ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนและเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรส ของสารสกัดกากน้ำตาล

Pancreatic Lipase and Cholesterol Esterase Enzyme Inhibitory Activity of Molasses Extracts

สุภาภรณ์ เลขวัต[1] และ อุบลวรรณา ศรีมงคลลักษณ์[1]
Lekhavat, S.[1] and Srimongkoluk, U[1]

Abstract

Total phenolic contents, antioxidant activity determined by DPPH assay and inhibitory effect of molasses (Type A, B and C) and molasses extracts, which was extracted by acidic alcohol at ratio of 1:30 (molasses: acidic alcohol), on pancreatic lipase and cholesterol esterase enzyme, are investigated. The results showed that molasses C has the highest value of total phenolic content (39.63 mg. of GAE/g. sample) and has the best IC_{50} value (120 µg/ml), while the lowest phenolic content and antioxidant capacity was molasses C $_{KSL}$). Pancreatic lipase and cholesterol esterase enzyme inhibition rate of molasses and the extracts are in range of 6-100 % and 2-75%, respectively. It was found that the level of inhibition depends on the concentration of molasses. On comparison, the results showed more phenolic content, antioxidant activity and capacity of pancreatic lipase enzyme inhibition of molasses than its extracts.

Keywords: molasses, cholesterol esterase inhibition, pancreatic lipase inhibition

บทคัดย่อ

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนและเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรสในกากน้ำตาล (ชนิด A, B และ C) และสารสกัดจากกากน้ำตาลที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์เติมกรดที่อัตราส่วน 1:30 (กากน้ำตาล:แอลกอฮอล์เติมกรด) พบว่ากากน้ำตาลชนิด C มีสารประกอบฟีนอลิกที่สูงที่สุด (39.63 mg GAE/g.) และมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ IC_{50} ดีที่สุด (120 µg/ml) ในขณะที่กากน้ำตาล C $_{KSL}$ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนและเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรสของกากน้ำตาลและสารสกัดอยู่ในช่วง 6-100 % และ 2-75 % ตามลำดับ ซึ่งพบว่าระดับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ขึ้นกับค่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกากน้ำตาลและสารสกัดจากกากน้ำตาล พบว่ากากน้ำตาลมีปริมาณฟีนอลิกสูง มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่าสารสกัด

คำสำคัญ: กากน้ำตาล การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คอเลสเตอรอลเอสเทอเรส ไลเปส ตับอ่อน

คำนำ

กากน้ำตาลเป็นของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลเข้มประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุคโตส น้ำตาลรีดิวส์ และส่วนประกอบที่ไม่ใช่น้ำตาล เช่น โพลีฟีนอล แร่ธาตุ และสารสีที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวส์และอะมิโนแอซิด (คาราเมล) (Solomon, 2011) โดยพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (TPC) 101.3 mg GAE/g และมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระคำนวณเป็น IC50 เท่ากับ 126 µg/ml (Yu และคณะ,2016) ปัจจุบันมักนำไปใช้ผลิตอาหารสัตว์และเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมแอลกอฮอล์ การผลิตกรดซิตริก ยีสต์ ผงชูรส และเด็กซ์แทรน เป็นต้น ไม่นิยมบริโภคเนื่องจากสีและองค์ประกอบเคมีบางชนิด กากน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตน้ำตาลซึ่งมีปริมาณสูงมาก (ประมาณ 4-5 %) ในขณะที่มูลค่าน้อย ดังนั้นจึงได้มีการนำกากน้ำตาลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่าและลดการค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียใน

[1] ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 35 หมู่ 3 ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
[1] Expert Centre of Innovative Health Food, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, 35 Moo 3, Khlong 5, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120

กระบวนการ ซึ่งพบว่าการเติมกากน้ำตาลที่กรองแล้วในอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสูงมีผลต่อระดับอินซูลินทำให้ค่าดัชนีน้ำตาลลดลงเนื่องจากมีสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น ferulic acid และ epigallocatechin รวมถึงแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม แมกเนเซียม และโพแทสเซียม ที่ยับยั้งการย่อยสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตและดูดซึมกลูโคส (Wright และคณะ, 2014) นอกจากนี้ Schlegelmilch และคณะ (2005) ได้ทดสอบฤทธิ์ของกากน้ำตาลในหนูทดลองพบว่าอาหารป้อนที่มีกากน้ำตาลสามารถเพิ่มระดับของคอเลสเตอรอลชนิดดี (High-Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C) มีค่าตับและไตรกลีเซอไรด์ลดลง

โดยปกติเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน หรือ pancreatic lipase จะทำหน้าที่ย่อยไขมันในลำไส้เล็กได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลซึ่งจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ในขณะที่บทบาทหน้าที่ของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเทอเรสจะช่วยควบคุมการสลายไขมันโดยเฉพาะอาหารที่มีคอเลสเตอรอลในรูปพันธะเอสเทอร์ ทำให้เกิดคอเลสเตอรอลในรูปอิสระในรูปไมเซลล์และมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มการดูดซึมคอเลสเตอรอล (Chatatikun และ Kwanhian, 2020) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการชะลอการย่อยไขมันในกลุ่มของไตรกลีเซอร์ไรด์ให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระและลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลเข้าสู่กระแสเลือด

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของกากน้ำตาลและสารสกัดจากกากน้ำตาลชนิด A, B และ C ที่ได้จากกระบวนการแยกผลึกน้ำตาลในอุตสาหกรรมน้ำตาลทราย โดยมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน (pancreatic lipase) และ เอนไซม์คอเลสเตอรอลเทอเรส (cholesterol esterase) บนสมมติฐานของความแตกต่างของชนิดกากน้ำตาลจากแหล่งและการผลิตที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิด

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างกากน้ำตาลจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทประจวบอุตสาหกรรมน้ำตาล จำกัด (ชนิด A, B และ C) และจากบริษัทน้ำตาลขอนแก่น จำกัด (KSL) (ชนิด C_{KSL}) ทำการสกัดกากน้ำตาลด้วยตัวแอลกอฮอล์ที่ปรับกรด (ดัดแปลงจาก Chen และคณะ, 2017) อัตราส่วนกากน้ำตาลต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:30 w/v เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความถี่สูงควบคุมอุณหภูมิที่ 45 C เป็นเวลา 70 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 g นาน 10 นาที แยกส่วนใสและนำไปประเหยภายใต้สุญญากาศ ที่ 45 C จนเหลือสารสกัดประมาณ 10 กรัม ทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำตัวอย่างทั้งหมด ได้แก่ กากน้ำตาล (A, B, C, C_{KSL}) และสารสกัดน้ำตาล (E_A, E_B, E_C, E_C_{KSL}) รวม 8 ตัวอย่าง ไปทำการวิเคราะห์ค่า TPC ด้วยวิธี Folin Ciocaltaeu's reagent (ดัดแปลงจาก Maisuthisakul และคณะ, 2007) โดยใช้กรดแกลลิคเป็นสารมาตรฐาน วัดค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นในช่วง 0-100 mg/l ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH Assay) (ดัดแปลงจาก Wong และ Chye 2009) โดยคำนวณ % radical scavenging activity (%RSA $=[(A_0-A_1)/A_0] \times 100$) และคำนวณค่า IC_{50}

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสโดยเตรียมตัวอย่างและตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเอนไซม์) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ปริมาณ 5 µl ผสมกับสาร reaction buffer (pH 8.0) (ซึ่งมีส่วนผสมของ 13 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl และ 1.3 mM $CaCl_2$ ในน้ำกลั่น 1 l) ปริมาณ 20 µl จากนั้นเติม 0.1 mM 4-Metheylumbelliferyl oleate (4-MU) ปริมาณ 50 µl และ Porcine Pancreatic lipase เข้มข้น 50 Unit/l ปริมาณ 25 µl ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 25 C 30 นาที เติม 0.1 M Sodium citrate (pH 4.2) 100 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยา วัดค่าเรืองแสงจากฟลูออเรสเซนต์ที่ Ex 355 nm และ Em 460 nm คำนวณค่า % enzyme inhibition

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรส โดยเตรียมตัวอย่างและตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเอนไซม์) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mg./ml. ปริมาณ 5 µl โดยใช้สารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 6.9 เป็นตัวทำละลาย เติม 0.1 M phosphate buffer 30 µl, 12mM Taurocholic acid 50 µl, 20 mM p-nitrophenyl butyrate (p-NPB) 5 µl, และ cholesterol esterase ความเข้มข้น 10 µg/ml ปริมาณ 10 µl ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 405 nm คำนวณค่า % enzyme inhibition

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์จากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมประเมินผลทางสถิติ SPSS version 17 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและความแตกต่างของตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

