



การผลิตเปปไทด์จากรำข้าวที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน
และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

PRODUCTION OF RICE BRAN PEPTIDES WITH ANTIOXIDATIVE
ACTIVITY AND ANTIPROLIFERATION OF CANCER CELLS

นางลัดกษณ์ บุญญาศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

ชื่อเรื่อง

การผลิตเปปไทด์จากรำข้าวที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน

และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

โดย

นงลักษณ์ บุญญาศรี

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

วิจิตรา แดงปรก

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก)

วันที่ 30 เดือน ๖ พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร.มงคล ธิบุญยานนท์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ธิบุญยานนท์)

วันที่ 30 เดือน ๖ พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร.สุติมา กองจรรณ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุติมา กองจรรณ)

วันที่ 30 เดือน ๖ พ.ศ. 2558

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร

วิจิตรา แดงปรก

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก)

วันที่ 30 เดือน ๖ พ.ศ. 2558

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุพงศ์ วาฤทธิ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 2 เดือน ๖ พ.ศ. 2558

ชื่อเรื่อง	การผลิตเปปไทด์จากรำข้าวที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
ชื่อผู้เขียน	นางสาวนงลักษณ์ บุญญาศรี
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก

บทคัดย่อ

การผลิตเปปไทด์จากรำข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิลโดยการใช้เอนไซม์อัลคาเลสในการย่อย เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด สมบัติการต้านออกซิเดชัน และสมบัติการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับ (HepG2) พบว่า crude peptide จากรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงกว่า resistant peptide และ protein concentrate ตามลำดับ ยกเว้น crude peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีสมบัติการต้านออกซิเดชันไม่แตกต่างจาก resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 นอกจากนี้ยังพบว่า protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิลมีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดและมีสมบัติการต้านออกซิเดชันมากกว่ารำข้าวขาวดอกมะลิ 105 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อทำการทดสอบระดับการย่อยโดยวิธี TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) พบว่า crude peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิลมีค่ากรดอะมิโนชนิดแอลฟาเพิ่มขึ้นเป็น 32.81 และ 11.97 เท่า จาก protein concentrate ตามลำดับ และ resistant peptide เพิ่มขึ้นเป็น 93.02 และ 34.90 เท่า จาก protein concentrate ตามลำดับ ส่วนสมบัติการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับ พบว่า resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับได้สูงกว่า resistant peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่ความเข้มข้นตัวอย่างเท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร resistant peptide ของรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิล สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับได้ร้อยละ 91.12 และ 88.90 ตามลำดับ

Title	Production of Rice Bran Peptides with Antioxidative Activity and Antiproliferation of Cancer Cells
Author	Miss Nonglak Boonyasri
Degree of	Master of Science in Food Science and Technology
Advisory Committee Chairperson	Associate Professor Dr. Wichitra Daengprok

ABSTRACT

Peptides from Khao Dawk Mali 105 and Jao Hom Nin rice bran were prepared using alcalase enzyme to study total polyphenol contents, antioxidant activity and anti-cancer cell (HepG2) inhibition. It was found that crude peptide from both rice bran varieties had total polyphenol contents and antioxidation activity higher than protein concentrate and resistant peptide, but antioxidation activity of crude peptide from Khao Dawk Mali 105 rice bran was not significantly different from resistant peptide from Khao Dawk Mali 105 rice bran. Moreover, all samples from Jao Hom Nin rice bran had higher total polyphenol contents and antioxidant activity than Khao Dawk Mali 105 rice bran ($P < 0.05$). The degree of hydrolysis in this study was investigated by TNBS method. It was found that the crude peptide from Khao Dawk Mali 105 and Jao Hom Nin rice bran had a higher α -amino group than protein concentrate by 32.81 and 11.97 times base on 100 g protein, respectively. Resistant peptide had higher α -amino group than protein concentrate by 93.02 and 34.90 times, respectively. The resistant peptide from Khao Dawk Mali 105 rice bran exhibited a stronger anti-cancer activity than the resistant peptide from Jao Hom Nin rice bran at a concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$) by 91.12% and 88.90%, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล อธิบุญยานนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา คงจัญญ กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาในการวางแผนการดำเนินงานทดลอง ตลอดจนให้คำปรึกษาพร้อมทั้งสนับสนุนในเรื่องของวัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนายปลั่งกร ส่างสวัสดิ์ ที่คอยให้คำปรึกษาและแก้ไขปัญหาให้ รวมทั้งขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย รวมถึงขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ตลอดจนญาติๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

และสุดท้าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ฟองนวล ใจลาม และคุณพ่ออนันต์ บุญญาศรี ที่คอยให้การสนับสนุน ให้ทุนการศึกษา ให้คำแนะนำยามมีปัญหา ตลอดจนคอยให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการศึกษา

นางลัทษณ์ บุญญาศรี

กรกฎาคม 2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
สารบัญตารางผนวก	(11)
สารบัญภาพผนวก	(12)
บทที่ 1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
โรคมะเร็ง	3
เปปไทด์ชีวภาพ	6
รำข้าว	16
สารต้านออกซิเดชัน	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	
อุปกรณ์	30
วิธีดำเนินการวิจัย	34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	
องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว	43
สารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดและความสามารถในการ	
ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของรำข้าว	45

ระดับการย่อยของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide	
จากร้าข้าว	47
เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการ	
ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ protein concentrate, crude peptide และ	
resistant peptide	49
ความสามารถของ resistant peptide ในการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)	53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	
สรุปผลการทดลอง	55
ข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง สารเคมี และวิธีการวิเคราะห์	68
ภาคผนวก ข รูปภาพประกอบการทำวิจัย	72
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง	75
ภาคผนวก ง ประวัติผู้วิจัย	78

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยเนื้อหอย <i>Ruditapes philippinarum</i>	9
2 การศึกษาองค์ประกอบต่างๆ ของข้าวในการป้องกันหรือลดความเสี่ยง ต่อโรคต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต (<i>in vivo</i>)	22
3 ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ของรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล	43
4 ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดของรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล	45
5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล	46
6 ระดับการย่อยของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว	47
7 ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูล อิสระ DPPH ของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว	50
8 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ โดย resistant peptide จากรำข้าว	54

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ลักษณะของเซลล์มะเร็งตับ (ซ้าย) และสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับ (ขวา)	5
2	ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเปปไทด์	6
3	กลไกทางเคมีและกายภาพของเปปไทด์ในการยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน (1) การจับโลหะ (2) การต้านออกซิเดชัน (3) การขัดขวางโดยทางกายภาพ	11
4	ปฏิกิริยาของ TNBS กับกลุ่มกรดอะมิโนชนิดแอลฟา	12
5	ระดับการย่อยของเวย์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (α -lactalbumin (α -la), β -lactoglobulin (β -lg), lactoferrin (Lf), bovine serum albumin (BSA), whey protein isolate (WPI))	13
6	SDS-PAGE electrophoregrams ของตัวอย่างเวย์โปรตีน และไฮโดรไลเสตของ เวย์โปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (เลน 1: molecular weight markers, 2: lactoferrin, 3: β -lactoglobulin, 4: α -lactalbumin, 5: whey protein isolate, 6: bovine serum albumin)	14
7	ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาที่วิเคราะห์ด้วยวิธี TNBS	15
8	สมบัติการต้านออกซิเดชันส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1–5 กิโลดาลตันที่ถูกย่อยด้วย เอนไซม์เปปซินและแพนกรีตินในระบบทางเดินอาหารจำลอง วิเคราะห์โดยวิธี ABTS radical scavenging activity assay	16
9	โครงสร้างของเมล็ดข้าว	18
10	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในรำข้าว (กรอบสีเขียว คือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มี ในรำข้าว และรำข้าวปราศจากไขมันที่มีฤทธิ์ในการป้องกันและบำบัดโรคมะเร็ง)	19
11	กลไกในการป้องกันหรือลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในรำข้าว (cyclooxygenase-2 (COX-2), dendritic cells (DC), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), nuclear factor-kB (NF-kB), natural killer (NK), nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2))	21
12	ศักยภาพของฟีนอลิกที่ได้จากพืชในการต้านเซลล์มะเร็งในขณะที่ยังพัฒนาใน แต่ละระยะ	27

ภาพ

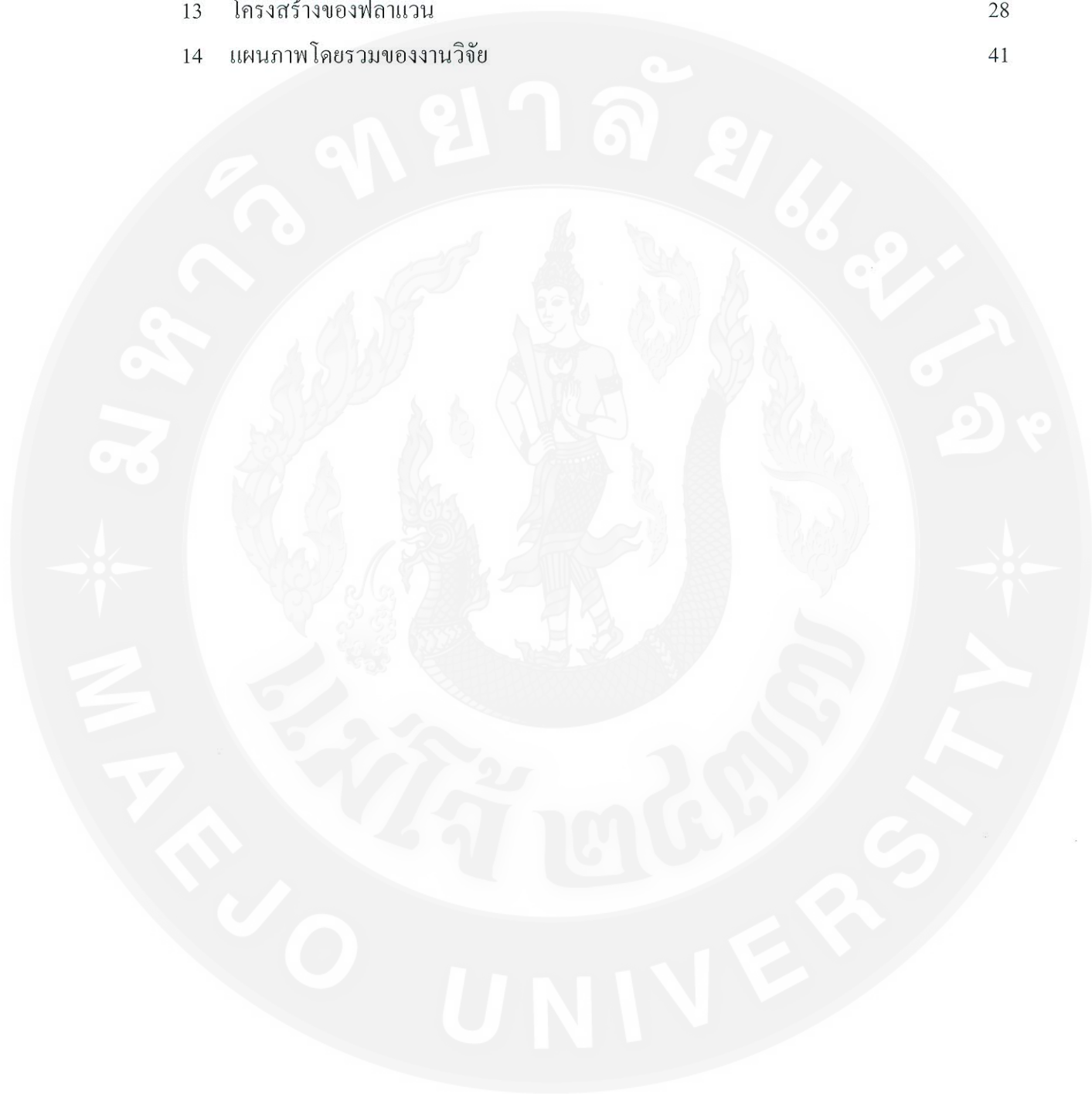
หน้า

13 โครงสร้างของฟลาเวน

28

14 แผนภาพโดยรวมของงานวิจัย

41



สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก

หน้า

- 1 ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง crude peptide และ resistant peptide จาก
รำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิลที่วิเคราะห์
โดยวิธี Lowry method

78



สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก	หน้า
1 การสกัดไขมันออกจากรำข้าวด้วยการเขย่ากับเอทานอล	74
2 protein concentrate ที่ได้จากการตกตะกอน	74
3 crude peptide ที่ได้จากการย่อยโปรตีนไฮโซเลตจากรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส หลังผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	75
4 การวัดค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วย วิธี MTT assay	75
5 กราฟมาตรฐานกรดอะมิโนลิวซีน	77
6 กราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA)	77
7 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก	78

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันอัตราการเสียชีวิตที่เป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทยคือโรคมะเร็ง ซึ่งมากกว่าการเสียชีวิตจากอุบัติเหตุหรือโรคหัวใจที่ปกติจะมีอัตราการเสียชีวิตที่มากอยู่แล้ว ทั้งยังเคยครองสถิติที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับหนึ่งติดต่อกันมานาน (ไทยรัฐออนไลน์, 2557) ทั้งนี้ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งเสียชีวิตอย่างรวดเร็วมาจากยารักษาโรคที่มีราคาแพง เนื่องจากยารักษาโรคมะเร็งส่วนใหญ่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งโดยทั่วไปมักจะเข้าไม่ถึงการรักษาด้วยวิธีดังกล่าว ดังนั้นการป้องกันโรคมะเร็งหรือการผลิตยารักษาโรคโดยใช้ทรัพยากรที่อยู่ในประเทศไทย ตัวอย่างเช่น การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากรำข้าว (rice bran) ซึ่งเป็นวัสดุเหลือจากการแปรรูปข้าวเปลือก เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดอัตราการเกิดโรคและลดอัตราการเสียชีวิตลง ทั้งยังช่วยประหยัดงบประมาณในการดูแลผู้ป่วยโรคมะเร็งดังกล่าวที่มีงบประมาณอยู่อย่างจำกัด (วรสิทธิ์, 2552)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการปลูกและส่งออกข้าวไปยังต่างประเทศสูงเป็นอันดับต้นๆ ของโลก ดังนั้นรำข้าวซึ่งเป็นเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปข้าวเปลือกไปเป็นข้าวสารจึงมีเหลือมากตามไปด้วย ราคาของรำข้าวในปัจจุบันนี้อยู่ที่ 9 - 10 บาทต่อกิโลกรัม (บริษัทบริษัทซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน), 2556) ในขณะที่รำข้าวมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) อยู่เป็นจำนวนมากและมีหลายชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอล โทโคไตรอีนอล โทโคฟีรอล ฟลาโวนอยด์ แกมมาออโรซานอล พอลิแซ็กคาไรด์ กรดไฟติก เส้นใยต่างๆ โปรตีน และเปปไทด์ เป็นต้น ทำให้รำข้าวมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน สามารถป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้ ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการต้านมะเร็งของเปปไทด์จากรำข้าวอยู่พอสมควร แต่งานวิจัยที่ศึกษาผลของเปปไทด์จากรำข้าวต่อความสามารถในการต้านมะเร็งจากข้าวต่างชนิดกันยังมีอยู่จำกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาผลของเปปไทด์จากรำข้าวต่างชนิดกันต่อความสามารถในการต้านมะเร็งตับ รวมถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เพื่อนำผลวิจัยที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อใช้ในการป้องกันหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็ง และการต้านออกซิเดชันต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดและสมบัติการต้านออกซิเดชันของรำข้าวและเปปไทด์จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเปปไทด์ที่ทนต่อการย่อยของระบบทางเดินอาหารที่ผลิตได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เปปไทด์จากรำข้าวที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งและต้านออกซิเดชันเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับกลุ่มผู้รักสุขภาพและผู้ป่วยโรคมะเร็ง
2. เพิ่มมูลค่าและการใช้ประโยชน์จากรำข้าว

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

โรคมะเร็ง (cancer)

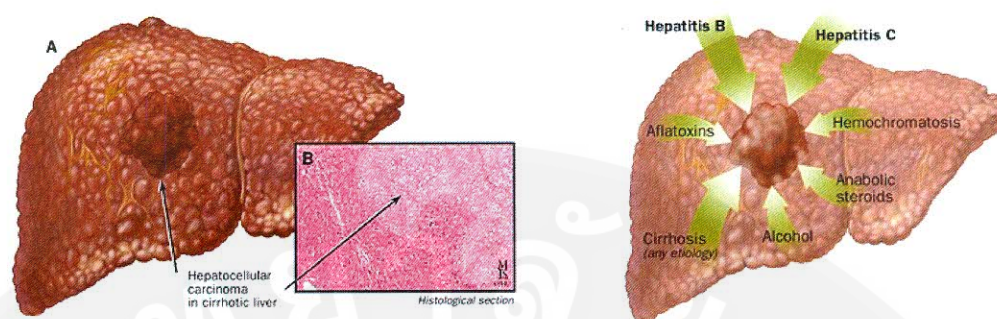
ประเทศไทยมีผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งจำนวนมากและเพิ่มขึ้นมากกว่าในอดีตอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงส่งผลให้โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากที่สุด ซึ่งมีอัตราสูงกว่าสาเหตุที่มาจากอุบัติเหตุหรือโรคหัวใจมาประมาณ 5-6 ปีแล้ว โดยเฉพาะตั้งแต่ช่วงปีพ.ศ. 2550-2552 มีคนไทยเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งกว่า 100,000 คน และนอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเฉลี่ยชั่วโมงละ 5-6 คน (สุภักดิ์กริมย์, 2553) จากรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (Hospital-Based Cancer Registry) ปี พ.ศ. 2554 มีผู้ป่วยมารับการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติเป็นจำนวน 25,476 คน โดยข้อมูลดังกล่าวไม่รวมผู้ป่วยโรคมะเร็งที่เข้ารับการรักษาสถานที่อื่นๆ หรือเสียชีวิตโดยไม่ได้รับการรักษาเลย ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2557 มีชาวอเมริกาที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งที่ยังมีชีวิตอยู่จำนวน 14.5 ล้านคน และนอกจากนี้ยังมีการคาดการณ์ว่าใน พ.ศ. 2558 จะมีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งรายใหม่เกิดขึ้นอีก 1,658,370 คน ซึ่งในจำนวนนี้ไม่รวมถึงผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งในระยะเริ่มต้นของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและมะเร็งผิวหนัง ซึ่งการคาดการณ์ผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งชาวอเมริกันในพ.ศ. 2558 คือ 589,430 คน เฉลี่ยเกือบ 1,620 คนต่อวัน โดยในอเมริกาโรคมะเร็งถือว่าเป็นโรคที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับสองรองจากโรคหัวใจ (American Cancer Society, 2015)

โรคมะเร็ง เป็นโรคที่เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่ดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติ เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อโดยรอบและยังสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้อีกด้วย ซึ่งส่งผลให้เกิดเป็นก้อนเนื้อผิดปกติหรือโรคมะเร็ง ทำให้เซลล์สูญเสียหน้าที่เฉพาะของเซลล์ปกติไป เซลล์มะเร็งจะมีกระบวนการสังเคราะห์พลังงานที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2555) โดยปกติแล้วถ้ามะเร็งเกิดขึ้นที่อวัยวะใดในร่างกายก็จะเรียกชื่อตามอวัยวะนั้นๆ เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น หากรวมผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งทั้งหมดทั้งผู้ป่วยเก่าและผู้ป่วยใหม่แล้ว มะเร็งที่พบมากในเพศชาย คือ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ และมะเร็งตับ ตามลำดับ ในขณะที่มะเร็งที่พบมากในเพศหญิง คือ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ ตามลำดับ (ภัทรวิชน์ และ รังสิยา, 2554) โดยสิ่งกระตุ้นที่ทำให้เกิด

ความผิดปกตินี้มีทั้งปัจจัยภายใน และปัจจัยภายนอก ปัจจัยภายใน เช่น กรรมพันธุ์ ฮอร์โมน
 สถานะของระบบภูมิคุ้มกัน และการกลายพันธุ์ที่ได้รับผลกระทบมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึม
 ส่วนปัจจัยภายนอกเรียกว่าสารก่อมะเร็ง เช่น คาร์บอน บุหรี่ รังสี สารเคมีอย่างอื่นหรือการติดเชื้อโรค
 ในปัจจุบันหนทางในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง ได้แก่ การผ่าตัด การฉายรังสี การทำคีโม ใช้
 ฮอร์โมน รักษาโดยระบบภูมิคุ้มกัน และการรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง เป็นต้น ซึ่งวิธี
 ที่กล่าวมาข้างต้นไม่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมดและยังมีค่าใช้จ่ายในการบำบัดรักษาโรคมะเร็ง
 มาก รวมทั้งอาจเกิดอาการแพ้ยาบำบัดหรือผลข้างเคียง เป็นต้น (American Cancer Society, 2014)

โรคมะเร็งตับเป็นโรคที่ค่อนข้างรุนแรงและยากต่อการรักษา เนื่องจากประเทศไทย
 ได้มีอุบัติการณ์โรคมะเร็งตับโดยเฉพาะมะเร็งท่อน้ำดีตบสูงมาก และเคยมีสถิติสูงที่สุดในโลก
 มาแล้ว (Vatanasapt et al., 1999) นอกจากนี้ยังพบว่ามะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบสูงเป็นอันดับสามใน
 ผู้ชายไทย โดยมีอัตราการอุบัติการณ์คาดประมาณของประเทศในปี พ.ศ. 2542 จำนวน 30.8 ต่อ
 ประชากรแสนคน โดยอุบัติการณ์แล้วพบว่าผู้ชายเป็นมะเร็งตับสูงกว่าผู้หญิงประมาณ 2-3 เท่า
 (สุพรรณิ, 2550) ซึ่งตับเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกายอยู่บริเวณใต้ชายโครงขวา มีหน้าที่สะสม
 อาหาร เช่น น้ำตาล โปรตีน ไขมัน และวิตามินไว้ใช้ในร่างกาย นอกจากนั้นยังเป็นอวัยวะที่ทำลาย
 ของเสียและสร้างโปรตีนที่เรียกว่าอัลบูมิน ซึ่งทำหน้าที่รักษาสมดุลของน้ำในเซลล์และเนื้อเยื่อ และ
 นำฮอร์โมนไปยังเนื้อเยื่อ

