

การศึกษากิจกรรมฟาโกไซติกของกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย

Bacillus subtilis TISTR 2664The Study of *In vitro* Phagocytic Activity of Soybean Meal Fermented with *Bacillus subtilis* TISTR 2664กมลศรี นวลคำ¹ วรณวิภา ชื่นชม¹ ภัทราวดี เก่งกว่าสิงห์² หนึ่งนุช ไชยวรรณ¹
วิโรจน์ เตชะภูริปัญญา³ และวัชร กัลยาลัง^{1*}Kamonsri Nuankham¹ Wanvipa Chuenchom¹ Pattarawadee Kengkwasingh²
Neungnut Chaiyawan¹ Viroj Tachapuripunya³ and Watcharee Kunyalung^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการกระตุ้นกิจกรรมฟาโกไซติก รวมถึงชนิดและส่วนประกอบของเปปไทด์ในกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 2664 โดยกากถั่วเหลืองที่ใช้ได้รับจากโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งมีองค์ประกอบต่าง ๆ คือ โปรตีน 44.65 เปอร์เซ็นต์ น้ำมัน 1.28 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 12.08 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 6.40 เปอร์เซ็นต์ และใยอาหาร 5.54 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก เมื่อผ่านการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 แล้วตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ในช่วง 5-29 กิโลดาลตัน และจากการวิเคราะห์ชนิดของเปปไทด์ด้วยวิธี liquid chromatography-mass spectrometry พบว่าประกอบด้วยเปปไทด์ 8,981 ชนิด และผลการทำนายคุณสมบัติเชิงหน้าที่ด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศพบว่า มีคุณสมบัติทางชีวภาพ 10 คุณสมบัติ คือ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านเชื้อรา ลดความดันโลหิต ต้านจุลชีพ ต้านปรสิต ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส กระบวนการสื่อสารระหว่างเซลล์ การนำส่งยา และการจับจำเพาะกับเซลล์มะเร็ง โดยผลการทำนายนี้จะมีประโยชน์ต่อการวางแผนการนำเปปไทด์ที่ได้ไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ ทั้งนี้จากการตรวจสอบด้านความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 โดยเทคนิค MTT พบว่าที่ความเข้มข้น 0-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์กระตุ้นกิจกรรมฟาโกไซติกได้สูงสุดที่ 93.27 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลสูงกว่าสารควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และสร้างไนตริกออกไซด์ได้ 48.53 ± 0.35 ไมโครโมลาร์ โดยค่าต่ำกว่าสารควบคุมเชิงบวกในทุกระดับความเข้มข้นอย่างไม่มี

¹ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)² ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมผลิตภัณท์สมุนไพร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)³ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

* Corresponding author e-mail: watcharee@tistr.or.th

DOI: <https://doi.org/10.65217/wichchajinstru.2023.v42i2.258315>

Received: 21 March 2023, Revised: 30 March 2023, Accepted: 31 March 2023

นัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่ากากถั่วเหลืองหมักมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันซึ่งจะเป็นแนวทางวิจัยพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารเสริมสุขภาพและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจต่อไป

คำสำคัญ: กากถั่วเหลืองหมัก *Bacillus subtilis* กิจกรรมฟาโกไซติก เปปไทด์

Abstract

This study aimed to investigate the components and activity of bioactive peptides derived from *Bacillus subtilis* TISTR 2664 fermentation of soybean meal to stimulate phagocytosis. Soybean meal obtained from a soybean oil factory was used as a raw material for fermentation. It contained 44.65% protein, 1.28% oil, 5.54% dietary fiber, 12.08% moisture and 6.40% ash. When fermented with *B. subtilis* TISTR2664 and examined by SDS-PAGE, most of the protein size remained in the range of 5-29 kilo Dalton (kDa). The 8,981 types of peptides in the fermented soybean meal were investigated by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-Q-TOF-MS/MS). Ten biologically active peptides having the following properties were predicted: anticancer, antifungal, antihypertensive antimicrobial antiparasitic anti-inflammatory antiviral cell communication, drug delivery, and tumor homing. Interestingly, the peptides with antihypertensive properties were found in the highest amounts. The results of this prediction will be useful for planning for further laboratory trials of the peptide derived from fermented soybean meal to lead to its utilization. A preliminary laboratory investigation into the toxicity of fermented soybean meal on RAW264.7 mouse macrophages was performed using the MTT assay. No cytotoxicity was observed at less than or equal to 25 milligrams per milliliters (mg/ml), with more than 70% viability of RAW264.7 cells. Moreover, sample concentrations ranging from 3.13 to 25 mg/ml were investigated. The results showed that at a 12.5% concentration, the highest phagocytic activity was induced at $93.27 \pm 0.50\%$, which was significantly higher than that of the positive control ($p < 0.01$). Nitric oxide production at 48.53 ± 0.35 micromolar (μM) was non-significantly different from the positive control at all tested sample concentrations. The result of this study can be used as a guideline for fermented soybean meal research in immune stimulation for further development as a health supplement or as an added economic value.

Keywords: Fermented soybean meal, *Bacillus subtilis*, Phagocytic activity, Peptides

บทนำ

ปัจจุบันการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลืองมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสู่ความยั่งยืนส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักเพิ่มขึ้น เช่น น้ำมันถั่วเหลือง นมถั่วเหลือง เต้าหู้ ฯลฯ ถั่วเหลืองถือเป็นแหล่งของโปรตีนคุณภาพสูงเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 36-56 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (Wen *et al.*, 2022) มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในสัดส่วนที่เหมาะสม ไขมัน 20 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 35 เปอร์เซ็นต์ แร่ธาตุ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 10 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดไขมัน วิตามิน ฟลาโวนอยด์ ไอโซฟลาโวน กรดฟีนอล และซาโปนิน (Medic, 2014) ดังนั้นกากถั่วเหลืองที่เหลือจากการผลิตอาหารจึงเป็นวัตถุดิบราคาถูกที่หาได้ง่ายและมีคุณค่าทางอาหารสูง