Figure 1 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (TPC) และค่า IC_{50} ของกากน้ำตาลและสารสกัด พบว่าค่า TPC และ IC_{50} อยู่ในช่วง 53.7-39.63 mg GAE/g. และ 122-221 µg/ml กากน้ำตาล C มีค่า TPCสูงที่สุดเท่ากับ 39.63 mg GAE/g และมีค่า IC_{50} ดีที่สุด(120.79 µg/ml) ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้สารสกัดกากน้ำตาลมีค่า TPC และ IC_{50} น้อยกว่ากากน้ำตาลแม้ว่าแนวโน้มของค่าดังกล่าวในสารสกัดจากกากน้ำตาลแต่ละชนิดเป็นไปในทำนองเดียวกันกับกากน้ำตาล โดยสารสกัด E_C มี TPC สูงที่สุด (11.25 mg GAE/g crude extract) และ IC_{50} น้อยที่สุด (160.15 µg/ml) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yu และคณะ (2016) ที่พบว่ากากน้ำตาลมี TPC และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง

พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (Table 1) แปรผันตามความเข้มข้นของของกากน้ำตาลและสารสกัด โดยตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานสูงถึง 100 % เมื่อเทียบกับตัวออย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ (0%) ที่ความเข้มข้นตัวอย่าง 0.01 และ 0.1 mg/ml พบว่ากากน้ำตาล C และ B จะออกฤทธิ์ยับยั้งสูงกว่าตัวอย่างอื่น ($P \leq 0.05$) ซึ่งกากน้ำตาลมีฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่าสารสกัด สอดคล้องกับค่า TPC และ IC_{50} สามารถอภิปรายได้ว่าการสกัดกากน้ำตาลด้วยกรดเอทานอลสามารถสกัดสารสำคัญได้เพียงบางส่วน ซึ่งเกิดจากโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกมีทั้งที่อยู่ในรูปที่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว (45%) และไม่มีขั้ว (Gulsunoglu และคณะ,2019)

อย่างไรก็ตามพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรสได้ดีกว่ากากน้ำตาล (Table 1) ซึ่งค่าการยับยั้งแปรผันตรงกับความเข้มข้น โดยสารสกัด E_C_{KSL} ออกฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุด (64 -80 %) สามารถอภิปรายได้ในทำนองเดียวกันคือในกากน้ำตาลที่ผ่านการสกัดอาจจะมีสารประกอบฟีนอลิกบางกลุ่มที่มีฤทธิ์ยังยั้งการทำงานของเอนไซม์คอเลสเตอรอลเอสเทอเรสได้ดี

ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่ากากน้ำตาลเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ (Valli และคณะ, 2012) และช่วยเพิ่ม HDL-C (Wright และคณะ, 2014) และสามารถสรุปได้ว่าชนิดกากน้ำตาลที่แตกต่างกันมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน โดยกากน้ำตาล A ซึ่งได้จากการปั่นแยกผลึกน้ำตาลในครั้งแรกจะยังคงมีน้ำตาลซูโครสอยู่ในปริมาณสูงและมีสารโพลีฟีนอลน้อยกว่ากากน้ำตาล B และ C ซึ่งได้จากการปั่นแยกผลึกครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่ากากน้ำตาล C จะให้ผลดีที่สุด แต่ในการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงหน้าที่ในผลิตภัณฑ์อาหารต้องคำนึงถึงการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคและความปลอดภัยอันเนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลและกรดอะมิโน

สรุปผล

ชนิดและแหล่งผลิตกากน้ำตาลมีผลต่อปริมาณสารประกอบทางชีวภาพและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและคอเลสเตอรอลเอสเทอเรส โดยกากน้ำตาลชนิด C ซึ่งได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการปั่นแยกผลึกน้ำตาล จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ IC_{50} ดีที่สุด ในขณะที่ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของของเอนไซม์ไลเปสของตับอ่อนและคอเลสเตอรอลเอสเทอเรสจะแปรผันตรงกับชนิดและความเข้มข้นของกากน้ำตาลและสารสกัดจากกากน้ำตาล โดยสารสกัดจากกน้ำตาลชนิด C มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุดซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารอ้างอิง

Chatatikun, M. and Kwanhian, W., 2020, Phenolic Profile of Nipa Palm Vinegar and Evaluation of Its Antilipidemic Activities, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 3:1-8.

Chen, M., Zhao, Z., Meng, H. and Yu, S., 2017, The Antibiotic Activity and Mechanisms of Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Molasses Polyphenols Against Selected Food-borne Pathogens, Food Science and Technology, 82: 354-360.

Gulsunoglu, Z., Guler, F. K., Reas, K. and Meral, K. A., 2019, Solutble and Insolutble-bound Phenolics and Antioxidant Activity of Various Industrial Plant Waste, Food Properties, 22: 1501-1510.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R., 2007, Assessment of Phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants, Food Chemistry, 100: 1409-1418.

