



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเปปไทด์ต้านมะเร็งที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วย *Bacillus subtilis* MP9 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและลำไส้

Bioactive compounds and anti-cancer peptides derived from rice bran fermented with *Bacillus subtilis* MP9 as new biotherapeutic substances for antiproliferation of liver and colon cancer cells

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2557 - 2558
จำนวน 552,720 บาท

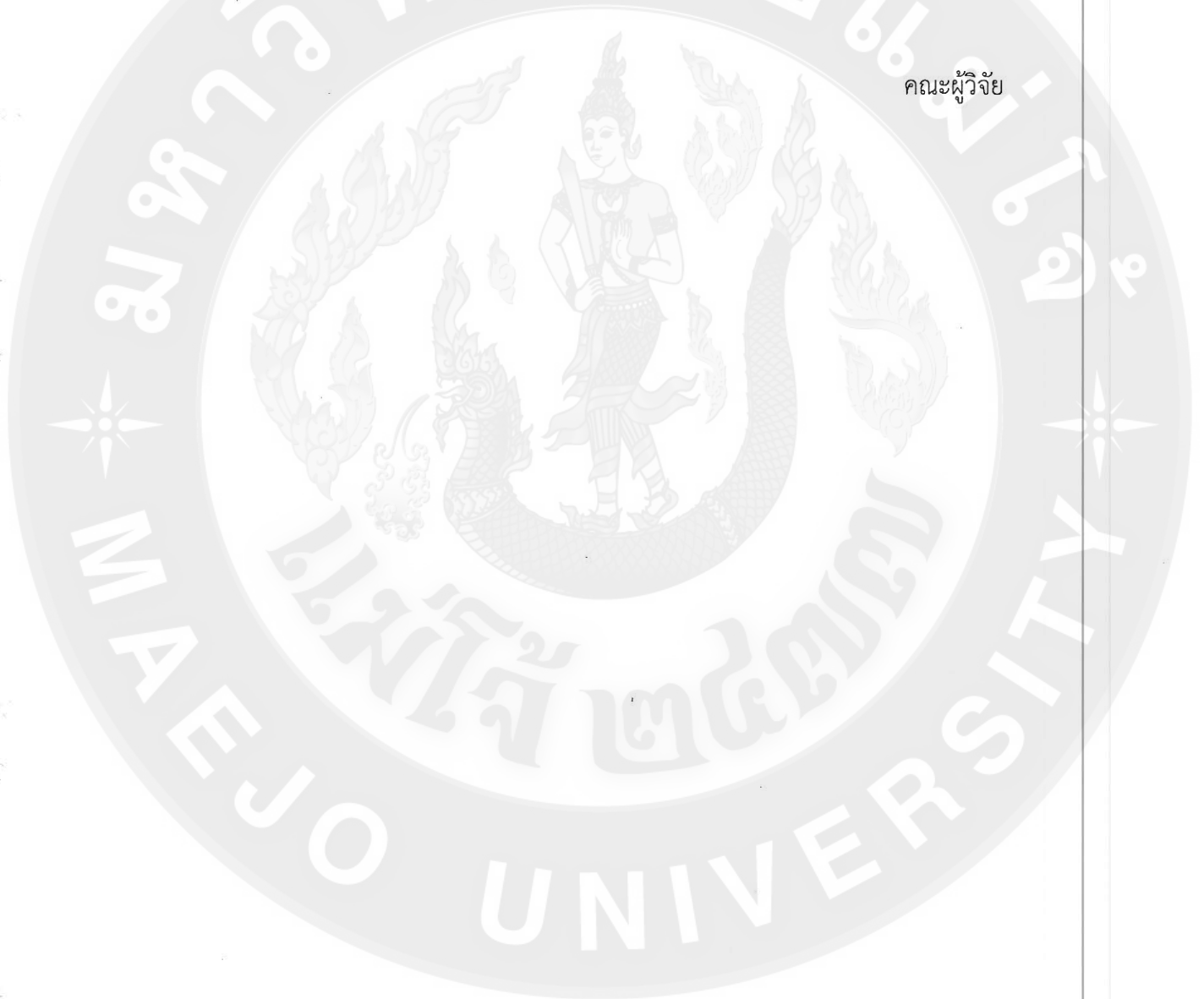
หัวหน้าโครงการ นายมงคล ธิรบุญยานนท์
ผู้ร่วมโครงการ นางวิจิตรา แดงปรก
นางสาวชุตติมา คงจรรยา

งานวิจัยเสรีจิ้นสมบูรณ
30 กรกฎาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

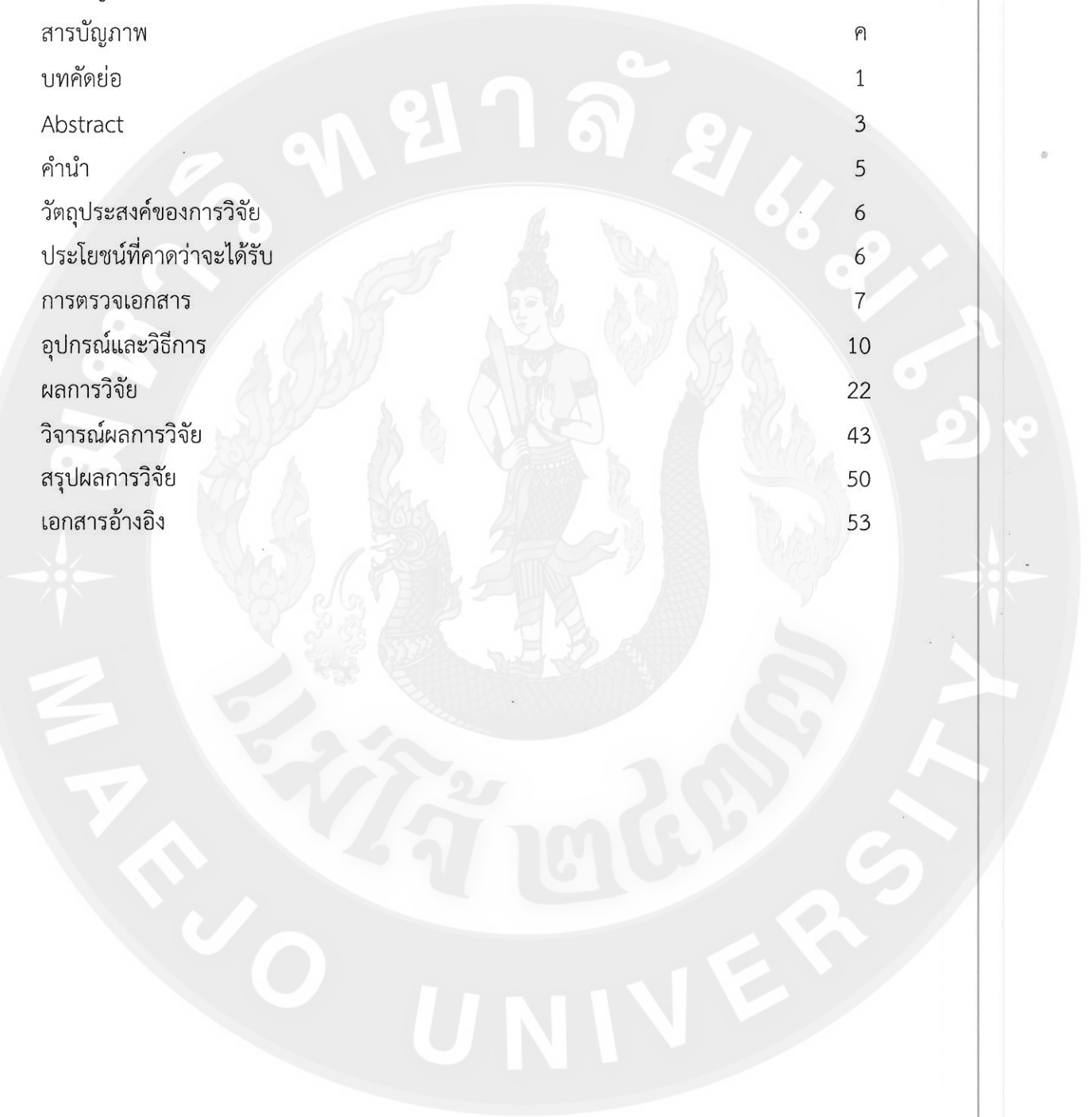
โครงการวิจัยเรื่อง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเปปไทด์ต้านมะเร็งที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วย *Bacillus subtilis* MP9 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและลำไส้ ได้ดำเนินการวิจัยเป็นไปได้อย่างดี โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2557 - 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อำนวยความสะดวกสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	3
คำนำ	5
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
การตรวจเอกสาร	7
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการวิจัย	22
วิจารณ์ผลการวิจัย	43
สรุปผลการวิจัย	50
เอกสารอ้างอิง	53



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล	23
ตารางที่ 2 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดด้วยเมธานอลของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล	23
ตารางที่ 3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล	24
ตารางที่ 4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ⁺ ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล	25
ตารางที่ 5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล	26
ตารางที่ 6 ปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมักและไม่ได้หมักด้วย <i>B. subtilis</i> MP9	27
ตารางที่ 7 ปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมนิลหมักและไม่ได้หมักด้วย <i>B. subtilis</i> MP9	29
ตารางที่ 8 ความคงทนของเปปไทด์ที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลองของมนุษย์	32
ตารางที่ 9 ขนาดของเปปไทด์ที่ผ่านการทนต่อสภาวะทางเดินอาหารจำลองของมนุษย์	34
ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ	35
ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ	37
ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้	40
ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้	42

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ฟีกปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมัก และจากรำข้าวไม่ได้หมักด้วย <i>B. subtilis</i> MP9	28
ภาพที่ 2 ฟีกปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวหอมนิลหมัก และจากรำข้าวไม่ได้หมักด้วย <i>B. subtilis</i> MP9	30
ภาพที่ 3 ลักษณะแบบแห้งของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก <i>B. subtilis</i> MP9	31
ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับเมื่อทดสอบกับเปปไทด์ จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105	36
ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับเมื่อทดสอบกับเปปไทด์ จากรำข้าวหอมนิล	39
ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อทดสอบกับเปปไทด์ จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105	41
ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อทดสอบกับเปปไทด์ จากรำข้าวหอมนิล	44

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเปปไทด์ต้านมะเร็งที่ได้จากการหมักรำข้าวด้วย *Bacillus subtilis* MP9 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและลำไส้

Bioactive compounds and anti-cancer peptides derived from rice bran fermented with *Bacillus subtilis* MP9 as new biotherapeutic substances for antiproliferation of liver and colon cancer cells

มงคล ธิรบุญยานนท์¹ วิจิตรา แดงปรก² ชุตินา คงจรูญ¹

MongKol Thirabunyanon¹, Wichitra Daengprok² and Chutima Kongjaroon¹

¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

²คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการผลิตเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์จากรำข้าวในเชิงการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็ง จากการนำเมล็ดข้าวที่ทำการเกษตรแบบอินทรีย์ 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล มาสีและคัดแยกรำข้าว พบว่าในสารสกัดรำข้าวด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 น้อยกว่ารำข้าวหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 24 : 70 mgGAE/g และมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 56 : 83 เปอร์เซ็นต์ สารต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.32 : 0.06 และสารต้านอนุมูลอิสระ FRAP เท่ากับ 359 : 836 $\mu\text{mol}/\text{Fe}^{2+}/\text{g}$ ในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล ตามลำดับ การศึกษาชนิดและปริมาณของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลังจากการหมักรำข้าวด้วย *B. subtilis* MP9 และทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ tetradecanoic acid, 9-octadecenoic acid และ octadecanoic acid เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากการหมักรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และมี octadecanoic acid และ oleic acid เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในรำข้าวหอมนิลหมัก การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9 พบว่าได้เอนไซม์โปรติเอสในรูปแบบแห้งที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 15,400 U/g และเมื่อทำการผลิตเปปไทด์ด้วยการย่อยโปรตีนรำข้าวด้วยโปรติเอสที่ความเข้มข้น 10 U/g พบว่าได้เปปไทด์เท่ากับ 42 และ 37 เปอร์เซ็นต์ ในโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และหอมนิล ตามลำดับ การทดสอบการทนของเปปไทด์ต่อสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้จำลอง

พบว่าเปปไทด์ที่คั่งท่นได้มีน้ำหนักเหลือ 59 : 67 เปอร์เซ็นต์ และ 96 : 99 เปอร์เซ็นต์ ของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และหอมนิล ตามลำดับ การคัดแยกขนาดของเปปไทด์ออกเป็นขนาดต่างๆ ตามน้ำหนักโมเลกุล พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 50 kDa มีสัดส่วนมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ทั้งเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และหอมนิล ในขณะที่เปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 50 kDa ในแต่ละช่วงขนาด คือ น้อยกว่า 3 อยู่ในช่วง 3 - 5 อยู่ในช่วง 5 - 10 และอยู่ในช่วง 30 - 50 kDa พบว่าในแต่ละช่วงขนาดมีน้ำหนักไม่แตกต่างกันมากนัก การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งระดับของเปปไทด์จากรำข้าวทั้ง 2 ชนิด โดยทดสอบแบ่งตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ น้อยกว่า 3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และมากกว่า 50 kDa และทดสอบที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้พบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับ 29.2 - 44.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับ 33.2 - 45.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa และขนาด 3 - 5 kDa มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับสูงกว่าเปปไทด์จากรำข้าวที่มีขนาดที่ใหญ่กว่า และเมื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทั้งเปปไทด์จากรำข้าวทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีลักษณะการเจริญที่ผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยไม่เจริญเป็นรูปหลายเหลี่ยม ไม่แผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยง และเซลล์ไม่ยึดติดกันแน่น การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิล โดยแบ่งกลุ่มทดสอบเหมือน ๆ กับการทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็งระดับ ผลที่ได้พบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ 43.7 - 74.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ 39.7 - 77.3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่มีขนาดอื่น ๆ ที่ทุกระดับความเข้มข้น นอกจากนั้น เมื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทั้งเปปไทด์จากรำข้าวทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ไม่มีผลชัดเจนที่ทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้เจริญผิดปกติ

เปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิลจากการวิจัยในครั้งนี้ อาจจะเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งระดับและมะเร็งลำไส้ได้

Abstract

The aims of this research were to utilize rice bran as bioactive substance and/or bioactive peptide for cancer protection and/or therapy. Organic rice brans of Hom Dok Mali 105 and Hom Nil varieties were applied in this study. Total phenolic compound (TPC) and antioxidant activities (DPPH; ABTS⁺ and FRAP) of Hom Dok Mali 105 rice bran methanol extract exhibited significantly lower than that of Hom Nil methanol extract ($P < 0.05$) as the rates of TPC as 24 : 70 mgGAE/g and DPPH as 56 : 83 percent; ABTS⁺ with IC₅₀ as 0.32 : 0.06, and FRAP as 359 : 836 $\mu\text{mol/Fe}^{2+}/\text{g}$ in Hom Dok Mali 105 and Hom Nil rice bran methanol extract, respectively. After fermentation these rice brans with *Bacillus subtilis* MP9, the profiles of substances and/or bioactive compounds were measured by using GC-MS. Some of them such as tetradecanoic acid, 9-octadecenoic acid and octadecanoic acid were little higher in the fermented Hom Dok Mali 105 group than that of non-fermented group. As well as, octadecanoic acid and oleic acid were also little higher in the fermented Hom Nil group than that of non-fermented group. Protease production by *B. subtilis* MP9 was successfully performed with protease activity of 15,400 U/g of protease dried weight. Rice bran peptide production using this protease with 10 U/g of rice bran protein, the obtaining peptide yields were the rates of 42 and 37 percent in Hom Dok Mali 105 and Hom Nil rice bran protein, respectively. The gastric and intestinal conditional models of resistant peptides were further investigated, the obtaining resistant peptides from gastric and intestinal conditional models were the rates of 59 : 67 percent and 96 : 99 percent in Hom Dok Mali 105 and Hom Nil peptides, respectively. The peptide fractions were continually studied, most of them were bigger than 50 kDa as the rate of more than 96 percent. While the smaller peptide fractions such as < 3 kDa, 3 - 5 kDa, 5 - 10 kDa and 30 - 50 kDa were not different in an amount of each fraction. The activity of Hom Dok Mali 105 and Hom Nil peptides against liver cancer was further investigated. Five groups of peptide fractions of < 3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 and > 50 kDa were designed with each of 4 concentrations as of 75, 125, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$. The results showed that the liver cancer cell antiproliferation were 29.2 - 44.2% and 33.2 - 45.5% in Hom Dok Mali 105 and Hom Nil peptides, respectively. Of these results, the smaller peptide fractions such as < 3

and 3 – 5 kDa showed to had higher tendency inhibited liver cancer cell growth compared to that of the bigger peptide fractions. After observation with a microscope, an abnormal cell growth such as abnormal cell shape, non-attach cells and non-adhere cells was observed in all experimental groups. For potential of both peptides against colon cancer, results showed that the colon cancer cell growth inhibition were 43.7 – 74.1% and 39.7 – 77.3% in Hom Dok Mali 105 and Hom Nil peptides, respectively. Of these results, the 3 kDa fraction of all concentration was significantly higher colon cancer cell growth inhibition ($P < 0.05$) compared to that of all groups in Hom Nil peptide. None of unclear an abnormal cell growth was observed in all experimental groups.

This study suggested that the anti-cancer peptides derived from Hom Dok Mali 105 and Hom Nil rice bran in this investigation may apply for liver and colon cancer protection and/or therapy.

