



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนพัฒนาศักยภาพการวิจัยเชิงสถาบันของภาควิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ชื่อโครงการนวัตกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์
เสริมอาหารเพื่อการส่งเสริมสุขภาพที่ยั่งยืน

โดย สิริพงษ์ จูฑะมาดี และคณะ

มีนาคม 2563

สัญญาเลขที่ IRG5980001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนพัฒนาศักยภาพการวิจัยเชิงสถาบันของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ชื่อโครงการนวัตกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

เพื่อการส่งเสริมสุขภาพที่ยั่งยืน

โดย สิริพงษ์ จิตะมาดี และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยกองทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนพัฒนาศักยภาพการวิจัยเชิงสถาบันของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทสรุปผู้บริหาร

มีการคาดการณ์ว่า ในปี 2564 ไทยจะเข้าสู่สังคมประชากรสูงวัยแบบสมบูรณ์ โดยมีผู้ที่อายุมากกว่า 60 ปี เกิน 20% ของจำนวนประชากรทั้งหมด ในขณะที่สัดส่วนประชากรวัยเด็กกำลังลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งประชากรกลุ่มเด็กนี้จะเป็นอนาคตที่สำคัญยิ่งของประเทศไทย ดังนั้นภาวะโภชนาการของประชากรในสองกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งจะส่งผลสืบเนื่องต่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจและสังคม รวมทั้งการงบประมาณรายจ่ายด้านสาธารณสุขของประเทศ

เทคโนโลยีชีวภาพจึงเข้ามามีบทบาทอย่างมากในการค้นหาประโยชน์และเพิ่มมูลค่าจากวัตถุดิบที่ไม่เป็นที่นิยมและอาจไม่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ โดยใช้หลักฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เป็นตัวบ่งชี้ถึงศักยภาพที่จะสามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบเสริมให้อาหารมีคุณค่าสูงขึ้นและเหมาะสมกับวัย โดยงานวิจัยนี้ มีการพัฒนากระบวนการผลิตอาหารเสริมสำหรับเด็ก จำนวน 2 โครงการย่อย ได้แก่ 1. การพัฒนากระบวนการผลิตอาหารเสริมจากผักดกแด่ใหม่ไทยสำหรับเด็กปฐมวัย และ 2. การคัดเลือกสายพันธุ์และพัฒนา Glutamate decarboxylase เพื่อผลิต GABA ที่มีส่วนช่วยในการพัฒนาระบบประสาทส่วนกลางและสมองของประชากรวัยเด็ก นอกจากนี้ยังประกอบด้วยงานวิจัยในส่วนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับผู้สูงวัยอีก 2 โครงการย่อย ได้แก่ 3. การหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านความดันโลหิตสูงจากพืชสมุนไพรไทย และ 4. การพัฒนาวิธีการตรวจหาสารสำคัญ cordycepin ในถั่งเช่า เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพอาหารเสริมต่อไป ซึ่งงานวิจัยได้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีตามวัตถุประสงค์ของโครงการ คือเกิดความร่วมมือระหว่างบุคคลากรที่มีความเชี่ยวชาญต่างสายงาน สามารถผลิตผลงานตีพิมพ์และสามารถนำไปต่อยอดทางอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังเป็นพื้นฐานในการสร้างศูนย์นวัตกรรมเพื่อให้คำปรึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ร่วมกับผู้ประกอบการรายย่อยได้อีกด้วย

สรุปผลการดำเนินงาน

โครงการวิจัย นวัตกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อการส่งเสริมสุขภาพที่ยั่งยืน

ประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อย 4 โครงการ คือ

หน้าที่

1. การพัฒนากระบวนการผลิตอาหารเสริมจากผักดกแด่ใหม่ไทยสำหรับเด็กปฐมวัย.....	2
2. การคัดเลือกสายพันธุ์และพัฒนา Glutamate decarboxylase เพื่อผลิต GABA ในระดับอุตสาหกรรม.....	12
3. การหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านความดันโลหิตสูงจากพืชสมุนไพร.....	25
4. การพัฒนาวิธีการตรวจหาสารสำคัญ cordycepin ในถั่งเช่า.....	38
5. สรุปผลงานที่ได้จากโครงการ.....	58

1. โครงการวิจัยที่ 1 การพัฒนากระบวนการผลิตอาหารเสริมจากดักแด้ไหมไทยสำหรับเด็กปฐมวัย

1.1 สรุปผลการดำเนินงานของโครงการ

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบก่อนการแปรรูป คือ ดักแด้ไหมไทย โดยใช้รูปแบบบดแห้งเพื่อสะดวกต่อการขนส่งและการเก็บรักษา เพื่อใช้เปรียบเทียบกับอ้างอิงกับผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะได้ผลิตออกมาเป็นต้นแบบได้ต่อไป ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ตลอดจน amino acid และ fatty acid profiles เป็นไปในทางเดียวกันกับดักแด้ไหมญี่ปุ่นที่มีผู้รายงานไว้แล้ว อาจมีแตกต่างบ้างเล็กน้อย ในส่วนของการพัฒนากระบวนการผลิต Protein hydrolysate เพื่อเป็น Food supplement คณะผู้วิจัยได้ใช้วิธีการ pH-shift เพื่อแยกโปรตีนออกจากส่วนประกอบอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมันที่เป็นสาเหตุให้เกิด Lipid oxidation และให้กลิ่นหืน เมื่อผ่านกระบวนการต่างๆ และได้วิเคราะห์ amino acid profiles ของ Pupae protein isolate ที่ได้เปรียบเทียบกับโปรตีนในดักแด้เริ่มต้น นอกจากนี้ได้นำโปรตีนที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ซึ่งปรากฏว่า Pupae hydrolysate ที่ได้มี antioxidant activity สูง ในขณะที่โปรตีนตั้งต้นและ Whey hydrolysis ไม่มีความสามารถดังกล่าวนี้ อีกทั้งได้พัฒนากระบวนการผลิต Protein hydrolysate ระดับใหญ่ขึ้น และทดสอบหาคุณสมบัติต่างๆ เพื่อนำ Pupae protein ที่ได้มาใช้เป็นอาหารเพื่อบริโภคตามแผนงานที่วางไว้

1.2 หลักการและเหตุผล

ในอุตสาหกรรมการผลิตผ้าไหม จะมีดักแด้และเศษรังไหมเกิดขึ้นเป็นของเหลือทิ้ง (By-product) ภายหลังจากการสาวเส้นไหมออกจากรัง ดักแด้ไหมเป็นแหล่งโปรตีนและไขมัน โดยมีองค์ประกอบของโปรตีน 55.6% และไขมัน 32.2% ของน้ำหนักดักแด้ไหมแห้ง โปรตีนของดักแด้ไหมประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) 9 ชนิดครบถ้วน (Tomotake et. al., 2010) และมีความใกล้เคียงกับโปรตีนในน้ำนมของคน (WHO Technical Report Series; no. 935)

ดักแด้ไหมมีสัดส่วนของกรดไขมันประเภท polyunsaturated (PUFA): monounsaturated (MUFA): saturated (SFA) เท่ากับ 1.6 : 1 : 1 โดยมีไขมันไม่อิ่มตัว Linolenic (C18:3) และ Oleic (C18:1) เป็นองค์ประกอบสำคัญร้อยละ 36.3 และ 26 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ (Tomotake et. al., 2010) ทั้งนี้ Linolenic (C18:3) หรือ Short-chain omega-3 fatty acid ซึ่งเป็นกรดไขมันหลักของดักแด้ไหมยังเป็นกรดไขมันที่จำเป็นที่ร่างกายคนเราไม่สามารถผลิตได้เองจึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหาร Linolenic (C18:3) ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิต Long-chain omega-3 fatty acid เช่น Eicosapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic acid (DHA) ซึ่งสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาระบบสมองของเด็กทารก เสริมสร้างพัฒนาการการเรียนรู้ในเด็ก ช่วยให้สมองทำหน้าที่ได้อย่างเป็นปกติในผู้ใหญ่ นอกจากนี้ยังช่วยให้ความสมบูรณ์แก่ผิวหนัง ป้องกันการอักเสบ ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ป้องกันการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับหัวใจและหลอดเลือด ความดันโลหิตสูง และโรคภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง (Liu et. al., 2015)

ดักแด้ไหมเป็นแหล่งของแร่ธาตุที่สำคัญ (mg/น้ำหนักแห้ง 100 g) ได้แก่ Na (11.66), K (22.45), Ca (26.65), Mg (27.53), Zn (37.50), และ Fe (6.33) (Omotoso, 2015) ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบร่วมกับโปรตีนและเอนไซม์ในร่างกาย เพื่อช่วยในการรักษาโครงสร้างของโปรตีนให้แข็งแรงและทำงานตามหน้าที่

ได้ เช่น Zn เป็นองค์ประกอบที่ช่วยในการทำงาน (Co-factor) ของเอนไซม์ ribonucleic acid polymerases, alcohol dehydrogenase, carbonic anhydrase, และ alkaline phosphatase นอกจากนี้ยังพบว่า Bioactive peptide จากผักดกแด่ใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านความดันโลหิตสูง (Antihypertension) และต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidative) (Yang et. al., 2013) ด้วย

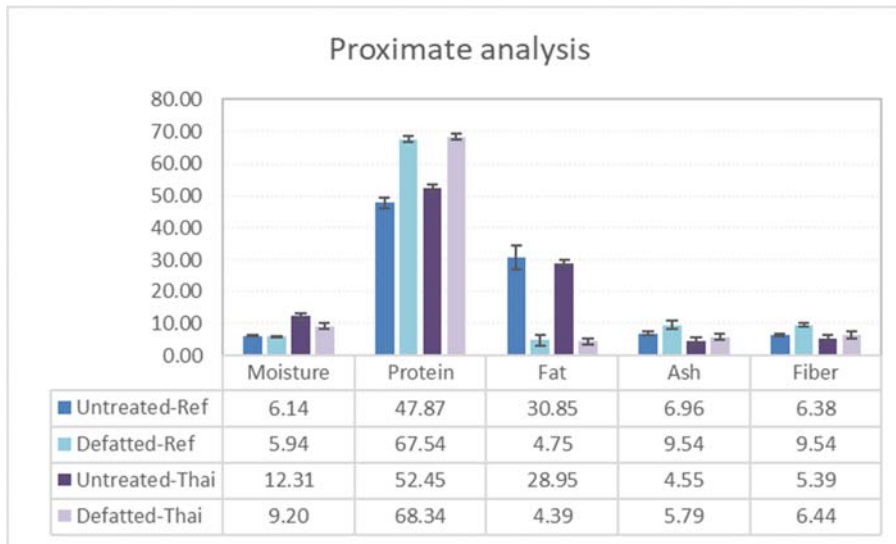
ถึงแม้ว่าการบริโภคผักดกแด่ใหม่จะได้รับความนิยมและเป็นเรื่องปกติทั่วไปในบรรดาผู้ปลูกหม่อนเลี้ยงไหม และมีประโยชน์ต่อสุขภาพตามที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น แต่ด้วยรูปลักษณะภายนอกของผักดกแด่ใหม่ ทำให้ไม่เป็นที่ดึงดูดต่อการนำมาเป็นอาหารขบเคี้ยวเล่นสำหรับบุคคลทั่วไป โดยเฉพาะเด็กปฐมวัย (1-5 ขวบ) ที่มีความต้องการอาหารประเภทโปรตีนและไขมันที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และเป็นช่วงเวลาในการปลูกฝังนิสัยการรับประทานอาหารที่ถูกต้องทั้งในแง่ของคุณค่าและความหลากหลายของอาหาร ตลอดจนการเรียนรู้ช่วงเวลาในการรับประทานอาหาร (USDA Behavioral Milestones) ประกอบกับที่มีรายงานการสำรวจเป็นระยะๆ ที่ผ่านมาเกี่ยวกับปัญหาการขาดสารอาหารประเภทโปรตีน คุณภาพของอาหาร ตลอดจนปัญหาการปนเปื้อนของสารต่างๆ ในอาหาร เช่น ในช่วงปี 2535-2548 มีเด็กที่อยู่ในสภาวะขาดโปรตีนและพลังงานอยู่ ร้อยละ 10 และในช่วงปี 2550-2552 พบว่าผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่ม ร้อยละ 35 มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่ามาตรฐาน เนื่องจากอาหารเลี้ยงโคนมไม่มีคุณภาพ น้ำนมดิบมีสารตกค้าง เช่นยาปฏิชีวนะ เชื้อจุลินทรีย์ เนื้อสัตว์มีสารตกค้าง เช่น สารปฏิชีวนะ สารเร่งเนื้อแดง วัตถุกันเสีย กระบวนการผลิตไม่ได้ GMP เหล่านี้เป็นต้น (คณะกรรมการอาหารแห่งชาติ, 2553) ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าและเป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรให้เกิดผลสูงสุดให้กับอุตสาหกรรมไหมไทย คณะผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนากระบวนการแปรรูป By-product ดังกล่าวนี้นี้ ให้สามารถเข้าถึงกลุ่มผู้บริโภคได้กว้างขวางมากขึ้น ในลักษณะของอาหารเสริมสุขภาพและเป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกใหม่ของประเทศไทยโดยเฉพาะให้กับเด็กปฐมวัย

1.3 วัตถุประสงค์

- ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผักดกแด่ใหม่ไทย
- การสกัดโปรตีนจากผักดกแด่ใหม่ไทย
- การทำ Partial hydrolysis โปรตีนจากผักดกแด่ใหม่ไทย และการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

1.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักดกแด่ใหม่ไทย

โครงการนี้คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ผักดกแด่ใหม่พันธุ์เหลืองสระบุรีเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทดลอง เนื่องจากมีแหล่งที่สามารถหาได้ตามความต้องการและเป็นผักดกแด่แบบแห้ง เบื้องต้นได้ทดลองวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักดกแด่ใหม่อบแห้ง ได้แก่ การวิเคราะห์ Moisture (AOAC Method 930.15), Total nitrogen (AOAC Method 991.20), Fat (AOAC Method 920.39), Ash (AOAC Method 942.05), Fiber (AOAC Method 973.18) โดยวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวอ้างอิงมาจาก AOAC. 2006. Official Methods of Analysis of AOAC international. 18th edition. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA. ซึ่งผลการวิเคราะห์ proximate analysis ที่ได้ของผักดกแด่ใหม่อบแห้งไม่แตกต่างจากผักดกแด่ใหม่แบบ Freeze dry (Untreated-Ref และ Defatted-Ref) ที่นำมาใช้อ้างอิง (Kim et. al., 2016) ดังแสดงใน รูปที่ 1.1 จากผลการทดลองดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่าไม่มีความจำเป็นในการใช้วิธี Freeze dry ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูงในการเก็บตัวอย่างผักดกแด่

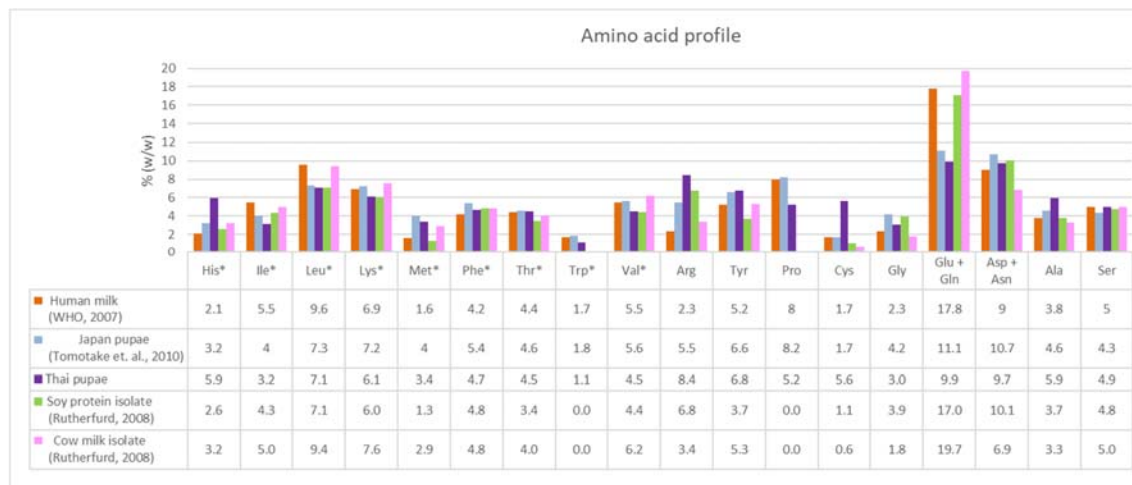


รูปที่ 1.1: ผลเปรียบเทียบการวิเคราะห์ทางเคมีระหว่างดักแด้ไหมไทยแบบอบแห้ง (Untreated-Thai และ Defatted-Thai) กับดักแด้ไหมแบบ Freeze dry (Untreated-Ref และ Defatted-Ref) ที่นำมาใช้อ้างอิง

การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณกรดอะมิโน (AOAC Method 994.12) (แสดงผลใน รูปที่ 1.2) พบว่าคุณภาพของโปรตีนจากดักแด้ไหมที่เหลือจากการสาวไหม (ผ่านการต้มแล้ว) ยังมีคุณค่าคือมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนทั้งที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อร่างกายอย่างครบถ้วน เช่นเดียวกับนํ้านมแม่ โดยมี Proline และ Tryptophan ครบ ในขณะที่ไม่พบในนํ้านมวัวและโปรตีนจากถั่วเหลืองที่แยกได้ ส่วนที่มีความแตกต่างที่พบคือโปรตีนจากดักแด้ไหมมีปริมาณ Histidine Methionine Arginine Tyrosine และ Cystine มากกว่านํ้านมแม่ แต่มี Isoleucine Leucine และ Glutamic + Glutamine น้อยกว่านํ้านมแม่ ส่วนดักแด้ไหมไทยมีความคล้ายกับดักแด้ไหมญี่ปุ่น หากแตกต่างตรงที่มีปริมาณ Histidine Arginine Cystine มากกว่าดักแด้ไหมญี่ปุ่น และมี Proline น้อยกว่าดักแด้ไหมญี่ปุ่น

การวิเคราะห์ปริมาณ Fatty acid profiles (AOAC Method 996.06) (แสดงผลใน ตารางที่ 1.1) ทำให้เห็นว่าดักแด้ไหมไทยมีสัดส่วนของกรดไขมันประเภท polyunsaturated (PUFA): monounsaturated (MUFA): saturated (SFA) เท่ากับ 1.7 : 1 : 1 โดยที่มีไขมันไม่อิ่มตัว Linolenic (C18:3) และ Oleic (C18:1) เป็นองค์ประกอบสำคัญร้อยละ 37.4 และ 26.5 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกันกับที่ Tomotake et. al. (2010) ได้รายงานไว้สำหรับดักแด้ไหมญี่ปุ่น และต่างจากดักแด้ไหมอินเดียที่มีสัดส่วนของ PUFA ต่ำกว่า (0.9 : 1.1 : 1) ส่วนน้ำมันจากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำมันถั่วเหลืองพบว่ามีปริมาณ PUFA ต่ำกว่ามาก เนื่องจาก Linoleic acid (C18:2) และ Linolenic (C18:3) เป็นกรดไขมันที่จำเป็นที่ร่างกายคนเราไม่สามารถผลิตได้เองจึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหาร ดังนั้นจึงถือได้ว่าไขมันหลักของดักแด้ไหมไทยและญี่ปุ่น มีความน่าสนใจในการนำไปใช้เป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็น Linolenic (C18:3) หรือ Short-chain omega-3 fatty acid ที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิต Long-chain omega-3 fatty acid เช่น Eicosapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic acid (DHA) ซึ่งสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาระบบสมองของเด็กทารก เสริมสร้างพัฒนาการการเรียนรู้ในเด็ก ช่วยให้สมองทำหน้าที่ได้อย่างเป็นปกติในผู้ใหญ่ นอกจากนี้ยังช่วยให้ความสมบูรณ์แก่ผิวหนัง ป้องกันการอักเสบ ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

ป้องกันการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ความดันโลหิตสูง และโรคภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง (Liu et. al., 2015)



รูปที่ 1.2: ผลเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโน ระหว่างดักแด้ไหมไทยกับดักแด้ไหมญี่ปุ่น (แบบ Freeze dry) น้านมมนุษย์ น้านมวัว และโปรตีนถั่วเหลือง ที่นำมาใช้อ้างอิง หมายถึง *Essential amino acid

ตารางที่ 1.1 ผลเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันระหว่างดักแด้ไหมไทยกับดักแด้ไหมญี่ปุ่น ดักแด้ไหมอินเดีย น้ำมันรำข้าว และน้ำมันถั่วเหลือง

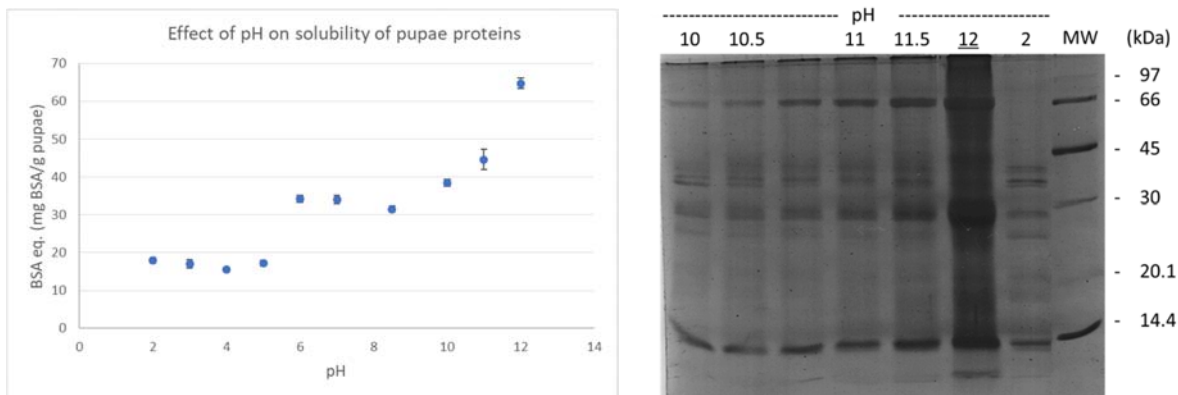
Fatty acid composition		Thai pupae	Japan pupae	India pupae	Rice bran	Soy bean
(g/100 g oil)		(This study)	(Tomotake et. al., 2010)	(Rao, 1994)	(Orsavova et al., 2015)	(Sodamade et al., 2013)
Saturated fatty acid (SFA)		25.43	28.80	33.20	22.50	60.44
Butyric acid	(C4:0)	ND	ND	ND	ND	ND
Caproic acid	(C6:0)	ND	ND	ND	ND	ND
Caprylic acid	(C8:0)	ND	ND	ND	ND	ND
Capric acid	(C10:0)	<0.07	ND	ND	ND	ND
Lauric acid	(C12:0)	0.14	ND	ND	ND	14.44
Tridecanoic acid	(C13:0)	ND	ND	ND	ND	ND
Myristic acid	(C14:0)	0.14	0.10	ND	0.39	41.04
Pentadecanoic acid	(C15:0)	ND	ND	ND	ND	ND
Palmitic acid	(C16:0)	17.90	24.20	26.20	20.00	3.46
Margaric acid	(C17:0)	0.14	ND	ND	ND	ND
Stearic acid	(C18:0)	6.67	4.50	7.00	2.10	1.50
Arachidic acid	(C20:0)	0.29	ND	ND	ND	ND
Heneicosanoic acid	(C21:0)	ND	ND	ND	ND	ND
Behenic acid	(C22:0)	0.07	ND	ND	ND	ND
Tricosanoic acid	(C23:0)	ND	ND	ND	ND	ND
Lignoceric acid	(C24:0)	ND	ND	ND	ND	ND
Total unsaturated fatty acid		69.78	71.20	66.80	77.60	20.19
Monounsaturated fatty acid (MUFAs)		26.96	27.70	36.90	44.00	14.54
Tetradecenenoic acid	(C14:1)	ND	ND	ND	ND	ND
Pentadecenenoic acid	(C15:1)	ND	ND	ND	ND	ND
Palmitoleic acid	(C16:1)	0.51	1.70	ND	0.19	ND
Margaroleic acid	(C17:1)	ND	ND	ND	ND	ND
Oleic acid	(C18:1, n-9)	26.45	26.00	36.90	42.70	14.54
Eicosenoic acid	(C20:1, n-9)	ND	ND	ND	1.11	ND
Erucic acid	(C22:1, n-9)	ND	ND	ND	ND	ND
Nervonic acid	(C24:1, n-9)	ND	ND	ND	ND	ND
Polyunsaturated fatty acid (PUFAs)		42.83	43.50	29.90	33.60	5.65
Linoleic acid*	(C18:2, n-6)	5.22	7.20	4.20	33.10	5.65
Eicosadienoic acid	(C20:2, n-6)	ND	ND	ND	ND	ND
Docosadienoic acid	(C22:2, n-6)	ND	ND	ND	ND	ND
Linolenic acid*	(C18:3, ALA, n-3)	37.39	36.30	25.7	0.45	ND
g-Linolenic acid	(C18:3, n-6)	ND	ND	ND	ND	ND
g-Eicosatrienoic acid	(C20:3, n-3)	0.07	ND	ND	ND	ND
Eicosatrienoic acid	(C20:3, n-6)	ND	ND	ND	ND	ND
Arachidonic acid	(C20:4, n-6)	ND	ND	ND	ND	ND
Eicosapentaenoic	(C20:5, EPA, n-3)	0.14	ND	ND	ND	ND
Docosahexaenoic	(C22:6, DHA, n-3)	ND	ND	ND	ND	ND