คุณสมบัติทางชีวภาพของเปปไทด์ที่ผลิตจากโปรตีนถั่วเหลืองนั้นมีความโดดเด่น ซึ่งเปปไทด์เป็นสารอาหารที่จำเป็นที่เกิดจากการย่อยของโปรตีนด้วยเอนไซม์หรือจากการหมักด้วยจุลินทรีย์ให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง มีความปลอดภัยและคุณสมบัติประโยชน์หลากหลาย สามารถควบคุมการทำงานของสรีรวิทยาหรือป้องกันโรคความเสื่อมเรื้อรัง (Chatterjee *et al.*, 2018) ช่วยลดความดันโลหิต ภาวะไฮโปโคเลสเตอรอลเลมิก ต้านอนุมูลอิสระ ต้านโรคอ้วน ต้านเบาหวาน ต้านมะเร็ง (Singh *et al.*, 2022) การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในการทำหน้าที่ควบคุมระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบภูมิคุ้มกัน การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ที่เปลี่ยน angiotensin I ไปเป็น angiotensin II ซึ่งเป็นสาเหตุของการเป็นโรคความดันโลหิตสูง (Korhonen and Pihlanto, 2006; Escudero *et al.*, 2012; Castellano *et al.*, 2013) นอกจากนี้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในโดจากข้าวสาลีที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติก (Coda *et al.*, 2012) เป็นต้น จากการศึกษาโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ พบว่าเพิ่มความสามารถของเซลล์ RAW264.7 ในการเกิดพินโซไซโทซิส (pinocytosis) และการสร้างไนตริกออกไซด์ Interleukin-6 (IL-6) และ TNF- α (Wen *et al.*, 2022) นอกจากนี้มีรายงานการหมักกากถั่วเหลืองด้วยจุลินทรีย์ผสม 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* *Lactobacillus casei* และ *Hansenula anomala* พบว่าช่วยลดอาการท้องเสียในลูกสุกรได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (Yuan *et al.*, 2017) เปปไทด์ที่ได้จากถั่วเหลืองมีคุณสมบัติในการปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ YPFVW MITLAIPVKNKPGR MITLAIPVN HCGAPA และ GAPA (Chatterjee *et al.*, 2018; Yoshikawa, 2015) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวของเปปไทด์จะมีผลดีโดยรวมต่อการทำงานของร่างกายและสุขภาพของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณสมบัติด้านองค์ประกอบของเปปไทด์และกลไกที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันยังมีปริมาณจำกัด

คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ได้เปปไทด์ เพราะเป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนคุณภาพสูงและมีกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ อีกทั้งเป็นการนำเอาผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันพืชภายในประเทศมาใช้ประโยชน์ในการเพิ่มมูลค่าด้านอาหารเสริมสุขภาพ โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันในการกระตุ้นการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวหรือการเกิดกิจกรรมฟาโกไซติกของเปปไทด์ที่ได้จากการหมักกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR

2664 ที่แยกได้จากถั่วเน่าและมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส รวมถึงการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์และชนิดของโปรตีน พร้อมการทำนายคุณสมบัติทางชีวภาพเพื่อใช้เป็นข้อมูลที่จะเป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากเปปไทด์สำหรับปรับปรุงคุณภาพของอาหารสัตว์หรืออาหารเสริมสุขภาพต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบในกากถั่วเหลืองที่ได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันพืช

ได้รับการสนับสนุนกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบจากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ทำการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีตามมาตรฐาน American oil chemists' society โดยวิเคราะห์ความชื้น (moisture) ด้วยวิธี moisture and volatile matter forced draft oven method (AOCS Ba 2a-38) วิเคราะห์ปริมาณไขมัน (oil content) ด้วยวิธี moisture and volatile matter in cottonseed (AOCS Ba 3-38) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหยาบ (crude protein) ด้วยวิธี AOA 945.01 วิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย (crude fiber) ด้วยวิธี AOCs official method Ba 6-84 และวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ash) ด้วยวิธี AOCs official method Ba 5a-49

2. การเตรียมตัวอย่างกากถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664

โดยนำกากถั่วเหลืองผสมด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที (Zhang *et al.*, 2020) เติมหิวเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $\log 6$ โคโลนีต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำตัวอย่างไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) และปั่นละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรง 60 เมช (mesh) จากนั้นนำไปละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ได้ 9.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000g เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 4.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000g เป็นเวลา 10 นาที และปรับให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 นำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง ละลายด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ก่อนนำไปทดสอบในขั้นต่อไป และทำการศึกษาขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) ในระบบ tris/tricine buffer system ด้วย 16 เปอร์เซ็นต์ เจลส่วนล่าง (resolving gel)

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบเปปไทด์และโปรตีนของกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664

โดยวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างด้วยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้เซรัมอัลบูมินจากวัว (bovine serum albumin) เป็นสารละลายมาตรฐาน จากนั้นละลายตัวอย่างด้วย 2x tricine sample buffer แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (Tachapuriyanya *et al.*, 2021) เก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเปปไทด์และโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในระบบ tris/tricine buffer system ด้วย 12 เปอร์เซ็นต์ เจลส่วนล่าง และ 4 เปอร์เซ็นต์ เจลส่วนบน (stacking gel) จากนั้นย้อม SDS polyacrylamide gel ด้วยสีคูมาซีบลู (coomassie brilliant blue g) บนเครื่องเขย่าข้ามคืน ก่อนล้างสีย้อมด้วยน้ำยา

destain บันทึกลับภาพเจล ก่อนเก็บรักษาในน้ำกลั่น ย้อมสีที่ส่องด้วยสีย้อมซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) โดยแช่เจลในน้ำยาสีฟiksative solution เป็นเวลา 60 นาที ก่อนแช่เจลในน้ำกลั่น ซ้ำอีกครั้ง แล้วล้างเจลด้วย 0.02 เปอร์เซนต์โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) และตามด้วยน้ำกลั่น จากนั้นบ่มเจลในสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ซิลเวอร์ไนเตรท เป็นเวลา 20 นาที ล้างเจลในน้ำกลั่น แล้วแช่ใน 3 เปอร์เซนต์โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) จนแถบโปรตีนปรากฏ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 5 เปอร์เซนต์กรดน้ำส้ม (acetic acid) ทำการถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจลเพื่อเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนและเปปไทด์