คำนำ

ปัจจุบันอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่งในประเทศไทยเรานั้นมีสาเหตุมาจากโรคมะเร็ง โดยที่อัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งดังกล่าวนี้ มีมากกว่าการเสียชีวิตที่มีสาเหตุเกิดจากอุบัติเหตุหรือโรคหัวใจที่ปกติจะมีอัตราการเสียชีวิตที่มากอยู่แล้ว ทั้งยังเคยครองสถิติที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับหนึ่งติดต่อกันมานาน ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งเสียชีวิตอย่างรวดเร็วนั้นมาจากยารักษาโรคที่มีราคาแพง ทั้งนี้เพราะยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันส่วนใหญ่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ด้วยสาเหตุนี้ทำให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งโดยทั่วไปมักจะเข้าไม่ถึงการรักษาด้วยวิธีการบำบัดดังกล่าว ดังนั้นการป้องกันโรคมะเร็งหรือการผลิตยารักษาโรคโดยใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรานั้น ถือเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดอัตราการเกิดโรคหรือลดอัตราการเสียชีวิตลง ทั้งยังช่วยประหยัดงบประมาณในการดูแลผู้ป่วยโรคมะเร็งดังกล่าวที่มีการจัดสรรงบประมาณมากขึ้นทุกๆ ปี

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากรำข้าว (Rice bran) โดยการใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากและมีหลากหลายชนิดในรำข้าวไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็ง โดยที่แนวคิดการประยุกต์ใช้ประโยชน์ดังกล่าวนี้เนื่องจากรำข้าวเป็นเศษเหลือจากการแปรรูปข้าวเปลือกที่มีราคาถูก แต่ทั้งนี้ในรำข้าวก็ยังคงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหลืออยู่เป็นจำนวนมากด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ประเทศไทยของเราเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวและส่งออกข้าวสารไปยังต่างประเทศสูงเป็นอันดับต้นๆ ของโลก ดังนั้นรำข้าวซึ่งเป็นเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปข้าวเปลือกไปเป็นข้าวสาร ก็ยังคงมีเหลือในปริมาณที่มากตามไปด้วย

การผลิตเปปไทด์ (Peptide) การศึกษาคุณสมบัติ และการศึกษาประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวเพื่อนำไปเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งนั้น เป็นแนวคิดที่ใหม่และน่าสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะผลิตเปปไทด์จากรำข้าวที่มีราคาถูกให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้ พร้อมกันนั้นยังมีแนวคิดที่จะนำเปปไทด์ที่ผลิตได้ไปเสริมในผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันโรคมะเร็งให้กับผู้บริโภคอีกแนวทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้เปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพจะมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารสังเคราะห์ เนื่องจากเปปไทด์เป็นสารชีวโมเลกุลที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นกระบวนการปกติในร่างกาย และมีประโยชน์ต่อร่างกายอยู่แล้ว (Wang and Gonzalez De Mejia, 2005; Phelan *et al.*, 2009) ผู้วิจัยคาดหวังว่าเปปไทด์ที่ผลิตจากรำข้าวในโครงการวิจัยนี้ จะเป็นส่วนหนึ่งของการประยุกต์ใช้ทรัพยากรที่มีราคาถูกที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรานั้น เพื่อนำไปเป็นยาหรือสารชีวภาพในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวที่หมักด้วย *B. subtilis* MP9
2. เพื่อผลิตเปปไทด์จากรำข้าวด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. subtilis* MP9
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและลำไส้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากรำข้าวที่หมักด้วย *B. subtilis* MP9
2. ได้เปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพต้านมะเร็ง



การตรวจเอกสาร

โรคมะเร็ง (Cancer) เป็นโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติ ที่ DNA หรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติ ซึ่งส่งผลทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อที่ผิดปกติหรือโรคมะเร็ง โดยปกติแล้วถ้ามะเร็งเกิดขึ้นที่อวัยวะใดในร่างกายก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้นๆ เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2555) ในประเทศไทยของเราพบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นมากกว่าในอดีตอย่างเห็นได้ชัด จากรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (Hospital – Based Cancer Registry) ปี 2554 พบว่ามีผู้ป่วยใหม่มารับการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวน 25,476 คน (ภัทรวินท์และรังสิยา, 2554) โดยข้อมูลดังกล่าวนี้จะไม่รวมผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งที่ทำการรักษาในสถานอื่นๆ หรือเสียชีวิตโดยไม่ได้รับการรักษาเลย ซึ่งหากรวมผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งทั้งหมดที่รวมทั้งผู้ป่วยเก่าและผู้ป่วยใหม่แล้ว ในประเทศไทยของเราจะมีผู้ป่วยเป็นมะเร็งจำนวนมาก ดังนั้นจึงส่งผลให้โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากที่สุด ซึ่งมีอัตราสูงกว่าสาเหตุมาจากอุบัติเหตุหรือโรคหัวใจมาประมาณ 5 - 6 ปีที่ผ่านมาแล้ว มะเร็งที่พบมากในผู้ชายเป็นอันดับ 1, 2 และ 3 ก็คือ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ และมะเร็งตับตามลำดับ ในขณะที่ผู้หญิงมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 1, 2 และ 3 ก็คือ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ตามลำดับ (ภัทรวินท์และ รังสิยา, 2554)

การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันมีหลายๆ วิธีที่ได้มาตรฐาน อาทิเช่น การผ่าตัด การใช้เคมีหรือยาบำบัด และการฉายรังสี เป็นต้น ซึ่งวิธีที่กล่าวมาข้างต้นดังกล่าวไม่สามารถที่จะฆ่าเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมดและยังมีค่าใช้จ่ายในการบำบัดรักษาโรคที่สูงมาก รวมทั้งอาจเกิดอาการแพ้ยาบำบัดหรือเกิดผลข้างเคียง เป็นต้น ดังนั้นการค้นหาสารชีวภาพหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรา เพื่อนำมาป้องกันหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งก็จะต้องมีการศึกษาวิจัยกันอย่างจริงจัง ทั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดอัตราการเกิดโรคและหรือลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง

รำข้าว (Rice bran) เป็นเศษเหลือ (by-product) จากกระบวนการแปรรูปข้าวเปลือกไปเป็นข้าวสารขาว รำข้าวนี้มีราคาถูกและบางครั้งหลังจากสกัดน้ำมันรำข้าวแล้วก็อาจจะถูกทิ้งเป็นของเหลือทิ้ง (Wiboonsirikul, *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามส่วนประกอบหรือสารชีวภาพที่สำคัญในรำข้าวนี้มีมาก เช่น มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นจำนวนทั้งปริมาณและชนิดที่มาก (Rao *et al.*, 2010) มีส่วนประกอบที่สำคัญ อาทิเช่น โปรตีน วิตามิน กลีโคแลร์ คาร์โบไฮเดรต ฟอสโฟลิปิด และกรดไขมันที่จำเป็น เป็นต้น (Saunders, 1990; Bandyopadhyay *et al.*, 2008) รำข้าวมีส่วนประกอบของโปรตีนประมาณ 10 - 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดีและมีความสำคัญต่อร่างกาย ดังนั้นโปรตีนจากรำข้าวจึงมีคุณค่าทางโภชนาการ และมีคุณสมบัติด้านยาที่เหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ (Fabian and Ju, 2011)

บทบาทและประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าว นั้น มีประโยชน์ต่อร่างกาย ได้อย่างหลากหลาย โดยเฉพาะบทบาทในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง ดังตัวอย่างเช่น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิด Arabinoxylan จากรำข้าวมีประสิทธิภาพเสริมช่วยกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Ghoneum and Gollapudi, 2003) และช่วยกระตุ้นให้เคมีบำบัดชนิด daunorubicin ทำลายเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น (Gollapudi and Ghoneum, 2008) เช่นเดียวกับสารออกฤทธิ์ Tocotrienol ที่สกัดแยกออกมาจากรำข้าวที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Sun *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2010; Kannappan *et al.*, 2010; Bi *et al.*, 2010) จากการรายงานของ Kim *et al.* (2012) ที่พบว่าหนูที่ได้รับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิด alpha-oryzanol ซึ่งเป็นสารที่มีส่วนประกอบในรำข้าว นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (tumor) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารในกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compounds) ชนิด Cycloartenyl ferulate สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติของลำไส้ (Kong *et al.*, 2009) เป็นต้น

เปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดเปปไทด์ (Bioactive peptide) ก็มีการศึกษาวิจัยว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันและบำบัดรักษาโรคมะเร็งเช่นเดียวกัน เปปไทด์ได้จากกระบวนการย่อยหรือกระบวนการหมักของโปรตีนที่มีอยู่ในอาหาร โดยอาศัยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ที่มีอยู่หลายๆ ชนิด (Walther and Sieber, 2011; Udenigwe and Aluko, 2012) เปปไทด์แต่ละชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัย อาทิเช่น แหล่งของโปรตีนว่ามาจากพืชหรือสัตว์ชนิดใด โปรตีนมีองค์ประกอบอย่างไร ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน กระบวนการในการย่อยที่รวมไปถึงระดับความเป็นกรดหรือด่าง เวลา หรืออุณหภูมิที่ใช้ย่อย (Wang and Gonzalez De Mejia, 2005; Udenigwe and Aluko, 2012) เปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพจะมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบต่อเชื่อมกัน 2 - 9 ชนิด และเมื่อทำการหาชนิดของกรดอะมิโนส่วนใหญ่ในเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพพบว่าเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ เช่น โพรลีน (Proline) อาร์จินีน (Arginine) และไลซีน (Lysine) (Dziuba *et al.*, 1999; Kitts and Weiler, 2003; Korhonen and Pihlanto, 2003) โดยปกติแล้วเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพนั้นจะมีความปลอดภัย เพราะร่างกายของพวกเราก็ย่อยโปรตีนแล้วได้เปปไทด์และนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายอยู่แล้ว (Wang and Gonzalez De Mejia, 2005; Phelan *et al.*, 2009) นอกจากนี้ในกระบวนการในการผลิตเปปไทด์จะต้องอาศัยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนที่เป็นชนิดที่ใช้ในอาหาร ทั้งนี้ก็เพื่อเพิ่มความมั่นใจต่อการนำเปปไทด์ไปใช้ในมนุษย์ (Udenigwe and Aluko, 2012) การศึกษาผลของเปปไทด์ต่อการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง พบว่า การใช้เอนไซม์ในการแยกเปปไทด์ออกจากถั่วเหลืองหลายๆ พันธุ์ มีเปปไทด์ชนิด Beta-Conglycinins ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ (Wang *et al.*, 2008) เช่นเดียวกันกับ เปปไทด์ที่แยกมาจากเศษเหลือของปลาทูน่า (Tuna dark muscle) โดยใช้เอนไซม์ชนิด papain และ protease ในการย่อยเปปไทด์ ผลที่ได้พบว่าสามารถผลิตเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่

2 ชนิด โดยทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ (Hsu *et al.*, 2011)

กระบวนการหมักรำข้าวด้วยโปรไบโอติก *Saccharomyces boulardii* สามารถแปลงเปลี่ยนคือ เพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมากทั้งปริมาณและชนิด นอกจากนั้นเมื่อนำรำข้าวที่หมักแล้วมาสกัดและทดสอบกับเซลล์มะเร็ง (B lymphomas) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ (Ryan *et al.*, 2011) นอกจากนั้นผลจากการศึกษาของ Kook *et al.* (2010) ที่พบว่า ปริมาณ alpha-Aminobutyric acid (GABA) มีปริมาณที่เพิ่มมาจากรำข้าวที่หมักด้วย *Lactobacillus sakei* B2-16 บทบาทของ *B. subtilis* ต่อการหมักสมุนไพรนั้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเช่นกัน จากรายงานของ Lim *et al.* (2010) ที่ทำการหมักโสม (ginseng) ด้วยแบคทีเรีย *Bacillus spp.* 15 วัน แล้วทำให้แห้ง พบว่าในโสมที่หมักนั้นมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น

B. subtilis MP9 เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกมาจากถั่วเน่า และเมื่อทำการศึกษาผลของโปรไบโอติกดังกล่าวต่อโภชนาการทางอาหารของถั่วเหลืองหมักพบว่า หลังจากการหมักถั่วเหลือง 24 - 48 ชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณเปอร์เซ็นต์ของโปรตีน ปริมาณ soluble protein และปริมาณ reducing sugar มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการหมักอย่างมีนัยสำคัญ (Thirabunyanon and Thongwittaya, 2007) นอกจากนั้นเมื่อนำ *B. subtilis* MP9 ดังกล่าวไปผลิตเป็นโปรไบโอติกแห้งในรูปแบบผงและประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคท้องร่วงในลูกสุกรตอนนม ผลที่ได้พบว่า *B. subtilis* MP9 สามารถลดอัตราการท้องร่วงในลูกสุกรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Maneewan *et al.*, 2011)

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากรำข้าวในรูปแบบต่างๆ ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งในประเทศไทยเรานั้นยังไม่มี ทั้งๆ ที่ในบ้านเรายังมีรำข้าวซึ่งเป็นเศษเหลือทางการเกษตรจากการแปรรูปข้าวเปลือกไปเป็นข้าวสารขาวนั้น มีเหลืออยู่จำนวนมากและมีราคาถูก นอกจากนั้นเรายังสามารถที่จะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระบวนการหมัก หรือผลิตเปปไทด์ต้านมะเร็งที่เป็นชนิดใหม่ของเราได้ เนื่องจากบ้านเรามีพันธุ์ข้าวที่ต่างจากประเทศอื่น พร้อมกันนั้นยังสามารถใช้กระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เป็นชนิดที่คัดเลือกขึ้นมาเองมาหมัก ทั้งนี้เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือนำโปรตีนจากรำข้าวมาหมักเพื่อช่วยย่อยสลายโปรตีนไปเป็นเปปไทด์หลายๆ ชนิด ด้วยเหตุที่ความแตกต่างของเปปไทด์ที่แยกได้แต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับแหล่งของโปรตีนในที่นี้ก็คือโปรตีนรำข้าวที่เป็นของประเทศไทยเรา ยิ่งรวมไปถึงชนิดของเอนไซม์ที่ช่วยย่อยโปรตีน และกระบวนการในการย่อยที่รวมไปถึงระดับความเป็นกรดหรือด่างระยะเวลา อุณหภูมิที่ช่วยย่อยและกระบวนการย่อยจากจุลินทรีย์ (Wang *et al.*, 2005; Udenigwe and Aluko, 2012) เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1. เมล็ดพันธุ์ข้าวที่นำมาสีเพื่อแยกรำข้าว

1.1.1. ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล เป็นข้าวที่ทำการเกษตรแบบอินทรีย์จาก อำเภอ
พริ้ว จังหวัดเชียงใหม่

1.2. เซลล์สายพันธุ์ของเซลล์มะเร็ง

2.1.1. เซลล์ HepG2 (ATCC, USA) เซลล์มะเร็งตับ

2.1.2. เซลล์ Caco-2 (ATCC, USA) เซลล์มะเร็งลำไส้

1.3. แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ใช้หมักรำข้าว

1.3.1 *Bacillus subtilis* MP9

1.4. อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

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

1.4.2 Fetal bovine serum (Gibco™)

1.5. อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.5.1 อาหารแข็งสูตร Nutrient Agar (NA) (Criterion, USA)

1.5.2 อาหารเหลวสูตร Nutrient Broth (NB) (Criterion, USA)

1.6. เอนไซม์ สารเคมี และวัสดุวิทยาศาสตร์

1.6.1 Pepsin (Sigma, USA)

1.6.2 Pancreatin (Sigma, USA)

1.6.3 Gallic acid (Sigma, USA)

1.6.4 Sodium chloride (NaCl)	(Merk, Germany)
1.6.5 Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	(Merk, Germany)
1.6.6 Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA)	(Ajax Finechem, Austraria)
1.6.7 Emulsion oil	(Merk, Germany)
1.6.8 Trypan blue	(Sigma-Aldrich, USA)
1.6.9 Trysin EDTA	(Hyclone, USA)
1.6.10 Absolute ethanol	(Merk, Germany)
1.6.11 Glycerol	(Merk, Germany)
1.6.12 Hydrochloric acid	(Merk, Germany)
1.6.13 Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	(Merk, Germany)
1.6.14 Sodium hydroxide	(Merk, Germany)
1.6.15 Fetal calf serum	(Hyclone, USA)
1.6.16 Non-essential amino acid	(Hyclone, USA)
1.6.17 Penicillin-streptomycin	(Hyclone, USA)
1.6.18 Methoxyamine hydrochloride	(Sigma, USA)
1.6.19 N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide	(Sigma, USA)
1.6.20 Trimethylchlorosilane	(Sigma, USA)
1.6.21 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	(Sigma, USA)
1.6.22 Folin-Ciocalteus's phenol reagent	(Merk, Germany)
1.6.23 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	(Sigma, Germany)
1.6.24 Potassium persulphate	(Ajax, Australia)
1.6.25 Sodium acetate (trihydrate)	(Labscan, Thailand)
1.6.26 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	(Sigma, Switzerland)
1.6.27 IRON(III) chloride anhydrous	(Ajax, Australia)
1.6.28 IRON(II) sulphate	(Ajax, Australia)
1.6.29 Acetic acid	(Merck, Germany)
1.6.30 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide	(Sigma, USA)
1.6.31 DMSO	(Sigma, USA)