1.4 การแยกโปรตีนจากดักแด้ไหมไทย

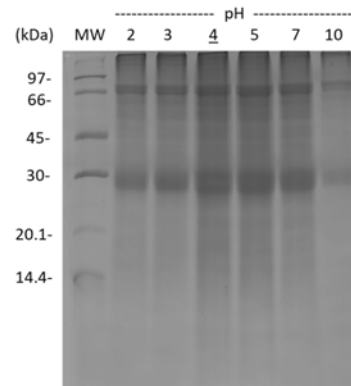
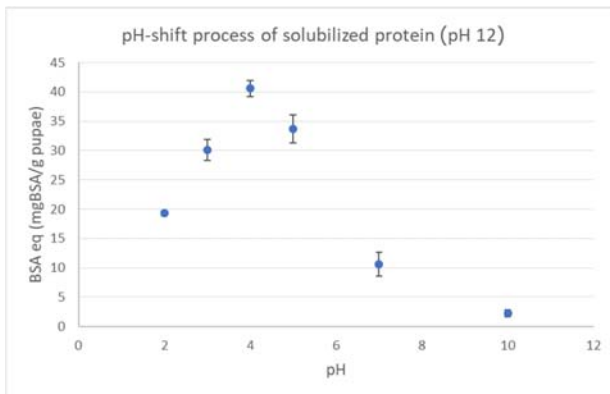
เนื่องจากวัตถุดิบเริ่มต้นมีปริมาณไขมันอยู่มาก ทำให้เราพบกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ที่เกิดจาก Lipid peroxidation ในระหว่างกระบวนการผลิต Protein hydrolysate ดังนั้นทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำได้คือการสกัดไขมันออกก่อน อย่างไรก็ตามกระบวนการสกัดไขมันโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นกระบวนการที่ไม่เป็นมิตรกับสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม และมีโอกาสเกิดสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ เราจึงได้หาลึกเลี้ยววิธีการดังกล่าว และใช้กระบวนการที่สะอาดกว่า คือการสกัดแยกโปรตีนออกมาด้วยวิธีการตกตะกอนแบบ pH-Shift หรือการใช้วิธีปรับ pH เพื่อช่วยในการละลาย และการตกตะกอนโปรตีนที่ Isoelectric point นั้นเอง ทั้งนี้ในระหว่างกระบวนการเราจะสามารถแยกไขมันออกได้ ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป ส่วนโปรตีนที่แยกได้จะนำไปใช้ในการทำ Protein hydrolysate ต่อไป แม้ว่าจะมีการใช้วิธีนี้กับการแยกโปรตีนจากชิ้นส่วนต่างๆ ที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์

จากปลา กุ้ง แต่ก็ยังไม่พบรายงานที่ใช้วิธีนี้กับดักแด้ใหม่ โดยเราสามารถหาสภาวะในการละลายโปรตีนออกจากดักแด้ใหม่ (Solubilized pupae proteins) ดัง รูปที่ 1.3 และหาสภาวะที่ตกตะกอนโปรตีนที่ละลายออกมาได้ดังกล่าว (Pupae protein isolate) ดัง รูปที่ 1.4 ซึ่งได้ Yield ต่อวัตถุดิบเริ่มต้นสูงที่สุด (based on total amino acid analysis) คือ 38.5% ที่ pH 12 และ 28% ที่ pH 4 ตามลำดับ และพบว่าโปรตีนที่แยกได้ในชั้นนี้ยังคงประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ครบถ้วนในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับวัตถุดิบเริ่มต้น ยกเว้น Met ที่มีปริมาณลดลงใน Pupae protein isolate (ดังแสดงในรูปที่ 1.5) จากการสังเกตพบว่าการใช้วิธี pH-shift ในการสกัดแยกโปรตีน สามารถลดการเกิดกลิ่นหืนที่ไม่ต้องการได้ ซึ่งจะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบค่า TBARS ที่ใช้เป็นตัวชี้วัด Lipid peroxidation ในการทดลองต่อไป ส่วนโปรตีนที่ยังคงเหลือไม่สามารถสกัดได้โดยวิธีนี้อีกประมาณกว่า 60% คาดว่าจะเป็นพวก Membrane bound protein และยังคงมีไขมันประเภท Phospholipid อยู่ด้วย ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไปเช่นเดียวกัน

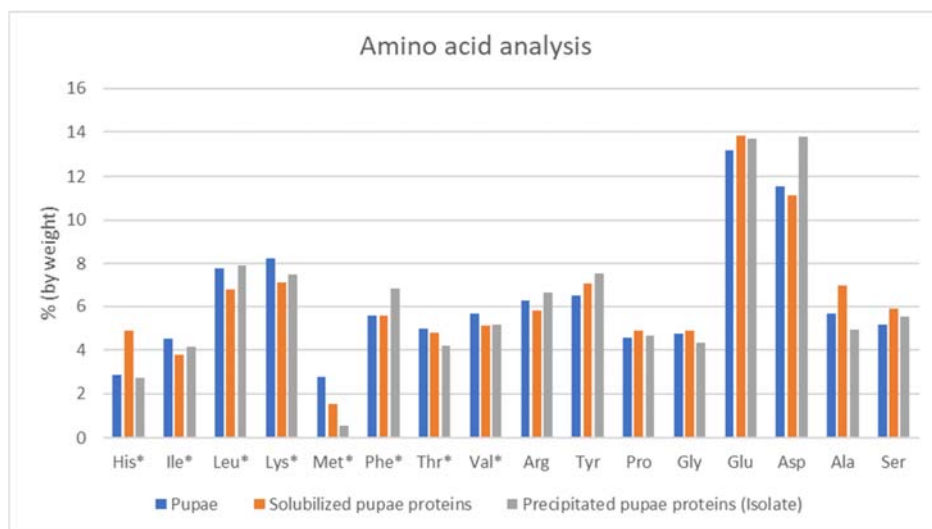
เนื่องจากความต้องการที่จะพัฒนาดักแด้ใหม่สายพันธุ์ไทยไปสู่ food supplement product คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการตกตะกอนสารละลายโปรตีนที่ pH 4 เพิ่มเติมด้วยการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ที่เป็น food grade ได้แก่ citric acid และ acetic acid เปรียบเทียบกับสารละลายกรดอินทรีย์ hydrochloric acid และตรวจสอบคุณสมบัติการละลายกลับของโปรตีนที่ตกตะกอนได้ เพื่อเป็นทางเลือกให้กับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองพบว่าการใช้กรดอินทรีย์สามารถตกตะกอนโปรตีนจากดักแด้ให้ผลดีเช่นเดียวกันกับกรดอินทรีย์ และแม้ว่าคุณสมบัติในการละลายกลับที่ pH 7 ของโปรตีนจากดักแด้ใหม่ที่ตกตะกอนได้โดยใช้กรดที่แตกต่างกันจะมีบ้างเล็กน้อย คือการละลายยากขึ้นเมื่อใช้ acetic acid แต่การละลายกลับที่ pH 12 ไม่มีความแตกต่างกัน (ดังแสดงใน รูปที่ 1.6)



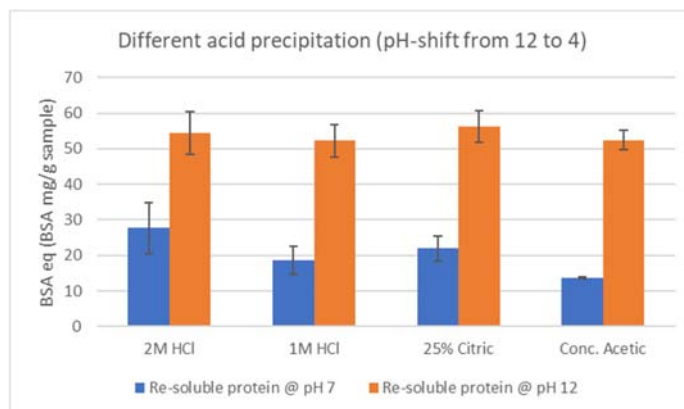
รูปที่ 1.3: ผลเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายออกมาจากดักแด้ใหม่ไทย โดยการปรับ pH เพื่อการละลายโปรตีน



รูปที่ 1.4: ผลเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในตะกอนที่ได้จากการใช้ pH-shift กับสารละลายโปรตีนดักแด้ไหมที่ pH 12



รูปที่ 1.5: ผลเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีในดักแด้เริ่มต้น (Pupae) โปรตีนที่ละลาย (Solubilized pupae proteins) และโปรตีนที่แยกได้ (Pupae protein isolate) หมายเหตุ *Essential amino acid



รูปที่ 1.6: ผลเปรียบเทียบการตกตะกอนโปรตีนโดยวิธี pH-shift โดยใช้กรดแตกต่างกัน และการละลายกลับ

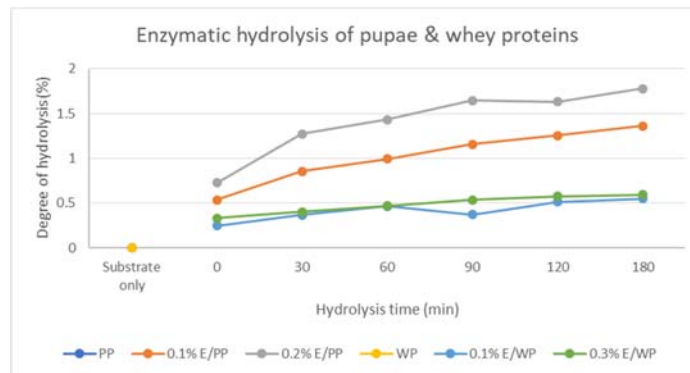
1.5 การทำ Partial hydrolysis โปรตีนจากดักแด้ไหมไทย และการศึกษาคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระ

ในการทดลองเบื้องต้นของการพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยการแปรรูปดักแด้ไหมไทยไปสู่โปรตีนไฮโดรไลเซส คณะผู้วิจัยได้ใช้ Commercial protease: Alcalase® (protease activity = 277 U/ml) เพื่อย่อย Pupae protein isolate ที่ได้ และเปรียบเทียบกับโปรตีนหางนมเข้มข้นในรูปแบบผง (Whey protein) ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของปริมาณเอนไซม์ต่อโปรตีนหรือสารตั้งต้น (E/S) ดังนี้คือ 0.1% และ 0.2% สำหรับการย่อย Pupae protein และ 0.1% และ 0.3% สำหรับการย่อย Whey protein โดยย่อยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 8 และจากผลการทดลองเราพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป Degree of hydrolysis (%DH) หรือค่าที่แสดงถึงระดับการถูกย่อยสลายพันธะ peptide ในโปรตีนเมื่อเทียบกับปริมาณพันธะ peptide ทั้งหมดที่มีในโปรตีนตั้งต้น (Nielsen et al., 2001) จะมีค่าเพิ่มขึ้นโดยเพิ่มขึ้นมากในช่วงแรกและน้อยลงในช่วงท้ายตามความคาดหมาย ทั้งนี้ reaction ที่ใช้ E/S 0.1% ของ Pupae protein มี %DH มากกว่า reaction ที่ใช้ E/S 0.3% ของ Whey protein (แสดงใน รูปที่ 1.7) จึงแสดงให้เห็นได้ว่า Alcalase® สามารถย่อย Pupae protein ได้ดีกว่า Whey protein อย่างไรก็ดีตามแนวโน้มที่กล่าวมานี้จะทำให้ได้ %DH ที่ไม่สูง เนื่องจากใช้อัตราส่วนปริมาณเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นในระดับที่น้อย แต่ในโปรตีนดักแด้ไหมที่ถูกย่อย (Pupae hydrolysate) มีค่าดัชนีที่ใช้วัดความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ หรือ FRAP-value (Ferric Reducing Antioxidant Power) ที่สูงที่สุดถึง 120 ในขณะที่โปรตีนตั้งต้นไม่มีความสามารถนี้ (แสดงใน รูปที่ 1.8A) ซึ่งนำเสนออยู่ในรูปของปริมาณเทียบเท่ากับ Fe²⁺ ferrous (Fe²⁺ equivalent ในหน่วย mM) ต่อปริมาณตัวอย่าง ทั้งนี้เพราะสารที่มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระจะสามารถ reduce ferric ให้กลายเป็น ferrous ได้นั่นเอง ในการทดลองนี้ค่า FRAP-value 1 mM เทียบเท่ากับความสามารถของ Vitamin C 0.25 mM ในขณะที่ผลิตภัณฑ์หางนมที่ถูกย่อย (Whey hydrolysate) ไม่มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการนี้ แต่คาดว่าจะมีความสามารถในการเป็น Metal chelator ได้ (แสดงใน รูปที่ 1.8B)

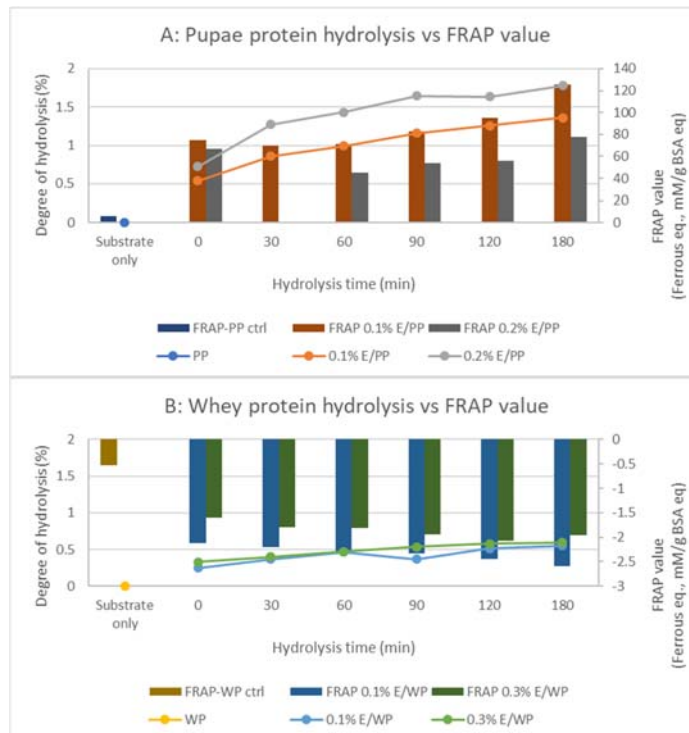
เมื่อพิจารณาผลการทดลองทำให้เห็นได้ว่าค่า FRAP ไม่ได้แปรผันตรงตาม %DH และเวลาในการย่อย และด้วยชนิดของเอนไซม์และสภาวะต่างๆ ที่เลือกใช้แบบเดิม การปรับปริมาณอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นให้เพิ่มขึ้น แม้จะทำให้ค่า %DH เพิ่มขึ้นแต่ความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระไม่ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่าการย่อยได้มากไม่ได้ทำให้ได้ peptide ที่มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้น (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้) อย่างไรก็ตามหากมีการเปลี่ยนชนิดของเอนไซม์ซึ่งมีความจำเพาะให้การย่อยโปรตีนให้ได้ peptide ที่แตกต่างไปจากนี้ อาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระนี้ไป นอกจากนี้เราได้ขยายขนาดการผลิตไปที่ระดับ 30 L และใช้วิธีทำแห้งเปรียบเทียบทั้งแบบ Spray dry และ Freeze dry เพื่อให้ได้สารที่มีความสามารถทางชีวภาพที่มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว ในการเป็นสารเสริมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ นอกเหนือจากสารอาหารคือกรดอะมิโนต่างๆ แล้วเนื่องจากเราคาดการณ์ว่าการที่ผลิตภัณฑ์มีองค์ประกอบของสารที่มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระนี้จะช่วยให้สามารถยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานยิ่งขึ้น

นอกจากนี้เราได้ทดสอบคุณสมบัติด้าน Functional properties ในอาหารอื่นๆ ด้วย เพื่อหาว่า Pupae protein isolate และ Pupae protein hydrolysate จะเหมาะสมกับการนำไปใช้เป็น food supplement และ food additive อย่างไรต่อไป เช่น การทดสอบคุณสมบัติในการให้ยีสต์ขนมปังทนต่อการถูกแช่แข็งและช่วยให้ขนมปังขึ้นฟูได้ดี (Izawa et. al., 2007) การทดสอบคุณสมบัติในการเป็น emulsifier ในน้ำกะทิ คุณสมบัติในการอุ้มน้ำในเนื้อสัตว์

(Water holding capacity) (Geirsdottir, et. al., 2011) ใน Yogurt (Wang, et. al., 2017) ทั้งนี้ผลการทดลองอยู่ระหว่างการจัดเตรียม Manuscript เพื่อลงวารสาร Food Bioscience (Publisher Elsevier BV)



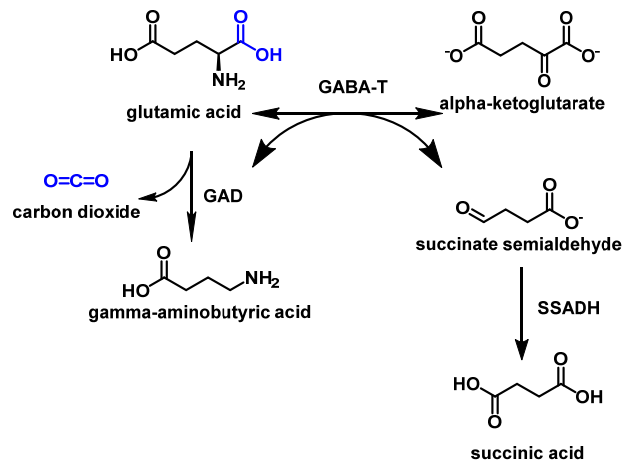
รูปที่ 1.7: ผลเปรียบเทียบระดับการถูกย่อยสลายพันธะ peptide ใน Pupae protein (PP) และ Whey protein (WP) เมื่อใช้สัดส่วนโดยน้ำหนักของปริมาณเอนไซม์ต่อโปรตีนตามที่กำหนด ภายใต้อุณหภูมิ 60°C pH 8 เป็นเวลา 3 h



รูปที่ 1.8: กราฟแสดง %DH และ FRAP-value ของ Hydrolysate ที่ได้จาก Pupae hydrolysate (A) และ Whey hydrolysate (B) หมายเหตุ ไม่มีผลของ FRAP 0.2% E/PP ที่เวลา 30 นาที

1.6 เอกสารอ้างอิง

- 1 คณะกรรมการอาหารแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข กรอบยุทธศาสตร์การจัดการด้านอาหารของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2555-2559
- 2 AOAC. 2006. Official Methods of Analysis of AOAC international. 18th edition. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- 3 Izawa, S., et al. (2007). Improvement of tolerance to freeze-thaw stress of baker's yeast by cultivation with soy peptides. Appl Microbiol Biotechnol 75: 533-537.
- 4 Geirsdottir, M. et al. (2011). Enzymatic hydrolysis of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*); functional and bioactive properties. Journal of Food Science 76 (Nr. 1): C14-C20.
- 5 Kim, H-W., Setyabrata, D., Lee, Y. J., Jones, O. G., Kim, Y. H. B. (2016). Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages. Innovative Food Science and Emerging Technologies 38: 116-123.
- 6 Liu X, Wang X, Pang N, Zhu W, Zhao X, Wang F, Wu F, and Wang J. (2015) APA-style human milk fat analogue from silkworm pupae oil: enzymatic production and improving storage stability using alkyl caffeates. Scientific Reports | 5:17909
- 7 Nielsen, P.M., Petersen, D., and Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. Journal of Food Science 66(5): 642-646.
- 8 Rutherfurd, S.M. and Moughan, P.J. (1998) The digestible amino acid composition of several milk proteins: application of a new bioassay. Journal of Dairy Science. 81(4):909-917.
- 9 Sodamade, A., et al. (2013). Fatty acids composition of three different vegetable oils (soybean oil, groundnut oil and coconut oil) by high performance liquid chromatography. Chemistry and Materials Research 3(7): 26-29.
- 10 Tomotake, H., Katagiri, M., Yamato, M. (2010) Silkworm pupae (*Bombyx mori*) are new sources of high quality protein and lipid. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 56: 446-448.
- 11 Orsavova, J., et al. (2015). Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. Int. J. Mol. Sci. 16: 12871-12890.
- 12 Wang, W., et al. (2017). Effect of silkworm pupae peptide on the fermentation and quality of yogurt. Journal of Food Processing and Preservation 41: e12893.
- 13 Yang R, Zhao X, Kuang Z, Ye M, Luo G, Xiao G, Liao S, Li L, and Xiong Z. (2013) Optimization of antioxidant peptide production in the hydrolysis of silkworm (*Bombyx mori* L.) pupa protein using response surface methodology. Journal of Food, Agriculture & Environment 11(1): 952-956.



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์และเมตาบอลิซึมของ GABA และ glutamic acid ในสิ่งมีชีวิต

GABA-T คือเอนไซม์ GABA-transaminase, SSADH คือ succinate semialdehyde dehydrogenase

การศึกษาทางการแพทย์พบว่า GABA มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบประสาท โดยรายงานหลายฉบับยืนยันว่า หากระบบประสาทไม่สามารถผลิต GABA ได้เพียงพอกับความต้องการ อาจก่อให้เกิดความผิดปกติทางระบบประสาทได้ เช่น การวิเคราะห์สมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจาก schizophrenia หรือ Huntington's chorea พบว่ามีปริมาณ GABA ต่ำ (Perry et al., 1979) นอกจากนี้ หากมีปริมาณ GABA ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ยังสามารถก่อให้เกิดภาวะเครียดผิดปกติ (Vaiva et al., 2004) โรคซึมเศร้า และรวมไปถึงการมีอารมณ์ที่รุนแรง (Bjork et al., 2001) และโรคสมาธิสั้นในเด็ก (Edden et al., 2012) ในทางกลับกัน การรับประทานอาหารเสริมที่มี GABA ช่วยทำให้ผ่อนคลาย และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน (Abdou et al., 2006) ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในเด็ก ผู้สูงอายุ และผู้ป่วยในหลายๆ กรณี นอกจากนี้ GABA ยังมีส่วนสำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบหัวใจ (Gordon and Sved, 2002; GoŹlińska et al., 1999) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ควบคุมการทำงานของระบบฮอร์โมนและไต (Abdou et al., 2006) และ ป้องกันโรคเบาหวาน (Li and Cao, 2010) ดังนั้น อาหารเสริมที่มี GABA จึงสามารถบริโภคได้โดยคนทุกเพศและทุกวัย

แหล่งของ GABA ในธรรมชาติที่สำคัญนั้น ได้แก่ ธัญพืช อาหารที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ lactic acid bacteria (LAB) ข้างล่างงอก ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง (Li and Cao, 2010) นอกจากนี้ มีรายงานว่าอาหารที่ผ่านการหมักโดยเชื้อ lactic acid bacteria (LAB) ซึ่งมีปริมาณ GABA สูงนั้น ยังช่วยลดความดันได้อีกด้วย (Shizuka et al., 2004; Shimada et al., 2009; Inoue et al., 2003) โดยอุตสาหกรรมอาหาร ได้ให้ความสนใจกับการผลิตอาหารหมักดองโดยใช้เชื้อ LAB ที่สามารถผลิต GABA ได้ในปริมาณสูง จากการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ glutamic acid decarboxylase ที่ผลิต GABA ได้จากจากอาหารหมักนั้น เป็นทางเลือกที่จำกัดสำหรับผู้บริโภค และการสกัด GABA จากอาหารที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น ข้างล่าง ยังเป็นการผลิตที่มีต้นทุนสูง และได้ผลผลิตที่มีปริมาณต่ำ ทำให้ผู้บริโภคจำนวนมากยังไม่สามารถเข้าถึงผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้ ในทางกลับกัน เทคโนโลยีทางชีวภาพ อาทิเช่น recombinant technology, protein engineering, bioprocess engineering สามารถนำมาใช้ในการผลิต GABA ในปริมาณสูง มีคุณภาพ และความปลอดภัย ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ ได้ นอกจากนี้ การผลิต GABA โดยใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพ ยังทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สม่ำเสมอและเพียงพอต่อความต้องการของตลาดได้มากกว่าแหล่งธรรมชาติ ทั้งยังสามารถเพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภคโดยการทำผลิตภัณฑ์ในรูปแบบอื่น เช่น แคปซูล หรือเป็นส่วนผสมในอาหารอื่นๆ

นอกจากจะใช้ GABA ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมแล้ว GABA ยังใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตสารเคมีอื่นๆ เช่น 2-pyrrolidone ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมเคมี (Kang et al., 2013) ซึ่งการผลิต GABA จากเอนไซม์ GAD นั้น มีหลากหลายรูปแบบ เช่น immobilised enzyme, whole cell biocatalyst, purified GAD แต่จากการสำรวจ เอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด พบว่า GAD ทำงานได้ดีในภาวะที่เป็นกรด (pH ระหว่าง 3.8 – 5) แต่ glutamic acid ละลายน้ำได้ไม่ดีในช่วง pH นี้ จึงเป็นข้อจำกัดในการทำปฏิกิริยา

