4. สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษา การสกัด การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจากถั่วแดง พบว่า ในถั่วแดงมีสารยับยั้งทั้งชนิดที่เป็นโปรตีนและไม่เป็นโปรตีน

<u>สารยับยั้งชนิดที่เป็นโปรตีน</u>

1. ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน พบว่าวิธี Grant และคณะ (1995) แบบไม่ให้ความร้อนเป็นวิธีที่ดีในการสกัดสารยับยั้งเนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อการอุตสาหกรรม การบริโภคและเวชภัณฑ์ยา ในขณะที่สามารถสกัดสารยับยั้งออกมาได้เท่าๆกับวิธีอื่น
2. ในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส จากถั่วแดงโดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G-100 และ Hydroxyapatite สามารถแยกสารได้บริสุทธิ์เป็น 21.40 % และมีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 41.73 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น
3. สารยับยั้งอะไมเลสที่แยกได้เมื่อเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าบนโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ Native-PAGE เมื่อบริสุทธิ์แล้วเหลือแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว เมื่อเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าบนโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ SDS-PAGE พบแถบโปรตีน 2 แถบ
4. น้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้ว จากการหาโดยคอลัมน์ Sephadex G-100 มีขนาด 56,234 ดาลตัน และพบว่า มี 3 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากัน 2 หน่วยคือ 17,378 และอีกหนึ่งหน่วยมีขนาด 16,596 ดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE
5. สารยับยั้งอะไมเลสมีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 37 °ซ
6. สารยับยั้งอะไมเลสมีความคงตัวช่วงในอุณหภูมิ 4-40 °ซ และ pH 5.0-6.0
7. ผลของอิออนต่อการยับยั้งพบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งจากมากไปน้อยดังนี้ $CaCl_2$> NaCl> $MgSO_4$>KCl> >no added salt ในบัฟเฟอร์ที่มี $CaCl_2$ จะช่วยให้มีการยับยั้งสูงขึ้น เนื่องจาก $CaCl_2$ เป็นตัวช่วยเพิ่มให้การจับระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ดีขึ้น ส่วน $MgSO_4$ มีผลลดกิจกรรมอะไมเลสและไม่มีผลต่อการยับยั้ง
8. สารยับยั้งอะไมเลสมีจลนศาสตร์การยับยั้งแบบไม่แข่งขันผสม(mixed noncompetitive)คือสารยับยั้งชอบจับกับเอนไซม์อะไมเลสในรูปสารเชิงซ้อนกับสับสเตรทมากกว่าเอนไซม์อะไมเลส อิสระ
9. พบว่าสารยับยั้งชนิดโปรตีนในแต่ละขั้นของการทำบริสุทธิ์ มีศักยภาพในยับยั้งต่อ เอนไซม์

อะไมเลส มอลเตสจากคน ส่วนมอลเตสและซูเครสจากยีสต์ นั้นสารยับยั้งชนิดที่เป็นโปรตีนแต่ละขั้นของการทำบริสุทธิ์สามารถยับยั้งได้ ยกเว้นสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ขั้นสุดท้าย (Hydroxyapatite) ซึ่งน่าจะแสดงว่า สารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์นี้ มีความจำเพาะต่อแหล่งของเอนไซม์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไม่จำเพาะต่อแหล่งที่มาจากยีสต์

10. จากการทดลองครั้งนี้ได้ค้นพบใหม่ว่าสารยับยั้งชนิดที่เป็นโปรตีนก็สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส มอลเตสและซูเครสได้ ซึ่งในอนาคตสามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

<u>สารยับยั้งชนิดไม่เป็นโปรตีน</u>

1. สกัดและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งชนิดที่ไม่เป็นโปรตีนโดย Thin layer chromatography พบสารยับยั้งชนิดไม่เป็นโปรตีนมีขนาดเดียวกับอะคาร์โบสเมื่อสเปรย์สารให้เกิดสีและย้อมกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส แต่สารยับยั้งที่ได้จากถั่วแดงไม่ทนความร้อนเหมือนอะคาร์โบส
2. สารยับยั้งชนิดไม่เป็นโปรตีนสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส มอลเตสและซูเครสได้เช่นเดียวกับอะคาร์โบสแต่ศักยภาพในการยับยั้งต่ำกว่าโดยสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายคนและตับอ่อนหมูได้ 52.2 และ 34.7%ตามลำดับ ยับยั้งมอลเตสจากยีสต์และลำไส้เล็กหมูได้ 20.8 และ 16.4% ตามลำดับ ยับยั้งซูเครสจากยีสต์ได้ 13.9%
3. การทดลองครั้งนี้เป็นการค้นพบที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนคือ การพบสารยับยั้งชนิดที่ไม่เป็นโปรตีนต่ออะไมเลส มอลเตสและซูเครสในสารสกัดจากถั่วแดง

สรุปผลการศึกษาสารยับยั้งในถั่วแดง ทำให้ทราบข้อมูล ได้แก่ วิธีการสกัด การทำบริสุทธิ์ ชนิดสารยับยั้งที่มีในถั่วแดง และคุณสมบัติต่างๆของสารยับยั้ง เป็นแนวทางในการนำสารยับยั้งจากถั่วแดงไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เช่น ยารักษาโรคเบาหวาน โรคอ้วน เพื่อเป็นการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และทางการเกษตร เพื่อช่วยป้องกันการกัดกินเมล็ดถั่วหรือการทำลายจากแมลงศัตรูพืชต่างๆ

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

ควรเพิ่ม yield ของสารยับยั้งอะไมเลสให้สูงขึ้นในช่วงการทำบริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังต้องศึกษาถึงโครงสร้างสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่เป็นโปรตีน ศึกษาความทนต่อ proteases ในทางเดินอาหารเพื่อนำสารยับยั้งอะไมเลสทั้งชนิดที่เป็นโปรตีนและไม่เป็นโปรตีนมาประยุกต์ใช้และทำการทดลองให้ทราบถึงการมีศักยภาพการยับยั้งในสัตว์ทดลองต่อไป