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนและเปปไทด์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) โดยใช้วิธี 1D-SDS-PAGE ให้ตัวอย่างโปรตีนเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นของเจลส่วนล่างเพียง 0.5-1.0 เซนติเมตร จากนั้นย้อมเจลด้วยสีค้อมาซีบลู และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยา destain แล้วทำการตัดแถบโปรตีนออกจากแผ่นเจล และเตรียมตัวอย่างเปปไทด์จากชั้นเจลที่ได้ด้วยเทคนิคการย่อยโปรตีนในเจลด้วยเอนไซม์ทริปซิน (in-gel trypsin digestion) เพื่อให้ได้สารละลายเปปไทด์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย LC-Q-TOF-MS/MS แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูล MS/MS ion spectrum ที่ได้ด้วยโปรแกรม MASCOT โดยกำหนดพารามิเตอร์ enzyme = trypsin; fixed modifications = carbamidomethyl; variable modifications = oxidation; mass values = monoisotopic; protein mass = unrestricted; peptide mass tolerance = + 1.2 Da; fragment mass tolerance = + 0.6 Da; max missed cleavage = 1 รวมข้อมูลเปปไทด์ที่มีค่าไอออน (ions scores) มากกว่า 39 และโปรตีนที่ระบุชนิดได้ เพื่อเปรียบเทียบเปปไทด์และโปรตีนจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ ทำนายคุณสมบัติของเปปไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรมทำนายทางชีวสารสนเทศซึ่งพัฒนาโดย Tachapuripunya *et al.* (2021) โปรแกรมทำนายนี้ให้หลักการของการเรียนรู้ของเครื่อง (machine learning) เป็นการเรียนรู้ของโปรแกรมด้วยตัวเอง โดยพัฒนาด้วยโปรแกรม R ใช้อัลกอริทึมในการทำนายหรือจำแนกประเภทข้อมูล โดยใช้การคำนวณ KNN (k-nearest neighbors:) และ random forest algorithms ด้วยข้อมูลเปปไทด์จากฐานข้อมูลเปปไทด์ที่ทราบคุณสมบัติทางชีวภาพจากการทดลองที่มีการเผยแพร่มาก่อน คณะผู้วิจัยนำเปปไทด์เหล่านี้แบ่งเป็นชุดข้อมูลการฝึก (training data) และชุดข้อมูลการทดสอบ (testing data) โดยชุดข้อมูลการฝึกจะใช้ในการพัฒนาโมเดลเพื่อทำนายเปปไทด์แต่ละคุณสมบัติ จากนั้นนำโมเดลการทำนายที่ได้มาทดสอบกับชุดข้อมูลการทดสอบ เพื่อประเมินประสิทธิภาพและความแม่นยำของการทำนาย แล้วนำโปรแกรมที่ได้นี้มาใช้ในการทำนายกับเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยจากถั่วเหลือง

4. การทดสอบคุณสมบัติการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของตัวอย่างในระดับเซลล์

ทำการเจือจางตัวอย่างทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 5 ระดับ เริ่มจากระดับความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถละลายได้ดี สำหรับตัวอย่างนี้ คือ 50 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก แล้วทำการเจือจางต่อไปครั้งละ 2 เท่า คือ 50.00 25.00 12.50 6.25 3.13 และ 0.00 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และระดับความเข้มข้นที่มีความปลอดภัย โดยทำให้เซลล์มีชีวิตรอดมากกว่า 70 เปอร์เซนต์ ขึ้นไป จะถูกนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันจากการกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมฟาโกไซติกต่อไป ซึ่งการเกิดกิจกรรมฟาโกไซติกนี้เซลล์จะมีการปลดปล่อยสารไนตริกออกไซด์ออกมาด้วย ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่มากขึ้นจะส่งผลให้เกิดการจับกิน

สิ่งแปลกปลอมของเซลล์มาโครฟาจมากขึ้น (Zhang *et al.*, 2019) ทั้งนี้ทุกการทดสอบทำการทดลอง 4 ซ้ำ ในทุกระดับความเข้มข้น

4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (International Standard (ISO 10993-5), 2009)

ทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด RAW264.7 (mouse macrophage cell line, ATCC® TIB-71™) ที่ความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ประเมินผลการทดสอบเชิงปริมาณโดยใช้สีของสาร MTT (3-[4, 5-dimethylthiazolyl-2]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) การทดสอบตรวจวัดการมีชีวิตของเซลล์ แล้ววัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร สารตัวอย่างทดสอบที่สัมผัสกับเซลล์แล้วทำให้เซลล์ตายและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์กับสารควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์) จะจัดสารตัวอย่างทดสอบนั้นว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ เลือกความเข้มข้นที่ปลอดภัยนำไปศึกษาต่อ

4.2 การทดสอบปริมาณไนตริกออกไซด์ (Zhang *et al.*, 2019)

โดยเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง RAW264.7 ให้มีความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารชนิด DMEM (dulbecco's modified eagle medium) ที่มีสารละลายตัวอย่างทดสอบที่ผสมกับสารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (สารควบคุมเชิงบวก คือ สาร LPS ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารควบคุมเชิงลบ คือ ใช้สารละลายไดโคลฟีแนค (diclofenac) 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ LPS แทนตัวอย่าง) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์ ด้วยชุดทดสอบ Griess reagent kit วิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ (nitrite) โดยนำสารละลายซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) และ NED (N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-30 นาที ใส่สารมาตรฐานไนไตรท์ในความเข้มข้นต่าง ๆ ช่วง 0-100 ไมโครโมล หลุมละ 50 ไมโครลิตร (3 หลุม) ดูดสารละลายซัลฟานิลาไมด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ทุกหลุม บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที ดูด NED ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ทุกหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที ในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยวัดภายใน 30 นาที หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้แทนแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแทนแกน x นำมาทำกราฟสารละลายมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณไนตริกออกไซด์