ดังนั้น การปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์หรือเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิต GABA จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อส่งเสริมอุตสาหกรรมอาหารเชิงหน้าที่

2.3 วัตถุประสงค์

- การคัดหาสายพันธุ์ lactic acid bacteria (LAB) และเทคนิค recombinant DNA เพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับผลิต GABA
- พัฒนา assay สำหรับวัดปริมาณ GABA หรือ MSG ที่เหลืออยู่ในระบบ แทนการใช้ HPLC

2.4 การคัดเลือกยีนและการศึกษาสภาวะสำหรับผลิต GAD เอนไซม์

เอนไซม์จาก *Oryza sativa subsp. japonica* (Rice) (UniProt Accession Q9AR41) ถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษา เนื่องจากมีรายงานว่า เอนไซม์นี้สามารถผลิต GABA ได้รวดเร็ว และหากตัด C-term ออกแล้ว ยังมี activity ที่สูงอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับ GAD จากสปีชีส์อื่น โดยยีนนี้ถูก clone ลงใน pET17b และ pET48b และการแสดงออกถูกควบคุมโดย T7 promoter และสามารถ induce ได้ด้วย IPTG

การปรับสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้น GAD activity และการผลิต

- ใช้แหล่งอาหารที่มีวิตามิน B สูง โดยเฉพาะ pyridoxine เพื่อชดเชย pyridoxal 5-phosphate สำหรับการทำงานของ GAD โดยให้ปริมาณ total nitrogen คงที่ และใช้ LB เป็นพื้นฐานในการปรับสูตรอาหาร โดยแหล่ง nitrogen source ที่ใช้ศึกษาคือ yeast extract, Soy peptone, Soy hydrolysate, tryptone โดยมีการปรับสัดส่วนดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สูตร และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดปริมาณการใช้ PLP

Composition	LB broth	Optimized #1	Soy peptone LB	Soy peptone opt #1 (1)	Soy peptone opt #1 (2)	Soy peptone opt #1 (3)	Soy hydrolysate LB	Soy hydrolysate opt #1
Yeast extract (g/L)	5	16	5	16	9.64	22	5	16
Tryptone (g/L)	10	5	-	-	-	-	-	-
Soy peptone (g/L)	-	-	14.6	7.3	15	-	-	-
Soy hydrolysate (g/L)	-	-	-	-	-	-	13.2	6.55
NaCl (g/L)	10							
Ampicillin (μ/L)	เติม Ampicillin 150 mg/ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 150 μg/ml ก่อนการใช้งาน							
Total N-source (g/L)	1.86	2.40	1.89	2.40	2.40	2.40	1.87	2.40

- ใช้ minimal medium เพื่อศึกษา effect ของ C:N ratio ต่อการแสดงออกของยีนส์ และการเจริญเติบโต

M9 minimal medium ถูกใช้เป็นฐาน ในการปรับสูตรอาหาร โดย M9 5x ประกอบด้วย

Na₂HPO₄ 33.9 g/L

KH₂PO₄ 15 g/L

NH₄Cl 5 g/L

NaCl 2.5 g/L

โดยทำการปรับสูตรอาหารดัง ตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สูตรอาหาร minimal medium ที่ใช้ในการเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GAD ใน pET17b เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่าง leaky expression level และ ปริมาณ total nitrogen

	unit	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume
M9 5x	ml	2	2	2	2	2	2	2	2
YE (25g/L)	ml	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
Glucose 20% W/V	ml	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DW	ml	7.3	6.8	6.3	5.8	5.3	4.8	4.3	3.8
Total Volume	ml	10	10	10	10	10	10	10	10

- การปรับสูตรอาหารเพื่อให้เซลล์มีสภาวะเป็นกรดและกระตุ้นการตอบสนองต่อสภาวะที่เป็นกรด เพื่อกระตุ้นการทำงานของ GAD enzyme โดยเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GAD enzyme ถูกเลี้ยงใน LB pH 5.0 หรือเติม glucose ในปริมาณสูงพอที่ทำให้เกิด acid ระหว่างเจริญเติบโต เพื่อกระตุ้นการทำงานของ GAD โดยใส่ PLP ระหว่างเลี้ยง เพื่อส่งเสริม protein folding นอกจากนี้ยังเติม monosodium glutamate เมื่อเลี้ยงใน pH5 เพื่อเป็นแหล่งกรดอะมิโนในการผลิต GABA เพื่อปรับตัวในสภาวะที่เป็นกรด

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพื่อกำหนดการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการใน GAD enzyme

Primers ดังต่อไปนี้ ใช้ในการปรับลำดับกรดอะมิโนใน GAD enzyme ด้วยวิธี Site-directed mutagenesis

A232E R236E Frd CTGGCTGAAAAAAACAAAGAGACCGGTTGGGAC

A232E R236E Rev CCAACCGGTCTCTTTGTTTTTTCAGCCAGCAG

P314A Frd GGTGCTGACCAGGGCACCCTTCACCCTG

P314A Rev CAGGGTGAAGGTGCCCTGGTCAGCACC

R392E Frd GCTCAGGCTTTTCGAGCTGTCTTCTGG

R392E Rev CCAGAAGACAGCTCGAAAGCCTGAGC

Gad delt C-term Frd 2 CGTACCGCTTGAGAAGAAGCTTCTATC

Gad delt C-term Rev 2 GATAGAAGCTTCTTCAAGCGGTACG

หมายเหตุ: ตัวหนา คือ codon ที่จะใช้ ชิดเส้นใต้คือ base ที่ต้องการเปลี่ยน

PCR reaction ถูกกำหนด annealing temperature ที่ 55°C และ elongation time 10.5 นาที ด้วย pfu DNA polymerase จำนวน 25 cycles เมื่อ transform PCR เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) แล้ว mutation ถูกยืนยันด้วย DNA sequencing

การทดสอบ expression ของ GAD enzyme ใน *E. coli*

หลังจากที่เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ต้องการศึกษา จนครบเวลาแล้ว จึงนำเซลล์มาปั่นตกตะกอน และแยกอาหารออก จากนั้นนำเซลล์มาละลายใน 100 mM Tris buffer, pH 7.0 และย่อยเซลล์ด้วย sonication แล้วปั่นแยกตะกอนเซลล์ กับโปรตีนที่ละลายน้ำ จากนั้น นำส่วนใสและตะกอนเซลล์ไปวิเคราะห์ต่อด้วย SDS-PAGE เพื่อดู profile ของ protein ในทั้ง 2 ส่วน

การทดสอบ activity ของ GAD enzyme

หลังจากที่เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ต้องการศึกษา จนครบเวลาแล้ว จึงนำเซลล์มาปั่นตกตะกอน และแยกอาหารออก จากนั้นนำเซลล์มาละลายใน 20 mM MSG-glutamic acid, pH 4.0 เขย่าที่ 25°C และเก็บตัวอย่างออกมาต้มที่ 90°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นปั่นตกตะกอน แล้วนำส่วนใสไปกรองผ่าน 0.45 µm filter ก่อนนำไปวัดปริมาณ GABA, glutamic acid ด้วย HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณ GABA และ Glutamic acid

ส่วนใสของปฏิกิริยา ถูกนำมาเจือจาง 10-100 เท่าใน Tris buffer, pH 7.0 แล้วจึงเติม O-Phthalaldehyde (OPA; Sigma, cat. no P0532-50ML) ปริมาณ 50µL ต่อตัวอย่าง 200 µL แล้วฉีดเข้า HPLC ทันที

2.5 ผลการปรับสูตรอาหารโดยใช้แหล่ง Nitrogen อื่น และแหล่งอาหารที่มี pyridoxine

การทดลองก่อนหน้านี้ เมื่อปรับสูตรอาหารให้มีปริมาณ yeast extract เพิ่มขึ้น ให้สูงถึง 16 g/L แล้วลดปริมาณ tryptone ลงเหลือ 5 g/L สามารถเพิ่มการผลิต GABA ได้ เทียบเท่ากับการเสริม PLP ในปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาลิ้นสุดเมื่อ ผ่านไป 24 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้เชื้อที่เลี้ยงใน LB เพียงอย่างเดียว นั้น กลับสามารถผลิต GABA ได้เพียงครึ่งเดียวของ เชื้อที่เลี้ยงใน Optimise No1. อย่างไรก็ตาม ระหว่างทำการทดลองนั้น ประสบปัญหาไม่สามารถผลิต GABA ได้ปริมาณ สูงดังเดิม โดยสาเหตุหลักมาจากการเกิด inclusion body ระหว่าง sub-culture การปรับสูตรอาหาร จึงถูกนำมาใช้ในการแก้ปัญหาเบื้องต้น

Soy peptone และ soy hydrolysate เป็นโปรตีนที่ได้จาก soybean ซึ่งมีวิตามิน B6 เป็นองค์ประกอบ จึงถูกนำมา ศึกษาในครั้งนี้

จาก ตารางที่ 2.3 ปริมาณ GABA ที่ *E. coli* BL21 (DE3) ผลิตได้ข้างต้น พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร LB แล้ว ทำการเติม PLP ระหว่างทำปฏิกิริยา ที่ 0.2 mM สามารถผลิต GABA ได้ 2.09 mM ในขณะที่การผลิต GABA โดยเชื้อที่ เลี้ยงใน LB เท่านั้น สามารถผลิต GABA ได้เพียง 0.232 mM ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นเกือบ 10 เท่า ในขณะที่ สูตรอาหาร Optimized #1 ผลิต GABA ได้ 0.31 mM ซึ่ง มากกว่าเชื้อที่เลี้ยงใน LB ราวๆ 2 เท่า ส่วนสูตรที่ใช้ soy hydrolysate และ soy peptone นั้น ผลิต GABA ได้น้อยกว่าการใช้ yeast extract ในสูตรเดียวกัน

จากการทดลองนี้ สามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่า การเติม PLP ในปฏิกิริยานั้น สามารถทำให้เซลล์ผลิต GABA ได้เพิ่มขึ้น จาก 0.232 mM เป็น 2.09 mM แต่ปริมาณ GABA ที่ได้นั้น คิดเป็นเพียง 10 เท่า ของ PLP ที่เติมลงไปในการปฏิกิริยา แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาน่าจะยังสามารถดำเนินต่อไปได้ เพราะเมื่อพิจารณาจาก equilibrium ของปฏิกิริยาแล้ว การเกิด carbondioxide ในปฏิกิริยา decarboxylation น่าจะทำให้ equilibrium ถูกดึงไปฝั่งการผลิต GABA และควรทำให้ ปฏิกิริยาดำเนินไปจนเกือบสมบูรณ์ได้ ดังนั้นปัจจัยอื่น เช่น Inhibition, mass transfer หรือเอนไซม์เสื่อมสภาพ อาจเป็น ปัจจัยที่ทำให้ได้ปริมาณ GABA น้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้

ตารางที่ 2.3 ผลของการใช้อาหารสูตรต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และปริมาณ GABA ที่ได้ เมื่อใช้ GAD เอนไซม์

Formula	Final pH	Final OD600	Specific growth rate (h ⁻¹)	doubling time (min)	Total N (g/L)	GABA mM
Optimized #1	8.45	11.7	0.335	124	2.40	0.311
LB control	8.25	6.52	0.558	74.5	1.86	0.162
Soy peptone opt #1	8.73	14.8	0.388	107	2.40	0.273
Soy peptone LB	8.75	12.9	0.512	81.2	1.89	0.272
Soy hydrolysate opt#1	8.54	14.8	0.299	139	2.40	0.149
Soy hydrolysate LB	8.45	8.83	0.439	94.7	1.87	0.096
LB + 0.2 mM PLP*						2.09

PLP ถูกเติมเข้าไประหว่าง ทำปฏิกิริยา ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 mM

2.6 ผลของการตัด C-term ออก

จากรายงานของ Akama และ Takaiwa (2007) ชี้ให้เห็นว่า C-term ของ GAD สามารถหยุดการทำงานของเอนไซม์ได้ และการตัด C-term ออกนั้น สามารถส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่ pH ประมาณ 7 ได้ (Akama and Takaiwa, 2007) ในการทดลองนี้ ได้ทำการตัด C-term ของยีน GAD ของเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ออกไปประมาณกรดอะมิโน 31 ตัว เมื่อตัดส่วนของ C-term ออก คาดว่าจะทำเอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากการทดลองผลิต GAD Δ C ใน *E. coli* BL21(DE3) แล้วทำการผลิต GABA พบว่า เมื่อตัด C-term ออกแล้วนั้น สามารถผลิต GABA ได้มากกว่าเดิม เป็น 4.85 mM เมื่อมีการเติม PLP ลงในปฏิกิริยา ดังแสดงใน ตารางที่ 2.4 แสดงให้เห็นว่า ปัญหาหลักของการผลิต GABA ด้วย GAD เอนไซม์นั้น อยู่ที่ activity ของเอนไซม์เป็นส่วนใหญ่ และการดัดแปลงเอนไซม์ เช่น การปรับเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโน เป็นทางเลือกที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้

ตารางที่ 2.4 ผลของการใช้ GAD Δ C ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหารสูตรต่างๆ

Microbe	Formula	Specific growth rate (h ⁻¹)	doubling time (min)	GABA amount (mM)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1(1)	LB control	0.432	96.3	1.18
	LB PLP			4.85
	Autoinduction	0.372	112	0.870
	Optimized #1	0.485	85.8	0.850

การลดการเกิด inclusion body เพื่อให้เกิด active enzyme นั้น เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องพิจารณา หากต้องการผลิต GABA ให้ได้มากขึ้น นอกเหนือจากสูตรอาหารแล้ว การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ก็สามารถส่งเสริมการทำงานของ chaperone เพื่อให้เกิด protein folding ได้มากขึ้น ดังนั้น จึงทำการทดลองเลี้ยง *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GAD Δ C ที่ 25 และ 42°C รวมถึงทดลองเลี้ยงเชื้อที่สภาวะที่เป็นกรด เพื่อกระตุ้นการทำงานของ GAD

2.7 ผลของ pH และอุณหภูมิระหว่างเลี้ยง *E. coli* ที่มี GAD Δ C ต่อการผลิต GABA

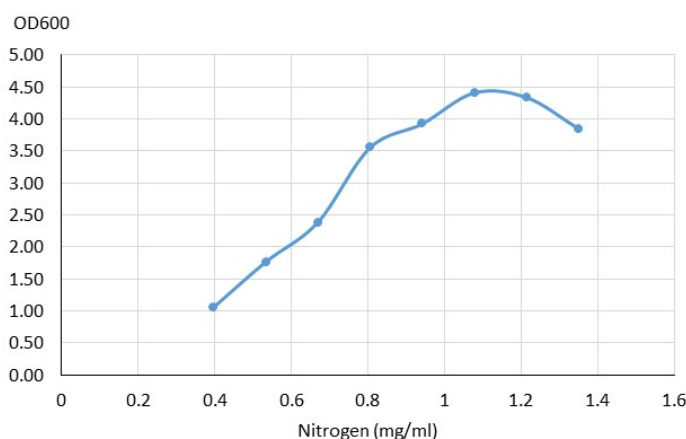
ในสภาวะที่เป็นกรด *E. coli* จะใช้ glutamic acid เพื่อผลิต GABA เพื่อปรับ pH ให้เป็นกลางเพื่อความอยู่รอด ดังนั้นจึงทำการทดลองเลี้ยง *E. coli* ที่มี GAD Δ C ใน LB ที่ pH 5 และ LB ที่ pH5 พร้อม supplement ด้วย MSG เปรียบเทียบกันการใช้ LB เพียงอย่างเดียว สำหรับการเลี้ยงที่ 42°C นั้น เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นจึงเพิ่มเป็น 42°C เพื่อให้เชื้อได้มีการปรับตัว จาก ตารางที่ 2.5 เชื้อที่ถูกเลี้ยงใน pH 5 ณ 25 °C สามารถผลิต GABA ได้เพิ่มขึ้น มากกว่าการเลี้ยงที่ pH7 ตารางที่ 2.4 และมากกว่า GAD ที่มีการเติม PLP ที่ 2.09 mM ตารางที่ 2.3 แต่อย่างน้อยก็การเติม PLP เพียงลำพัง และเลี้ยงที่ pH 7.0 (4.85 mM)

จากการทดลองขั้นต้นที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่า pH, ปริมาณ PLP อุณหภูมิ และปริมาณ active enzyme มีผลต่อปริมาณ GABA ที่จะผลิตได้ โดยการหยุด leaky expression และ inclusion body เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผลิต active enzyme ได้ โดยในส่วนถัดไป เป็นการศึกษาผลกระทบของ nitrogen content ต่อการเจริญเติบโต และการผลิต GAD

ตารางที่ 2.5 ผลของอุณหภูมิและ pH ต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GAD Δ C และการผลิต GABA

Incubation temperature	Formula	Specific growth rate (h ⁻¹)	doubling time (min)	GABA (mM)
25°C	LB control	0.531	78.4	1.47
	LB pH 5	0.320	130	2.71
	LB pH 5 + MSG	0.321	130	0.837
42°C	LB control	1.07	38.7	0.792
	LB pH 5	0.862	48.2	0.032
	LB pH 5 + MSG	0.824	50.5	0.217

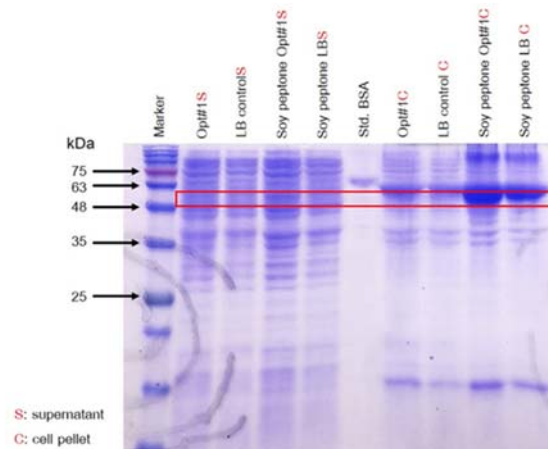
จาก กราฟที่ 2.1 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Nitrogen ใน M9 minimal medium แล้ว พบว่า ปริมาณเซลล์ที่ได้เพิ่มขึ้นตามปริมาณ nitrogen ที่ใช้ โดย optimal C:N ratio สำหรับการเจริญเติบโตอยู่ที่ 1.73 mol:mol หรือ 1.48 g:g (total nitrogen 11.6-11.8 mg/ml) ทั้งนี้ leaky expression นั้น พบเมื่อมี nitrogen สูงเกินกว่า 0.8 mg/ml (SDD-PAGE not shown) และมี OD600 สูงกว่า 3.5 จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อใช้ nitrogen เพิ่มขึ้น



กราฟที่ 2.1 OD600 ของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GAD ใน pET17b เมื่อเลี้ยงใน M9 ที่มีความเข้มข้นของ Nitrogen ต่างกัน

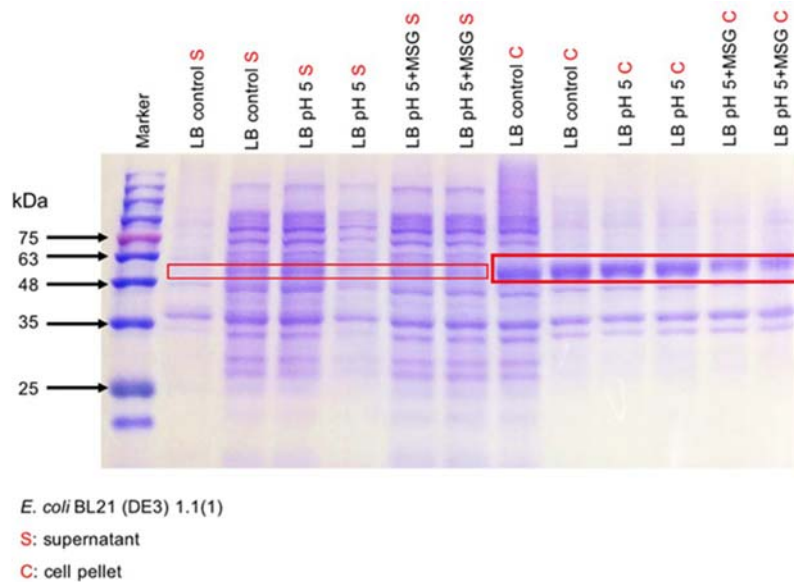
2.8 การแสดงออกของเอนไซม์ GAD ก่อนการตัด GAD C-term

GAD เอนไซม์ ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ นั้น ถูกนำมาตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ด้วย SDS-PAGE ดังแสดงใน รูปที่ 2.3 และ รูปที่ 2.4 โดยเมื่อมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ใน inclusion body ก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน สอดคล้องกับการศึกษาด้วย minimal medium ทั้งนี้ soy peptone และ soy hydrolysate นั้น มี carbon source อยู่ด้วย ทำให้มีปริมาณเซลล์สูงขึ้น และส่งผลให้มีการสังเคราะห์โปรตีนได้เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน



รูปที่ 2.3 ผลการทำ SDS-PAGE ของ GAD enzyme ในอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ก่อนทำการตัด c-term หมายถึง: GAD ทั้งหมด อยู่ใน pET17b

- | | |
|--------|--|
| แถว 1 | BLUeye Prestained Protein Ladder marker ขนาด 10-245 kDa |
| แถว 2 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) GAD 3.4 supernate, Optimized #1 |
| แถว 3 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) GAD 3.4 supernate, LB (control) |
| แถว 4 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) GAD 3.4 supernate, Soy peptone opt#1 |
| แถว 5 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) GAD 3.4 supernate, Soy peptone LB |
| แถว 6 | Standard BSA |
| แถว 7 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) GAD 3.4 cell pellet, Optimized #1 |
| แถว 8 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) GAD 3.4 cell pellet, LB (control) |
| แถว 9 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) GAD 3.4 cell pellet, Soy peptone opt#1 |
| แถว 10 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) GAD 3.4 cell pellet, Soy peptone LB |

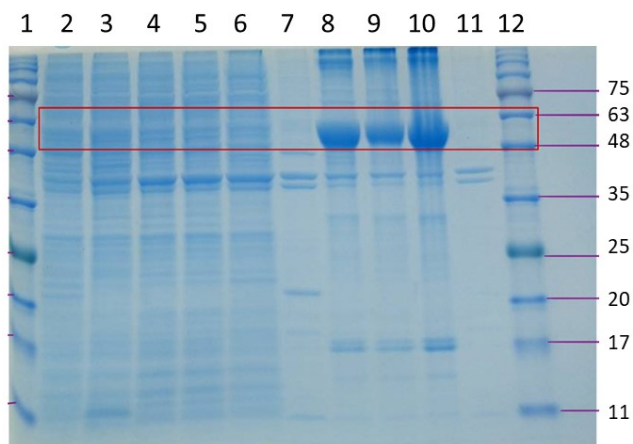


รูปที่ 2.4 ผลการทำ SDS-PAGE ของ GADΔC enzyme ในอาหารสูตร LB เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C

หมายเหตุ: GADΔC ทั้งหมด อยู่ใน pET17b

แถว 1	BLUeye Prestained Protein Ladder marker ขนาด 10-245 kDa	
แถว 2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC supernate	LB (control)
แถว 3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC supernate	
แถว 4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC supernate	
แถว 5	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC supernate	LB pH5
แถว 6	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC supernate	
แถว 7	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC supernate	
แถว 8	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC cell pellet	LB (control)
แถว 9	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC cell pellet	
แถว 10	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC cell pellet	
แถว 11	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC cell pellet	LB pH5
แถว 12	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC cell pellet	
แถว 13	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) 1.1 (1) GADΔC cell pellet	

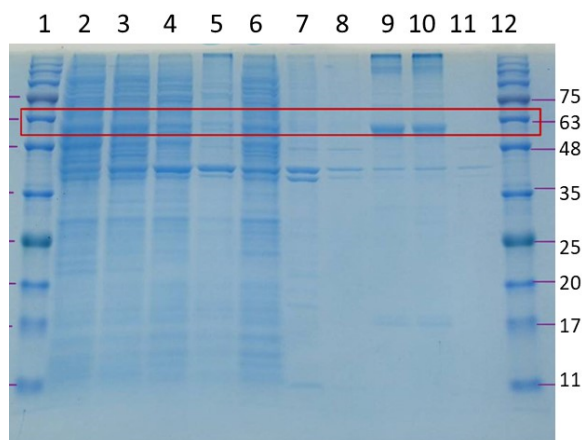
เมื่อทำการย้าย GADΔC มาอยู่ใน pET48b และทดสอบการแสดงออกโดยเลี้ยงใน LB และ auto induction พบว่า ไม่มี leaky expression ของ GADΔC เลย ดังแสดงใน lane ที่ 7 รูปที่ 2.5 และ lane ที่ 8 รูปที่ 2.6 อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบว่ามี GADΔC ใน soluble fraction



รูปที่ 2.5 SDS-PAGE แสดงออกของ GAD Δ C enzyme ใน soluble และ insoluble fraction เมื่อใช้ pET48b เป็น vector จากการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง

Induction โดยการเติม IPTG ที่ final concentration 0.1 mM

1	Marker	
2	BL21(DE3)	Supernatant
3	GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan	Supernatant
4	GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan + IPTG	Supernatant
5	P314G GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan + IPTG	Supernatant
6	P314G GAD Δ C in pET48b in Autoinduction+ Kan	Supernatant
7	GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan	Sediment
8	GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan + IPTG	Sediment
9	P314G GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan + IPTG	Sediment
10	P314G GAD Δ C in pET48b in Autoinduction+ Kan	Sediment
11	BL21(DE3)	Sediment
12	Marker	



รูปที่ 2.6 SDS-PAGE แสดงออกของ GAD Δ C enzyme ใน soluble และ insoluble fraction เมื่อใช้ pET48b เป็น vector จากการเลี้ยงเชื้อ 10 ชั่วโมง (8 ชั่วโมง หลัง induction)
Induction โดยการเติม IPTG ที่ final concentration 0.1 mM

1	Marker	
2	BL21(DE3)	Supernatant
3	GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan	Supernatant
4	GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan + IPTG	Supernatant
5	P314G GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan + IPTG	Supernatant
6	P314G GAD Δ C in pET48b in Autoinduction+ Kan	Supernatant
7	BL21(DE3)	Sediment
8	GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan	Sediment
9	GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan + IPTG	Sediment
10	P314G GAD Δ C in pET48b in LB+ Kan + IPTG	Sediment
11	P314G GAD Δ C in pET48b in Autoinduction+ Kan	Sediment
12	Marker	Sediment

จากข้อมูลที่ผ่านมา มีความเป็นไปได้ว่า สามารถเพิ่ม soluble enzyme ได้ โดยปรับเวลาการ induce โดยอาจทำการ induce ที่ OD600 มากกว่า 3 เพื่อให้เหลือปริมาณโปรตีนในอาหารน้อย และลดความเสี่ยงการเกิด inclusion body และปรับสูตรอาหารโดยเฉพาะให้มีความเป็นกรดมากขึ้น โดยเฉพาะก่อนทำการ induce รวมถึงการทำ Mutation เพื่อให้พื้นผิวมีประจุลบมากขึ้น

2.9 ความเป็นไปได้ของการเพิ่ม solubility ของเอนไซม์โดย protein engineering

การทำ mutation โดยปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนบนพื้นผิว โดยมีเป้าหมายคือ A232E/R236E, R392E, A232E/R236E/R392E

จากการประมาณการความสามารถในการละลายน้ำ โดย protein sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) พบว่า มี score สำหรับการละลายน้ำสูงขึ้น โดย triple mutant A232E/R236E/R392E GAD Δ C มีค่า solubility score สูงขึ้นจาก GAD และใกล้เคียงกับการใช้ thoredoxin แต่อย่างน้อยกว่า GAD จาก *E. coli* และ GAD จาก Arabidopsis จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่ม solubility ได้

ตารางที่ 2.6 ค่า pI และ solubility score เมื่อทำ Mutation

Enzyme	pI	Scale solubility
GAD with thioredoxin	5.84	0.343
GAD	6.42	0.263
GAD Δ C	5.930	0.255
A232E/R236E GAD Δ C	5.57	0.299
R236E/R392E GAD Δ C	5.47	0.313
A232E/R236E/R392E GAD Δ C	5.41	0.334
<i>E. coli</i> GAD	5.34	0.37
Arabidopsis	5.42	0.457

2.10 เอกสารอ้างอิง

- 1 Akama, K., Takaiwa, F., 2007. C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells. *J. Exp. Bot.* 58, 2699–2707. doi:10.1093/jxb/erm120
- 2 Bjork, J.M., Moeller, F.G., Kramer, G.L., Kram, M., Suris, A., Rush, A.J., Petty, F., 2001. Plasma GABA levels correlate with aggressiveness in relatives of patients with unipolar depressive disorder. *Psychiatry Res.* 101, 131–136. doi:10.1016/S0165-1781(01)00220-7
- 3 Edden, R.A.E., Crocetti, D., Zhu, H., Gilbert, D.L., Mostofsky, S.H., 2012. Reduced GABA concentration in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 750–3. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.2280
- 4 Gordon, F.J., Sved, A.F., 2002. Neurotransmitters in central cardiovascular regulation: Glutamate and gaba. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 522–524. doi:10.1046/j.1440-1681.2002.03666.x
- 5 Goźlińska, B., Czyżewska-Szafran, H., Płaźnik, A., 1999. Blood pressure and hypothalamic NA-GABA interaction in spontaneously hypertensive rats (SHR): effect of administration DSP-4. *Acta Pol. Pharm.* 56, 245–8.
- 6 Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H., 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 490–495. doi:10.1038/sj.ejcn.1601555
- 7 Kang, T.J., Ho, N.A.T., Pack, S.P., 2013. Buffer-free production of gamma-aminobutyric acid using

- an engineered glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 53, 200–205. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.04.006
- 8 Krnjević, K., Schwartz, S., 1967. The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp. brain Res.* 3, 320–336.
 - 9 Li, H., Cao, Y., 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids* 39, 1107–16. doi:10.1007/s00726-010-0582-7
 - 10 Perry, T., Buchanan, J., Kish, S., Hansen, S., 1979. γ -Aminobutyric-Acid Deficiency in Brain of Schizophrenic Patients. *Lancet* 313, 237–239. doi:10.1016/S0140-6736(79)90767-0
 - 11 Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T., Matsubayashi, T., 2009. Anti-hypertensive effect of gamma-aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clin. Exp. Hypertens.* 31, 342–54. doi:10.1080/10641960902977908
 - 12 Shizuka, F., Kido, Y., Nakazawa, T., Kitajima, H., Aizawa, C., Kayamura, H., Ichijo, N., 2004. Antihypertensive effect of gamma-amino butyric acid enriched soy products in spontaneously hypertensive rats. *Biofactors* 22, 165–7.
 - 13 Vaiva, G., Thomas, P., Ducrocq, F., Fontaine, M., Boss, V., Devos, P., Rascle, C., Cottencin, O., Brunet, A., Laffargue, P., Goudemand, M., 2004. Low posttrauma GABA plasma levels as a predictive factor in the development of acute posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 55, 250–254. doi:10.1016/j.biopsych.2003.08.009
 - 14 Wong, C.G.T., Bottiglieri, T., Snead 3rd, O.C., 2003. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* 54 Suppl 6, S3-12. doi:10.1002/ana.10696
- 14.3

3. โครงการวิจัยที่ 3 การหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านความดันโลหิตสูงจากพืชสมุนไพรไทย

3.1 สรุปผลการดำเนินงานของโครงการ

จากพืชสมุนไพรไทย 8 ชนิด ได้แก่ เหง้าขมิ้น เหง้าขมิ้นขาว เหง้าขิง ใบกะเพราขาว ใบกะเพราม่วง ใบโหระพา ผลมะเขือพวง ใบและลำต้นของใบบัวบก เมื่อนำมาสกัดโปรตีนและย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซิน พบว่าได้ hydrolysate ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ACE และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้เลือกพืช 5 ชนิด คือ เหง้าของขมิ้น ขมิ้นขาว และขิง และ ใบของพืช 2 ชนิด คือ กะเพราขาว และกะเพราม่วงมาสกัดโปรตีนและย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองข้างต้น และนำ fraction ที่น้อยกว่า 1 kDa ไปทำให้บริสุทธิ์ พบว่าได้เปปไทด์หลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านความดันโลหิตสูง และต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามมีเปปไทด์บางชนิดที่มีฤทธิ์ทั้งสองชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเปปไทด์จากขิง และเปปไทด์ของขิงที่ดีที่สุด คือ VM ซึ่งมีกรดอะมิโน 4 ตัว มีฤทธิ์ต้านความดันโลหิตสูงและอนุมูลอิสระสูง

3.2 หลักการและเหตุผล

การเข้าสู่สังคมประชากรผู้สูงอายุในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยทำให้มีอุบัติการณ์และมีปัญหาสุขภาพด้านโรคไม่ติดต่อสูงขึ้น ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ และโรคเมร็งชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีผลการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ที่พบว่าปัญหาสุขภาพจากโรคไม่ติดต่อเหล่านี้ มีปัจจัยสำคัญที่มีความสัมพันธ์กับอาหารที่บริโภคจึงได้มีงานวิจัยที่พัฒนาอาหารเสริมสุขภาพชนิดต่าง ๆ ออกมาวางจำหน่ายจำนวนมาก รวมทั้งอาหารเสริมสุขภาพที่ผลิตจากแหล่งโปรตีนชนิดต่าง ๆ เช่น ถั่วเหลือง นม และเนื้อไก่ (ซูเปอร์ฟู้ด)

การดูแลสุขภาพ การป้องกัน และการรักษาอาการเจ็บป่วยกำลังเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคซึ่งเน้นประชากรผู้สูงอายุ หรือแม้แต่ประชากรทั่วไปให้ความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะปัญหาสุขภาพด้านโรคไม่ติดต่อ เช่น เบาหวาน ความดันสูง โรคหัวใจ ซึ่งมีผลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า ปัญหาสุขภาพ โรคเรื้อรัง และโรคที่เกิดจากความเสื่อมหลายชนิด มีความสัมพันธ์กับอาหารที่บริโภค จึงได้มีงานวิจัยที่จะนำอาหารมาพัฒนาในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติในการเสริมอาหาร หรือออกฤทธิ์ป้องกันโรค โปรตีนประกอบไปด้วยกรดอะมิโน จึงเป็นแหล่งพลังงานของร่างกายส่งเสริมการเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ เมื่อโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์จะได้เป็นลำดับกรดอะมิโนสายสั้น ๆ ซึ่งมีรายงานว่าเปปไทด์สายสั้น ๆ มีอยู่หลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น มีฤทธิ์ต้านความดันโลหิต (Antihypertension) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterials) เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ชีวภาพเหล่านี้มีชื่อเรียกว่า ไบโอแอคทีฟเปปไทด์ (Bioactive peptide)

ไบโอแอคทีฟเปปไทด์ (Bioactive peptides) คือ ชิ้นส่วนที่ได้จากการย่อยโปรตีนทำให้ได้สายเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีความจำเพาะเจาะจง มีผลกระทบต่อหน้าที่การทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย (Sarmadi & Ismail, 2010) ส่วนใหญ่แล้วไบโอแอคทีฟเปปไทด์จะมีจำนวนกรดอะมิโนต่อกันเป็นสายยาว 2-20 กรดอะมิโน และมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 6,000 Da ดังได้กล่าวข้างต้น นอกจากนี้ ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบรวมทั้งลำดับของกรดอะมิโนก็มีผลต่อความสามารถในการทำงานของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ (Chen, et al, 1998)

ไบโอแอคทีฟเปปไทด์สามารถถูกดูดซึมผ่านลำไส้เข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือด (Circulatory system) แล้วส่งผลกับการทำงานของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย หรืออาจจะส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหาร (Digestive tract) ได้โดยตรง (Erdmann, et al, 2008) เช่น มีฤทธิ์ในการลดความดันเลือด (Antihypertensive) ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidative)

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial) เป็นพรีไบโอติก (Prebiotic) และช่วยในการจับกันของแร่ธาตุ (Mineral binding) (Arihara, 2006) ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น

ไบโอแอคทีฟเปปไทด์สามารถผลิตได้จากอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น จากพืช นม เนื้อสัตว์ โดยเทคนิคที่ใช้ในการผลิตไบโอแอคทีฟเปปไทด์อย่างกว้างขวาง คือ การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis) ตัวอย่างเช่น การผลิตไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากเนื้อสัตว์ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin), ทริปซิน (Trypsin) และไคมोटริปซิน (Chymotrypsin) (Arihara, et al, 2001)

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า นอกจากวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว เราสามารถผลิตไบโอแอคทีฟเปปไทด์ได้จากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย (Bacterial fermentation) ซึ่งนิยมใช้แบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* sp.) หมักโปรตีนในนม (Pihlanto, et al, 2010) แต่พบว่ากระบวนการหมักโดยแบคทีเรียไม่ประสบความสำเร็จมากนักในการใช้กับโปรตีนในเนื้อสัตว์ (Arihara & Ohata, 2006)

การทดสอบความเป็นพิษของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่มีต่อเซลล์ ก็เป็นปัจจัยที่ควรคำนึงถึง ควบคู่ไปกับความสามารถในการออกฤทธิ์ของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ เพื่อเป็นการควบคุมปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการออกฤทธิ์ ที่จะไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของตับ หรือกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ทั้งนี้สามารถใช้วิธีการทดสอบการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย ที่ชื่อ NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase enzymes ในการทดสอบ (Mosmann, 1983)

นอกจากนี้ปัจจัยเบื้องต้นแล้ว ความสามารถในการเข้าสู่เซลล์เพื่อเข้าถึงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ก็เป็นอีกปัจจัยที่ควรคำนึง เนื่องจากความสามารถดังกล่าว อาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของชนิดของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์เช่นกัน เปปไทด์บางชนิด สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ดี ซึ่งเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติผ่านดังกล่าว เรียกว่า Cell-Penetrating Peptides (CPPs) ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนแบบจำเพาะ คือ ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนน้อยกว่า 20 ตัว และมีหมู่เบส เป็นจำนวนมาก (Richard, Melikov et al, 2003) ซึ่ง CPPs สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการช่วยนำสารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ ทั้งนี้กลไกในการเข้าสู่เซลล์ของ CPPs ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่มีงานวิจัยหลายชิ้นที่เสนอทฤษฎีการเข้าสู่เซลล์ โดยอาศัยคุณสมบัติต่าง ๆ ของเปปไทด์ ได้แก่ 1) การดึงดูดกันระหว่างประจุบวกของเปปไทด์และประจุลบบนพลาสมาเมมเบรนของเซลล์ ซึ่งมีรายงานว่ากรดอะมิโนที่สำคัญซึ่งช่วยเสริมกระบวนการเข้าสู่เซลล์ในทฤษฎีนี้ คือ อาร์จินีน (Sakai and Matile, 2003; Nakase, Takeuchi, et al, 2008) ซึ่งอาจเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ endocytosis ต่อไป 2) คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ ซึ่งช่วยในการย้ายตำแหน่งของเปปไทด์บนไบเลเยอร์เมมเบรน กรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำจึงจำเป็นสำหรับทฤษฎีนี้ โดยเฉพาะ ทริปโตเฟน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยมีหมู่โรมาติก ซึ่งมีส่วนสำคัญสำหรับการ destabilization ของเมมเบรน (Killian, Burger et al, 1987)

ตารางที่ 3.1 แสดงเอนไซม์ และสภาวะที่พบในระบบทางเดินอาหาร (ข้อมูลที่ได้ รวบรวมจาก (Fallingborg, Christensen

Part	Time	pH	Secretion
Mount	Mins	6.0-7.0	α -amylase, potassium and bicarbonate ions, mucus, lysozyme.
Oesophagus	3 secs		Mucous
Stomach	4 hrs	1.8-3.5	Hydrochloric acid, pepsinogen, intrinsic factor, and mucous.
Pancreas			[1] trypsin and chymotrypsin, carboxypolypeptidase. [2] pancreatic amylase, [3] pancreatic lipase, cholesterol esterase, phospholipase
Liver			Bile salts, bilirubin, cholesterol, fatty acids, lecithin, Na
Small intestine	7.5-8.0 hrs		[1] several peptidases
Duodenum		6.0-6.4	[2] sucrose, maltase, iso-maltase, and lactase [3] intestinal lipase
Jejunum and ileum		7.4	[4] mucous
Large intestine	10 hrs		Mucous with bicarbonate ions
Caecum		5.7-5.9	
Appendix			
Colon	17.2-17.5 hrs		
Rectum	Few mins	6.5-6.7	

ผู้บริโภคในหลายๆ ประเทศได้ให้ความสนใจในการนำสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรมารับประทานเพื่อใช้ในการรักษาโรคหรือ เพื่อใช้บำรุงรักษาสุขภาพ นอกจากนี้ผู้บริโภคมีความเชื่อมั่นว่าผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสูง และมีปัญหาผลข้างเคียงน้อย ซึ่งไบโอแอคทีฟเปปไทด์ถือว่าเป็นอาหารเสริมสุขภาพชนิดหนึ่งที่เริ่มเป็นที่นิยมในตลาดอาหารเสริมสุขภาพ ไบโอแอคทีฟเปปไทด์เกิดจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ ได้เป็นเปปไทด์ที่มีความยาวของกรดอะมิโนระหว่าง 2-20 ตัวและน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 6000 Da เนื่องจากไบโอแอคทีฟเปปไทด์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน เช่น การต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial), การป้องกันเลือดแข็งตัว (antithrombotic), การลดความดันโลหิต (antihypertensive), การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidative) ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น ซึ่งถึงแม้ว่ามีการค้นพบและศึกษาไบโอแอคทีฟเปปไทด์และ เปปไทด์ใหม่ๆ ไปแล้วเพิ่มมากขึ้นทุกปี แต่มักจะเป็นเปปไทด์ที่มาจากโปรตีนสัตว์หรือจากไข่ หรือเมล็ดพืชที่มีโปรตีนสูง แต่การศึกษาไบโอแอคทีฟเปปไทด์ใหม่ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสมุนไพร ยังคงมีความจำเป็นเพราะยังมีผู้ศึกษาน้อยและอาจได้ข้อมูลเพื่อผลิตไบโอแอคทีฟเปปไทด์ชนิดใหม่

พืชสมุนไพรไทยหลายชนิดสร้างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ หรือน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (โหระพา

ไขมันชั้น ไขมันขาว เป็นต้น) ด้านการบวม (anti-inflammatory) (โหระพา ตะไคร้ ไขมันชั้น ไขมันขาว เป็นต้น) ด้านแบคทีเรีย (ขิง ไขมัน ไขมันชั้น ตะไคร้ เป็นต้น) หรือด้านความดันโลหิตสูง (ดอกคำฝอย ลูกกระเจี๊ยบแดง คื่นช่าย ใบบัวบก ขิง ไขมันชั้น เป็นต้น) ในขณะเดียวกันพืชเหล่านี้มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนแม้เป็นส่วนน้อยเพียง 1-4% ซึ่งยังมีคนศึกษากันน้อยถึงโปรตีนที่อาจเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อพืชเหล่านี้ถูกกินเข้าไปและถูกระบบเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารย่อยซึ่งอาจจะได้เปปไทด์ขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะคัดเลือกสมุนไพรไทย 4-5 ชนิด มาสกัดโปรตีนและย่อยให้ได้เปปไทด์ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และด้านความดันโลหิตในระบบ renin-angiotensin system (RAS) โดยการหา bioactive peptide ที่มีฤทธิ์ต้าน angiotensin I converting enzyme (ACE) พร้อมทั้งศึกษาการคงทนของเปปไทด์ต่อเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร การดูดซึมเข้าเซลล์ และการเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่อย่างไร

ในงานวิจัยนี้ สนใจที่จะศึกษาไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากพืชวงศ์ขิงและสมุนไพรอื่น ๆ ได้แก่ เหง้าของขิง, ไขมัน, ไขมันขาว, ใบโหระพา และใบกะเพรา ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารหลายชนิด โดยมีวัตถุประสงค์คือ หาพืชในวงศ์ขิงและสมุนไพรซึ่งเมื่อย่อยแล้วจะได้เปปไทด์ที่คุณสมบัติเป็นไบโอแอคทีฟเปปไทด์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งความดันโลหิตสูง (Anti-ACE inhibitory activity) และนอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติด้านอื่น ๆ ของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ เช่น antimicrobial และ antioxidative activity อีกด้วย

3.3 วัตถุประสงค์

- หา Bioactive peptide จากสารสกัดโปรตีนจากพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านความดันโลหิตสูง
- การศึกษาความเป็นพิษและการดูดซึมของ Bioactive peptide ต่อเซลล์และความคงทนในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร

3.4 ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านความดันโลหิตสูงของไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากพืชสมุนไพร

- สกัดโปรตีนจากสมุนไพรไทย ได้แก่ เหง้าของขมิ้น (*Curcuma longa*) ชื่อสามัญ turmeric ไขมันขาว (*Curcuma mangga* Veleton) ชื่อสามัญ white turmeric ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) ชื่อสามัญ ginger, ใบโหระพา (*Ocimum basilicum* Linn.), ใบกะเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.) หรือ sweet basil และใบบัวบก (*Centella asiatica* Linn.) หรือ holy basil

1) นำพืชสมุนไพร 0.5 kg มาล้างน้ำให้สะอาด ตามด้วยล้างด้วย 70% Ethanol และผึ่งให้หมาดๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2) นำขิงและไขมันขาวมาปอกเปลือกออก และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ หั่นเป็นชิ้นบางๆ นำไขมัน ไขมันขาว ขิง ใบโหระพา และใบกะเพรา มาผสมกับ 100 mM Tris-HCl pH8.3 ปริมาตร 100 ml ที่มี Vitamin C ปั่นแยกใน blender (ทำแต่ละตัวอย่างแยกออกจากกัน)

3) กรองด้วยผ้าขาวบาง และนำไป centrifuge นำ supernatant มาตกตะกอนโปรตีนด้วย Acetone ปริมาตร 4 เท่า กวนด้วย Magnetic stirrer ที่ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปเก็บที่ -30 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กำจัด acetone ออกโดย Rotary evaporator (Adulyatham & Oousu-Apenton, 2005)

4) นำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปทำ lyophilization เก็บผงโปรตีนที่ได้ที่ -20 °C เพื่อนำไปย่อยเอนไซม์ต่อไป

- ย่อยโปรตีนจากสมุนไพรเพื่อผลิตโปรตีนสายสั้นที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติเป็นไบโอแอคทีฟเปปไทด์

1) นำโปรตีนที่ได้ (ประมาณ 5 กรัม) ไปย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่ pH 2.0 และปรับ pH ให้เป็น pH7 และ

ย่อยด้วยทริปซิน วิเคราะห์ protein profile ก่อนและหลังย่อยด้วย Tricine SDS-PAGE

2) นำเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมาทำการคัดเลือขนาดด้วยการใช้ molecular weight cut off (MWCO) โดยการใช้ Amicon Ultrafiltration ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (60 psi) โดยใช้ MWCO เริ่มจากขนาด pore size 30 → 10 → 5 → 3 → 1 kDa และเก็บ fraction ที่มีขนาด <1 kDa

3) นำเปปไทด์มาทำให้บริสุทธิ์

3.1) Gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-25

- เก็บ fraction และนำแต่ละ fraction ไปหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ anti-ACE

3.2) Reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) โดยใช้คอลัมน์ X Terra RP18 และใช้ linear gradient ของ 5-30% acetonitril ใน 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) โดยใช้ flow rate 0.5 mL/min และวัดขึ้น 210 nm เก็บแต่ละ peak ไป assay Antioxidant และ anti-ACE

4) การคัดเลือกเปปไทด์และการหาลำดับกรดอะมิโน โดย mass spectrometry

4.1) Peak ที่ได้จาก RP-HPLC แม้จะเป็น peak ที่แยกดี อย่างไรก็ตาม แต่ละ peak จะมี peptide จำนวนหลาย sequence จึงต้องนำไปหา sequence ด้วย liquid chromatography tandem mass repeated (LC-MS/MS) analysis และ nano-electrospray source ของ QToF

4.2) นำ sequence ที่ได้ไปสังเคราะห์ Synthetic peptide เพื่อยืนยันผลการมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

5) การศึกษาทดสอบการดูดซึมของ selected bioactive peptide

การดูดซึมของ selected bioactive peptide โดยการติดสารเรืองแสงลงบนสายเปปไทด์ และตรวจสอบความสามารถในการดูดซึมของเปปไทด์ของ mammalian cell ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Fluorescence Microscope)

• การทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของ Bioactive Peptides ในพืชสมุนไพรโดยการทดสอบปฏิกิริยาการยับยั้ง Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) ด้วยวิธีทางชีวเคมี (ACE Kit-WST 100 tests) มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เติมห่วงอย่าง 10 μ L ลงในแต่ละหลุม positive control และ negative control
- 2) เติม substrate buffer 10 μ L ลงในแต่ละหลุม
- 3) เติมน้ำกลั่น 10 μ L ลงในหลุมที่เป็น positive control และ negative control
- 4) เติม ACE Enzyme working solution 10 μ L ลงในตัวอย่างแต่ละหลุมและหลุม positive control
- 5) นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 6) เติม indicator working solution 100 μ L ลงในแต่ละหลุมตั้งไว้ที่อุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที
- 7) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วย microplate reader
- 8) คำนวณหา ACE inhibitory จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ACE inhibitory activity (inhibitory rate \%)} = [(A_{\text{blank1}} - A_{\text{sample}}) / (A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank2}})] \times 100$$

โดยที่ A_{blank1} = Positive control (ACE whole activity)

A_{blank2} = Negative control (Reaction without ACE)

A_{sample} = Remained activity of ACE in the presence of peptide (s)

• การทดสอบความสามารถของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ด้วย 2,2-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)

