึงสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารต้านอนุมูลอิสระ และเปปไทด์ชีวภาพ เป็นต้น ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากรำข้าวทั้งจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิล นั้น พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS⁺ และ FRAP ดังนั้นแสดงว่ารำข้าวดังกล่าวนี้มีฤทธิ์ทางยาในการป้องกันหรือลดความเสี่ยงการเกิดโรคหลาย ๆ ชนิดได้ เช่น โรคมะเร็งและโรคหลอดเลือดหัวใจ (มงคล และคณะ, 2559) นอกจากนั้นจากการศึกษาของ Rao *et al.* (2010) พบว่าสารสกัดของรำข้าวสายพันธุ์ Njavara ด้วยเมทานอลนั้นมีสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณที่สูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากรำข้าวดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีก

ด้วย ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้เสนอแนะไว้ด้วยว่ารำข้าวจากข้าวสายพันธุ์ Njavara ดังกล่าวนี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านยาได้อีกด้วย

ชนิดของสายพันธุ์ข้าวเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้รำข้าวจากข้าวสายพันธุ์ที่มีสีขาว อย่างเช่น ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์ที่มีสีดำ เช่น ข้าวหอมนิล ผลที่ได้พบว่ารำข้าวที่มีสี คือ ข้าวหอมนิลนั้นมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่ารำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีสีขาว (มงคล และคณะ, 2559) นอกจากนั้นยังพบว่ารำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีสีขาวนั้นมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าข้าวที่มีสีแดงและสีดำ ตามลำดับ (Muntana and Prasong, 2010) โดยเหตุผลดังกล่าวคณะผู้วิจัยดังกล่าวจึงศึกษาแปรรูปข้าวจากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย ซึ่งคาดว่าแหล่งของแปรรูปข้าวจากข้าวที่มีประโยชน์และเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้

กระบวนการผลิตแปรรูปข้าวจากรำข้าวในงานวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยต้องการผลิตแปรรูปข้าวจากข้าวโดยวิธีการใหม่ ๆ ทั้งนี้เพื่อต้องการผลิตแปรรูปข้าวชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง ซึ่งแปรรูปได้จากกระบวนการย่อยหรือกระบวนการหมักของโปรตีนที่มีอยู่ในอาหาร โดยอาศัยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่หลาย ๆ ชนิด (Walther and Sieber, 2011; Udenigwe and Aluko, 2012) โดยแปรรูปแต่ละชนิดที่ได้มานั้นจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย อาทิเช่น แหล่งของโปรตีนว่ามาจากพืชหรือสัตว์ชนิดใด โปรตีนมีองค์ประกอบอย่างไร ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน กระบวนการในการย่อยที่รวมไปถึงระดับความเป็นกรดหรือด่าง เวลา หรืออุณหภูมิที่ใช้ย่อย (Wang and Gonzalez De Mejia, 2005; Udenigwe and Aluko, 2012) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าอาจจะได้แปรรูปชนิดใหม่แน่นอน โดยมีปัจจัยจากการใช้แหล่งของโปรตีนชนิดใหม่ คือ โปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 จากรำข้าวจากข้าวหอมนิล รำข้าวจากข้าวหอมแดง และรำข้าวจากข้าวเหนียว กข6 นอกจากนั้นยังมีปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนในงานวิจัยในครั้งนี้ โดยคณะผู้วิจัยจะใช้เอนไซม์อัลคาเลสในการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการ

องค์ประกอบของโปรตีนในรำข้าว นั้น จะเป็นแหล่งของสารชีวโมเลกุลสำคัญที่สามารถนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสในการผลิตแปรรูปได้ ทั้งนี้ได้มีคณะนักวิจัยหลาย ๆ ท่านได้ศึกษาถึงการผลิตและศึกษาถึงคุณสมบัติของแปรรูปข้าวจากโปรตีนรำข้าว โดยผลการศึกษาดังกล่าวก็สามารถผลิตแปรรูปข้าวจากโปรตีนรำข้าวได้ (Bandyopadhyay et al., 2008; Kannan et al., 2008; Kannan et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของคณะผู้วิจัยในครั้งนี้ ที่สามารถสกัดแยกโปรตีนรำข้าวทั้งจากโปรตีนรำข้าวจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 โปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมนิล โปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมแดง และโปรตีนรำข้าวจากข้าวเหนียว กข6 และโปรตีนรำข้าวอินทรีย์ดังกล่าวนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตแปรรูปข้าวได้ ถึงแม้ในการผลิตแปรรูปข้าวในงานวิจัยนี้จะมีความแตกต่างจากคณะวิจัยท่านอื่น ๆ ในเรื่องพันธุ์ข้าวที่นำมาใช้ก็ตาม แต่ทั้งนี้ก็สามารถนำโปรตีนรำข้าวดังกล่าวนี้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตแปรรูปข้าวได้เช่นเดียวกัน

