Published Online: 9 SEP 2024

ผลของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ

The Effect of Edible Bird's Nest Protein Hydrolysate Extract on Nitric Oxide Inhibition in Macrophage

พิราภรณ์ ทองอ่อน

อีเมล: 6352003269@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์

อีเมล: karnt.won@mfu.ac.th

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

รังนกถือเป็นวัตถุดิบที่สร้างมูลค่ามากมายในการส่งออกของประเทศ และรังนกต้มหรือตุ๋นมีการบริโภคตามความเชื่อมายาวนานว่ามีส่วนช่วยเสริมสร้างสุขภาพที่ดีต่อร่างกาย จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ การนำรังนกที่ผ่านขบวนการสกัดด้วยวิธีไฮโดรไลเซตด้วยน้ำเพื่อให้ได้โมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดเล็ก และให้สารสำคัญในกลุ่มไซอะลิกแอซิด จะช่วยเพิ่มคุณค่าและประโยชน์ต่อการบริโภคที่มากขึ้น โดยการศึกษานี้ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต มีค่า IC50 ของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตอยู่ที่ 2,602 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยดูการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW264.7) เมื่อบ่มด้วยสาร LPS ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 10, 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW264.7) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$; Mann-Whitney U test) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารสกัดดังกล่าว และที่ความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ 15.3, 28.0, 52.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และมีแนวโน้มของการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นแปรไปตามขนาดของความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต

คำสำคัญ: รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต, ไซอะลิแอซิด, ไนตริกออกไซด์, การต้านการอักเสบ, ทดสอบความเป็นพิษ

Abstract

Bird's nest is considered a raw material that creates a lot of value in the country's exports. Boiled or stewed bird's nests have long been consumed according to the belief that they help promote good health for the body. Therefore, it is the origin of this study. Using bird's nest that has been extracted using a hydrolysate method with water to obtain small protein molecules and provides important substances in the sialic acid group It will add value and benefit to increased consumption. This study tested the toxicity of bird's nest protein hydrolysate extract. The IC50 value of bird's nest protein hydrolysate extract was 2,602. micrograms per milliliter. We study the anti-inflammatory effect by inhibition of nitric oxide of macrophage cells (RAW264.7) when incubated with LPS at a concentration of 0.1 micrograms per milliliter. It was found that bird's nest protein hydrolysate at concentrations of 10, 20, and 100 micrograms per milliliter could inhibit the production of nitric oxide by macrophage cells (RAW264.7) as significantly ($p<0.01$; Mann-Whitney U test) compared to samples that did not receive the extract. where the concentration of bird's nest protein hydrolysate was 10, 20, 100 micrograms per milliliter. The nitric oxide inhibition values were 15.3, 28.0, 52.3 micromolar, respectively, and the trend of inhibiting nitric oxide production increased depending on the concentration of bird's nest protein hydrolysate.

Keywords: Bird's Nest Protein Hydrolysate, Sialic Acid, Nitric Oxide, Anti-Inflammatory, MTT Assay

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

Edible bird's nest (EBN) รังนกได้จากสารคัดหลั่งจากต่อมน้ำลาย (salivary glands) ของนกอีแอ่น หรือ นกแอ่นกินรังที่สามารถนำมาบริโภคได้ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Collocalia germani* หรือ *Aerodramus fuciphagus* หรือ *Collocalia fuciphaga* (Kong et al., 2022) เนื่องจากรังนกมีโภชนการทางอาหารที่ดี รังนกจึงถูกนำมาใช้เพื่อการบริโภคในตำรับอาหารและยาของราชวงศ์ชั้นสูงมาตั้งแต่สมัยโบราณ ปัจจุบันรังนกกินได้ มีข้อพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์สมัยใหม่เปิดเผยถึงกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้าน

การอักเสบ ฤทธิ์ต้านไข้หวัดใหญ่ และประสิทธิภาพการปรับสีผิว รวมไปถึงฤทธิ์การสมานแผลและการปรับปรุงเพิ่มจำนวนของสเต็มเซลล์ (Acharya & Satheesh, 2023)