1.7. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.7.1 ตู้บ่ม (Oven, ยี่ห้อ Menmert, Germany)
- 1.7.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 และ 4 ตำแหน่ง
- 1.7.3 เครื่องเขย่า
- 1.7.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 1.7.5 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 1.7.6 ตู้บ่ม (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240(E2), USA)
- 1.7.7 ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator, ยี่ห้อ Forma Scientific, รุ่น 3111, USA)
- 1.7.8 ตู้อบเครื่องแก้ว (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED115 (E2), USA)
- 1.7.9 ตู้อบเครื่องแก้ว (High Performance Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240 (E2), USA)
- 1.7.10 ตู้เขี่ยเชื้อ (Horizontal type laminar flow, ยี่ห้อ Triwork 2000 รุ่น CLEAN H2-3, ประเทศไทย)
- 1.7.11 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer, ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-592, Japan)
- 1.7.12 ตู้ฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave, ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50, Japan)
- 1.7.13 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscope, ยี่ห้อ Olympus รุ่น UM 500)
- 1.7.14 กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope, Olympus, ULWCD 0.30)
- 1.7.15 พีเอชมิเตอร์ (pH/Ion/Conductivity, ยี่ห้อ WTW รุ่น PP50)
- 1.7.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath/Unstirred digital bath, ยี่ห้อ Julabo Labortechnik GMBH รุ่น TW12)
- 1.7.17 ถังไนโตรเจนเหลว (TAYLOR-WHARTON, XT-20, USA)
- 1.7.18 ไมโครปิเปต ปรับปริมาตรได้ขนาด 0-20, 20-200 และ 100-1,000 มิลลิลิตร
- 1.7.19 Nylon syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)
- 1.7.20 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)

1.8. ภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์และภาชนะอื่น

- 1.8.1 ฟลาสค์เลี้ยงเซลล์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.8.2 ถาดหลุม 24 หลุม
- 1.8.3 ถาดหลุม 96 หลุม
- 1.8.4 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- 1.8.5 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
- 1.8.6 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
- 1.8.7 บีกเกอร์ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.8.8 ปีเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างรำข้าว

ตัวอย่างรำข้าวจะรวบรวมข้าวที่มีการปลูกแบบอินทรีย์ เพื่อป้องกันการเจือปนของสารเคมีในรำข้าว โดยทำการซื้อพันธุ์ข้าวอินทรีย์เองเพื่อทำการคัดเลือกข้าวพันธุ์อื่นทิ้งก่อน ซึ่งปกติมักจะมีการปลอมปนอยู่เสมอ โดยซื้อพันธุ์ข้าว 2 ชนิด คือ ข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวหอมนิล นำข้าวไปสีด้วยโรงสีขนาดเล็ก และทำการเก็บรวบรวมรำข้าวเพื่อทำการทดลองต่อไป จากนั้นจะนำรำข้าวมาผ่านกระบวนการให้เกิดความคงทนต่อความเสถียรภาพ (heat stabilized) โดยผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น (Ryan *et al.*, 2011)

2.2 การวิเคราะห์ทางองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว (Proximate analysis)

2.2.1 ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนจากรำข้าว โดยการนำรำข้าวมาชั่งน้ำหนัก 0.3 กรัม และทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของเจลดาล์ (Kjeldahl) (AOAC, 2005) โดยการนำรำข้าวไปย่อยด้วยเครื่องย่อย แล้วนำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน และนำไปไตเตรทด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น

0.1 นอร์มอล

2.2.2 ปริมาณไขมัน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันในรำข้าวโดยวิธีซอกซ์เลท (Soxhlet) (AOAC, 2005) โดยการนำรำข้าวมาชั่งน้ำหนัก 1 กรัม แล้วนำไปใส่ในชุดสกัดไขมันทิมเบล ทำการสกัดไขมันด้วยเฮกเซน โดยใช้อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 102 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้นให้เย็น จากนั้นทำการชั่งน้ำหนัก

2.2.3 ปริมาณความชื้น

ทำการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในรำข้าวตามวิธีการของ AOAC (AOAC, 2000) โดยการนำรำข้าวมาชั่งน้ำหนัก 2 กรัม ในถ้วยอลูมิเนียม แล้วนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 103 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้นให้เย็น จากนั้นทำการชั่งน้ำหนัก

2.2.4 ปริมาณเถ้า

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในรำข้าวตามวิธีการของ AOAC (AOAC, 2000) โดยการนำรำข้าวมาชั่งน้ำหนัก 2 กรัม ในถ้วยครุชเชิล จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เถ้าที่มีสีขาว จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นให้เย็น แล้วทำการชั่งน้ำหนัก

2.3 ศึกษาหาปริมาณผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าว ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, ABTS⁺, FRAP)

โดยการนำรำข้าวที่ผ่านการอบแล้วพันธุ์ละ 100 กรัม มาสกัดเพื่อหาปริมาณผลผลิตของสารสกัดและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สารสกัดเมทานอล (methanol) 80 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สัดส่วนรำข้าวต่อเมทานอลเท่ากับ 5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง (เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที) จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำสารสกัดที่อยู่ข้างบนมารองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารสกัดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporation จากนั้นนำสารสกัดไปทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (freeze dry) จนกว่าจะเหลือเฉพาะสารสกัดเท่านั้น

2.3.1 ปริมาณผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าว

ผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าวเป็นสารสกัดที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยรวมที่สกัดได้ด้วยเมทานอล กล่าวคือเป็นรูปแบบสารสกัดที่สามารถนำไปใช้ได้เลย อัตราส่วนหรือร้อยละของผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าวสามารถคำนวณได้จาก ปริมาณรำข้าวเริ่มต้นก่อนการสกัด คือ รำข้าวแต่ละสายพันธุ์เริ่มต้น 100 กรัม เทียบกับสารสกัดที่ผ่านการนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็นเรียบร้อยแล้ว

2.3.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds)

โดยวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดตามวิธีการของ Dewanto *et al.* (2002) โดยเริ่มต้นจากการทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ก่อนจะเติมโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 3 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน

2.3.3 DPPH radical scavenging activity

การวิเคราะห์นี้ดัดแปลงจาก วิธีการของ Butsat and Siriamormpun, (2010) โดยทำการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการดูดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม DPPH ที่ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 3.8 มิลลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยมีการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ (blank)

วิธีการคำนวณ

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

2.3.4 ABTS⁺ radical scavenging activity

การวิเคราะห์นี้ดัดแปลงจากวิธีการของ Re *et al.* (1999) โดยทำการเตรียม ABTS radical cation stock solution โดยเตรียมจากซัง ABTS 0.0360 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิตร (7 มิลลิโมลาร์) และซังโปแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต 0.3784 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิตร (140 มิลลิโมลาร์) หลังจากนั้นผสม ABTS 10 มิลลิตร กับโปแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต 176 ไมโครลิตร ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนของ ABTS radical cation stock solution : น้ำกลั่น 1 : 75 มิลลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายอนุมูล ABTS⁺ จำนวน 2.5 มิลลิตร มาผสมกับสารละลายตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิตร (ทำทั้งหมด 5 ความเข้มข้น) ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่มืดเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer แล้วคำนวณหาค่า IC₅₀ (mg/mL) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใช้ และ % inhibition

2.3.5 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

การวิเคราะห์นี้ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Yen and Chen, (1995) ซึ่งทำการวัดค่าความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) โดยการดูความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบเฟอริก โดยทำการผสม acetate buffer (pH 3.6) 300 มิลลิโมลาร์ Ferric chloride solution 20 มิลลิโมลาร์ และ TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) solution 10 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 หลังจากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แล้วนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารที่เตรียม 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีความสามารถในการรีดิวซ์ได้มากขึ้น โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4)

2.4 ศึกษาชนิดและการเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวที่หมักด้วย

B. subtilis MP9

2.4.1 กระบวนการหมักรำข้าวด้วย *B. subtilis* MP9

วิธีการในการหมักรำข้าวเริ่มต้นด้วยการนำรำข้าว 1.5 กรัม มาเติมในหลอดที่มีน้ำกลั่นอยู่ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 ลงไป 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่บ่มทำการกวนพลาสติกตลอดการทดลอง ในขณะที่กลุ่มควบคุมก็ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่จะไม่มีเติมแบคทีเรียโปรไบโอติก (ดัดแปลงมาจากการทดลองของ Sindhu and Khetarpaul, 2002; Ryan *et al.*, 2011)

2.4.2 ศึกษาชนิดและปริมาณของสาร และหรือออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวหมักด้วย *B. subtilis* MP9

เมื่อหมักเสร็จเรียบร้อยแล้วนำรำข้าวหมักมาสกัดด้วย isopropanol : acetonitrile : water ในสัดส่วน 3 : 2 : 2 หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย GC-MS (Ryan *et al.*, 2011)

2.5 การผลิตเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าว

2.5.1 การสกัดน้ำมันรำข้าว

โดยการนำรำข้าวมาสกัดแยกน้ำมันรำข้าวออก โดยใช้เฮกเซน (food grade) เป็นสารสกัด โดยใช้อัตราส่วนของเฮกเซนและรำข้าวเท่ากับ 3 : 1 จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ

250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำรำข้าวที่สกัดไขมันออกแล้วไประเหยให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 1 คืน (Wang *et al.*, 1999)

2.5.2 การสกัดโปรตีนรำข้าว

กระบวนการสกัดโปรตีนจากรำข้าว (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2008; Fabian *et al.*, 2010) จะเริ่มจากการนำรำข้าวที่สกัดน้ำมันออกไปแล้วมาบดและคัดขนาด โดยการใช้ตะแกรงร่อนขนาด 60 mesh จากนั้นนำรำข้าว 10 กรัม มาผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยปรับให้ได้ pH 10 แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 - 55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเอาส่วนใส (supernatant) ไปปรับให้ได้ pH 4 ด้วย 1 N HCl นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 - 55 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 20 นาที ส่วนที่ตกตะกอนจะเป็นโปรตีนรำข้าว การเก็บรักษาโปรตีนรำข้าวนั้นจะนำโปรตีนไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น แล้วเก็บรักษาไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป

2.5.3 การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Protease) จาก *B. subtilis* MP9

โดยทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* MP9 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Nutrient Broth (NB) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องเขย่าที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสมาผ่านกระบวนการตกตะกอน ด้วยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ความอิ่มตัว 85%) โดยการเติมอย่างช้าๆ ลงในสารละลายส่วนใส และทำการกวนตลอดเวลาจนกระทั่งละลายจนหมด แล้วทำการกวนต่อเนื่องทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อจากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนโปรตีนในสภาวะอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบที่ 5,000 g เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายกลับด้วยสารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer ที่ pH 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายโปรตีนทั้งหมดไปใส่ในถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุน 12 kDa Cut-off เพื่อกำจัดเกลือ แล้วนำถุงมาแช่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer ที่ pH 7.0 โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการกวนตลอดเวลา แล้วนำส่วนสารละลายโปรตีนที่ได้ทั้งหมดไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น และทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดที่เหลืออยู่ต่อไป (Kiers *et al.*, 2000; Inatsu *et al.*, 2002; Inatsu *et al.*, 2006)

2.5.4 การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9

การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยเริ่มต้นจากการนำตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้ 0.01 กรัม ไปละลายด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรตและบัฟเฟอร์โดยการเตรียมสารละลายผสมทั้งหมด 4 หลอด ได้แก่

หลอดที่ 1 (ES) : สารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร + สารละลาย (1%) Casien (bovine milk) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 2 (EB) : สารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร + สารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer ที่ pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 3 (SB) : สารละลาย (1%) Casien (bovine milk) 1 มิลลิลิตร + สารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer ที่ pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

หลอดที่ 4 (BB) : สารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer ที่ pH 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการวัดกิจกรรมเอนไซม์โดยนำสารละลายแต่ละหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาเคมีด้วยสารละลาย 0.4M โมลาร์ trichloroacetic acid 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 0.25 มิลลิลิตร ไปผสมกับสารละลาย 0.4 โมลาร์ sodium carbonate 1.25 มิลลิลิตร และ Folin-ciocalteau reagent 0.15 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (tyrosine) เพื่อทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (ดัดแปลงมาจาก วิธีการของ Chantawannakul *et al.*, 2002)

(1 ยูนิต ของเอนไซม์โปรติเอส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยไทโรซีนออกมา 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่วิเคราะห์)

2.5.5 การย่อยโปรตีนรำข้าวเพื่อผลิตเปปไทด์ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9

โดยการนำโปรตีนรำข้าว 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปปรับให้เป็น pH 8 จากนั้นเติมเอนไซม์โปรติเอสที่มีความเข้มข้น 10 U/g ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าโดยกำหนดสภาวะอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที ใช้เวลาในการย่อยที่ 2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปแช่ในอ่างควบคุม

อุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 g เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเปปไทด์ที่ได้จะอยู่ส่วนใส โดยการนำส่วนใสไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น และเก็บรักษาเปปไทด์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองต่อไป (Li *et al.*, 2007; Kannan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012)

2.6 การทดสอบเปปไทด์ที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลองของมนุษย์

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

2.7 การทดสอบเปปไทด์ที่สภาวะบริเวณลำไส้จำลองของมนุษย์

โดยการเตรียมเปปไทด์ที่ผ่านการทดสอบต่อสภาวะกระเพาะอาหารแล้วที่อยู่ในรูปผง 2.5 กรัม มาเติมในของเหลวที่จำลองสภาวะที่อยู่บริเวณลำไส้ของมนุษย์ (Takagi *et al.*, 2003; Israel-Ballard *et al.*, 2005; Kannan *et al.*, 2008) โดยของเหลวดังกล่าวประกอบด้วยน้ำกลั่นประมาณ 90 มิลลิลิตร โปตัสเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิก 0.68 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 N ปริมาตร 7.7 มิลลิลิตร ทำการผสมของเหลวให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับให้ได้ pH 8 แล้วเติมเอ็นไซม์แพนครีเอติน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเติมเปปไทด์รำข้าวที่ผ่านการทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลองแล้ว ทำการกวนของเหลวให้สม่ำเสมอเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับอุณหภูมิไปที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอ็นไซม์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที เปปไทด์รำข้าวที่ถูกย่อยด้วยสภาวะจำลองของลำไส้ดังกล่าวจะอยู่ในส่วนใส และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.8 การคัดแยกขนาดของเปปไทด์รั้าขาว

โดยการนำเปปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่สภาวะลำไส้จำลองของมนุษย์แล้วมาคัดแยกขนาด โดยใช้วิธีการแบบ ultrafiltration ซึ่งจะคัดแยกขนาดตามน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ ได้แก่ มีขนาดน้อยกว่า 3 อยู่ในช่วง 3 - 5 อยู่ในช่วง 5 - 10 อยู่ในช่วง 30 - 50 และมากกว่า 50 kDa (Kannan *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2010) หลังจากแยกขนาดเสร็จเรียบร้อยแล้ว ทำการนำเปปไทด์แต่ละขนาดไปเข้าเครื่องทำแห้งด้วยความเย็นเพื่อทำให้แห้งแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อไป

2.9 การทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและลำไส้

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในครั้งนี้ จะทดสอบกับเซลล์มะเร็งของโรคมะเร็งที่พบเป็นอันดับต้นๆ ของโรคมะเร็งที่พบทั้งหมดในประเทศไทยของเรา ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ซึ่งแหล่งของเซลล์มะเร็งดังกล่าวจะมาจาก American Type Culture Collection (ATCC)

(1). การเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์มะเร็งจะเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ดังกล่าวจะนำมาเลี้ยงเพื่อทำการเก็บสำรองไว้เป็นหลายๆ หลอด ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จากนั้นจะนำเพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงด้วยอาหารที่เหมาะสมแล้วเสริมด้วย Fetal bovine serum 10% ก่อนเดิมต้องนำไปให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีก่อนใช้ 1% (v/v) non essential amino acid และยาปฏิชีวนะ 1% Penicillin-streptomycin (10,000 IU/ml และ 10,000 µg/ml) เซลล์มะเร็งจะเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีการปรับสภาวะให้ปลอดภัย มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ทั้งนี้เพื่อเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์มะเร็งให้ได้จำนวนที่เพียงพอสำหรับการศึกษาทดลอง

(2). MTT Assay โดยเริ่มจากการทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งให้โตเต็มที่และมีปริมาณเพียงพอต่อการทดลองในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเซลล์มะเร็งโตเต็มที่และมีจำนวนเพียงพอแล้ว นำเซลล์มะเร็งมานับจำนวนที่มีชีวิตโดยใช้สีย้อม trypan blue และปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ 100 ไมโครลิตร ไปหยอดลงในถาดหลุมขนาด 96 หลุมต่อถาด บ่มในตู้บ่มเพื่อให้เซลล์มะเร็งได้ปรับสภาพ 24 ชั่วโมง การทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์โดยการนำเปปไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ มีขนาดน้อยกว่า 3 อยู่ในช่วง 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และมากกว่า 50 kDa มาเจือจางความเข้มข้นที่ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเซลล์มะเร็งในตู้บ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ก็นำเปปไทด์แต่ละความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร มาหยอดใส่หลุมในแต่ละหลุม (โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และทำการทดลองต่อเนื่องกันอีก 4 ครั้ง) แล้วนำไปบ่มต่อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเติมด้วยสารละลาย MTT (0.5 mg/ml

DMSO) 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่อในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจวัดจำนวนเซลล์มะเร็งที่รอดชีวิตด้วย Microplate reader ที่ 595 nm (ศึกษาตามวิธีการของ Thirabunyanon *et al.*, 2009; Thirabunyanon and Hongwittayakorn, 2013)

