

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและชีวเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากเมล็ดดาวอินคา

Antioxidant and Biochemical Properties of Protein Hydrolysates

Prepared from Sacha Inchi Meal

ศรัญญา สุวรรณอังกุล^{1*} และชนิษฐา รุตรัตนมงคล²

Saranya Suwanangul^{1*}, and Khanitta Ruttarattanamongkol²

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

¹Program of Food Science and Technology, Faculty of Engineering and Agro-Industry

Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

²Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment

Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

*Corresponding author: saranya_sw@mju.ac.th

Received: February 15, 2022

Revised: May 02, 2022

Accepted: May 31, 2022

Abstract

The oil from sacha inchi is one type of oil which is very popular, especially among health-conscious people. However, after the oil extraction process, 50% of meal (residue) from the initial material remained, which is high in protein. This seems suitable to produce protein hydrolysate and peptide which is beneficial in bioactivity. This research aimed to produce the protein hydrolysate and peptide, which are good sources of antioxidants and have a biochemical effect to restrain the enzyme causing chronic diseases while also adding the value to the sacha inchi meal. Enzymatic hydrolysate was extracted from sacha inchi meal protein isolate by using flavourzyme. The sacha inchi protein hydrolysate (SPH) was further fractionated into peptide sizes of 1, 3, 5 and 10 kDa using membrane ultrafiltration. The <1 kDa peptides exhibited significantly better ($p < 0.05$) diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radical scavenging activities when compared to peptide fractions of higher molecular weights. The high activity of <1 kDa peptides in these antioxidant assay systems may be related to the high levels of total hydrophobic and aromatic amino acids. In comparison to glutathione, the SPH and its membrane fractions had higher ability to chelate metal ions. In addition, the <1 kDa peptides had the greatest ACE-inhibition (Hypertension), DPP-IV inhibition (Type 2 Diabetes), α -amylase

inhibition and α -glucosidase inhibition (Obesity) an IC_{50} value of 1.56, 2.31, 3.77 and 1.84 mg/ml, respectively. Antioxidant activities and enzyme inhibition were determined by the molecular weight and amino acid from peptide fractions.

Keywords: sacha inchi meals, protein hydrolysate, antioxidant properties, bioactive peptide

บทคัดย่อ

น้ำมันจากเมล็ดดาวอินคาเป็นหนึ่งในน้ำมันที่คนนิยมรับประทาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่รักสุขภาพ เนื่องจากภายหลังจากการบีบน้ำมันจะได้ผลผลิตพลอยได้ (กากเมล็ดดาวอินคา) ประมาณร้อยละ 50 ของปริมาณวัตถุดิบเริ่มต้น ซึ่งผลผลิตพลอยได้ดังกล่าวอุดมด้วยโปรตีนที่มีคุณภาพ เหมาะสำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตและเปปไทด์ ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตและเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและออกฤทธิ์ทางชีวเคมีในการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรัง เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตพลอยได้จากกากเมล็ดดาวอินคา โปรตีนไฮโดรไลเซตถูกเตรียมจากกากเมล็ดดาวอินคาด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ จากนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซต (SPH) ถูกกรองผ่านเยื่อกรองเมมเบรนระดับอัลตราฟิลเตรชันขนาด 1, 3, 5 และ 10 กิโลดาลตัน พบว่าเปปไทด์ขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลไฮดรอกซิลสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ อาจเนื่องจากพบกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำและกรดอะมิโนอะโรมาติกอยู่จำนวนมาก ทั้งนี้ SPH และเปปไทด์มีความสามารถดักจับไอออนของโลหะได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลูตาไรโอน นอกจากนี้เปปไทด์ขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์ ACE (โรคความดันโลหิตสูง) DPP-IV (โรคเบาหวานชนิดที่ 2) α -amylase และ α -glucosidase (โรคอ้วน) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.56 2.31 3.77 และ 1.84 มก./มล. ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ถูกกำหนดโดยน้ำหนักโมเลกุลและกรดอะมิโน

คำสำคัญ: กากเมล็ดดาวอินคา โปรตีนไฮโดรไลเซต สมบัติต้านอนุมูลอิสระ เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

คำนำ

ดาวอินคาหรือถั่วดาวอินคา (Sacha inchi) เป็นพืชที่ให้น้ำมันในตระกูล Euphorbiaceae ซึ่งอุดมด้วยน้ำมันร้อยละ 35-60 ที่มีคุณภาพ เนื่องจากมีกรดไขมันจำเป็นในปริมาณสูง ได้แก่ กรดไขมันโอเมก้า 3 ร้อยละ 45-63 กรดไขมันโอเมก้า 6 ร้อยละ 34-39 และกรดไขมันโอเมก้า 9 ร้อยละ 6-10 (Wang and Kakuda, 2018) นอกจากนี้ยังอุดมด้วยโปรตีนร้อยละ 27-33 และวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด (Jagersberger, 2013; Maurer et al., 2012) จากศึกษาภาพที่ดีด้านคุณภาพของน้ำมันเมล็ดดาวอินคาส่งผลให้แนวโน้มความต้องการทางการตลาดเพิ่มสูงขึ้น และมีผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการบีบน้ำมัน (กากเมล็ดดาวอินคา) ในปริมาณมหาศาลหรือคิดเป็นร้อยละ 50 ของปริมาณวัตถุดิบเริ่มต้น ทั้งนี้กากเมล็ดดาวอินคาที่มีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 56.63 และประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด เช่น Cysteine, Tyrosine, Threonine และ Tryptophan ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าเมล็ดพืชที่ให้น้ำมันหลาย ๆ ชนิด (Jagersberger, 2013) การนำผลผลิตพลอยได้ดังกล่าวมาเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจด้วยเหตุผลทางด้านคุณค่าทาง