สาเหตุที่สำคัญสำหรับการเกิดมะเร็งตับในมนุษย์นั้น ได้แก่ การดื่มสุราและการติด
 เชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซี รวมไปถึงอะฟลาทอกซินซึ่งเป็นสารพิษที่ส่วนมากจะถูกผลิต
 ขึ้นโดยเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus flavus* (Wild et al., 1993) นอกจากนั้นยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น
 สารเคมี และยารักษาโรคบางชนิด ยาฆ่าแมลง ภาวะทางระบบภูมิคุ้มกัน ปัจจัยทางพันธุกรรม และ
 ปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงการขาดการออกกำลังกาย และอาหารที่รับประทาน
 ไม่ถูกสุขลักษณะ (ภาพ 1) ผู้ที่ป่วยเป็นโรคมะเร็งตับในระยะปานกลาง และระยะลุกลามมาก หลังที่
 ได้รับการวินิจฉัยแล้วจะสามารถรักษาโดยการผ่าตัดเปลี่ยนตับได้วิธีเดียวเท่านั้น หรือที่เรียกว่าการ
 ปลูกถ่ายตับ (Tomokuni et al., 2013) ซึ่งเซลล์มะเร็งตับจะมีลักษณะเป็นชิ้นเนื้องอกออกมาจาก
 เซลล์ตับปกติที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นอย่างไม่จำกัด แสดงดังภาพ 1



ภาพ 1 ลักษณะของเซลล์มะเร็งตับ (ซ้าย) และสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับ (ขวา)

ที่มา: The Johns Hopkins University (no date)

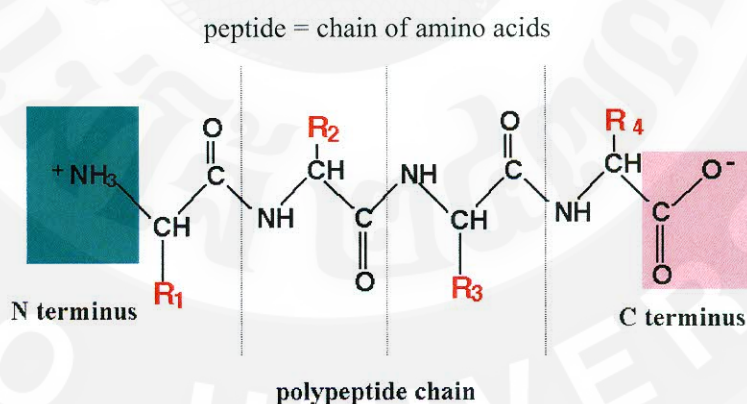
เนื่องจากโรคมะเร็งเป็นโรคที่มีสถิติผู้ป่วยสูง ดังนั้นการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทรัพยากรที่มีอยู่ภายในประเทศเพื่อนำมาป้องกันหรือนำมาบำบัดรักษาโรคมะเร็งจะต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างจริงจัง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดอัตราการเกิดโรคและลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง จากรายงานที่ผ่านพบว่ามีการศึกษาสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติต่างๆ มากมายเพื่อลดความเสี่ยง บำบัด หรือรักษาโรคต่างๆ เช่น สารสกัดจากพืช *Borreria hispida* ซึ่งเป็นพืชในตระกูล Rubiaceae มีลักษณะเจริญปกคลุมตามผิวดิน เป็นไม้ล้มลุก ก้านขรุขระเต็มไปด้วยขนอ่อน กิ่งก้านมีสีเขียวหรือสีม่วง ใบจะมีลักษณะเป็นรูปไข่ และมีดอกเกิดขึ้นติดระหว่างใบและก้าน ซึ่งพบว่าสารสกัดจากพืชชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยมีค่าความเข้มข้นของการยับยั้งการเจริญของเซลล์ให้ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Rupachandra and Sarada, 2013) นอกจากนี้ Sun and Liu (2006) ได้ศึกษาการต้านโรคมะเร็งด้วยสารสกัดจากแครนเบอร์รี่ พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 5-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมแบบอะพอพโทซิสได้ภายใน 4 ชั่วโมง และพบว่าการใช้สารสกัดจากแครนเบอร์รี่ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ร้อยละ 25 ของตัวอย่างควบคุม ซึ่งใช้เซลล์ MCF-7 ที่ไม่ได้ทรีตด้วยสารสกัดจากแครนเบอร์รี่เป็นตัวอย่างควบคุม

มีการศึกษาถึงประโยชน์ของรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดย Leardkamolkarn et al. (2011) ได้ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วย ไดคลอโรมีเทน พบว่า สารสกัดรำข้าวดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) ด้วย

ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.28, 0.32 และ 1.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีการศึกษาถึงประโยชน์ของไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยเจลาตินที่มาจากหมียักษ์ (*Dosidicus gigas*) โดยได้ใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด ได้แก่ โปรตามักซ์ ทริปซิน นิวเทรส ซาวิเนส S37005 เอสเพอเรส และอัลคาเลส พบว่าไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เอสเพอเรสเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์เนื้องอกในสมอง (U87) สูงที่สุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.13 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Aleman et al., 2011)

เปปไทด์ชีวภาพ (bioactive peptide)

เปปไทด์ คือ สายพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนที่มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ เป็นสารชีวโมเลกุลที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นกระบวนการปกติที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย (Wang and Gonzalez, 2005; Phelan et al., 2009) ส่วนมากมักมีกรดอะมิโนมากกว่า 100 หน่วยเรียงตัวกันเป็นสายพอลิเปปไทด์ ซึ่งโปรตีนจะมีสายพอลิเปปไทด์มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งสายก็ได้ ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเปปไทด์ จะมีปลายด้านที่มีหมู่อะมิโนเป็นอิสระเรียกว่าปลายเอ็น (N-terminal) ส่วนปลายที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นอิสระเรียกว่าปลายซี (C-terminal) (ภาพ 2) ดังนั้นการเรียกชื่อเปปไทด์จะเรียกตามลำดับกรดอะมิโนจากปลายเอ็นไปหาปลายซี



ภาพ 2 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเปปไทด์

ที่มา: University College London (no date)

เปปไทด์ชีวภาพ (bioactive peptide) เกิดจากย่อยสลายโปรตีนที่เป็นพอลิเมอร์ของ กรดอะมิโนสายยาวให้กลายเป็นกรดอะมิโนสายสั้นๆ มีสมบัติในการเป็นสารเสริมสุขภาพและ สามารถต้านโรคต่างๆ ในมนุษย์ได้ โดยปัจจุบันได้มีการผลิตเปปไทด์ชีวภาพออกมาจำหน่ายในทาง การค้าเป็นจำนวนมาก ส่วนมากจะใช้ในแง่ของอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ ได้แก่ เปปไทด์คอลลาเจนที่ มีส่วนช่วยในเรื่องผิวพรรณ นอกจากนี้ยังมีเปปไทด์ที่ช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคที่เกี่ยวกับระบบประสาทและสมอง ระบบทางเดินอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน โรคหลอดเลือด ตลอดจนมีส่วนช่วยในการลดระดับไขมันในเลือด ลดความดันโลหิต ลดการอักเสบที่เกิดจาก การบาดเจ็บของเซลล์ มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เพิ่มการดูด ซึมแร่ธาตุ และระงับความเจ็บปวด ช่วยผ่อนคลายหรือคลายเครียด เป็นต้น (Udenigwe et al., 2013)

เปปไทด์ชีวภาพสามารถผลิตได้โดยการนำโปรตีนมาย่อยสลาย ซึ่งสภาวะที่ใช้ใน การผลิตเปปไทด์ชีวภาพอาจแตกต่างกัน ได้แก่ วัตถุดิบตั้งต้นหรือแหล่งที่มาของโปรตีนที่ถูกย่อย โดยวัตถุดิบที่นำมาย่อยส่วนใหญ่จะนำมาจากพืชหรือสัตว์ที่มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง โดย วัตถุดิบที่มาจากพืชที่นิยมนำมาผลิตเปปไทด์ ได้แก่ ถั่วชนิดต่างๆ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวโพด คาโนล่า แฟล็กซ์ซีด (flaxseed) และสาหร่าย เป็นต้น ส่วนวัตถุดิบที่มาจากสัตว์ ได้แก่ นม ไข่ เนื้อ หอยนางรม ปลา ปลาหมึก กุ้ง ปู และแมงกะพรุน เป็นต้น รวมไปถึงโปรตีนที่สกัดได้จากอาหาร เช่น กากถั่วเหลือง แลคโตเฟอริน เคซีน เป็นต้น นอกจากชนิดของโปรตีนแล้ว ยังมีชนิดของเอนไซม์ ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน เช่น อัลคาเลส ปาเปน ฟลาเวอร์ไรม์ นิวเทรส โปรตามิกซ์ และ บรอมมิเลน เป็นต้น และยังสามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus cereus* สำหรับสภาวะในการย่อยอื่นๆ ได้แก่ เวลา ระดับ การย่อย อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส การเตรียมวัตถุดิบตั้งต้นก่อนการย่อย เช่น การให้ความร้อน ความดัน หรือการสั่นสะเทือนโดยคลื่นเสียง (sonication) เป็นต้น ซึ่งกระบวนการผลิตเปปไทด์มี ความสำคัญต่อสมบัติของเปปไทด์ชีวภาพ ส่งผลโดยตรงต่อลำดับ ชนิดและจำนวนของกรดอะมิโน ภายในสายโซ่เปปไทด์ชีวภาพ ขนาดของเปปไทด์ ความสามารถในการดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย ประจวบ และความสามารถในการละลายน้ำ เป็นต้น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้สมบัติในการออกฤทธิ์ ทางชีวภาพแตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตาม สมบัติทางยาของเปปไทด์จะขึ้นอยู่กับลำดับและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายโซ่เปปไทด์ และรูปแบบที่ไปสัมผัสกับ เนื้อเยื่อเป้าหมาย (Udenigwe and Aluko, 2012)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของเปปไทด์ลูนาซิน (Lunasin) ซึ่งเป็นเปปไทด์ชนิด ใหม่ (novel peptide) ที่มีกรดอะมิโนเรียงตัวกัน 43 ตัว ถูกค้นพบครั้งแรกในถั่วเหลือง และต่อมาได้ ถูกค้นพบในข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และเมล็ดพืชอื่นๆ มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคมะเร็งใน

เซลล์สัตว์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็ง (carcinogens) และไวรัสก่อมะเร็ง (oncogenes) และยังพบว่าลูนาซินที่ใช้ระดับความเข้มข้นในหน่วยนาโนโมลาร์ สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงเซลล์หนูที่มีรูปร่าง fibroblast (C3H10T1/2) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็งโดยสารก่อมะเร็ง 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) และ 3-methylcholanthrene (MCA) ได้ (Galvez et al., 2001) ซึ่งเปปไทด์ดังกล่าวยังสามารถป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคมะเร็งด้วยสารก่อมะเร็งได้อีกด้วย (Hernandez-Ledesma et al., 2009)

ส่วน Kim et al. (2013) ศึกษาเปปไทด์ที่สกัดได้จากหอย สกุล *Ruditapes philippinarum* โดยใช้เอนไซม์ในการย่อยแตกต่างกัน 8 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ฟลาเวอรีน นิวเทรส โปรตามิกซ์ อัลคาเลส ปาเปน เปปซิน แอลฟาไคโมทริปซิน และทริปซิน โดยขั้นตอนที่ใช้ในการสกัดเปปไทด์จะเริ่มจากการนำเอาเนื้อหอยไปทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง นำมาบดให้เป็นผง แล้วนำตัวอย่างผงแห้งที่ได้จำนวน 2 กรัม เติมนลงในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์แต่ละชนิดลงไป 40 ไมโครลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมงเพื่อทำการย่อยโปรตีน โดยสถานะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดแสดงดังตาราง 1 และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและกรอง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำไปใช้วิเคราะห์ต่อไป

ตาราง 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยเนื้อหอย *Ruditapes philippinarum*

ชนิดของเอนไซม์	สภาวะที่เหมาะสม		บัฟเฟอร์
	pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
ฟลาเวอร์ไรซ์	7.0	50	ฟอสเฟต
นิวเทรส	7.0	50	ฟอสเฟต
โปรตามิกซ์	7.0	50	ฟอสเฟต
อัลคาเลส	7.0	50	ฟอสเฟต
ปาเปน	6.0	37	ฟอสเฟต
เปปซิน	2.0	37	ไกลซีน-ไฮโดรคลอริก
แอลฟาไคโมทริปซิน	7.0	37	ฟอสเฟต
ทริปซิน	7.0	37	ฟอสเฟต

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kim et al. (2013)

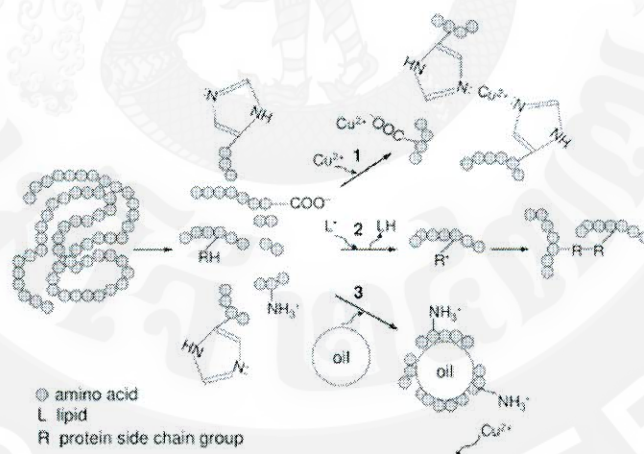
เมื่อได้ไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยแล้ว จึงทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการกรองโดยใช้เยื่อบางร่วมกับการให้ความดัน (ultrafiltration membranes) ที่มีช่วงของขนาดโมเลกุลต่างๆ กัน ได้แก่ 5, 10 และ 30 กิโลดาลตัน เมื่อได้เปปไทด์ขนาดต่างๆ แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อไป จากนั้นนำไปทดสอบการต้านมะเร็งแล้วเลือกสารละลายที่ได้จากการเก็บลำดับส่วนที่มีความสามารถในการต้านมะเร็งได้สูงสุดมาทำบริสุทธิ์ด้วยการแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography) และเก็บสารละลายแต่ละส่วนไว้และนำไปทดสอบการต้านมะเร็งต่อไป ซึ่งสารละลายแต่ละส่วนที่ต้านมะเร็งได้ดีที่สุดจะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบย้อนกลับ (reversed-phase HPLC) จากนั้นจึงนำไประเหยโดยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ซึ่งเป็นการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อไป นำเปปไทด์ที่ได้มาทดสอบการต้านมะเร็งอีกครั้ง แล้วนำเอาสารละลายแต่ละส่วนที่ต้านมะเร็งได้ดีที่สุดไปทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค gel permeation chromatography (GPC column) แล้วจึงนำไปหาลำดับกรดอะมิโน และเทียบกับฐานข้อมูล NCBI non-redundant peptide database สำหรับการศึกษาด้านมะเร็งโดยเปปไทด์ที่

สกัดได้นั้น เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม ปอด และตับ โดยเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์การต้านมะเร็ง คือ MTT assay สำหรับการวิเคราะห์การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ทำโดยใช้เอทานอล (ประกอบด้วย Tween-20 ร้อยละ 0.5) ตรึงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มด้วย propidium iodide (PI) เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์ด้วย flow cytometry และคำนวณค่า LC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายลดลงร้อยละ 50 เป็นลำดับต่อไป ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเนื้อหอยด้วยเอนไซม์ 8 ชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม และมะเร็งปอดให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ แต่เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาไคโมทริปซินยับยั้งได้ดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดที่ได้นี้ถูกเลือกไปทำบริสุทธิ์ต่อไป และเมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปหาประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งพบว่า เปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.14 ± 0.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อหาลำดับกรดอะมิโนพบว่าได้ลำดับกรดอะมิโนจากปลาย N ดังนี้ Ala-Val-Leu-Val-Asp-Lys-Gln-Cys-Pro-Asp ซึ่งเป็นเปปไทด์ชนิดใหม่

Kannan et al. (2009) ได้ศึกษาประโยชน์ของโปรตีนจากรำข้าว โดยศึกษาโปรตีนจากรำข้าวที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โดยนำรำข้าวไปสกัดเอาน้ำมันออกและนำไปผ่านการให้ความร้อนเพื่อทำลายเอนไซม์ไลเปสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 3.5 AU ที่ pH 8.0 และให้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 85 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์อัลคาเลส ปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ได้ ทำให้เกิดการแยกเป็น 2 ชั้น โดยโปรตีนที่ถูกย่อยจะอยู่ในส่วนใสด้านบน นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเปปไทด์ที่ได้ไปทดสอบที่สภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้จำลองของมนุษย์ แล้วจึงนำเอาเปปไทด์ที่ได้นั้นไปคัดแยกขนาดโมเลกุลโดยอาศัยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดต่างๆ กัน ได้แก่ 5, 10 และ 50 กิโลดาลตัน ซึ่งจะได้สารละลายที่แยกเก็บตามลำดับทั้งหมด 4 ส่วน ได้แก่ <5, 5-10, 50-10 และ >50 กิโลดาลตัน แล้วจึงนำเอาสารละลายแต่ละส่วนไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่มีขนาด < 5 กิโลดาลตัน ไปทดสอบการต้านมะเร็งด้วยวิธี MTT assay ซึ่งหลังจากการวิเคราะห์พบว่าเปปไทด์จากรำข้าวขนาด <5 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้ง

การเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทั้งมะเร็งลำไส้ (HCT-116) และมะเร็งเต้านม (HTB-26) ได้ร้อยละ 80 และ 65 ตามลำดับ เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 650 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยทั่วไปเปปไทด์ด้านออกซิเดชันมักจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 2-10 หน่วย โดยกรดอะมิโนในสายโซ่เปปไทด์ที่โดดเด่นที่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเปปไทด์ ได้แก่ ฮิสติดีน ไทโรซีน ทริปโตเฟน เมทไทโอนีน ซิสเตอีน และโปรลีน (Mine et al., 2010) โดยลำดับและขนาดของกรดอะมิโนของเปปไทด์มีผลต่อสมบัติการด้านออกซิเดชันของเปปไทด์ เนื่องจากเปปไทด์มีแนวโน้มที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็ก การทำลายโครงสร้างดั้งเดิมของโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายจะเป็นผลทำให้เกิดการคลายตัวของโครงสร้าง (unfolding) ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยกรดอะมิโนซึ่งมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (Sun et al., 2011) โดยกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยเปปไทด์นั้น เกิดขึ้นได้จากการที่เปปไทด์จับกับโลหะซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้หยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเปปไทด์ยังสามารถหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ ทำให้เกิดความเสถียร และนอกจากนี้กรดอะมิโนยังไปล้อมรอบกรดไขมันซึ่งเป็นการขัดขวางการไปทำปฏิกิริยากับสารอื่น ดังภาพ 3

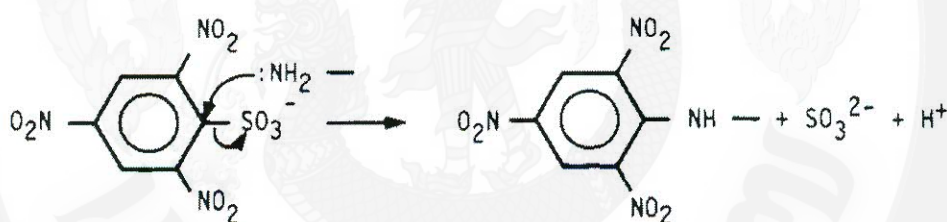


ภาพ 3 กลไกทางเคมีและกายภาพของเปปไทด์ในการยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน (1) การจับโลหะ (2) การด้านออกซิเดชัน (3) การขัดขวางโดยทางกายภาพ

ที่มา: Mine et al. (2010)

การตรวจสอบระดับการย่อยสลายหาได้โดยวิธี TNBS ซึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณ primary amino group ในตัวอย่างหลังการย่อยเพื่อเทียบกับตัวอย่างก่อนการย่อย ซึ่ง

primary amino group หรือกรดอะมิโนชนิดแอลฟา คือ กรดอะมิโนตัวแรกของสายโซ่เปปไทด์ เมื่อโปรตีนหรือพอลิเปปไทด์ถูกย่อย เนื่องจากการถูกทำลายพันธะเปปไทด์จะทำให้ได้เปปไทด์สายสั้นลง ดังนั้นวิธีการนี้จึงสามารถทำให้ทราบได้ว่าโปรตีนหลังถูกย่อยมีกรดอะมิโนชนิดแอลฟาเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเพียงใด บ่งบอกได้ถึงความสามารถในการย่อยสลายนั่นเอง ซึ่งปกติโปรตีนก่อนถูกย่อยจะมีกรดอะมิโนชนิดแอลฟา หรือสายโซ่เปปไทด์จำนวนน้อยกว่าโปรตีนหลังถูกย่อย โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการนี้ทำได้โดยใช้สาร 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) ผสมกับตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้องเป็นเพราะหากทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องจะเกิด N-trinitrophenylation ทำให้เกิดกรดพิคริก (picric) ซึ่งมีความไวต่ำ หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทันที แล้วจึงทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้ลิวซีน (leucine) เป็นสารมาตรฐาน (Adler-Nissen, 1979) โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ TNBS กับกลุ่มกรดอะมิโนชนิดแอลฟา แสดงได้ ดังภาพ 4

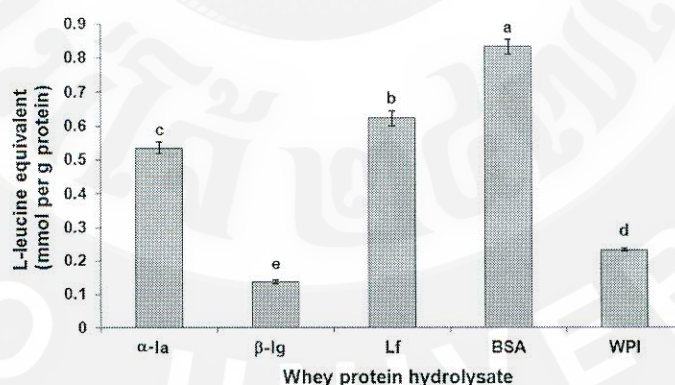


ภาพ 4 ปฏิกิริยาของ TNBS กับกลุ่มกรดอะมิโนชนิดแอลฟา

ที่มา: Adler-Nissen (1979)