อย่างไรก็ตามรังนักกินได้ ส่วนใหญ่จะแปรรูปด้วยวิธีการต้มหรือเคี่ยวในน้ำก่อนการบริโภค แต่โปรตีนบางกลุ่มยังคงไม่ละลายน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งการสกัดรังนกด้วยการต้มจึงได้ปริมาณโปรตีน 5-12% (Daud et al., 2021) และโปรตีนที่สกัดด้วยวิธีการต้มจะยังคงเป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ ขนาดโมเลกุลมากกว่า 100 กิโลดาลตัน (Marcone, 2005; Zhang et al., 2012) จะมีกรด N-Acetylneuraminic (NANA) คิดเป็นประมาณ 10% ของน้ำหนักแห้งรวมของรังนกกินได้ (Hou et al., 2013) แต่ NANA ส่วนใหญ่อยู่ในแบบฟอร์มคอนจูเกต มีความสามารถในการดูดซึมต่ำ จึงได้มีการศึกษาพัฒนาวิธีการสกัดรังนกกินได้ โดยศึกษาการย่อยรังนกกินได้ในระบบทางเดินอาหารจำลอง หลังจาก 48 ชั่วโมงของการย่อย รังนกกินได้ ด้วยของเหลวในกระเพาะอาหารจำลอง ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด NANA ได้รับการปลดปล่อยอย่างเต็มที่ เป็นรูปแบบอิสระ และโปรตีนมีขนาดที่เล็กลง โดยมีการเปรียบเทียบคุณสมบัติของรังนกที่ผ่านการย่อยแล้ว กับผ่านการสกัดด้วยน้ำ พบว่า รังนกที่ย่อยแล้วจะแสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งขบวนการสังเคราะห์เม็ดสี B16 melanogenesis ได้ดีกว่า นอกจากนี้ รังนกที่ย่อยแล้วยังมีการสร้างกระดูกที่แข็งแกร่งขึ้น (Wong et al., 2018) จึงเป็นที่มาของการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพรังนกสกัดด้วยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์แบบไฮโดรไลเซต ซึ่งวิธีนี้สามารถให้คุณค่าทางโภชนาการที่ดีกว่ารังนกพร้อมดื่มทั่ว ๆ ไป ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สริมอาหาร เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์รังนกแปรรูปได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต (Edible Bird’s nest Protein hydrolysate ด้วยวิธี MTT assay และ เพื่อศึกษาผลของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7)

ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาฤทธิ์ของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต (Edible Bird’s nest Protein hydrolysate) ต่อการอยู่รอดของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) ด้วยวิธี MTT assay และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี Griess assay

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

1. การเตรียมรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต (Edible Bird’s Nest Protein Hydrolysate) จากวัตถุดิบรังนกนางแอ่น *Collocalia germani* มาจากภาคใต้ โดยตรวจเช็คปริมาณไซอาลิก แอซิก และ

ทำการแปรรูปรังนกด้วยวิธีการย่อยโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส และคัดแยกโมเลกุลโดยผ่านขั้นตอน Microfiltration และ Ultrafiltration เพื่อคัดแยกโมเลกุลในช่วง 8000 ดาลตัน และผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ออกมาเป็นผงรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยกำหนดค่ามาตรฐาน ของปริมาณ Sialic acid ไม่ต่ำกว่า 1.8%

2. การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตและความเป็นพิษต่อเซลล์ของรังนกไฮโดรไลเซต ด้วยวิธี MTT Assay โดยใช้เซลล์มาโครฟาจ (RAW 264.7)

2.1เตรียมสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2.2 เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม หลุมละ 50,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นบ่มเซลล์กับรังนกไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมในอาหารที่ไม่มี FBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหลุมที่เป็นกลุ่ม control และ blank จะเปลี่ยนจากรังนกไฮโดรไลเซทเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS ในปริมาณเท่ากัน เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย 3, [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย PBS (pH 7.4) หลุมละ 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดสารละลายในหลุมออกให้หมด และเติม DMSO หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าถาดหลุมจนผลึก formazan ละลายเข้ากัน และวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability)

3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซต (Griess assay)

3.1 เตรียมสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม หลุมละ 50,000 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความชื้นและปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมออก และใส่สารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตซึ่งละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสม FBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมให้ได้ความเข้มข้น 1, 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนหลุมที่ไม่ใส่สารสกัดรังนกไฮโดรไลเซต จะใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผสม FBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มถาดหลุมในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่ม เติม LPS ซึ่งละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนหลุมที่ไม่ใส่ LPS ให้ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายในแต่ละหลุมปริมาณ 100 ไมโครลิตร