(3). การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็ง (Cell morphology) การศึกษาเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งด้วยกล้อง fluorescence microscope โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งให้โตเต็มที่และให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทดลองในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นนำเซลล์มะเร็งมานับจำนวนที่มีชีวิตโดยใช้สีย้อม trypan blue และปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการนำเซลล์ 1 มิลลิลิตร ไปหยอดลงในถาดหลุมขนาด 24 หลุมต่อถาด หลุมละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพื่อให้เซลล์มะเร็งได้ปรับสภาพ 24 ชั่วโมง การทดสอบประสิทธิภาพของเปปไทด์โดยการนำเปปไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ มีขนาดน้อยกว่า 3 อยู่ในช่วง 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และมากกว่า 50 kDa มาเจือจางความเข้มข้นที่ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อบ่มเซลล์มะเร็งในตู้บ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ก็นำเปปไทด์ตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร มาหยอดใส่หลุม (โดยทำการทดลองกลุ่มละ 4 ซ้ำ) แล้วนำไปบ่มต่อในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ ทั้งในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งลำไส้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

ผลการวิจัย

1. ปริมาณรำข้าวที่คัดแยกได้จากข้าวเปลือกที่มีการทำการเกษตรอินทรีย์

ข้าวเปลือกอินทรีย์ที่ซื้อมาจากกลุ่มเกษตรอินทรีย์ อำเภอพร้าวกะเทียม จังหวัดเชียงใหม่ ทั้ง 2 พันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล พันธุ์ละ 30 กิโลกรัม จากนั้นนำมาคัดแยกสิ่งเจือปนออกให้หมด แล้วนำมาสีด้วยเครื่องสีข้าวขนาดเล็กเพื่อแยกรำข้าว นำรำข้าวมากรองผ่านตะแกรงเบอร์ 60 (ขนาดรูกรอง 354 ไมครอน) พบว่าได้ปริมาณรำข้าวหอมดอกมะลิ 1,457.4 กรัม และข้าวหอมนิล 1,296.9 กรัม หลังจากนั้นได้นำรำข้าวไปอบ (heat stabilize) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และเก็บรำข้าวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. คุณค่าทางโภชนาการของรำข้าว

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของรำข้าว โดยการนำรำข้าวที่ผ่านกระบวนการ heat stabilize แล้วไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เช่น โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า เป็นต้น ผลที่ได้พบว่าปริมาณโปรตีนจากรำข้าวหอมนิลมีสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 คือ ร้อยละ 13.9 และ 11.9 ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณของไขมันที่พบว่าไขมันในรำข้าวหอมนิลมีค่อนข้างสูงกว่าไขมันในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 คือ ร้อยละ 18.9 และ 17.4 ตามลำดับ ในขณะที่ความชื้นในรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน คือ มีความชื้นร้อยละ 11.3 และ 11.4 ในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และในรำข้าวหอมนิลตามลำดับ ส่วนปริมาณเถ้าในรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีเถ้าในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 สูงกว่าเถ้าจากรำข้าวหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ ร้อยละ 4.9 และ 4.6 ในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และในรำข้าวหอมนิลตามลำดับ (ตารางที่ 1)

3. ปริมาณผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าว

ผลจากการนำรำข้าวที่ผ่านการอบแล้วสายพันธุ์ละ 100 กรัม มาสกัดโดยใช้สารสกัดเมทานอล และนำสารสกัดไปทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น จนกระทั่งเหลือเฉพาะสารสกัดจากรำข้าวเท่านั้น โดยพบว่าได้ปริมาณสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 เท่ากับ 19.98 กรัม หรือร้อยละ 19.98 ในขณะที่ได้สารสกัดจากรำข้าวหอมนิล 21.89 กรัม หรือร้อยละ 21.89 ทั้งนี้พบว่าผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลนั้นมีปริมาณของสารสกัดสูงกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ตารางที่ 1 ปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล (Means \pm SD, n =3)

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์	
	ข้าวหอมดอกมะลิ 105	ข้าวหอมนิล
โปรตีน	11.97 \pm 0.17 ^a	13.88 \pm 0.30 ^b
ไขมัน	17.40 \pm 0.68	18.86 \pm 0.62
ความชื้น	11.35 \pm 0.06	11.24 \pm 0.58
เถ้า	4.95 \pm 0.03 ^a	4.60 \pm 0.03 ^b

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

4. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากรำข้าว

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในครั้งนี้ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลจากรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณในระดับที่แตกต่างกัน คือปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 24.11 mgGAE/g ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยจากรำข้าวหอมนิล เท่ากับ 70.04 mgGAE/g (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดด้วยเมทานอลของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล (Means \pm SD, n =3)

รำข้าวสกัด	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/g)
ข้าวหอมดอกมะลิ 105	24.11 \pm 0.89 ^a
ข้าวหอมนิล	70.94 \pm 0.85 ^b

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

5. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรำข้าว

5.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากทั้งรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิล พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากทั้งรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างกัน กล่าวคือสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เท่ากับ 56.14 และ 83.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล (Means \pm SD, n =3)

รำข้าวสกัด	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (เปอร์เซ็นต์)
ข้าวหอมดอกมะลิ 105	56.14 \pm 0.63 ^a
ข้าวหอมนิล	83.36 \pm 0.59 ^b

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

5.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิล โดยพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดจากทั้งรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างกัน คือ สารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ (IC₅₀) น้อยกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.056 และ 0.316 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล (Means \pm SD, n =3)

รำข้าวสกัด	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ⁺ (IC ₅₀)
ข้าวหอมดอกมะลิ 105	0.316 \pm 0.003 ^a
ข้าวหอมนิล	0.056 \pm 0.002 ^b

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

5.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล

โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดจากทั้งรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิลนั้น พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดจากทั้งรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างกัน กล่าวคือสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP น้อยกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เท่ากับ 358.80 และ 835.88 $\mu\text{mol/Fe}^{2+}/\text{g}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

6. การเปลี่ยนแปลงของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิลหมักด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9

การหมักรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติก *B. subtilis* MP9 นั้น แบคทีเรียโปรไบโอติกดังกล่าวสามารถหมักรำข้าวได้ และนอกจากนั้นยังสามารถผลิตสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้เกิดขึ้นได้ หรือให้ผลผลิตมากขึ้นกว่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทำการหมัก โดยการตรวจสอบชนิดและปริมาณของสาร และหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวนี้ด้วยเครื่อง GC-MS

ตารางที่ 5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล (Means \pm SD, n =3)

รำข้าวสกัด	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ($\mu\text{mol/Fe}^{2+}/\text{g}$)
ข้าวหอมดอกมะลิ 105	358.80 \pm 3.59 ^a
ข้าวหอมนิล	835.88 \pm 3.74 ^b

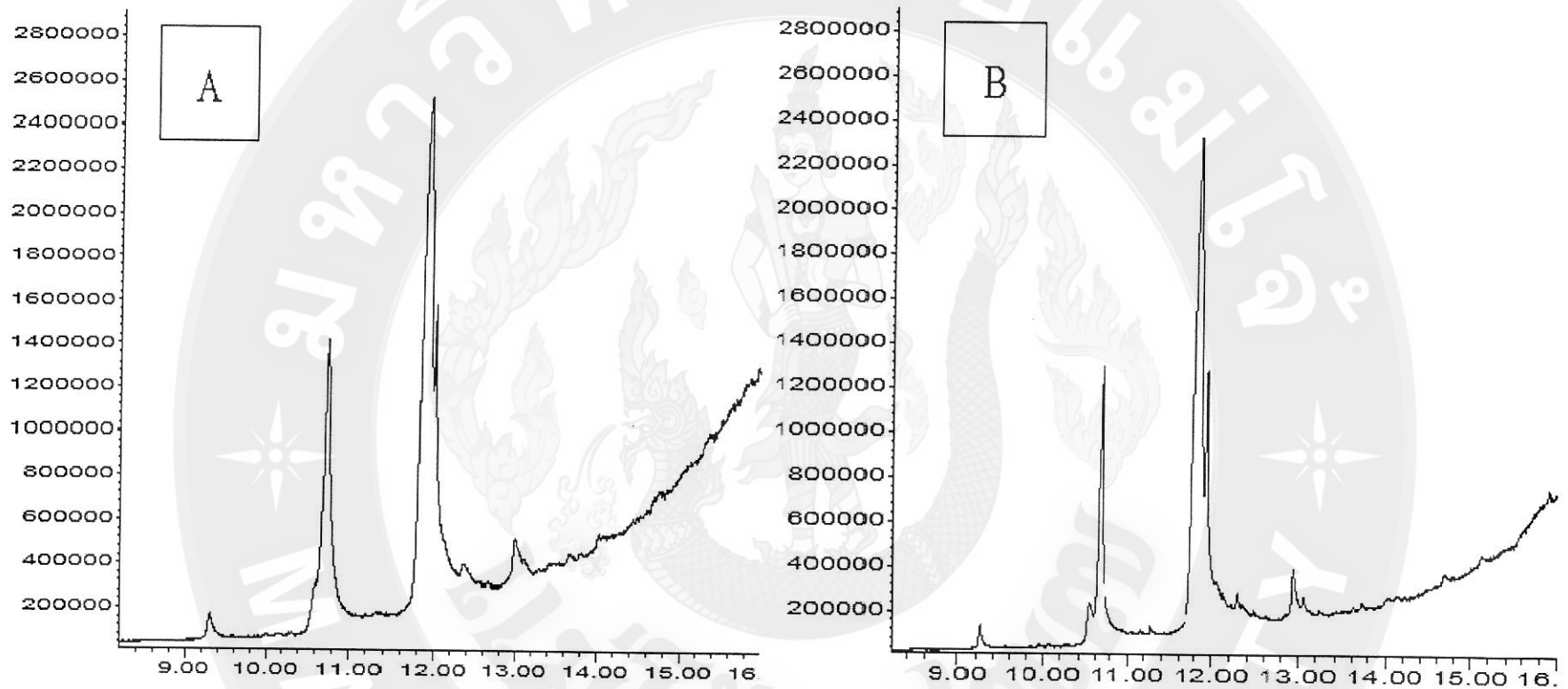
หมายเหตุ ^{a,b}แสดงค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างสายพันธุ์ ($P < 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร และหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 พบว่ามีปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่หมัก (ตารางที่ 6 และรูปที่ 1 A) และกลุ่มที่ไม่ได้หมักด้วย *B. subtilis* MP9 (ตารางที่ 6 และรูปที่ 1 B) โดยเปรียบเทียบจากลักษณะของพีคและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดของกลุ่มที่หมักมีสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้หมัก เช่น tetradecanoic acid, 9-octadecenoic acid และ octadecanoic acid เป็นต้น ในขณะที่เดียวกันในกลุ่มที่หมักดังกล่าวจะไม่มี linoleic acid และ oleic acid แต่กรดทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวนี้จะมีในกลุ่มที่ไม่ได้หมักรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ด้วย *B. subtilis* MP9

ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร และหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมนิล ด้วย *B. subtilis* MP9 (ตารางที่ 7 และรูปที่ 2 C) และกลุ่มที่ไม่ได้หมักด้วย *B. subtilis* MP9 (ตารางที่ 7 และรูปที่ 2 D) พบว่ามีปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวในกลุ่มที่หมัก โดยเปรียบเทียบจากลักษณะของพีคและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น 9,17-octadecadienal และ linoleic acid ซึ่งสารดังกล่าวนี้จะไม่พบในกลุ่มที่ไม่ได้หมักเลย นอกจากนั้นในกลุ่มที่หมักนี้ยังมีปริมาณ octadecanoic acid และ oleic acid เพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้หมัก แต่อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่ไม่ได้หมักจะมีปริมาณ hexadecanoic acid และ 9-octadecenoic acid เพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการหมักรำข้าวหอมนิลด้วย *B. subtilis* MP9

ตารางที่ 6 ปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมักและไม่ได้หมักด้วย *B. subtilis* MP9

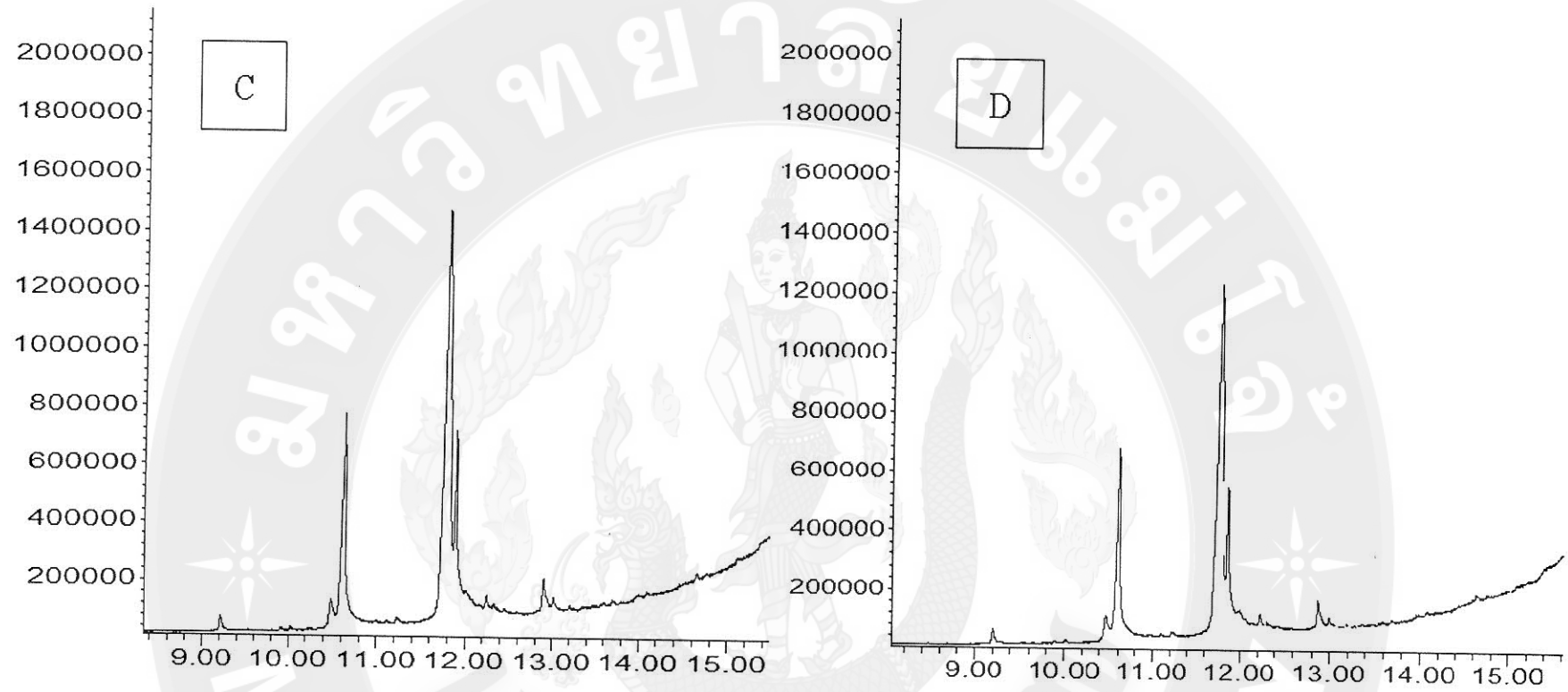
ข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมัก			ข้าวหอมดอกมะลิ 105 ไม่ได้หมัก		
เวลา	ปริมาณสาร (เปอร์เซ็นต์)	ชื่อสาร	เวลา	ปริมาณสาร (เปอร์เซ็นต์)	ชื่อสาร
9.29	0.95	Tetradecanoic acid	9.26	1.32	Tetradecanoic acid
10.58	2.74	9-Hexadecenoic acid	10.53	2.33	(+)-15-Hexadecanolide \$\$ Oxacyclo
10.72	15.84	Tetradecanoic acid	10.69	17.93	Hexadecanoic acid
11.9	39.96	9-Octadecenoic acid	11.86	36.42	9-Octadecenoic acid
11.99	13.17	Octadecanoic acid	11.95	10.15	Octadecanoic acid
12.33	1.40	9,12-Octadecadienoic acid	12.08	2.77	Linoleic acid
12.98	2.31	9-Octadecenoic acid	12.29	1.37	9,12-Octadecadienoic acid
13.09	0.81	1-Docosene	12.94	3.13	9-Octadecenoic acid
13.65	0.27	9-Octadecenoic acid	13.63	0.25	(Z,Z)-3,13-octadecadien-1-ol
13.78	0.21	9-Octadecenoic acid (Z)-	13.74	0.36	9-Octadecenoic acid
14.06	0.36	9-Octadecenoic acid (Z)	14.03	0.52	9-Octadecenal
14.17	0.14	Cyclotetradecane, 1,7,11-trimethyl	14.22	0.12	(Z,Z)-3,13-octadecadien-1-ol
14.73	0.58	9-Octadecenoic acid	14.7	0.98	Oleic Acid
			14.8	0.40	9-Octadecenoic acid



รูปที่ 1 พีคปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (A) จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมักและ (B) จากรำข้าวไม่ได้หมักด้วย *B. subtilis* MP9

ตารางที่ 7 ปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมนิลหมักและไม่ได้หมักด้วย
B. subtilis MP9

ข้าวหอมนิลหมัก			ข้าวหอมนิลไม่หมัก		
เวลา	ปริมาณสาร	ชื่อสาร	เวลา	ปริมาณสาร	ชื่อสาร
	(เปอร์เซ็นต์)			(เปอร์เซ็นต์)	
9.24	0.613	Tetradecanoic acid	9.2	0.780	Tetradecanoic acid
10.51	1.617	15-Hexadecanolide	10.47	2.065	15-Hexadecanolide
10.65	12.023	Hexadecanoic acid	10.59	17.167	Hexadecanoic acid
11.82	31.437	9-Octadecenoic acid	11.77	34.708	9-Octadecenoic acid
11.92	8.532	Octadecanoic acid	11.89	8.005	Octadecanoic acid
12.02	2.120	9,17-Octadecadienal	12.00	2.740	9-Octadecenoic acid
12.27	0.483	Linoleic acid	13.00	0.793	Oleic Acid
12.92	1.560	9-Octadecenoic acid	14.62	0.730	9-Octadecenoic acid
13.04	0.505	9-Octadecenal			
13.72	0.865	Oleic Acid			
14.67	2.240	9-Octadecenoic acid			