กระบวนการผลิตแปรรูปข้าวจากโปรตีนรำข้าวในการวิจัยครั้งนี้ โดยได้ทำการผลิตด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase® 2.4 L.) ที่ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวผลิตจาก *Bacillus licheniformis* โดยพบว่าสามารถผลิต

เปปไทด์ชีวภาพรวมได้ในปริมาณที่สูงมาก โดยได้เปปไทด์ชีวภาพจากการผลิตจากโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล และ รำข้าวหอมแดง คือ เท่ากับ 59.7, 71.9 และ 76.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ได้ผลผลิตเปปไทด์ชีวภาพค่อนข้างน้อยในรำข้าวเหนียว กข6 คือ 34.1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้แสดงว่าทั้งชนิดของโปรตีนและชนิดของเอนไซม์นั้น เป็นปัจจัยร่วมที่บ่งชี้ถึงอัตราผลผลิตของเปปไทด์ชีวภาพด้วยกัน ซึ่งโดยผลการศึกษาดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Silpradit *et al.* (2010) ที่พบว่าเอนไซม์อัลคาเลสดังกล่าวนี้สามารถผลิตเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้เมื่อนำเปปไทด์ชีวภาพรวมที่ผลิตได้ในครั้งนี้ไปทดสอบการทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ คือ การทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลองและสภาวะลำไส้จำลอง โดยพบว่าเปปไทด์ชีวภาพที่ผลิตจากโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล และรำข้าวหอมแดงนั้น สามารถทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ดีและได้ผลผลิตของเปปไทด์ชีวภาพจำนวนมาก ยกเว้นเปปไทด์ชีวภาพที่ผลิตจากโปรตีนรำข้าวจากข้าวเหนียว กข6 ที่ทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ค่อนข้างน้อย โดยประโยชน์ของการทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารของมนุษย์นั้นมีหลายประการ ดังเช่น เปปไทด์ชีวภาพดังกล่าวนี้จะไม่โดนย่อยหรือสลายไปอีกแล้วเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในมนุษย์จริง ๆ ดังนั้นจึงเป็นเปปไทด์ชีวภาพที่สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งหมด ทั้งนี้การผลิตเปปไทด์ชีวภาพที่ทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จากโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลสนั้น ก็มีรายงานว่านักวิจัยท่านอื่น ๆ สามารถผลิตเปปไทด์ชีวภาพในสภาวะดังกล่าวนี้ได้เช่นเดียวกัน (Kannan *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2010)

ฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเปปไทด์ชีวภาพที่ผลิตได้จากโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นแนวทางการศึกษาในการประยุกต์ใช้ทรัพยากรที่เป็นเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ถึงแม้โดยปกติแล้วบุคคลทั่ว ๆ ไปมักจะไม่เห็นคุณค่าของรำข้าวก็ตาม จากการศึกษาพบว่าในรำข้าวนี้ยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า 120 ชนิด ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดก็จะมีบทบาท หรือมีประโยชน์ต่อร่างกายแตกต่างกันออกไป (Kahlon *et al.*, 2009) โดยปกติแล้วการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเปปไทด์ชีวภาพที่ผลิตจากรำข้าวถือเป็นงานวิจัยที่ยังใหม่และมีนักวิจัยศึกษากันน้อยมาก โดยยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์การต้านมะเร็งจากเปปไทด์ชีวภาพที่ผลิตจากรำข้าวสายพันธุ์ข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 เลย

โดยผลจากการศึกษาพบว่าฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่าเปปไทด์ชีวภาพว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ระดับ 56 – 63, 41 – 51, 58 – 60 และ 46 – 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยฤทธิ์ยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มพบว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมแดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ ในขณะที่ฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับใกล้เคียงกันกับเซลล์มะเร็งลำไส้ คือ ที่ระดับ 53 – 60, 36 – 51, 49 – 52 และ 48 – 54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีแนวโน้มพบว่าเฉพาะเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ในการ

ยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ จากผลการวิจัยดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลของเปปไทด์จากรำข้าวที่ผลิตจากเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งลำไส้ (Kannan *et al.*, 2008) และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งตับ (Kannan *et al.*, 2010)

ผลจากการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ที่ได้จากการวิจัยนี้ อาจจะเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ได้ โดยคณะผู้วิจัยจะนำเปปไทด์ต้านมะเร็งที่ผลิตจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมแดงซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งสูงกว่ารำข้าวที่ผลิตจากสายพันธุ์อื่น ๆ ไปเสริมในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตในรูปแบบอาหารฟังก์ชันต้านมะเร็งต่อไปในการวิจัยต่อเนื่องในปีที่ 2 ของการวิจัยในเรื่องดังกล่าวนี้



สรุปผลการวิจัย

1. ปริมาณรำข้าวที่คัดแยกได้จากข้าวเปลือกที่มีการทำการเกษตรอินทรีย์ ข้าวเปลือกอินทรีย์ทั้ง 4 พันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดง และข้าวเหนียว กข6 สายพันธุ์ละ 40 กิโลกรัม พบว่าได้ปริมาณรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 1.86, 1.78, 1.81 และ 1.52 กิโลกรัม ตามลำดับ
2. ปริมาณของรำข้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว เมื่อนำรำข้าวไปสกัดไขมันด้วยเฮกเซนแล้ว โดยพบว่าจากน้ำหนักเริ่มต้น 300 กรัม พบว่าได้รำข้าวปราศจากไขมันในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 271.6, 270.9, 271.3 และ 270.0 กรัม ตามลำดับ
3. ปริมาณโปรตีนรำข้าว โดยเมื่อนำรำข้าวที่ไม่มีไขมันไปสกัดโปรตีนแล้ว พบว่าได้โปรตีนจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 10.4, 11.1, 11.4 และ 10.2 กรัม ตามลำดับ
4. ปริมาณเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าว โดยเมื่อนำโปรตีนรำข้าวไปย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส แล้ว พบว่าได้เปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 5.97, 7.19, 7.68 และ 3.41 กรัม ตามลำดับ
5. ปริมาณเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง โดยเมื่อนำเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวไปผ่านสภาวะกระเพาะอาหารจำลองแล้ว พบว่าได้เปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลองจากเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 2.17, 2.39, 2.89 และ 2.07 กรัม ตามลำดับ
6. ปริมาณเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลอง โดยเมื่อนำเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวไปผ่านสภาวะลำไส้จำลองแล้ว พบว่าได้เปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลองจากเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 คือ 1.42, 2.04, 2.61 และ 1.13 กรัม ตามลำดับ
7. ฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ที่ระดับ 56 – 63, 41 – 51, 58 – 60 และ 46 – 53 เปอร์เซ็นต์ โดยฤทธิ์ยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มพบว่เปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมแดง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ

8. ฤทธิ์ของเปปไทด์ชีวภาพที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 รำข้าวหอมนิล รำข้าวหอมแดง และรำข้าวเหนียว กข6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ ที่ระดับ 53 – 60, 36 – 51, 49 – 52 และ 48 - 54 เปอร์เซ็นต์ โดยฤทธิ์ยับยั้งการเจริญดังกล่าวมีแนวโน้มพบว่า เปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ



เอกสารอ้างอิง

- มงคล ถิรบุญยานนท์ วิจิตรา แดงปรก และชุติมา คงจรูญ (2559). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเปปไทด์ต้านมะเร็งที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วย *Bacillus subtilis* MP9 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและลำไส้. รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่. 58 หน้า.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ (2560). ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคมะเร็ง. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (online) http://www.nci.go.th/Knowledge/index_general.html (1/7/1560)
- อาคม ชัยวีระวัฒน์ ศุภพร แสงกระจ่าง ปิยวัฒน์ เลาวหุตานนท์ และวทีนันท เพชรฤทธิ์ (2560). รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล (Hospital-Based Cancer Registry). สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. ฉบับที่ 31. 94 หน้า
- Abdel Wahab, S.I., A.B. Abdul, A.S. Alzubairi, M. Mohamed Elhassan, and S. Mohan. 2009. In vitro ultramorphological assessment of apoptosis induced by zerumbone on (HeLa). *J. Biomed. Biotechnol.* 2009:769568.
- AOAC. 2000. Official method of analysis of AOAC international. AOAC Int. Virginia.
- AOAC. 2005. Official method of analysis of AOAC international. AOAC Int. Maryland.
- Bandyopadhyay, K., G. Misra, and S. Ghosh. 2008. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from indian defatted rice bran meal. *J. Oleo Sci.* 57: 47-52.
- Bi, S., J.R. Liu, Y. Li, Q. Wang, H.K. Liu, Y.G. Yan, B.Q. Chen, and W.G. Sun. 2010. Gamma-Tocotrienol modulates the paracrine secretion of VEGF induced by cobalt (II) chloride via ERK signaling pathway in gastric adenocarcinoma SGC-7901 cell line. *Toxicology.* 274: 27-33.
- Butsat, S. and S. Siriamornpun. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chem.* 119: 606-613.
- Chantawannakul, P., A. Oncharoen, K. Klanbut, E. Chukeatirote, and S. Lumyong. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia.* 28: 241-245.
- Chatterjee, J., S. Giri, S. Maity, A. Sinha, A. Ranjan, R. Shekhar, and S. Gupta. 2014. Production and characterization of thermostable alkaline protease of *B. Subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid state fermentation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* doi: 10.1002/bab.1309

