ผลของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วดาวอินคาในการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-Converting และ Dipeptidyl-Peptidase 4

Effects of Protein Hydrolysate from Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis* L.) on Enzyme Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme and Dipeptidyl-Peptidase 4

ณัฐพล ลิ้มจุติธรรม (Nattapol Limjutitham)* ดร.กฤษณ์ ตันตนะรัตน์ (Dr.Krit Tantanarat)**

บทคัดย่อ

ถั่วดาวอินคาเป็นพืชเศรษฐกิจใหม่ของประเทศไทย ปัจจุบันการนำโปรตีนที่ได้จากถั่วดาวอินคามาประยุกต์ใช้ยังมีน้อยอีกทั้งกากถั่วดาวอินคาที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานนั้นมีปริมาณมาก การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วดาวอินคาและทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE และ DPP-4 ซึ่งพบว่ากากถั่วดาวอินคาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ alcalase เวลา 5 ชั่วโมงและที่ย่อยด้วยเอนไซม์ alcalase เวลา 5 ชั่วโมงต่อเนื่องด้วย flavourzyme เป็นเวลา 2 ชั่วโมงมีผลผลิตเท่ากับ 34.82% และ 40.55% ตามลำดับ ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis) มีค่า 24.45% และ 45.17% ตามลำดับและปริมาณโปรตีนเท่ากับ 55.44 และ 45.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อนำโปรตีนที่มีขนาดต่ำกว่า 3KDa ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.290 และ 0.293 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับและความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 เท่ากับ 0.913 และ 0.327 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วดาวอินคามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE และ DPP-4

ABSTRACT

Sacha inchi is a new economic crop of Thailand. Currently, Sacha inchi pressed cakes are large quantity residue is a byproduct of the factory, but there are still few outcomes for these Sacha inchi proteins. The objective of this study was to produce protein hydrolysate from Sacha inchi pressed cake and to test their inhibition activity on ACE and DPP-4 enzymes. Sacha inchi pressed cakes were digested for 5 hours with Alcalase (A5) and 5 hours with alcalase followed by 2 hours of flavourzyme (AF7). The %yield of hydrolysate product were 34.82% and 40.55% respectively. The Degrees of hydrolysis were 24.45% and 45.17% respectively, and the protein content was 55.44 and 45.16 mg/ml, respectively. The protein, which was lower than 3 KDa, The ACE inhibitor activity has IC_{50} values were 0.290 and 0.293 mg/ml respectively, and DPP-4 inhibition activity has IC_{50} values was 0.913 and 0.327 mg/ml respectively. Concluded that protein hydrolysate from Sacha inchi pressed cake had activity to inhibit ACE and DPP-4 enzymes.