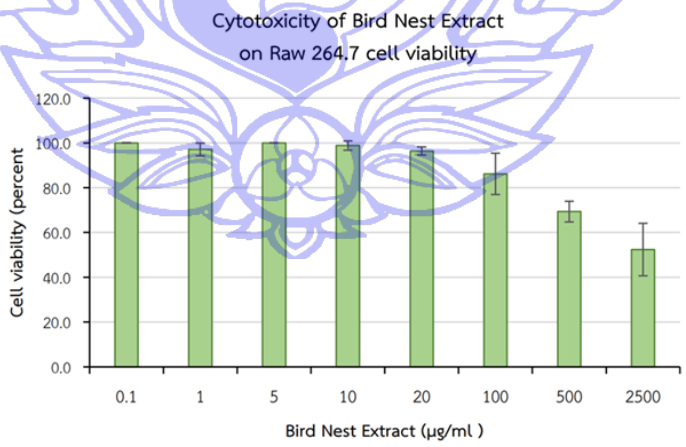
ใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม ถาดใหม่ตามลำดับเหมือนกับถาดเดิม เติม Griess reagent ลงไปทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าไมโครเพลตเป็นเวลา 3 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์โดยเทียบกับแผนภูมิมาตรฐานแสดงความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของโซเดียมไนไตรท์

4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ MTT Assay เก็บข้อมูลแต่ละตัวอย่างโดยการทดลอง 3 ซ้ำ หาค่า IC 50 และ หาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ ใช้หลักการประเมินสถิติ Mann-Whitney U test โดยใช้โปรแกรมประเมิน SPSS

ผลวิจัย

1. การศึกษาความเป็นพิษของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW264.7) ด้วยวิธี MTT assay เพื่อหาความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตที่จะไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง NO

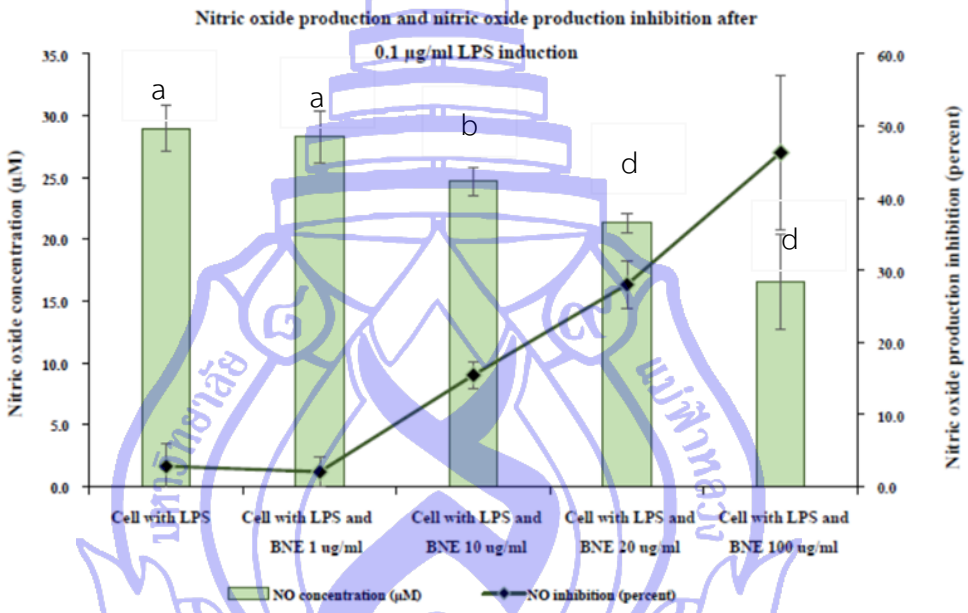
ผลการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 5, 10, 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยมีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 100.0, 97.1, 100.0, 98.8, 96.4, 86.2 ตามลำดับ โดยผู้ทดสอบเลือกความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์(NO) พิจารณาจากความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่ต่ำกว่า 75% และค่า IC50 ของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตอยู่ที่ 2,602 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 1 ความเข้มข้นของรังนกไฮโดรไลเซตและร้อยละการมีชีวิตของเซลล์

2. การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต

ผลการศึกษาตัวอย่างที่บ่มด้วย LPS ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตความเข้มข้น 10, 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์มาโครฟาจ (RAW264.7) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$; Mann-Whitney U test) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารสกัดดังกล่าว โดยที่ความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ 10, 20, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ 15.3, 28.0, 52.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และมีแนวโน้มของการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นแปรไปตามขนาดของความเข้มข้นของรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซต จากการทดลองจึงสรุปได้ว่า รังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลต่อการยับยั้งไนตริกออกไซด์ซึ่งอาจจะมีผลต่อการลดการอักเสบของร่างกายได้



ภาพที่ 2 ปริมาณไนตริกออกไซด์และร้อยละการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยเซลล์ RAW 264.7 เมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดรังนกไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่างๆจากกราฟแท่ง a ไม่มีความแตกต่าง b,c และ d ที่ความเข้มข้นของรังนกสกัดตั้งแต่ 10,20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.01$; Mann-Whitney U test)

อภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

การทดลองฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อเซลล์มาโครฟาจ (RAW264.7) โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสารกลุ่ม Lipopolysaccharide ให้เกิดปริมาณไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้น ซึ่งไนตริกออกไซด์จัดเป็นสารสื่ออักเสบ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จึงสามารถช่วยยืนยันประสิทธิภาพการต้านการอักเสบของสารสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซ ตได้

เบื้องต้น และผลการทดลองมีการสอดคล้อง ไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษารังนกกินได้ที่ผ่านการย่อยแล้วในประเทศมาเลเซีย พบว่ารังนกที่ผ่านการย่อยแล้วสามารถยับยั้ง TNF-α และ NO ด้วยค่าการยับยั้งสูงสุดที่ 58% และ 63% ในเซลล์มาโครฟาจเช่นกัน (Vimala et al., 2012) และ EBN ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ แสดงผลต้านการอักเสบในเซลล์ HaCaT keratinocytes โดยระดับไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบในผิวหนังหนูลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อได้รับการรักษาด้วย EBN (Lai et al., 2022) ซึ่งควรมีการศึกษาผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดสกัดรังนกโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อไป

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการอักเสบเบื้องต้น ซึ่งหากจะดูให้มากขึ้นต้องศึกษาการยับยั้งสารสื่ออักเสบที่มากขึ้น นอกจากไนตริกออกไซด์ เช่น ศึกษาเพิ่มเติมในการยับยั้งสารสื่ออักเสบในกลุ่มพรอสตาแกลนดิน และ กลุ่มไซโตไคน์ เพิ่มเติม เพื่อชี้ชัดการยับยั้งการอักเสบที่กว้างมากขึ้น และสามารถต่อยอดศึกษาในเซลล์ทดลองผิวหนังมนุษย์เพื่อดูฤทธิ์การตอบสนองต่อการสังเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน เพื่อตอบโจทย์ การทำผลิตภัณฑ์รังนกที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

รายการอ้างอิง

Acharya, C., & Satheesh, N. (2023). Edible Bird's Nest (EBN): Production, Processing, Food and Medicinal Importance. *AgriCos e-Newsletter, 4*(2), 20-5.

Daud, N. A., Mohamad Yusop, S., Babji, A. S., Lim, S. J., Sarbini, S. R., & Hui Yan, T. (2021). Edible bird's nest: Physicochemical properties, production, and application of bioactive extracts and glycopeptides. *Food Reviews International, 37*(2), 177-196.

Hou, X.-C., Zhu, L. P., Liu, C. S., Wang, B., Wang, L., Han, W. Q., . . . Ke, Z-H. (2013). Determination of sialic acid in edible bird's nest using UPLC-MS/MS. *Modern Food Science and Technology, 29*(7),1706-1709,1720.

Kong, H. K., Chan, Z., Yan, S. W., Lo, P. Y., Wong, W. T., Wong, K. H., . . . Lo, C. L. (2022). Revealing the species-specific genotype of the edible bird's nest-producing swiftlet, Aerodramus fuciphagus and the proteome of edible bird's nest. *Food Research International, 160*, 111670.

Marcone, M. F. (2005). Characterization of the edible bird's nest the "Caviar of the East". *Food Research International, 38*(10), 1125-1134.

Wong, Z. C., Chan, G. K., Wu, K. Q., Poon, K. K., Chen, Y., Dong, T. T., . . . Tsim, K. W. (2018). Complete digestion of edible bird's nest releases free N-

acetylneuraminic acid and small peptides: An efficient method to improve functional properties. *Food & Function, 9*(10), 5139-5149.

Zhang, S., Lai, X., Liu, X., Li, Y., Li, B., Huang, X., . . . Yang, G. (2012). Competitive enzyme-linked immunoassay for sialoglycoprotein of edible bird's nest in food and cosmetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(14), 3580-3585.

Lai, Q. W. S., Q. Fan, B. Z. Zheng, Y. Chen, T. T. Dong & K. W. K. Tsim (2022). "Edible bird's nest, an Asian health food supplement, possesses anti-inflammatory responses in restoring the symptoms of atopic dermatitis: An analysis of signaling cascades." *Frontiers in Pharmacology,13, 141413.*

Vimala B, Hussain H, Nazaimoon WMW. Effects of edible bird's nest on tumour necrosis factor-alpha secretion, nitric oxide production and cell viability of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Agricultural Immunology. 2012;23*(4):303-14.