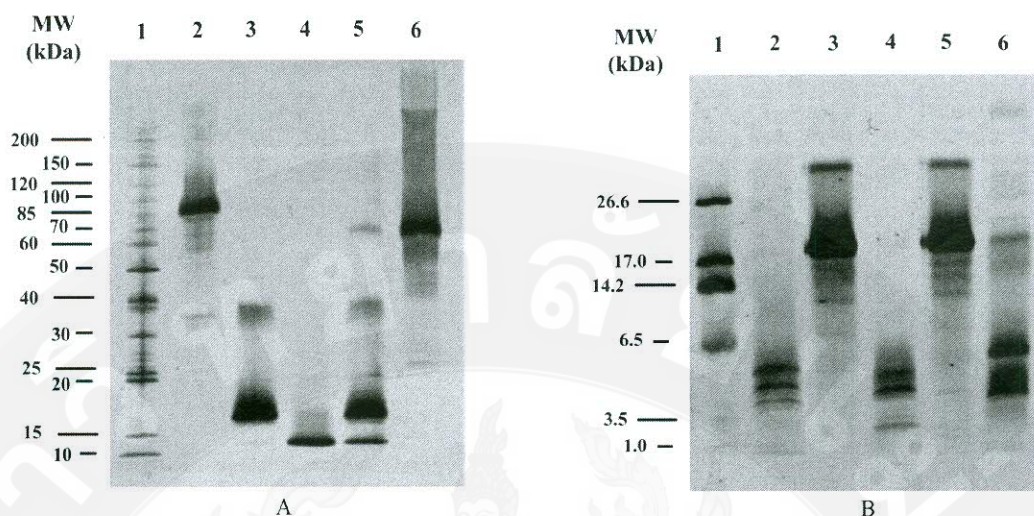
วิธีนี้ได้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจสอบระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสต และเปปไทด์ ดังเช่น Lacroix and Li-Chan (2013) ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลเสตของเวย์โปรตีนไอโซเลต (whey protein isolate) แอลฟาแลคตาบูมิน (α -lactalbumin) เบต้าแลคโตโกลบูลิน (β -lactoglobulin) ซีรัมอัลบูมิน (serum albumin) และแลคโตเฟอริน (lactoferrin) ที่ใช้เอนไซม์เปปซินในการย่อยที่สภาวะเดียวกัน โดยการนำตัวอย่างโปรตีนร้อยละ 3 ผสมในน้ำกลั่นที่ประกอบไปด้วยโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ร้อยละ 0.02 ปรับ pH เป็น 2.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมเอนไซม์เปปซินร้อยละ 4 (อัตราส่วน เอนไซม์ : สารตั้งต้น, น้ำหนักต่อน้ำหนักโปรตีน) ซึ่งของผสมเหล่านี้จะถูกนำไปทำปฏิกิริยาที่สภาวะภายใต้อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,100 g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของเหลวนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตัวอย่างที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ dipeptidyl peptidase (DPP)-IV และแอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ทั้งนี้ได้ใช้วิธี TNBS ในการตรวจวิเคราะห์ขอบเขตการย่อยของตัวอย่างโดยเอนไซม์เปปซิน เนื่องจากวิธีนี้เป็นการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟา และได้ใช้แอล-ลิวซีนเป็นสารมาตรฐาน พบว่าเวย์โปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งมีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบเท่ากับ 8.8 มิลลิโมลกรดอะมิโนต่อกรัมโปรตีน เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟา พบว่ามีค่าน้อยกว่า 1.0 มิลลิโมลสมมูลกรดอะมิโนแอล-ลิวซีนต่อกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตของแอลฟาแลคตาบูมิน เบต้าแลคโตโกลบูลินซีรัมอัลบูมิน และแลคโตเฟอรินแล้วพบว่าซีรัมอัลบูมินมีกรดอะมิโนชนิดแอลฟามากที่สุด ดังภาพ 5 และเมื่อได้ทำการแยกขนาดโมเลกุลโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ามีโมเลกุลที่มีขนาดเล็กมากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตของแอลฟาแลคตาบูมิน เบต้าแลคโตโกลบูลิน และแลคโตเฟอริน ดังภาพ 5 อย่างไรก็ตาม การแยกขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ PhastGel gradient ซึ่งเป็นเจลสำเร็จรูป ที่มีการไล่ระดับความเข้มข้นภายในแผ่นเจลเดียวกัน (ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 10-15) ที่มีความหนาแน่นสูง และย้อมเจลด้วย PlusOne silver staining kit ที่มีความไวสูงมาก ซึ่งสูงกว่าการย้อมด้วย Coomassie Blue ถึง 100 เท่า (GE Healthcare Life Sciences, 2015)



ภาพ 5 ระดับการย่อยของเวย์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (α -lactalbumin (α -la), β -lactoglobulin (β -lg), lactoferrin (Lf), bovine serum albumin (BSA), whey protein isolate (WPI))

ที่มา: Lacroix and Li-Chan (2013)



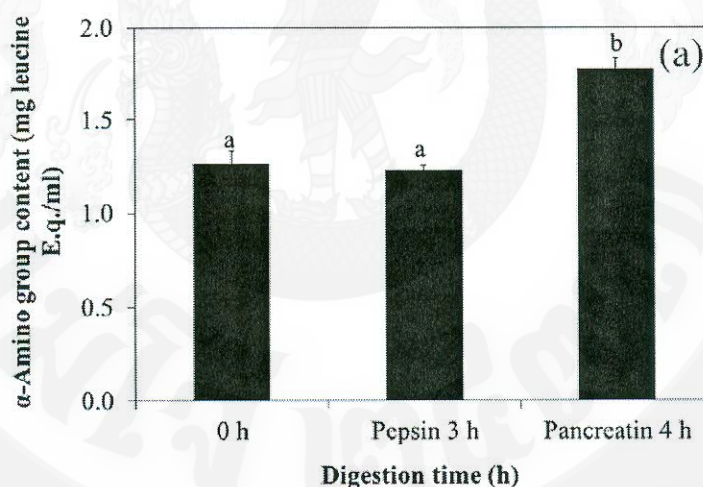
ภาพ 6 SDS-PAGE electrophoregrams ของตัวอย่างเวย์โปรตีน และไฮโดรไลเสตของเวย์โปรตีน ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (เลน 1: molecular weight markers, 2: lactoferrin, 3: β -lactoglobulin, 4: α -lactalbumin, 5: whey protein isolate, 6: bovine serum albumin)

ที่มา: Lacroix and Li-Chan (2013)

จากผลการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ DPP-IV พบว่าไฮโดรไลเสตของแอลฟาแลคตาบูมิน และเวย์โปรตีนไอโซเลต มีสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-IV ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นด้วยค่ายับยั้งเอนไซม์ DPP-IV ร้อยละ 91 และ 82 ตามลำดับ และพบว่าไฮโดรไลเสตของเบต้าแลคโตโกลบูลิน และเวย์โปรตีนไอโซเลต ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลโคไซด์ได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 33 และ 36 ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษานี้ทำให้ได้เปปไทด์จากเวย์โปรตีนที่มีสมบัติในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดสามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารฟังก์ชันเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้

Wiriaphan et al. (2015) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเศษเหลือของปลาทรายแดง (*Nemipterus* spp.) ได้แก่ โครงปลา กระดุกปลา และหนังปลา โดยได้ใช้เอนไซม์ *Virgibacillus* sp. SK33 proteinase ในการย่อยและแยกขนาดโมเลกุลโดยใช้เยื่อบางร่วมกับการให้ความดัน ซึ่งคัดแยกขนาดโมเลกุลเป็นส่วนต่างๆ ได้แก่ <1, 1-5, 5-30 และ >30 กิโลดาลตัน ซึ่งเมื่อทำการหาองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ได้จากการแยกส่วน พบว่าสารละลายแต่ละส่วนมีกรดอะมิโนชนิด Lys, Glu/Gln, Gly, Pro, Ala, Asp/Asn และ Arg มาก เมื่อทดสอบ surface hydrophobicity พบว่าส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 และ <1 กิโลดาลตัน มี surface hydrophobicity สูง

ที่สุด ในขณะที่ ส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตัน มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด และต้าน tert-butyl hydroperoxide (TBHP) ที่เป็นตัวเหนี่ยวนำการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้มากที่สุด จึงได้นำส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันไปทดสอบในระบบทางเดินอาหารจำลอง (simulated GI digestion) ซึ่งจะถูกละลายด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนกรีเอติน ตามลำดับ TNBS ได้ถูกใช้ในการหาปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาในส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนกรีเอตินโดยใช้ลิซีนเป็นสารมาตรฐาน ผลที่ได้พบว่าส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนกรีเอตินมีปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟามากกว่า ส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างถูกเอนไซม์แพนกรีเอตินย่อยพันธะเปปไทด์ได้มากกว่าถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ในขณะที่ส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตัน ที่ชั่วโมงที่ 0 และ ส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเพียงอย่างเดียวมีปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังภาพ 7

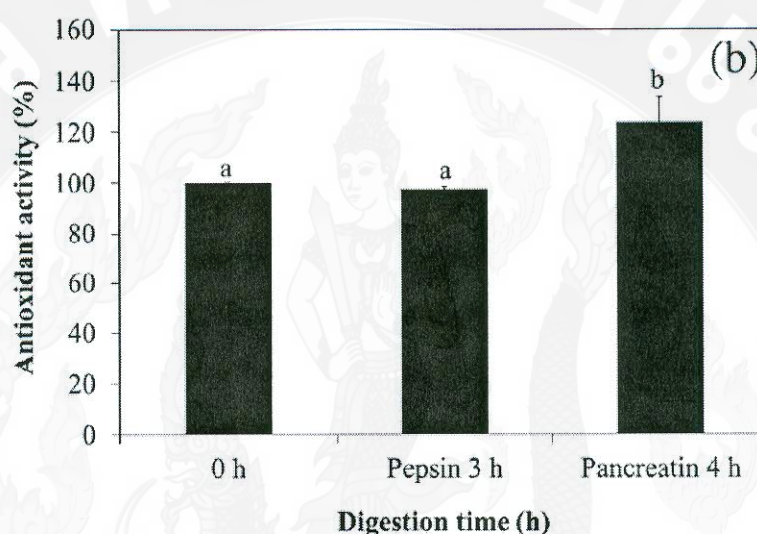


ภาพ 7 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาที่วิเคราะห์ด้วยวิธี TNBS

ที่มา: Wiriaphan et al. (2015)

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเอนไซม์เปปซินมีความจำเพาะสูงต่อกรดอะมิโนฟีนิล-อะลานีน ไทโรซีน ทรีโพรไทเฟน ลิซีน และกรดกลูตามิก ที่เป็นส่วนประกอบในสายโซ่เปปไทด์ (Simpson, 2000) ในขณะที่เอนไซม์แพนกรีเอติน ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์โปรตีเอสหลายชนิด ได้แก่ endopeptidases (trypsin, α -chymotrypsin และ elastase) และ exopeptidases

(carboxypeptidases A และ B) ซึ่งมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนหลายชนิด (Young et al., 2011) และเมื่อนำไปหาสมบัติการต้านออกซิเดชัน พบว่าส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนกรีเอตินมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูงกว่า ส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันก่อนถูกย่อยด้วยเปปซินและแพนกรีเอติน ณ เวลาที่ 0 และส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันที่ถูกย่อยด้วย pepsin เพียงอย่างเดียว ดังภาพ 8



ภาพ 8 สมบัติการต้านออกซิเดชันส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 1-5 กิโลดาลตันที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนกรีเอตินในระบบทางเดินอาหารจำลอง วิเคราะห์โดยวิธี ABTS radical scavenging activity assay

ที่มา: Wiriyaphan et al. (2015)

รำข้าว (rice bran)

กรมการค้าต่างประเทศ รายงานว่า ณ วันที่ 30 พฤศจิกายน 2557 ไทยส่งออกข้าวแล้วปริมาณ 9.8 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากช่วงเดียวกันของปีที่ผ่านมาที่มีปริมาณ 5.92 ล้านตัน หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 65.6 โดยมีมูลค่าการส่งออก 4,875 ล้านดอลลาร์ฯ (เพิ่มขึ้นร้อยละ 21.7) หรือประมาณ 156,431 ล้านบาท (เพิ่มขึ้นร้อยละ 29.5) (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2557) จึงทำให้รำข้าวซึ่งเป็นเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปข้าวเปลือกไปเป็นข้าวสารมีเหลือมากตามไปด้วย ซึ่งส่วนประกอบของรำข้าว มีดังนี้ (อรอนงค์, 2547)

1. เยื่อหุ้มผลที่มีความหนาประมาณ 10 ไมครอน ประกอบไปด้วยผนังเส้นใย 6 ชั้น สีของข้าวกล้องที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของข้าวนั้นๆ ซึ่งเกิดจากสารสีหรือรงควัตถุที่ปนอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มผล ดังนั้นเมื่อขัดสีข้าวกล้องไปเป็นข้าวสาร รำข้าวที่ได้ก็จะมีสีต่างๆ ตามลักษณะของพันธุ์ข้าว เช่น ข้าวหอมมะลิจะได้รำข้าวที่มีสีม่วงเข้ม ข้าวหอมมะลิจะได้รำข้าวที่มีสีเหลืองอ่อน ส่วนข้าวสังข์หยดจะได้รำข้าวสีแดง เป็นต้น

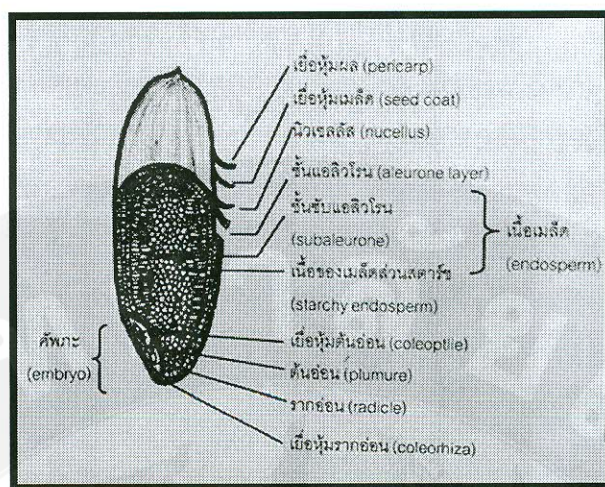
2. เยื่อหุ้มเมล็ด เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มผลเข้ามา ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น มีความหนาประมาณ 0.5 ไมครอน เป็นส่วนที่ทำให้ข้าวกล้องหรือรำข้าวมีสีเช่นเดียวกับส่วนของเยื่อหุ้มผล เนื่องจากภายในเซลล์มีไขมันและสารสี

3. นิวเซลลัส (nucellus) เป็นเซลล์ชั้นที่อยู่ติดกับเยื่อหุ้มเมล็ด มีความหนาประมาณ 0.8-2.5 ไมครอน

4. เยื่อชั้นแอลิวโรน (aleurone layer) เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มเมล็ด ประกอบด้วยเซลล์ 1-7 ชั้น โดยเยื่อหุ้มด้านหลังจะหนากว่าเยื่อหุ้มด้านท้อง ซึ่งความหนาจะแตกต่างกันไปตามแต่ละพันธุ์ข้าว ชั้นนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ เซลล์ส่วนที่ห่อหุ้มรอบเนื้อของเมล็ด มีรูปร่างเป็นลูกบาศก์ และมีไซโตพลาสซึมอยู่หนาแน่น ในเซลล์ยังมีกลุ่มโปรตีนที่มีรูปร่าง กลุ่มไขมัน และสารอื่นๆ เช่น นิวเคลียส ไมโครบอดี ไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม เวสิเคิล และพลาสทิด เป็นต้น ส่วนเซลล์แอลิวโรนที่ห่อหุ้มคัพภะจะบาง มีไซโตพลาสซึม น้อย รูปร่างยาว มีกลุ่มไขมันและกลุ่มโปรตีนน้อย เวสิเคิลมาก เป็นต้น ส่วนผนังเซลล์จะประกอบด้วย โปรตีน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส

5. คัพภะ อยู่ที่โคนเมล็ดด้านเปลือกใหญ่ หน้าที่ของคัพภะคือเป็นแหล่งสะสมอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ส่วนนี้จึงอุดมไปด้วยโปรตีนและไขมัน

ส่วนประกอบของโครงสร้างเมล็ดข้าวจากด้านนอกสุดไปยังด้านในสุด ได้แก่ เปลือก รำข้าว จมูกข้าว และเมล็ดข้าว ตามลำดับ แสดงได้ ดังภาพ 9



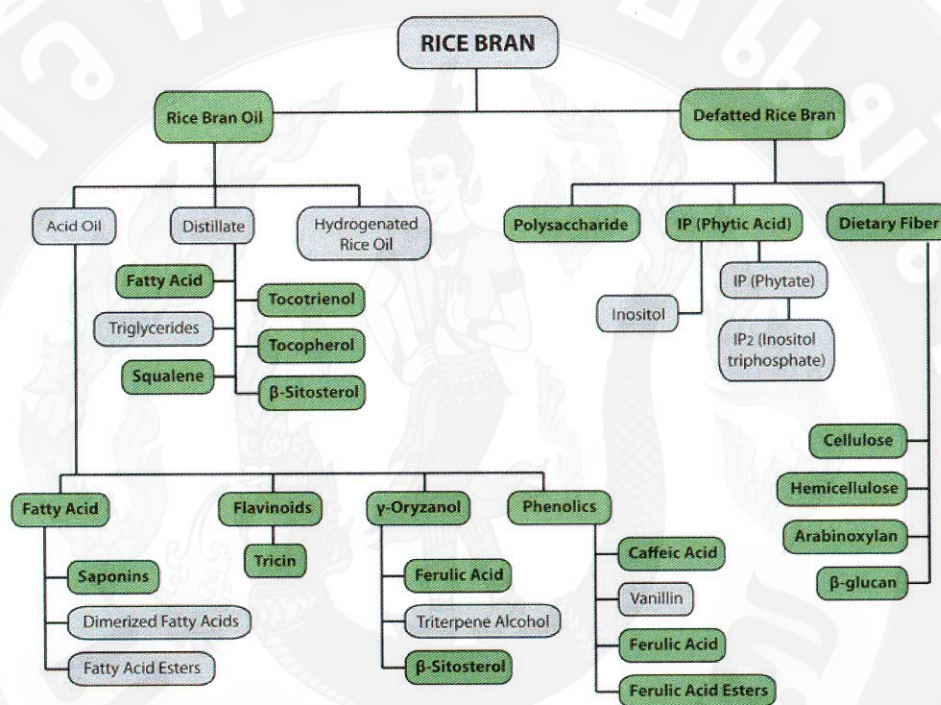
ภาพ 9 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา: อรอนงค์ (2547)

การแบ่งสายพันธุ์ของข้าว สามารถแบ่งได้ตามนิเวศการปลูกและแบ่งตามการตอบสนองต่อช่วงแสง ในปีพ.ศ. 2553 สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ได้ดำเนินงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวจนได้ข้าวพันธุ์รับรอง พันธุ์แนะนำและพันธุ์ทั่วไปให้เกษตรกรปลูกในระบบนิเวศต่างๆ ซึ่งมีทั้งพันธุ์ข้าวนาสวน ข้าวไร่ ข้าวขึ้นน้ำ ข้าวน้ำลึก ข้าวญี่ปุ่น ข้าวลูกผสม และข้าวพืชเมืองหนาว จำนวน 118 พันธุ์ (กรมการข้าว, 2553) พันธุ์ข้าวเหล่านี้มีทั้งชนิดข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ด้วยความหลากหลายทางสายพันธุ์นี้เองทำให้ข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทั้งในลักษณะทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งส่วนใหญ่แล้วข้าวมักมีสีขาวเนื่องจากกระบวนการขัดสี หรือผ่านกระบวนการที่ทำให้รำข้าวหลุดออกไป รำที่หลุดออกไปมักมีสีเหลืองอ่อน ซึ่งเกิดจากรงควัตถุภายในรำข้าว

รำข้าวแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ รำหยาบ (bran) ซึ่งได้จากการขัดผิวเมล็ดข้าวกล้อง และรำละเอียด (polish) ได้จากการขัดขาวและขัดมัน องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวหยาบที่ความชื้นร้อยละ 14 ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ คาร์โบไฮเดรต และเถ้า ร้อยละ 12.0-15.6, 15.0-19.7, 7.0-11.4, 34.1-52.3 และ 6.6-9.9 ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวละเอียดที่ความชื้นระดับเดียวกัน ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ คาร์โบไฮเดรต และเถ้า ร้อยละ 11.8-13.0, 10.1-12.4, 2.3-3.2, 51.1-55.0 และ 5.2-7.3 ตามลำดับ ซึ่งรำหยาบจะมีโปรตีน ไขมัน เส้นใยหยาบ และเถ้า มากกว่ารำละเอียด ยกเว้นคาร์โบไฮเดรต (อรอนงค์, 2547) จากการที่รำข้าวมีปริมาณไขมัน และโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูง จึงถูกนิยมนำมาสกัดน้ำมัน สกัดโปรตีน รวมไปถึงสารอาหารอื่นเพื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น ซึ่งจากเดิมมีราคาถูกและมักนำไปใช้เป็น

อาหารสัตว์ แม้ว่าในน้ำมันรำข้าวจะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น โทโคไตรอีนอล โทโคฟีรอล ฟลาโวนอยด์ แกมมาโอไรซานอล และฟีนอลิก เป็นต้น แต่กระนั้นการกำจัดที่เหลือจากการบีบน้ำมันในอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวยังคงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่เป็นจำนวนมากและหลายชนิด เช่น โพรตีน พอลิแซกคาไรด์ กรดไฟติก สารประกอบพอลิฟีนอล และเส้นใยต่างๆ เป็นต้น (Henderson et al., 2012) ซึ่งยังคงมีสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ดังแสดงในภาพ 10