โภชนาการที่มีอยู่สูงในกากเมล็ดอินคา โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน ถือเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจ และยังสามารถแก้ไขปัญหาระบบการย่อยสลายกากเมล็ดอินคาหรือการจัดจำหน่ายในรูปแบบอาหารสัตว์ที่มีราคาต่ำ

การบริโภคโปรตีนจากพืชมักนิยมบริโภคโปรตีนธรรมชาติที่ยังไม่ผ่านการย่อยสลายโปรตีน ส่งผลให้การย่อยและการดูดซึมตลอดจนการนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายเป็นไปได้ช้ากว่าโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายหรือที่เรียกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซต (Awosika and Aluko, 2019) โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หรือการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันและกรดอะมิโนอิสระ กระบวนการผลิตสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์โปรตีเอส นอกจากนี้การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตสามารถผลิตได้จากแหล่งโปรตีนที่หลากหลาย หนึ่งในแหล่งโปรตีนที่สำคัญคือโปรตีนจากพืช ซึ่งมีบทบาทสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในแง่ของคุณค่าโภชนาการ และสารต้านอนุมูลอิสระ โดยโปรตีนดังกล่าวยังเหมาะสำหรับบุคคลที่มีข้อจำกัดทางด้านอาหาร เช่น ผู้ที่ทานมังสวิรัต ผู้ที่แพ้โปรตีนจากสัตว์ หรือผู้ที่มีปัญหาด้านการย่อยโปรตีนในเนื้อสัตว์ มีงานวิจัยหลายฉบับรายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากพืชน้ำมันมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลินทรีย์ ยับยั้งเอนไซม์ก่อโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ ACE เอนไซม์ DPP-IV รวมทั้งสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วน เช่น α -amylase และ α -glucosidase เป็นต้น (Santos *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2019; Awosika and Aluko, 2019)

ปัจจุบันกระบวนการหมักเบรนนระดับอัลตราฟิลเตรชันถือเป็นเทคโนโลยีที่ดีที่สุดเทคโนโลยีหนึ่ง ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกขนาดเปปไทด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเรื้อรัง (Connolly *et al.*, 2015) นอกจากนี้กระบวนการดังกล่าวยังมีบทบาทสำคัญในการ

ทำให้เข้มข้น การทำให้บริสุทธิ์ และการแยกสารทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเทคโนโลยีชีวภาพ (Foh *et al.*, 2010) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตและเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและออกฤทธิ์ทางชีวเคมีในการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรัง เพื่อเพิ่มมูลค่าผลพลอยได้จากกากเมล็ดอินคา

อุปกรณ์และวิธีการ

ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากเมล็ดอินคา

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากเมล็ดอินคา ดัดแปลงจากวิธีของ Adebisi and Aluko (2011) โดยนำกากเมล็ดอินคาที่ผ่านการสกัดน้ำมันโดยการบีบเย็นจาก บริษัท ไท.ซี.เอ็ม.เอส สเตนดาร์ด อินดัสเตรียล จำกัด จังหวัดเชียงราย ปริมาณ 100 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ปรับ pH เป็น 11.5 ด้วย 2 โมลาร์ NaOH จากนั้นนำไปหมักที่อุณหภูมิ 60°C. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำสารละลายปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25°C. เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนที่ pH 7.0 ด้วย 2 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งจะได้ตะกอนโปรตีนไอโซเลต (SPI) นำ SPI ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ปรับ pH 6.5 ด้วย 2 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก และบ่มที่ 55°C. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 1 (Flavourzyme from *Aspergillus oryzae*) ร่วมกับการกวนด้วยเครื่อง Overhead stirrer ที่ความเร็ว 350 รอบต่อนาที พร้อมทั้งควบคุม pH และอุณหภูมิให้คงที่ตลอดระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายส่วนใส คือ โปรตีนไฮโดรไลเซต (SPH) และนำไปทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง

การแยกขนาดเปปไทด์ตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยเมมเบรนระดับอัลตราฟิลเตรชัน

นำสารละลาย SPH แยกขนาดเปปไทด์ตามน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรนระดับอัลตราฟิลเตรชันชนิด Amicon stirred ultrafiltration ที่มี Molecular weight cut off ที่ขนาดแตกต่างกันคือ 1, 3, 5 และ 10 กิโลดาลตัน เพื่อให้เปปไทด์มีความบริสุทธิ์และมีขนาดที่เฉพาะมากยิ่งขึ้น การแยกขนาดเปปไทด์เริ่มจากนำสารละลาย SPH กรองผ่านเมมเบรนขนาด 1 กิโลดาลตัน ซึ่งจะได้ Peptide fraction ขนาดต่ำกว่า 1 จากนั้นนำสารละลาย SPH ที่เหลือกรองผ่านเมมเบรนขนาด 3, 5 และ 10 กิโลดาลตัน ซึ่งจะได้ Peptide fraction ขนาด 1-3, 3-5 และ 5-10 กิโลดาลตัน ตามลำดับ หลังจากนั้นนำ Peptide fraction ทำแห้งโดยกระบวนการแช่เยือกแข็ง (Awosika and Aluko, 2019) เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Markwell *et al.*, 1978) และร้อยละผลผลิตของ SPH และเปปไทด์

ร้อยละผลผลิตของ SPH = (ปริมาณโปรตีนของ SPH/น้ำหนักเริ่มต้นของ SPI) × 100%

ร้อยละผลผลิตของเปปไทด์ = (ปริมาณโปรตีนของเปปไทด์/น้ำหนักเริ่มต้นของ SPH) × 100%

วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

กระบวนการย่อยสลายโปรตีนทำให้เกิดเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ ทั้งนี้กรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นสนับสนุนการทำงานที่แตกต่างกัน (Awosika and Aluko, 2019) กรดอะมิโนอิสระของ SPI, SPH และเปปไทด์ตรวจสอบด้วยเครื่อง HPLC (SpectraLab Scientific Inc, แคนาดา) โดยใช้คอลัมน์ Pico-Tag ทำการย่อยตัวอย่างด้วย 6M HCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกสารละลายด้วย Performic acid เพื่อให้สามารถตรวจเมไทโอนีนและซิสเทอีนได้ ในขณะเดียวกันปริมาณทริปโตเฟนถูกตรวจสอบด้วย NaOH (Landry and Delhaye, 1992)

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) ด้วยวิธี OPA assay

ดัดแปลงวิธีจาก Malomo *et al.* (2015) ด้วยการเตรียม OPA reagent ดังนี้ 12.5 มล. ของ 100 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมเตตระโบเรต เติมน้ำใน 1.25 มล. ของ 20% โซเดียมเตตระโบเรตเคคาไฮเดรทที่ผสมกับ 20 มก. ของ OPA และ 50 ไมโครลิตร ของ 2-mercaptoethanol โดยส่วนผสมทั้งหมดละลายในเมทานอลและปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปต OPA reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 10 ไมโครลิตรของ SPH จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ทั้งนี้จำนวนหมู่อะมิโนอิสระของ SPI ตรวจสอบด้วยการย่อยใน 6 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก ที่ 110°C ด้วยเครื่อง Auto-digestion system เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคำนวณระดับการย่อยสลาย ดังนี้

$$(\%DH) = \frac{[(NH_2)_{tx} - (NH_2)_{t0}]}{[(NH_2)_{total} - (NH_2)_{t0}]} \times 100$$

เมื่อ $(NH_2)_{tx}$ คือ จำนวนหมู่อะมิโนอิสระ ณ เวลา X นาที

$(NH_2)_{total}$ คือ จำนวนหมู่อะมิโนอิสระของ SPI

$(NH_2)_{t0}$ คือ จำนวนหมู่อะมิโนอิสระที่เวลา 0 นาที ของ SPH

ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงวิธีจาก Girgih *et al.* (2011) เตรียมสารละลาย DPPH reagent โดยละลาย DPPH 0.0040 กรัม ในเมทานอล ปริมาตร 100 มล. และละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 0.1 โมลาร์ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี Triton X-100 ทดสอบการออกฤทธิ์ด้วยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงใน 96 Well plate จากนั้นเติม Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกลูตาไรโอนและใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวอย่างควบคุม สามารถคำนวณจากสมการดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลดัดแปลงวิธีจาก Girgih *et al.* (2011) ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ถูกละลายด้วย 0.1 โมลาร์ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทดสอบการออกฤทธิ์ด้วยการเปิดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 Well plate จากนั้นเติมสาร 3 มิลลิโมลาร์ของ 1,10-phenanthroline ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 3 มิลลิโมลาร์ของ FeSO₄ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร รวมทั้ง 0.01% Hydroperoxide ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร และอ่านค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 10 นาที จนครบ 1 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับกลูตาไรโอนและใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวอย่างควบคุม สามารถคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = [(\Delta A / \text{min})_{\text{control}} - (\Delta A / \text{min})_{\text{sample}}] / (\Delta A / \text{min})_{\text{control}} \times 100$$

การเกิดคีเลชันของโลหะดัดแปลงวิธีจาก Girgih *et al.* (2011) ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ถูกละลายในน้ำกลั่น ทดสอบการออกฤทธิ์ด้วยการเปิดตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน 96 Well plate จากนั้นเติมสาร 5 มิลลิโมลาร์ ของ Ferrozene ปริมาตร 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 925 ไมโครลิตร และ 2 มิลลิโมลาร์ของ FeCl₂ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกลูตาไรโอนและใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างควบคุม สามารถคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

ทั้งนี้การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่า EC₅₀ คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% โดยคำนวณจากกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างกับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้โปรแกรม Graph Pad 6.05

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ

การยับยั้ง Angiotensin-converting enzyme (ACE) ทดสอบด้วย ACE activity assay kit เติมตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ของ Tris-HCl buffer pH 7.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 Well plates จากนั้นเติมเอนไซม์ ACE ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ 0.5 มิลลิโมลาร์ของ FAPGG ปริมาตร 170 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 345 นาโนเมตร โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 1 นาที จนครบ 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับแคปโตพริลและใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวอย่างควบคุมการยับยั้งจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = [(slop_{\text{control}} - slop_{\text{sample}}) / slop_{\text{control}}] \times 100$$

การยับยั้ง Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) ทดสอบด้วย DPP-IV activity assay kit เติมตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่ละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ของ Tris-HCl buffer pH 8.0 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 Well plates จากนั้นเติมเอนไซม์ DPP-IV ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และซับสเตรท (0.75 มิลลิโมลาร์ของ Gly-Pro-p-NA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับ Tripeptide diprotin A (Ile-Pro-Ile) และใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวอย่างควบคุม สามารถคำนวณการยับยั้งจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = 1 - [(A_{\text{test sample}} - A_{\text{test sample blank}}) / (A_{\text{positive control}} - A_{\text{negative control}})] \times 100$$

เมื่อ $A_{\text{test sample}}$ คือ ตัวอย่าง+ซบสเตรท+เอนไซม์ DPP-IV
 $A_{\text{test sample blank}}$ คือ ตัวอย่างที่+ซบสเตรท+บัฟเฟอร์
 $A_{\text{positive control}}$ คือ บัฟเฟอร์+ซบสเตรท+เอนไซม์ DPP-IV
 $A_{\text{negative control}}$ คือ บัฟเฟอร์+สารตั้งต้น
 การยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ดัดแปลงจากวิธี
 ของ Awosika and Aluko (2019) ตัวอย่างแต่ละความ
 เข้มข้นที่ละลายใน 0.02 โมลาร์ ของโซเดียมฟอสเฟต
 บัฟเฟอร์ pH 6.9 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C.
 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ α -amylase
 ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ
 ละลายแข็ง 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 25°C. เป็นเวลา 10 นาที
 จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาณ 200 ไมโครลิตร
 (96 มิลลิโมลาร์ของ DNS, 2 โมลาร์ของ Sodium
 potassium tartrate tetrahydrate และ 2 โมลาร์ของ
 NaOH) และนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เมื่อสารละลายเย็น
 ตัวเติมน้ำกลั่น 3 มล. และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540
 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับอะคาโบสและคำนวณการ
 ยับยั้งจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = \frac{[A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}})]}{(A_{\text{control}})} \times 100$$

เมื่อ A_{control} คือ เติมบัฟเฟอร์แทนตัวอย่าง
 A_{sample} คือ ไม่เติมบัฟเฟอร์ และ
 $A_{\text{sample blank}}$ คือ เติมบัฟเฟอร์แทนเอนไซม์
 การยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ดัดแปลงวิธี
 จาก Awosika and Aluko (2019) เตรียมเอนไซม์อย่าง
 หยาบ (Rat intestinal acetone power) 300 มก.
 ละลายใน 0.9% NaCl ปริมาตร 9 มล. จากนั้นปั่นเหวี่ยง
 ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูด
 สารละลายส่วนใสและเก็บแช่แข็งรอจนกว่าจะนำมา
 วิเคราะห์ ปิเปิดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่ละลายใน
 0.1 โมลาร์ ของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9
 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 Well plates และเติม
 เอนไซม์อย่างหยาบ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C. เป็นเวลา
 10 นาที จากนั้นเติมซบสเตรท 5 มิลลิโมลาร์ ของ PNP-

glycoside ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืน
 แสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยอ่านค่าการ
 ดูดกลืนแสงทุก ๆ 30 วินาที จนครบ 30 นาที โดย
 เปรียบเทียบกับอะคาโบสและคำนวณการยับยั้งจาก
 สมการ ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = \frac{[(A_{\text{control}} - A_{\text{control blank}})/(A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}})] \times 100}$$

เมื่อ A_{control} คือ บัฟเฟอร์+เอนไซม์+ซบสเตรท
 $A_{\text{control blank}}$ คือ บัฟเฟอร์+ซบสเตรท
 A_{sample} คือ ตัวอย่าง+เอนไซม์+ซบสเตรท
 $A_{\text{sample blank}}$ คือ ตัวอย่าง+บัฟเฟอร์+ซบสเตรท
 ทั้งนี้การออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ แสดงด้วย
 ค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง
 เอนไซม์ 50% โดยคำนวณจากกราฟระหว่างความเข้มข้น
 ของตัวอย่างกับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้โปรแกรม
 Graph Pad 6.05

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ปริมาณโปรตีนและร้อยละผลผลิต

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของโปรตีน
 ไอโซเลท (SPI) โปรตีนไฮโดรไลเซท (SPH) และเปปไทด์
 ขนาดต่าง ๆ พบว่า SPI มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 91.23 ซึ่ง
 สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ SPH ซึ่งมีโปรตีนร้อยละ 90.16
 ในขณะที่เปปไทด์ขนาดต่ำกว่า 1, 1-3, 3-5 และ 5-10
 กิโลดาลตัน มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 59.00, 82.83,
 90.18 และ 90.09 ตามลำดับ ทั้งนี้ SPI ที่ได้มีปริมาณ
 โปรตีนสูง ซึ่งเหมาะแก่การนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนตั้งต้น
 ในการผลิต SPH (โปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80) โดย
 โปรตีนตั้งต้นจะช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์
 โปรติเอสให้มีความว่องไวมากยิ่งขึ้น (Zheng *et al.*,
 2015) นอกจากนี้เมื่อนำเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ มาวิเคราะห์
 ปริมาณโปรตีนพบว่า เปปไทด์ขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน
 มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด อาจเกิดจากการรวมกันของ

เปปไทด์กับสารละลาย NaOH ซึ่งส่งผลให้การละลายลดลงเมื่อทดสอบด้วยวิธี Lowry ซึ่งสอดคล้องกับจากงานวิจัยของ Adebiyi and Aluko (2011) รายงานว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 3 กิโลดาลตัน จะมีปริมาณโปรตีนลดลงซึ่งเกิดจากการปรากฏตัวของส่วนประกอบที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น โพลีฟีนอล ซึ่งมีผลต่อการขัดขวางการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและสารที่ใช้ติดตามปริมาณโปรตีน เมื่อพิจารณาร้อยละผลผลิตรวมทั้งหมดของเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ พบว่าเปปไทด์ทั้ง 4 กลุ่ม มีผลรวมของผลผลิตเท่ากับร้อยละ 47.31 ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่า SPH เนื่องจากเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 10 กิโลดาลตัน ไม่สามารถซึมผ่านเมมเบรนได้ จึงทำให้ผลรวมของผลผลิตของเปปไทด์ทั้ง 4 กลุ่ม มีปริมาณผลผลิตรวมต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ SPH ที่มีปริมาณผลผลิตร้อยละ 65.10

ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

การวิเคราะห์กรดอะมิโนมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่สำคัญในเชิงโภชนาการ นอกจากนี้กรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นยังช่วยสนับสนุนการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน (Awosika and Aluko, 2019) ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของ SPI, SPH และเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ พบว่า SPH มีกลูตามิกร้อยละ 10.76 และแอสปาร์ติกร้อยละ 10.04 สูงขึ้น โดยกรดอะมิโนทั้งสองจัดเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสอร่อย และ SPH พบกรดอะมิโนชนิดจำเป็นมากกว่า SPI

ได้แก่ วาลีน เมไทโอนีน ไอโซลูซีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ฮีสทีดีน ไลซีน และทริปโตเฟน นอกจากนี้เปปไทด์ทั้ง 4 กลุ่ม มีปริมาณกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำและกรดอะมิโนอะโรมาติกเพิ่มขึ้น เช่น อะลานีน ลิวซีน ไอโซลูซีน ฟีนิลอะลานีน เมื่อเทียบกับกรดอะมิโนอิสระของ SPI (Table 1) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดผสมระหว่าง Endo-exo peptidases ส่งผลให้สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้ทั้งภายในสายและปลายสายของโปรตีน ทำให้มีระดับการย่อยสลายเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือกรดอะมิโนอิสระที่หลากหลายมากกว่า เอนไซม์ที่เป็น Endopeptidases ที่ย่อยสลายภายในสายเพียงอย่างเดียว ในขณะที่เดียวกันปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ลดลงอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของอะมิโนเป็นรูปแบบอื่น (Theerakarunwong *et al.*, 2021) นอกจากนี้เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ มักมีลำดับกรดอะมิโนสายสั้น ๆ 2-20 ตัว ซึ่งสามารถจับกับบริเวณที่ออกฤทธิ์ได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับเปปไทด์สายยาว (Awosika and Aluko, 2019) โดยกรดอะมิโนอิสระเหล่านี้ช่วยส่งเสริมการออกฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ (Fasuan *et al.*, 2018) ขณะที่ Udenigwe and Aluko (2011) ระบุว่ากรดกลูตามิกและกรดแอสปาร์ติกมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่แข็งแกร่ง เนื่องจากสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ

Table 1 Amino acid compositions (%) of SPI, SPH and fractionated peptides

Amino acid	SPI	SPH	<1 kDa	1-3 kDa	3-5 kDa	5-10 kDa
Aspartic acid	7.61 ^b	10.04 (2.43) ^a	3.96 (-3.65) ^e	2.15 (-5.46) ^f	5.14 (-2.47) ^d	5.38 (-2.23) ^c
Threonine*	3.74 ^b	3.53 (-0.21) ^c	4.97 (1.23) ^a	2.50 (-1.24) ^f	3.33 (-0.41) ^d	2.76 (-0.98) ^e
Serine	3.40 ^e	5.31 (1.91) ^b	5.69 (2.29) ^a	3.27 (-0.13) ^f	4.08 (0.68) ^d	4.70 (1.30) ^c
Glutamic acid	9.09 ^d	10.76 (1.67) ^b	9.92 (0.83) ^c	6.93 (-2.16) ^f	8.02 (-1.07) ^e	11.84 (2.75) ^a
Proline	2.76 ^d	3.22 (0.46) ^b	4.87 (2.11) ^a	3.11 (0.35) ^c	2.79 (0.03) ^d	2.04 (-0.72) ^e
Glycine	3.42 ^c	4.25 (0.83) ^b	4.96 (1.54) ^a	2.12 (-1.30) ^e	2.61 (-0.81) ^d	1.07 (-2.35) ^f
Alanine	2.15 ^f	3.09 (0.94) ^d	3.91 (1.76) ^a	2.72 (0.57) ^e	3.24 (1.09) ^c	3.85 (1.70) ^b
Cysteine	1.10 ^c	1.16 (0.06) ^b	1.22 (0.12) ^a	1.13 (0.03) ^b	1.21 (0.11) ^a	0.85 (-0.25) ^d
Valine*	3.06 ^d	4.16 (1.10) ^c	5.54 (2.48) ^a	4.87 (1.81) ^b	1.96 (-1.10) ^e	1.56 (-1.50) ^f
Methionine*	0.53 ^e	1.01 (0.48) ^b	1.72 (1.19) ^a	0.51 (-0.02) ^e	0.67 (0.14) ^d	0.84 (0.31) ^c
Isoleucine*	2.10 ^f	3.16 (1.06) ^c	5.02 (2.92) ^a	2.55 (0.45) ^e	3.18 (1.08) ^d	3.83 (1.73) ^b
Leucine*	3.31 ^d	5.12 (1.81) ^b	7.12 (3.81) ^a	4.46 (1.15) ^c	5.11 (1.80) ^b	5.03 (1.72) ^b
Tyrosine	2.50 ^f	3.43 (0.93) ^e	5.19 (2.69) ^a	3.70 (1.20) ^d	4.46 (1.96) ^c	4.56 (2.06) ^b
Phenylalanine*	1.02 ^f	1.35 (0.33) ^d	2.39 (1.37) ^a	1.81 (0.79) ^c	1.10 (0.08) ^e	2.22 (1.20) ^b
Histidine*	1.11 ^f	2.06 (0.95) ^c	3.57 (2.46) ^a	1.23 (0.12) ^e	1.51 (0.04) ^d	2.54 (1.43) ^b
Lysine*	2.20 ^f	3.57 (1.37) ^b	4.54 (2.34) ^a	2.54 (0.34) ^d	2.82 (0.62) ^c	2.42 (0.22) ^e
Arginine	4.92 ^f	8.14 (3.22) ^b	5.01 (0.09) ^e	6.22 (1.30) ^c	5.77 (0.85) ^d	8.73 (3.81) ^a
Tryptophan*	0.96 ^e	1.55 (2.44) ^d	2.44 (1.48) ^b	2.17 (1.21) ^c	2.57 (1.61) ^a	2.11 (1.15) ^c

*Essential amino acid, SPI (sacha inchi protein isolate) and SPH (sacha inchi protein hydrolysate); The information in parentheses means the difference of datas when compared to SPI. For each row, data values that contain different alphabets are significantly different at $p < 0.05$.

ระดับการย่อยสลาย

ผลการศึกษาระยะเวลาต่อระดับการย่อยสลายของ SPH ภายใต้สภาวะที่กำหนดและตรวจสอบระดับการย่อยสลายที่ระยะเวลา 30 ถึง 240 นาที พบว่าการย่อยสลาย SPH ในช่วง 120 นาทีแรก มีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Figure 1) เนื่องจาก SPH มีโปรตีนกลูบูลินและอัลบูมินเป็นกลุ่มโปรตีนหลัก (Sathe *et al.*, 2012) ซึ่งโปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้สามารถละลายได้ดีในน้ำและน้ำเกลือ จึงถูกไฮโดรไลซ์อย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาแรก ๆ ของการเกิดปฏิกิริยา (Parrado *et al.*,

1993) แต่เมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้นจาก 120 นาที พบว่าระดับการย่อยสลายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากกลุ่มของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดีที่เป็นสับสเตรทถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ทำให้ได้เปปไทด์สายสั้น ๆ หรือกรดอะมิโนอิสระ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ได้อีก ทำให้สับสเตรทไม่เพียงพอต่อเอนไซม์หรือเกิด Product inhibition ซึ่งส่งผลให้ค่าระดับการย่อยสลายคงที่ (Jack and Mona, 1966) อย่างไรก็ตามพบว่า ระดับการย่อยสลายของ SPH มีระดับการย่อยสลายสูงสุดเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนเป็นระยะเวลา 240 นาที เมื่อ

เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Chirinos *et al.* (2020) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเมล็ดดาวอินคาที่สกัดน้ำมันด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีระดับการย่อยสลายต่ำกว่าร้อยละ 5 ทั้งนี้ประสิทธิภาพ

ในการย่อยที่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากวัตถุดิบที่นำมาใช้ ขั้นตอนการย่อย โครงสร้างโปรตีน องค์ประกอบ และ/หรือลำดับกรดอะมิโน (Barbana and Boye, 2010)

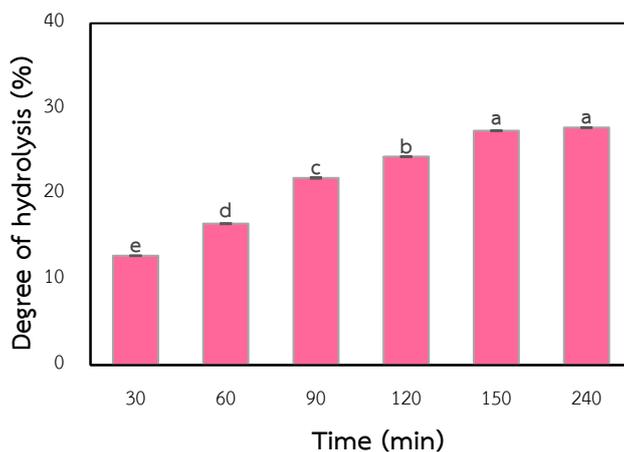


Figure 1 Degree of hydrolysis of sachinchi protein hydrolysate (SPH) after 240 min of reaction; For each plot, bars with different alphabets have mean values that are significantly ($p < 0.05$) different.

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

EC₅₀ เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ กล่าวคือ EC₅₀ ต่ำบ่งชี้ถึงกิจกรรมการขจัดอนุมูลอิสระสูง พบว่าเปปไทด์ขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพขจัดอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลไฮดรอกซิลสูงสุดด้วยค่า EC₅₀ เท่ากับ 0.97 และ 0.39 มก./มล. ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า SPH และเปปไทด์มีความสามารถดักจับอนุมูลอิสระของโลหะได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลูตาไธโอนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Table 2) ทั้งนี้อนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อกระบวนการเสื่อมของเซลล์และการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของสมอง โรคเบาหวาน โรคกล้ามเนื้อหัวใจ และโรคหลอดเลือดหัวใจ (Lepping *et al.*, 2011) การมีอยู่ของกรดอะมิโนบางชนิด เช่น ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน

เมไทโอนีน ฮิสติดีน และทริปโตเฟน มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Udenigwe and Aluko, 2011) จากการพิจารณา Table 1 พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน มีกรดอะมิโนดังกล่าวสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ ผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Girgih *et al.* (2011) พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด นอกจากนี้การมีอยู่ของไลซีน ฮิสติดีน และอาร์จินีน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจับอนุมูลอิสระของโลหะได้ดี (Saiga *et al.*, 2003) จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเปปไทด์ที่ช่วยลดปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ไม่ให้ส่งผลกระทบต่อระดับของการทำลายโครงสร้างและหน้าที่ของสารชีวโมเลกุล ไม่ว่าจะเป็นไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ ซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิด

โรคได้ นอกจากนี้เปปไทด์สายสั้นสามารถดูดซึมและสามารถจับกับบริเวณไซต์แอคทีฟได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับเปปไทด์สายยาว (Awosika and Aluko, 2019) จึง

ส่งผลให้เปปไทด์สายสั้น (ต่ำกว่า 10 กิโลดาลตัน) มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์สายยาว (SPH และ SPI)

Table 2 Antioxidant and biochemical properties of SPI, SPH and fractionated peptides

Sample	EC ₅₀ (mg/ml)			IC ₅₀ (mg/ml)			
	DPPH	HSRA	Fe ²⁺ chelating	ACE-inhibition	DPP-IV inhibition	α-amylase	α-glucosidase
SPI	4.05 ^a	0.87 ^a	5.55 ^a	5.14 ^a	11.83 ^a	6.13 ^a	4.11 ^a
SPH	1.89 ^c	0.56 ^b	1.91 ^c	3.75 ^b	7.45 ^b	5.64 ^b	4.03 ^b
<1 kDa	0.97 ^f	0.39 ^d	1.50 ^f	1.56 ^f	2.31 ^f	3.77 ^f	1.84 ^f
1-3 kDa	1.37 ^e	0.44 ^c	1.61 ^e	1.80 ^e	4.10 ^e	3.82 ^e	2.05 ^e
3-5 kDa	1.58 ^d	0.41 ^c	1.54 ^f	1.95 ^d	5.69 ^d	4.05 ^d	3.23 ^d
5-10 kDa	1.93 ^b	0.50 ^b	1.82 ^d	3.16 ^c	7.09 ^c	5.18 ^c	3.47 ^c
Standard	0.31 ^g	0.17 ^e	3.45 ^b	0.47 ^g	0.73 ^g	0.21 ^g	0.46 ^g

SPI (sacha inchi protein isolate) and SPH (sacha inchi protein hydrolysate); Reference standard; antioxidant activity is glutathione (GSH). ACE-inhibition is captopril. DPP-IV inhibition is tripeptide diprotin. A (Ile-Pro-Ile), α-amylase and α-glucosidase are acarbose. For each column, data values that contain different alphabets are significantly different at p<0.05.

ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน มีฤทธิ์การยับยั้ง ACE (IC₅₀=1.56 มก./มล.) สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ DPP-IV เอนไซม์ α-amylase และเอนไซม์ α-glucosidase โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.31, 3.77 และ 1.84 มก./มล. ตามลำดับ (Table 2) ทั้งนี้เปปไทด์จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งที่มีโครงสร้างคล้ายกับสารตั้งต้นและเข้าไปเกาะบริเวณแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์ ทำให้สารตั้งต้นไม่สามารถเข้าไปเกาะบริเวณแอคทีฟไซต์ จึงสามารถช่วยระงับอาการหรือลดภาวะการเกิดโรคของผู้ป่วยได้ (Aluko, 2019) นอกจากนี้เปปไทด์สายสั้นสามารถเข้าสู่บริเวณไซต์แอคทีฟของเอนไซม์ได้ง่าย และมีโอกาสในการดูดซึมในลำไส้ได้มากขึ้น (โดยไม่ทำให้โครงสร้างเกิดความ

เสียหาย) เมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์สายยาว และปริมาณกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำสามารถเพิ่มการออกฤทธิ์ทางชีวเคมีได้ดีกว่าเปปไทด์สายยาว (Aluko, 2019) นอกจากนี้กรดอะมิโนทริปโตเฟน ฟีนิลอะลานีน และอะลานีน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการการยับยั้งเอนไซม์ DPP-IV (Lan et al., 2015) และการยับยั้งเอนไซม์ α-amylase และ α-glucosidase ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วนได้ (Malomo et al., 2015)

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทและเปปไทด์ในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเปปไทด์ขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพขจัดอนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลไฮดรอกซิล และมี

ความสามารถดักจับอออนของโลหะได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ขนาดอื่น ๆ รวมถึง SPH และ SPI นอกจากนี้เปปไทด์สายสั้น (ขนาดต่ำกว่า 10 กิโลดาลตัน) สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น ยับยั้งเอนไซม์ ACE (โรคความดันโลหิตสูง) เอนไซม์ DPP-IV (โรคเบาหวานชนิดที่ 2) เอนไซม์ α -amylase และ เอนไซม์ α -glucosidase (โรคอ้วน) พบว่าเปปไทด์ขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.56, 2.31, 3.77 และ 1.84 มก./มล. ตามลำดับ นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซทและเปปไทด์สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และยังสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับกากเมล็ดดาวอินคาซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมัน อย่างไรก็ตาม การนำสารสกัดจากพืชมาใช้ทดแทนยาสังเคราะห์ จำเป็นต้องมีการศึกษาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะดำเนินการในลำดับต่อไป เพื่อสร้างโอกาสในการพัฒนารักษาโรคในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณตัวอย่างกากเมล็ดดาวอินคาที่ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท ไทย.ซี.เอ็ม.เอส สแตนดาร์ด อินดัสเตรียล จำกัด จังหวัดเชียงราย ตลอดจนห้องปฏิบัติการสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เอกสารอ้างอิง

- Adebiji, A.P. and R.E. Aluko. 2011. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. **Food Chem.** 128(4): 902-908.
- Aluko, R.E. 2019. Food protein-derived renin-inhibitory peptides: in vitro and in vivo properties. **J. Food Biochem.** 43: e12648.
- Awosika, T.O. and R.E. Aluko. 2019. Inhibition of the in vitro activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates. **Int. J. Food Sci. Technol.** 54(6): 2021-2034.
- Barbana, C. and J.I. Boye. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. **Food Res. Int.** 43(6): 1642-1649.
- Chirinos, R., R. Pedreschi and D. Campos. 2020. Enzyme-assisted hydrolysates from sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) protein with in vitro antioxidant and antihypertensive properties. **J. Food Process. Preserv.** 44(12): e14969.

- Connolly, A., M.B. O'Keeffe, C.O. Piggott, A.B. Nongonierma and R.J. FitzGerald. 2015. Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers' spent grain protein isolate. **Food Chem.** 176: 64-71.
- Fasuan, T.O., S.O. Gbadamosi and T.O. Omobuwajo. 2018. Characterization of protein isolate from *Sesamum indicum* seed: In vitro protein digestibility, amino acid profile, and some functional properties. **Food Sci. Nutr.** 6(6): 1715-1723.
- Foh, M.B.K., I. Amadou, B.M. Foh, M.T. Kamara and W. Xia. 2010. Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. **Int. J. Mol. Sci.** 11(4): 1851-1869.
- Girgih, A.T., C.C. Udenigwe and R.E. Aluko. 2011. In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 88(3): 381-389.
- Han, R., J. Maycock, B.S. Murray and C. Boesch. 2019. Identification of angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides derived from oilseed proteins using two integrated bioinformatic approaches. **Food Res Int.** 115: 283-291.
- Jack, F.K. and I. Mona. 1966. The kinetics of the papain-catalyzed hydrolysis of esters of carbobenzoxyglycine evidence for an acyl-enzyme Intermediate. **J. Biochem.** 5(2): 783-791.
- Jagersberger, J. 2013. **Development of Novel Products on Basis of Sacha Inchi-Use of Press Cakes and Hulls.** Austria: University of Vienna. 125 p.
- Lan, V.T., K. Ito, M. Ohno, T. Motoyama, S. Ito and Y. Kawarasaki. 2015. Analyzing a dipeptide library to identify human dipeptidyl peptidase IV inhibitor. **Food Chem.** 175: 66-73.
- Landry, J. and S. Delhaye. 1992. Simplified procedure for the determination of tryptophan of foods and feedstuffs from barytic hydrolysis. **J. Agric. Food Chem.** 40(5): 776-779.
- Lepping, P., J. Delieu, R. Mellor, J.H.H. Williams, P.R. Hudson and C. Hunter-Lavin. 2011. Antipsychotic medication and oxidative cell stress: A systematic review. **J. Clin. Psychiatry.** 72(3): 273-285.
- Malomo, S.A., J.O. John, A.T. Girgih and R.E. Aluko. 2015. Structural and antihypertensive properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. **Nutrients** 7(9): 7616-7632.
- Markwell, M.A.K., S.M. Haas, L.L. Bieber and N.E. Tolbert. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Anal. Biochem.** 87(1): 206-210.

- Maurer, N.E., B. Hatta-Sakoda, G. Pascual-Chagman and L.E. Rodriguez-Saona. 2012. Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. **Food Chem.** 134(2): 1173-1180.
- Parrado, J., F. Millan, I. Hernandez-Pinzon, J. Bautista and A. Machado. 1993. Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolyzates. **J. Agric. Food Chem.** 41(11): 1821-1825.
- Saiga, A., S. Tanabe and T. Nishimura. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **J. Agric. Food Chem.** 51(12): 3661-3667.
- Santos, P.M., D.L.J. Batista, L.A.F. Ribeiro, E.F. Boffo, M.D. Cerqueira, D. Martins, R.D. Castro, L.C. Souza-Neta, E. Pinto, L. Zambotti-Villelae, P. Colepicoloe, L.G. Fernandez, G.A.B. Canuto and P.R. Ribeiro. 2018. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds from the oilseed crop *Ricinus communis* using a multiplatform metabolite profiling approach. **Ind. Crops Prod.** 124(15): 834-844.
- Sathe, S.K., H.H. Kshirsagar and G.M. Sharma. 2012. Solubilization, fractionation, and electrophoretic characterization of Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.) proteins. **Plant Foods Hum. Nutr.** 67(3): 247-255.
- Theerakarunwong, P., P. Sanporkha, C. Hattakosol and N. Laohakulchit. 2021. Effect of flavozyme concentration and degradation time on chemical properties-physic of protein hydrolyzate from sacha inchi meal. **Prawarun Agr. J.** 18(2): 69-79. [in Thai]
- Udenigwe, C.C. and R.E. Aluko. 2011. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. **Int. J. Mol. Sci.** 12(5): 3148-3161.
- Wang, S., F. Zhu and Y. Kakuda. 2018. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. **Food Chem.** 265: 316-328.
- Zheng, L., Y. Zhao, C. Xiao, D. Sun-Waterhouse, M. Zhao and G. Su. 2015. Mechanism of the discrepancy in the enzymatic hydrolysis efficiency between defatted peanut flour and peanut protein isolate by flavorzyme. **Food Chem.** 168: 100-106.