1) นำ 7 mM ของ 2,2-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) 0.031 กรัมผสมลงใน 2.45 mM ของสารละลาย potassium sulphate ($K_2S_2O_8$) เก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง

2) ทำให้เป็น working solution โดยนำไปเจือจางโดยใช้น้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เป็น 0.7 ± 0.02

3) การทดสอบตัวอย่าง นำสารละลาย ABTS 200 μ l ผสมกับตัวอย่าง 10 μ l ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้น้ำกลั่นเป็น negative control

4) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยใช้ Microplate reader
คำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\% \text{Antioxidant activity} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) \times 100 / A_{\text{blank}}$$

โดยที่ A_{blank} = หลอดที่มี ABTS

A_{sample} = หลอดที่มี ABTS และไปโอแอกทิฟเปปไทด์

- การทดสอบความสามารถของไปโอแอกทิฟเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ด้วย 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) assay

1) นำ 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) 1 mg ละลายใน cool absolute ethanol 25 ml ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2) ตัวอย่าง 50 μ l ให้เข้ากันโดยใช้ absolute ethanol เป็น negative control

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยใช้ UV-1800 Shimadzu spectrophotometer

คำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\% \text{Antioxidant activity} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) \times 100 / A_{\text{blank}}$$

โดยที่ A_{blank} = หลอดที่มี DHHP

A_{sample} = หลอดที่มี DHHP และไปโอแอกทิฟเปปไทด์

3.5 ผลทางชีวภาพของ protein hydrolysate

จากพืชสมุนไพร 8 อย่าง ได้แก่ เหง้าของขมิ้นขาว ขมิ้น ขิง ใบกะเพราขาว ใบกะเพราม่วง ใบบัวบก ลูกมะเขือพวง โดยมีผลการศึกษา antihypertension และ antioxidant แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ACE inhibitory activity (%) and scavenging inhibitory activity (%) of extracted protein after digestion

Sample	Activities (%)	
	Anti-hypertension	Anti-oxidant (ABTS)
White turmeric (ขมิ้นขาว)	94.6	89.38
Turmeric (ขมิ้น)	92.2	87.28
Ginger (ขิง)	95.3	84.61
Purple holy basil (กะเพราม่วง)	95.1	88.3
Green holy basil (กะเพราขาว)	95.8	84.7
Sweet basil (โหระพา)	96.2	84.9
Asiatic pennywort (ใบบัวบก)	96.4	59.5
Turkey berry (มะเขือพวง)	93.7	80.4

ได้เลือกสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นขาว ขมิ้น ขิง กระเพราขาว และกระเพราม่วง ไปแยกโปรตีนออกเป็น fraction ต่าง ๆ ด้วยวิธี ultrafiltration ให้ได้ fractions ที่มีขนาด 5-10, 3-5, 1-3 และ <1 kDa โดย fraction ที่ใหญ่ > 10 kDa ไม่ทำการศึกษาต่อ

3.6 ฤทธิ์ชีวภาพของ protein fractions

1) Anti-bacteria

เปปไทด์จากพืชสมุนไพร 5 ชนิด (ขมิ้นขาว ขมิ้น ขิง กระเพราขาว และกระเพราม่วง) ที่ได้จากแยกตามขนาดของโปรตีนด้วยวิธี Ultrafiltration ที่มีขนาด 1-3 kDa, 3-5 kDa และ 5-10 kDa ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 100-200 µg/ml ได้นำมาทดสอบหาความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25293, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนของพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบ

2) Anti-ACE และ Anti-oxidant

ได้นำ Fraction ที่มีขนาด 1-3 และน้อยกว่า 1 kDa มาทดสอบ Anti-ACE และ Anti-oxidant (DPPH & ABTS methods) พบว่า fraction ที่มีขนาดน้อยกว่า 1 kDa มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีในการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี จึงนำ Fraction ที่มีขนาดน้อยกว่า 1 kDa ไปแยกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธี gel filtration และ RP-HPLC

3) การแยกเปปไทด์ที่อยู่ใน fraction ขนาด < 1 kDa ด้วย gel filtration (Sephadex G-25)

3.1 การหา Fraction จาก Gel filtration ที่มี activity

จากการเก็บ Fraction ของเปปไทด์ <1 kDa ของขมิ้นขาว ขมิ้น ขิง กระเพราขาว และกระเพราม่วง และนำมาหา anti-ACE และ anti-oxidant พบว่ามีหลาย Fraction ที่มีฤทธิ์ชีวภาพอย่างใดอย่างหนึ่ง แต่พบว่าเปปไทด์จากขิงให้ฤทธิ์ชีวภาพทั้ง 2 อย่าง จึงได้เลือกเก็บบาง Fractions ที่มีฤทธิ์ชีวภาพสูง ดังผลแสดงใน ตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 Summary of selected active fractions from Gel filtration (G-25)

Source	Pooled fraction	Activity
White turmeric	WT 25-30	ACE inhibitory activity
	WT 35-40	Antioxidant activity
Turmeric	T 25-30	ACE inhibitory activity
	T 40-45	Antioxidant activity
Ginger	G 35-45	ACE inhibitory & Antioxidant activity
Purple holy basil (1 st preparation)	PU 32-36	ACE inhibitory & Antioxidant activity
Purple holy basil (2 nd preparation)	PU 18-22	ACE inhibitory & Antioxidant activity
Green holy basil (1 st preparation)	GR 32-36	ACE inhibitory & Antioxidant activity
Green holy basil (2 nd preparation)	GR 15-19	ACE inhibitory & Antioxidant activity

3.2 การแยกเปปไทด์ใน gel filtration fraction ที่มีฤทธิ์ชีวภาพด้วย RP-HPLC

จาก pooled fraction ที่ได้ใน ตารางที่ 3.3 ได้นำ fraction ต่าง ๆ ที่เก็บไปทำ lyophilization และนำไปแยกด้วย RP-HPLC ซึ่งจะได้ peak profile ที่น่าสนใจ 2-6 peaks แล้วแต่ fraction (รายละเอียดรายงาน ก้าวหน้าครั้งที่ 3 และ 4) หลังจากนั้นได้เก็บ RP-HPLC peak แต่ละ peak มาวัดหาฤทธิ์ชีวภาพ (anti-ACE และ anti-oxidant) peak ที่ได้ activity สูงจะเก็บเพิ่มเติมโดยการฉีดตัวอย่างประมาณ 10 injection และเก็บรวบรวมเข้าด้วยกัน และนำไปหา mass และลำดับกรดอะมิโนต่อไป

3.3 การหา peptide mass และลำดับกรดอะมิโน

Peptide ที่ได้จากการทำ RP-HPLC จะถูก load เข้า Mass spectroscopy โดยใช้เทคนิคในการวิเคราะห์เปปไทด์ 2 แบบ ได้แก่ MALDI-ToF และ LC-MS/MS โดยใช้ QToF (MicroToF Q II)

3.3.1 MALDI-ToF (Bruker Attoflex II, Germany)

- 1) ละลายตัวอย่างใน 0.1% (v/v) Formic acid แล้วปิเปตมา 1 μ l หยดลงบน MTP 384 (384-well microtiterplate)
- 2) หยด matrix 1 μ l ซึ่งเป็นของเหลวผสม Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (-cyano) ที่ละลายใน 50% (v/v) Acetonitrile และ 0.1% (v/v) Trifluoroacetic acid
- 3) ทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง Bruker Attoflex II (Bruker) ที่มีความถี่ของเลเซอร์ 200 Hz, ความต่างศักย์ 1680 V และมีค่า m/z ระหว่าง 400-2,000
- 4) อ่านค่าโดยอาศัยโปรแกรม Bruker Daltonik (FlexControlTM version 3.0 และ Flexanalysis software)

3.3.2 LC-MS/MS โดยใช้ QToF (MicroToF Q II, Bruker Daltonics, Germany)

- 1) ทำให้ peptide เป็นกรดโดยละลายลงใน 0.1% (v/v) Formic acid
- 2) ฉีดตัวอย่างเข้าสู่ Ultimate 3,000 capillary LC system (Dionex, Survey, UK) ผ่าน FAMOS autosampler
- 3) ใช้ความต่างศักย์ของ detector เท่ากับ 2,300 V
- 4) Spectrum ของ MS มีค่า m/z เป็น 400-3,000 ในขณะที่ spectrum ของ MS/MS มีค่า m/z เป็น 50-1,500
- 5) อ่านค่าโดยอาศัยโปรแกรม DataAnalysisTM software, Biotoools software

หลังจากที่ได้ mass และลำดับกรดอะมิโนแล้ว ได้เลือกสังเคราะห์เปปไทด์ที่มีการวิเคราะห์ค่า binding energy ระหว่างเปปไทด์แต่ละชนิดกับ catalytic site ของ ACE เป็นค่าติดลบ ส่วนเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่มีคุณลักษณะเป็น anti-oxidant ได้แก่ Tyr, Trp, Met, Lys, Cys และ His จะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปผลิต synthetic peptide และนำแต่ชนิดมาหาฤทธิ์ชีวภาพต่อไป

3.4 การหาฤทธิ์ชีวภาพของ Synthetic peptide ที่มาจากพืชสมุนไพรลำดับกรดอะมิโน

เปปไทด์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด และทำให้บริสุทธิ์เมื่อนำไปสังเคราะห์และวิเคราะห์หาฤทธิ์ชีวภาพให้ผลดังแสดงใน ตารางที่ 3.4 และ ตารางที่ 3.5 เนื่องจากข้อมูลยังอยู่ในระหว่างการส่งตีพิมพ์ จึงขอไม่แสดงลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์แต่ละชนิด โดยแสดงผลเป็นค่า IC₅₀ (μ M) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้ยับยั้ง activity (anti-ACE หรือ Anti-oxidative compounds) ได้ 50% สำหรับค่า IC₅₀ ของเปปไทด์ที่มาจากกะเพราขาวและกะเพรา

ม่วง ได้ทำเพียงหนึ่งซ้ำ ซึ่งจะต้องมีการดำเนินการทดสอบเพิ่ม

ตารางที่ 3.4 ACE inhibitory and antioxidant activities of peptides derived from three medicinal plant (white turmeric, turmeric and ginger)

Sources	Peptides	Number of amino acid residues	IC50 (μ M)	
			Antioxidants	
			DPPH	ABTS
WT	RC	3	ND	ND
WT	HV	4	108.25 $\pm$ 1.1	77.31 $\pm$ 8.70
T	CV	6	ND	ND
T	DP	4	ND	ND
T	CA	6	ND	ND
T	WA	9	90.25 $\pm$ 1.29	71.93 $\pm$ 1.43
G	VM	4	19.86 $\pm$ 2.05	63.95 $\pm$ 3.71
G	RH	5	88.57 $\pm$ 9.81	71.26 $\pm$ 2.33
G	AR	5	123.57 $\pm$ 1.32	116.67 $\pm$ 0.57
G	GP	6	97.99 $\pm$ 0.11	82.35 $\pm$ 0.08
G	KV	5	114.29 $\pm$ 1.58	109.18 $\pm$ 0.59

Values represent IC50 values $\pm$ SD (n = 3)

WT = white turmeric, T = turmeric, G = ginger

ND = not determined

ตารางที่ 3.5 ACE inhibitory and anti-oxidant activities of peptides derived from green and purple holy basil leaves

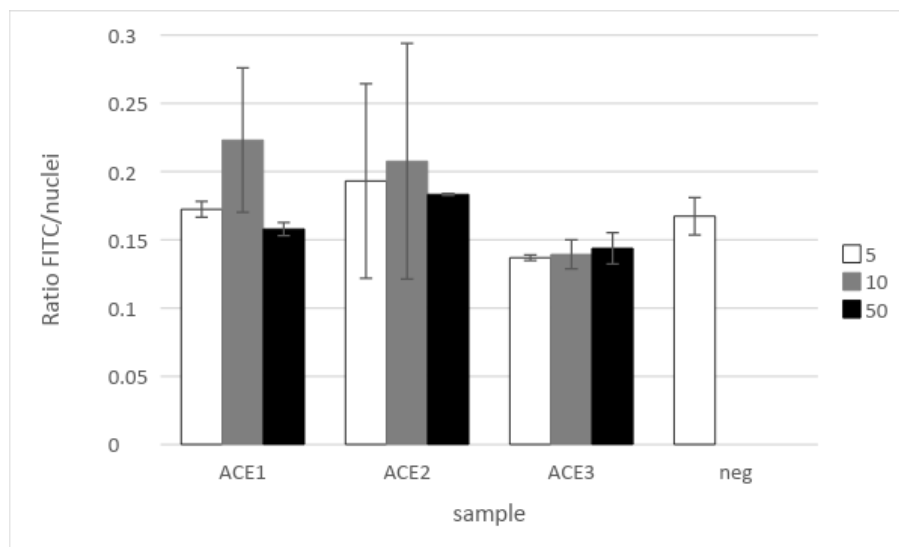
Sources	Peptides	Number of amino acid residues	IC50 (μ M)	
			Antioxidants	
			ACE inhibition	Antioxidant (DPPH assay)
Purple holy basil leaves	TP	4	6.04	>200
	HP	5	10.91	>200
	AA	6	26.09	>200
	GH	9	>200	88.21
Purple holy basil leaves	TP2	3	44.23	>200
	AT	5	14.38	>200
	GA	8	87.24	102.34
	AP	6	4.75	>200
	LP	8	120.53	90.42
	HT	9	103.05	75.89
	HA	5	10.02	>200
	PP	11	119.45	96.34
	AP2	7	117.04	>200
	TL	5	4.79	>200
control	Captopril	-	0.00197	ND
	BHA	-	ND	19.81

ND, not determined

3.7 การทดสอบการดูดซึมเข้าเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์ของระบบทางเดินอาหาร

จากผลการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 3.1 พบว่า สัณฐานของเปปไทด์ AP6 และ AP7 ในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยเปปไทด์ ที่มีความเข้มข้น 10 nM มีสัณฐานค่อนข้างสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก การทดลองควบคุมที่ไม่ได้เติมเปปไทด์จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า คุณสมบัติของเปปไทด์ที่สามารถผ่าน เข้าสู่เซลล์ได้ (Cell penetrating peptide) ส่วนมากจะมีประจุเป็นบวก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

การที่ในสายเปปไทด์มีไลซีนหรือ อาร์จินีนอยู่ก็ส่งผลให้ความสามารถในการเข้าสู่เซลล์สูงขึ้น (Mitchell, et al, 2000) ตัวอย่างเช่น Penetratin (RQIKIWFAQNRRMKWKK) (Derossi, et al, 1994), Tat peptide (GRKKRRQRRRPQ) (Vivès, et al, 1997), pVEC (LLILRRRIRKQAHASK) (Elmqvist, et al, 2001) ซึ่งการมีประจุบวกดังกล่าวช่วยใน การยึดเกาะกันระหว่างประจุบวกของ เปปไทด์ และประจุลบของเซลล์เมมเบรน ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ยังไม่พบความสามารถในการเข้าสู่เซลล์อย่างชัดเจนในเปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากการทดลองนี้ และอาจเป็นผลจากการที่ติดสารเรืองแสงทำให้โมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้นและอาจทำให้เข้าเซลล์ได้ยากขึ้น จาก รูปที่ 3.1 จะเห็นว่าเปปไทด์กรดอะมิโนเหลือ 7 ตัวเข้าเซลล์ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 9 ตัว อย่างไรก็ตามผลที่ได้มีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในแต่ละการทดสอบจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม



รูปที่ 3.1 Ratio of FITC/nuclei of HT-29 treated with FITC-labeled peptides

Note: control is cells treated with only FITC and Hoechst 33422.

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ได้ทดสอบความเป็นพิษของเปปไทด์ AP6 ที่มี ACE inhibitory activity สูง ($IC_{50} = 4.75 \mu M$) และ HT9 ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ($IC_{50} = 75.89 \mu M$) โดยเทียบกับ AP7 ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำต่อความเป็นพิษกับ HT-29 cell line โดยวิธีการ MTT assay โดยใช้ความเข้มข้น peptide ที่ final concentration 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 μM พบว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการเติมเปปไทด์ที่ความเข้มข้นของ AP-6, AP-7 และ HT-9 ที่ 0.1 μM cell viability ลดลงเหลือ 96.65, 92.60 และ 90.39% ขณะที่เมื่อเทียบระหว่างความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ 0.1 μM กับ 1000 μM cell viability ต่างกันเพียง 12-16% ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณ Peptide solution ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่น 100 μl ที่ใส่ลงใน cell culture 1000 μl อาจมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์จากปริมาณน้ำกลั่นที่ใช้ ดังนั้นจะมีการทดลองซ้ำโดยลดปริมาณน้ำที่ใส่เข้าไป

3.8 เอกสารอ้างอิง

1. Adulyatham, P. and Owusu-Apenten, R. (2005) Stabilization and partial purification of a protease from ginger rhizome (*Zingiber officinale* Roscoe). *J Food Sci.* 70(3): C231-C234.
2. Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S. and Itoh, M. (2001) Peptide inhibitors for angiotensin i-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci.* 57: 319-324.
3. Arihara, K. and Ohata, M. (2006) Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. In Toldra F. (Ed.), *Advanced Technologies For Meat Processing*. 245-274.
4. Cam, A. and de Mejia, E.G. (2012) GRD-peptide lunasin inhibits Akt-mediated NF-KB activation in human macrophages through interaction with the $\alpha V\beta 3$ integrin. *Mol Nutr Food Res.* 56(10): 1569-1581.
5. Cam, A., Sivagura, M. and de Mejia, E.G. (2013) Endocytic mechanism of internalization of dietary peptide lunasin into macrophages in inflammatory condition associated with cardiovascular disease. *PLoS ONE.* 8(9): e72115.
6. Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokiara, K. (1998) Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem.* 46: 49-53.
7. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem.* 269(14): 10444-10450.
8. Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T., and Langel, U. (2001). Ve-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC with carrier functions. *Exp Cell Res.* 269(2): 237-244. doi:10.1006/excr.2001.5316
9. Erdmann, K., Belinda, W.Y. and Schroder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem.* 19: 643-654.
10. Fallingborg, J. (1999) Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull.* 46(3): 183-196.
11. Fallingborg, J., L. A. Christensen, M. Ingeman-Nielsen, B.A. Jacobsen, K. Abildgaard and H.H. Rasmussen. (1989) pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device. *Aliment Pharmacol Ther.* 3(6): 605-613.
12. Fallingborg, J., L.A. Christensen, M. Ingeman-Nielsen, B.A. Jacobsen, K. Abildgaard, H.H. Rasmussen and S.N. Rasmussen. (1990) Measurement of gastrointestinal pH and regional transit times in normal children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 11(2)211-214.
13. Fuglsang, A., D. Nilsson and N.C. Nyborg. (2003) Characterization of new milk-derived inhibitors of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. *J. Enzyme. Inhib Med Chem.* 18(5): 407-412.

14. Killian, J. A., Burger, K. N., and de Kruijff, B. (1987). Phase separation and hexagonal HII phase formation by gramicidins A, B and C in dioleoylphosphatidylcholine model membranes. A study on the role of the tryptophan residues. *Biochim Biophys Acta*. 897(2): 269-284.
15. Mitchell, D.J., Steinman, L., Kim, D.T., Fathman, C.G., and Rothbard, J.B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Int J Pept Res Ther*. 56(5): 318-325.
16. Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., and Futaki, S. (2008). Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev*. 60(4-5): 598-607.
17. Pihlanto, A., Virtanen, T. and Korhonen, H. (2010) Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Jnt. Dairy J*. 20: 3-10.
18. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 26(9-10): 1231-1237.
19. Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L.V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*. 278(1): 585-590. doi:10.1074/jbc.M209548200
20. Sarmadi, B.H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31: 1949-1956.
21. Vivès, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. 272(25): 16010-16017. doi:10.1074/jbc.272.25.16010
22. Wu, H.C., Chen, H.M., & Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int*. 36(9-10): 949-957.

4. โครงการวิจัยที่ 4 การพัฒนาวิธีการตรวจหาสารสำคัญ cordycepin ในถั่งเช่า

สามารถแบ่งวิธีการตรวจวัดสารสำคัญ cordycepin ในถั่งเช่าออกเป็นการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ Adenosine deaminase ในหัวข้อ 4.2 และการวิเคราะห์ด้วย Indicator Displacement Assay ดังแสดงในหัวข้อ 4.3

4.1 สรุปผลการดำเนินงานของโครงการ

Cordyceps เป็นกลุ่มราที่เจริญเติบโตบนหนอน ซึ่งปัจจุบัน มีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยง Cordyceps เพื่อทดแทนการได้มาจากแหล่งธรรมชาติ เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของตลาด ด้วยมูลค่าทางการตลาดที่สูง ทำให้มีผลิตภัณฑ์ปลอมปนหรือด้อยคุณภาพออกสู่ท้องตลาด ในขณะเดียวกัน วิธีการตรวจสอบคุณภาพถั่งเช่า ณ ปัจจุบันต้องอาศัยอุปกรณ์ที่มีความซับซ้อนและมีราคาแพง เช่น HPLC ซึ่งไม่เอื้ออำนวยต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าและการคัดกรองผลิตภัณฑ์ตามธรรมชาติ การพัฒนาวิธีการตรวจคุณภาพถั่งเช่าให้มีความสะดวกรวดเร็ว จะช่วยพัฒนาการปรับปรุงวิธีการเพาะถั่งเช่า ให้มีปริมาณ adenosine หรือ cordycepin ในปริมาณมากได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งการส่งเสริมอุตสาหกรรมผลิตยาในประเทศในทางอ้อม การใช้เอนไซม์เพื่อพัฒนาการตรวจปริมาณสารในถั่งเช่าเป็นแนวทางที่น่าสนใจ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะและมีความรวดเร็วในการทำปฏิกิริยา

การพัฒนาระบบเอนไซม์เพื่อตรวจหา adenosine และ cordycepin ด้วยเอนไซม์ ได้ทำควบคู่ไปกับการตรวจวัดด้วยวิธีมาตรฐานคือ HPLC ทั้งนี้ การตรวจด้วย HPLC มี limit of detection และ limit of quantification ที่ 0.0099 mM และ 0.0331 mM สำหรับทั้ง adenosine และ cordycepin ตามลำดับ โดยเหมาะกับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ adenosine หรือ cordycepin ไม่เกิน 0.5 mM และมี Linearity อยู่ระหว่าง 0.005 – 0.5 mM

การศึกษาการสกัดถั่งเช่าสีทอง *Cordyceps militaris* เพื่อใช้กับระบบเอนไซม์พบว่า adenosine เสื่อมสภาพระหว่างการสกัดในน้ำร้อน ที่อุณหภูมิสูงกว่า 85°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่ cordycepin ไม่พบว่ามีอาการเสื่อมสภาพ เมื่อเปลี่ยนเป็นการสกัดด้วย 30% methanol หรือ 30% propanol ที่ 85°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า มีการเสื่อมสภาพของ adenosine น้อยกว่าการใช้น้ำร้อนสกัด ทั้งนี้ การใช้ 30% methanol หรือ 30% propanol ช่วยให้สกัด cordycepin ได้มากขึ้นแต่การสกัด adenosine กลับลดลง เมื่อทำการ spike test พบว่า recovery yield ของ cordycepin จาก *Cordyceps militaris* อยู่ที่ประมาณ 76.5% ทั้งนี้ น่าจะมีผลมาจาก Matrix effect ของเนื้อเห็ด ทั้งนี้ การสกัดด้วยน้ำร้อน ถูกนำไปใช้กับการพัฒนาการตรวจวัดด้วยเอนไซม์เนื่องจากสามารถให้ปริมาณ cordycepin ที่สูง แต่ต้องลดระยะเวลาในการสกัดลง

เอนไซม์ adenosine deaminase ถูกทดสอบและพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณ adenosine, cordycepin, and 2'-deoxyadenosine ในสารสกัด *Cordyceps militaris* และ *Cordyceps sinensis* ทดแทน HPLC ซึ่งสามารถติดตามปฏิกิริยา deaminisation ได้จากการดูดกลืนแสงที่ 265 nm เป็นเวลา 10 นาที จากการทดสอบกับสารมาตรฐาน adenosine, cordycepin, and 2'-deoxyadenosine พบว่า adenosine deaminase จากมนุษย์ ไม่มีความจำเพาะกับสารทั้ง 3 ชนิด แต่ adenosine deaminase จาก *E. coli* สามารถใช้ adenosine ได้เร็วกว่า cordycepin ถึง 10 เท่า แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารทั้ง 2 ชนิด โดยพบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาแบ่งเป็น 2 เฟส คือ เฟสแรกเกิดปฏิกิริยาเร็ว และเฟสที่ 2 เกิดปฏิกิริยาช้า โดยในเฟสแรกน่าจะเป็นการเกิด deamination ของ adenosine ทั้งนี้ การเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงในช่วง 10 นาทีแรก สอดคล้องกับปริมาณของ adenosine ที่วัดได้โดย HPLC และในช่วงที่ 2 เกิดจาก deamination ของ cordycepin จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า adenosine deaminase สามารถใช้ในการตรวจหาปริมาณ adenosine และ cordycepin ในสารสกัด *Cordyceps militaris* ได้

การปรับปรุงความจำเพาะของเอนไซม์ adenosine deaminase ต่อสารทั้ง 3 ชนิด ทำโดยการเปลี่ยนกรดอะ