ภาพ 10 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในรำข้าว (กรอบสีเขียว คือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในรำข้าว และรำข้าวปราศจากไขมันที่มีฤทธิ์ในการป้องกันและบำบัดโรคมะเร็ง)

ที่มา: Henderson et al. (2012)

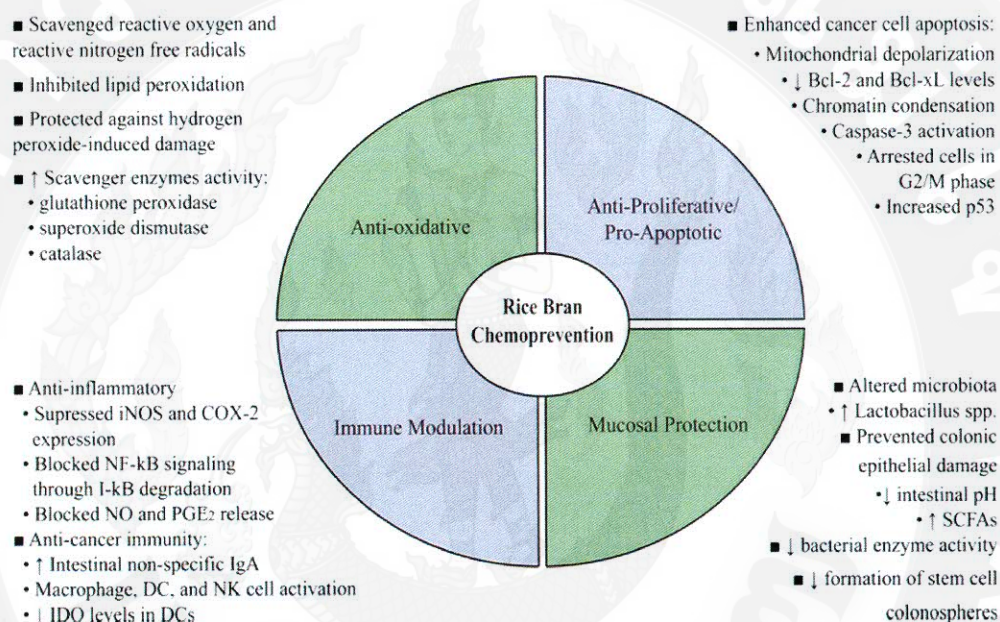
ปัจจุบันนี้พบว่าข้าวสายพันธุ์ที่มีสีย้อมบริโภคมามากขึ้น โดยกลุ่มคนที่รักสุขภาพเนื่องจากมีงานวิจัยจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าข้าวที่มีสีมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมากกว่าข้าวที่ไม่มีสี โดยส่วนใหญ่แล้วเมล็ดสีที่มีในข้าวหรือในส่วนของรำข้าวนั้นจะมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และแอนโทไซยานิน โดยมียงานวิจัยจำนวนมากที่สนับสนุนว่าฟีนอลิกมีศักยภาพในการต้านออกซิเดชันได้ เช่น การศึกษาของ Shao et al. (2014) ได้ศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเมล็ดข้าว (endosperm) จมูกข้าว (germ) และรำข้าว (bran) ของข้าวขาว ข้าวแดง และข้าวดำ พบว่าในรำข้าวขาว รำข้าวแดง และรำข้าวดำมี

กรดฟีนอลิกร้อยละ 41, 65 และ 85 ของกรดทั้งหมด และพบว่าในส่วนจากรำข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.35 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม ส่วนของจมูกข้าว และเมล็ดข้าว มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 2.79 และ 0.11 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัม ไม่ต่างกับการศึกษาของ Min et al. (2012) ที่พบว่า รำข้าวสีแดงและสีม่วงมีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ รวมไปถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่ารำข้าวที่มีสีอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากมีโปรแอนโทไซยานินและแอนโทไซยานินสูงกว่ารำข้าวที่ไม่มีสี โดยโปรแอนโทไซยานินของรำข้าวแดงมีความเข้มข้นเท่ากับ 1.27 มิลลิกรัมต่อกรัม

จากงานวิจัยของ Moko et al. (2014) ศึกษาเปรียบเทียบรำข้าว 2 กลุ่ม คือรำข้าวที่มีสี (สีแดง) และรำข้าวที่ไม่มีสี (สายพันธุ์ Superwin และ Cigeulis) ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ บิวทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน แล้วนำมาหาสมบัติการต้านออกซิเดชันพบว่า รำข้าวที่มีสีแดงที่สกัดด้วย เอน-บิวทานอล มีความสามารถต้านออกซิเดชันด้วย วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay ได้มากที่สุด โดยมีค่าร้อยละของการต้านออกซิเดชันเท่ากับ 88.29 ในขณะที่รำข้าวที่ไม่มีสีสายพันธุ์ Superwin และ Cigeulis มีค่าร้อยละของการต้านออกซิเดชันเท่ากับ 51.02 และ 51.29 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับค่า IC_{50} ที่พบว่าสารสกัดจากรำข้าวสีแดงมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด เท่ากับ 26.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในขณะที่รำข้าวที่ไม่มีสีสายพันธุ์ Superwin และ Cigeulis มีค่า IC_{50} เท่ากับ 363.17 และ 341.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากรำข้าวสีแดงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 68.61 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากรำข้าวที่ไม่มีสีทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ Cigeulis และ Superwin ซึ่งมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเพียง 54.45 และ 43.30 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากงานวิจัยดังกล่าวนี้ สามารถสรุปได้ว่ารำข้าวที่มีสีมีสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดีกว่ารำข้าวที่ไม่มีสี นอกจากนี้ยังได้หาสารฟลูเคมิที่ชี้ให้เห็นว่าในสารสกัดรำข้าวหยาบดังกล่าวมีสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ ไตรเทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ และซาโปนิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารำข้าวที่มีสีเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันที่ดีที่มีในธรรมชาติ

การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรำข้าว พบว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่มีความสามารถในการป้องกันและยับยั้งโรคต่างๆ ได้ เช่น โทโคไตรอีนอลซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งได้ (Sun et al., 2009) เนื่องจากรำข้าวมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนมาก จึงทำให้สามารถยับยั้งการเกิดโรคต่างๆ รวมทั้งช่วยบำบัด หรือรักษาโรคต่างๆ ได้ โดยมีกลไกป้องกันหรือลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ ได้หลายวิธี ได้แก่ การทำปฏิกิริยากับ

อนุมูลอิสระของออกซิเจนและไนโตรเจน การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การอักเสบ โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการสร้างสาร prostaglandin E₂ (PGE₂) และ nitric oxide (NO) ที่จัดเป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้รำข้าวยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็งในกระบวนการอะพอพโทซิส และยังป้องกันความเสียหายของเยื่อบุลำไส้ เป็นต้น (Henderson et al., 2012) ดังภาพ 11



ภาพ 11 กลไกในการป้องกันหรือลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรำข้าว (cyclooxygenase-2 (COX-2), dendritic cells (DC), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), nuclear factor-κB (NF-κB), natural killer (NK), nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂))

ที่มา: Henderson et al. (2012)

จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีการศึกษาประโยชน์ของข้าวและรำข้าวมากมายในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคต่างๆ ตัวอย่างเช่น พบว่ารำข้าวช่วยลดความผิดปกติของเนื้องอกที่ลำไส้ใหญ่ (Barnes et al., 1983) กรดไฟติกและสารสกัดจากรำข้าว ช่วยลดจำนวนของ Aberrant crypt foci (ACF) ของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Norazalina et al., 2010) และเฮมิเซลลูโลสในรำ

ข้าว ลดอุบัติการณ์และจำนวนของเนื้องอกในลำไส้ในหนู (Fisher 344 rats) ได้ (Kawasaki et al., 2008) เป็นต้น ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 การศึกษาองค์ประกอบต่างๆ ของข้าวในการป้องกันหรือลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*)

ส่วนประกอบข้าว	กลไกในการยับยั้ง	ที่มา
รำข้าว	ลดความผิดปกติของเนื้องอกที่ลำไส้ในหนู (Fisher 344 rats)	Barnes et al., 1983
เอมิเซลลูโลสในรำข้าว	ลดอุบัติการณ์และจำนวนของเนื้องอกในลำไส้ในหนู (Fisher 344 rats)	Kawasaki et al., 2008
กรดเฟอรูลิกและจุ่มข้าวปราศจากไขมัน	ลดจำนวนของ Aberrant crypt foci (ACF) ของการเกิดมะเร็งลำไส้ในหนู (Fisher 344 rats)	Mori et al., 1999
กรดไฟติกและสารสกัดจากรำข้าว	ลดจำนวนของ Aberrant crypt foci (ACF) ของการเกิดมะเร็งลำไส้ในหนู (Sprague-Dawley rats)	Norazalina et al., 2010
ข้าวและรำข้าวสีน้ำตาลหมัก	กดเนื้องอกในลำไส้ในหนูที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบในลำไส้ใหญ่ (Apc ^{Min} mice)	Phutthaphadoong et al., 2010
ข้าวกล้อง	การบริโภคข้าวกล้องอย่างน้อยหนึ่งครั้งต่อสัปดาห์ลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ในมนุษย์ได้ถึงร้อยละ 40	Tantamango et al., 2011
โทโคไตรอีนอลในน้ำมันรำข้าว	ลดความรุนแรงและจำนวนของเนื้องอกต่อมน้ำนมที่ทดสอบในหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley	Iqbal et al., 2003

ตาราง 2 (ต่อ)

ส่วนประกอบข้าว	กลไกในการยับยั้ง	ที่มา
ข้าวกล้องหมักโดย <i>Aspergillus oryzae</i>	ลดอุบัติการณ์และความหลากหลายของมะเร็งที่ลิ้นในหนู (Fisher 344 rats)	Long et al., 2007
ข้าวกล้องหมักโดย <i>Aspergillus oryzae</i>	ลดอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะและการรุกรานของมะเร็งในหนู (ICR mice)	Kuno et al., 2006
โทโคไตรอีนอลในน้ำมันรำข้าว	ลดความเสี่ยงต่อมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocarcinoma) โดยการลดการสร้างก้อน (nodule) ในตับ ส่งผลให้ลดระดับอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในพลาสมา ลดกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไทโอนทรานเฟอร์เรสในตับ และลด LDL และการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley	Iqbal et al., 2003
ข้าวและรำข้าวสีน้ำตาลหมัก	ลดอุบัติการณ์และความหลากหลายของมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular) ในช่วงก่อนและหลังระยะเริ่มต้นในหนู (F344 rats)	Katayama et al., 2003
ข้าวกล้องหมักโดย <i>Aspergillus oryzae</i>	ระงับจำนวนรวมของเนื้องอกหลอดอาหารและรุกรานโรคผ่านการยับยั้งของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในหนูสายพันธุ์ F344	Kuno et al., 2004

ที่มา: ดัดแปลงจาก Henderson et al. (2012)

เนื่องจากในรำข้าวมีไขมันเป็นองค์ประกอบสูง ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันรำข้าว ซึ่งผลผลิตจากอุตสาหกรรมทำให้ได้กากรำข้าวที่เหลือมีคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งโปรตีนในรำข้าวเป็นที่ยอมรับในการใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ (Houston, 1972) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ประโยชน์จากโปรตีนรำข้าวมากขึ้น เพราะในรำข้าวมีโปรตีนอยู่หลายชนิด ดังเช่นในรำข้าวกล้อง (brown rice) ซึ่งมักถูกใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและไก่มีโปรตีนชนิด อัลบูมิน โกลบูลิน และกลูเตลิน อยู่ร้อยละ 37, 36 และ 22

ตามลำดับ (Farrell, 1994) นอกจากนี้ Chanput et al. (2009) ได้จำแนกชนิดของโปรตีนที่มีรำข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* L., CV. Khao Dawk Mali 105 และ CV. Chainat 1 ที่ผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 พบว่ามีโปรตีนชนิดกลูเตลิน อัลบูมิน โกลบูลิน และโปรลามิน อยู่ 22.7, 21.6, 17.4 และ 8.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และนอกจากนั้นยังมีกรดอะมิโนอีก 20 ชนิด จากการวิจัยของ Subramanian et al. (2013) ที่ได้จำแนกชนิดของกรดอะมิโนในรำข้าวโดยวิธี HPTLC พบว่ามี ฟีนอลอะลานีน ลิวซีน ไกลซีน อะลานีน แอล-ทรีโอนีน และอาร์จีนีน เท่ากับ 786.89, 167.46, 20.432, 13.324, 6.200 และ 0.316 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ

สารต้านออกซิเดชัน

ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาที่โมเลกุล อะตอม และไอออน สูญเสียอิเล็กตรอน ทำให้สถานะภาพออกซิเดชัน (oxidation state) ของธาตุเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นอะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวหรือไม่ครบคู่ในวงจรรอบนอกสุด ทำให้อะตอมดังกล่าวไม่เสถียรและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาอย่างมากในการแย่งรับเอาอิเล็กตรอนเดี่ยวหรืออิเล็กตรอนไร้คู่ (unpaired electron) จากอะตอมหรือโมเลกุลอื่นมาไว้ในตัวมันเอง ในบางครั้งอนุมูลอิสระอาจส่งหรือปล่อยอิเล็กตรอนเดี่ยวหลุดออกไปยังอะตอมหรือโมเลกุลสารอื่น ส่งผลให้สารอนุมูลอิสระกลายเป็นสารธรรมดาเพราะหมดความเป็นอนุมูลอิสระแล้วจึงเสถียรหรือคงตัวอยู่ได้ ในขณะที่สารที่ได้รับอิเล็กตรอนเดี่ยวไปจะกลายเป็นอนุมูลอิสระแทน ทำให้โมเลกุลนั้นอยู่สภาพที่ไม่คงตัว มีภาวะไม่อยู่นิ่ง ซึ่งต้องแย่งเอาอิเล็กตรอนของโมเลกุลข้างเคียงมาเติมให้กับอิเล็กตรอนที่ขาดหายไป ในรอบวงโคจร เป็นแบบนี้เรื่อยไปกลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ส่งผลให้เกิดความเสื่อมสลายของโมเลกุลของสารอื่นๆ ในเซลล์เป็นบริเวณกว้าง เป็นสาเหตุของการทำลายหรือภาวะบาดเจ็บของสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอในเซลล์ของร่างกาย (วรพล, 2555) หากโมเลกุลที่เสียหายนั้นเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ เช่น คอลลาเจน ก็จะส่งผลกระทบทำให้คอลลาเจนนั้นเสียสภาพ เนื้อเยื่อบริเวณนั้นจึงเกิดความผิดปกติ ทำให้ผิวหนังเหี่ยวย่น หลอดเลือดแดงแข็งตัว เลนส์ตามีต้อกระจก เป็นต้น แต่หากอนุมูลอิสระทำลายโมเลกุลโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ สารสื่อประสาท ก็เป็นสาเหตุให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีความบกพร่องไม่สามารถทำหน้าที่ปกติได้ ทำให้อวัยวะต่างๆ เสื่อมหรือชราภาพ เกิดเป็นโรคต่างๆ ตามมามากมาย นอกเหนือจากนี้ ความเสียหายจากการเกิดออกซิเดชันที่รุนแรงมากกว่านี้คือเกิดการทำลายโมเลกุลดีเอ็นเอ ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและการแปลรหัสทางพันธุกรรม ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอในเซลล์ผิดเพี้ยนจนก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากการแบ่งตัวของดีเอ็นเอที่ผิดปกติ เซลล์อาจจะตาย

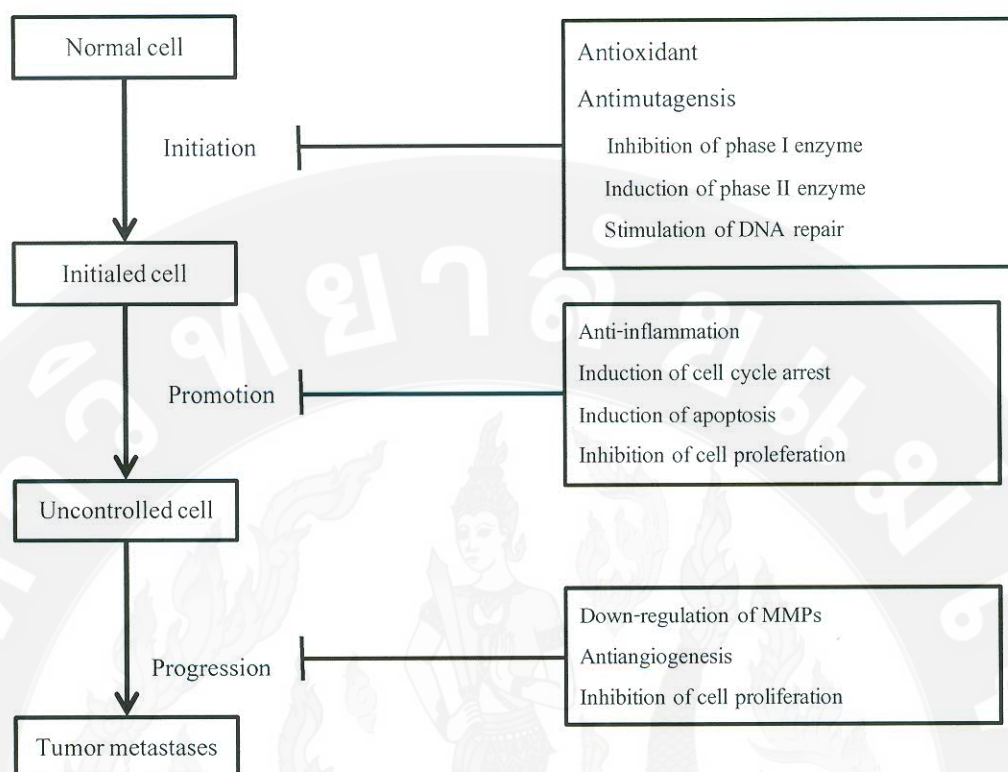
หรือกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลายอย่าง เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคข้ออักเสบ ต้อกระจกตา โรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมและความชรา เป็นต้น (Uttara et al., 2009)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย และการรับอนุมูลอิสระจากภายนอกในร่างกาย เช่น คาร์บอนฟรี มลพิษ สารเคมี รวมไปถึงจากอาหารที่มี ภาวะทางโภชนาการที่ไม่ถูกต้อง เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการเพิ่มของอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ซึ่ง เมื่อใดก็ตามที่ร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านออกซิเดชัน ทำให้ร่างกายเกิดภาวะ เครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) นั่นคือ ภาวะที่ไม่มีความสมดุลระหว่างสารต้านออกซิเดชัน และอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลกระทบการทำงานของเนื้อเยื่อและอวัยวะ สามารถเกิดเป็น โรคต่างๆ ตามมามากมาย (วรพล, 2555) แต่อย่างไรก็ตาม โดยปกติแล้วร่างกายจะมีการปกป้องโดยของเหลว ภายในร่างกายที่มีส่วนประกอบเป็น โมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีโลหะจับอยู่ ได้แก่ เอนไซม์ และ โปรตีน สารต้านออกซิเดชันเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลให้หมด ไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไปได้ ซึ่งร่างกายของมนุษย์และสัตว์มีเอนไซม์ที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันหลายชนิด ได้แก่ คีตาเลส (catalase) ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และกลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นต้น (Frankle and Meyer, 2000) นอกจากนี้ยังมีสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ เช่น กลูตาไทโอน (glutathione) และกรดยูริก (uric acid) และยังสามารถพบสารต้านออกซิเดชันได้ในพืช ซึ่งได้จากการรับประทานอาหารที่มีสารต้านออกซิเดชันเป็นองค์ประกอบ เช่น วิตามินซี วิตามินอี สารประกอบพอลิฟีนอล ฟลาโวนอยด์ เบต้าแคโรทีน ยูบิควิโนน กลูตาไทโอน เป็นต้น สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดออกซิเดชัน มีบทบาทในการทำให้ปฏิกิริยา ลิปิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง (Uttara et al., 2009)

สารต้านออกซิเดชันที่มีในธรรมชาติ (natural antioxidants) ที่มีบทบาทสำคัญมักพบว่าส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบในกลุ่มพอลิฟีนอลิก ซึ่งสารประกอบพอลิฟีนอล จัดเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ได้รับจากภายนอก และพบมากในธรรมชาติ ได้แก่ ผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ปัจจุบันพบสารประกอบพอลิฟีนอลมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ลิคินิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น สารพอลิฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านแบคทีเรีย ไวรัส การอักเสบ การแพ้ มีสมบัติในการช่วยสลาย ลิ่มเลือด รวมไปถึงการเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่มุ่งเน้นในการศึกษาถึง ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดในพืชผัก ผลไม้ นานาชนิด (Cai et al., 2003; Velioglu et al., 1998; Zheng and Wang, 2001) อีกทั้งยังศึกษาถึงสมบัติในการป้องกันหรือบำบัดโรคต่างๆ

เนื่องจากฟีนอลิกมีศักยภาพมากในการต้านออกซิเดชันมากกว่าวิตามินซี วิตามินอี และแคโรทีนอยด์ (Rice-Evans et al., 1995) โดยกลไกในการต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก คือ รับอนุมูลอิสระมาไว้กับตัวเอง กลายเป็นฟีนอกซีแรดิคอล (phenoxyl radical) มีความเสถียรเนื่องจากสามารถเกิดเรโซแนนซ์ได้ และให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้เกิดความเสถียร รวมไปถึงยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในกลุ่มออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) และอนุมูลอิสระในกลุ่มไนโตรเจน (Reactive nitrogen species; RNS) โดยยับยั้งเอนไซม์บางชนิด หรือจับสารคีเลตของไอออนของเหล็ก (chelate metals) ที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (Dai and Mumper, 2010)