คำสำคัญ: ถั่วดาวอินคา โปรตีนไฮโดรไลเซต เอซีอี

Keywords: Sacha inchi, Protein hydrolysate, ACE

**นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร*

บทนำ

ถั่วดาวอินคาหรือ Sachi Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) ได้มีกระจายการเพาะปลูกมาในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะตอนเหนือของประเทศไทย ปัจจุบันถั่วดาวอินคานิยมนำไปผ่านการบีบเย็นเพื่อสกัดเอาน้ำมันออกไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง (Cai et al., 2012) นั้นยังมีกากถั่วดาวอินคาที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานนั้นมีปริมาณมหาศาลซึ่งส่วนใหญ่นำไปทำเป็นผงโปรตีนหรืออาหารสัตว์ที่มีมูลค่าต่ำ แต่อย่างไรก็ตามการนำโปรตีนที่ได้จากถั่วดาวอินคามาประยุกต์ใช้ยังมีน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันของกากถั่วดาวอินคา จากการศึกษาพบว่ากากถั่วดาวอินคามีส่วนประกอบเป็นโปรตีนสูงถึง 56% (Rawdkuen et al., 2016; Kodahl, 2020) โดยมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนได้แก่ albumin globulin prolamin และ glutelin (Sathe and Kshirsagar, 2012) และยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นได้แก่ cysteine tyrosine threonine และ tryptophan (Rawdkuen et al., 2016; Wang et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการไฮโดรไลเซตของโปรตีนได้รับความสนใจและแพร่หลาย เนื่องจากเป็นการทำลายพันธะเปปไทด์เพื่อให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงนั้นจะช่วยให้เกิดความหลากหลายในการเรียงลำดับของกรดอะมิโนทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน ซึ่งพบว่าสามารถลดความดันโลหิต ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอับเสบและต้านแบคทีเรียได้ (Bhat et al., 2015) อีกทั้งในปัจจุบันโรคไม่ติดต่อเรื้อรังมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นในทุกๆ ปี โดยมีผู้เสียชีวิตมากกว่า 40 ล้านคน โดยคิดเป็น 71% ของการเสียชีวิตทั้งหมดของประชากรโลก โดยโรคในกลุ่ม NCDs พบการเสียชีวิตมากที่สุดคือ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง (กองโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2563) จากการรายงานพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากถั่วแระ ถั่วขาว มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin-converting enzyme (ACE) (Hanafi et al., 2018; Rui et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าโปรตีนสกัดจากกากถั่วดาวอินคาที่ได้ไฮโดรไลเซตมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงถึง 33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Chirinos et al., 2020) แต่อย่างไรก็ตามยังขาดการนำโปรตีนไปใช้ในการลดความดันโลหิตและลดระดับน้ำตาลในเลือด จากปัญหาดังกล่าวการศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากกากถั่วดาวอินคาและมีฤทธิ์ของเปปไทด์โดยทดสอบกับชุดทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ ACE ซึ่งเป็นเอนไซม์เกี่ยวข้องกับความดันโลหิตและ dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระดับน้ำตาลในเลือด กากถั่วดาวอินคาจึงเหมาะสมสำหรับนำไปเพิ่มมูลค่าให้แก่กากถั่วดาวอินคาและสร้างผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วดาวอินคาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE และ DPP-4

วิธีการวิจัย

ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วดาวอินคา

นำกากถั่วดาวอินคาที่ได้มาจาก บริษัท โอเมกา 3, 6, 9 แอนด์ ไลโคปีน จำกัด จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย (เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมีนาคม 2561) ปริมาณ 20 กรัมผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ปรับ pH เป็น 9.5 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์เตรียมทั้งหมด 2 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างทั้งสองไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 2% (w/w) alcalase ทั้งสองตัวอย่างและนำไปกวนด้วยเครื่อง overhead stirrer ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที โดยควบคุมให้ pH เป็น 9.5 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์และอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสอย่างสม่ำเสมอ บ่มไว้เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำไปต้มเป็นเวลา 15 นาทีเพื่อยุติการทำงานของเอนไซม์ เก็บไว้เป็นตัวอย่างที่ 1 เรียกว่าตัวอย่าง A5

หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ 2 ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริกอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 2% (w/w) flavourzyme โดยควบคุมให้ pH 6 ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสสม่ำเสมอ บ่มไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที เรียกว่าตัวอย่าง AF7 (ตัวอย่าง uncut จะไม่มีการเติมเอนไซม์ alcalase และ flavourzyme) จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,200 xg เป็นเวลา 15 นาที โดยนำส่วนที่เป็นสารละลายนำไป Freeze dry และส่วนของตะกอนนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณผลผลิตที่ได้ จากสูตร %Yields of hydrolysate product = (โปรตีนไฮโดรไลเซต/กากถั่วดาวอินคา)*100 และ %Yields of hydrolysate product = 100-(น้ำหนักตะกอน/กากถั่วดาวอินคา)*100

การทดสอบ Degree of hydrolysis ด้วยวิธี OPA assay

การทดสอบได้ดัดแปลงจาก *Church et al., 1983* โดยนำตัวอย่างกากถั่วดาวอินคาไปละลายด้วย 7 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 60 นาทีจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 10,*000 xg* เป็นเวลา 5 นาที (กากถั่วดาวอินคาคิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด) และตัวอย่างทั้งสองคือ *A5* และ *AF7* นำไปละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำทั้งสองตัวอย่างมาดูดใส่ 96-*well plates* ปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับ *OPA reagent* ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตรและความยาวคลื่นปลดปล่อย 460 นาโนเมตร โดยคำนวณระดับ *degree of hydrolysis* จากสูตร *degree of hydrolysis* (*%DH*) = ($Abs_{ex460/em405}$ *OPA /total protein*(กากถั่วดาวอินคา))*100

การตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำทั้งหมดด้วยวิธี *Biuret*

การตรวจสอบปริมาณได้ดัดแปลงจาก *Gornall et al., 1949* และ *Moayedi et al., 2010* โดยนำทั้งสองตัวอย่างคือที่ *A5* และ *AF7* ที่ได้จากการ *Freeze dry* นำมาละลายด้วย *0.5* โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที และนำไปกรองที่กระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นดูดใส่ 96-*well plate* ปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมกับ *Biuret* ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน *BSA*

การแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุลด้วย *Ultrafiltration*

สารตัวอย่าง *A5* และ *AF7* ที่ได้จากการ *Freeze dry* ถูกนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นและกรองผ่านหลอด *Amicon ultrafiltration cell membrane* ที่มีเมมเบรนคัดแยก 2 ครั้งโดยครั้งที่ 1 แยกขนาด 10 *kDa* และครั้งที่สองนำโปรตีนที่ผ่านการแยกครั้งที่ 1 มาแยกขนาด 3 *kDa* โดยนำไปปั่นเหวี่ยง *4,200 xg* เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไป *Freeze dry* ซึ่งจะได้ส่วนที่มีโปรตีน 3 ช่วงขนาด คือ มากกว่า 10 *kDa* ระหว่าง 3-10 *kDa* และน้อยกว่า 3 *kDa* สำหรับนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE และ DPP-4

การตรวจสอบขนาดโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเทคนิค SDS-PAGE

เตรียมตัวอย่างตัวอย่างถั่วดาวอินคาที่ไม่ได้ไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ (Uncut) ตัวอย่าง A5 และมีช่วงขนาดโปรตีนน้อยกว่า 3 kDa (A5/<3kDa) ช่วง 3-10 kDa (A5/3-10kDa) ช่วงมากกว่า 10 kDa (A5/>10kDa) และตัวอย่าง AF7 และมีช่วงขนาดโปรตีนน้อยกว่า 3 kDa (AF7/<3kDa) ช่วง 3-10 kDa (AF7/3-10kDa) และช่วงมากกว่า 10 kDa (AF7/>10kDa) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับ loading dye โดยมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร โดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรตีนและ loading dye ในอัตราส่วน 4:1 โดยใช้ 4% Stacking gel (ชั้นบน) และ 15% Resolving gel(ชั้นล่างสำหรับแยกโปรตีนตามขนาด) จากนั้นนำไปทดสอบที่แรงดันไฟ 200 โวลต์เป็นระยะเวลา 40 นาที

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE

การทดสอบนี้ใช้ ACE activity assay kit จาก Sigma-Aldrich โดยนำตัวอย่าง Uncut, A5, AF7, A5<3kDa และ AF7<3kDa ความเข้มข้น 0.2 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ใน 96 well-plates จากนั้นใส่เอนไซม์ ACE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในความมืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่สารตั้งต้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปวัด kinetic ทุก ๆ 2.5 นาทีเป็นเวลา 20 นาทีที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 320 นาโนเมตรและปลดปล่อยในความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE โดยรายงานเป็นค่า IC_{50} ที่คำนวณจากค่าความชันที่หาได้จากกราฟระหว่างค่า %inhibition กับความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่าง

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4

การทดสอบนี้ใช้ DPP-4 activity assay kit จาก Sigma-Aldrich โดยนำตัวอย่าง Uncut, A5, AF7, A5<3kDa และ AF7<3kDa ความเข้มข้น 0.25 ถึง 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ใน 96 well-plates จากนั้นใส่เอนไซม์ DPP-4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในความมืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใส่สารตั้งต้น ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และนำไปวัด kinetic ทุก ๆ 2.5 นาทีเป็นเวลา 20 นาทีที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 320 นาโนเมตรและปลดปล่อยในความยาวคลื่น 460 นาโนเมตรและนำไปวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 โดยรายงานเป็นค่า IC_{50} ที่คำนวณจากค่าความชันที่หาได้จากกราฟระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่าง