4.3 การทดสอบการเกิดกิจกรรมฟาโกไซติก (Zhang *et al.*, 2019)

ทำการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง RAW264.7 ให้มีความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยง 24 หลุม เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารชนิด DMEM ที่มีสารละลายของตัวอย่างทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (สารควบคุมเชิงบวก คือ เบต้ากลูแคน (β -glucan) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารควบคุมเชิงลบ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์) จากนั้นบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมสารละลายนิวทรัลเรด (neutral red) (ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์) 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายนิวทรัลเรดออก แล้วล้างด้วยน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline: PBS) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4

เติมสารละลาย destain แล้ววางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมฟาโกไซติกจากสมการ (1)

$$\text{เปอร์เซ็นต์กิจกรรมฟาโกไซติก} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของสารควบคุมเชิงลบ}} \times 100 \quad (1)$$

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยโปรแกรม SPSS version 15.0 (SPSS Inc., 2008) วิเคราะห์ความแปรปรวน one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 4 ซ้ำ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

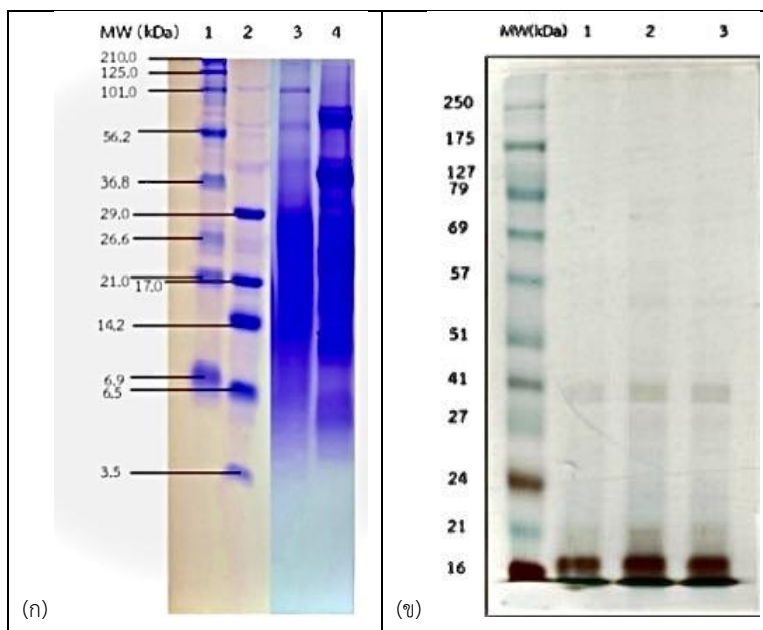
ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารในกากถั่วเหลืองและการเจริญของแบคทีเรียในการเตรียมกากถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664

การศึกษาค่าองค์ประกอบของสารอาหารในกากถั่วเหลืองที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ พบว่ามีปริมาณโปรตีน 44.65 เปอร์เซ็นต์ น้ำมัน 1.28 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 12.08 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 6.40 เปอร์เซ็นต์ และใยอาหาร 5.54 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 ตามสภาวะที่กำหนด พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตที่มีปริมาณ 10.88 ลอการิทึมฐานสิบ ($\log_{10}$) ของโคโลนีต่อกรัม มีปริมาณของเปปไทด์ที่มีขนาดต่ำกว่า 3 กิโลดาลตันเพิ่มขึ้น 3.5 เท่า และในปริมาณโปรตีนที่เท่ากันจะมีสัดส่วนของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ลดลงเมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก ดังภาพที่ 1

2. ผลการศึกษานาฬิกาของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างกากถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664

การศึกษาลักษณะโปรไฟล์โปรตีนของตัวอย่างควบคุมซึ่งเป็นกากถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแต่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 8.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 13.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนที่ได้จากการย่อยด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 ดังภาพที่ 1 (ก) เลน 3 พบว่าขนาดของโปรตีนที่ถูกย่อยไปจะอยู่ในช่วง 30-100 กิโลดาลตัน (kDa) และส่วนใหญ่จะมีขนาดอยู่ในช่วง 5-29 กิโลดาลตัน เมื่อเทียบกับในตัวอย่างควบคุม ดังภาพที่ 1 (ก) เลน 4



ภาพที่ 1 รูปแบบของขนาดโปรตีนในกากถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 (ก) SDS-PAGE ในระบบ tris-tricine 16.5 เปอร์เซ็นต์เจล กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 45 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 10:30 ชั่วโมง โดยเลนที่ 1 และ 2 คือ โปรตีนมาตรฐานขนาดต่าง ๆ เลนที่ 3 คือ เปปไทด์จากกากถั่วเหลืองหมัก และเลนที่ 4 คือ กากถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแต่ไม่ได้เติมเชื้อแบคทีเรีย

(ข) SDS-PAGE ในระบบ tris-tricine 12.0 เปอร์เซ็นต์เจล ที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรทของ กากถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR2664 เพื่อใช้ศึกษาต่อยด้วย LC-Q-TOF-MS/MS โดยเลนที่ 1-3 คือ ตัวอย่างเปปไทด์จากกากถั่วเหลืองหมัก จำนวน 3 ซ้ำ

3. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของเปปไทด์และโปรตีนของกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 ด้วย LC-Q-TOF-MS/MS และการทำนายชีวสารสนเทศ