รูปที่ 2 ฝึกปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (C) จากรำข้าวหอมนิลหมักและ (D) จากรำข้าวไม่ได้หมักด้วย *B. subtilis* MP9

7. กระบวนการผลิตเปปไทด์จากรำข้าวโดยเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9

7.1 ปริมาณของรำข้าวที่สกัดไขมันแล้วและปริมาณโปรตีนรำข้าว

หลังจากนำรำข้าวไปสกัดไขมันด้วยเฮกเซนแล้ว โดยพบว่าร้อยละของรำข้าวที่ไม่มีไขมันในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิล เท่ากับ 92.8 และ 92.97 ตามลำดับ และเมื่อนำรำข้าวที่ไม่มีไขมันดังกล่าวไปสกัดโปรตีนในขั้นตอนต่อมา พบว่าร้อยละของโปรตีนจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิลมีค่าเท่ากับ 9.92 และ 12.67 ตามลำดับ

7.2 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสและกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9

หลังจากการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและนำส่วนสารละลายโปรตีนที่ได้ทั้งหมดในขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งก็คือเอนไซม์โปรติเอสไปทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น โดยเอนไซม์แห้งที่ได้มีลักษณะสีเหลืองขาวติดกันเป็นแผ่น (รูปที่ 3) และเมื่อทำการนำเอนไซม์ดังกล่าวเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำเอนไซม์ดังกล่าวนี้ไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวยังมีกิจกรรมที่ดี เท่ากับ 15,400 U/g ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปย่อยโปรตีนรำข้าวเพื่อผลิตเป็นเปปไทด์จากรำข้าวในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3 ลักษณะแบบแห้งของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. subtilis* MP9

7.3 การย่อยโปรตีนรำข้าวเพื่อผลิตเปปไทด์ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9

ผลที่ได้จากการนำโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 และโปรตีนรำข้าวหอมนิลไปย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส พบว่าได้ปริมาณเปปไทด์รวม (crude peptide) ที่มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 เริ่มต้น 50 กรัม ถูกย่อยไปเป็นเปปไทด์รวมที่เป็นน้ำหนักแห้ง 20.77 กรัม คิดเป็นสัดส่วนที่ได้เปปไทด์เท่ากับ 41.54 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเริ่มต้น ในขณะที่โปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมนิลเริ่มต้น 60 กรัม ถูกย่อยไปเป็นเปปไทด์รวมที่เป็นน้ำหนักแห้ง 22.2 กรัม คิดเป็นสัดส่วนที่ได้เปปไทด์เท่ากับ 37.0 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเริ่มต้น ซึ่งผลผลิตเปปไทด์รวมที่ได้จากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีมากกว่าเปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวหอมนิลเมื่อผลิตโดยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9

8. การทนของเปปไทด์ที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลองของมนุษย์

ผลจากการนำเปปไทด์รวมที่ได้จากโปรตีนรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มาทดสอบการทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 จะเหลือผลผลิตน้ำหนักแห้งของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลองได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมนิล โดยมีค่าเท่ากับ 2.96 และ 3.34 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ความคงทนของเปปไทด์ที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลองของมนุษย์ (Means \pm SD, n =4)

เปปไทด์	น้ำหนักแห้งที่เหลือ (g)
ข้าวหอมดอกมะลิ 105	2.96 \pm 0.03 ^a
ข้าวหอมนิล	3.34 \pm 0.22 ^b

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

9. การทนของเปปไทด์ที่สภาวะลำไส้จำลองของมนุษย์

ผลจากการนำเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง มาทดสอบต่อเนื่องต่อการทนต่อสภาวะลำไส้จำลอง โดยพบว่าในขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอนที่จะต่อเนื่องไปถึงการแยกขนาดของเปปไทด์ กล่าวคือจะเอาส่วนใสที่อยู่ด้านบนไปคัดแยกขนาดของเปปไทด์หลังจากการปั่นเหวี่ยงในขั้นตอนสุดท้ายแล้ว โดยส่วนใสที่ได้จะปริมาตรที่แตกต่างกัน คือ มีส่วนใสที่มีเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลองเหลืออยู่ 90 ± 0.0 มิลลิลิตร จากเริ่มต้นที่ 100 มิลลิลิตร หรือเหลืออยู่ 90 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาตรเริ่มต้นของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ซึ่งมีปริมาตรที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใสที่มีเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลองเหลืออยู่ 95 ± 0.0 มิลลิลิตร จากเริ่มต้นที่ 100 มิลลิลิตร หรือเหลืออยู่ 95 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาตรเริ่มต้นของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิล

ทั้งนี้ยังพบมีความสอดคล้องกับน้ำหนักแห้งที่ได้เช่นเดียวกัน โดยผู้วิจัยได้นำส่วนใสดังกล่าวนี้จำนวนแต่ละสายพันธุ์เพียง 1 ตัวอย่าง ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น พบว่าน้ำหนักแห้งที่ได้ของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 เท่ากับ 2.39 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 2.5 กรัม หรือเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่น้ำหนักแห้งที่ได้ของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิล เท่ากับ 2.47 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 2.5 กรัม หรือเท่ากับ 98.8 เปอร์เซ็นต์

10. ขนาดของเปปไทด์ที่ผ่านการทนต่อสภาวะทางเดินอาหารจำลองของมนุษย์แล้ว

ผลจากการนำส่วนใสที่มีเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะลำไส้จำลอง ซึ่งหมายถึงทนได้ทั้งสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้จำลอง และสามารถเรียกโดยรวมว่าเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะทางเดินอาหารจำลองของมนุษย์แล้ว มาผ่านการคัดแยกขนาดของเปปไทด์โดยใช้วิธีการแบบ ultrafiltration โดยจะคัดแยกขนาดตามน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ ได้แก่ มีขนาดน้อยกว่า 3 อยู่ในช่วง 3 - 5 อยู่ในช่วง 5 - 10 อยู่ในช่วง 30 - 50 และมากกว่า 50 kDa โดยพบว่าขนาดของเปปไทด์ที่คัดแยกได้ดังกล่าวมีขนาดใหญ่ คือ มากกว่า 50 kDa ซึ่งมากกว่าเปปไทด์ขนาดเล็กกว่าอย่างมาก กล่าวคือเปปไทด์จากรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มีขนาดใหญ่กว่า 50 kDa มีค่าเท่ากับ 2.46 และ 2.41 กรัม จากจำนวนเปปไทด์เริ่มต้นที่ใช้แยกขนาด 2.5 กรัม ของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และหอมนิล ตามลำดับ หรือหากคิดสัดส่วนโดยรวมของเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 50 kDa จากรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีสัดส่วนที่ได้มากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

เปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 50 kDa ในแต่ละช่วงขนาด คือ น้อยกว่า 3 อยู่ในช่วง 3 - 5 อยู่ในช่วง 5 - 10 และอยู่ในช่วง 30 - 50 kDa พบว่าในแต่ละช่วงขนาดมีน้ำหนักไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ยกเว้นช่วงขนาดของเปปไทด์ขนาด 5 - 10 และ 30 - 50 kDa ที่เก็บข้อมูลได้เฉพาะตัวอย่างละ 1 ซ้ำ เท่านั้นเอง และพบว่าช่วงขนาดเปปไทด์ขนาด 3 - 5 kDa มีสัดส่วนน้ำหนักแห้งที่ได้มากกว่าขนาดอื่นๆ เฉพาะในรำข้าวหอมนิล หรือมีน้ำหนักที่ได้รองจากเปปไทด์ขนาดมากกว่า 50 kDa เท่านั้น โดยมีน้ำหนักเท่ากับ 0.16 กรัม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ขนาดของเปปไทด์ที่ผ่านการทนต่อสภาวะทางเดินอาหารจำลองของมนุษย์ (Means \pm SD, n =3)

ขนาดเปปไทด์ (kDa)	เปปไทด์ (g)	
	ข้าวหอมดอกมะลิ 105	ข้าวหอมนิล
> 50	2.46 \pm 0.02	2.41 \pm 0.04
30 – 50	0.04	0.07
5 – 10	0.02	0.03
3 – 5	0.02 \pm 0.01 ^a	0.16 \pm 0.03 ^b
< 3	0.06 \pm 0.03	0.08 \pm 0.05

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

ขนาดของเปปไทด์ขนาด 5 - 10 และ 30 - 50 kDa ได้ข้อมูลตัวอย่างละ 1 ซ้ำ เท่านั้น

11. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากร้าข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

ผลของเปปไทด์จากร้าข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ <3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และ > 50 kDa และที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับมีอัตราการยับยั้งการเจริญ 29.2 - 44.2 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างขนาดของเปปไทด์ในช่วงขนาดที่แตกต่างกัน และระหว่างเปปไทด์ในแต่ละความเข้มข้น แต่มีแนวโน้มพบว่าในกลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กในการทดลองครั้งนี้ คือ ขนาดน้อยกว่า 3 kDa และขนาด 3 - 5 kDa มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับสูงกว่าเปปไทด์จากร้าข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีขนาดใหญ่กว่าในทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 10)

อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับของเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 kDa จากร้าข้าวหอมดอกมะลิ 105 ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 36 - 44.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปปไทด์ที่มีขนาด 3 - 5 kDa ในทุกๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 37.1 - 43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปปไทด์ที่มีขนาด 5 - 10 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 32.7 - 39.9 เปอร์เซ็นต์ เปปไทด์ที่มีขนาด 30 - 50 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 29.2 - 39.8 เปอร์เซ็นต์ และเปปไทด์ที่มีขนาดมากกว่า 50 kDa ในทุกๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 29.5 - 38.7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10)

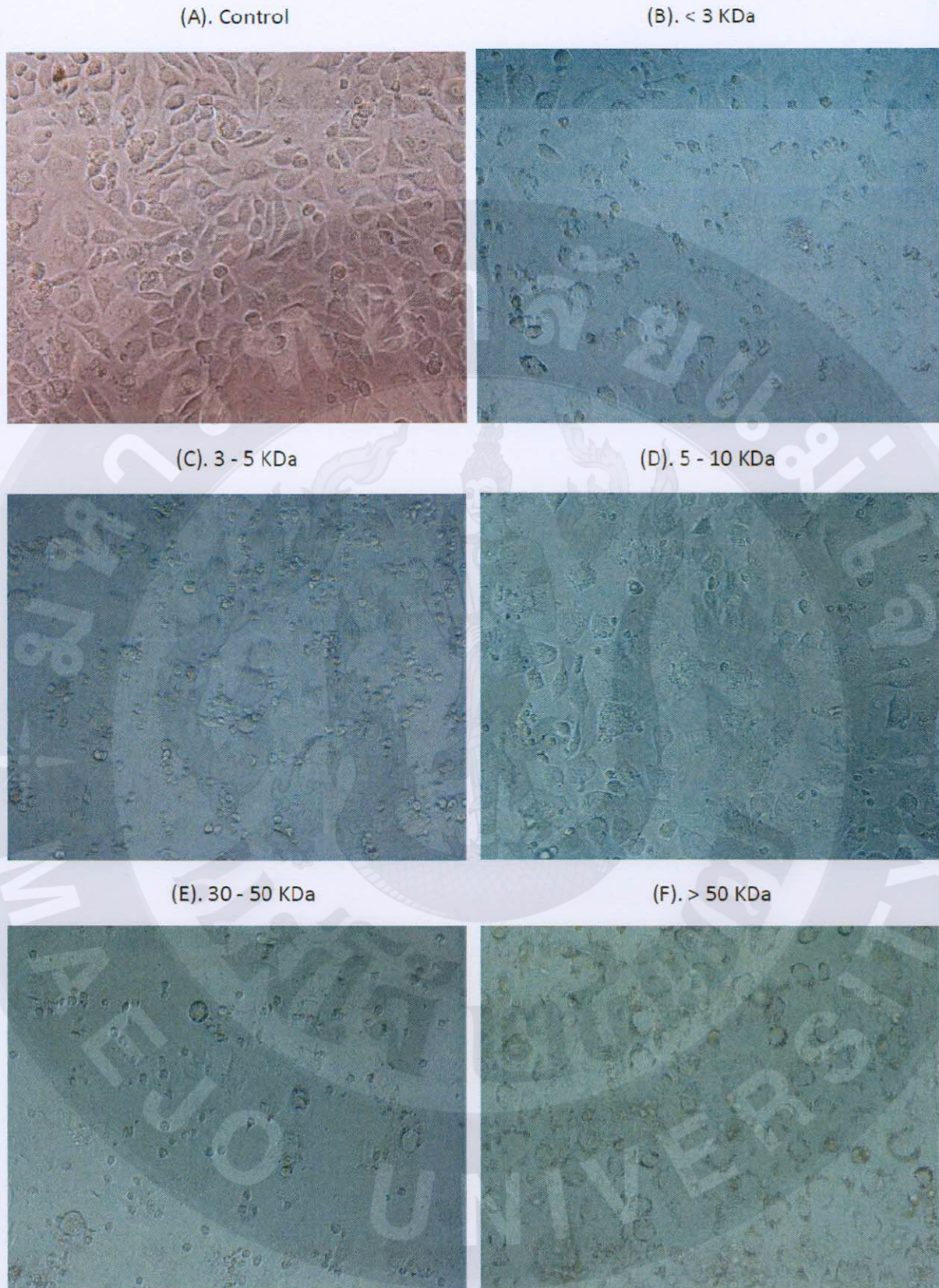
ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ
(Means \pm SD, n =3)

ขนาดเปปไทด์ (kDa)	Antiproliferation (%)			
	75 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml
> 50	29.5 \pm 17.9	38.7 \pm 9.6	38.1 \pm 9.7	31.2 \pm 13.7
30 – 50	29.2 \pm 16.2	39.8 \pm 3.4	37.9 \pm 2.4	34.7 \pm 2.6
5 – 10	32.7 \pm 20.4	37.8 \pm 13.3	39.9 \pm 7.9	35.8 \pm 7.4
3 – 5	37.1 \pm 11.3	41.6 \pm 8.5	43.0 \pm 7.2	43.0 \pm 7.3
< 3	36.0 \pm 8.1	42.9 \pm 5.1	42.1 \pm 6.2	44.2 \pm 2.5

หมายเหตุ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างขนาดของเปปไทด์และเปปไทด์แต่ละความเข้มข้น ($P > 0.05$)

12. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับ

การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับในครั้งนี้ โดยเมื่อทำการทดสอบผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ <3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และ > 50 kDa ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ดังกล่าวนี้ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งตับมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างผิดปกติไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในรูปที่ 4 โดยที่ในกลุ่มควบคุมนั้นเซลล์มะเร็งตับมีการเจริญเป็นปกติ กล่าวคือ เซลล์เจริญเป็นรูปหลายเหลี่ยมแผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยงและยึดติดกันแน่น (รูปที่ 4A) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับเมื่อทำการทดสอบกับเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ กัน เช่น เปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 3 kDa (รูปที่ 4B) เปปไทด์ขนาด 3 - 5 kDa (รูปที่ 4C) เปปไทด์ขนาด 5 - 10 kDa (รูปที่ 4D) เปปไทด์ขนาด 30 - 50 kDa (รูปที่ 4E) และเปปไทด์ขนาดใหญ่กว่า 50 kDa (รูปที่ 4F) โดยที่กลุ่มทดลองเหล่านี้ทำให้เซลล์มีรูปร่างที่ผิดปกติ กล่าวคือ เซลล์มะเร็งตับบางส่วนเจริญแล้วไม่มีลักษณะรูปร่างเป็นเหลี่ยม ๆ นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์จะเจริญอย่างช้า ๆ ไม่ยึดติดกันแน่น ๆ เหมือนกับเซลล์มะเร็งตับในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 แต่อย่างใด



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับเมื่อทดสอบกับเปปไทด์จากร้าข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 5 ขนาด ที่ระดับความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพมีกำลังขยาย 300 เท่า)

13. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ตับ

ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ <3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และ > 50 kDa และที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับในครั้งนี พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับมีอัตราการยับยั้งการเจริญ 33.2 - 45.5 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างขนาดของเปปไทด์ในช่วงขนาดที่แตกต่างกัน และระหว่างเปปไทด์ในแต่ละความเข้มข้น ทั้งนี้มีแนวโน้มพบว่าในกลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กในการทดลองครั้งนี้ คือ ขนาดน้อยกว่า 3, 3 - 5 และ 5 - 10 kDa มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับสูงกว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่มีขนาดที่ใหญ่กว่าในทุกๆระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 11)

อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับของเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 kDa จากรำข้าวหอมนิลในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 39.8 - 42.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปปไทด์ที่มีขนาด 3 - 5 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 38.9 - 43.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปปไทด์ที่มีขนาด 5 - 10 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 34.7 - 45.5 เปอร์เซ็นต์ เปปไทด์ที่มีขนาด 30 - 50 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 33.2 - 41.3 เปอร์เซ็นต์ และเปปไทด์ที่มีขนาดมากกว่า 50 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 35.4 - 41.9 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (Means \pm SD, n = 3)