นอกจากนี้ฟีนอลิกยังมีความสามารถในการป้องกันและยับยั้งโรคมะเร็งได้ด้วย โรคมะเร็งสามารถแบ่งระยะของการเกิดโรคได้หลายระยะ ประกอบด้วยระยะเริ่มต้น (initiation) ระยะส่งเสริม (promoting) ระยะลุกลาม (progression) และระยะแพร่กระจาย (metastasis) ซึ่งฟีนอลิกที่ได้จากธรรมชาติสามารถเข้าไปมีศักยภาพในการจัดการกับมะเร็งแต่ละระยะได้ คือ ระยะเริ่มต้น สารฟีนอลิกจะทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน และต้านการเกิดการกลายพันธุ์ ระยะต่อมาคือระยะส่งเสริม ซึ่งเป็นระยะที่เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ สารฟีนอลิกจะทำหน้าที่ต้านการอักเสบ เหนี่ยวนาให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ ที่เป็นเหตุให้เซลล์นั้นเกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง เหนี่ยวนาให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ส่วนระยะลุกลามเป็นระยะที่นำไปสู่การเจริญเป็นเนื้องอก และแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง สารฟีนอลิกจะไปลด Matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นเอนไซม์หลักของระบบเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีโอไลติก ซึ่งมีบทบาทต่อการกระบวนการทางสรีรวิทยาและการก่อให้เกิดโรค (กิตติศักดิ์, 2554) ดังภาพ 12

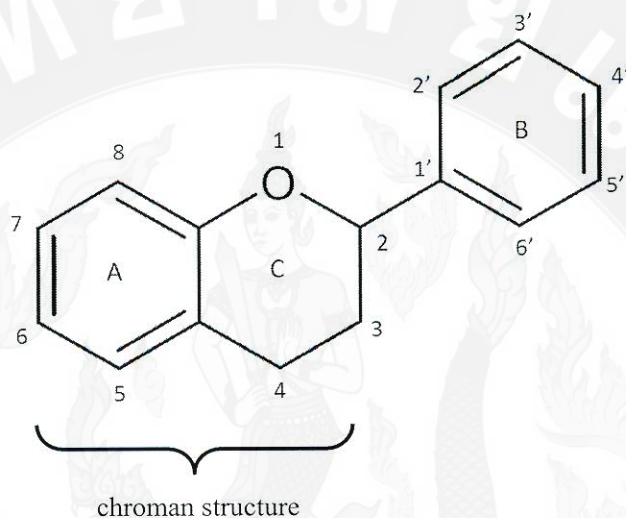


ภาพ 12 ศักยภาพของฟีนอลิกที่ได้จากพืชในการต้านเซลล์มะเร็งในขณะพัฒนาในแต่ละระยะ
ที่มา: ดัดแปลงจาก Dai and Mumper (2010)

มีการศึกษาเปลือกของลูกนํานมสีม่วง (*Chrysophyllum cainito* L.) เปลือกมะม่วง
หิมพานต์ (*Anacardium occidentale*) สีเหลือง และสีแดง ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เมื่อ
วิเคราะห์ความสามารถด้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic
acid) (ABTS) cation radical scavenging assay และ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
radical scavenging capacity assay พบว่าสามารถด้านออกซิเดชันได้เป็นอย่างดี โดยมีค่าเฉลี่ย
เท่ากับ 3050.95–3322.31 ไมโครโมลาร์โทรลอกซ์ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หรือ 890.19–970.01
มิลลิกรัมวิตามินซีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และ 1579.04–1680.90 ไมโครโมลาร์โทรลอกซ์ต่อ 100
กรัมน้ำหนักแห้ง หรือ 340.18–362.18 มิลลิกรัมวิตามินซีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อทำ
การแยกสารประกอบพอลิฟีนอลในตัวอย่างดังกล่าวพบว่ามีกรดเฟอรูลิก กรดคาเฟอิก
กรดซินเนปิก กรดแกลลิก และไมริซิทิน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของฟีนอลิก (Moo-Huchin et al., 2015)

โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบพอลิฟีนอล ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวง
อะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีอย่างน้อย 1 หมู่ ถือเป็นสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิของ
พืช โดยกลุ่มสารสำคัญที่อยู่ในกลุ่มพอลิฟีนอลที่มักพบบ่อย ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งจะพบได้ทั่วไป

ในพืชที่มีเขียว และพบได้ทุกส่วนของพืชมีโครงสร้างหลักเป็นฟลาเวน (flavan) หรือ 2-phenylbenzopyran ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม (โอภาและคณะ, 2549) ซึ่งอาจจัดเรียงเกิดเป็นวงที่ 3 ทำให้โครงสร้างหลักที่ได้เหมือนกับโครงสร้างหลักของวิตามินอี ที่เป็นโครงสร้างแบบโครแมน (chroman) หรือเบนโซไพแรน (benzopyran) ดังภาพ 13



ภาพ 13 โครงสร้างของฟลาเวน

ที่มา: ดัดแปลงจาก โอภาและคณะ (2549)

ฟลาโวนอยด์ยังแบ่งกลุ่มย่อยออกได้อีกหลายกลุ่ม โดยแบ่งตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้าง ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาเวน ฟลาโวนอน ไอโซฟลาโวน แอนโทไซยานิดิน และแอนโทไซยานิน เป็นต้น (โอภา และคณะ, 2549)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุหรือสารให้สี ที่ให้สีในช่วงสีแดง สีม่วง และสีน้ำเงิน เป็นกลุ่มที่พบมากในฟลาโวนอยด์ ใช้เป็นสารให้สีธรรมชาติในอาหาร มักพบในผักและผลไม้ที่มีสีเข้ม อาหารที่เป็นแหล่งสำคัญของแอนโทไซยานินได้แก่ ผลไม้ในกลุ่มเบอร์รี่ เช่น สตรอเบอร์รี่ ผลหม่อน บลูเบอร์รี่ แครนเบอร์รี่ เชอร์รี่ ราสเบอร์รี่ เป็นต้น รวมทั้งกะหล่ำปลีสีม่วง ข้าวดำ หรือข้าวสาลีนิล ข้าวโพดสีม่วง มันเทศสีม่วง กระเจี๊ยบแดง ดอกอัญชัน ลูกหว้า ข้าวแดง หอมหัวใหญ่สีม่วง มะเขือม่วง องุ่นแดง-ม่วง แอปเปิ้ลแดง ลูกไหนด ลูกพรุน และลูกเกด เป็นต้น ปัจจุบันมีการค้นพบแอนโทไซยานินมากกว่า 300 ชนิดจากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ได้พบกว่า 7,000 ชนิด แต่ละชนิดจะมีสีและคุณสมบัติแตกต่างกันไป แม้ว่าแอนโทไซยานินจะมีด้วยกันหลายชนิด แต่ทุกชนิดจะมีโครงสร้างหลักเป็นสารชนิดเดียวกันที่เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins)

(กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553) ประโยชน์ของแอนโทไซยานินในการต้านทานหรือมีส่วนช่วยในการบำบัดโรคนั้น ได้ถูกศึกษากันอย่างแพร่หลาย การศึกษาของ Roobha et al. (2011) พบว่าแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากกาบ (bract) ของปลีกล้วย (Musa acuminata) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มีความสามารถในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ร้อยละ 12.24 ในขณะที่ Luo et al. (2014) ได้ทำการศึกษาแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากชั้นแอริวโลนของข้าวสาลีดำ โดยให้หนูผู้ดื่ปราศจากขนห่อหุ้มร่างกาย (nude mice) เพศเมีย อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 16 ตัว ได้บริโภคแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากชั้นแอริวโลนของข้าวสาลีดำดังกล่าวทางปากในสัดส่วน 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นฉีดเซลล์เนื้องอก MDA-MB-453 จำนวน 8×10^5 เซลล์ ที่ใต้ผิวหนังบริเวณหลังด้านขวาของหนูแต่ละตัว พบว่าหนูที่บริโภคแอนโทไซยานินจากข้าวสาลีดำลดการเจริญของเซลล์เนื้องอก ยับยั้งการแพร่กระจายของเนื้องอกในปอด ลดก้อนเนื้องอกในปอดของหนูผู้ดสายพันธุ์ BALB/c ที่ถูกปลูกถ่ายอวัยวะเต้านมที่มีเซลล์มะเร็ง MDA-MB-453

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัตถุดิบ

เชียงใหม่

1. รำข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซื้อมาจากกลุ่มเกษตรกรอินทรีย์ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่
2. รำข้าวเจ้าหอมนิล ซื้อมาจากกลุ่มเกษตรกรอินทรีย์ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่
3. เซลล์มะเร็งตับ (HepG2, American Type Culture Collection (ATCC))

อุปกรณ์

1. กระดาษชั่งสาร (weighing paper: white man)
2. กระดาษกรอง (filter paper: Whatman, Cat no. 1001-110)
3. ช้อนตักสาร (spatula)
4. กระบอกตวง (cylinder)
5. บีกเกอร์ (beaker)
6. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
7. ขวดปริมาตร (volumetric flask)
8. ปิเปต (pipette)
9. ลูกยาง (rubber bulb)
10. ไมโครปิเปต (micropipette)
11. ทิป (tips)
12. หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube)
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
14. คิวเวตต์ (cuvette)
15. ขวดดูแรน (laboratory bottle)
16. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge tube)
17. ถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ (microplate)
18. พาราฟิล์ม (parafilm)
19. หลอดหยด (dropper)
20. แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร (magnetic bar)

21. บิวเรต (burette)
22. ครุฑิเบิล (crucible)
23. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น (moisture can)
24. ถุงมือยาง (rubber glove: Sempermed)
25. ทิมเบิล (thimble)
26. นาฬิกาจับเวลา (stopwatch: Oregon scientific, model: TR113)
27. สไลด์นับจำนวนเซลล์ (counting chambers: Isolab, Germany)
28. ไมโครเพลทขนาด 96 หลุม (96-well microtiter plate: Nonclon, China)
29. ฟลาस्कสำหรับเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask: NUNC, Denmark)
30. ขวดน้ำกลั่น (wash bottle)

เครื่องมือ

1. ตู้อบลมร้อน (hot air oven: Termaks, Norway)
2. ตู้บ่มเลี้ยง (CO₂ Incubator: Thermo Scientific Forma Steri-Cycle, model: 371, USA)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge: Harrier 18/80, Canada)
4. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker: inniva, model: 4043, USA)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter: Metrohm 744, Switzerland)
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath: Memmert, Germany)
7. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance: Sartorius BP, model: 610, Germany)
8. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance: Sartorius, model: CP 224S, Germany)
9. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กและเตาให้ความร้อน (magnetic stirrer and hot plate: IKA, Malaysia)
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer: Reyleigh, model: VIS-723G, China)
11. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader: Bio-rad, model: 680 XR, USA)
12. เตาเผาถ้ำ (muffle furnace: Carbolite, England)
13. โถดูดความชื้น (desiccator: Duran, vakuumfest, Germany)
14. extraction unit (Tecator, model: 1043, Sweden)

15. service unit (Tecator, model: 1046, Sweden)
16. Digestor (Tecator, model: 2012, Sweden)
17. Distilling unit (Tecator, model: 2016, Sweden)
18. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (freezer: Haier, model: FZC770624, Thailand)
19. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (refrigerator: Panasonic, model: NR-B20SB, Japan)
20. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer: Dura-stop, model: STD)
21. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer: Scientific, model: G-560E, USA)
22. ตู้ดูดควัน (fume hood: major scientific, Thailand)
23. กล้องจุลทรรศน์ (microscope: Olympus, model: UM 500, Japan)
24. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope: Olympus, model: ULWCD 0.30, Japan)
25. ตู้เป่าเชื้อ (horizontal type laminar flow: triwork 2000, model: CLEAN H2-3, Thailand)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

1. เฮกเซน (hexane: Merck, CAS no. 110-54-3, Germany)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: Merck, CAS no.11310-73-2)
3. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: Merck, Germany)
4. เอนไซม์อัลคาเลส (alcalase: Sigma, CAS no. 9014-01-1, USA)
5. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: Merck, Germany)
6. เอนไซม์เปปซิน (pepsin: Sigma, CAS no. 9001-75-6, USA)
7. โพแทสเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิก (potassium phosphate monobasic: Merck, CAS no. 7778-77-0, USA)
8. เอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin: Sigma, CAS no. 8049-47-6, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid: RCI Labscan, CAS no. 7664-93-9, Thailand)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: Merck, CAS no.11310-73-2, Germany)

3. กรดบอริก (Boric acid: Merck, Germany)
4. เมทิลเรด (methyl red: Qrec, CAS no. 493-52-7, New zealand)
5. เมทิลีนบลู (methylene blue: Qrec, CAS no. 61-73-4, New zealand)
6. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate: Merck, Germany)
7. เจห์ลแท็บ (kjeltabs: tecator, CAS no. 1527-0018, Sweden)
8. เฮกเซน (hexane: RCI Labscan, CAS no. 110-54-3, Thailand)
9. คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate: Fisher scientific, CAS no. 7758-99-8, England)
10. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (sodium potassium tartrate: Merck, Germany)
11. Folin-ciocalteu reagent (Merck, Germany)
12. อาหารเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM): Gibco™, USA)
13. โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodiumbicarbonate: Merck, Germany)
14. ซีรัมบวีนซีรัม (Fetal bovine serum: Gibco™, USA)
15. non-essential amino acid solution (HyQ®, USA)
16. ยาปฏิชีวนะ penicillin streptomycin (antibiotic penicillin streptomycin: Gibco™, USA)
17. ยาปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา (antibiotic-antimycotic: Gibco™, USA)
18. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution, PBS: Gibco™, USA)
19. เอนไซม์ Trypsin-EDTA (Gibco™, USA)
20. สาร MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2Hterazoliumbromide : Sigma, Germany)
21. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide (DMSO): Sigma, Germany)
22. กรดแกลลิก (gallic acid: Sigma, CAS no. 149-91-7, China)
23. สาร DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): Sigma, USA)
24. เอทานอล (ethanol: RCI Labscan, CAS no. 64-17-5, Thailand)
25. ลิวซีน (leucine: Sigma, USA)
26. สาร 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS: Sigma, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาคุณภาพบางประการของรำข้าว

1.1 การเตรียมตัวอย่างรำข้าว

ตัวอย่างรำข้าว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ รำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิล นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส โดยตู้อบลมร้อน เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเป็นการทำลายเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการเสื่อมสภาพ (Ryan et al., 2011) สุ่มตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ได้แก่ วิเคราะห์ปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน และโปรตีน) ปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การเตรียมรำข้าวปราศจากไขมันทำได้ดังนี้ นำตัวอย่างรำข้าวผงมาทำการสกัดไขมัน โดยใช้เฮกเซนเป็นสารสกัด ในอัตราส่วนของ รำข้าว : เฮกเซน เท่ากับ 1:3 นำไปเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำรำข้าวที่สกัดน้ำมันออกแล้วไปทำแห้งภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำรำข้าวที่ได้ไปบดและบรรจุในถุงซิปล็อก (ดัดแปลงจาก Wang et al., 1999)

1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1.2.1 วิธีวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 2000)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 2 กรัม นำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 130±3 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ นำมาใส่ในโถดูดความชื้นรอจนเย็นถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณความชื้น

1.2.2 วิธีวิเคราะห์เถ้า (AOAC, 2000)

ชั่งตัวอย่าง 2 กรัมลงในถ้วยครุชเชิล นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 420-550 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 16 ชั่วโมงเพื่อให้ได้เถ้าที่มีสีขาว ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณเถ้า

1.2.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธีชอกห์เลท (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005)

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม วางบนกระดาษกรองและห่อลงใส่ในทิมเบิล สวมอุปกรณ์ที่ทิมเบิล แล้วนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ไขมัน ซึ่งถ้วยที่รองรับน้ำมันให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน เติมหะกษณลงในถ้วยที่รองรับน้ำมัน 50 มิลลิลิตร ใส่ทิมเบิลที่บรรจุตัวอย่างลงในหลอดชอกห์เลท ใช้อุณหภูมิในการสกัด 140 องศาเซลเซียส กลั่นและชะล้างด้วยสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปอบที่อุณหภูมิ 102 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักไขมันที่ได้

1.2.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจดคาลท์ (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005)

ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.3 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน เติมหะกษณเร่งปฏิกิริยา (Kjeltab) 1 เม็ด และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาไฟ 420 องศาเซลเซียสในตู้ควบคุมจนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส วางไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปกลั่น โดยเครื่องกลั่นจะเติมน้ำกลั่น 28 มิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร รองรับสิ่งที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมหินดิเคเตอร์ผสมระหว่างโบโมครีซอลกรีนกับเมทิลเรด 2 หยด กลั่นประมาณ 4 นาที ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนได้จุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน นำไปคำนวณต่อไป

1.3 ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

1.3.1 การสกัดตัวอย่าง

ทำการสกัดตัวอย่างรำข้าวก่อนทำการวิเคราะห์ โดยการนำรำข้าวผสมกับสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 ในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ไปแยกเมทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปทำแห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) (Chatha et al., 2006) ตัวอย่างที่ได้ในที่นี้ เรียกว่า “rice bran extract”

1.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ก่อนจะเติมโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน (Dewanto et al., 2002)

1.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยน้ำกลั่น ผสมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายเจือจาง DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) (ดัดแปลงจาก Butsat and Siriamormpun, 2010)

วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของการต้านออกซิเดชัน} = \frac{(A_{517\text{nm}} \text{ control} - A_{517\text{nm}} \text{ sample}) \times 100}{A_{517\text{nm}} \text{ control}}$$

2. การเตรียม protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว

การเตรียม protein concentrate ดัดแปลงจาก Bandyopadhyay et al., 2008 สามารถทำได้ ดังนี้ นำรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว 10 กรัม ผสมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล กวนโดยเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กและเตาให้ความร้อน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปปรับ pH ให้เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปกวนต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนตะกอนซึ่งเป็นโปรตีนรำข้าว ไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำความแห้งแบบแช่

เยือกแข็ง จะได้ “protein concentrate” จากร้าข้าวตามต้องการ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

นำ protein concentrate 10 กรัม ผสมด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 8 โดยเติมเอนไซม์อัลคาเลส เข้มข้น 2.4 ยูนิตต่อกรัม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ โดยกำหนดสภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ใช้เวลาในการย่อย 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดสอบที่สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองของมนุษย์ต่อไป (Li et al., 2007 และ Kannan et al., 2008) โดยในที่นี้จะเรียกเปปไทด์ที่ได้ในส่วนนี้ว่า “crude peptide”

ทำการทดสอบที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลองของมนุษย์ เริ่มจากเตรียมของเหลวที่จำลองสภาวะที่อยู่บริเวณกระเพาะอาหารของมนุษย์ (Kannan et al., 2008) ซึ่งประกอบด้วยน้ำกลั่นประมาณ 90 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.2 กรัม และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 37 จำนวน 0.7 กรัม ผสมของเหลวให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที นำมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ย้ายของเหลวผสมที่เป็นเนื้อเดียวกันดังกล่าวลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นปรับให้ได้ pH 2.0 แล้วเติมเอนไซม์เปปซิน 0.32 กรัม แล้วจึงเติม crude peptide จำนวน 5 กรัม นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดกิจกรรมของเอนไซม์โดยปรับ pH ให้เป็น 7.2 แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง บรรจุในถุงซิปล็อก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากนั้นทดสอบที่สภาวะลำไส้จำลองของมนุษย์ โดยการเตรียมของเหลวที่ประกอบด้วยน้ำกลั่นประมาณ 90 มิลลิลิตร โพตัสเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิก 0.68 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.2 นอร์มัล ปริมาตร 7.7 มิลลิลิตร ผสมของเหลวให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเติม crude peptide ที่ผ่านทดสอบที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลอง จำนวน 5 กรัม และเติมเอนไซม์แพนক্রีเอตินร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนให้เข้ากัน เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนของเหลวให้สม่ำเสมอเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดกิจกรรมของเอนไซม์โดยนำส่วนผสมดังกล่าวไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึง

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง บรรจุเปปไทด์ที่ได้ในถุงซิปล็อก เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Kannan et al., 2008) ในที่นี้ เปปไทด์ที่ได้ในส่วนนี้จะเรียกว่า “resistant peptide”

3. การวัดระดับการย่อยของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว

นำตัวอย่าง protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide มาทำการวัดระดับการย่อยตามวิธี TNBS (Adler-Nissen, 1979) ซึ่งเป็นวิธีการวัดปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาของตัวอย่าง โดยการทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid ดังนี้คือ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2125 โมลาร์ pH 8.2 จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย TNBS เข้มข้น ร้อยละ 0.05 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยากด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 2 มิลลิลิตรทันที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาของตัวอย่างต่อน้ำหนักโปรตีนที่มีในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของลิวซีน (leucine) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ตามวิธีการในภาคผนวก ก)

4. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว

ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.3.2 และ 1.3.3 ตามลำดับ

5. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์ HepG2 ของ resistant peptide จากรำข้าว

ความสามารถในการยับยั้งเซลล์ HepG2 (เซลล์มะเร็งตับ) ของ resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิล ตามวิธีการของ Thirabunyanon and Hongwittayakorn, 2013 ในการทดลองนี้ใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบในหลอดทดสอบ (*in vitro* test) โดย

ใช้สารละลาย MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) เป็นสารทดสอบปริมาณของเซลล์มีชีวิต ดังนี้ คือ

5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับในอาหารสูตร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) ที่มี fetal calf serum ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ยาปฏิชีวนะ penicillin streptomycin ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ยาปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ non-essential amino acid ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

เมื่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) โตเต็มที่และมีจำนวนเพียงพอแล้ว นำเซลล์มะเร็งมานับจำนวนเซลล์โดยสไลด์นับจำนวนเซลล์ (haemocytometer) ภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์ ปรับความเข้มข้นของสารละลายที่มีเซลล์ให้ได้ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์มา 100 ไมโครลิตร หยดลงในถาดหลุมขนาด 96 หลุมต่อถาด บ่มในตู้บ่มเลี้ยงที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์มะเร็งได้ปรับสภาพ จากนั้นเติมสารละลาย resistant peptide ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ที่ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มต่อในตู้บ่มเลี้ยงที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเติมสารละลาย MTT (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO) 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่อ นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มต่ออีก 5 นาที แล้วจึงนำมาตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท นำจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต และจำนวนเซลล์เริ่มต้นมาคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์ ดังสมการ

$$\text{ร้อยละของการมีชีวิตรอด} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} - \text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มเทียบสี}}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม}} \times 100$$