ผลการทดลอง

โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วดาวอินคา

หลังจากทำการไฮโดรไลเซตถั่วดาวอินคาด้วยเอนไซม์ alcalase เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง *(A5)* และ alcalase กับ flavourzyme เป็นระยะเวลา 5 และ 2 ชั่วโมง *(AF7)* ตามลำดับ พบว่า ตัวอย่าง AF7 มีปริมาณของตัวอย่างหลังจากไฮโดรไลเซตมากกว่าตัวอย่าง A5 เท่ากับ 40.55 และ 34.82% ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1

ประสิทธิภาพในการย่อย

หลังจากทำการไฮโดรไลเซตถั่วดาวอินคาด้วยเอนไซม์ alcalase เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง *(A5)* และ alcalase กับ flavourzyme เป็นระยะเวลา 5 และ 2 ชั่วโมง *(AF7)* ตามลำดับ พบว่า ตัวอย่าง AF7 มีความสามารถในการย่อยได้มากกว่าตัวอย่าง A5 เท่ากับ 51.82% และ 22.08% ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1

ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำทั้งหมด

หลังจากทำการไฮโดรไลเซตถั่วดาวอินคาด้วยเอนไซม์ alcalase เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง (A5) และ alcalase กับ flavourzyme เป็นระยะเวลา 5 และ 2 ชั่วโมง (AF7) ตามลำดับ พบว่า ตัวอย่าง AF5 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากกว่าตัวอย่าง AF7 เท่ากับ 55.44 และ 45.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง Yields ที่ได้จากการไฮโดรไลเซต Degree of hydrolysis และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำของกากถั่วดาวอินคาที่ได้รับการไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ alcalase และ flavourzyme

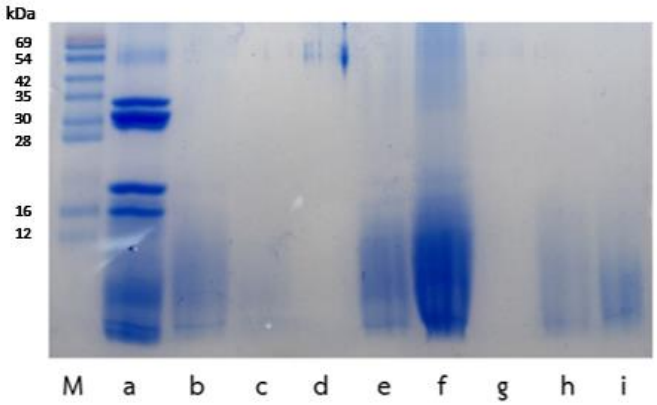
Sample	Appearance	%Yields of hydrolysate product	%DH	%Total soluble protein
Uncut		6.49±1.09	-	21.20±2.61
A5		34.82±5.46	22.08±1.08	55.44±1.41
AF7		40.55±2.21	51.82±0.21	45.16±3.48

หมายเหตุ: ผลลัพธ์ที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยโดยมีค่า n=3

การตรวจสอบขนาดโปรตีนไฮโดรไลเซต

จากการตรวจสอบขนาดโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ถั่วดาวอินคาดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าตัวอย่าง uncut ที่ไม่ได้รับการไฮโดรไลซ์พบโปรตีนขนาดใหญ่ 4 ขนาดซึ่งมากกว่า 16kDa โดยเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐาน และตัวอย่าง A5, AF7, A5/3-10kDa, A5/10>kDa, AF7/3-10kDa และ AF7/10>kDa พบโปรตีนที่มีหลายขนาดที่อยู่ในช่วงต่ำกว่า 16 kDa ซึ่งแตกต่างกับตัวอย่าง A5/<3kDa และ AF7/<3kDa ที่ไม่สามารถทราบขนาดได้จากวิธีนี้

ภาพที่ 1 แสดงการแยกขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE เทียบระหว่างตัวอย่าง Uncut กับตัวอย่างที่ไฮโดรไลเซต



หมายเหตุ: กากถั่วดาวอินคา (a), ตัวอย่าง A5 (b), ตัวอย่าง AF7 (c), A5 ขนาดน้อยกว่า 3 kDa (d), A5 ช่วง 3-10 kDa (e) A5 ช่วงมากกว่า 10 kDa (f), AF7 ขนาดน้อยกว่า 3 kDa (g), AF7 ช่วง 3-10 kDa (h) และ AF7 ช่วงมากกว่า 10 kDa (i)

ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE

เมื่อทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าตัวอย่างที่ไม่ได้รับการไฮโดรไลเซต (uncut) มีความสามารถในการยับยั้งดีที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.116 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรองลงเป็น AF7, A5, A5<3kDa และ AF7<3kDa ที่ความเข้มข้น 0.160, 0.194, 0.290 และ 0.293 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4

เมื่อทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าตัวอย่างที่ไม่ได้รับการไฮโดรไลเซต (Uncut) ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากไม่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 โดยพบว่าตัวอย่าง AF7<3kDa มีความสามารถในการยับยั้งดีที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ได้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.327 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรองลงมาเป็น AF7, A5<3kDa และ A5 ที่ความเข้มข้น 0.373, 0.913 และ 1.211 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE และ DPP-4 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละตัวอย่าง

Sample	ACE IC_{50} (mg/ml)	DPP-4 IC_{50} (mg/ml)
uncut	0.116	ND
A5	0.194	1.211
AF7	0.160	0.373
A5<3kDa	0.290	0.913
AF7<3kDa	0.293	0.327

หมายเหตุ: ND = non detection, n=1

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการไฮโดรไลเซตกากถั่วดาวอินคาที่ได้จากบริษัท โอเมกา 3, 6, 9 แอนด์ ไลโคปีน จำกัด จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย ด้วยเอนไซม์ alcalase และ flavourzyme พบว่าหลังจากการเพิ่มเอนไซม์ flavourzyme มีผลช่วยให้ความสามารถในการย่อยโปรตีนได้มากขึ้นกว่าการใช้ alcalase เพียงอย่างเดียว เมื่อนำไปเปรียบเทียบระหว่าง %yields of hydrolysate product กับน้ำหนักตะกอนที่ได้จากการนำไปอบพบว่ามีค่าสอดคล้องกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัย ที่ใช้เอนไซม์ curd papain และ calotropis ในการไฮโดรไลเซตถั่วดาวอินคาพบว่าได้ %Yields เท่ากับ 50 และ 51% ตามลำดับซึ่งมากกว่า Alcalase และ Flavourzyme ถึง 2 เท่าซึ่งเป็นน่าจะเป็นผลมาจากเอนไซม์ที่แตกต่างกันและค่า unit activity ที่ไม่เท่ากัน (Rawdkuen, 2018)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยพบว่า degree of hydrolysis ตัวอย่าง AF7 มีค่าสูงกว่า AF5 แต่มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำน้อยกว่านั้นอันเนื่องมากจากโปรตีนที่ตัวอย่าง AF7 ไฮโดรไลเซตได้นั้นซึ่งอาจจะเกิดจากขั้นตอนการไฮโดรไลเซตทำให้อัตราส่วนระหว่างโปรตีนและน้ำหนักตัวอย่างลดลงอันเนื่องมากจากการเพิ่มขึ้นของเกลือคลอไรด์และเอนไซม์ flavourzyme เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ curd papain และ calotropis ในการไฮโดรไลเซตถั่วดาวอินคาพบว่าได้ %DH เท่ากับ 2.7% และ 11.2% ตามลำดับซึ่งมีค่าน้อยกว่าการใช้เอนไซม์ alcalase และ flavourzyme (Rawdkuen, 2018) นอกจากนี้ในงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ papain ในการไฮโดรไลซ์เซตถั่วชิกพีและถั่วลันเตา

สีเหลืองพบว่าได้ %DH ประมาณ 31-40% ซึ่งน้อยกว่า alcalase และ flavourzyme ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากความแตกต่างของตัวอย่างและเอนไซม์และค่า unit activity ของเอนไซม์ที่ไม่เท่ากัน (Barbana and Boye, 2010) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำกับงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ curd papain และ calotropis ในการไฮโดรไลซ์ถั่วดาวอินคาพบว่าได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 24 และ 37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Rawdkuen, 2018) ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์ alcalase และ flavourzyme ในการทดลองนี้