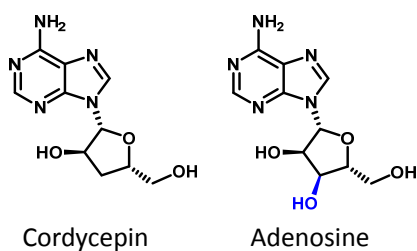
มีโนเอนไซม์ ณ ตำแหน่งที่ L63 และ D16 แบบสุ่ม โดยพบว่า การปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนทั้ง 2 ตำแหน่ง สามารถเปลี่ยนความจำเพาะต่อสาร adenosine, 2'-deoxyadenosine, และ corydcepin ได้จริง โดยกำลังศึกษา kinetics ของเอนไซม์สายพันธุ์ใหม่ โดยในขณะนี้พบว่ามีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดย substrate

นอกจากการพัฒนาการตรวจหา adenosine, 2'-deoxyadenosine, และ corydcepin ด้วยเอนไซม์แล้ว โครงการวิจัยนี้ ยังได้พัฒนาการตรวจหาสารสำคัญดังกล่าว ด้วยวิธีการ Indicator displacement assay โดยใช้ macrocyclic host ที่มีขนาดเฉพาะเจาะจง เพื่อเพิ่ม selectivity ต่อ corydcepin และมีการ screen หาสารเรืองแสงที่เหมาะสม ที่จะถูกแทนที่ด้วยโมเลกุลของ corydcepin ทำให้ได้ค่าปริมาณของ corydcepin ในสารตัวอย่าง มีความแปรผันตรงกับปริมาณสารเรืองแสงที่ถูกแทนที่ออกมา จึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณ corydcepin ผลลัพธ์ถึงเข้าสู่สีกัด หรือถึงเข้าผงที่มีขายตามท้องตลาด โดยมีการเปรียบเทียบผลที่ได้กับการวิเคราะห์ด้วยวิธีการมาตรฐาน พบว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Indicator displacement assay มีมากกว่า HPLC แต่ก็มีความสัมพันธ์กันในระดับหนึ่ง และมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณ corydcepin ที่เติมในตัวอย่าง ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร corydcepin ในขั้นต้นได้ และสามารถใช้ในการควบคุมการผลิตอาหารเสริมสุขภาพที่ประกอบด้วยถึงเข้าได้ วิธีการทางการเรืองแสงที่พัฒนาขึ้น จะช่วยให้ผู้ประกอบการสามารถประหยัดงบประมาณ และเวลาในการวิเคราะห์ รวมถึงลดปริมาณสารเคมีที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ เมื่อเทียบกับเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่ใช้กันอยู่ทั่วไปในปัจจุบัน

4.2 การวิเคราะห์หา corydcepin ด้วย Adenosine deaminase

4.2.1 หลักการและเหตุผล

Corydcepin เป็นสารประกอบที่พบในถึงเข้า (*Cordyceps sinensis* (Hsu et al., 2002)) ซึ่งจากการศึกษาทางเคมีพบว่า Corydcepin โครงสร้างคล้ายกับ adenosine ดังแสดงใน รูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 โครงสร้างของ Corydcepin และ adenosine

ด้วยโครงสร้างที่คล้ายกันนี้ ทำให้ corydcepin สามารถจับกับเอนไซม์ที่ใช้ adenosine, AMP, ADP, ATP เป็นสารตั้งต้นได้ แต่เอนไซม์จะไม่สามารถนำ corydcepin ไปใช้ในเมตาบอลิซึมได้ เนื่องจาก nucleotide เหล่านี้ เป็นส่วนสำคัญในการสร้าง DNA เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่สามารถจับกับ corydcepin เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การทดลองหลายฉบับพบว่า Corydcepin มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Leukaemia (Chen et al., 1997; Park et al., 2005)

Corydcepin นั้น มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น Cytokinin Oxidase ใน Phaseolus vulgaris L. cv Great Northern (Chatfield and Armstrong, 1986) polynucleotide

adenylyltransferase ใน Bos Taurus (Winters and Edmonds, 1973) Pseudomonas putida (Blakesley and Boezi, 1975) Bacillus subtilis (Sarkar et al., 1997) adenosine deaminase ในคนและ Plasmodium falciparum (Daddona et al., 1984) DNA nucleotidylexotransferase ในคน (Di Santo and Maga, 2006)

ผลิตภัณฑ์ที่วางขายในท้องตลาดมีความหลากหลาย ทั้งทางด้านการผลิต แหล่งวัตถุดิบ และสินค้าปลอมปน รูปแบบสินค้ามีความหลากหลาย เช่น แคปซูล เครื่องดื่ม ยาน้ำ (Lo et al., 2013) และถึงแม้จากบางแหล่ง ไม่มี cordycepin (Hsu et al., 2002) ดังแสดงใน ตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ cordycepin และ adenosine ในถึงเข้าจากแหล่งต่างๆ

	Genuine DongChongXiaCao (<i>Cordyceps</i> sp.)		Fermented preparations of <i>C. sinensis</i>		Counterfeit DongChongXiaCao (<i>Cordyceps</i> sp.)		MimicDongChongXiaCao
Bioactive ingredient(μ g/g)	Corpus	Fruiting body	Mycelium	Supernatant of broth	Corpus	Fruiting body	<i>Starchys geobombycis</i>
Adenosine	311 ^b	1930 ^a	2.0 ^c	2.7 ^c	–	–	–
Cordycepin	5.4 ^a	2.4 ^b	1.4 ^b	1.9 ^b	–	–	–

A Means with different letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

การปลอมปนหรือขายถึงเข้าที่ไม่มีมาตรฐานรองรับ ทำให้ผู้บริโภคไม่ได้รับสินค้าที่มีคุณภาพและมีความเสี่ยงในด้านความปลอดภัย ในขณะที่เดียวกันการสกัด cordycepin จากแหล่งวัตถุดิบธรรมชาตินั้นจะไม่คงที่ ซึ่งมีผลกระทบต่อราคาของ cordycepin ที่ทำให้บริสุทธิ์ แต่ในปัจจุบัน การตรวจสอบปริมาณ cordycepin ยังอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนและมีราคาแพง เช่น HPLC (Huang et al., 2009) ทำให้ผู้บริโภคหรือผู้รับซื้อวัตถุดิบ ไม่สามารถทำการตรวจวัดได้เอง

นอกจากนี้ สมุนไพรไทยหลายชนิด ยังไม่ได้รับการศึกษาว่ามีปริมาณ cordycepin หรือ adenosine และสารอนุพันธ์หรือไม่ ซึ่งหากมีการตรวจพบ ก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าภายในประเทศได้ ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจหา cordycepin, adenosine และสารอนุพันธ์ จึงมีความสำคัญต่อการค้นหาตัวใหม่ และส่งเสริมการพัฒนาสมุนไพรไทย

4.2.2 วัตถุประสงค์

- โคลนยีนของเอนไซม์ที่อาจนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์ปริมาณ cordycepin
- ปรับปรุงเอนไซม์ให้มีความจำเพาะต่อ cordycepin ของโดยวิธี protein engineering

4.2.3. วิธีการดำเนินการ

4.2.3.1 การคัดเลือกและผลิตเอนไซม์

E. coli Adenosine deaminase ถูกคัดเลือกจากกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถใช้ adenosine และ cordycepin เนื่องจากสามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย และมีข้อมูลเบื้องต้นด้านความจำเพาะของเอนไซม์ในแต่ละ species

E. coli Adenosine deaminase ถูก clone ลงใน pET17b และควบคุมการแสดงออกโดย T7 promoter จากนั้น

plasmid ถูก transformed เข้าสู่ E. coli BL21(DE3) โดยถูกเลี้ยงใน LB medium พร้อมกับ ampicillin และ induce ด้วย IPTG และตรวจสอบการแสดงออกของยีนส์โดย SDS-PAGE

human adenosine deaminase (ADA1) จาก Sigma Aldrich ถูกนำมาทดสอบในการศึกษานี้เช่นกัน

4.2.3.2 การทดสอบความจำเพาะของเอนไซม์เบื้องต้น

substrate ทั้ง 3 ชนิด ถูกทดสอบกับเอนไซม์ทุกชนิดที่ความเข้มข้น 0.05 mM และอัตราการเกิดปฏิกิริยาถูกวัดโดยการดูดกลืนแสงที่ 265 nm เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง แสดงถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาของแต่ละ substrate ซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบโดยตรง

4.2.3.3 การสกัด *Cordyceps militaris* และ *Ohiocordyceps sinensis*

1. การสกัดด้วยน้ำร้อน

บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วเติมน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 0.25g/15 ml ต้มที่อุณหภูมิ 85-90°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยกวนตัวอย่างตลอดเวลา และเก็บตัวอย่างก่อนต้มจำนวน 1 ml เมื่อครบ 3 ชั่วโมง จึงทำการปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอน และกรองส่วนใส ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

2. การสกัดด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง

บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วเติมน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 0.25g/15 ml แช่ตัวอย่างที่ 25-30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างก่อนแช่จำนวน 1 ml เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงทำการปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอน และกรองส่วนใส ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

3. การสกัดด้วยตัวทำละลาย

บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วเติม 15% เอทานอล หรือ isopropanol ในอัตราส่วน 0.25g/15 ml ต้มที่อุณหภูมิ 85-90°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยกวนตัวอย่างตลอดเวลา และเก็บตัวอย่างก่อนต้มจำนวน 1 ml เมื่อครบ 3 ชั่วโมง จึงทำการปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอน และกรองส่วนใส ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

4.2.3.4 การตรวจวัดด้วย HPLC

Mobile phase สำหรับการแยก Adenosine และ cordycepin ประกอบด้วย น้ำ (Type 1) และเมทานอล (HPLC grade) สัดส่วน 90:10 โดยใช้ Isocratic elution คอลัมน์ชนิด Thermo Acclaim™ 120 C-18, 5 μ m 120 Å (ขนาด 4.6 x 150 mm) อุณหภูมิของคอลัมน์ 31 °C Flow rate 1 mL/min แบบ Isocratic; Injection volume 10 μ L และใช้ความยาวคลื่น 260 nm (UV detector) และเวลาที่ใช้ในการ run ตัวอย่าง ใช้ระยะเวลา 18 นาที ต่อตัวอย่าง สารมาตรฐานถูกเตรียมในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.005 mM – 0.5 mM

4.2.3.5 การ validate การสกัดและตรวจวัด ด้วย HPLC

Method validation ในการศึกษาครั้งนี้ ครอบคลุม linearity, precision, recovery, LOD, LOQ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. Linearity ทดสอบโดยใช้สารมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.005 – 1.0 mM เพื่อดู linear regression ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ โดยต้องมี R^2 อย่างน้อย 0.995

2. precision วัดพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น โดยทำ 6 ซ้ำ และใช้ถังเข้าสกัด 3 ความเข้มข้น วัดทั้งหมด 6 ซ้ำ และดูค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ทั้งนี้ ทำการวัด

ตัวอย่างทั้งภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) ติดต่อกัน 3 วัน

3. Recovery ของ hot water extraction ทำโดยสกัดตัวอย่างในน้ำร้อน และเติมสารมาตรฐาน cordycepin ที่ทราบความเข้มข้น ลงในตัวอย่าง (spike test) เมื่อทำการต้มตัวอย่างเป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ว จึงนำป็นเหยียงและกรอง เพื่อวัดปริมาณ cordycepin ที่ได้ โดย HPLC

4. LOD และ LOQ LOD พิจารณาจาก signal: noise และ LOQ คำนวณจาก

$$\text{Quantification limit} = \frac{\text{SD} \times 10}{\text{slope of calibration curve}}$$

4.2.3.6 การเปลี่ยนกรดอะมิโนใน *E. coli* adenosine deaminase

ตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่จะทำการปรับเปลี่ยน ถูกเลือกโดยการวิเคราะห์โครงสร้าง Site-directed mutagenesis โดยเน้นการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณ active site ของเอนไซม์ โดยมี 2 ตำแหน่งที่คัดเลือกมาศึกษาเพิ่มเติมคือ D16 และ L63 จากนั้นใช้ primers เพื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน ดังนี้

Primer names	Sequence(5'-3')
D16 For 1	CCATCGCCACCTT NN KGGCAACATTCG
D16 Rev 1	CGAATGTTGCC MN NAAGGTGGCGATGG
L63 For 1	CTTTCTGACCAA NN KGACTGGGGC
L63 Rev 1	GCCCCAGTC MN NTTTGGTCAGAAAG

จากนั้น ทำ PCR โดยใช้ extension time 10 นาทีและ annealing temperature 50° C แล้วจึง transform เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) เพื่อเลี้ยงและผลิตเอนไซม์ต่อไป

4.2.3.7 การ screen สายพันธุ์ L63X และ D16X

หลังจาก transform PCR product เข้าไปใน *E. coli* BL21(DE3) แล้ว Single colony ถูกนำไปเลี้ยงใน Auto-induction medium-Ampicillin ใน deep-square 24 well plate และทำการเลี้ยงที่ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้ไปปั่นตกตะกอน และย่อยด้วย lysozyme ใน KPB buffer, pH 7.5 ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำตัวอย่างไปปั่นตกตะกอน และนำส่วนใสไปทดสอบกับ substrate ทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.05 mM โดยมี wild type และ *E. coli* BL21(DE3) ที่ไม่มี plasmid เป็น control และทำการติดตามปฏิกิริยาโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 265 nm อย่างน้อย 80 clones จาก L63X ถูก screen

4.2.3.8 การยืนยัน Mutation

Mutants ที่ได้จากการ screen ถูกนำไปเลี้ยงใน LB-Ampicillin เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงทำการสกัด plasmid และส่งไปวิเคราะห์ DNA sequence โดย mutants ที่คัดเลือกมาทำการ DNA sequence นั้นเป็น Mutants ที่มี activity สูง ปานกลาง และต่ำ ต่อ substrate ทั้ง 3 ชนิด เพื่อดูผลกระทบของ mutation ต่อ activity ของเอนไซม์ประกอบ จากนั้น นำ mutants ที่ได้ผลิตเอนไซม์ตามวิธีขั้นต้นและทดสอบ activity ต่อ substrate ทั้ง 3 อีกครั้ง เพื่อยืนยัน activity และ specificity

4.2.3.9 การตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ และการแสดงออก

เมื่อทำการผลิตเอนไซม์แล้ว เซลล์ที่เก็บได้จะถูกย่อยเซลล์ด้วย Ultrasonication แล้วจึงนำไปปั่นตกตะกอน

เพื่อแยกเศษเซลล์ออก และ adenosine deaminase จะอยู่ในส่วนใส นำส่วนใสมาวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Bradford assay และใช้ BSA เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์การแสดงออกด้วย SDS-PAGE และย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue โดยมี blueye prestained protein ladder เป็นโปรตีนมาตรฐาน

4.2.3.10 การศึกษาคุณสมบัติทาง Kinetics ของ mutants

เมื่อทำการผลิตเอนไซม์แล้ว clarified lysate จะถูกนำมาทดสอบกับ substrate ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 – 0.15 mM ใน KPB buffer, pH 7.5 ปฏิกริยาถูกติดตามโดย spectrophotometer โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 265 nm ตัวอย่างจากปฏิกริยายังถูกวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อยืนยันผลที่ได้จาก spectrophotometer โดยนำตัวอย่างไป quench ใน 10% acetic acid ที่อัตราส่วน 1:4 แล้วนำไปกรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.45 μ m ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีข้างต้น

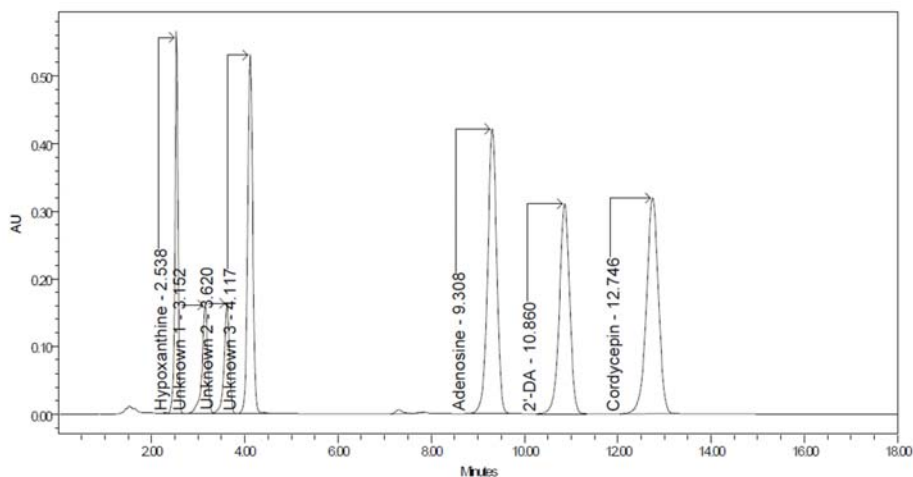
4.2.4 ผลการดำเนินงาน

4.2.4.1 การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณ adenosine, 2'-deoxyadenosine, cordycepin ด้วย HPLC

การแยกสารมาตรฐาน Inosine, adenine, guanosine, adenosine, 2'-deoxyadenosine และ cordycepin สามารถทำได้ด้วยด้วย HPLC ดังที่ chromatogram แสดงใน รูปที่ 4.2

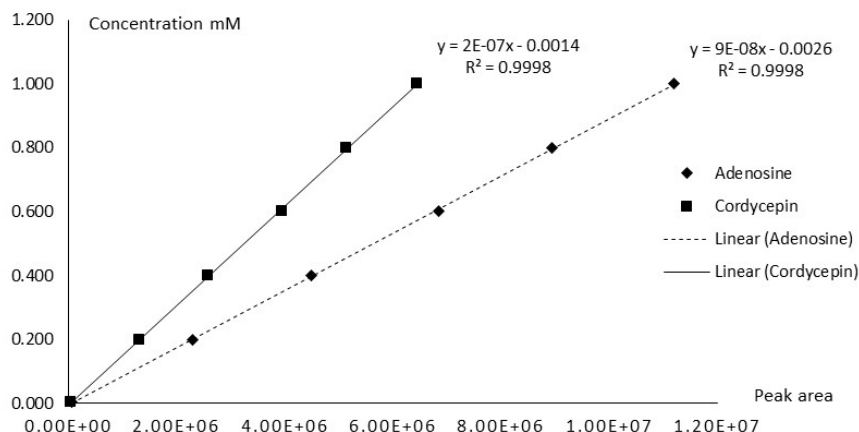
กราฟมาตรฐานของ adenosine และ cordycepin ถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณ adenosine และ cordycepin ดังแสดงใน กราฟที่ 4.1 ทั้งนี้ linearity ของกราฟมาตรฐานของสารทั้ง 2 ชนิด อยู่ในช่วง 0.005-0.5 mM อย่างไรก็ตาม สารมาตรฐานอาจมี linearity สูงถึง 0.1 mM หาก column ได้รับการดูแลรักษาเป็นอย่างดี

การตรวจวัดปริมาณ adenosine ด้วย HPLC นั้น มี LOD และ LOQ อยู่ที่ 0.0082 และ 0.0273 mM ตามลำดับ ในขณะที่ การตรวจวัดปริมาณ adenosine ด้วย HPLC มี LOD และ LOQ อยู่ที่ 0.0099 และ 0.0331 mM ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.2 Chromatogram ของสารมาตรฐาน

Unknown 1 = Inosine, Unknown 2 = Adenine และ Unknown 3 = Guanosine ตามลำดับ



กราฟที่ 4.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้ curve ของ chromatogram และ ความเข้มข้น adenosine และ cordycepin

ตารางที่ 4.2 Linear regression, LOD และ LOQ ของสาร adenosine และ cordycepin

Analytes	Linear range (mM)	Standard error (SE)	R2	LOD (mM)	LOQ (mM)
Adenosine	0.005-0.5	29278.805	0.9995	0.0082	0.0273
Cordycepin	0.005-0.5	20144.2206	0.9994	0.0099	0.0331

เมื่อได้วิธีมาตรฐานในการตรวจวัด adenosine และ cordycepin แล้ว จึงใช้วิธีการดังกล่าวในการตรวจหาปริมาณ adenosine และ cordycepin ในสารสกัดงั้วเช่า

4.2.4.2 วิธีการสกัดงั้วเช่า และ validation

แบ่งออกเป็น 3 วิธีการ ได้แก่ Hot water extraction, Ambient water extraction และ Organic solvent extraction วิธีการสกัดงั้วเช่า 3 วิธีถูกเลือกมาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ adenosine และ cordycepin ที่สกัดได้จากงั้วเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) ได้แก่ Hot water extraction, Ambient water extraction, Organic solvent extraction โดย 1 ตัวอย่าง จะถูกสกัดซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อดูปริมาณ adenosine และ cordycepin ที่หลงเหลืออยู่ และบ่งชี้ประสิทธิภาพในการสกัดงั้วเช่า นอกจากนี้ การเก็บตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง (ก่อนทำการสกัด) บ่งชี้ให้เห็นถึงปริมาณ adenosine และ cordycepin ที่เพิ่มขึ้น เมื่อทำการสกัดไปแล้ว 3 ชั่วโมง

จาก ตารางที่ 4.3 ตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 แสดงให้เห็นว่า มี adenosine และ cordycepin ที่ละลายออกมาในตัวทำละลายได้ทั้ง 3 วิธี โดย cordycepin มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อสกัดไปแล้ว 3 ชั่วโมง และสามารถสกัดได้เพิ่มขึ้นในการสกัดครั้งที่ 2 โดยสารสกัดส่วนใหญ่อยู่ในการสกัดครั้งที่ 1 และการใช้ organic solvent สามารถเพิ่มการสกัดได้มากกว่าการใช้ น้ำ

ในทางตรงกันข้าม adenosine มีปริมาณลดลงเมื่อมีการสกัดนานขึ้นในน้ำ หรือ methanol ในขณะที่การสกัดด้วย Isopropanol ได้ปริมาณ adenosine น้อยมากกว่าวิธีอื่น ทั้งนี้ มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า adenosine

สามารถเสื่อมสภาพได้เมื่อมีการแช่อยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูง และอาจเป็นผลจากเอนไซม์บางชนิดที่ทำงานที่อุณหภูมิสูง ทั้งนี้การทดลองตามมาตรฐาน adenosine ในน้ำ หรือ phosphate buffer pH 7.5 ที่ 85°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ว ทำการวัดปริมาณด้วย HPLC แล้วพบว่า ปริมาณ adenosine ยังเท่าเดิม แสดงให้เห็นว่า adenosine ไม่ได้เสื่อมสภาพ ไปด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียว แต่น่าจะมีปัจจัยอื่นที่มาจากถังเข้าเข้ามาเกี่ยวข้อง

จาก ตารางที่ 4.3 จะเห็นว่า ไม่มีวิธีใดที่สามารถสกัดเพื่อให้ได้ adenosine และ Cordycepin ให้ได้มากที่สุดไปพร้อม ๆ กัน เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัด adenosine และ cordycepin ด้วยเอนไซม์ วิธีการสกัดจำเป็นต้องเอื้อต่อการใช้เอนไซม์เช่นเดียวกัน จาก โดยการใช้ organic solvent เหมาะกับการสกัด cordycepin แต่การสกัดด้วยน้ำ ทำให้ได้ปริมาณ adenosine มากกว่าแต่มีความเสี่ยงต่อการเสื่อมสภาพของ adenosine อย่างไรก็ตาม การเสื่อมสภาพของ adenosine ในน้ำร้อน ไม่ได้มากกว่าการเสื่อมสภาพใน organic solvent และการใช้ organic solvent ต้องทำการระเหย organic solvent ออก เพื่อป้องกันเอนไซม์เสื่อมสภาพ ดังนั้น จึงเลือกใช้น้ำร้อนในการสกัดถังเข้าตัวอย่าง โดยอาจพิจารณาปรับเปลี่ยนเวลาในการสกัด เพื่อลดการเสื่อมสภาพของ adenosine

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ Adenosine และ Cordycepin ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ จากตัวอย่าง Cordyceps militaris แห่ง 4 ชนิด

Extraction method	Sample name	Total mg/ 100 g sample							
		Adenosine				Cordycepin			
		Cordylis	CFD	CFFB	CFFM	Cordylis	CFD	CFFB	CFFM
1. Hot water extraction	HW 0 h	125	107	138	48.4	202	774	930	542
	HW 3 h_1	54.9	52.3	86.5	28.0	241.3	795	1074	643
	HW 3 h_2	2.98	2.91	6.35	2.20	13.0	46.6	78.9	57.9
2. Ambient water extraction	AW 0 h	167	156	176	103	182	699	879	453
	AW 24 h_1	94.6	146	153	70.9	162	718	893	463
	AW 24 h_2	-	63.6	65.3	62.5	28.0	91.2	79.3	54.5
3. Organic solvent extraction									
30% V/V Methanol	Met 0 h	121	107	119	78	184	583	732	427
	Met 3 h_1	81.4	85.0	96.2	75.2	217	947	1022	535
	Met 3 h_2	63.2	63.1	63.5	-	37.1	76.4	84.0	58.6
30% V/V Isopropanol	Iso 0 h	-	67.1	67.2	-	81.3	330	406	258
	Iso 3 h_1	76.4	86.3	104.5	72.7	227	1192.5	1238	763
	Iso 3 h_2	-	-	-	-	32.8	155	121	111