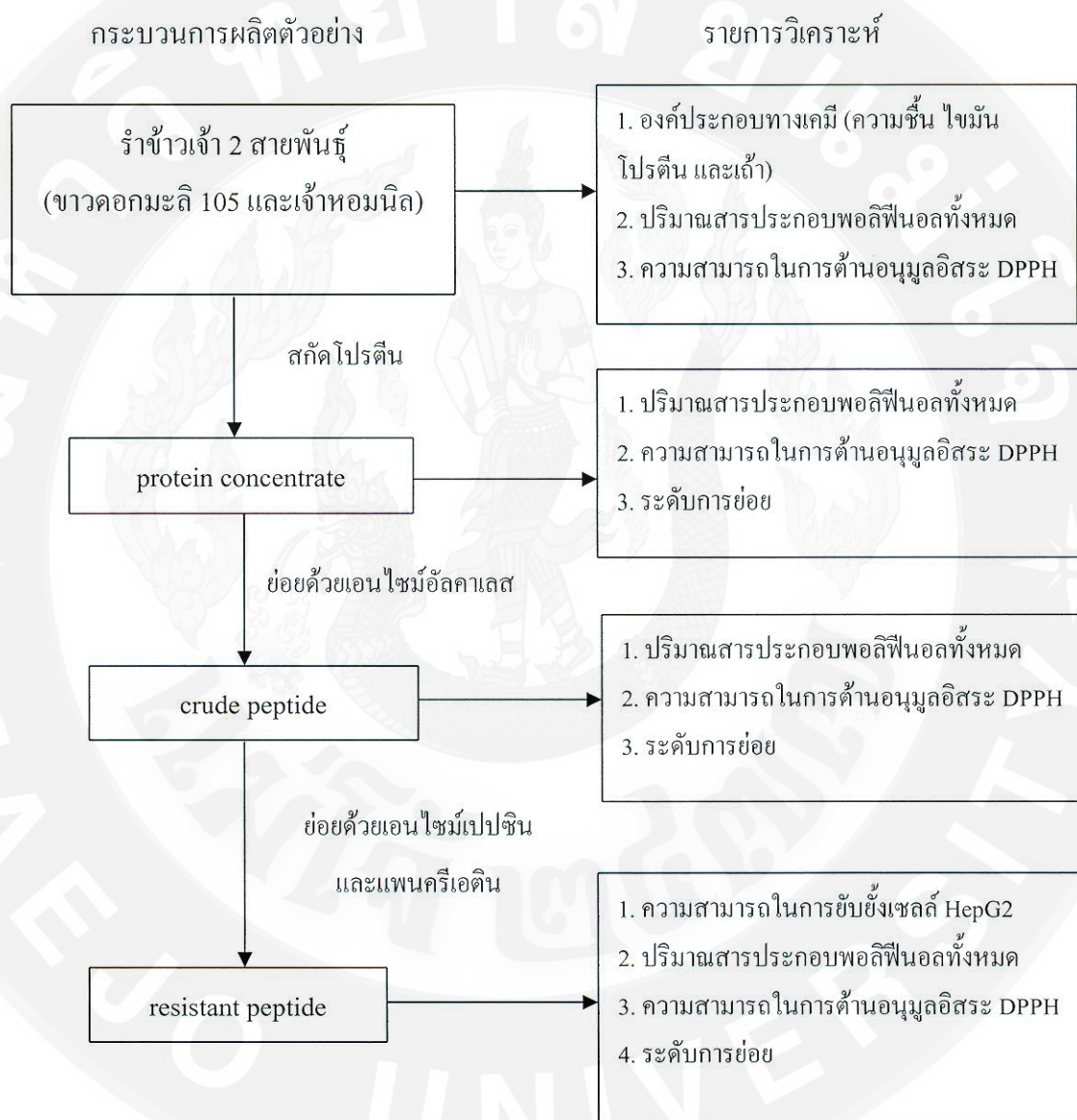
โดย - ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีเซลล์ที่บ่มกับ resistant peptide

- ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเทียบสี คือค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่บ่มกับ resistant peptide

- ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีเซลล์

ร้อยละของการยับยั้งการเจริญ = $100 - \text{ร้อยละของการมีชีวิตรอด}$

จากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง รวมถึงการวิเคราะห์ต่างๆ ของตัวอย่าง สามารถสรุปเป็นแผนภาพ ได้ดังนี้



ภาพ 14 แผนภาพโดยรวมของงานวิจัย

การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Ranges Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (SPSS) รุ่น 16

สถานที่ทำการทดลอง

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

การหาองค์ประกอบทางเคมีเป็นสิ่งสำคัญในการใช้ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณขององค์ประกอบที่สนใจที่มีอยู่ในวัตถุดิบ ผลขององค์ประกอบทางเคมีพบว่าในตัวอย่างรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิลมีปริมาณความชื้นและไขมันไม่แตกต่างกัน โดยรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความชื้นและไขมันร้อยละ 11.35 ± 0.06 และ 17.40 ± 0.68 ตามลำดับ ส่วนรำข้าวเจ้าหอมนิลมีความชื้น และไขมันร้อยละ 11.24 ± 0.58 และ 18.86 ± 0.62 ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนและเถ้าแตกต่างกัน โดยพบว่าในรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณโปรตีนมากกว่าและมีปริมาณเถ้าน้อยกว่ารำข้าวเจ้าหอมนิล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กล่าวคือ ในตัวอย่างรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่ามีปริมาณโปรตีนและเถ้าร้อยละ 11.97 ± 0.17 และ 4.95 ± 0.03 ตามลำดับ ส่วนในรำข้าวเจ้าหอมนิลพบว่ามีปริมาณโปรตีนและเถ้าร้อยละ 13.88 ± 0.30 และ 4.60 ± 0.03 ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ของรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล

องค์ประกอบทางเคมี	รำข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ร้อยละ)	รำข้าวเจ้าหอมนิล (ร้อยละ)
ความชื้น ^{ns}	11.35 ± 0.06	11.24 ± 0.58
ไขมัน ^{ns}	17.40 ± 0.68	18.86 ± 0.62
โปรตีน	11.97 ± 0.17^a	13.88 ± 0.30^b
เถ้า	4.95 ± 0.03^a	4.60 ± 0.03^b

หมายเหตุ ^{a, b} แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างแถว ($P < 0.05$)

^{ns} แสดงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

รายงานการวิจัยของ Sirikul et al. (2009) พบว่าข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เก็บเกี่ยวจากจังหวัดสุรินทร์ ในประเทศไทย ที่ปลูกแบบดั้งเดิมเปรียบเทียบกับปลูกแบบอินทรีย์ โดยข้าวที่ได้จากการปลูกแบบดั้งเดิมมีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใย และเถ้า ร้อยละ 9.99, 11.01, 15.17, 16.4 และ 13.28 ตามลำดับ ส่วนข้าวที่ปลูกแบบอินทรีย์มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใย และเถ้า ร้อยละ 9.85, 11.77, 14.92, 19.95 และ 16.63 ตามลำดับ ซึ่งหากเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในงานวิจัยนี้กับข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ทั้งปลูกแบบดั้งเดิมและปลูกแบบอินทรีย์ พบว่ามีปริมาณความชื้นต่างกันเล็กน้อย โดยข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ศึกษา มีปริมาณความชื้นมากกว่าข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ทั้งปลูกแบบดั้งเดิมและปลูกแบบอินทรีย์ประมาณ เพียงประมาณร้อยละ 1 ส่วนปริมาณโปรตีน พบว่ามีค่าเท่ากัน คือร้อยละ 11 สำหรับปริมาณไขมัน พบว่าข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในงานวิจัยนี้มีปริมาณไขมันมากกว่าข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกแบบดั้งเดิมและปลูกแบบอินทรีย์ ประมาณร้อยละ 2 ส่วนปริมาณเถ้าของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณเถ้าน้อยกว่าข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกแบบดั้งเดิม ประมาณร้อยละ 8 และน้อยกว่าข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกแบบอินทรีย์ ประมาณร้อยละ 11 อย่างไรก็ตาม ปริมาณเถ้าที่แตกต่างกันนี้ ขึ้นอยู่กับระดับการขัดสี (Puri et al., 2014)

นอกจากนี้ยังมีรายงานจาก Moongngarm et al. (2012) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของข้าว ที่ซื้อได้จากโรงสีข้าวท้องถิ่นภายในจังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย พบว่าข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 มีไขมัน โปรตีน และเถ้า ร้อยละ 18.80 13.66 และ 10.65 ส่วนข้าวแดง (red rice) มีไขมัน โปรตีน และเถ้า ร้อยละ 17.32, 12.93 และ 11.41 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่วิเคราะห์ได้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากงานวิจัยของ Moongngarm et al. (2012) พบว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีร้อยละของโปรตีน ไขมัน และเถ้ามากกว่าเล็กน้อย แต่หากเปรียบเทียบระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวแดง พบว่าข้าวเจ้าหอมนิลมีปริมาณโปรตีนและไขมันมากกว่าประมาณร้อยละ 1 แต่มีปริมาณเถ้าน้อยกว่าประมาณร้อยละ 7 ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน และไขมัน ในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มีปริมาณใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 จากงานวิจัยอื่น

การหาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างข้าว เพื่อตรวจสอบปริมาณส่วนประกอบทางเคมีชนิดต่างๆ ในตัวอย่าง ดังเช่นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำโปรตีนที่มีในข้าวมาทำการผลิตเป็นเปปไทด์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทราบปริมาณโปรตีนที่มีในข้าวว่ามีมากน้อยเพียงใด เพียงพอต่อการสกัดหรือคุ้มค่าแก่การผลิตหรือไม่ เพราะจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับปริมาณผลผลิตที่จะ

ได้ ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีอยู่ในรำข้าว เช่น ไขมันที่มีในรำข้าว จากการหาปริมาณไขมันที่มีรำข้าวพบว่าไขมันเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีในรำข้าว กล่าวคือ มีปริมาณมากกว่าโปรตีนที่ต้องการสกัด (Sirikul et al., 2009; Moongngarm et al., 2012) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องสกัดไขมันออกเพื่อให้โปรตีนที่สกัดได้มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น (ลิ้นา, 2556) อย่างไรก็ตาม การที่องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวมีค่าแตกต่างกันนั้นเกิดจากหลายปัจจัย อาทิเช่น สภาพแวดล้อมในการปลูก สายพันธุ์ รวมไปถึงในเรื่องของการจัดสีก็เป็นผลทำให้องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวต่างกันได้ (อรอนงค์, 2547)

2. สารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของรำข้าว

สารประกอบพอลิฟีนอลมีศักยภาพในการต้านออกซิเดชัน จากการศึกษาพบว่า ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดของรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิล มีค่าเท่ากับ 26.38 ± 1.00 และ 52.54 ± 1.16 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดรำข้าว ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดของรำข้าวเจ้าหอมนิล มีค่ามากกว่ารำข้าวขาวดอกมะลิ 105 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดของรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล

ตัวอย่าง	สารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดรำข้าว)
รำข้าวขาวดอกมะลิ 105	26.38 ± 1.00^a
รำข้าวเจ้าหอมนิล	52.54 ± 1.16^b

หมายเหตุ ^{a, b} แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างคอลัมน์ ($P < 0.05$)

จากผลของปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดของรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล สอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH กล่าวคือ พบว่า รำข้าวเจ้าหอมนิลมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากกว่ารำข้าวขาวดอกมะลิ 105 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งจากการศึกษาได้เปรียบเทียบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

ของรำข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ารำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีร้อยละของความสามารถในการต้านออกซิเดชันเท่ากับ ร้อยละ 17.25 ± 0.12 , 33.91 ± 0.10 , 47.64 ± 0.20 , 60.96 ± 0.43 และ 67.11 ± 0.29 ตามลำดับ ส่วนรำข้าวเจ้าหอมนิล มีค่าร้อยละ 51.69 ± 0.22 , 80.64 ± 0.18 , 85.79 ± 0.06 , 84.77 ± 0.21 และ 83.13 ± 0.06 ตามลำดับ พบว่า รำข้าวเจ้าหอมนิลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่ารำข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ทุกระดับความเข้มข้นของการวิเคราะห์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของตัวอย่างขึ้น พบว่ามีแนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากขึ้น ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล

ความเข้มข้นของตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละ)	
	รำข้าวขาวดอกมะลิ 105	รำข้าวเจ้าหอมนิล
2	17.25 ± 0.12^a	51.69 ± 0.22^b
4	33.91 ± 0.10^a	80.64 ± 0.18^b
6	47.64 ± 0.20^a	85.79 ± 0.06^b
8	60.96 ± 0.43^a	84.77 ± 0.21^b
10	67.11 ± 0.29^a	83.13 ± 0.06^b

หมายเหตุ ^{a, b} แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างแถว ($P < 0.05$)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดรำข้าวโดยใช้เมทานอลเป็นตัวสกัดนั้น เพื่อเป็นการแสดงให้เห็นว่าในรำข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปนั้นมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพอยู่ และเนื่องด้วยรำข้าวมีลักษณะโครงสร้างที่มีความซับซ้อน (matrix) การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ทั้งนี้เนื่องจากฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่มีขั้วมาก ละลายได้ดีในเมทานอล จึงใช้เมทานอลในการสกัด จากงานวิจัยของ Lai et al. (2009) ศึกษาตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเฮกเซนในการสกัดรำข้าวเพื่อ

เปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของรำข้าวสายพันธุ์ *Japonica* พบว่าเมทานอล เอทานอล และเฮกเซน มีค่าความมีขั้ว Synder (Synder's polarity value) เท่ากับ 5.1, 4.4 และ 0.1 ตามลำดับ เป็นเหตุให้ฟีนอลิกสามารถละลายได้ดีในเมทานอล จึงทำการสกัดฟีนอลิกได้มากกว่าเอทานอลและเฮกเซนในสภาวะการสกัดเดียวกัน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3. ระดับการย่อยของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว

การวิเคราะห์ระดับในการย่อยสลายของ crude peptide และ resistant peptide เทียบกับ protein concentrate โดยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid method จากข้อมูลที่ได้ พบว่า ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ มีค่าเท่ากับ 0.58 ± 0.26 , 19.03 ± 0.47 และ 53.95 ± 1.42 กรัมต่อ 100 กรัม โปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิลมีค่าเท่ากับ 0.69 ± 0.12 , 8.25 ± 0.34 และ 24.08 ± 0.49 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 6 โดยพบว่าปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาของ protein concentrate จากรำข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตาราง 6 ระดับการย่อยของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว

ตัวอย่าง	กรดอะมิโนชนิดแอลฟา (กรัม ต่อ 100 กรัมโปรตีน)	
	ขาวดอกมะลิ 105	เจ้าหอมนิล
protein concentrate	$0.58 \pm 0.26^{ns,c}$	$0.69 \pm 0.12^{ns,c}$
crude peptide	$19.03 \pm 0.47^{A,b}$	$8.25 \pm 0.34^{B,b}$
resistant peptide	$53.95 \pm 1.42^{A,a}$	$24.08 \pm 0.49^{B,a}$

หมายเหตุ ^{A, B} แสดงความแตกต่างระหว่างแถว ($P < 0.05$)

^{a, b, c} แสดงความแตกต่างระหว่างคอลัมน์ ($P < 0.05$)

^{ns} แสดงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การตรวจสอบระดับการย่อยสลายของโปรตีน มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาระหว่างก่อนย่อยและหลังย่อย ทำให้ทราบได้ว่าตัวอย่างถูกย่อยได้มากน้อยเพียงใด จากผลการทดลอง พบว่า crude peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และของรำข้าวเจ้าหอมนิลที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่ากรดอะมิโนชนิดแอลฟาเพิ่มขึ้นเป็น 32.81 และ 11.97 เท่า จาก protein concentrate ตามลำดับ และหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์จากระบบทางเดินอาหาร กรดอะมิโนชนิดแอลฟาเพิ่มมากขึ้นเป็น 93.02 และ 34.90 เท่า จาก protein concentrate ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า protein concentrate หรือ crude peptide สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการย่อย สังเกตได้จากการมีค่ากรดอะมิโนชนิดแอลฟาเพิ่มมากขึ้นในแต่ละขั้นตอนการย่อย และพบว่าตัวอย่างจากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถถูกย่อยได้ดีกว่าตัวอย่างจากรำข้าวเจ้าหอมนิล ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของโปรตีนในรำข้าวทั้งสองชนิดแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาจะคำนวณในฐานน้ำหนักโปรตีนที่มีในตัวอย่าง โดยปริมาณโปรตีนในตัวอย่างหาได้จากวิธี Lowry ซึ่งปริมาณโปรตีนของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ มีค่าเท่ากับ 41.40 ± 0.79 , 43.39 ± 0.29 และ 25.53 ± 0.58 กรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ส่วน protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิล มีค่าเท่ากับ 69.11 ± 0.58 , 76.25 ± 0.00 และ 51.61 ± 0.07 กรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ (แสดงค่าในตารางผนวก 1)

ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wiriyaphan et al. (2015) ที่ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟา ด้วยวิธี TNBS ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากชูริมิที่ได้จากเศษเหลือของปลาทรายแดง (โครงปลา กระดูก และหนังปลา) โดยใช้เอนไซม์ *Virgibacillus* sp. SK33 proteinase ในการย่อย และนำไปย่อยที่ระบบทางเดินอาหารจำลอง ซึ่งใช้เอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์แพนครีเอติน ตามลำดับ พบว่าปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเพียงอย่างเดียวมีปริมาณน้อยกว่าตัวอย่างที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์แพนครีเอติน ซึ่งคล้ายกับการศึกษาที่นำ protein concentrate จากรำข้าวไปย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสให้ได้เป็น crude peptide แล้วนำ crude peptide ที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและแพนครีเอตินเพื่อให้ทนต่อสภาวะทางเดินอาหารจำลองมนุษย์ ซึ่งพบว่าตัวอย่างถูกย่อยได้ค่อนข้างมากเช่นกัน สังเกตจากปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาที่เพิ่มขึ้น (ตาราง 6)

จากรายงานวิจัยปัจจุบันได้ชี้ให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมีสมบัติการเป็นเปปไทด์ชีวภาพดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า ดังงานวิจัยของ Umayaparvathi et al. (2014) ที่ได้ทำการผลิตเปปไทด์จากหอยนางรม (*Saccostrea cucullata*) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดย gel filtration chromatography (GFC) และ ultra performance liquid chromatography (UPLC)

ผลการศึกษา พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กสามารถต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่า กล่าวคือ เปปไทด์จากหอยนางรมที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ได้ทำการแยกขนาดโมเลกุลเป็นลำดับส่วนต่างๆ ได้แก่ 515.29, 1145.75 และ 1432.89 ดาลตัน มีความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชันได้ร้อยละ 83.79, 76.62 และ 75.48 ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kannan et al. (2008) ที่ทำการผลิตเปปไทด์ที่ทนต่อระบบทางเดินอาหารจำลองของมนุษย์จากโปรตีนรำข้าวปราศจากไขมัน โดยทำการแยกเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ <5, 5-10, 10-50 และ >50 กิโลดาลตัน แล้วนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) โดยวิธีการย้อมเซลล์ด้วย trypan blue พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล 5-10 และ <5 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ร้อยละ 80 และเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล <5 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ประมาณร้อยละ 50 ซึ่งเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็กจะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่า ดังนั้นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กที่ได้จากงานวิจัยนี้ อาจจะมีสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าโปรตีน โมเลกุลที่ใหญ่กว่า

4. เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด พบว่า protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide ที่ได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 1.96 ± 0.03 , 23.15 ± 0.73 และ 21.57 ± 0.57 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดรำข้าว ตามลำดับ ส่วน protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide ที่ได้จากรำข้าวเจ้าหอมนิลมีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 5.05 ± 0.10 , 82.39 ± 0.79 และ 69.73 ± 1.53 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดรำข้าว ตามลำดับ (ตาราง 7) ส่วนผลของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของตัวอย่าง เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเท่ากับร้อยละ 1.95 ± 0.23 , 6.45 ± 0.2 และ 6.30 ± 0.45 ตามลำดับ ในขณะที่ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวเจ้าหอมนิล มีค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเท่ากับร้อยละ 8.83 ± 0.43 , 65.45 ± 0.15 และ 39.81 ± 0.45 ตามลำดับ ดังตาราง 7

ตาราง 7 ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าว

ตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลยักรดแกลลิก ต่อกรัมสารสกัดรำข้าว)		ความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละ)	
	ข้าวดอกมะลิ 105	เจ้าหอมนิล	ข้าวดอกมะลิ 105	เจ้าหอมนิล
protein concentrate	$1.96 \pm 0.03^{A,c}$	$5.05 \pm 0.10^{B,c}$	$1.95 \pm 0.23^{A,b}$	$8.83 \pm 0.43^{B,c}$
crude peptide	$23.15 \pm 0.73^{A,a}$	$82.39 \pm 0.79^{B,a}$	$6.45 \pm 0.21^{A,a}$	$65.45 \pm 0.15^{B,a}$
resistant peptide	$21.57 \pm 0.57^{A,b}$	$69.73 \pm 1.53^{B,b}$	$6.30 \pm 0.45^{A,a}$	$39.81 \pm 0.45^{B,b}$

หมายเหตุ A, B แสดงความแตกต่างระหว่างแถว ($P < 0.05$)
 a, b, c แสดงความแตกต่างระหว่างคอลัมน์ ($P < 0.05$)