จากการวิเคราะห์แมสสเปกโตรเมตรีของตัวอย่างกากถั่วเหลืองหมัก พบจำนวนของเปปไทด์ 8,981 ชนิด เมื่อทำการเปรียบเทียบเปปไทด์ทั้งหมดด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ จากลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์สามารถระบุชนิดได้ดังตารางที่ 1 และเมื่อทำนายคุณสมบัติทางชีวภาพของเปปไทด์ที่ได้ พบว่ามีคุณสมบัติที่ทำนายได้จำนวน 10 คุณสมบัติ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านเชื้อรา ลดความดันโลหิต ต้านจุลชีพ ต้านปรสิต ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส กระบวนการสื่อสารระหว่างเซลล์ การนำส่งยา และการจับจำเพาะกับเซลล์มะเร็ง ซึ่งเปปไทด์ที่มีจำนวนมากที่สุดมีคุณสมบัติลดความดันโลหิต (antihypertensive) ซึ่งผลนี้จะมีประโยชน์ต่อการพิจารณาวางแผนการนำเปปไทด์จากกากถั่วเหลืองไปทดลองทางห้องปฏิบัติการเพื่อนำสู่การใช้ประโยชน์ต่อไป

ตารางที่ 1 ข้อมูลชนิดและลำดับของกรดอะมิโนในตัวอย่างกากั่วเหลืองที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 พร้อมการทำนายคุณสมบัติทางชีวภาพ ด้วยโปรแกรมทำนายทางชีวสารสนเทศ (Tachapuripunya *et al.*, 2021)

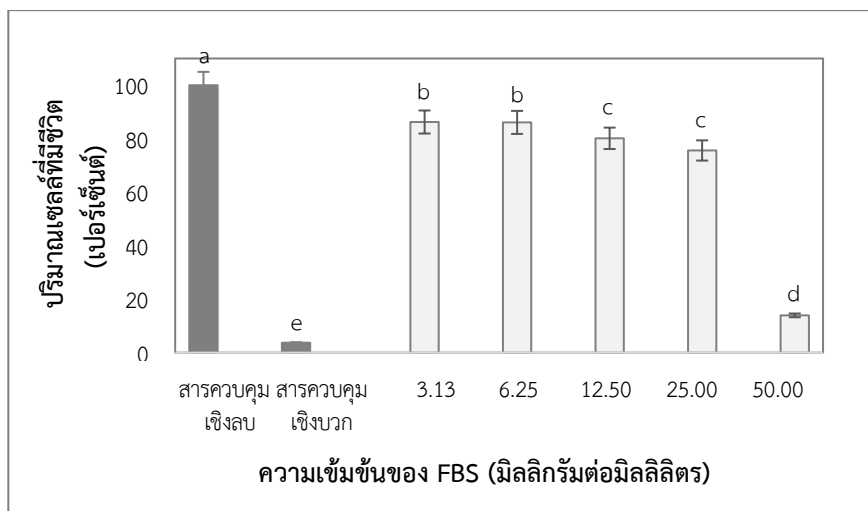
ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ลำดับกรดอะมิโน	ชนิดของโปรตีน
anticancer	RCPLTVVQSRN (1058.79 Da)	trypsin inhibitor protein
	RVVEIPGKG (742.60 Da)	SET domain-containing protein
	RCPLTVVQSRN (1058.79 Da)	uncharacterized protein
antifungi	KALANNTANGHATGASSAAKARA (2041.38 Da)	TLC domain-containing protein
antihypertensive	RLNGTAVNDDKV (1044.77 Da)	polyadenylate-binding protein
	KCAHLPSLPKTSTRT (1307.95 Da)	MADS-box domain-containing protein
	KTAaipGTGDDKV (1044.80 Da)	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein
	KLHDSGEYDKTYEKW (1585.38 Da)	transporter substrate-binding domain-containing protein
	KDIHSGPALHSEIISK (1602.41 Da)	Fe2OG dioxygenase domain-containing protein
	KDAMDGWFRL (1012.25 Da)	trypsin inhibitor protein
	RCPLTVVQSRN (1058.79 Da)	trypsin inhibitor protein
	REQDQMCAVMTMDGIIDTVSAVHPLVPLIGLLK	PKS_ER domain-containing protein
	PHGKL (3971.32 Da)	protein
	KLDHSPAQFEPAINRS (1578.30 Da)	alpha-mannosidase
	RGTSWASSILPSSNPPKS (1629.42 Da)	alpha-mannosidase
	RYINVEEAQFRNYQMLFDYINSNPSLNAAEAKF (3780.77 Da)	alpha-mannosidase
	KAVAAEEARL (814.50 Da)	ribosome biogenesis protein NOP53
	KPISLAASGKQ (814.73 Da)	ribosome biogenesis protein NOP53
	KLLHGLSYLHGVRHLVHRD (2005.32 Da)	uncharacterized protein
	KHLSDGMRDSCPLRK (1673.45 Da)	protein kinase domain-containing protein
	RYHSHYILDTGDVIPMEIVDKV (2359.56 Da)	protein kinase domain-containing protein
	KPAVAEWIQLQNHDPDCSWYIFELLETIRDRM (3655.57 Da)	protein kinase domain-containing protein
	RVVEIPGKG (742.60 Da)	SET domain-containing protein
	KSSSQSFRV (796.63 Da)	patatin
	RLAVATEPRV (855.71 Da)	patatin
	RPLLDFRAMAELRV (1447.20 Da)	patatin
	KEMCAEDGDLMIDSAVKNVPKV (2351.79 Da)	patatin
	KDAMDGWFRL (1012.23 Da)	uncharacterized protein
	RCPLTVVQSRN (1058.79 Da)	uncharacterized protein

ตารางที่ 1 (ต่อ)