หมายเหตุ 0 h หมายถึง ปริมาณสารก่อนทำการ Incubate ณ อุณหภูมิต่างๆ

3 h_1 หมายถึง การสกัดครั้งที่ 1 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

3 h_2 หมายถึง การสกัดครั้งที่ 2 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

ตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง ได้แก่ 1.Cordylis 2.Cordy Farmacy แบบดอกถังเข้าอบแห้ง (Dehydrated) (CFD) 3.Cordy Farmacy แบบ capsule Fruiting Body (CFFB) 4.Cordy Farmacy แบบ capsule Fruiting Body ผสมกับ Mycelium (CFFM)

ปริมาณสาร adenosine และ cordycepin ในหน่วย mg/100 g จาก 3 ตัวอย่าง ของ *Cordyceps sinensis*

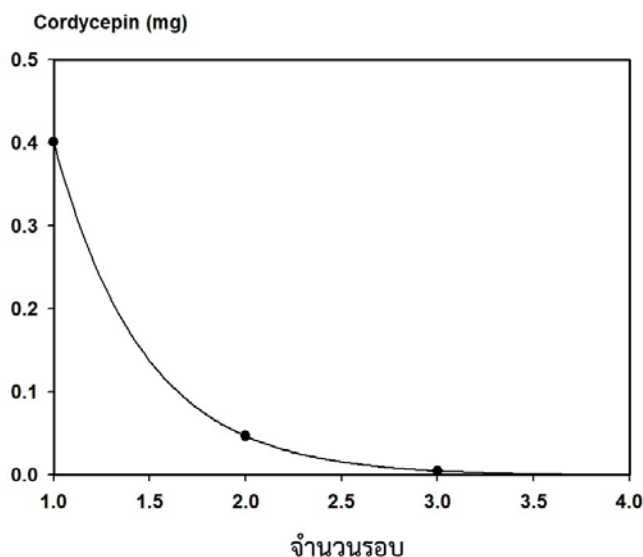
เพื่อเป็นการทดสอบว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนนั้นมีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใด จึงได้ทำการ Spike test โดยเติม Cordycepin ในตัวอย่างถึงเข้า แล้วทำการสกัดตามปกติ และวัดปริมาณ cordycepin ที่ออกมาในน้ำ เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ spike ซึ่งพบว่าได้ปริมาณ cordycepin ออกมาราว 76.5% ดังแสดงใน ตารางที่ 4.4 แม้ว่าการสกัดครั้งแรก จะให้ cordycepin มากกว่าครั้งที่ 2 อยู่ราวเกือบ 10 เท่า การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า matrix effect เช่นเนื้อถั่งเช่า อาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัด cordycepin ซึ่งจะส่งผลต่อการตรวจวัด cordycepin ในตัวอย่างได้ส่วน adenosine นั้น ไม่สามารถตรวจสอบ recovery ได้ เนื่องจากมีการเสื่อมสภาพระหว่างการสกัด

ตารางที่ 4.4 % Recovery ของสาร cordycepin

Analytes	Original (mg)	Spiked (mg)	Found (mg)	% Recovery*
Adenosine	0.0214	-	0.0214	-
Cordycepin	0.453	0.18843	0.592	76.5

* %Recovery สามารถคำนวณได้จากสูตร $\% \text{ Recovery} = 100 \times (\text{Amount found} - \text{Original amount}) / \text{Amount spiked}$

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการติดตามปริมาณ cordycepin ที่ได้จากการสกัด 3 รอบ พบว่า ปริมาณ cordycepin ที่ออกมานั้น ส่วนใหญ่อยู่ในการสกัดครั้งที่ 1 และมี profile การสกัดออกแบบ exponential decay ดังแสดงในกราฟที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าการสกัดนั้นเป็นไปตามหลักการ แต่ cordycepin ที่คลาดเคลื่อนนั้น อาจเกิดจากตัวอย่างที่ไม่สม่ำเสมอ จึงต้องมีการทดสอบความน่าเชื่อถือของการสกัด ด้วยการติดตาม Inter-day และ Intra-day นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดสอบความแน่นอนของการตรวจวัดในวันเดียวกันและระหว่างวัน Intra-day และ inter-day ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ตารางที่ 4.



กราฟที่ 4.2 ปริมาณ Cordycepin ที่ได้ จากการสกัดแต่ละรอบ

ตารางที่ 4.5 ค่าความเที่ยงตรง (Precision) Intra-day และ Inter-day ของสาร adenosine และ cordycepin จากตัวอย่างถั่งเช่า

Standard	Concentration added (mM)	Intra-day			Inter-day		
		Mean concentration found (mM) ^a	SD ^a	%RSD ^a	Mean concentration found (mM) ^b	SD ^b	%RSD ^b
Adenosine	1 (High)	0.821	0.271	32.99	1.035	0.05	5.18
	0.5 (Medium)	0.520	0.055	10.59	0.671	0.03	5.50
	0.05 (Low)	0.047	0.002	4.82	0.052	0.001	3.80
Cordycepin	1	0.823	0.272	33.09	1.022	0.05	5.21
	0.5	0.508	0.056	11.06	0.540	0.03	5.48
	0.05	0.047	0.002	4.84	0.051	0.001	3.80
Sample	Concentration added (ug/ml)	Intra-day			Inter-day		
		Mean concentration found (ug/ml) ^a	SD ^a	%RSD ^a	Mean concentration found (mM) ^b	SD ^b	%RSD ^b
Adenosine (CFFB)	17,000 (High)	8.742	3.49	39.97	88.349	10.33	5.53
	12,500 (Medium)	6.895	0.34	4.91	54.755	6.98	8.27
	8,500 (Low)	4.828	0.25	5.15	7.113	3.76	7.54
Cordycepin (CFFB)	17,000	124.740	23.5	18.84	172.795	12.34	6.02
	12,500	108.806	3.78	3.47	120.228	10.75	8.37
	8,500	75.385	5.57	7.39	53.558	6.0	4.83

ความเที่ยงตรงของเครื่องมือและการสกัด ดูได้จาก Standard deviation (SD), Relative standard deviation (%RSD), Coefficient of Variation (%CV) จากการวัดปริมาณสารมาตรฐาน adenosine และ cordycepin ภายในวันเดียวกัน และข้ามวัน ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4. ตารางที่ 4.5 โดยที่

$$\% \text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\text{Mean concentration}} \times 100$$

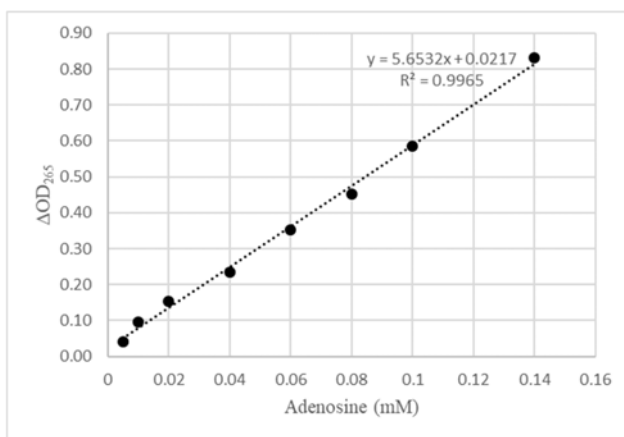
ค่า %RSD ที่ยอมรับได้จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2% และสำหรับ Low level impurity ค่า %RSD จะอยู่ในช่วง 5 - 10%

จาก ตารางที่ 4.5 จะเห็นว่า %RSD ที่ยอมรับได้สำหรับสารมาตรฐานทั้ง adenosine และ cordycepin นั้น จะอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่น้อยกว่า 0.05 mM สำหรับ Intra-day แต่ %RSD ของสารทั้ง 2 ชนิด สามารถยอมรับได้ถึง 1 mM แสดงให้เห็นว่า การตรวจวัดระหว่างวันนั้น มีความน่าเชื่อถือ แต่จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐานทุกครั้งที่ตรวจวัดสารในแต่ละวัน เพื่อตรวจสอบความคลาดเคลื่อนและเพื่อให้การตรวจวัดมีความแน่นอนมากขึ้น ส่วนการตรวจวัดปริมาณ adenosine และ cordycepin ในสารสกัดนั้น มีความคลาดเคลื่อนภายในวัน (intra-day) ค่อนข้างสูงเมื่อใช้ตัวอย่างสารมากกว่า 12,500 µg/ml และจำเป็นต้องมีการทำซ้ำ เพื่อลดความเบี่ยงเบนหรือความคลาดเคลื่อนของการวัดสารสกัด

การตรวจวัดระหว่างวันนั้น มีค่า %RSD สูงกว่า 5% เล็กน้อย สำหรับทั้ง adenosine และ cordycepin แสดงให้เห็นว่า วิธีการตรวจวัดนี้มีความน่าเชื่อถือ

4.2.4.3 การใช้ Adenosine deaminase ในการตรวจหาปริมาณ adenosine ในถังเช่าสกัด

เมื่อทำการสกัด adenosine และ cordycepin จากถังเช่าได้แล้ว และทราบปริมาณ adenosine และ cordycepin จากการใช้ HPLC จึงได้ทดสอบการวัดปริมาณ adenosine และ cordycepin ด้วยเอนไซม์ adenosine deaminase โดยวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ 265 nm จนกระทั่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง (total change in Absorbance 265 nm) และดูความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ adenosine ดังแสดงใน กราฟที่ 4.3 พบว่า สามารถวัดปริมาณ adenosine มาตรฐานในบัฟเฟอร์และมีความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 0.005 mM – 0.14 mM การใช้ Adenosine deaminase ในการตรวจหาปริมาณ adenosine ในถังเช่าสกัด



กราฟที่ 4.2 กราฟมาตรฐานระหว่างการเปลี่ยนแปลง Absorbance 265 nm และความเข้มข้น adenosine

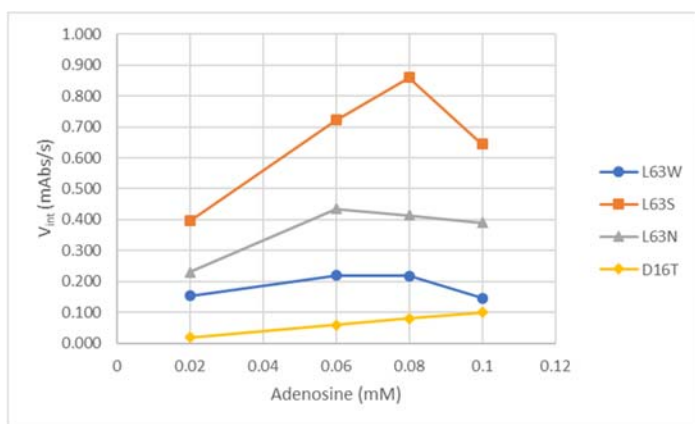
ตัวอย่างจากการสกัดถึงเข้าสีทอง 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CDL และ CFFB ถูกนำมาใช้ทดสอบความสามารถในการวัดปริมาณ adenosine หรือ cordycepin จากการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ 265 nm โดยพบว่า ปริมาณ adenosine ที่ได้ สูงกว่าปริมาณ Product claim ใน CDL แต่ใกล้เคียงกับปริมาณ adenosine ที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธี HPLC ดังที่กล่าวมาข้างต้น ในขณะที่ปริมาณ adenosine ใน CFFB นั้น ถูกตรวจวัดได้มากกว่า product claim และการตรวจวัดด้วย HPLC แต่ยังคงอยู่ในระดับเดียวกัน คือช่วง 230 – 300 mg/100g ดังแสดงใน ตารางที่ 4.1 ทั้งนี้ ความแตกต่างจาก product claim อาจเกิดจากวิธีการสกัด ส่วนความแตกต่างที่เกิดขึ้นกับการตรวจวัดด้วย HPLC นั้น อาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของ adenosine ที่ไม่เท่ากัน หรือการทำปฏิกิริยาของ cordycepin เนื่องจาก cordycepin ใน CFFB สูงกว่า CDL ราว 4 เท่า จึงสามารถเป็น competitive substrate ได้ และให้สัญญาณในการตรวจวัดได้ อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ในการใช้ adenosine deaminase ในการตรวจวัดปริมาณ adenosine ในสารสกัดถึงเข้าได้ แต่อาจมี interference จาก cordycepin ได้ จึงนำไปสู่การพัฒนาเอนไซม์เพื่อปรับปรุงความจำเพาะกับ adenosine เท่านั้น หรือ cordycepin เท่านั้น ในส่วนถัดไป

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ adenosine และ cordycepin ที่สกัดได้จาก *C. militaris* ด้วยวิธี Hot water extraction (mg/100g) (n=3) และปริมาณ adenosine ที่วัดได้จาก adenosine deaminase

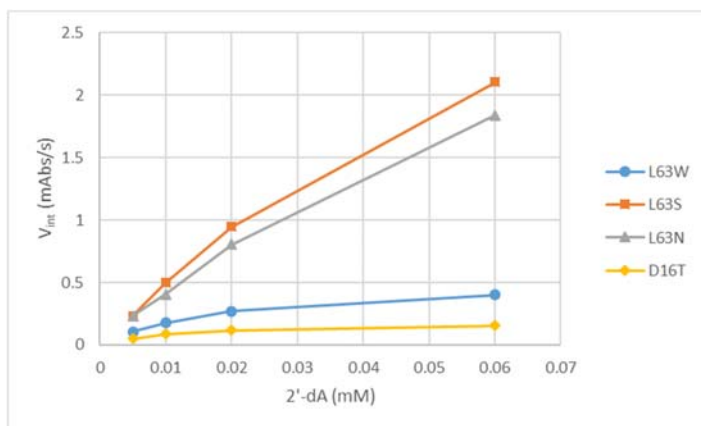
	Product claim		Quantified by HPLC		Quantified by adenosine deaminase mg/100g
Sample	Adenosine	Cordycepin	Adenosine	Cordycepin	Adenosine
CDL	145.50	492.80	209.5 ± 1.99	260.3 ± 23.3	197.18 ± 21.16
CFFB	256	1227	227.7 ± 1.31	1076 ± 15.71	298.12 ± 38.46

4.2.4.4 การปรับปรุงความจำเพาะของ adenosine deaminase ด้วย site-directed adenosine deaminase

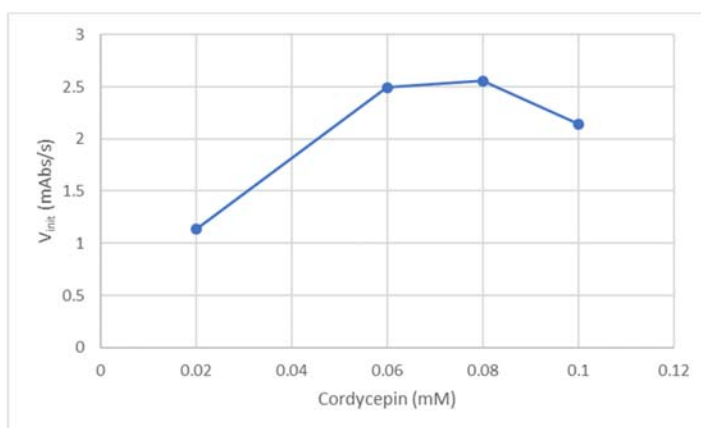
เมื่อทำการคัดกรอง mutants จาก L63X และ D16X libraries แล้ว พบว่ามี mutants ที่มีการเปลี่ยนความจำเพาะระหว่าง adenosine, 2'-deoxyadenosine, cordycepin และเมื่อคัดเลือก mutants บางสายพันธุ์มาทดสอบ kinetic parameters แล้ว พบว่ามีการปรับเปลี่ยนความจำเพาะระดับ V_{max} เป็นส่วนใหญ่ และ K_M ในบาง mutants มีความเปลี่ยนแปลงมากกว่า 50% และใน 1 mutant มีการเปลี่ยนแปลง K_{cat}/K_M ระหว่าง adenosine และ 2'-deoxyadenosine ชัดเจน อันได้แก่ L63S/N นอกจากนี้ ระดับการเกิด substrate inhibition ยังเปลี่ยนไปเมื่อเปลี่ยน L63 เป็นกรดอะมิโนตัวอื่น ดังแสดงใน กราฟที่ 4.4-4.6 และ ตารางที่ 4.6-4.8



กราฟที่ 4.3 The initial rates of eADA assay (mutants) with adenosine at 0.02 – 0.1 mM



กราฟที่ 4.4 The initial rates of eADA assay (mutants) with 2'-doxyadenosine at 0.05 – 0.06 mM



กราฟที่ 4.5 The initial rates of eADA assay (wild type) with cordycepin at 0.02 – 0.1 mM

ตารางที่ 4.6 The kinetic parameters of eADA with adenosine

Sample	[E] (μg)	Vmax ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Km (μM -1)	kcat ($\mu\text{M}/\text{min} \times \mu\text{g}$)	kcat/Km ($\text{min} \times \mu\text{g}$)-1
WT (A12)	5.38	198 $\pm$ 1.64	0.0570 $\pm$ 0.00390	36.75 $\pm$ 0.31	645 $\pm$ 44.4
L63W	18.9	1.03 $\pm$ 0.0164	0.0135 $\pm$ 0.00360	0.0546 $\pm$ 0.00	4.04 $\pm$ 1.08
L63S	17.9	5.51 $\pm$ 0.171	0.0523 $\pm$ 0.0137	0.308 $\pm$ 0.00955	5.88 $\pm$ 1.552
L63N	18.2	2.38 $\pm$ 0.0431	0.0302 $\pm$ 0.0184	0.131 $\pm$ 0.00	4.33 $\pm$ 2.642
D16T	14.8	0.520 $\pm$ 0.0431	0.0076 $\pm$ 0.154	0.0351 $\pm$ 0.00	4.62 $\pm$ 93.7

ตารางที่ 4.7 The kinetic parameters of eADA with 2'-deoxyadenosine

Sample	[E] (μg)	Vmax ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Km(μM -1)	kcat ($\mu\text{M}/\text{min} \times \mu\text{g}$)	kcat/Km ($\text{min} \times \mu\text{g}$)-1
WT (A12)	5.38	479 $\pm$ 4.59	0.189 $\pm$ 0.0101	89.1 $\pm$ 0.854	470 $\pm$ 25.48
L63W	18.9	2.09 $\pm$ 0.00310	0.0201 $\pm$ 0.0003	0.111 $\pm$ 0.00	4.50 $\pm$ 0.0825
L63S	17.9	22.5 $\pm$ 0.454	0.105 $\pm$ 0.0119	1.26 $\pm$ 0.0254	12.02 $\pm$ 1.386
L63N	18.2	21.2 $\pm$ 0.436	0.117 $\pm$ 0.0132	0.117 $\pm$ 0.0240	9.93 $\pm$ 1.135
D16T	14.8	0.732 $\pm$ 0.00680	0.0124 $\pm$ 0.00120	0.0494 $\pm$ 0.00	3.99 $\pm$ 0.388

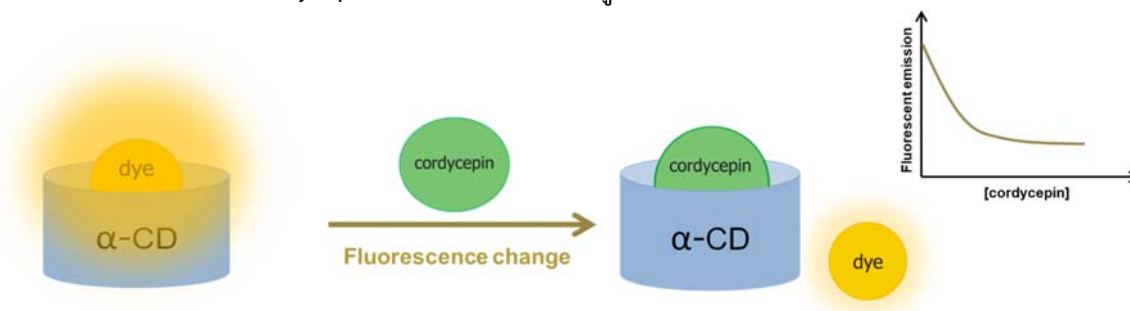
ตารางที่ 4.8 The kinetic parameters of eADA with cordycepin

Sample	[E] (μg)	Vmax ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Km(μM -1)	kcat ($\mu\text{M}/\text{min} \times \mu\text{g}$)	kcat/Km ($\text{min} \times \mu\text{g}$)-1
WT (A12)	5.38	20.7 $\pm$ 4.68	0.0684 $\pm$ 0.0300	3.85 $\pm$ 0.870	56.2 $\pm$ 27.7
L63W	18.9	-	-	-	-
L63S	17.9	-	-	-	-
L63N	18.2	-	-	-	-
D16T	14.8	-	-	-	-

4.3 การใช้ indicator displacement assay ในการวิเคราะห์หาปริมาณ cordycepin ในถั่งเช่า

4.3.1 หลักการและเหตุผล

วิธีการทางเคมีเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ cordycepin ในถั่งเช่าโดยใช้หลักการ indicator displacement assay โดยมี fluorescent dye ที่ทำหน้าที่เป็น guest และ macrocyclic molecule ที่ทำหน้าที่เป็น host เมื่อมีโมเลกุลของ cordycepin เข้ามาในระบบ fluorescent dye ที่อยู่ภายใน macrocyclic molecule จะถูกแทนที่ด้วย cordycepin ทำให้ fluorescent dye หลุดออกมาจาก macrocyclic molecule และให้สัญญาณการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ขึ้นกับปริมาณ cordycepin ที่มีในระบบ ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 หลักการ indicator displacement assay ในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ cordycepin ในถั่งเช่า

4.3.2 วัตถุประสงค์

เพื่อหา host-guest ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ cordycepin ในสารสกัดถั่งเช่า ด้วยหลักการ indicator displacement assay

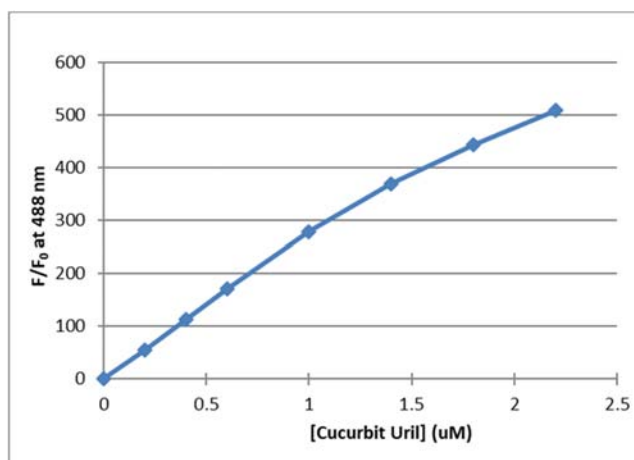
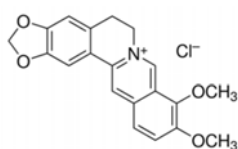
4.3.3 วิธีการดำเนินการ

1. คัดเลือกหา host จาก macrocycles จากสารประกอบที่มีรายงานเบื้องต้น คือ cyclodextrin และ cucurbiturils เนื่องจาก macrocycles จะมีขนาดที่จำเพาะเจาะจง จึงมีความสามารถในการเลือกจับสารเป้าหมายได้มากกว่าสารประกอบในกลุ่มอื่นๆ
2. Screen หา fluorescent dyes เพื่อเป็น indicator ที่เหมาะสมที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับ cyclodextrin และ cucurbiturils โดยในการทดลองนี้ได้ทดสอบสารเรืองแสงทั้งหมด 7 ตัว ได้แก่ FM4-64, esculetin, cascade yellow, nonyl acridine orange, berberine (BE), 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulphonate (2,6-TNS) และ acridine orange (AO) โดยที่ BE, 2,6-TNS และ AO ให้การเปลี่ยนแปลงของค่าการเรืองแสงเมื่อมีการเติมสารประกอบ cucurbit [7] urils (CB7) ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสารเรืองแสงอื่นๆ
3. ทดสอบ host-guest reporter pair ที่ได้ ด้วยการเติม cordecepin, adenosine หรือ nucleoside ตัวอื่นๆ ลงไปเพื่อตรวจสอบการแทนที่และสัญญาณการเรืองแสงที่เปลี่ยนไป และทำการหา buffer และ pH ที่เหมาะสมกับการแทนที่ เพื่อหา sensitivity ของการวิเคราะห์ที่สูงที่สุด