จะเห็นว่าทุกตัวอย่างที่สกัดได้จากรำข้าวเจ้าหอมนิลมีสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่าตัวอย่างที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ที่พบว่ารำข้าวที่มีสีจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดีกว่ารำข้าวที่ไม่มีสี เนื่องจากรำข้าวที่มีสีจะมีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลมากกว่ารำข้าวที่ไม่มีสี โดยเฉพาะฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน (Goufo and Trindade, 2014) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ นิพัทธา และ วรพิสัย (2553) ที่พบว่าสารสกัดจากกลุ่มข้าวที่มีสีมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแอนโทไซยานินสูงกว่าสารสกัดจากกลุ่มข้าวที่ไม่มีสี และพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณแอนโทไซยานิน ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.845 แสดงให้เห็นว่าหากมีปริมาณฟีนอลิกมากก็จะพบว่ามีแอนโทไซยานินมากตามไปด้วย ซึ่งแอนโทไซยานินก็จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิฟีนอลด้วยเช่นกัน โดยจะมีหมู่ฟีนอลเพียงกลุ่มเดียวอยู่ในรูปของไกลโคไซด์ (glycoside) เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง และมีกรดฟีนอลิกเป็นสารตั้งต้น โดยสารในกลุ่มนี้สามารถจับกับไอออนของโลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ทำให้ไอออนของโลหะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้ แต่ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลและการจัดเรียงตัวของโครงสร้าง โดยสามารถจับกับอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิลและเปอร์ไฮดรอกซิล และจับกับโลหะ

เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้ เป็นที่ทราบกันดีว่าแอนโทไซยานินเป็นสารเม็ดสี ส่วนใหญ่เป็นสารที่ให้สีแดง น้ำเงิน หรือม่วง พบมากในส่วนที่เป็นกระเปาะภายในเนื้อเยื่อส่วนดอกและส่วนผล

สำหรับ protein concentrate จากรำข้าวที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้นั้นสามารถอธิบายได้จากงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าโปรตีนสามารถยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันได้โดยเอนไซม์ และการที่โปรตีนจับกับอนุมูลโลหะซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดออกซิเดชัน จึงยับยั้งอนุมูลอิสระในกลุ่มออกซิเจนได้ รวมไปถึงโดยกระบวนการที่ไม่เฉพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันทั้งหมดของโปรตีนเพิ่มขึ้นได้โดยการทำลายโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนดังกล่าวซึ่งจะเป็นการเพิ่มการเข้าถึงกรดอะมิโนที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระและรวมตัวกับโลหะซึ่งเป็นตัวตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนมีแนวโน้มในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้มากกว่าโปรตีนที่สมบูรณ์ (intact proteins) (Elias et al., 2008) ดังเช่นในงานวิจัยของ Sakanaka et al. (2004) ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสได้จากไข่แดงสามารถยับยั้งออกซิเดชันได้มากกว่าโปรตีนที่ยังไม่ได้ผ่านการย่อย

ซึ่งสัมพันธ์กับงานวิจัยนี้ที่พบว่า crude peptide ที่ได้จากการย่อยโปรตีนรำข้าวมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่า protein concentrate จากรำข้าว ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนรำข้าวโดยเอนไซม์อัลคาเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะภายในสายพอลิเปปไทด์ (endopeptidase) (Shetty, 2006) ทำให้ได้เป็นเปปไทด์สายสั้นลงจึงมีหมู่อะมิโนและหมู่ฟังก์ชันมากกว่าโปรตีนที่เป็นโมเลกุลใหญ่ ทำให้มีสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดีกว่า (Sarmadi and Ismail, 2010) ซึ่งจากรายงานของ Elias et al. (2008) พบว่าสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นเมื่อถูกทำลายโครงสร้างระดับตติยภูมิของโปรตีนทำให้สามารถละลายในตัวทำละลายได้ง่ายขึ้น ดังนั้นเปปไทด์จึงละลายน้ำได้มากกว่าโปรตีน กรดอะมิโนจึงถูกปลดปล่อยออกมาและสามารถจับกับอนุมูลอิสระและจับกับเหล็ก ซึ่งมีสมบัติเป็นโปรออกซิเดทีฟได้อีกด้วย นอกจากนี้ส่วนของกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic) สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลที่ขาดอิเล็กตรอนทำให้ครบคู่จึงเกิดความเสถียร อีกทั้งเอนไซม์จะทำลายผนังเซลล์ จึงอาจทำให้โปรตีนรั่วออกมาพร้อมกับสารประกอบพอลิฟีนอลในรูปแบบสารประกอบเชิงซ้อน (Li et al., 2006) อย่างไรก็ตามสมบัติการต้านออกซิเดชันของเปปไทด์มีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับองค์ประกอบทางเคมี โครงสร้าง และความสามารถในการละลาย (Sarmadi and Ismail, 2010) ดังจะเห็นได้จากการทดลองนี้ที่พบว่า crude peptide ที่ได้จากรำข้าวทั้งสองสายพันธุ์จะมีสารประกอบพอลิฟีนอลสูงกว่า protein concentrate ซึ่งสารประกอบพอลิฟีนอลจะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ สามารถละลายน้ำได้โดยทั่วไปมักพบรวมกับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (จารนัย และคณะ,

2007) กลไกการต้านออกซิเดชันของ DPPH ของสารประกอบพอลิฟีนอลเกิดจากการให้อิเล็กตรอนอิสระแก่อนุมูล DPPH ทำให้ไม่ใช่อนุมูลอิสระอีกต่อไป ในขั้นนี้ก็จะเกิดอนุมูลฟีนอกซี (phenoxy radical) ที่จะไปจับกันเอง ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (รวิวรรณ และ ทรงพร, 2549) ดังนั้นปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมดจึงมีความสัมพันธ์กับการต้านออกซิเดชัน

แต่ทั้งนี้เนื่องจากผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า resistant peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิลมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้น้อยกว่า crude peptide ทั้งที่ resistant peptide ได้ถูกนำไปย่อยด้วยเอนไซม์จากระบบทางเดินอาหารจำลอง อันได้แก่ เอนไซม์เปปซิน และแพนกรีเอติน จึงควรมีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า crude peptide (Wiriyaphan et al., 2015) ซึ่งควรมีสสมบัติการต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า crude peptide อย่างไรก็ดีตาม แม้ว่าจะมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมีสมบัติการเป็นเปปไทด์ชีวภาพดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า แต่ก็ยังมีบางงานวิจัยที่พบว่าขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่ายับยั้งออกซิเดชันได้มากกว่า ดังเช่นในงานวิจัยของ Sun et al. (2011) ที่ได้ทำการผลิตไฮโดรไลเสตจากฮีโมโกลบินของสุกร โดยเปรียบเทียบสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสตดังกล่าวจากการใช้เอนไซม์ในการย่อยที่แตกต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ ฟลาโวไซม์ ปาเปน A.S.1398 อัลคาเลส เปปซิน และทริปซิน ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อย กับความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชัน กล่าวคือ เมื่อทำการย่อยที่ระยะเวลาเวลาที่เท่ากัน คือ 8 ชม. พบว่าไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีระดับการย่อยที่สูงที่สุด ถัดมา คือ เปปซิน แต่ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันกลับพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากเปปซินต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรไลเสตที่ย่อยได้จากเอนไซม์ชนิดอื่นๆ และเมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเปปซินไปคัดแยกขนาดโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิเตรชันโครมาโตกราฟี พบว่าได้ส่วนของขนาดโมเลกุลทั้งหมด 4 ขนาด ได้แก่ <3, 3-5, 5-10 และ >10 กิโลดาลตัน แล้วนำแต่ละลำดับส่วนไปทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน พบว่าลำดับส่วนที่มีขนาดโมเลกุล <3 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นลำดับส่วนที่มีขนาดเล็กที่สุด ยับยั้งได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม กลับพบว่าลำดับส่วนที่มีขนาดโมเลกุล >10 กลับมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากกว่าลำดับส่วนที่มีขนาดโมเลกุล 3-5 และ 5-10 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า นอกจากขนาดของเปปไทด์จะมีผลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันอีก เช่น ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอล ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบ และการเรียงลำดับของกรดอะมิโนในสายโซ่เปปไทด์ เป็นต้น กรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของสายโซ่เปปไทด์ก็มีความสำคัญในการต้านออกซิเดชัน เช่น ไตรเปปไทด์ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดฮิสติดีน หรือไทโรซีน กับ

ไทรเปปไทด์ที่มีไทโรซีน เป็นองค์ประกอบอยู่สองหน่วยมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันได้ดีกว่าไทรเปปไทด์ที่มีฮิสติดีนประกอบอยู่สองหน่วย ดังนั้น Tyr-His-Tyr จึงมีสมบัติในการทำงานร่วมกับฟีนอลิกในการต้านออกซิเดชันได้มาก (synergistic effect) ยิ่งไปกว่านั้น ไทรเปปไทด์ที่มีทริปโตเฟน หรือไทโรซีน เป็นส่วนประกอบที่ปลาย C ของโครงสร้างจะสามารถจับกับอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี แต่หากประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็น phosphorelated hydroxyl ได้แก่ ทรีโอนีน และหมู่คาร์บอกซิล ได้แก่ กรดกลูตามิก และกรดแอสพาร์ติก จะสามารถจับกับไอออนของเหล็กได้ เนื่องจากการส่งผ่านของไอออนเหล็ก จะส่งเสริมให้เกิดการสลายตัว lipid hydroperoxide และเหล็กจะไปจับกับเปปไทด์ จึงยับยั้งขั้นตอน propagation ของปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ (Mine et al., 2010) และนอกจากนี้ กลุ่มฟีนอลที่แยกออกจากปลายสายโซ่เปปไทด์จะไปจับกับอนุมูลอิสระทำให้เป็นการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอได้ (Sun et al., 2011)

5. ความสามารถของ resistant peptide ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

โรคมะเร็งเกิดจากการที่เซลล์สูญเสียหน้าที่ปกติไป ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและเจริญเติบโตผิดปกติ จากการทดสอบความสามารถของ resistant peptide ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) พบว่า resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวสาลีพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิลที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดย resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับร้อยละ 70.63 ± 8.74 ส่วน resistant peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิลสามารถยับยั้งได้ร้อยละ 70.51 ± 11.38 ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของทั้ง resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ crude peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิล สามารถยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้ โดยพบว่าตัวอย่าง resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้มากกว่า resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวเจ้าหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ร้อยละ 73.02 ± 1.54 , 88.73 ± 2.19 และ 91.12 ± 1.80 ตามลำดับ ส่วน resistant peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิลยับยั้งได้ร้อยละ 70.56 ± 11.24 , 83.42 ± 8.05 และ 88.90 ± 1.81 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของตัวอย่าง พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังตาราง 8

ตาราง 8 ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับโดย resistant peptide จากรำข้าว

resistant peptide	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)			
	75 ^{ns}	125	250	500
รำข้าวขาวดอกมะลิ 105	70.63 ± 8.74	73.02 ± 1.54 ^a	88.73 ± 2.19 ^a	91.12 ± 1.80 ^a
รำข้าวเจ้าหอมนิล	70.51 ± 11.38	70.56 ± 11.24 ^b	83.42 ± 8.05 ^b	88.90 ± 1.81 ^b

หมายเหตุ ^{a, b} แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างคอลัมน์ ($P < 0.05$)
^{ns} แสดงถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Kannan et al. (2008) พบว่า resistant peptide จากรำข้าวที่มีขนาด <5 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้ประมาณร้อยละ 70 และ 80 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างควบคุมใช้น้ำเกลือแทนตัวอย่าง พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้และเซลล์มะเร็งตับได้เพียงร้อยละ 0 นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Kannan et al. (2010) ยังพบว่า resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าว มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2, HCT-116) ได้ร้อยละ 84 ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7, MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้ร้อยละ 84 และ 80 ตามลำดับ โดยเมื่อทำการหาลำดับของกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดังกล่าวแล้วพบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้ คือ Glu-Gln-Arg-Pro-Arg ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kannan et al. (2008) และ Kannan et al. (2010) เพราะพบว่า resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้มากกว่าร้อยละ 80 เช่นกัน

สำหรับสาเหตุที่ resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเซลล์มะเร็งตับได้ดีกว่า resistant peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิล นั้น อาจเนื่องจากรำข้าวขาวดอกมะลิมีระดับการย่อยสูงกว่า (ตามผลการทดลองในตาราง 6) ทำให้เปปไทด์มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า ซึ่งส่งผลให้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ดีกว่า (Umayaparvathi et al., 2014; Kannan et al. 2008)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการทดลอง

1. รำข้าวเจ้าหอมนิลมีปริมาณโปรตีนและเถ้ามากกว่ารำข้าวขาวดอกมะลิ 105 แต่ปริมาณความชื้นและไขมันของรำข้าวขาวดอกมะลิและรำข้าวเจ้าหอมนิลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
2. rice bran extract, protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวเจ้าหอมนิลมีสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่า rice bran extract, protein concentrate, crude peptide และ resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ
3. crude peptide จากรำข้าวเจ้าหอมนิล มีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่า resistant peptide และ protein concentrate ตามลำดับ ส่วน crude peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่า protein concentrate แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่าง crude peptide และ resistant peptide
4. ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอลฟาของ crude peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิลหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 32.81 และ 11.97 เท่า จาก protein concentrate ตามลำดับ และหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์จากระบบทางเดินอาหาร เพิ่มขึ้นเป็น 93.02 และ 34.90 เท่า จาก protein concentrate ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ารำข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ถูกย่อยได้มากกว่ารำข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และเปปไทด์ถูกย่อยได้เพิ่มขึ้นหลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารจำลอง
5. resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้มากกว่า resistant peptide ที่สกัดได้จากรำข้าวเจ้าหอมนิลที่ทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง ยกเว้นที่ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ข้อเสนอแนะ

1. แม้ว่า resistant peptide ที่สกัดได้โดยรำข้าว 2 สายพันธุ์นี้จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดีก็ตาม แต่เพื่อความชัดเจนในการอธิบายถึงกระบวนการการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและต้านออกซิเดชัน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการหาลำดับกรดอะมิโนในสายโซ่เปปไทด์ ซึ่งจะทำให้ทราบถึงขนาดและองค์ประกอบของเปปไทด์ เนื่องจากกรดอะมิโนแต่ละตัวมีสมบัติทางชีวภาพที่แตกต่างกัน และอาจทำการทดลองการวิเคราะห์การตายของเซลล์มะเร็งในกระบวนการอะพอพโทซิส ซึ่งจะสามารถอธิบายได้ว่าเซลล์มะเร็งตายในรูปแบบใด

2. เปปไทด์ชีวภาพที่ได้จากการย่อยโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงจะช่วยลดการแพ้ในผู้ป่วยที่แพ้โปรตีน (Moure et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตาม ก่อนการสารสกัดเหล่านี้ไปใช้จริงไม่ว่าจะเป็นการเติมลงไปเป็นส่วนประกอบหนึ่งของอาหารฟังก์ชันหรือการผลิตในรูปแบบอาหารเสริม (neutraceutical) ควรมีการตรวจสอบความปลอดภัยต่อผู้บริโภคก่อน เช่น ทดสอบการแพ้ (allergenic properties) หรือทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (cytotoxic effects) และควรทดสอบระดับของการใช้ต่อวันว่าร่างกายควรได้รับในปริมาณเท่าไรจึงจะได้รับประโยชน์สูงสุด

3. หากใช้เปปไทด์ชีวภาพที่สกัดได้จากรำข้าวนี้ในการเป็นอาหารฟังก์ชัน ซึ่งหมายถึงการเติมเปปไทด์ดังกล่าวนี้ลงไปในการเพิ่มคุณค่าของอาหารนั้นๆ ต่อร่างกาย ควรมีการตรวจสอบปริมาณที่ใช้ว่ามีผลกระทบต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารหรือไม่ รวมไปถึงความคงตัวของเปปไทด์ต่อกระบวนการแปรรูป และการเก็บรักษา

บรรณานุกรม

- กรมการข้าว. 2553. **ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวรับรองของไทย**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.brrd.in.th/rvdb/> (19 มกราคม 2558).
- กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553. **แอนโทไซยานิน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR21.pdf> (25 มกราคม 2558).
- กิตติศักดิ์ พุทธรชาติ. 2554. **การสร้างเซลล์เบสรีพอร์ตเตอร์ยีนสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนแมทรอกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-3 ในเซลล์อิวแมนคอนโดโรมา (SW1353)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 199 น.
- จรรย์ พณิชกุลวิเชียร ลีลาวัชรมาศ เพ็ญพร พงษ์พรรณเจริญ รัตนันท์ พรรณนา รุโนทัย นฤมร วิมลเกษม และวิมลรัตน์ สุกกิกิจกาญจนา. 2007. **สารพันความรู้เกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพและความงาม ตอนที่1 โพลีฟีนอล: สารต่อต้านออกซิเดชัน**. Food & Health. The 15th International Processing, Filling and Packaging Event for Asia ปาเตค, กรุงเทพฯ.
- ไทยรัฐออนไลน์. 2557. **วันมะเร็งโลกรู้จักโรคร้ายอันดับ 1 คร่าชีวิตคนไทย**. [ระบบ ออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.thairath.co.th/content/401217> (4 กุมภาพันธ์ 2557).
- นิพัทธา ชาติสุวรรณ และ วรวิทย์ อารีกุล. 2553. **พารามิเตอร์สี ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ**. เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 646 น.
- บริษัทซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน). 2556. **ราคาประกาศ เช็คราคาขาย แนวโน้มราคาจากแหล่งข้อมูลที่คุณต้อง**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.cpfefeed.com/price/detail.html?product=8> (17 กันยายน 2556).
- ภัทรวิทย์ อัดตะสาระ และ รังสิยา บัวส้ม. 2554. **รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล (Hospital-Based Cancer Registry)**. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ: ยูเนี่ยนอุลตราไวโอเล็ต.
- รวิวรรณ แก้วอมตะวงศ์ และ ทรงพร จิรมั่นคง. 2549. **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด**. ว.มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 8(2): 76 – 88.
- ลิษา หงษ์ฟ้า. 2556. **องค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลือง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 118 น.

- วรพล เองวานิช. (บรรณาธิการ). 2555. **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ**. เชียงใหม่: สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย (สวอ.). 431 น.
- วรวิทย์ กาญจนสูตร. 2552. **วิกฤตโรคมะเร็ง ต้องมีผู้กำหนดนโยบาย**. มติชนรายวัน 23 มิถุนายน: 7.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2555. **ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคมะเร็ง**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.nci.go.th/th/Knowledge/index_general.html. (10 กุมภาพันธ์ 2558).
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2557. **สถิติส่งออกข้าว (Export statistics)**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.thairiceexporters.or.th/default_th.htm (16 มีนาคม 2558).
- สุพรรณิ ศรีอำพร. 2550. **อุบัติการณ์โรคมะเร็งตับและท่อน้ำดี**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.cmp.ubu.ac.th/th/detail_article.php?article=00081&=2f90b9e480a339ba231be52a30807fd7 (18 พฤศจิกายน 2557)
- สุภัททิยมย์. (นามแฝง). 2553. **สุดยอดสมุนไพรต้านมะเร็ง**. เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ: ไทยควอลิตีบุ๊กส์. 192 น.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. **ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. เล่มที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 366 น.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดตสันทอง. 2549. **สารต้านอนุมูลอิสระ**. เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พรินท์. 200 น.
- A.O.A.C. 2000. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Washington,D.C. USA: Association of Official Analytical chemistry.
- A.O.A.C. 2005. **Official Methods of Analysis**. 18th ed. Washington,D.C. USA: Association of Official Analytical chemistry.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 27(6): 1256-1262.
- Ahn, C., Y. Jeonb, Y. Kimc and J. Je. 2012. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. **Process Biochemistry** 47: 2240–2245.
- American Cancer Society. 2014. **Cancer Treatment and Survivorship Facts and Figures 2014-2015**. Atlanta: American Cancer Society Inc. 43 p.

- American Cancer Society. 2015. **Cancer Facts & Figures 2015**. Atlanta: American Cancer Society Inc. 52 p.
- Aleman, A., E. Perez-Santín, S. Bordenave-Juchereau, I. Arnaudin, M.C. Gomez-Guillen and P. Montero. 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International** 44: 1044–1051.
- Bandyopadhyay, K., G. Misra and S. Ghosh. 2008. Preparation and characterization of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. **Journal of Oleo Science** 57: 47-52.
- Barnes, D. S., N. K. Clapp, D. A. Scott, D. L. Oberst and S. G. Berry. 1983. Effects of wheat, rice, corn, and soybean bran on 1,2-dimethylhydrazine-induced large bowel tumorigenesis in F344 rats. **Nutrition and Cancer** 5: 1–9.
- Butsat, S. and S. Siriamornpun. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. **Food Chemistry** 119: 606-613.
- Cai, Y. Z., M. Sun and H. Corke. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51(8): 2288–2294.
- Cayot, P. and G. Tainturier. 1997. The Quantification of Protein Amino Groups by the Trinitrobenzenesulfonic Acid Method: **A Reexamination**. **Analytical** 249: 184–200.
- Chanput, W., C. Theerakulkait and S. Nakai. 2009. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science** 49: 422–428.
- Chatha, S. A., A. I. Hussain, J. Bajwa and M. Sagir. 2006. Antioxidant activity of different solvent extracts of rice bran at accelerated storage of sunflower oil. **Journal of Food Lipids** 13: 424– 433.
- Dai, J. and R. J. Mumper. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules** 15(10):7313-52.
- 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50(10): 3010-3014.
- Eliasa, R. J., S. S. Kellerbya and E. A. Deckera. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 48(5): 430-441.

- Farrell, D. J. 1994. Utilization of rice bran in diets for domestic fowl and ducklings. **World's poultry Science Journal** 50: 115-130.
- Frankle, E. N. and A. S. Meyer. 2000. The problem the using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 80: 1925-1941
- Galvez, A. F., N. Chen, J. Macasieb, B. O. de Lumen. 2001. Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibit acetylation. **Cancer Research** 61:7473-8.
- GE Healthcare Life Sciences. 2015. **PlusOne Silver Staining Kit, Protein**. [Online] available <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/en/GELifeSciences-th/17115001> (8 April 2015).
- Goufo, P. and H. Trindade. 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. **Food Science and Nutrition** 2(2): 75-104.
- Henderson, A. J., C. A. Ollila, A. Kumar, E. C. Borresen, K. Raina, R. Agarwal and E. P. Ryan. 2012. Chemopreventive Properties of Dietary Rice Bran: Current Status and Future Prospects. **Advances in Nutrition** 3: 643-653.
- Hernandez-Ledesma, B., C. Hsieh and B. O. D. Lumen. 2009. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. **Peptides** 30: 426-430.
- Houston, D. F. 1972. **Rice bran and polish**. In **Rice: Chemistry and Technology**. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Iqbal, J., M. Minhajuddin and Z. H. Beg. 2003. Suppression of 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced carcinogenesis and hypercholesterolaemia in rats by tocotrienol-rich fraction isolated from rice bran oil. **European Journal of Cancer Prevention** 12: 447-53.
- Kannan, A., N. Hettiarachchy and S. Narayan. 2009. Colon and Breast Anti-cancer Effects of Peptide Hydrolysates Derived from Rice Bran. **The Open Bioactive Compounds Journal** 2: 17 - 20.