ขนาดเปปไทด์ (kDa)	Antiproliferation (%)			
	75 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml
> 50	35.4 \pm 7.5	38.9 \pm 2.7	39.6 \pm 6.5	41.9 \pm 4.0
30 - 50	34.3 \pm 10.2	33.2 \pm 6.0	40.8 \pm 3.5	41.3 \pm 5.5
5 - 10	34.7 \pm 19.0	45.5 \pm 7.5	43.8 \pm 4.3	43.2 \pm 4.2
3 - 5	38.9 \pm 15.2	40.0 \pm 11.4	43.9 \pm 8.6	43.1 \pm 6.4
< 3	40.4 \pm 8.5	39.8 \pm 2.8	42.0 \pm 5.0	42.9 \pm 5.5

หมายเหตุ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างขนาดของเปปไทด์และเปปไทด์แต่ละความเข้มข้น ($P > 0.05$)

14. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับ

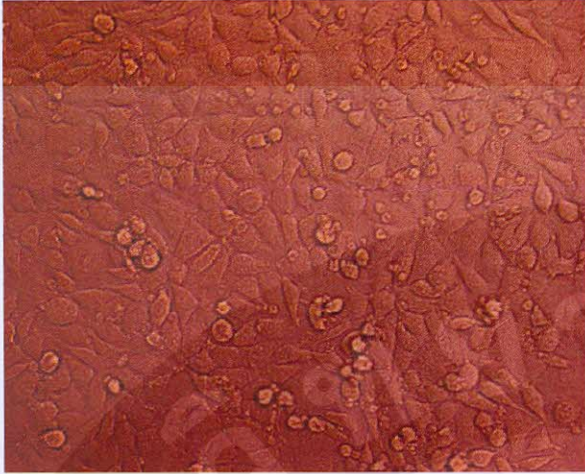
การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับในครั้งนี้ โดยเมื่อทำการทดสอบผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ <math>< 3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50</math> และ > 50 kDa ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลดังกล่าวนี้ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งตับมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างผิดปกติไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในรูปที่ 5 โดยที่ในกลุ่มควบคุมนั้นเซลล์มะเร็งตับมีการเจริญเป็นปกติ กล่าวคือ เซลล์เจริญเป็นรูปหลายเหลี่ยมแผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยงและยึดติดกันแน่น (รูปที่ 5A) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับเมื่อทำการทดสอบกับเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ กัน เช่น เปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 3 kDa (รูปที่ 5B) เปปไทด์ขนาด 3 - 5 kDa (รูปที่ 5C) เปปไทด์ขนาด 5 - 10 kDa (รูปที่ 5D) เปปไทด์ขนาด 30 - 50 kDa (รูปที่ 5E) และเปปไทด์ขนาดใหญ่กว่า 50 kDa (รูปที่ 5F) โดยที่กลุ่มทดลองเหล่านี้ทำให้เซลล์มีรูปร่างที่ผิดปกติ กล่าวคือ เซลล์มะเร็งตับบางส่วนเจริญแล้วไม่มีลักษณะรูปร่างเป็นเหลี่ยม ๆ นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์จะเจริญอย่างช้า ๆ ไม่ยึดติดกันแน่น ๆ เหมือนกับเซลล์มะเร็งตับในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลแต่อย่างใด

15. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ <math>< 3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50</math> และ > 50 kDa และที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มีอัตราการยับยั้งการเจริญ 43.7 - 74.1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังกล่าวนี้ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างขนาดของเปปไทด์ในช่วงขนาดที่แตกต่างกัน และระหว่างเปปไทด์ในแต่ละความเข้มข้น แต่มีแนวโน้มพบว่าในกลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กในการทดลองครั้งนี้ คือ ขนาดน้อยกว่า 3 kDa มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้สูงกว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีขนาดอื่น ๆ (ตารางที่ 12)

อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 kDa จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 54.1 - 74.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปปไทด์ที่มีขนาด 3 - 5 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 47.2 - 56.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปปไทด์ที่มีขนาด 5 - 10 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 43.7 - 50.7 เปอร์เซ็นต์ เปปไทด์ที่มีขนาด 30 - 50 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 45.2 - 49.3 เปอร์เซ็นต์ และเปปไทด์ที่มีขนาดมากกว่า 50 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 56.5 - 59.9 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

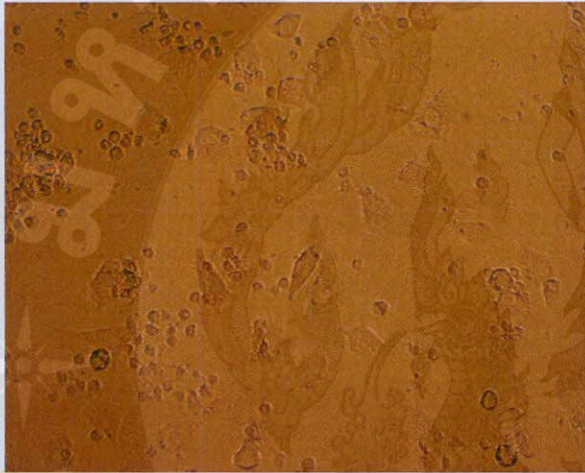
(A). Control



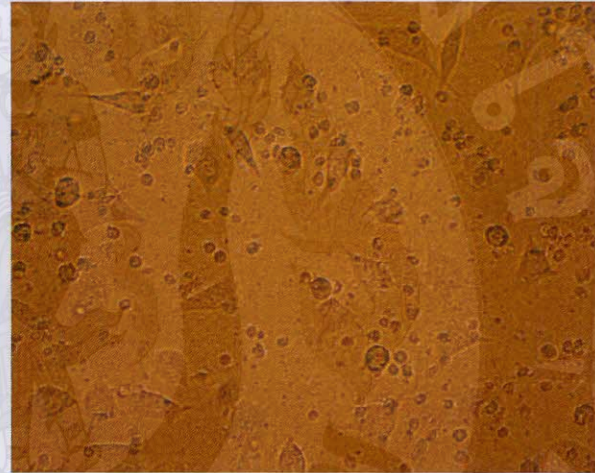
(B). < 3 KDa



(C). 3 - 5 KDa



(D). 5 - 10 KDa



(E). 30 - 50 KDa



(F). > 50 KDa



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งตับเมื่อทดสอบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่มีขนาด น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด ที่ระดับความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพมีกำลังขยาย 300 เท่า)

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Means \pm SD, n =3)

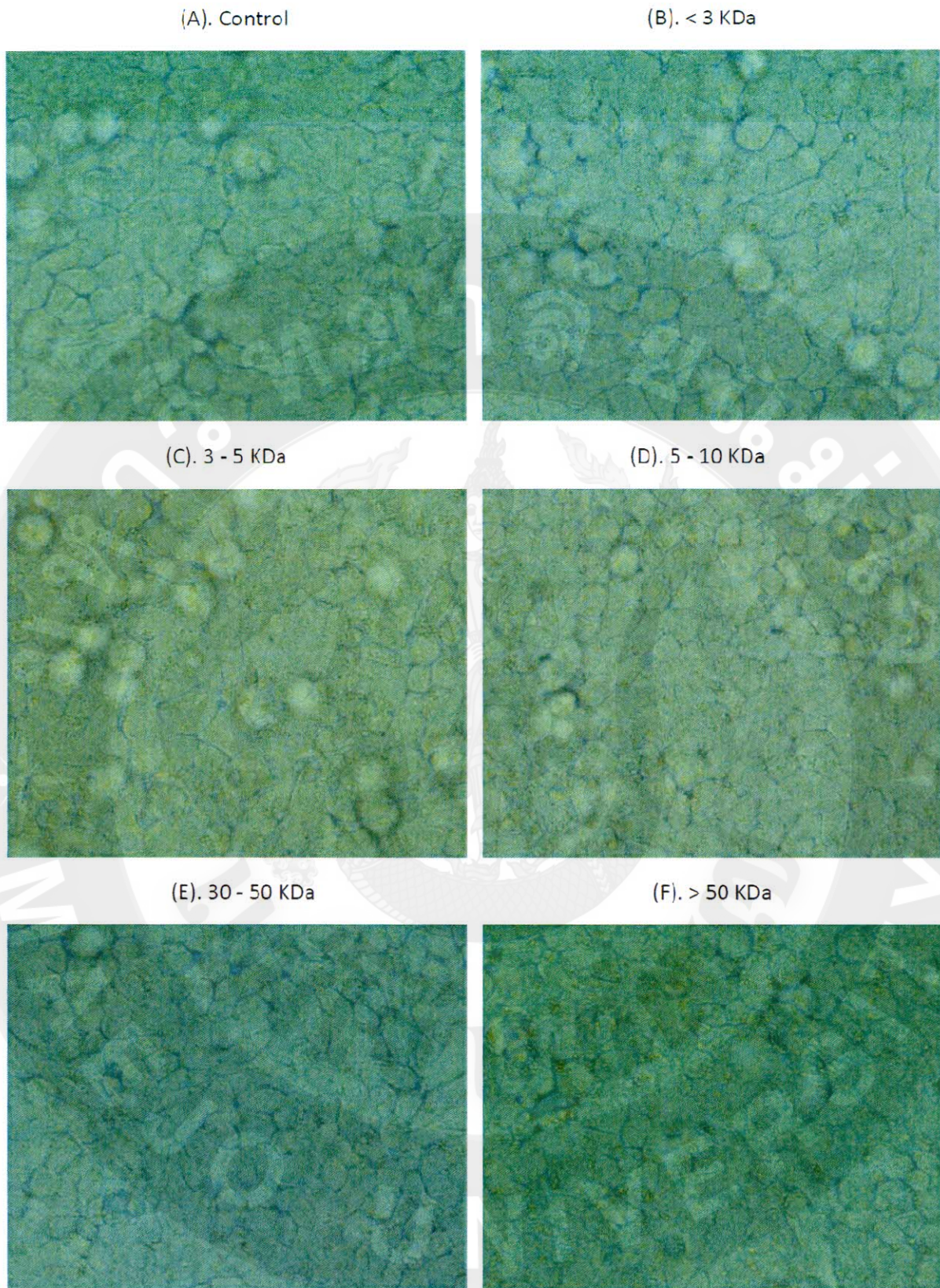
ขนาดเปปไทด์ (kDa)	Antiproliferation (%)			
	75 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml
> 50	56.5 \pm 2.6	59.9 \pm 0.9	57.7 \pm 4.0	58.1 \pm 5.0
30 – 50	45.5 \pm 6.2	47.5 \pm 5.5	45.2 \pm 2.0	49.3 \pm 4.0
5 – 10	49.9 \pm 3.4	45.5 \pm 2.2	43.7 \pm 6.0	50.8 \pm 5.4
3 – 5	56.5 \pm 19.2	47.3 \pm 1.7	47.2 \pm 2.1	48.3 \pm 1.7
< 3	56.9 \pm 4.2	56.5 \pm 0.5	54.1 \pm 0.6	74.1 \pm 1.6

หมายเหตุ ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างขนาดของเปปไทด์และเปปไทด์แต่ละความเข้มข้น ($P > 0.05$)

16. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้

การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ โดยเมื่อทำการทดสอบผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ <3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และ > 50 kDa ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ดังกล่าวนี้ ไม่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันออกไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6)

โดยกลุ่มควบคุมเซลล์มะเร็งลำไส้มีการเจริญเป็นปกติ กล่าวคือ เซลล์เจริญเป็นรูปหลายเหลี่ยมแผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยงและยึดติดกันแน่น (รูปที่ 6A) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อทำการทดสอบกับเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ กัน เช่น เปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 3 kDa (รูปที่ 6B) เปปไทด์ขนาด 3 - 5 kDa (รูปที่ 6C) เปปไทด์ขนาด 5 - 10 kDa (รูปที่ 6D) เปปไทด์ขนาด 30 - 50 kDa (รูปที่ 6E) และเปปไทด์ขนาดใหญ่กว่า 50 kDa (รูปที่ 6F) โดยที่กลุ่มทดลองเหล่านี้เซลล์มีลักษณะรูปร่างที่ปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม กล่าวคือ เซลล์มะเร็งลำไส้เจริญเป็นรูปหลายเหลี่ยมแผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยงและยึดติดกันแน่น



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลลูโลสเส้นลำไส้เมื่อทดสอบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 5 ขนาด ที่ระดับความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพมีกำลังขยาย 600 เท่า)

17. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้

ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ <3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และ > 50 kDa และที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 75, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้มีอัตราการยับยั้งการเจริญ 39.7 - 77.3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ดังกล่าวนี้ มีค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างขนาดของเปปไทด์ในช่วงขนาดที่ต่างกัน โดยพบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กในการทดลองครั้งนี้ คือ ขนาดน้อยกว่า 3 kDa มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่มีขนาดอื่น ๆ ทุก ๆ ระดับความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (ตารางที่ 13)

อัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ของเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 kDa จากรำข้าวหอมนิล ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 66.4 - 77.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปปไทด์ที่มีขนาด 3 - 5 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 60.7 - 62.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปปไทด์ที่มีขนาด 5 - 10 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 39.7 - 49.7 เปอร์เซ็นต์ เปปไทด์ที่มีขนาด 30 - 50 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 52.5 - 58.3 เปอร์เซ็นต์ และเปปไทด์ที่มีขนาดมากกว่า 50 kDa ในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญในช่วง 46.9 - 51.9 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Means \pm SD, n =3)

ขนาดเปปไทด์ (kDa)	Antiproliferation (%)			
	75 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml
> 50	51.9 \pm 4.7 ^b	49.8 \pm 2.6 ^b	46.9 \pm 2.0 ^b	51.7 \pm 4.5 ^b
30 - 50	58.3 \pm 3.6 ^b	57.7 \pm 1.9 ^b	56.3 \pm 2.3 ^b	52.5 \pm 1.6 ^b
5 - 10	49.7 \pm 4.6 ^b	39.7 \pm 1.6 ^b	42.9 \pm 0.8 ^b	46.3 \pm 6.5 ^b
3 - 5	62.2 \pm 2.5 ^b	60.9 \pm 0.9 ^b	62.2 \pm 0.1 ^b	60.7 \pm 0.7 ^b
< 3	73.2 \pm 0.5 ^a	72.5 \pm 3.1 ^a	66.4 \pm 0.4 ^a	77.3 \pm 7.0 ^a

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

18. ประสิทธิภาพของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้

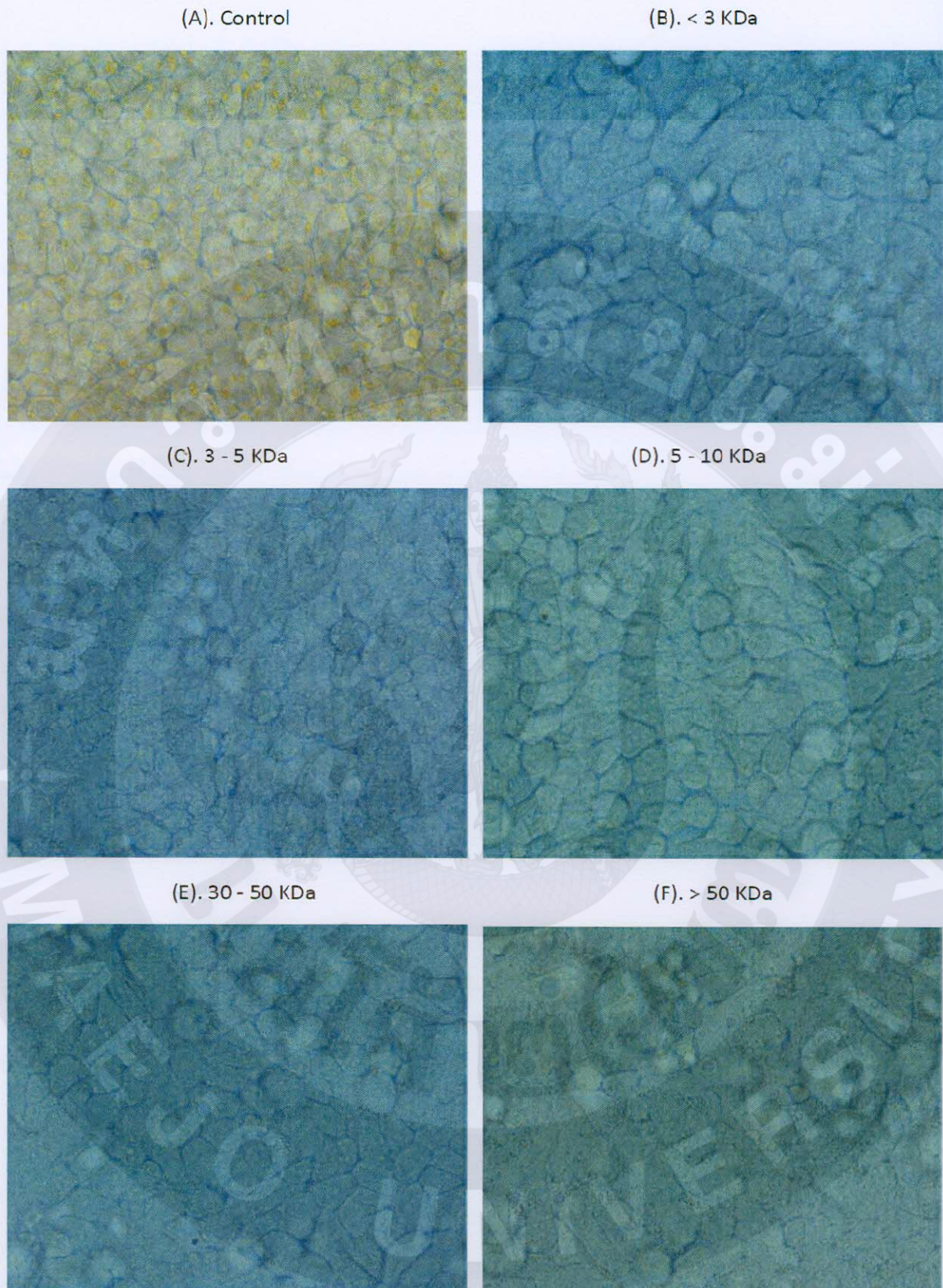
การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ในครั้งนี้ โดยเมื่อทำการทดสอบผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 5 ช่วงขนาด คือ <3, 3 - 5, 5 - 10, 30 - 50 และ > 50 kDa ที่ระดับความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลดังกล่าวนี้ ไม่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 7)