อีกทั้งหลังจากการแยกขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE เมื่อเปรียบเทียบขนาดโปรตีนกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าโปรตีนที่ตัวอย่าง UNCUT พบว่ามีโปรตีน 4 ชนิดคือ glutelin (~70 kDa), albumin (~30 kDa), globulin (~20 kDa) และ prolamin (~12kDa) (Sathe et al., 2012) โดยทางผู้วิจัยที่ได้ทำการแยกขนาดของโปรตีนขนาดทั้ง 3 ช่วงคือ มากกว่า 10kDa ระหว่าง 3-10 kDa และต่ำกว่า 3 kDa ทั้งนี้มีการรายงานก่อนหน้านี้การไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ alcalase และ chymotrypsin ในถั่วลันเตาสีเหลืองในแง่ของขนาดโปรตีนต่อการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin พบว่าที่โปรตีนที่มีขนาดต่ำกว่า 1 kDa ขนาดระหว่าง 1-3 kDa ขนาดระหว่าง 3-5 kDa และขนาดระหว่าง 5-10 kDa มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ trypsin โดยมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 2.14 ถึง 3.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการไฮโดรไลเซตด้วย chymotrypsin พบว่าโปรตีนขนาดต่ำกว่า 1 kDa สามารถยังยั้งเอนไซม์ Trypsin ได้ดีที่สุด (Awosika et al., 2019) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาโปรตีนที่มีขนาดต่ำกว่า 3 kDa สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

หลังจากนั้นเมื่อนำโปรตีนที่มีขนาดต่ำกว่า 3 kDa ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE และ DPP-4 ซึ่งเมื่อเทียบกันระหว่างก่อนและหลังแยกขนาดของโปรตีน พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วดาวอินคามีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE มากกว่าเทียบกับงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ alcalase และ flavourzyme ในการไฮโดรไลเซตถั่วลูกไก่ พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Barbana and Boye, 2010) และมีความสามารถใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ alcalase ในการไฮโดรไลเซตถั่วแระซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ ACE โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Hanafi et al., 2018) และอีกงานวิจัยที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วดาวอินคาสามารถยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่าเวย์โปรตีนไฮโดไลเซตที่สามารถยับยั้งได้ที่ 40% ที่ความเข้มข้น 0.143 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Lacroix et al., 2016) สุดท้ายเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ไฮโดรไลเซตโปรตีนสกัดจากกากถั่วดาวอินคาด้วยเอนไซม์ alcalase และ flavourzyme พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Chirinos et al., 2020) ซึ้งยับยั้งได้ดีกว่าเนื่องจากโปรตีนที่ผู้วิจัยนำมาใช้เป็นโปรตีนที่ได้ไฮโดรไลเซตจากถั่วดาวอินคาโดยตรง เพื่อลดต้นทุนและขั้นตอนในการผลิตสำหรับนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในอนาคต

และจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง IC_{50} ของ AF7 และ AF7<3kDa พบว่า AF7<3kDa มีค่าน้อยกว่าซึ่งหมายความว่ามีความสามารถในการยับยั้งสูงกว่าซึ่งเป็นไปทางเดียวกันกับรายงานของ Awosika et al., 2019 ที่พบว่าโปรตีนขนาดเล็กมีฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่าโปรตีนขนาดใหญ่และผู้วิจัยคิดว่า IC_{50} ของ AF7 ที่สูงนั้นส่วนหนึ่งอันเนื่องมากจากโปรตีนที่มีขนาดต่ำกว่า 3 kDa ทำให้มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกับ AF7<3kDa อีกทั้งการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลอง 1 ซ้ำซึ่งจำเป็นต้องทดลอง 3 ซ้ำเพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องมากที่สุด และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ protamex ในถั่วเหลืองพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Nongonierma & FitzGerald, 2015) พบว่าตัวอย่าง AF7-3kDa สามารถยับยั้งได้ดีกว่าอันเนื่องมาข้อแตกต่างในเรื่องของชนิดเอนไซม์และ %DH และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 กับเวย์โปรตีนไฮโดรไลเซต พบว่า IC_{20} ของ AF7<3kDa มีค่าเท่ากับ 0.105 mg/ml ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเวย์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีค่าเท่ากับ 0.125 mg/ml (Lacroix et al., 2016) ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วดาวอินคามีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ได้ดีกว่าเวย์โปรตีนไฮโดรไลเซต