- 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.
- 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: 11643-11647.
- Katayama, M., S. Sugie, N. Yoshimi, Y. Yamada, K. Sakata, Z. Qiao, T. Iwasaki, H. Kobayashi and H. Mori. 2003. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on diethylnitrosoamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. **Oncology Reports** 10: 875–80.
- Kawasaki, B. T., E. M. Hurt, T. Mistree and W. L. Farrar. 2008. Targeting cancer stem cells with phytochemicals. **Molecular Interventions** 8: 174–84.
- Kim, E., Y. Kim, J. Hwang, J. S. Lee, S. Moon, B. Jeon and P. Park. 2013. Purification and characterization of a novel anticancer peptide derived from *Ruditapes philippinarum*. **Process Biochemistry** 48: 1086-1090.
- Shetty, K., G. Paliyath, A. Pometto and R. E. Levin. 2006. **Food Biotechnology**. USA: CRC Press. 1921 p
- Kuno, T., Y. Hirose, K. Hata, K. Kato, S. H. Qiang, N. Kitaori, A. Hara, T. Iwasaki, T. Yoshimura and K. Wada. 2004. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats. **International Journal of Oncology** 25: 1809-15.
- Kuno, T., Y. Hirose, Y. Yamada, K. Hata, S. H. Qiang, N. Asano, T. Oyama, H. Zhi, T. Iwasaki, H. Kobayashi. 2006. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. **Oncology Reports** 15: 533-8.
- Lacroix, I. M. E. and E. C. Y. Li-Chan. 2013. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV and α -Glucosidase Activities by Pepsin-Treated Whey Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 61: 7500-7506
- Lai, P., K. Y. LI, S. Lu and H. H. Chen. 2009. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. **Food Chemistry** 117: 538-544.

- Leardkamolkarn, V., W. Thongthep, P. Suttiarporn, R. Kongkachuichai, S. Wongpornchai and A. Wanavijitr. 2011. Chemopreventive properties of the bran extracted from a newly-developed Thai rice: The *Riceberry*. **Food Chemistry** 125: 978–985.
- Li, B. B., B. Smith and M. M. Hossain. 2006. Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. **Separation and Purification Technology** 48: 189–196.
- 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 Pacific Journal of Clinical Nutrition** 16: 275–280.
- Long, N. K., H. Makita, T. Yamashita, M. Toida, K. Kato, D. Hatakeyama and T. Shibata. 2007. Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats. **Oncology Reports** 17: 879–85.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193(1): 265–75.
- Luo, L., B. Han, X. Yu, X. Chen, J. Zhou, W. Chen, Y. Zhu, X. Peng, Q. Zou and S. Li. 2014. Anti-metastasis Activity of Black Rice Anthocyanins Against Breast Cancer: Analyses Using an ErbB2 Positive Breast Cancer Cell Line and Tumoral Xenograft Model. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** 15: 6219–6225.
- Min, B., L. Gu, A. M. McClung, C. J. Bergman and M. Chen. 2012. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours. **Food Chemistry** 133: 715–722.
- Mine, Y., L. Eunice and J. Bo. (eds). 2010. **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. USA: John Wiley and Sons. 420 p.
- Moko, E. M., H. Purnomo, J. Kusnadi and F. G. Ijong. 2014. Phytochemical content and antioxidant properties of colored and non colored varieties of rice bran from Minahasa, North Sulawesi, Indonesia. **International Food Research Journal** 21(3): 1053–1059.

- Moo-Huchin, V. M., M. I. Moo-Huchin, R. J. Estrada-León, L. Cuevas-Glory, I. A. Estrada-Mota, E. Ortiz-Vázquez, D. Betancur-Ancona and E. Sauri-Duch. 2015. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry** 166: 17–22.
- Moongngarm, 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.
- Mori, H., K. Kawabata, N. Yoshimi, T. Tanaka, T. Murakami, T. Okada and H. Murai. 1999. Chemopreventive effects of ferulic acid on oral and rice germ on large bowel carcinogenesis. **Anticancer Research** 19: 3775–8.
- Norazalina, S., M. E. Norhaizan. I. Hairuszah and M. S. Norashareena. 2010. Anticarcinogenic BGC-823 cells and several enzymes. **FEBS Letters** 579: 1187–1190.
- Phelan, M., A. Ahernea, R. J. FitzGerald and N. M. O'Brien. 2009. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects regulatory status. **International Dairy Journal** 19: 643–645.
- Phutthaphadoong, S., Y. Yamada, A. Hirata, H. Tomita, A. Hara, P. Limtrakul, T. Iwasaki, H. Kobayashi and H. Mori. 2010. Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran (FBRA) on the inflammation-related colorectal carcinogenesis in ApcMin/+ mice. **Oncology Reports** 23: 53–9.
- Phutthaphadoong, S., Y. Yamada, A. Hirata, H. Tomita, A. Taguchi, A. Hara, P. N. Limtrakul, T. Iwasaki, H. Kobayashi and H. Mori. 2009. Chemopreventive effects of fermented brown rice and rice bran against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. **Oncology Reports** 21: 321–7.
- Puri, S., B. Dhillon and N. S. Sodhi. 2014. Effect of degree of milling (Dom) on overall quality of rice. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research** 15(3): 474–489.
- Rice-Evans, C., N. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley and J. B. Pridham. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research** 22: 375–383.

- Roobha, J. J., M. Saravanakumar, K. M. Aravindhan and P. D. Suganya. 2011. *In vitro* evaluation of anticancer property of anthocyanin extract from *Musa acuminata* bract. **Research in Pharmacy** 1(4): 17-21.
- Rupachandra, S. and D.V.L. Sarada, 2013. Anticancer activity of methanol extract of the seeds of *Borreria hispida* and *Momordica dioica*. **Pharmacy Research** 6(5): 565–568.
- 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59: 1862–70.
- Sakanaka, S., Y. Tachibana, N. Ishihara and L. R. Juneja. 2004. Antioxidant activity of egg yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. **Food chemistry** 86: 99-103.
- Sarmadi, B, H. and A, Ismail. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides** 31: 1949-1956.
- Shao, Y., F. Xu, X. Sun, J. Bao and T. Beta. 2014. Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). **Journal of Cereal Science** 59: 211-218.
- Simpson, B. K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. New York: Marcel Dekker. p. 531–540).
- Sirikul, A., A. Moongngarm and P. Khaengkhan. 2009. Comparison of proximate composition, bioactive compounds and antioxidant activity of rice bran and defatted rice bran from organic rice and conventional rice. **Journal of Agricultural & Food Industrial Organization** 2(04): 731-743.
- Subramanian, R., S. Manivannan, R. Rajasekar and K. Suganya. 2013. Protein quality of rice by-product. **Indian Journal of Science** 4(9): 3-5.
- Sun, J. and R. H. Liu. 2006. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. **Cancer Letters** 2: 17-20.
- Sun, Q., S. Huixing and L. Yongkang. 2011. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. **Journal of Food Science and Technology** 48(1): 53-60.

- Sun, W., W. Xu, 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. **The Journal of Nutritional Biochemistry** 20: 276-84.
- Tantamango, Y. M., S. F. Knutsen, W. L. Beeson, G. Fraser. and J. Sabate. 2011. Foods and food groups associated with the incidence of colorectal polyps: the Adventist Health Study. **Nutrition and Cancer** 63: 565–72.
- The Johns Hopkins University. no date. **Liver Cancer (Hepatocellular Carcinoma)**. [online]. Available http://www.hopkinsmedicine.org/liver_tumor_center/conditions/cancerous_livertumors/hepatocellular_carcinoma.html (18.November.2014).
- Thirabunyanon, M. and P. Hongwittayakorn. 2013. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cell via synergic action in adhesion to cancer cell and short-chain fatty acid bioproduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 169: 511-525.
- Tomokuni, A., H. Eguchi, H. Hoshino, D. L. Dewi, S. Nishikawa, Y. Kano, N. Miyoshi, A. Tojo, S. Kobayashi, N. Gotoh, K. Hinohara, N. Fusaki, T. Saito, H. Suemizu, H. Wada, S. Kobayashi, S. Marubashi, M. Tanemura, Y. Doki, M. Mori, H. Ishii and H. Nagano. 2013. Effect of in vivo administration of reprogramming factors in the mouse liver. **Oncology Letters** 6(2): 323–328.
- Udenigwe, C. C. and A. Howard. 2013. Meat proteome as source of functional biopeptides. **Food Research International** 54: 1021–1032.
- Udenigwe, C. C. and R. E. Aluko. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. **Journal of Food Science** 71(1): 11-24.
- Umayaparvathi, S., S. Meenakshi, V. Vimalra, M. Arumugama, G. Sivagami, T. Balasubramaniana. 2014. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). **Biomedicine & Preventive Nutrition** 4: 343–353.
- University College London. No date. **Proteins**. [online]. Available <http://www.ucl.ac.uk/~sjjgsca/ProteinStructure.html> (19.11.57).

- Uttara, B., A.V. Singh, P. Zamboni and R. T. Mahajan. 2009. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology** 7(1): 65–74.
- Vatanasapt, V., D. M. Parkin, J. Ferlay. 1999. **Cancer in Thailand Vol.II , 1992-1994**. IARC Technical Report No. 34, Lyon: WHO Press.
- Velioglu, Y. S., G. Mazza, L. Gao and B. D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46(10): 4113–4117.
- Wang, M., N. S. Hettiarachchy, M. Qi, W. Burks and T. Siebenmorgen. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47: 411-416.
- Wang, W. and D. M. E. Gonzalez. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 4: 63-78.
- Wild, C. P., M. Fortuin, F. Donato, H. C. Whittle, A. J. Hall, C. R. Wolf and R. Montesano. 1993. Aflatoxin, liver enzymes, and hepatitis B virus infection in Gambian children. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention** 2:555-61.
- Wiriyanphan, C., H. Xiao, E. A. Decker, J. Yongsawatdigul. 2015. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. **Food Chemistry** 167: 7–15.
- Young, D., F. Nau, M. Pasco and Y. Mine. 2011. Identification of hen egg yolk-derived phosphopeptides and their effects on gene expression profiling against oxidative stress-induced Caco-2 Cells. P. 9207–9218.
- Zheng, W. and S. Y. Wang. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49(11): 5165–5170.





ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง สารเคมี และวิธีการวิเคราะห์

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal medium)

ประกอบด้วย

NaHCO ₃	3.7	กรัมต่อลิตร
DMEM	13.5	กรัมต่อลิตร
Fetal bovine serum	ร้อยละ 10	
Penicillin – streptomycin	ร้อยละ 1	
non essential amino acid	ร้อยละ 1	

วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 13.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 780 มิลลิลิตร
2. ชั่ง NaHCO₃ 3.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมรวมกับสารละลาย DMEM ในข้อ 1
3. เติม Fetal bovine serum 100 มล. ตามด้วยกรดอะมิโน non essential amino acid 10 มิลลิลิตร
4. ทำการปรับค่า pH ให้อยู่ประมาณ 7.4 จากนั้นทำการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน ลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
5. ทำการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 10 มิลลิลิตร แล้วทำการปิดขวดให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลาย PBS (Phosphate buffer saline) pH 7.4

ประกอบด้วย

Sodium chloride (NaCl)	9	กรัม
Sodium hydrogen phosphate	9	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	กรัม

วิธีการเตรียม

ทำการชั่งสารเคมีทั้งหมดตามสูตรแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 975 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

3. สารละลาย MTT

ประกอบด้วย

MTT	0.5	มิลลิกรัม
-----	-----	-----------

วิธีการเตรียม

ชั่งสาร MTT 0.5 มิลลิกรัม ละลายในสาร DMSO 1 มิลลิลิตร

4. Lowry's method (Lowry et al., 1951)

สารเคมีที่ใช้ ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	2	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	100	มิลลิลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)	0.5	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	1	กรัม
Folin-ciocalteu reagent	20	มิลลิลิตร
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA)	1	มิลลิกรัม

วิธีการเตรียม

1. Reagent A

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 2 กรัม ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 100 มิลลิลิตร

2. Reagent B

ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) 0.5 กรัม และ tartrate salt 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. Reagent C

นำ reagent A 50 มิลลิลิตรผสมกับ reagent B 1 มิลลิลิตร

4. Reagent E

นำ Folin-ciocalteu reagent ผสมกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดย Lowry method

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ reagent C 5 มิลลิลิตร โดยเครื่อง vortex บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม reagent E 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของโบวันชีรัมอัลบูมิน



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง สารเคมี และวิธีการวิเคราะห์

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal medium)

ประกอบด้วย

NaHCO ₃	3.7	กรัมต่อลิตร
DMEM	13.5	กรัมต่อลิตร
Fetal bovine serum	ร้อยละ 10	
Penicillin – streptomycin	ร้อยละ 1	
non essential amino acid	ร้อยละ 1	

วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 13.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 780 มิลลิลิตร
2. ชั่ง NaHCO₃ 3.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมรวมกับสารละลาย DMEM ในข้อ 1
3. เติม Fetal bovine serum 100 มล. ตามด้วยกรดอะมิโน non essential amino acid 10 มิลลิลิตร
4. ทำการปรับค่า pH ให้อยู่ประมาณ 7.4 จากนั้นทำการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน ลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
5. ทำการเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 10 มิลลิลิตร แล้วทำการปิดขวดให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลาย PBS (Phosphate buffer saline) pH 7.4

ประกอบด้วย

Sodium chloride (NaCl)	9	กรัม
Sodium hydrogen phosphate	9	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	กรัม

วิธีการเตรียม

ทำการชั่งสารเคมีทั้งหมดตามสูตรแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 975 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

3. สารละลาย MTT

ประกอบด้วย

MTT 0.5 มิลลิกรัม

วิธีการเตรียม

ชั่งสาร MTT 0.5 มิลลิกรัม ละลายในสาร DMSO 1 มิลลิลิตร

4. Lowry's method (Lowry et al., 1951)

สารเคมีที่ใช้ ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	2	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	100	มิลลิลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)	0.5	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	1	กรัม
Folin-ciocalteu reagent	20	มิลลิลิตร
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA)	1	มิลลิกรัม

วิธีการเตรียม

1. Reagent A

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 2 กรัม ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 100 มิลลิลิตร

2. Reagent B

ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) 0.5 กรัม และ tartrate salt 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. Reagent C

นำ reagent A 50 มิลลิลิตรผสมกับ reagent B 1 มิลลิลิตร

4. Reagent E

นำ Folin-ciocalteu reagent ผสมกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดย Lowry method

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ reagent C 5 มิลลิลิตร โดยเครื่อง vortex บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม reagent E 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของโบวันชีรัมอัลบูมิน



ภาคผนวก ข

รูปภาพประกอบการทำวิจัย



ภาพผนวก 1 การสกัดไขมันออกจากรำข้าวด้วยการเขย่ากับเอทานอล



ภาพผนวก 2 protein concentrate ที่ได้จากการตกตะกอน



ภาพผนวก 3 crude peptide ที่ได้จากการย่อยโปรตีนไอโซเลตจากรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหลังจาก
ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง



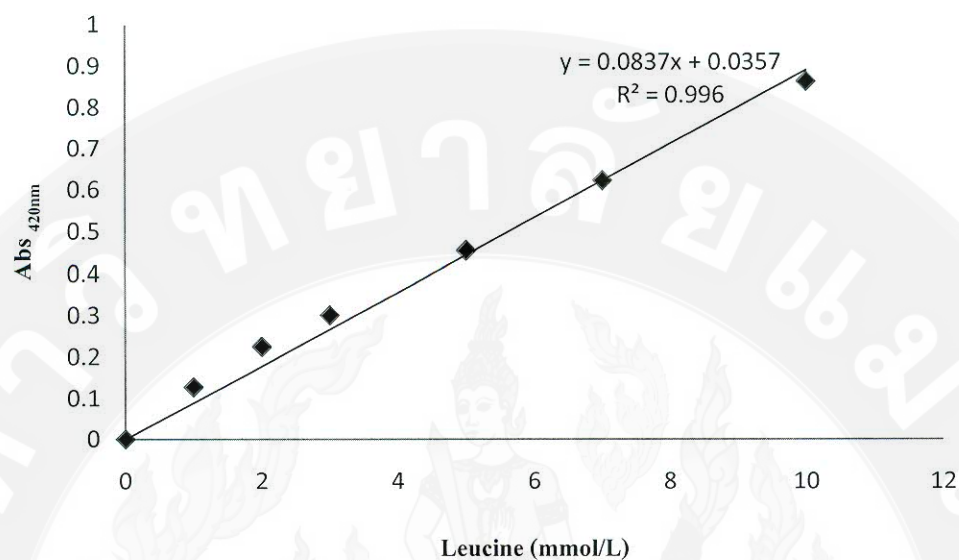
ภาพผนวก 4 การวัดค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี
MTT assay



ภาคผนวก ก

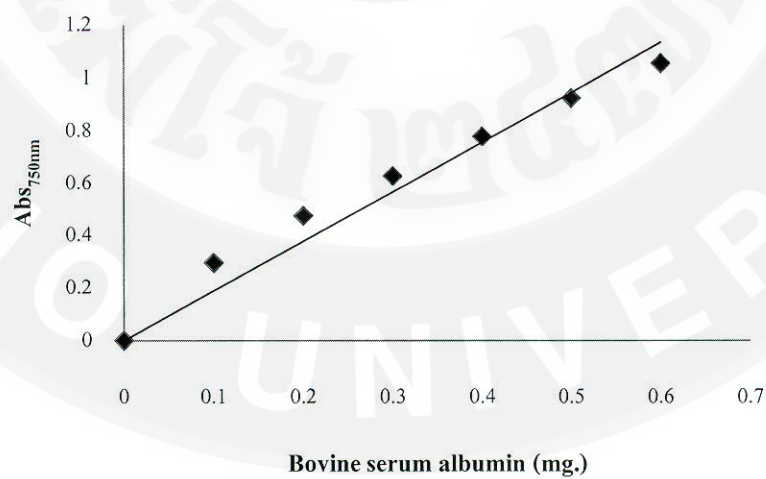
ข้อมูลผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ระดับการย่อยโดยวิธี TNBS



ภาพผนวก 5 กราฟมาตรฐานกรดอะมิโนลิวซีน

2. การวิเคราะห์โปรตีน โดยวิธี Lowry method



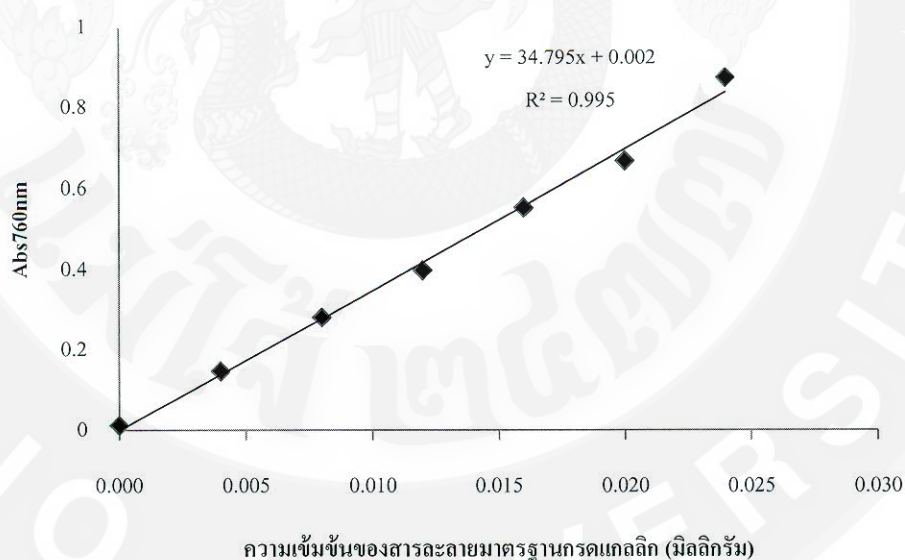
ภาพผนวก 6 กราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA)

ตารางผนวก 1 ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง crude peptide และ resistant peptide จากรำข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิลที่วิเคราะห์โดยวิธี Lowry method

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อ 100 กรัม)	
	ขาวดอกมะลิ 105	เจ้าหอมนิล
protein concentrate	41.40 ± 0.79 ^a	69.11 ± 0.58 ^b
crude peptide	43.39 ± 0.29 ^a	76.25 ± 0.00 ^b
gastric resistant peptide	34.51 ± 0.58 ^a	65.47 ± 0.21 ^b
gastric intestinal resistant peptide	25.53 ± 0.58 ^a	51.61 ± 0.07 ^b

หมายเหตุ ^{a, b} แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างแถว ($P < 0.05$)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด



ภาพผนวก 7 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก



ภาคผนวก ง

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล		นางสาวนงลักษณ์ บุญญาศรี
เกิดเมื่อ		26 มิถุนายน 2532
ภูมิลำเนา		จังหวัดเชียงราย
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเวียงป่าเป้าวิทยาคม จังหวัดเชียงราย
	พ.ศ. 2551	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ผลงานทางวิชาการ	พ.ศ. 2556	“Milling quality of Thai jasmine rice (<i>Oryza sativa</i> L. cv. Kao Dok Mali 105) mutants obtained from low-energy ion beam bombardment” ในการประชุมวิชาการ PROPAK ASIA 2013 Empowering SMEs through Science and Technology ระหว่าง วันที่ 12 - 15 มิถุนายน 2556
	พ.ศ. 2558	“ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดด้วยเมทานอล โปรตีนไฮโซเลต และเพปไทด์ที่ได้จากรำข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และรำข้าวเจ้าหอมนิล” ในวารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร ปีที่ 32 ฉบับที่ 2
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	พ.ศ. 2556	ทุนศึกษย์ก้นกุฏิ จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้