Schlegelmilch, U. L. F., Brandch, C., Stangl, G. I. and Elder, K., 2005, Molasses Increases HDL Cholesterol in Rats Research Note, International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 75: 211-217.

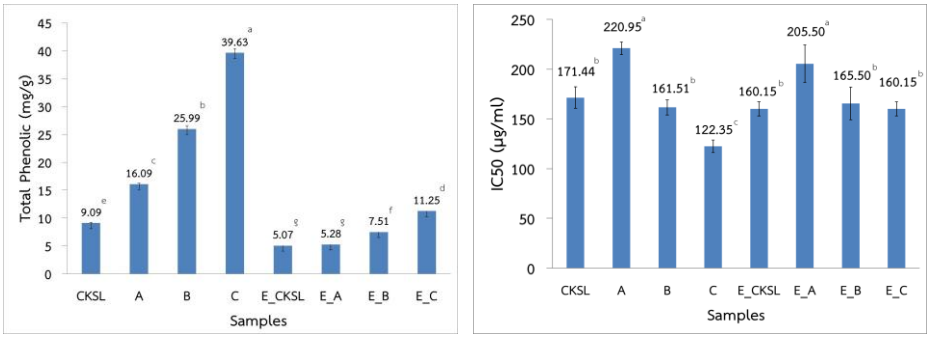
Solomon, S., 2011, Sugarcane By-Products Based Industries in India, Sugar Technology, 13: 408-416.

Valli, V., Caravaca, A. G., M. D., Danesi, F., Caboni, M. and Bordoni, A., 2012, Sugar Cane and Sugar Beet Molasses, Antioxidant-rich Alternatives to Refined Sugar, Agricultural and Chemistry, 60: 12508-12515.

Wright, A. G., Ellis, T. P., and Ilag, L. L., 2014, Filtered Molasses Concentrate from Sugar Cane: Natural Funtional Ingredient Effective in Lowering the Glycaemic Index and Insulin Response of High Carbohydrate Foods, Plant Foods Hum Nutr, 69: 310-316.

Wong, Y.J. and Chye, Y.F., 2009, Antioxidant Properties of Selected Tropical Wild Edible Mushrooms, Journal of Food Composition and Analysis, 22: 269–277.

Yu, D., Chen, M. S. and Yu, S. J., 2016, Effect of Sugarcane Molasses Extract on the Formation of 2-amiono-1-methyl-6-phenylidazo 4,5-b pyridine (PhIP) in a Model System, Food Chemistry, 197: 924-929.



(a) (b)

Figure 1 (a) Phenolic contents and (b) antioxidant activity (IC_{50}) of molasses and molasses extracts

Table 1 Inhibitory activity (%) of pancreatic lipase and cholesterol esterase from molasses and molasses extracts.

Sample	% Inhibition of pancreatic lipase			% Inhibition of cholesterol esterase		
	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml^{ns}	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml
C_{KSL}	30 ± 5^{c}	56 ± 4^{c}	100 ± 0	28 ± 3^{c}	43 ± 5^{c}	61 ± 4^{c}
A	44 ± 1^{b}	62 ± 2^{c}	100 ± 0	2 ± 1^{e}	19 ± 1^{de}	28 ± 3^{d}
B	61 ± 2^{a}	99 ± 1^{a}	100 ± 0	30 ± 4^{c}	45 ± 4^{c}	64 ± 6^{bc}
C	63 ± 1^{a}	99 ± 1^{a}	100 ± 0	16 ± 2^{d}	41 ± 4^{c}	47 ± 1^{c}
E_C_{KSL}	17 ± 2^{d}	83 ± 3^{b}	100 ± 0	64 ± 3^{a}	75 ± 1^{a}	79 ± 1^{a}
E_A	8 ± 2^{e}	36 ± 4^{e}	100 ± 0	11 ± 1^{de}	14 ± 1^{e}	13 ± 2^{e}
E_B	6 ± 1^{e}	47 ± 2^{d}	100 ± 0	41 ± 3^{b}	55 ± 3^{b}	72 ± 3^{ab}
E_C	16 ± 1^{d}	71 ± 2^{b}	100 ± 0	17 ± 1^{d}	23 ± 2^{d}	46 ± 5^{c}
Control (no enzyme)	0	0	0	0	0	0

*Data are means ± SD; n=3

Mean values within the same column with different letters in superscript letters (a,b,c,d) are significantly different ($P \leq 0.05$) ; ns= not significant different ($P>0.05$)