- Dewanto, V., X. Wu, K.K. Adonm, and R.H. Liu. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **J. Agri. Food Chem.** 50: 3010-3014.
- Dziuba, J., P. Minkiewicz, D. Nalecz. 1999. Biologically active peptides from plant and animal proteins. **Pol. J. Food Nutr. Sci.** 8: 3-16.
- Fabian, C.B., L.H. Huynh, and Y.H. Ju. 2010. Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. **LWT – Food Sci.** 43: 375-379.
- Fabian, C., and Y.H. Ju. 2011. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 51: 816-827.
- Ghoneum, M., and S. Gollapudi. 2003. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. **Cancer Lett.** 201: 41-49.
- Gollapudi, S., and M. Ghoneum. 2008. MGN-3/Biobran, modified arabinoxylan from rice bran, sensitizes human breast cancer cells to chemotherapeutic agent, daunorubicin. **Cancer Detect. Prev.** 32: 1-6.
- Hsu, K., E.C.Y. Li-Chan, and C. Jao. 2011. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. **Food Chem.** 126: 617–622.
- Inatsu, Y., K. Kimura, Y. Itoh. 2002. Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in southeast Asia: comparison with *B. subtilis* (natto) starter strains. **Jpn. Agric. Res. Q.** 36: 169-175.
- Inatsu, Y., N. Nakamura, Y. Yuriko, T. Fushimi, L. Watanasiritum, and S. Kawamoto. 2006. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. **Lett. Appl. Microbiol.** 43: 237-242.
- Israel-Ballard, K., C. Chantry, K. Dewey, B. Lönnerdal, H. Sheppard, R. Donovan, J. Carlson, A. Sage, and B. Abrams. 2005. Viral, nutritional, and bacterial safety of flash-heated and pretoria-pasteurized breast milk to prevent mother-to-child transmission of HIV in resource-poor countries: A pilot study. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.** 40 :175-81.
- Kahlon, T.S. 2009. Rice bran: Production, composition, functionality and food applications, physiological benefits. *In*: S.S. Cho and P. Samuel, eds. **Fiber ingredients: Food applications and health benefits**. Taylor and Francis Group, LLC: Boca Raton. , pp. 305-321.

- 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. *J. Agric. Food Chem.* 56: 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: 1629-1634.
- Kannappan, R., Y.R. Yadav, and B.B. Aggarwal. 2010. α -Tocotrienol but not α -tocopherol blocks STAT3 cell signaling pathway through induction of protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and sensitizes tumor cells to chemotherapeutic agents. *Br. J. Pharmacol.* 285: 33520–33528.
- Kiers, J.L., A.E.A. Van laeken, F.M. Rombouts, and M.J.R. Nout. 2000. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 163-169.
- Kim, S.P., M.Y. Kang, S.H. Nam, and M. Friedman. 2012. Dietary rice bran component γ -oryzanol inhibits tumor growth in tumor-bearing mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 935-44.
- Kong, C.K., W.S. Lam, L.C. Chiu, V.E. Ooi, S.S. Sun, and Y.S. Wong. 2009. A rice bran polyphenol, cycloartenyl ferulate, elicits apoptosis in human colorectal adenocarcinoma SW480 and sensitizes metastatic SW620 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 77: 1487-1496.
- Kook, M.C., M.J. Seo, C.I. Cheigh, Y.R. Pyun, S.C. Cho, and H. Park. 2010. Enhanced production of gamma-aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 763-766.
- Kitts, D.D., and K. Weiler. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1309-1323.
- Korhonen, H., and A. Pihlanto. 2003. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1297-1308.
- Li, S.C., T.C. Chou, C.K. Shih. 2011. Effects of brown rice, rice bran, and polished rice on colon carcinogenesis in rats. *Food Res. Int.* 44: 209-216.
- Li, G., M. Qu, J. Wan, and J. You. 2007. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16: 275-280.
- Lim, S., C.W. Cho, U.K. Choi, and Y.C. Kim. 2010. Antioxidant activity and ginsenoside pattern of fermented white Ginseng. *J. Ginseng Res.* 34: 168-174.