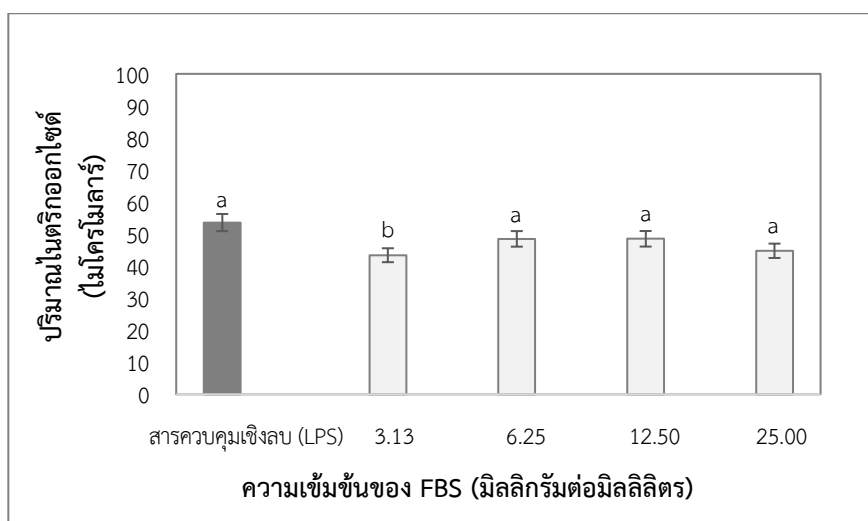
ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ลำดับกรดอะมิโน	ชนิดของโปรตีน
	RLERVSDDEFNNYKL (1629.41 Da)	uncharacterized protein
	KTTFWATMQSFSGTWKGPDLGDTGPTEYSRP (3341.63 Da)	glucan 1,3-beta-glucosidase
antimicrobe	KALANNTANGHATGASSSAAKARA (2041.38 Da)	TLC domain-containing protein
antiparasite	KDAMDGWFL (1012.23 Da)	trypsin inhibitor protein
	RCPLTVVQSRN (1058.80 Da)	trypsin inhibitor protein
	RVVEIPGKG (742.60 Da)	SET domain-containing protein
	KSSSQSFRV (796.63 Da)	patatin
	RPLLDFRAMAELRV (1447.20 Da)	patatin
	KDAMDGWFL (1012.23 Da)	uncharacterized protein
	RCPLTVVQSRN (1058.79 Da)	uncharacterized protein
antiinflammatory	KSSSQSFRV (796.63 Da)	patatin
	RLAVATEPRV (855.71 Da)	patatin
antivirus	RLNGTAVNDDKV (1044.77 Da)	polyadenylate-binding protein
	RYINVEEAEAQFRNYQMLFDYINSNPSLNAEAKF (3780.77 Da)	alpha-mannosidase
	KALANNTANGHATGASSSAAKARA (2041.38 Da)	TLC domain-containing protein
	KRMGTFFHEQFIVEPTSLIGCEPTSLIGCYTIVKQ (3697.71 Da)	uncharacterized protein
cell communicating	KDAMDGWFL (1012.23 Da)	trypsin inhibitor protein
drug delivering	RYHSHYILDTGDVIPMEIVDKV (2359.56 Da)	protein kinase domain-containing protein
tumor homing	RYHSHYILDTGDVIPMEIVDKV (2359.56 Da)	protein kinase domain-containing protein

4. การทดสอบความเป็นพิษ ฤทธิ์ในการกระตุ้นกิจกรรมฟาโกไซติก และการสร้างไนตริกออกไซด์ของตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664

การทดสอบความเป็นพิษของกากถั่วเหลืองหมักที่มีต่อเซลล์ RAW264.7 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 0-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 3.13-25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ในช่วง 75.61 ± 2.03 - 86.25 ± 2.05 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 3 ซึ่งการที่เซลล์มีชีวิตรอดอยู่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป เป็นเกณฑ์ที่ยอมรับว่าสารนั้นในระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบมีความปลอดภัย สามารถนำไปใช้ทดสอบในขั้นต่อไปได้



ภาพที่ 3 ผลของกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 (FBS) ที่มีต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW264.7 โดยตัวอักษรเหนือแท่งกราฟที่แตกต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

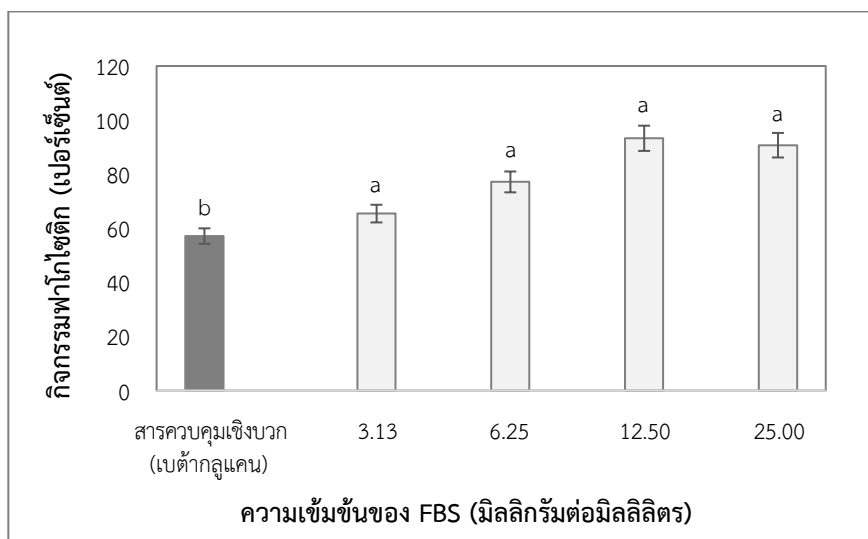


ภาพที่ 4 การสร้างไนโตรเจนออกไซด์ของกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 (FSB) ทดสอบในเซลล์ RAW264.7 โดยตัวอักษรเหนือแท่งกราฟที่แตกต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารควบคุมเชิงบวก (LPS)

การวิเคราะห์ปริมาณการสร้างไนโตรเจนออกไซด์ของตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 ที่ระดับความเข้มข้น 0.00-25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการสร้างไนโตรเจนออกไซด์ในช่วง 43.41 ± 0.99 - 48.53 ± 0.35 ไมโครโมลาร์ โดยที่ความเข้มข้น 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนโตรเจนออกไซด์ 43.41 ± 0.99 ไมโครโมลาร์ เป็นปริมาณ