โดยกลุ่มควบคุมเซลล์มะเร็งลำไส้มีการเจริญเป็นปกติ กล่าวคือ เซลล์เจริญเป็นรูปหลายเหลี่ยมแผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยงและยึดติดกันแน่น (รูปที่ 7A) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อทำการทดสอบกับเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ กัน เช่น เปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 3 kDa (รูปที่ 7B) เปปไทด์ขนาด 3 - 5 kDa (รูปที่ 7C) เปปไทด์ขนาด 5 - 10 kDa (รูปที่ 7D) เปปไทด์ขนาด 30 - 50 kDa (รูปที่ 7E) และเปปไทด์ขนาดใหญ่กว่า 50 kDa (รูปที่ 7F) โดยที่กลุ่มทดลองเหล่านี้เซลล์มีลักษณะรูปร่างที่ปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม กล่าวคือ เซลล์มะเร็งลำไส้เจริญเป็นรูปหลายเหลี่ยมแผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยงและยึดติดกันแน่น

วิจารณ์ผลการวิจัย

การประยุกต์ใช้ประโยชน์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าว นั้น นับว่าเป็นวิธีการที่ใช้ประโยชน์จากทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศไทยของเรา ทั้งนี้เนื่องจากในรำข้าว นั้นประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่เป็นจำนวนมากและมีหลากหลายชนิด ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักๆ ที่ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทำการผลิตเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวที่ได้จากการทำการเกษตรอินทรีย์ คือ รำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิล นอกจากนี้ยังนำรำข้าวดังกล่าวมาหมักด้วย *Bacillus subtilis* MP9 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทำการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *B. subtilis* MP9 เพื่อย่อยโปรตีนรำข้าวจากทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อให้ได้เปปไทด์จากรำข้าวที่มีประสิทธิภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้ในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งในท้ายที่สุด

ข้าวสายพันธุ์ที่ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ เป็นสายพันธุ์ที่มีบทบาทหรือมีส่วนสำคัญต่อประเทศไทยของเรามาก ข้าวหอมดอกมะลิ 105 เป็นข้าวที่มีการเพาะปลูกมากที่สุดและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดในประเทศไทยของเรา ในขณะที่ข้าวหอมนิลก็เป็นข้าวที่นับว่ามีคุณค่าทางโภชนาการมากอีกสายพันธุ์หนึ่ง ดังนั้นรำข้าวจากข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังกล่าวนี้นี้จะต้องมีคุณค่าทางโภชนาการที่สอดคล้องกับพันธุ์ข้าวของข้าวแต่ละสายพันธุ์ด้วย ซึ่งจากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว พบว่าสัดส่วนของโปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า นั้น มีค่าใกล้เคียงกันกับการศึกษาของ Moongngarm *et al.* (2012) ที่พบว่าสัดส่วนของโปรตีนในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ข้าวดำ (black rice) และข้าวแดง (red rice) มีค่าเท่ากับ 13.66, 13.27



รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้เมื่อทดสอบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 5 ช่วงขนาด ที่ระดับความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพมีกำลังขยาย 600 เท่า)

และ 12.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีอื่น เช่น ไขมัน ความชื้น และเถ้า จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิลในงานวิจัยครั้งนี้ก็มีค่าใกล้เคียงกันเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ได้เน้นถึงองค์ประกอบทางเคมีจากรำข้าวเฉพาะโปรตีนรำข้าว ทั้งนี้เพราะโปรตีนรำข้าวสามารถนำไปผลิตเปปไทด์ชีวภาพได้

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวสกัดด้วยเมทานอลในกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าอัตราส่วนของผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าวที่ได้จากรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มีอัตราส่วนที่ได้ค่อนข้างสูงคือ ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักรำข้าวเริ่มต้นที่นำมาสกัด ผลผลิตของสารสกัดที่ได้ในอัตราส่วนที่สูงดังกล่าวนี้จะมีประโยชน์ในด้านการนำสารสกัดไปผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สบู่และโลชั่นบำรุงผิว เป็นต้น โดยปกติแล้วประโยชน์ของรำข้าวนั้นมีฤทธิ์หรือสรรพคุณหลายๆ ประการ เช่น ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และลดโคเลสเตอรอล (Rohrer *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011) เป็นต้น ทั้งนี้เกี่ยวเนื่องมาจากในรำข้าวนี้ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า 120 ชนิด (Kahlon *et al.*, 2009) ซึ่งรวมไปถึงสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม DPPH, ABTS⁺ และ FRAP ด้วย

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากรำข้าวทั้งจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิลในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น DPPH, ABTS⁺ และ FRAP ดังนั้นแสดงว่ารำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีฤทธิ์ทางยาในการป้องกันหรือลดความเสี่ยงการเกิดโรคหลายๆ ชนิดได้ เช่น โรคมะเร็งและโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น ซึ่งผลจากการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิจัยหลายๆ ท่าน จากการศึกษาของ Rao *et al.* (2010) พบว่าสารสกัดของรำข้าวสายพันธุ์ Njavara ด้วยเมทานอลนั้นมีสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณที่สูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากรำข้าวดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อีกด้วย ซึ่งคณะผู้วิจัยได้เสนอแนะไว้ด้วยว่ารำข้าวจากข้าวสายพันธุ์ Njavara นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านยาได้

โดยปกติแล้วเมื่อเปรียบเทียบระหว่างรำข้าวจากข้าวสายพันธุ์ที่มีสีขาว อย่างเช่น ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์ที่มีสีดำ เช่น ข้าวหอมนิล ผลที่ได้พบว่ารำข้าวที่มีสี คือ ข้าวหอมนิลนั้นมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่ารำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีสีขาว ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Muntana and Prasong, (2010) ที่พบว่ารำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีสีขาวนั้นมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าข้าวที่มีสีแดงและสีดำ ตามลำดับ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยดังกล่าวได้สรุปโดยรวมว่ารำข้าวจากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยนั้น เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์และเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้

การเปลี่ยนแปลงของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลังจากที่มีการหมักรำข้าวกับ *B. subtilis* MP9 ถึงแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลังจากที่มีการหมักรำข้าวทั้งรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเท่านั้นเอง เช่น รำข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมัก มีปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม tetradecanoic acid, 9-octadecenoic acid และ octadecanoic acid เพิ่มมากขึ้นแต่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้หมัก ซึ่งผล

ที่ได้คล้ายๆ กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมชนิดที่หมักด้วย *B. subtilis* MP9 ที่พบว่าปริมาณของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม octadecanoic acid และ oleic acid เพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้หมัก ดังนั้นแสดงว่าการหมักรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วย *B. subtilis* MP9 นั้นจะไม่สามารถผลิตสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างเหมาะสมได้ แต่ทั้งนี้การหมักรำข้าวดังกล่าวจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการผลิตเปปไทด์ชนิดใหม่ๆ ก็ได้ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Ryan *et al.* (2011) ที่พบว่าการหมักรำข้าวด้วยโพรไบโอติก *Saccharomyces boulardii* สามารถเพิ่มปริมาณสารและหรือออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมากทั้งปริมาณและชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ alpha-Aminobutyric acid (GABA) มีปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นจากการหมักรำข้าวด้วย *Lactobacillus sakei* B2-16 (Kook *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามความแตกต่างจากผลการวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยคาดว่าอาจจะเกิดจากปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการหมักรำข้าวด้วยแบคทีเรียหลายประการ ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ ดังเช่น ชนิดของแบคทีเรีย สายพันธุ์ของข้าวที่นำมาคัดแยกรำข้าว และสภาพภูมิอากาศในการเพาะปลูกข้าว เป็นต้น

เปปไทด์และกระบวนการผลิตเปปไทด์จากรำข้าวในงานวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยต้องการผลิตเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวโดยวิธีการใหม่ๆ ทั้งนี้เพื่อต้องการผลิตเปปไทด์ชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง ซึ่งเปปไทด์นั้นได้จากกระบวนการย่อยหรือกระบวนการหมักของโปรตีนที่มีอยู่ในอาหาร โดยอาศัยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่หลายๆ ชนิด (Walther and Sieber, 2011; Udenigwe and Aluko, 2012) โดยเปปไทด์แต่ละชนิดที่ได้มานั้นจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัย อาทิเช่น แหล่งของโปรตีนว่ามาจากพืชหรือสัตว์ชนิดใด โปรตีนมีองค์ประกอบอย่างไร ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน กระบวนการย่อยที่รวมไปถึงระดับความเป็นกรดหรือด่าง เวลา หรืออุณหภูมิที่ใช้ย่อย (Wang and Gonzalez De Mejia, 2005; Udenigwe and Aluko, 2012) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าจะได้เปปไทด์ชนิดใหม่แน่นอน โดยมีปัจจัยจากการใช้แหล่งของโปรตีนชนิดใหม่ คือ โปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 และจากรำข้าวหอมชนิด นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนในครั้งนี้ นั้น คณะผู้วิจัยก็ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9 ขึ้นมาใช้ในการย่อยโปรตีนในห้องปฏิบัติการ

โปรตีนรำข้าวเป็นแหล่งของโปรตีนที่สามารถนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสในการผลิตเปปไทด์ได้ ซึ่งมีคณะนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาการผลิตเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าว โดยผลการศึกษาดังกล่าวก็สามารถผลิตเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวได้ดี (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของคณะผู้วิจัยในครั้งนี้ที่พบว่าโปรตีนรำข้าวจากทั้งโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 และโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมชนิด ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตเปปไทด์ชีวภาพได้ ถึงแม้ในการผลิตเปปไทด์ชีวภาพในงานวิจัยนี้จะมีความแตกต่างจากคณะวิจัยท่านอื่นๆ ในเรื่องพันธุ์ข้าวที่นำมาใช้ก็ตาม แต่ก็สามารถนำโปรตีนรำข้าวดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเปปไทด์ชีวภาพได้เช่นเดียวกัน

แบคทีเรีย *B. subtilis* MP9 เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดแยกมาจากถั่วเน่าที่สามารถใช้หมักถั่วเหลืองและสามารถเพิ่มปริมาณเปอร์เซ็นต์ของโปรตีน ปริมาณ soluble protein และปริมาณ reducing sugar มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการหมักอย่างมีนัยสำคัญ (Thirabunyanon and Thongwittaya, 2007) ซึ่งคณะผู้วิจัยคาดว่า *B. subtilis* MP9 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ เนื่องจากสามารถหมักถั่วเหลืองแล้วให้โปรตีนและ soluble protein ได้ ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวนี้เป็นผลพลอยได้จากเอนไซม์โปรติเอส และเมื่อคณะผู้วิจัยทำการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9 ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ดี กล่าวคือได้เอนไซม์โปรติเอสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูง ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการนำเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. subtilis* MP9 ไปย่อยโปรตีนรำข้าวเพื่อผลิตเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าว ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยที่พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มสายพันธุ์ *B. subtilis* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และสามารถนำเอนไซม์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ด้านต่างๆ ได้ (Chantawannakul et al., 2002; Chatterjee et al., 2014)

การผลิตเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. subtilis* MP9 ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าสามารถผลิตเปปไทด์ชีวภาพรวมได้ในปริมาณที่มาก ซึ่งเท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 และเท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมนิล ดังนั้นแสดงว่าประสิทธิภาพในการผลิตเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. subtilis* MP9 นั้นมีประสิทธิภาพในการผลิตที่ดี การผลิตเปปไทด์ชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* ก็มีรายงานว่าสามารถผลิตเปปไทด์ชีวภาพได้ (Silpradit et al., 2010) นอกจากนี้เมื่อนำเปปไทด์ชีวภาพรวมไปทดสอบการทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งผลการวิจัยที่ได้พบว่ามีปริมาณเปปไทด์ที่ทนต่อระบบทางเดินอาหารที่ได้เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ ของเปปไทด์รวมจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ของเปปไทด์รวมจากรำข้าวหอมนิล ซึ่งแสดงว่าประสิทธิภาพของเปปไทด์รวมที่ทนได้ต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารในงานวิจัยครั้งนี้มีสูงมาก ทั้งนี้การผลิตเปปไทด์ชีวภาพที่ทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จากโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวผลิตจาก *B. licheniformis* ก็มีรายงานว่าสามารถผลิตเปปไทด์ชีวภาพได้เช่นเดียวกัน (Kannan et al., 2008; Kannan et al., 2010)

โดยปกติแล้วขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ชีวภาพนั้น จะเกี่ยวเนื่องกับประสิทธิภาพของเปปไทด์ชีวภาพเหล่านั้นด้วย ซึ่งเปปไทด์ชีวภาพขนาดเล็กๆ อาทิเช่น ขนาดน้อยกว่า 5 kDa มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดี ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่มีขนาดและน้ำหนักโมเลกุลที่ใหญ่กว่า (Kannan et al., 2008) การวิจัยในครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้คัดแยกขนาดน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ชีวภาพที่ผ่านการทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารแล้ว ซึ่งผลที่ได้พบว่าเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์คือ รำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวจากข้าวหอมนิลนั้น ส่วนใหญ่แล้วมีสัดส่วนปริมาณน้ำหนักแห้งมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ใหญ่มากกว่า 50 kDa ในขณะที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลขนาดที่มีขนาดเล็กกว่า ดังเช่น น้อยกว่า 3 อยู่ในช่วง 3 - 5 อยู่ในช่วง 5 - 10 และอยู่ในช่วง 30 - 50 kDa มีปริมาณน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าขนาดน้ำหนัก

โมเลกุลของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวดังกล่าวมีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่เป็นส่วนมาก แต่ก็ยังมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กๆ ทุกๆ ขนาดกระจายอยู่ร่วมกัน ซึ่งสอดคล้องกับที่พบการกระจายขนาดน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ชีวภาพจากรำข้าวที่สามารถแยกออกเป็นได้หลาย ๆ ขนาดน้ำหนักโมเลกุล (Kannan *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2010)

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเปปไทด์ที่ผลิตได้จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และจากรำข้าวหอมนิล นั้น ถือเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ทรัพยากรที่เป็นเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ถึงแม้โดยปกติแล้วบุคคลทั่ว ๆ ไปมักจะไม่เห็นคุณค่าของรำข้าว แต่ก็พบว่าในรำข้าวนั้นยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า 120 ชนิด ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดก็จะมีบทบาทหรือมีประโยชน์ต่อร่างกายแตกต่างกันออกไป (Kahlon *et al.*, 2009) ฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเปปไทด์ที่ผลิตจากรำข้าวถือเป็นงานวิจัยที่ยังใหม่และมียุทธศาสตร์ศึกษาที่น้อยมาก และงานวิจัยครั้งนี้ที่ผลิตเปปไทด์จากรำข้าวโดยเอนไซม์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* MP9 เป็นงานวิจัยใหม่ที่ยังไม่มีนักวิจัยท่านใดศึกษามาก่อน โดยผลจากการศึกษาพบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และจากรำข้าวหอมนิล สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ 29.2 – 44.2 และ 33.2 – 45.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์ทั้งจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และจากรำข้าวหอมนิลดังกล่าวนี้ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ 43.7 – 74.1 และ 39.7 – 77.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการวิจัยดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลของเปปไทด์จากรำข้าวที่ผลิตจากเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งลำไส้ (Kannan *et al.*, 2008) และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งตับ (Kannan *et al.*, 2010)

ฤทธิ์ต้านมะเร็งกับขนาดของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และจากรำข้าวหอมนิล ซึ่งขนาดของเปปไทด์ที่มีขนาดที่แตกต่างกันนั้นอาจจะมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งแตกต่างกันด้วย โดยผลจากการวิจัยพบว่าเปปไทด์จากรำข้าวทั้ง 2 ชนิด ที่มีขนาดเล็ก คือ มีขนาดน้อยกว่า 3 kDa, 3 – 5 และ 5 – 10 kDa มีแนวโน้มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ และพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติระหว่างขนาดของเปปไทด์ในช่วงขนาดที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก คือ น้อยกว่า 3 kDa มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่มีขนาดอื่น ๆ ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่พบว่าเปปไทด์จากรำข้าวที่มีขนาดน้อยกว่า 5 kDa และ 5 – 10 kDa (Kannan *et al.*, 2008) และมีขนาดน้อยกว่า 5 kDa (Kannan *et al.*, 2010) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่กว่า

การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็ง โดยปกติแล้วลักษณะรูปร่างของเซลล์จะเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์ดังกล่าวมีสภาพเป็นอย่างไร ซึ่งหากเซลล์มะเร็งเจริญเป็นปกติก็แสดงว่าเปปไทด์หรือสารใด ๆ ก็ตามที่น่าทดสอบกับเซลล์มะเร็งนั้น ๆ จะไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเลย โดยผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และจากรำข้าวหอมนิลมีผลทำให้เซลล์มะเร็งตับมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม กล่าวคือ เซลล์เจริญไม่เป็นรูปหลายเหลี่ยม เซลล์เจริญไม่แผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยง และเซลล์