- Maneewan, C., K. Yamauchi, M. Thirabunyanon, S. Siri, A. Mekbungwan, and N. Thonwittaya. 2011. Development of *Bacillus subtilis* MP and effective utilization on productivity and microorganisms in feces of suckling piglets. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 9: 382- 387.
- Moongngarma, A., N. Daomukdaa, and S. Khumpika. 2012. Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. *APCBEE Procedia*. 2: 73 – 79.
- Muntana, N., and S. Prasong. 2010. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. *Pak. J. Biol. Sci.* 13: 170-174.
- Nakashima, K., N. Virgona, M. Miyazawa, T. Watanabe, and T. Yano. 2010. The tocotrienol-rich fraction from rice bran enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human mesothelioma H28 cells. *Phytother. Res.* 24: 1317-1321.
- Ohnuki, H., and H. Otani. 2005. Antigen-binding and protein G-binding abilities of immunoglobulin G in hyperimmunized cow's milk treated under various conditions. *Anim. Sci. J.* 76: 283-290.
- Oktay, M., I. Culcin, and O.I. Kufrevioglu. 2003. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extract. *LWT-Food Sci. Technol.* 36: 263-271.
- Phelan, M., A. Ahernea, R.J. FitzGerald, and N.M. O'Brien. 2009. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy J.* 19: 643-654.
- Rao, A.S., S.G. Reddy, P.P. Babu, and A.R. Reddy. 2010. The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. *BMC Complement Altern. Med.* 10: 4.
- Re, R. N. Pellegrini, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Bio. Med.* 26: 1231-1237.
- Rohrer, C.A., and T.J. Siebenmorgen. 2004. Nutraceutical concentrations within the bran of various rice kernel thickness fractions. *J. Biosystems Eng.* 88: 453-460.
- Ryan, E.P., A.L. Heuberger, T.L. Weir, B. Barnett, C.D. Broeckling, and J.E. Prenni. 2011. Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity. *J. Agric. Food Chem.* 59: 1862-70.
- Saunders, R.M. 1990. The properties of rice bran as a food stuff. *Cereal Foods World.* 35: 632-662.

- Silpradit, K., S. Tadakittasarn, H. Rimkeeree, S. Winitchai, and V. Haruthaithanasan. 2010. Optimization of rice bran protein hydrolysate production using alcalase. *As. J. Food Ag-Ind.* 3: 221-231.
- Sindhu, S.C., and N. Khetarpaul. 2002. Effect of probiotic fermentation on antinutrients and in vitro protein and starch digestibilities of indigenously developed RWGT food mixture. *Nutr. Health.* 16: 173-181.
- Sun, W., W. Xu, H. Liu, J. Liu, Q. Wang, J. Zhou, F. Dong, and B. Chen. 2009. gamma-Tocotrienol induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *J. Nutr. Biochem.* 20: 276-84.
- Takagi, K., R. Teshima, H. Okunuki, and J. Sawada. 2003. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 969-973.
- Thirabunyanon, M., and N. Thongwittaya. 2007. Screening and effects of probiotic *Bacillus Subtilis* MP on microbiological or biochemical changes in fermented soybean food. (ประชุมทางวิชาการ สกว. นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส 11-13 ตุลาคม 2550). (Poster presentation).
- Thirabunyanon, M., P. Boonprasom, and P. Niamsup. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol. Lett.* 31: 571-576.
- Thirabunyanon, M., and P. Hongwittayakorn. 2013. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 511-525.
- Udenigwe, C.C., and R.E. Aluko. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.* 77: R11-24.
- Walther, B., and R. Sieber. 2011. Bioactive proteins and peptides in foods. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 81: 181-192.
- Wang, W., and E. Gonzalez de Mejia. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* 4: 63-78.
- Wang, W., N.A. Bringe, M.A. Berhow, and E. Gonzalez de Mejia. 2008. beta-Conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4012-20.

- Wiboonsirikul, J., K. Kimura, M. Kadota, H. Morita, T. Tsuno, and S. Adachi. 2007. Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8759–8765.
- Yen, G.C., and H.Y. Chen. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27-32.
- Zhang, H.J., H. Zhang, L. Wang, and X.N. Guo. 2012. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. *Food Res. Int.* 47: 359-363.