ที่ต่ำกว่าสารควบคุมเชิงบวกไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลิตในตริกออกไซด์ 53.60 ± 3.49 ไมโครโมลาร์ ดังภาพที่ 4 และเมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างกากถั่วเหลืองหมักสูงขึ้นเป็น 6.25-25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้การสร้างไนตริกออกไซด์สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย อยู่ในช่วง 44.79 ± 1.49 - 48.53 ± 0.35 ไมโครโมลาร์ โดยปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น มีค่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสารควบคุมเชิงบวก LPS แต่สูงกว่าสารควบคุมเชิงลบ สารละลายไดโคลฟีแนค ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งสารละลายไดโคลฟีแนคกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ที่ 32.06 ± 2.52 ไมโครโมลาร์

การวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดกิจกรรมฟาโกไซติก พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 ที่ทำการทดสอบมีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมฟาโกไซติกได้ 65.43 ± 1.24 - 93.27 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมฟาโกไซติก 65.43 ± 1.24 เปอร์เซ็นต์ โดยในช่วงความเข้มข้นจาก 3.13 ถึง 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การเกิดกิจกรรมฟาโกไซติกสูงขึ้นอย่างมีความสัมพันธ์แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และทุกระดับความเข้มข้นของตัวอย่างมีผลให้เกิดกิจกรรมฟาโกไซติกสูงกว่าสารควบคุมเชิงบวกเบต้ากลูแคนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังภาพที่ 5 และที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมฟาโกไซติกสูงสุดเท่ากับ 93.27 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นพบว่าไม่มีผลให้เกิดกิจกรรมฟาโกไซติกสูงขึ้น แสดงให้เห็นแนวโน้มว่าสารในช่วงความเข้มข้นต่ำจึงจะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน



ภาพที่ 5 การเกิดกิจกรรมฟาโกไซติกของตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 (FSB) ในเซลล์ RAW264.7 โดยตัวอักษรเหนือแท่งกราฟที่แตกต่างกัน หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับสารควบคุมเชิงบวก

การอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและชนิดของโปรตีนด้วย LC-Q-TOF-MS/MS พบว่า ในกากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 มีส่วนประกอบของเปปไทด์จำนวน $8,981 \pm 30.32$ ชนิด สอดคล้องกับข้อมูลของโปรตีนจากถั่วเหลือง *Glycine max* ที่มีข้อมูลในฐานข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (NCBI) และการทำนายทางชีวสารสนเทศพบเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพแตกต่างกันถึง 10 คุณสมบัติที่มีผลในการช่วยส่งเสริมต่อสุขภาพ โดยเฉพาะเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติลดความดันโลหิตในปริมาณสูงกว่าคุณสมบัติอื่น ๆ โดยเปปไทด์ดังกล่าวอาจส่งผลต่อการรักษาคุณภาพของเหลวของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นสูงดังภาพที่ 3 สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Karaki *et al.* (1990) ที่พบว่าเปปไทด์จากการย่อยโปรตีนเคซีนที่ความเข้มข้นต่ำ (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สามารถลดความดันโลหิตสูงในหนูทดลองได้ ผ่านการควบคุม RAS (ranin-angiotensin system) เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติลดความดันโลหิตเหล่านี้ยังอาจมีส่วนในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ด้วย สอดคล้องกับผลการทดลองดังภาพที่ 4 และรายงานการศึกษาของ Majumder and Wu (2014) อีกทั้งการทำนายถึงคุณสมบัติทางชีวภาพอื่น ๆ แสดงให้เห็นถึงโอกาสในการวิจัยเพื่อนำผลิตผลจากการย่อยกากถั่วเหลืองไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพด้านต่าง ๆ ได้มากยิ่งขึ้น เช่น การต้านจุลชีพหรือการต้านมะเร็ง นอกจากนี้เปปไทด์ที่ช่วยต้านการอักเสบอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในกลไกของกิจกรรมฟาโกไซติกที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 5 สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Möller *et al.* (2008) ที่รายงานว่าเปปไทด์บางชนิด เช่น แลคโตเฟอริน (lactoferrin) และ tuftsin สามารถเพิ่มกิจกรรมฟาโกไซติกของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ดังนั้นผลข้างต้นบ่งชี้ถึงความจำเป็นของการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบและยืนยันคุณสมบัติของเปปไทด์เหล่านี้และการศึกษาเชิงลึกต่อไปถึงกลไกการทำงานของเปปไทด์หรือกลุ่มเปปไทด์ที่สนใจ อีกทั้งข้อมูลคุณสมบัติของเปปไทด์ที่ทำนายได้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาสูตรผสมของเปปไทด์เหล่านี้ให้มีคุณสมบัติตามต้องการ เช่น การแยกเป็นเปปไทด์ชนิดเดียวบริสุทธิ์หรือสูตรผสมจากเปปไทด์มากกว่าหนึ่งชนิดที่ทำงานร่วมกันหรือเสริมกัน เป็นต้น

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวหรือกิจกรรมฟาโกไซติกของกากถั่วเหลืองหมัก พบว่าที่ความเข้มข้น 3.13-12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดกิจกรรมฟาโกไซติกมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองหมักสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นที่ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้เกิดกิจกรรมฟาโกไซติกได้ในปริมาณสูงสุด และมีปริมาณลดลงเล็กน้อยที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเปปไทด์ในกากถั่วเหลืองหมักจะช่วยเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 เกิดกระบวนการฟีนอลิซิส ซึ่งเป็นการนำสารโมเลกุลใหญ่ในรูปสารละลายเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้นและกระตุ้นให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ได้มากขึ้น (Wen *et al.*, 2022) ด้วยกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมผ่านกระบวนการฟาโกไซโทซิส ซึ่งจะมีการปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ออกมาด้วย แต่งานวิจัยนี้พบว่าปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์ไม่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองหมักที่สูงขึ้น ผลที่แตกต่างกันนี้อาจบ่งชี้ถึงกลไกการทำงานที่แตกต่างกันของเปปไทด์แต่ละชนิดที่ได้จากการย่อย แต่อย่างไรก็ตามผลนี้แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ในกากถั่วเหลืองหมักที่ความเข้มข้นในช่วงต่ำกว่า 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immune stimulation) แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นกิจกรรมฟาโกไซติกและการสร้างไนตริกออกไซด์ค่อนข้างคงที่ บ่งชี้ว่าสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ระดับสูงขึ้นไปมีแนวโน้มที่มี