เจริญแล้วไม่ยึดติดกันแน่นระหว่างเซลล์ เป็นต้น ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวนี้สามารถบ่งชี้ว่าเซลล์มะเร็งระดับดังกล่าวนี้มีการเจริญที่ช้าลงและเซลล์มะเร็งระดับมีอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น

ผลจากการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าเปปไทด์ต้านมะเร็งจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิลที่ได้จากการวิจัยนี้ อาจจะเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการป้องกันและหรือบำบัดรักษาโรคมะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ได้



สรุปผลการวิจัย

1. ข้าวเปลือกอินทรีย์พันธุ์ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล สายพันธุ์ละ 30 กิโลกรัม นำมาสีด้วยเครื่องสีข้าวและกรองผ่านตะแกรงเบอร์ 60 (ขนาดรูกรอง 354 ไมครอน) พบว่าได้ปริมาณรำข้าวหอมดอกมะลิ 1,457.4 กรัม และข้าวหอมนิล 1,296.9 กรัม

2. องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว พบว่าปริมาณโปรตีนจากรำข้าวหอมนิลมีสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เทียบกับรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 คือ ร้อยละ 13.9 และ 11.9 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณไขมันและความชื้นไม่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 18.9 : 17.4 และ 11.3 : 11.4 ในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิล ตามลำดับ ปริมาณเถ้าในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีสูงกว่าเถ้าจากรำข้าวหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ ร้อยละ 4.9 และ 4.6 ตามลำดับ

3. ผลผลิตของสารสกัดจากรำข้าว โดยนำรำข้าวที่ผ่านการอบแล้วสายพันธุ์ละ 100 กรัม มาสกัดโดยใช้สารสกัดเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และนำสารสกัดไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าได้ปริมาณสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 เท่ากับ 19.98 กรัม หรือร้อยละ 19.98 ในขณะที่ได้สารสกัดจากรำข้าวหอมนิล 21.89 กรัม หรือร้อยละ 21.89

4. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากรำข้าว พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 24.11 mgGAE/g ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากรำข้าวหอมนิล คือ 70.04 mgGAE/g

5. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าว พบว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เท่ากับ 56.14 และ 83.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

6. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของสารสกัดจากรำข้าว พบว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ดีกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.056 และ 0.316 ตามลำดับ

7. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดจากรำข้าว พบว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP น้อยกว่าสารสกัดจากรำข้าวหอมนิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เท่ากับ 358.80 และ 835.88 $\mu\text{mol}/\text{Fe}^{2+}/\text{g}$ ตามลำดับ

8. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 หมักด้วย *B. subtilis* MP9 พบว่ามี tetradecanoic acid, 9-octadecenoic acid และ octadecanoic acid สูงกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้หมัก

9. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารและหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรำข้าวหอมนิลหมักด้วย *B. subtilis* MP9 พบว่ามี octadecanoic acid และ oleic acid สูงกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทำการหมัก

10. ปริมาณรำข้าวที่ไม่มีไขมัน การนำรำข้าวไปสกัดไขมันด้วยเฮกเซน พบว่าร้อยละของรำข้าวที่ไม่มีไขมันในรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิล เท่ากับ 92.8 และ 92.97 ตามลำดับ
11. ปริมาณโปรตีนในรำข้าวที่ไม่มีไขมัน การนำรำข้าวที่ไม่มีไขมันไปสกัดโปรตีน พบว่าร้อยละของโปรตีนจากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และรำข้าวหอมนิลมีค่าเท่ากับ 9.92 และ 12.67 ตามลำดับ
12. การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MP9 พบว่าได้เอนไซม์โปรติเอสในรูปแบบแห้งที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 15,400 U/g
13. การผลิตเปปไทด์ด้วยการย่อยโปรตีนรำข้าวด้วยโปรติเอสที่ความเข้มข้น 10 U/g พบว่าได้เปปไทด์จากโปรตีนรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิล เท่ากับ 42 และ 37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
14. การทนของเปปไทด์ที่สภาวะกระเพาะอาหารจำลองของมนุษย์ พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมดอกมะลิ 105 จะเหลือผลผลิตน้ำหนักแห้งของเปปไทด์ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะอาหารจำลองได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนรำข้าวจากข้าวหอมนิล โดยมีค่าเท่ากับ 2.96 และ 3.34 กรัม ตามลำดับ จากน้ำหนักเริ่มต้น 5 กรัม
15. การทนของเปปไทด์ที่สภาวะลำไส้จำลองของมนุษย์ พบว่าน้ำหนักแห้งที่ได้ของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 เท่ากับ 2.39 กรัม หรือเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่น้ำหนักแห้งที่ได้ของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิล เท่ากับ 2.47 กรัม หรือเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำหนักเริ่มต้น 2.5 กรัม
16. การคัดแยกขนาดของเปปไทด์ออกเป็นขนาดต่างๆ ตามน้ำหนักโมเลกุล พบว่าเปปไทด์ทั้งจากเปปไทด์รำข้าวหอมดอกมะลิ 105 และหอมนิล มีขนาดใหญ่กว่า 50 kDa โดยมีสัดส่วนมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 50 kDa ในแต่ละช่วงขนาด คือ น้อยกว่า 3 อยู่ในช่วง 3 - 5 อยู่ในช่วง 5 - 10 และอยู่ในช่วง 30 - 50 kDa พบว่าในแต่ละช่วงขนาดมีน้ำหนักไม่แตกต่างกันมากนัก
17. ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับ อัตรการยับยั้งการเจริญ 29.2 - 44.2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแนวโน้มพบว่าในกลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก คือ ขนาดน้อยกว่า 3 kDa และขนาด 3 - 5 kDa มีอัตรการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับสูงกว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีขนาดที่ใหญ่กว่าในทุกระดับความเข้มข้น
18. ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งระดับ พบว่ามีผลทำให้เซลล์มะเร็งระดับมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างผิดปกติไป โดยเซลล์เจริญไม่เป็นรูปหลายเหลี่ยม ไม่แผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยง และไม่ยึดติดกันแน่นระหว่างเซลล์
19. ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับ พบว่ามีอัตรการยับยั้งการเจริญ 33.2 - 45.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแนวโน้มพบว่าในกลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก คือ ขนาดน้อยกว่า 3, 3 - 5 และ 5 - 10 kDa มีอัตรการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งระดับสูงกว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่มีขนาดที่ใหญ่กว่าในทุกระดับความเข้มข้น
20. ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งระดับ พบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลมีผลทำให้เซลล์มะเร็งระดับมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างผิดปกติไป โดยเซลล์มะเร็งเจริญไม่เป็นรูปหลายเหลี่ยม ไม่แผ่เต็มพื้นที่ในภาชนะเพาะเลี้ยง และไม่ยึดติดกันแน่นระหว่างเซลล์

21. ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญ 43.7 – 74.1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแนวโน้มพบว่าในกลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก คือ ขนาดน้อยกว่า 3 kDa มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้สูงกว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ที่มีขนาดใหญ่กว่า

22. ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมดอกมะลิ 105 ไม่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

23. ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่ามีอัตราการยับยั้งการเจริญ 39.7 – 77.3 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กน้อยกว่า 3 kDa มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลที่มีขนาดใหญ่กว่าในทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการทดลอง

24. ผลของเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่าเปปไทด์จากรำข้าวหอมนิลไม่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

เอกสารอ้างอิง

- ภัทรวิรินทร์ อัตตะสาร และ รังสิยา บัวส้ม (2554). รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล (Hospital-Based Cancer Registry). สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. ฉบับที่ 26. 60 หน้า
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ (2555). ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคมะเร็ง. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (online) http://www.nci.go.th/Knowledge/index_general.html
- Abdel Wahab, S.I., A.B. Abdul, A.S. Alzubairi, M. Mohamed Elhassan, and S. Mohan. 2009. In vitro ultramorphological assessment of apoptosis induced by zerumbone on (HeLa). *J. Biomed. Biotechnol.* 2009:769568.
- AOAC. 2000. Official method of analysis of AOAC international. *AOAC Int.* Virginia.
- AOAC. 2005. Official method of analysis of AOAC international. *AOAC Int.* Maryland.
- Bandyopadhyay, K., G. Misra, and S. Ghosh. 2008. Preparation and characterisation of protein hydrolysates from indian defatted rice bran meal. *J. Oleo Sci.* 57: 47-52.
- Bi, S., J.R. Liu, Y. Li, Q. Wang, H.K. Liu, Y.G. Yan, B.Q. Chen, and W.G. Sun. 2010. Gamma-Tocotrienol modulates the paracrine secretion of VEGF induced by cobalt (II) chloride via ERK signaling pathway in gastric adenocarcinoma SGC-7901 cell line. *Toxicology.* 274: 27-33.
- Butsat, S. and S. Siriamornpun. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chem.* 119: 606-613.
- Chantawannakul, P., A. Oncharoen, K. Klanbut, E. Chukeatirote, and S. Lumyong. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia.* 28: 241-245.
- Chatterjee, J., S. Giri, S. Maity, A. Sinha, A. Ranjan, R. Shekhar, and S. Gupta. 2014. Production and characterization of thermostable alkaline protease of *B. Subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid state fermentation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* doi: 10.1002/bab.1309
- Dewanto, V., X. Wu, K.K. Adonm, and R.H. Liu. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agri. Food Chem.* 50: 3010-3014.
- Dziuba, J., P. Minkiewicz, D. Nalecz. 1999. Biologically active peptides from plant and animal proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 8: 3-16.

- Fabian, C.B., L.H. Huynh, and Y.H. Ju. 2010. Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. *LWT - Food Sci. Tech.* 43: 375-379.
- Fabian, C., and Y.H. Ju. 2011. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51: 816-827.
- Ghoneum, M., and S. Gollapudi. 2003. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 201: 41-49.
- Gollapudi, S., and M. Ghoneum. 2008. MGN-3/Biobran, modified arabinoxylan from rice bran, sensitizes human breast cancer cells to chemotherapeutic agent, daunorubicin. *Cancer Detect. Prev.* 32: 1-6.
- Hsu, K., E.C.Y. Li-Chan, and C. Jao. 2011. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chem.* 126: 617-622.
- Inatsu, Y., K. Kimura, Y. Itoh. 2002. Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in southeast Asia: comparison with *B. subtilis* (natto) starter strains. *Jpn. Agric. Res. Q.* 36: 169-175.
- Inatsu, Y., N. Nakamura, Y. Yuriko, T. Fushimi, L. Watanasiritum, and S. Kawamoto. 2006. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 237-242.
- Israel-Ballard, K., C. Chantry, K. Dewey, B. Lönnnerdal, H. Sheppard, R. Donovan, J. Carlson, A. Sage, and B. Abrams. 2005. Viral, nutritional, and bacterial safety of flash-heated and pretoria-pasteurized breast milk to prevent mother-to-child transmission of HIV in resource-poor countries: A pilot study. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 40 :175-81.
- Kahlon, T.S. 2009. Rice bran: Production, composition, functionality and food applications, physiological benefits. *In: S.S. Cho and P. Samuel, eds. Fiber ingredients: Food applications and health benefits.* Taylor and Francis Group, LLC: Boca Raton. , pp. 305-321.
- Kannan, A., N. Hettiarachchy, M.G. Johnson, and R. Nannapaneni. 2008. Human colon and liver cancer cell proliferation inhibition by peptide hydrolysates derived from heat-stabilized defatted rice bran. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11643-11647.

- Kannan, A., N.S. Hettiarachchy, J.O. Lay, and R. Liyanage. 2010. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*. 31: 1629-1634.
- Kannappan, R., Y.R. Yadav, and B.B. Aggarwal. 2010. α -Tocotrienol but not α -tocopherol blocks STAT3 cell signaling pathway through induction of protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and sensitizes tumor cells to chemotherapeutic agents. *Br. J. Pharmacol.* 285: 33520-33528.
- Kiers, J.L., A.E.A. Van laeken, F.M. Rombouts, and M.J.R. Nout. 2000. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 163-169.
- Kim, S.P., M.Y. Kang, S.H. Nam, and M. Friedman. 2012. Dietary rice bran component γ -oryzanol inhibits tumor growth in tumor-bearing mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 935-44.
- Kong, C.K., W.S. Lam, L.C. Chiu, V.E. Ooi, S.S. Sun, and Y.S. Wong. 2009. A rice bran polyphenol, cycloartenyl ferulate, elicits apoptosis in human colorectal adenocarcinoma SW480 and sensitizes metastatic SW620 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 77: 1487-1496.
- Kook, M.C., M.J. Seo, C.I. Cheigh, Y.R. Pyun, S.C. Cho, and H. Park. 2010. Enhanced production of gamma-aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 763-766.
- Kitts, D.D., and K. Weiler. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1309-1323.
- Korhonen, H., and A. Pihlanto. 2003. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1297-1308.
- Li, S.C., T.C. Chou, C.K. Shih. 2011. Effects of brown rice, rice bran, and polished rice on colon carcinogenesis in rats. *Food Res. Int.* 44: 209-216.
- Li, G., M. Qu, J. Wan, and J. You. 2007. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16: 275-280.
- Lim, S., C.W. Cho, U.K. Choi, and Y.C. Kim. 2010. Antioxidant activity and ginsenoside pattern of fermented white Ginseng. *J. Ginseng Res.* 34: 168-174.
- Maneewan, C., K. Yamauchi, M. Thirabunyanon, S. Siri, A. Mekbungwan, and N. Thonwittaya. 2011. Development of *Bacillus subtilis* MP and effective utilization on productivity and microorganisms in feces of suckling piglets. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 9: 382- 387.

- Moongngarma, A., N. Daomukdaa, and S. Khumpika. 2012. Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. *APCBEE Procedia*. 2: 73 – 79.
- Muntana, N., and S. Prasong. 2010. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. *Pak. J. Biol. Sci.* 13: 170-174.
- Nakashima, K., N. Virgona, M. Miyazawa, T. Watanabe, and T. Yano. 2010. The tocotrienol-rich fraction from rice bran enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human mesothelioma H28 cells. *Phytother. Res.* 24: 1317-1321.
- Ohnuki, H., and H. Otani. 2005. Antigen-binding and protein G-binding abilities of immunoglobulin G in hyperimmunized cow's milk treated under various conditions. *Anim. Sci. J.* 76: 283-290.
- Oktay, M., I. Culcin, and O.I. Kufreviöglu. 2003. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extract. *LWT-Food Sci. Technol.* 36: 263-271.
- Phelan, M., A. Ahernea, R.J. FitzGerald, and N.M. O'Brien. 2009. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy J.* 19: 643-654.
- Rao, A.S., S.G. Reddy, P.P. Babu, and A.R. Reddy. 2010. The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. *BMC Complement Altern. Med.* 10: 4.
- Re, R. N. Pellegrini, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Bio. Med.* 26: 1231-1237.
- Rohrer, C.A., and T.J. Siebenmorgen. 2004. Nutraceutical concentrations within the bran of various rice kernel thickness fractions. *J. Biosystems Eng.* 88: 453-460.
- Ryan, E.P., A.L. Heuberger, T.L. Weir, B. Barnett, C.D. Broeckling, and J.E. Prenni. 2011. Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity. *J. Agric. Food Chem.* 59: 1862-70.
- Saunders, R.M. 1990. The properties of rice bran as a food stuff. *Cereal Foods World.* 35: 632-662.
- Silpradit, K., S. Tadakittasarn, H. Rimkeeree, S. Winitchai, and V. Haruthaithanasan. 2010. Optimization of rice bran protein hydrolysate production using alcalase. *As. J. Food Ag-Ind.* 3: 221-231.

- Sindhu, S.C., and N. Khetarpaul. 2002. Effect of probiotic fermentation on antinutrients and in vitro protein and starch digestibilities of indigenously developed RWGT food mixture. *Nutr. Health*. 16: 173-181.
- Sun, W., W. Xu, H. Liu, J. Liu, Q. Wang, J. Zhou, F. Dong, and B. Chen. 2009. gamma-Tocotrienol induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *J. Nutr. Biochem*. 20: 276-84.
- Takagi, K., R. Teshima, H. Okunuki, and J. Sawada. 2003. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol. Pharm. Bull*. 26: 969-973.
- Thirabunyanon, M., and N. Thongwittaya. 2007. Screening and effects of probiotic *Bacillus Subtilis* MP on microbiological or biochemical changes in fermented soybean food. (ประชุมทางวิชาการ สกว. นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส 11-13 ตุลาคม 2550). (Poster presentation).
- Thirabunyanon, M., P. Boonprasom, and P. Niamsup. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol. Lett*. 31: 571-576.
- Thirabunyanon, M., and P. Hongwittayakorn. 2013. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 169: 511-525.
- Udenigwe, C.C., and R.E. Aluko. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci*. 77: R11-24.
- Walther, B., and R. Sieber. 2011. Bioactive proteins and peptides in foods. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. 81: 181-192.
- Wang, W., and E. Gonzalez de Mejia. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*. 4: 63-78.
- Wang, W., N.A. Bringe, M.A. Berhow, and E. Gonzalez de Mejia. 2008. beta-Conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells in vitro. *J. Agric. Food Chem*. 56: 4012-20.
- Wiboonsirikul, J., K. Kimura, M. Kadota, H. Morita, T. Tsuno, and S. Adachi. 2007. Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment. *J. Agric. Food Chem*. 55: 8759-8765.

Yen, G.C., and H.Y. Chen. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43: 27-32.

Zhang, H.J., H. Zhang, L. Wang, and X.N. Guo. 2012. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. *Food Res. Int.* 47: 359-363.