จากการวิจัยดังกล่าวเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับนำไปศึกษาโปรตีนในการหาลำดับกระอะมิโนเพื่อยืนยันฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม NCDs และช่วยลดปริมาณของกากถั่วดาวอินคาและช่วยเพิ่มมูลค่าของกากถั่วดาวอินคาสำหรับนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หรือประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมถั่วดาวอินคาในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณตัวอย่างกากถั่วดาวอินคาจากบริษัท โอเมกา 3, 6, 9 แอนด์ ไลโคปีน จำกัด จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย สถานบริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้บริการด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ตลอดจนห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

กองโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. รายงานสถานการณ์โรค NCDs เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้อง พ.ศ. 2562. สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2563

Aiello G, Li Y, Boschin G, Bollati C, Arnoldi A, Lammi C. Chemical and Biological Characterization of Spirulina Protein Hydrolysates: Focus on ACE and DPP-IV Activities Modulation. Journal of Functional Foods. 2019; 1(63):103592.

Awosika T, Aluko RE. Enzymatic Pea Protein Hydrolysates Are Active Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors. Foods. 2019; 8(6):200.

Barbana C, Boye JI. Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Activity of Chickpea and Pea Protein Hydrolysates. Food Research International. 2010; 43(6):1642-9.

Bhat, Z. F., Sunil Kumar, Hina Fayaz Bhat. Bioactive Peptides of Animal Origin: A Review. Journal of Food Science and Technology. 2015; 2015:5377-5392.

Cai, Z. Q., Jiao, D. Y., Lei, Y. B., Xiang, M. H., & Li, W. G. Growth and Yield Responses of Plukenetia volubilis L. Plants to Planting Density. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2013; 88(4):421-426.

Chirinos, R., Pedreschi, R., & Campos, D. Enzyme-Assisted Hydrolysates from Sacha inchi (Plukenetia Volubilis) Protein With in Vitro Antioxidant and Antihypertensive Properties. Journal of Food Processing and Preservation. 2020; 44(Issue12):https://doi.org/10.1111/jfpp.14969

Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL. Spectrophotometric Assay Using O-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. Journal of Dairy Science. 1983; 66(6):1219-27.

Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of Serum Proteins by Means of The Biuret Reaction. Journal of Biological Chemistry. 1949; 177(2):751-66.

Hanafi MA, Hashim SN, Chay SY, Ebrahimpour A, Zarei M, Muhammad K, Abdul-Hamid A, Saari N. High Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Alcalase-Digested Green Soybean (Glycine Max) Hydrolysates. Food Research International. 2018; 106:589-97.

Kodahl N. Sacha inchi (Plukenetia volubilis L. From Lost Crop of The Incas to Part of The Solution to Global Challenges?. Planta. 2020; 251(4):1-22.

Lacroix IM, Meng G, Cheung IW, Li-Chan EC. Do Whey Protein-Derived Peptides Have Dual Dipeptidyl-Peptidase IV and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activities?. Journal of Functional Foods. 2016; 21:87-96.

Moayedi V, Omana DA, Chan J, Xu Y, Betti M. Alkali-Aided Protein Extraction of Chicken Dark Meat: Composition and Stability to Lipid Oxidation of The Recovered Proteins. Poultry Science. 2010; 89(4):766-75.

Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Investigation of The Potential of Hemp, Pea, Rice and Soy Protein Hydrolysates as a Source of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides. Food Digestion: Research and Current Opinion. 2015; 6(1-3):19-29.

Rawdkuen S, Murdayanti D, Ketnawa S, Phongthai S. Chemical Properties and Nutritional Factors of Pressed-Cake from Tea and Sacha Inchi Seeds. Food Bioscience. 2016; 15:64-71.

Rawdkuen S, Rodzi N, Pinijsuwan S. Characterization of Sacha Inchi Protein Hydrolysates Produced by Crude Papain and Calotropis Proteases. LWT. 2018; 98:18-24.

Rui X, Boye JI, Simpson BK, Prasher SO. Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Small Red Bean (Phaseolus Vulgaris) Hydrolysates. Journal of Functional Foods. 2013; 5(3):1116-24.

Sathe, S. K., Kshirsagar, H. H., & Sharma, G. M. Solubilization, Fractionation, and Electrophoretic Characterization of Inca Peanut (Plukenetia Volubilis L.) Proteins. Plant Foods for Human Nutrition. 2012; 67(3):247-255.

Wang, S., Zhu, F., & Kakuda, Y. Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.): Nutritional Composition, Biological Activity, and Uses. Food Chemistry. 2018; 265:316-328.