- นำ host-guest reporter pair ที่ได้ไปทดสอบกับสารสกัดของงั้วเช่า พบว่าสารสกัดของ *C. militaris* มีการเรืองแสงภายในตัวเองเป็นสีเหลือง ให้ค่าการเรืองแสงสูงสุดเมื่อมีการ excitation ที่ 375 nm จึงจำเป็นต้องใช้ fluorescent dye ที่ต้องการการกระตุ้นที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 475 nm เพื่อหลีกเลี่ยง autofluorescence ของสารสกัดดังกล่าว
- คัดเลือก host-guest reporter pair ที่เหมาะสม โดยได้เป็น AO/CB7 ที่ต้องการการกระตุ้นที่มีความยาวคลื่น 498 nm และให้การเรืองแสงสูงสุดที่มีความยาวคลื่น 530 nm
- ตรวจสอบคุณสมบัติเชิงโมเลกุลของการเกิด complex และการแทนที่ ด้วย ^1H NMR spectrometry, fluorescence spectroscopy, UV-vis spectroscopy และ isothermal calorimetry
- ทำการสกัดอาหารเสริมงั้วเช่าที่มีขายตามท้องตลาดในประเทศไทย โดยเริ่มจากการนำตัวอย่างไปอบที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชม. ชั่งมา 1.0 g แล้วสกัดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ml ใน sonicator bath เป็นเวลา 2 ชม. ปั่นตกตะกอนที่ 18,225xg เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วย 0.45 micron filter syringe แล้วนำสารสกัดมาวิเคราะห์ด้วย IDA เทียบกับวิธีการ HPLC ที่มีใช้โดยทั่วไป

4.3.4 ผลการดำเนินงาน

จากการ screen หาคู่ host-guest ที่เหมาะสม โดยใช้ host เป็นสารประกอบ cyclodextrin และ curcubit uril ที่มีขนาดต่างๆกัน พบว่า environmental sensitive fluorescent dye ที่ให้ค่า sensitivity สูงสุด คือ Berberine (BE) มีการเปลี่ยนแปลงของการเรืองแสง (F/F_0) เป็น 500 เท่าเมื่อ free dye สร้าง inclusion complex กับ curcubit uril ที่สภาวะ pH 7.2 (10 mM Phosphate buffer, $\lambda_{ex} = 345 \text{ nm}$) ดังแสดงใน รูปที่ 4.4



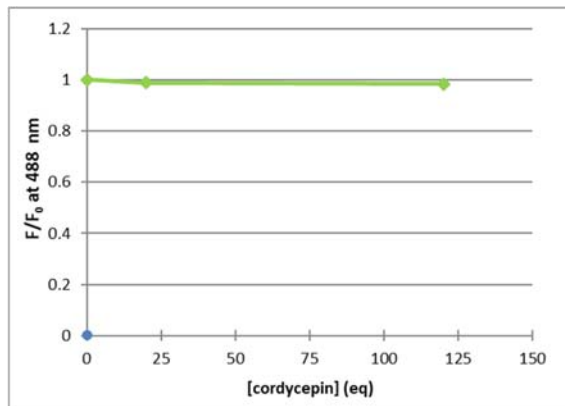
รูปที่ 4.4 โครงสร้างของ Berberine และค่า fluorescent change เมื่อทำการเติม curcubit uril ลงไป

การทดลองในลำดับต่อมา เป็นการหาค่า reverse ของการเปลี่ยนแปลงของ fluorescent change เมื่อมีการเติม cordycepin ลงไป เพื่อแสดงว่า Berberine dye ถูกแทนที่ด้วย cordycepin และหลุดออกมาอยู่ในสารละลายใน

ลักษณะของ free dye ดังแสดงในรูปที่ 4.3

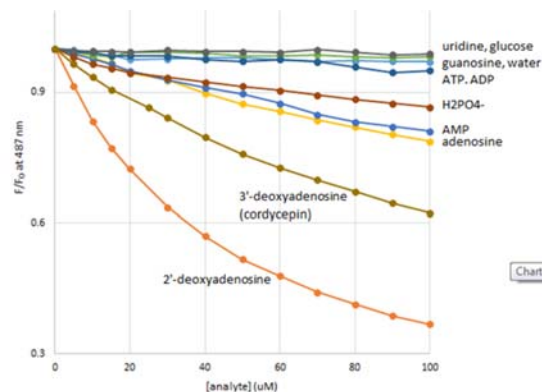
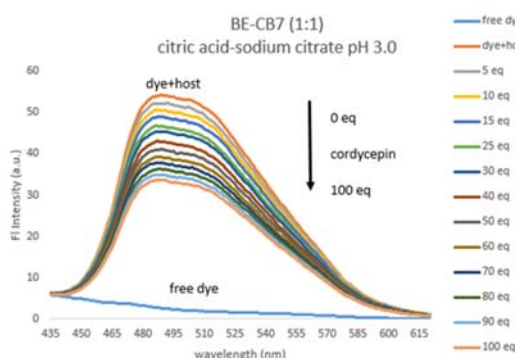
รูปที่ 4.5 ค่า fluorescent change ของ Berberine-Host inclusion complex เมื่อเติม cordycepin

จากรูปที่ 4.5 พบว่า ค่า fluorescent change ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมสารประกอบ cordycepin ลงไปในความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือ 0.125 mM (125 equivalent to dye) แสดงว่าการแทนที่ด้วย cordycepin



ไม่เกิดขึ้นใน host ซึ่งอาจเป็นผลมาจากค่า binding constant ระหว่าง host และ Berberine มีค่าสูงกว่า binding constant ระหว่าง host และ cordycepin เกิน 2 log จึงไม่เกิดการปฏิกิริยาแทนที่ตามที่คาดการณ์เอาไว้

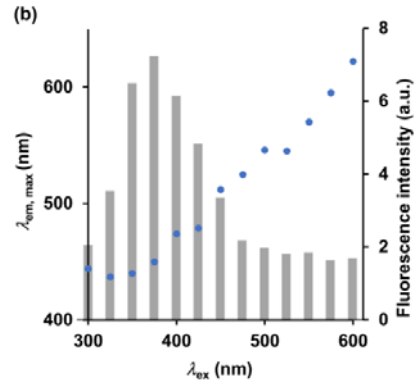
จากนั้นได้ทำการปรับสภาวะความเป็นกรด ด่าง และ ionic strength ที่เหมาะสม ที่จะช่วยลดค่า binding constant ระหว่าง host กับ Berberine พบว่า 10 mM citric acid-sodium citrate ที่ pH 3.0 ค่าการเรืองแสงของ Berberine มีการลดลงเมื่อมีการเติม cordycepin และสารเป้าหมายอื่นๆ แสดงถึงการที่ Berberine ถูกปลดปล่อยออกจาก host และมี cordycepin เข้าไปแทนที่ดังแสดงในรูปที่ 4.5



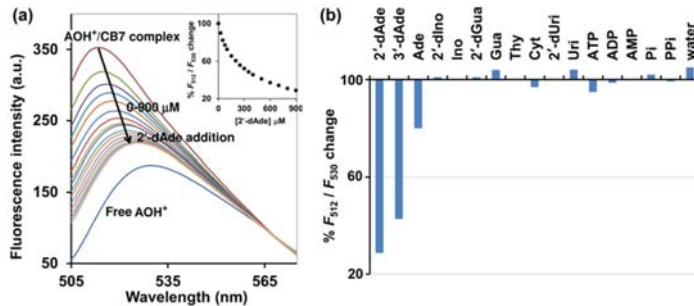
รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่าการเรืองแสงของ Berberine ตามปริมาณที่เติม cordycepin ใน 10 mM citric acid-sodium citrate ที่ pH 3.0

จากนั้นนำ host-guest reporter pair ที่ได้ไปทดสอบกับสารสกัดของถั่งเช่า พบว่าสารสกัดของ *C. millitaris* มีการเรืองแสงภายในตัวเองเป็นสีเหลือง ให้ค่าการเรืองแสงสูงสุดเมื่อมีการ excitation ที่ 375 nm ดังแสดงในรูปที่ 4.6 จึงไม่สามารถใช้ BE ในการวิเคราะห์สารสกัดจากถั่งเช่า เนื่องจาก BE เป็นสารเรืองแสงที่ต้องการการกระตุ้นที่มีความยาวคลื่นเท่ากับ 343 nm

รูปที่ 4.6 การเรืองแสงภายในตัวเองของสารสกัดจาก *C. militaris* หรือถังเช่าสีทอง เมื่อทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่นต่างๆ ตั้งแต่ 300 ถึง 600 นาโนเมตร จุดสีฟ้าแสดงถึงความยาวคลื่นที่มีการเรืองแสงสูงที่สุด และแท่งสีเทา แสดงถึงค่าการเรืองแสงที่เกิดขึ้น



ดังนั้น คู่ reporter pair ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างถังเช่าจริง ที่จะให้ค่าความแม่นยำสูงที่สุด คือ CB7/AO ซึ่งต้องการการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 498 nm จึงได้มีการทดสอบ selectivity ดังแสดงในรูปที่ 4.7

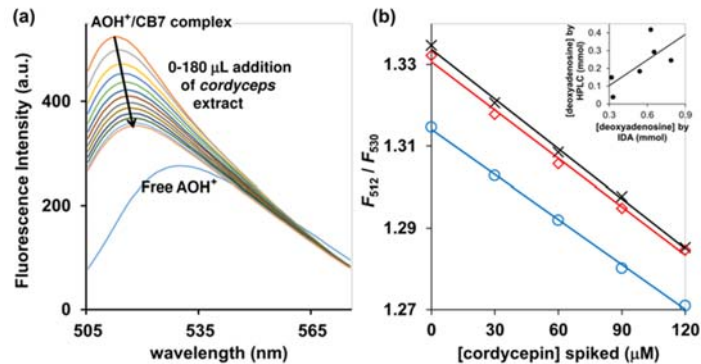


รูปที่ 4.7 การเรืองแสงของ AO, สารประกอบเชิงซ้อน AO/CB7 เมื่อมีการเติม cordycepin (3'-dAde) เมื่อเทียบกับ nucleoside ตัวอื่นๆ

จากการทดลองพบว่า deoxyadenosine ทั้ง 2'- และ 3'- สามารถแทนที่ AO ในสารประกอบเชิงซ้อน AO/CB7 ซึ่งในการทดลอง ค่าการแทนที่จะเกิดได้ดีที่สุดที่ pH ประมาณ 4 ลงมา ในการทดลองจึงใช้ pH 4.0 ในสารละลาย 10 mM ammonium acetate buffer และการแทนที่เกิดได้ระดับหนึ่ง เมื่อเติม adenosine แต่กับ nucleoside ตัวอื่นๆ แทบจะไม่เกิดการแทนที่เลย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า indicator displacement assay สามารถนำมาใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณ

cordycepin ในสารสกัดถังเช่า จึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ cordycepin ในสารสกัดถังเช่าดังแสดงในรูปที่ 4.8

รูปที่ 4.8 การเติมสารสกัดถังเช่าลงในสารประกอบเชิงซ้อนของ AO/CB7 ที่ pH 4.0 ในสารละลาย 10 mM ammonium acetate



เมื่อเติมสารสกัดแห้งเข้าลงใน สารประกอบเชิงซ้อนของ AO/CB7 พบว่าสารสกัดแห้งเข้าให้การลดลงของค่าการเรืองแสงแบบเดียวกับการเติม cordycepin และให้ความสัมพันธ์กับปริมาณ cordycepin เป็นเส้นตรงที่มีค่า R^2 มากกว่า 0.99 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 แม้ว่าค่าที่ได้จากเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยการเรืองแสง จะให้ค่ามากกว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แต่ก็มีความสัมพันธ์ที่ไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ cordycepin ด้วยวิธีการแทนที่ด้วย indicator สามารถนำไปใช้ในกระบวนการควบคุมคุณภาพการผลิตอาหารเสริมสุขภาพได้ ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว และใช้สารเคมีน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง HPLC ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

4.4 เอกสารอ้างอิง

1. Blakesley, R.W., Boezi, J.A., 1975. A kinetic and structural characterization of adenosine-5'-triphosphate: ribonucleic acid adenylyltransferase from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta* 414, 133–45.
2. Chatfield, J.M., Armstrong, D.J., 1986. Regulation of Cytokinin Oxidase Activity in Callus Tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv Great Northern. *Plant Physiol.* 80, 493–9.
3. Chen, Y.-J., Shiao, M.-S., Lee, S.-S., Wang, S.-Y., 1997. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci.* 60, 2349–2359. doi:10.1016/S0024-3205(97)00291-9
4. Daddona, P.E., Wiesmann, W.P., Lambros, C., Kelley, W.N., Webster, H.K., 1984. Human malaria parasite adenosine deaminase. Characterization in host enzyme-deficient erythrocyte culture. *J. Biol. Chem.* 259, 1472–5.
5. Di Santo, R., Maga, G., 2006. Human terminal deoxynucleotidyl transferases as novel targets for anticancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 13, 2353–68.
6. Hsu, T.H., Shiao, L.H., Hsieh, C., Chang, D.M., 2002. A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom *DongChongXiaCao*, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Chem.* 78, 463–469. doi:10.1016/S0308-8146(02)00158-9
7. Huang, L., Li, Q.Z., Chen, Y.Y., Wang, X.F., Zhou, X.W., 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. *African J. Microbiol. Res.* 3, 957–961.
8. Lo, H.-C., Hsieh, C., Lin, F.-Y., Hsu, T.-H., 2013. A Systematic Review of the Mysterious Caterpillar Fungus *Ophiocordyceps sinensis* in *Dong-ChongXiaCao* (Dōng Chóng Xià Cǎo) and Related Bioactive Ingredients. *J. Tradit. Complement. Med.* 3, 16–32. doi:10.4103/2225-4110.106538

9. Park, C., Hong, S.H., Lee, J.-Y., Kim, G.-Y., Choi, B.T., Lee, Y.T., Park, D. Il, Park, Y.-M., Jeong, Y.-K., Choi, Y.H., 2005. Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis. *Oncol. Rep.* 13, 1211–6.
10. Sarkar, B., Cao, G.J., Sarkar, N., 1997. Identification of two poly(A) polymerases in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41, 1045–50.
11. Winters, M.A., Edmonds, M., 1973. A poly(A) polymerase from calf thymus. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 4756–62.

5. สรุปผลงานที่ได้จากโครงการ

5.1 ผลงานตีพิมพ์นานาชาติ

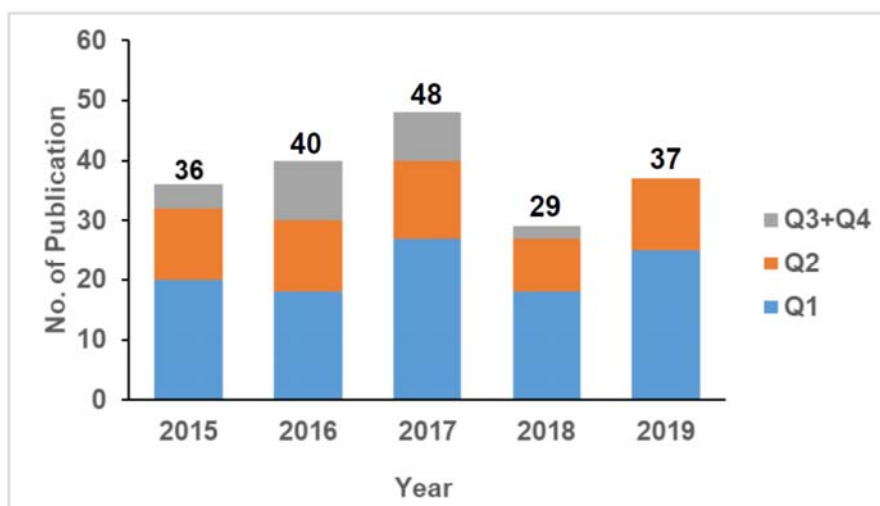
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลมีผลงานวิจัยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ได้รับจัดสรรโครงการทุนพัฒนาศักยภาพสถาบันฯ นี้ อย่างไรก็ตาม ในช่วงปี 2517-2018 มีบุคลากรของภาควิชาในระดับศาสตราจารย์ที่มีผลงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง ถึงกำหนดเกษียณอายุการปฏิบัติงานถึง 2 ท่าน รวมถึงมีการรับบุคลากรใหม่เข้าปฏิบัติงานเพื่อทดแทนอาจารย์ที่เกษียณอายุ จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนผลงานตีพิมพ์ ดัง ตารางที่ 5.1 และรูปที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงจำนวนผลงานตีพิมพ์ จำนวนบุคลากรและจำนวนงานตีพิมพ์/บุคลากรของ ในช่วงปี 2015-2019

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล (MU-BT)

Year	International publications			Total Int. publications	Staffs	Publication /head
	Q1	Q2	Q3+Q4			
2015	20	12	4	36	26	1.38
2016	18	12	10	40	25	1.60
2017	27	13	8	48	26	1.85
2018	18	9	2	29	27	1.07
2019	25	12	0	37	28	1.32

<https://science.mahidol.ac.th/th/research/output.php> accessed on 21 Feb 2020



รูปที่ 5.1 กราฟแสดงจำนวนผลงานตีพิมพ์ ในช่วงปี 2015-2019 แยกตามควอเตอร์

5.2 ผลงานตีพิมพ์ที่มี acknowledgement สกว.

1. ชื่อเรื่อง Turning hydrophilic bacteria into biorenewable hydrophobic material with potential antimicrobial activity via interaction with chitosan
ชื่อวารสาร Bioresource Technology
ปีที่พิมพ์ (Year) 2017 ปีที่ (Volume) 230 หน้า (Page) 97-102
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 1 และอยู่ใน top 10 percentile journal
สาขาวิชา Agricultural Engineering
IF = 4.917 (2017) (ดูเอกสารแนบที่ 1)
2. ชื่อเรื่อง Fluorescence sensing of inorganic phosphate and pyrophosphate using small molecular sensors and their applications
ชื่อวารสาร Topics in Current Chemistry (Z)
ปีที่พิมพ์ (Year) 2017 ปีที่ (Volume) 375 หน้า (Page) 1-33
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 1
IF = 4.464 (2017) (ดูเอกสารแนบที่ 2)
3. ชื่อเรื่อง Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Samonella Typhimurium* and their application as vegetable wash disinfectant
ชื่อวารสาร Food Control
ปีที่พิมพ์ (Year) 2018 ปีที่ (Volume) 86 หน้า (Page) 294-301
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 1
IF = 3.667 (2017) (ดูเอกสารแนบที่ 3)
4. ชื่อเรื่อง Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatomenaei* (EHP)
ชื่อวารสาร Aquaculture
ปีที่พิมพ์ (Year) 2018 ปีที่ (Volume) 490 หน้า (Page) 156-161
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 1
IF = 2.710 (2017) (ดูเอกสารแนบที่ 4)
5. ชื่อเรื่อง Hydroxypropyl methylcellulose enhances the stability of o/w emulsions stabilized with chitosan and the whole cells of *Lactococcus lastis* IO-1
ชื่อวารสาร Food Research International
ปีที่พิมพ์ (Year) 2019 ปีที่ (Volume) 116 หน้า (Page) 559-565
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 1
IF = 3.579 (2018) (ดูเอกสารแนบที่ 5)

6. ชื่อเรื่อง Viable But Nonculturable State of *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* and *Lactococcus lactis* during Exposure to Toxic Chemicals, as Revealed by Headspace Gas Chromatography and Indirect Conductivity Techniques
ชื่อวารสาร Songklanakarin Journal of Science and Technology
ฐานข้อมูล ไม่สามารถหาคำควอร์ไทล์ได้ (ดูเอกสารแนบที่ 6)
สถานะ accepted on 13 August 2019
7. ชื่อเรื่อง Masking Phosphate with Rare-Earth Elements Enables Selective Detection of Arsenate by Dipicolylamine-Zn^{II} Chemosensor
ชื่อวารสาร Scientific Reports
ปีที่พิมพ์ (Year) 2020 ปีที่ (Volume) 10 หน้า (Page) 2656
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 1
IF = 4.011 (2018) (ดูเอกสารแนบที่ 7)
8. ชื่อเรื่อง Fluorescence Differentiation of ATP-related Multiple Enzymatic Activities in Synovial Fluid as a Marker of Calcium Pyrophosphate Deposition Disease using Kyoto Green
ชื่อวารสาร Molecules
ปีที่พิมพ์ (Year) 2020 ปีที่ (Volume) 25 หน้า (Page) 1116
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 2
IF = 3.060 (2018) (ดูเอกสารแนบที่ 8)
9. ชื่อเรื่อง Fluorescence determination of soluble pyrophosphate levels in synovial fluid as a marker of pseudogout using middle point of quantification concept and molecular sensor
ชื่อวารสาร ScienceAsia
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 4
IF = 0.452 (2018) (ดูเอกสารแนบที่ 9)
สถานะ Proofread done
10. ชื่อเรื่อง Potential application of CRISPR-Cas12a fluorescence assay coupled with rapid nucleic acid amplification for detection of white spot syndrome virus in shrimp.
ชื่อวารสาร Aquaculture
ปีที่พิมพ์ (Year) 2019 ปีที่ (Volume) 512
ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 1
IF = 2.710 (2017) (ดูเอกสารแนบที่ 10)
11. ชื่อเรื่อง CRISPR-Cas fluorescent cleavage assay coupled with Recombinase Polymerase

Amplification for sensitive and specific detection of *Enterocytozoon hepatopenaei*

ชื่อวารสาร Biotechnology Reports

สถานะ submitted 2020

12. ชื่อเรื่อง Fluorescence Detection of deoxyadenosine in *Cordyceps* spp. by Indicator Displacement Assay

ชื่อวารสาร Molecules

ฐานข้อมูล JCR (Journal Citation Report) มีค่าควอร์ไทล์ 2

IF = 3.060 (2018)

สถานะ will be submitted by March 2020

5.3 การเทียบ benchmarking

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลมีการทำ benchmarking กับหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยโอซาก้า จากผลงานตีพิมพ์ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ตั้งแต่ได้รับจัดสรรโครงการทุนพัฒนาศักยภาพสถาบันฯ นี้ จึงทำให้สัดส่วนจำนวนงานตีพิมพ์ต่อบุคลากรทัดเทียมกับมหาวิทยาลัยคู่เทียบดังแสดงในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบจำนวนผลงานตีพิมพ์ จำนวนบุคลากร และ จำนวนงานตีพิมพ์/บุคลากร ระหว่างหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล (MU-BT) และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยโอซาก้า (OU-BT) ในช่วงปี 2015-2019

Year	Total Int. publications		Staffs		Publication/head	
	MU-BT	OU-BT	MU-BT	OU-BT	MU-BT	OU-BT
2015	36	125	26	50	1.38	2.5
2016	40	96	25	49	1.60	1.96
2017	48	105	26	60	1.85	1.75
2018	29	106	27	60	1.07	1.77
2019	37	107	28	60	1.32	1.78

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ps/originalpapers.html>

http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/pl/publications_e.html

http://www.icb.osaka-u.ac.jp/fujiyama_lab_e/gyoseki.html

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/publication.html>

<http://publication.fukusaki-lab.com/home/original-articles>

accessed on 21 Feb 2020

6. กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

มีการนำเสนอผลงานทางวิชาการมากกว่า 12 ผลงาน ในการประชุมวิชาการระดับสถาบัน ระดับชาติ และนานาชาติ ต่างๆ ตลอดระยะเวลาการรับทุน

7. ปัญหา อุปสรรค

- การเปลี่ยนถ่ายบุคลากรของภาควิชาที่เป็นกำลังสำคัญในการสร้างนักศึกษาและผลงานวิจัยระดับนานาชาติ
ถึงแม้ว่าการเกษียณอายุการทำงานของบุคลากรระดับศาสตราจารย์ที่มีผลงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง จะทำให้ภาควิชาที่มีผลงานตีพิมพ์นานาชาติลดลง การรับบุคลากรใหม่เข้าปฏิบัติงานเพื่อทดแทนอาจารย์ที่เกษียณอายุจะเป็นกำลังสำคัญในการสร้างผลงานของภาควิชาต่อไป
- การจัดหางบประมาณเพื่อซื้อ/ซ่อมแซมเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ก็มีสำคัญในการเพิ่มจำนวนผลงานวิจัยและตีพิมพ์
- การลดลงของประชากรวัยเด็ก การลดลงของจำนวนผู้สนใจเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทและเอก ความขาดแคลนทุนการศึกษา ล้วนแล้วแต่เป็นปัญหาที่สำคัญในการทำงานวิจัย

8. ความเห็น ข้อเสนอแนะ

- การสนับสนุนงบประมาณจากทุนพัฒนาศักยภาพการวิจัยเชิงสถาบัน สำหรับการซ่อมแซมครุภัณฑ์ส่วนกลางของภาควิชา ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากกับการทำวิจัยและกิจกรรมการเรียนการสอนของภาควิชาโดยรวม
- งบประมาณจากทุนพัฒนาศักยภาพการวิจัยเชิงสถาบันกระตุ้นให้มีการจ้างนักวิจัยและให้ทุนนักศึกษาเพื่อสนับสนุนบุคลากรที่จำเป็นต่อการวิจัย
- สกว น่าจะพิจารณาจัดสรรงบประมาณพิเศษเพื่อจัดซื้อเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขนาดใหญ่ที่จำเป็นในโครงการวิจัย เพื่อทดแทนครุภัณฑ์ที่หมดสภาพ และความยืดหยุ่นทางงบประมาณ จะมีผลทำให้ภาควิชาฯ สามารถรักษาคุณภาพและปริมาณผลงานวิจัยให้อยู่ในระดับ “ดีมาก” ต่อไปได้ในอนาคต

10. การเชื่อมโยงกับต่างประเทศหรือรางวัลที่ได้รับ

ยังไม่มี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพงษ์ ฐิตะมาติ)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน