

การเพิ่มศักยภาพของโปรตีนจิ้งหรีดด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
และการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วนและโรคเบาหวานชนิดที่ 2

Hydrolysis-Enhanced Cricket (*Acheta domesticus*) Proteins with Improved
Antioxidant Capacity and Inhibitory Effects on Enzymes Related to Obesity
and Type 2 Diabetes

จันทร์จิรา วันชนะ¹ สุมิตร เชื้อมชัยตระกูล¹ กาญจนา นาคประสม² ปังกร ส่างสวัสดิ์³
และศรัญญา สุวรรณอังกู^{1,*}

Janjira Wanchana¹, Sumit Chueamchaitrakun¹, Kanjana Narkprasom²
Papungkorn Sangsawad³ and Saranya Suwanangul^{1,*}

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²สาขาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

³สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

¹Program of Food Science and Technology, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University
Chiang Mai, Thailand 50290

²Program in Food Engineering, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

³School of Animal Technology and Innovation, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima, Thailand 30000

*Corresponding author: saranya_sw@mju.ac.th

*ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4096-3285>.

Abstract

Received: November 03, 2025

Revised: January 20, 2026

Accepted: January 27, 2026

This study aimed to enhance the functional and bioactive properties of house-cricket (*Acheta domesticus*) proteins via enzymatic hydrolysis. Three enzymes, Alcalase, Flavourzyme, and Neutrase, were evaluated and compared based on their antioxidant activity and their ability to inhibit carbohydrate-metabolizing enzymes (DPP-IV, alpha-amylase, alpha-glucosidase). Hydrolysates produced with Alcalase exhibited the highest degree of hydrolysis (DH=22.36%) and the greatest proportion of low-molecular-weight peptides (<3 kDa), resulting in superior activities, i.e., lower EC₅₀ values in antioxidant assays and lower IC₅₀ values against the target enzymes, relative to Flavourzyme- and Neutrase-derived hydrolysates. These findings indicate a positive association between DH/low-MW peptide proportion and the bioactivity of cricket protein hydrolysates under the present conditions. Collectively, the results identified Alcalase as the most promising protease for upgrading the nutritional value and enhancing

the biofunctional efficacy of cricket proteins, supporting their application as ingredients in functional foods or nutraceutical formulations.

Keywords: hydrolysis, cricket protein, obesity, type 2 diabetes, antioxidant activity

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มศักยภาพของโปรตีนจากจิ้งหรีดบ้าน (*Acheta domesticus*) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์อัลคาเลส ฟลาโวไซม์ และนิวเทรส ต่อสมบัติเชิงฟังก์ชันและฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์เมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต (DPP-IV, alpha-amylase, alpha-glucosidase) ผลการทดลองพบว่าไฮโดรไลเสตจากอัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายสูงที่สุด (DH=22.36%) และมีสัดส่วนเปปไทด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (<3 kDa) มากที่สุด ส่งผลให้มีประสิทธิภาพเด่นในการต้านอนุมูลอิสระ (ค่า EC₅₀ ต่ำ) และการยับยั้งเอนไซม์เมแทบอลิซึม (ค่า IC₅₀ ต่ำ) เมื่อเทียบกับไฮโดรไลเสตจากฟลาโวไซม์และนิวเทรส ผลลัพธ์สะท้อนความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างค่า DH และสัดส่วนเปปไทด์ขนาดเล็กกับศักยภาพทางชีวภาพของโปรตีนจิ้งหรีด ดังนั้น เอนไซม์อัลคาเลสเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพสูงที่สุดในการเพิ่มคุณค่าเชิงโภชนาการ และเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนจิ้งหรีด เพื่อการประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันหรือโภชนเภสัช

คำสำคัญ: การไฮโดรไลซิส โปรตีนจิ้งหรีด โรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคอ้วน สารต้านอนุมูลอิสระ

บทนำ

การเพิ่มขึ้นของประชากรโลกที่คาดว่าจะสูงถึงประมาณ 10,000 ล้านคน ภายในปี ค.ศ. 2050 ส่งผลให้

ความต้องการโปรตีนเพื่อการบริโภคเพิ่มขึ้นกว่า 70% เมื่อเปรียบเทียบกับปัจจุบัน (Hamad and Tayel, 2025) ขณะที่แหล่งโปรตีนจากสัตว์ไม่สามารถรองรับความต้องการดังกล่าวได้อย่างยั่งยืน เนื่องจากการผลิตเนื้อสัตว์ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรง ทั้งการปล่อยก๊าซเรือนกระจก การใช้น้ำ และพื้นที่เลี้ยงสัตว์ การแสวงหาแหล่งโปรตีนทางเลือกจึงเป็นประเด็นเร่งด่วนในระดับโลก หนึ่งในแนวทางที่ได้รับความนิยมอย่างมาก คือ การใช้แมลงกินได้ (edible insects) ซึ่งมีศักยภาพสูงในฐานะแหล่งโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Anyasi *et al.*, 2025)

ในบรรดาแมลงกินได้ จิ้งหรีดบ้าน (*Acheta domesticus*) ถือเป็นหนึ่งในชนิดที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากมีโปรตีนสูงถึง 60–70% ของน้ำหนักแห้ง พร้อมทั้งมีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน รวมทั้งไขมันเชิงไม่อิ่มตัว วิตามิน และแร่ธาตุสำคัญ (Chanadang *et al.*, 2024) ประเทศไทยมีศักยภาพโดดเด่นในด้านการเพาะเลี้ยงจิ้งหรีดเชิงพาณิชย์จากความเหมาะสมของภูมิอากาศและวัฒนธรรมการบริโภคเดิม ส่งผลให้ประเทศไทยกลายเป็นหนึ่งในผู้ผลิตโปรตีนจากแมลงรายสำคัญในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การนำจิ้งหรีดมาแปรรูปเป็นผงโปรตีนได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น เพื่อให้เหมาะกับผู้บริโภคที่ไม่นิยมบริโภคแมลงในรูปตัว โดยผงโปรตีนจิ้งหรีดได้รับการยกย่องว่าเป็นแหล่ง “clean protein” ที่มีศักยภาพในการใช้เป็นส่วนผสมอาหารฟังก์ชัน

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มคุณสมบัติ ทั้งทางกายภาพและทางชีวภาพของโปรตีนจากแหล่งต่าง ๆ (Suwanangul *et al.*, 2021) กระบวนการดังกล่าวสามารถ

สร้างเปปไทด์สายสั้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตได้อย่างมีนัยสำคัญ กลไกของการเพิ่มฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชัน เช่น Tyr, Trp, Cys และ His ซึ่งสามารถบริจาคอิเล็กตรอนให้อนุมูลอิสระ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีน ที่เอื้อต่อการจับกับตำแหน่งออกฤทธิ์ของเอนไซม์ได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับโปรตีนจากจิ้งหรีด (*Acheta domesticus*) ภายหลังจากไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ต่อศึกษาทางชีวภาพยังมีจำกัด โดยเฉพาะต่อกลไกการยับยั้งเอนไซม์เมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วนและเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ alpha-amylase, alpha-glucosidase และ dipeptidyl peptidase-IV (DPP-4) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยและดูดซึมน้ำตาลในระบบทางเดินอาหาร การยับยั้งเอนไซม์เหล่านี้จึงเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมระดับกลูโคสและลดความเสี่ยงต่อภาวะดื้ออินซูลิน (Suwanangul *et al.*, 2021)

อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังขาดรายงานเชิงเปรียบเทียบที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีนจิ้งหรีดบ้าน กับศักยภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งในด้านการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์เมตาบอลิซึมภายใต้ระบบการศึกษาเดียวกัน การทำความเข้าใจความเชื่อมโยงดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการกำหนดเงื่อนไขการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดต่อกลไกทางสรีรวิทยา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของกระบวนการไฮโดรไลซิสต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีนจากจิ้งหรีดบ้าน โดยเฉพาะการเสริมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์เมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วนและโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ผลการศึกษานี้สามารถช่วยอธิบายกลไกของการเพิ่มศักยภาพทางชีวภาพของโปรตีนจิ้งหรีดภายหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลเสตจากแมลง

ให้เป็นวัตถุดิบต้นแบบสำหรับอาหารฟังก์ชัน และผลิตภัณฑ์สุขภาพเชิงโภชนเภสัชในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากจิ้งหรีดบ้าน

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากจิ้งหรีดบ้าน (Cricket Protein Hydrolysate; CPH) ดัดแปลงจากวิธีของ Suwanangul *et al.* (2021) โดยละลายผงโปรตีนคอนเซนเทรตจากจิ้งหรีดบ้านในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (w/v) จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50–55°C และปรับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดด้วยสารละลาย 2M NaOH เพื่อให้ครอบคลุมการย่อยโปรตีนทั้งในลักษณะเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดส จึงเลือกใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase® 2.4L from *Bacillus licheniformis*) เอนไซม์ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme from *Aspergillus oryzae*) และเอนไซม์นิวเทรซ (Neutrase® 0.8L from *Bacillus amyloliquefaciens*) โดยเติมเอนไซม์ในอัตราร้อยละ 3 (w/w) และย่อยภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ เอนไซม์อัลคาเลส ปรับ pH 8.0 ย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 55°C เอนไซม์ฟลาโวไซม์ ปรับ pH 6.5 ย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 50°C และเอนไซม์นิวเทรซ ปรับ pH 7.0 ย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 55°C ตามลำดับ ระหว่างการย่อยกวนสารละลายด้วยเครื่อง Overhead stirrer ที่ความเร็ว 350 รอบต่อนาที พร้อมควบคุมค่า pH และอุณหภูมิให้คงที่ตลอดระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการให้ความร้อนในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ปลดปล่อยให้เย็น จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยออก ส่วนของสารละลายใส (supernatant) ซึ่งเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตถูกนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้เป็นผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 3 ชนิด

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis: DH) ด้วยวิธี OPA assay

วิธีวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของโปรตีน (DH) ดัดแปลงจากวิธีของ Suwanangul and Ruttarattanamongkol (2022) โดยเตรียมสารละลาย OPA reagent ดังนี้ ผสมโซเดียมเตตระโบเรต 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลายโซเดียมเตตระโบเรตเคคาไฮเดรต 20% ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำ o-Phthalaldehyde (OPA) ปริมาณ 20 มิลลิกรัม และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในเมทานอล แล้วปรับปริมาตรรวมเป็น 500 ไมโครลิตร นำ OPA reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต 10 ไมโครลิตร ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของ CPH ให้ทำการย่อยตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 M ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ขนาดเปปไทด์

ขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากจิ้งหรีด วิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแยกตามขนาดโมเลกุล (Size-Exclusion Chromatography: SEC) ตามวิธีการของ Sangsawad *et al.* (2022) โดยฉีดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ Superdex Peptide 10/300 GL ที่เชื่อมต่อกับระบบ Fast Protein Liquid Chromatography: FPLC (ÄKTA Pure, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร มาตรฐานที่ใช้สำหรับกำหนดน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ cytochrome c (12,384 Da), aprotinin (6,512 Da), AGNQVLNLQADLPK (1,480.6 Da), MILLLFR (1,095 Da), Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (429.47 Da) และ tyrosine (181.19 Da)

ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ดัดแปลงจาก Suwanangul *et al.* (2025) โดยเตรียมสารละลาย DPPH reagent ด้วยการละลาย DPPH 0.0040 กรัม ในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตัวอย่างถูกละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (pH 7.0) ที่มี Triton X-100 จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH reagent 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมของแผ่น 96-well plate บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้กลูตาไธโอนเป็นสารมาตรฐาน และใช้บัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุม

การทดสอบการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical scavenging assay) ดัดแปลงจาก Suwanangul *et al.* (2025) ตัวอย่างถูกละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (pH 7.4) แล้วเปิดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของแผ่น 96-well plate เติมน้ำ 1,10-phenanthroline 3 มิลลิโมลาร์ สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต 3 มิลลิโมลาร์ และสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.01% อย่างละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกลูตาไธโอนและใช้บัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุม

การทดสอบการเกิดคีเลชันของโลหะ (metal chelating activity) ดัดแปลงจาก Suwanangul *et al.* (2023) โดยละลายตัวอย่างในน้ำกลั่น แล้วเปิดตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ลงในหลุมของแผ่น 96-well plate เติมน้ำ สารละลายเฟอร์โรซีน 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 925 ไมโครลิตร และสารละลาย FeCl₂ 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร โดยใช้กลูตาไธโอนเป็นสารมาตรฐานและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม

การทดสอบด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power ดัดแปลงจาก Suwanangul *et al.* (2021) โดยเตรียมสารละลาย FRAP reagent จากการผสมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 300 มิลลิโมลาร์ (pH 3.6) เฟอร์ริกคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย TPTZ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร ลงในหลุมของแผ่น 96-well plate เติม FRAP reagent 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารเฟอร์รัสซัลเฟต (0.0625–1 มิลลิโมลาร์)

ค่าการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่า EC₅₀ ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 โดยคำนวณจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วนและโรคเบาหวานชนิดที่ 2

การยับยั้งเอนไซม์ Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) ทดสอบด้วย DPP-IV activity assay kit โดยละลายตัวอย่างในสารละลาย Tris-HCl buffer 100 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) ปิเปตตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมของแผ่น 96-well plate เติมเอนไซม์ DPP-IV ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และสารละลายซับสเตรต (Gly-Pro-p-NA 0.75 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดยใช้ tripeptide Diprotin A (Ile-Pro-Ile) เป็นสารอ้างอิง และใช้บัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุม

การยับยั้งเอนไซม์ alpha-amylase ดัดแปลงจากวิธีของ Suwanangul *et al.* (2021) โดยละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 6.9) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 10 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ alpha-amylase (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายแป้ง 100 ไมโครลิตร บ่มต่อที่ 25°C 10 นาที ก่อนเติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย DNS 96 มิลลิโมลาร์, sodium potassium tartrate tetrahydrate 2 โมลาร์ และ NaOH 2 โมลาร์) แล้วให้ความร้อนในน้ำเดือด 5 นาที หลังจากเย็นตัวลงเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

การยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase ดัดแปลงวิธีของ Suwanangul *et al.* (2021) เตรียมเอนไซม์อย่างหยาบ (rat intestinal acetone power) 300 มิลลิกรัม ละลายใน 0.9% โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที 30 นาที จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใสและแช่แข็งไว้จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ ระหว่างการทดสอบ ปิเปตตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (pH 6.9) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 10 นาที แล้วเติมซับสเตรต PNP-glycoside 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ทั้งนี้ ผลการยับยั้งเอนไซม์แสดงด้วยค่า IC₅₀ ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 โดยคำนวณจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเอนไซม์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 20

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ระดับการย่อยสลายของโปรตีน (DH)

ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากจิ้งหรีดบ้าน ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส เอนไซม์ฟลาโวไซม์ และเอนไซม์นิวเทรส ดังแสดงใน Figure 1 พบว่า เอนไซม์อัลคาเลส ให้ค่า DH สูงที่สุด (22.36%) รองลงมา คือ เอนไซม์ฟลาโวไซม์ (16.48%) และเอนไซม์นิวเทรส (10.92%) ตามลำดับ โดยค่า DH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลนี้ยืนยันว่า ชนิดของเอนไซม์เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ma *et al.* (2023) ที่ระบุว่าเอนไซม์ในกลุ่ม serine endopeptidase เช่น เอนไซม์อัลคาเลส มีประสิทธิภาพสูงในการตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีน โดยเฉพาะบริเวณที่มีกรดอะมิโน

ไม่ชอบน้ำ เช่น Leucine, Phenylalanine และ Tyrosine ส่งผลให้เกิดการแตกตัวของสายโปรตีนเป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก สั้นมากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ในขณะที่เอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีทั้ง endo- และ exopeptidase activity จึงให้ค่า DH ปานกลาง สำหรับเอนไซม์นิวเทรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ neutral metalloprotease มักแสดงกิจกรรมต่ำกว่า ในสภาวะ pH 7-8 ที่ใช้ในการทดลอง ระดับการย่อยที่สูงขึ้นของเอนไซม์อัลคาเลส สะท้อนถึงการปลดปล่อยหมู่อะมิโนอิสระจำนวนมาก ซึ่งสัมพันธ์กับการได้เปปไทด์น้ำหนักรวมเฉลี่ยต่ำ และความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น (Mishyna *et al.*, 2021) ดังนั้น ความแตกต่างของค่า DH จึงสะท้อนถึงระดับการแตกตัวของสายโปรตีน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดรูปแบบการกระจายขนาดโมเลกุลของเปปไทด์

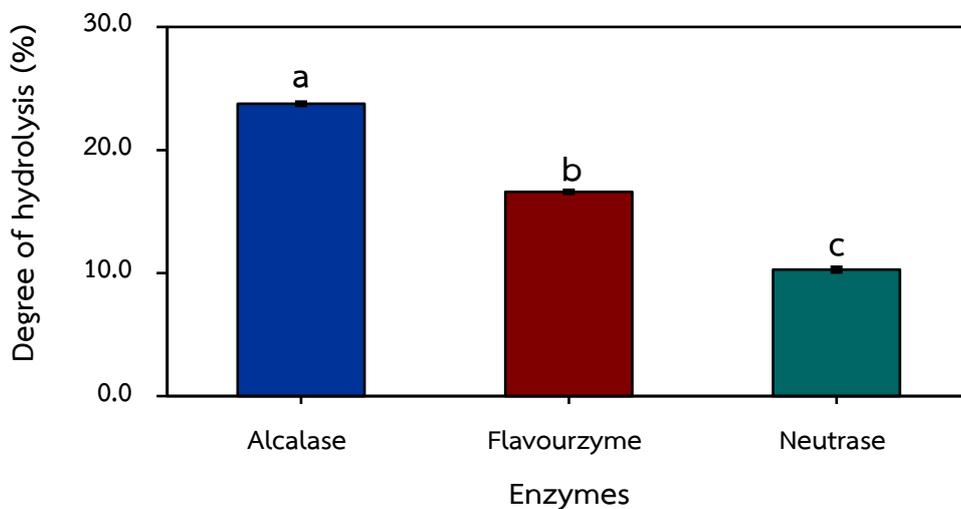


Figure 1 Degree of hydrolysis of cricket protein hydrolysates prepared using different proteolytic enzymes. Bars with different letters indicate significant differences among treatments ($p < 0.05$).

ขนาดโมเลกุลของเปปไทด์

ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากเอนไซม์อัลคาเลส เอนไซม์ฟลาโวไซม์ และเอนไซม์นิวเทรส แสดงดัง Figure 2

พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดให้โปรไฟล์โครมาโทแกรมที่แตกต่างอย่างชัดเจน ซึ่งสะท้อนถึงความสามารถเฉพาะตัวในการตัดพันธะเปปไทด์และการสร้างเปปไทด์ขนาดต่าง ๆ ทั้งนี้ เอนไซม์อัลคาเลสให้พีคหลักในช่วง

ปริมาตรการชะ 13–17 มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับขนาดโมเลกุลประมาณ 400–3,000 Da แสดงถึงสัดส่วนเปปไทด์สายสั้นจำนวนมาก ในขณะที่เอนไซม์ฟลาโวไซม์ ให้พีคกว้างในช่วง 15–20 มิลลิลิตร (3–7 kDa) และเอนไซม์นิวเทรส ให้พีคเด่นบริเวณ 9–14 มิลลิลิตร (>5 kDa) แสดงว่าการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดส่งผลต่อรูปแบบการแตกตัวของโปรตีนแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับระดับการย่อยสลายใน Figure 1 พบแนวโน้มที่สอดคล้องกัน โดยเอนไซม์อัลคาเลส ซึ่งมีค่า DH สูงสุด ให้สัดส่วนของเปปไทด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (<3 kDa) มากที่สุด ขณะที่เอนไซม์นิวเทรส ให้ DH ต่ำที่สุด และยังคงมีเปปไทด์ขนาดใหญ่เป็น

องค์ประกอบหลัก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Patil *et al.* (2015) ซึ่งระบุว่า การย่อยที่มี DH สูง สัมพันธ์กับการเกิดเปปไทด์สายสั้น (<3 kDa) ซึ่งมักมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า เช่น การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์เมตาบอลิซึม เนื่องจากเอนไซม์อัลคาเลส เป็นเอนไซม์เอนโดเปปติเดสที่สามารถตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงสร้างเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีหมู่ฟังก์ชันอิสระมากขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มความสามารถในการบริจาคอิเล็กตรอนหรือต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงจับกับ active site ของเอนไซม์เมตาบอลิซึมได้ดีกว่าเปปไทด์ขนาดใหญ่ (Antony and Vijayan, 2021)

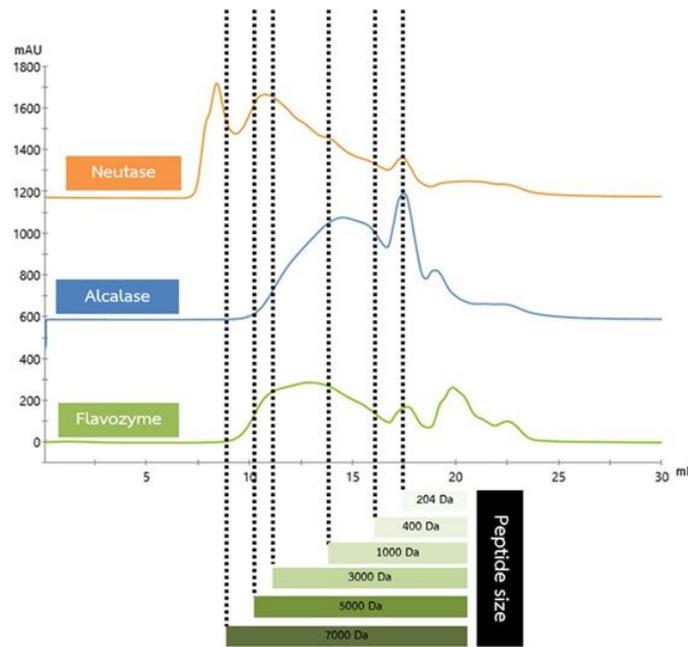


Figure 2 Gel-filtration chromatograms showing the molecular-weight distribution of cricket protein hydrolysates prepared using different proteolytic enzymes

การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ค่า EC_{50} เป็นพารามิเตอร์สำคัญที่ใช้ประเมินศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยค่าที่ต่ำกว่าสะท้อนถึงประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระที่สูงกว่า ผลการทดสอบ (Figure 3a-d) แสดงให้เห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากเอนไซม์อัลคาเลส มีค่า EC_{50} ต่ำที่สุดในชุดการ

ทดสอบ DPPH และการจับไอออนโลหะ ($p < 0.05$) บ่งชี้ถึงความสามารถในการบริจาคอิเล็กตรอนและคีเลตกับไอออน Fe^{2+} ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับระดับการย่อยสลายที่สูง และการเกิดเปปไทด์ขนาดเล็กในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 400–3,000 Da จากผลการวิเคราะห์ก่อนหน้านี้ เปปไทด์สายสั้นเหล่านี้มีหมู่

ฟังก์ชันที่สามารถบริจาคอิเล็กตรอนได้ดี เช่น -OH, -SH และ -NH₂ จากกรดอะมิโน Tyrosine, Tryptophan, Histidine และ Cysteine ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาถ่ายโอนอิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH หรือจับกับตำแหน่งประจุบวกของ Fe²⁺ ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง (Czelej *et al.*, 2022) ในทางกลับกัน โปรตีนไฮโดรไลสจากเอนไซม์นิวเทรสแสดงศักยภาพสูงสุดในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล (\cdot OH) และในการทดสอบ FRAP โดยมีค่า EC₅₀ ต่ำที่สุด ($p < 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถในการบริจาคอิเล็กตรอนในระบบสารละลายน้ำได้ดีกว่าเอนไซม์อื่น กลไกนี้คาดว่าเกี่ยวข้องกับการมีเปปไทด์ขนาดปานกลางถึงใหญ่ (>5 kDa) ที่ยังคงหมู่ซัลโฟไฮดรอกซิล เช่น Histidine, Lysine, Arginine และ Methionine (Suwanagul *et al.*, 2021) สอดคล้องกับรายงานของ Sangsawad *et al.* (2022) ซึ่งระบุว่าเปปไทด์ขนาดปานกลางที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนมีซัลโฟไฮดรอกซิลได้ดีกว่าเปปไทด์สายสั้นในบางกรณี

สำหรับโปรตีนไฮโดรไลสจากเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ซึ่งมีทั้งคุณสมบัติของเอนโดเปปติเดสและเอ็กโซเปปติเดส พบว่าค่า EC₅₀ อยู่ในระดับปานกลางในทุกชุดการทดสอบ แสดงถึงการย่อยโปรตีนที่ให้ทั้งเปปไทด์ขนาดเล็กและขนาดปานกลางในสัดส่วนสมดุล ทำให้เกิดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลายกลไกพร้อมกัน แต่ไม่เด่นชัดในด้านใดด้านหนึ่ง ดังนั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสจากจึงหริตมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับการย่อย และเชิงลบกับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเปปไทด์ กล่าวคือ เมื่อค่าระดับการย่อยเพิ่มขึ้น สัดส่วนของเปปไทด์ขนาดเล็กเพิ่มขึ้น ซึ่งมีสมบัติในการบริจาคอิเล็กตรอนและคีเลตโลหะได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม โครงสร้างลำดับกรดอะมิโนและการจัดเรียงตัวของเปปไทด์ยังมีบทบาทสำคัญต่อกลไกการออกฤทธิ์ในแต่ละระบบ ซึ่งเป็นปัจจัยที่กำหนดสมรรถนะต้านอนุมูลโดยรวมของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลส (Suwanagul *et al.*, 2021)

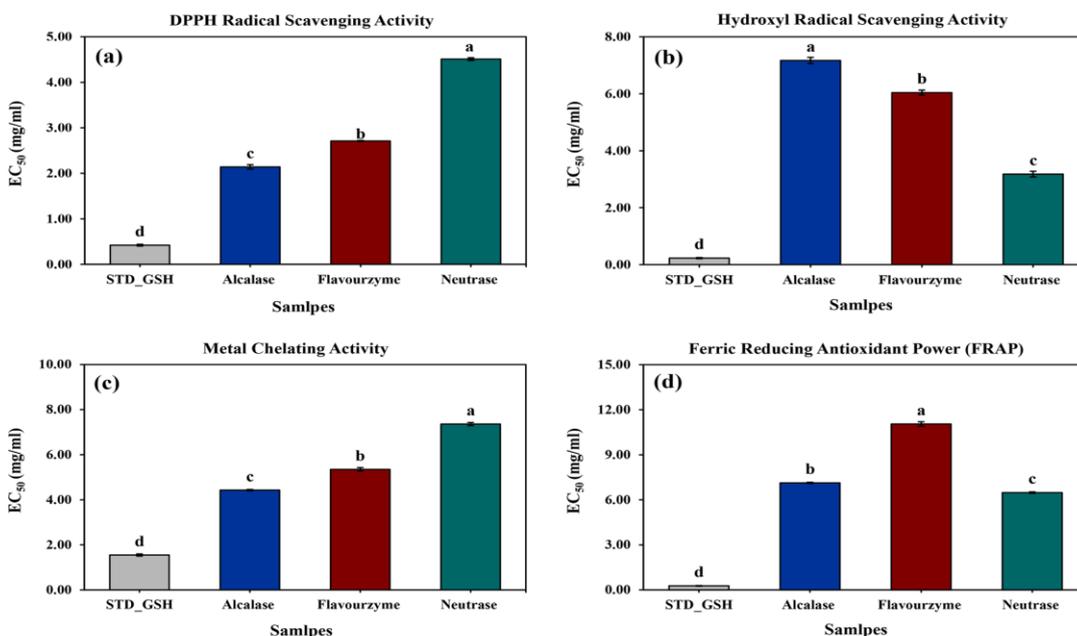


Figure 3 Antioxidant activities of cricket protein hydrolysates obtained from different proteolytic enzymes compared with glutathione (STD_GSH); DPPH radical scavenging activity (a), hydroxyl radical scavenging activity (b), metal ion chelating (c) and ferric reducing antioxidant power (d) Bars (mean±standard deviation) with different letters have mean values that are significantly different at $p < 0.05$.

การยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วน และโรคเบาหวาน ชนิดที่ 2

การประเมินฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV), alpha-amylase และ alpha-glucosidase ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากจิ้งหรีด แสดงผลดัง Figure 4a-c โดยใช้ค่า IC₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการยับยั้ง พบว่าการใช้เอนไซม์ อัลคาเลส ให้ค่า IC₅₀ ต่ำที่สุดในทุกการทดสอบ สะท้อน ศักยภาพการยับยั้งที่สูงการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์และเอนไซม์นิวเทรส ซึ่งสอดคล้องกับค่า DH สูงและ สัดส่วนเปปไทด์ขนาดเล็ก (<3 kDa) ที่มากที่สุดในกลุ่ม ดังกล่าว แนวโน้มดังกล่าวแสดงความสัมพันธ์เชิงบวก

ระหว่างระดับ DH กับประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ กล่าวคือ การเพิ่มสัดส่วนของเปปไทด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ช่วยเพิ่มความสามารถในการเข้าถึงบริเวณ active site ของเอนไซม์ ขณะที่การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์นิวเทรส ซึ่งมี DH ต่ำและประกอบด้วยเปปไทด์ขนาดใหญ่กว่า มีประสิทธิภาพลดลง ทั้งนี้ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่สูงของเอนไซม์อัลคาเลส ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถ ในการให้รับอิเล็กตรอนและจับโลหะ ยังอาจส่งเสริมการเกิด ปฏิสัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น ผลลัพธ์ สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า (Suwanangul *et al.*, 2021) ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีเปปไทด์น้ำหนัก โมเลกุลต่ำมักแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เมตาบอลิซึมสูงกว่า

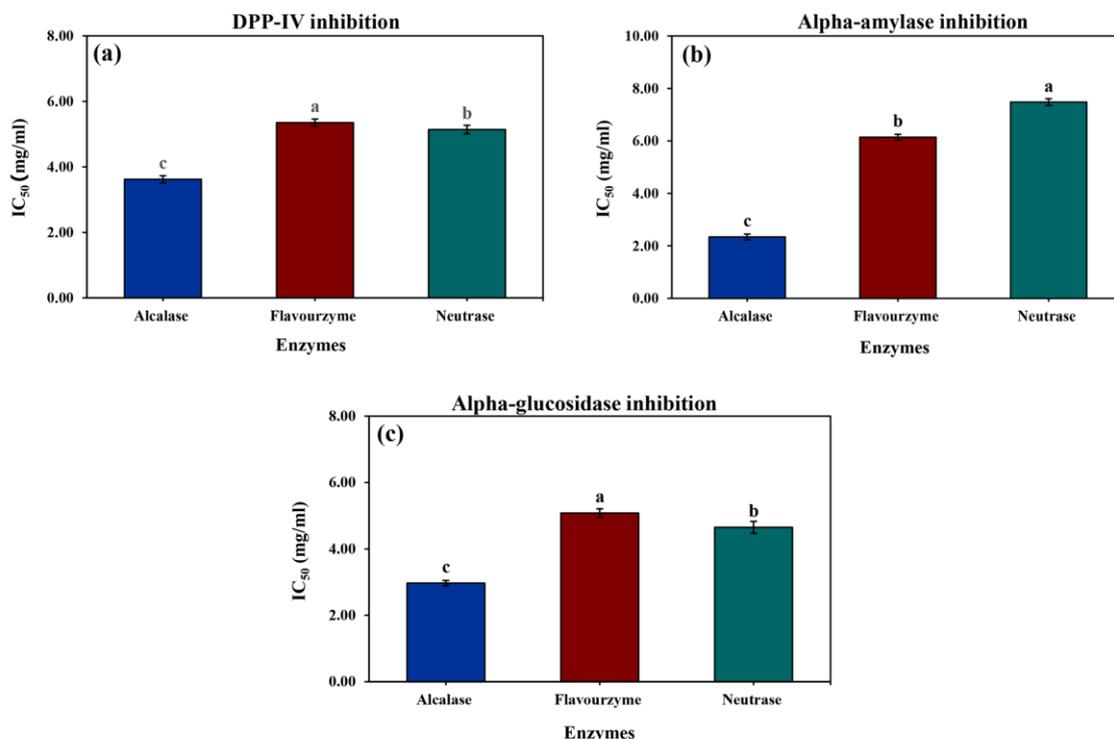


Figure 4 Inhibitory effects of cricket protein hydrolysates (CPHs) prepared using different proteolytic Enzymes; DPP-IV inhibition (a), alpha-amylase inhibition (b) and alpha-glucosidase Inhibition (c) Bars with different letters (a–c) indicate significant differences (p<0.05).

สรุปผลการวิจัย

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากจังหวัดบ้านที่ผลิตด้วย เอนไซม์อัลคาเลส มีค่า DH สูงที่สุด และให้สัดส่วนเปปไทด์ น้ำหนักโมเลกุลต่ำมากที่สุด ส่งผลให้มีศักยภาพต้านอนุมูลอิสระสูง และยับยั้งเอนไซม์ DPP-IV, alpha-amylase inhibition และ alpha-glucosidase ได้ เหนือกว่าไฮโดรไลเสตจากเอนไซม์อื่น ผลดังกล่าวยืนยันว่าการคัดเลือกเอนไซม์ย่อยที่เหมาะสมสามารถเพิ่มศักยภาพทางชีวภาพของโปรตีนจังหวัดได้ และสนับสนุนต่อการพัฒนาเป็นส่วนประกอบอาหารฟังก์ชัน หรือโภชนเภสัช ทั้งนี้ควรดำเนินการศึกษาต่อเนื่องด้านความปลอดภัย (cytotoxicity) การระบุเปปไทด์ออกฤทธิ์ และการประเมินในระบบเซลล์และสัตว์ทดลอง เพื่อยืนยันประสิทธิผลและความปลอดภัยก่อนการประยุกต์ใช้เชิงพาณิชย์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนงานวิจัย มูลฐาน (Fundamental Fund) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 รหัสโครงการวิจัย มจ.1-67-03-001.1 จากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ตลอดจนการสนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์จากห้องปฏิบัติการสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งเอื้อให้การดำเนินงานวิจัยนี้สำเร็จ ล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Antony, P. and R. Vijayan. 2021. Bioactive peptides as potential nutraceuticals for diabetes therapy: a comprehensive review. **International Journal of Molecular Sciences** 22(16): 9059.
- Anyasi, T.A., P. Acharya and C.C. Udenigwe. 2025. Edible insects as an alternative protein source: nutritional composition and global consumption patterns. **Future Foods** 12: 100699.
- Chanadang, S., S. Mingyai, P. Charoenthaikij, K. Sathapornprasath, Y. Supan, D. Wayupap and T. Itthisoponkul. 2024. Topic: physicochemical, functional and antioxidant properties of cricket protein powders produced by microwave-assisted spouted bed drying. **Future Foods** 10: 100480.
- Czelej, M., K. Garbacz, T. Czernecki, J. Wawrzykowski and A. Wasko 2022. Protein hydrolysates derived from animals and plants-a review of production methods and antioxidant activity. **Foods** 11(13): 1953.
- Hamad, A. and A. Tayel. 2025. Food 2050 concept: trends that shape the future of food. **Journal of Future Foods** 6(6): 1053–1066.

- Ma, Z., M. Mondor, F.G. Valencia and Hernández-A.J. Alvarez. 2023. Current state of insect proteins: extraction technologies, bioactive peptides and allergenicity of edible insect proteins. **Food & Function** 14(18): 8129–8156.
- Mishyna, M., J.K. Keppler and J. Chen. 2021. Techno-functional properties of edible insect proteins and effects of processing. **Current Opinion in Colloid & Interface Science** 56: 101508.
- Patil, P., S. Mandal, S.K. Tomar and S. Anand. 2015. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. **European Journal of Nutrition** 54(6): 863–880.
- Sangsawad, P., S. Katemala, D. Pao, S. Suwanangul, R. Jeencham and M. Sutheerawattananonda. 2022. Integrated evaluation of dual-functional DPP-IV and ACE inhibitory effects of peptides derived from sericin hydrolysis and their stabilities during in vitro-simulated gastrointestinal and plasmin digestions. **Foods** 11(23): 3931.
- Suwanangul, S., M.A. Alashi, R.E. Aluko, W. Tochampa and K. Ruttarattanamongkol. 2021. Inhibition of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase activities in vitro by sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) protein hydrolysates and their fractionated peptides. **Maejo International Journal of Science and Technology** 15(1): 13–26.
- Suwanangul, S., P. Sangsawad, M.A. Alashi, R.E. Aluko, W. Tochampa, S. Chittrakorn, and K. Ruttarattanamongkol. 2021. Antioxidant activities of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) protein isolate and its hydrolysates produced with different proteases. **Maejo International Journal of Science and Technology** 15(1): 48–60.
- Suwanangul, S. and K. Ruttarattanamongkol. 2022. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Sacha Inchi meal. **Journal of Agricultural Research and Extension** 39(2): 55–67. [in Thai]
- Suwanangul, S., P. Jaichakan, N. Narkprasom, S. Kraithong, K. Narkprasom and P. Sangsawad. 2023. Innovative insights for establishing a synbiotic relationship with *Bacillus coagulans*: viability, bioactivity, and In Vitro-simulated gastrointestinal digestion. **Foods** 12(19): 3692.
- Suwanangul, S., K. Arkanit, S. Kraithong, W. Sorndech, S. Tastub, N. Rungraeng and P. Sangsawad. 2025. Impact of an innovative two-step temperature-controlled accelerated germination process on phytochemical enhancement, digestibility, and morphological changes in colored rice. **Food Chemistry** 478: 143558.

Suwanangul, S., N. Rungraeng, S. Phongthai,
R. Chen, H. Corke, Y. Ai and
P. Sangsawad. 2025. Effects of
pressure-cooking and freeze-drying on
the quality and functionality of instant
black rice: starch crystallinity, bioactive
properties, and digestibility.
**International Journal of Biological
Macromolecules** 318(1): 144754.