สัดส่วนของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ร่วมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2020)

สรุปผลการวิจัย

กากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันพืชเมื่อนำมาหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากถั่วเน่าและมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ช่วยทำให้โปรตีนขนาดเล็กมีปริมาณเพิ่มขึ้น และเมื่อศึกษาองค์ประกอบของเปปไทด์และการทำนายผลคุณสมบัติทางชีวภาพพบว่า มีเปปไทด์ 8,981 ชนิด และมีคุณสมบัติทางชีวภาพแตกต่างกัน 10 คุณสมบัติ คือ ด้านมะเร็ง ด้านเชื้อรา ลดความดันโลหิต ด้านจุลชีพ ด้านปรสิต ด้านการอักเสบ ด้านไวรัส กระบวนการสื่อสารระหว่างเซลล์ การนำส่งยา และการจับจำเพาะกับเซลล์มะเร็ง โดยกากถั่วเหลืองหมักที่ความเข้มข้น 0-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความปลอดภัย มีเปปไทด์ที่ส่งเสริมกิจกรรมฟาโกไซติกของเซลล์มาโครฟาจ RAW264.7 ได้ดี โดยที่ความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นให้เกิดกิจกรรมฟาโกไซติกได้ 93.27 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างไนตริกออกไซด์ 48.53 ± 0.35 ไมโครโมลาร์ จากคุณสมบัตินี้และผลการทำนายทางชีวภาพบ่งชี้ว่ากากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 2664 มีส่วนประกอบของเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน สามารถวิจัยต่อเพื่อการพัฒนาไปใช้เป็นสารเสริมสุขภาพ และเพื่อการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจจากของเหลือในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมอาหาร

ข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษานี้จะสามารถวิจัยต่อยอดเพื่อนำความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพและทรัพยากรทางชีวภาพภายในประเทศมาใช้ให้เกิดการเพิ่มมูลค่าและการพัฒนาสารเสริมสุขภาพ โดยเฉพาะการทดสอบคุณสมบัติเพิ่มเติมด้านการลดความดัน ที่ได้จากผลการทำนายชีวสารสนเทศที่พบว่า มีเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติด้านนี้ในปริมาณสูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ธีรศักดิ์ เอโกบล ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำเป็นอย่างดี ขอขอบคุณผู้ร่วมงานทุกท่านที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- Castellano, P., Aristoy, M.C., Sentandreu, M.A., Vignolo, G. and Toldrá, F. (2013). Peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity generated from porcine skeletal muscle proteins by the action of meat-borne *Lactobacillus*. *Journal of Proteomics*, 89, 183-190, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2013.06.023>.
- Chatterjee, C., Gleddie, S. and Xiao, C.W. (2018). Soybean bioactive peptides and their functional properties. *Nutrients*, 10(9), doi: <https://doi.org/10.3390/nu10091211>.

- Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D. and Gobbetti, M. (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1087-1096, doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.06837-11>.
- Escudero, E., Aristoy, M.C., Nishimura, H., Arihara, K. and Toldrá, F. (2012). Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science*, 91(3), 306-311, doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.008>.
- International Standard (ISO 10993-5). (2009). *Biological evaluation of medical devices-part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva: International Organization for Standardization.
- Karaki, H., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U. and Takemoto, S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 96(2), 367-371, doi: [https://doi.org/10.1016/-8413\(90\)90023-3](https://doi.org/10.1016/-8413(90)90023-3).
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960, doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Majumder, K. and Wu, J. (2014). Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 256-283, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms16010256>.
- Medic, J., Atkinson, C. and Hurburgh, C.R. (2014). Current knowledge in soybean composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(3), 363-384, doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2407-9>.
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. and Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182, doi: <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>.
- Singh, B.P., Aluko, R.E., Hati, S. and Solanki, D. (2022). Bioactive peptides in the management of lifestyle-related diseases: Current trends and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(17), 4593-4606, doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1877109>.

- Tachapuripunya, V., Roytrakul, S., Chumnannpuen, P. and E-kobon, T. (2021). Unveiling putative functions of mucus proteins and their tryptic peptides in seven gastropod species using comparative proteomics and machine learning-based bioinformatics predictions. *Molecule*, 26(11), doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26113475>.
- Wen, L., Bi, H., Zhou, X., Zhu, H., Jiang, Y., Ramadan, N.S. and Yang, B. (2022). Structure and activity of bioactive peptides produced from soybean proteins by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry Advances*, 1, doi: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100089>.
- Yoshikawa, M. (2015). Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides*, 72, 208-225, doi: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.013>.
- Yuan, L., Chang, J., Yin, Q., Lu, M., Di, Y., Wang, P. and Lu, F. (2017). Fermented soybean meal improves the growth performance, nutrient digestibility, and microbial flora in piglets. *Animal Nutrition*, 3(1), 19-24, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.11.003>.
- Zhang, Y., Chen, S., Zong, X., Wang, C., Shi, C., Wang, F. and Lu, Z. (2020). Peptides derived from fermented soybean meal suppresses intestinal inflammation and enhances epithelial barrier function in piglets. *Food and Agricultural Immunology*, 31(1), 120-135, doi: <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1705766>.
- Zhang, Z., Hu, X., Lin, L., Ding, G. and Yu, F. (2019). Immunomodulatory activity of low molecular-weight peptides from *Nibea japonica* in RAW264.7 cells via NF- κ B pathway. *Marine Drugs*, 17(7), doi: <https://doi.org/10.3390/md17070404>.