# 3.ผลการทดลอง และวิจารณ์

## 1. เปรียบเทียบวิธีสกัด 3 วิธี

ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีสกัด 3 วิธีคือ Peuyo และคณะ (1997), Grant และคณะ (1995) แบบให้ความร้อน และ Grant และคณะ (1995) แบบไม่ให้ความร้อน ต่อเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เอนไซม์อะไมเลส มอลเตสและซูเครส ดังตารางที่ 3

**ตารางที่** 3 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดแต่ละวิธี

| วิธีสกัด | Specific inhibitory activity* | | | Concentration of extract** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Peuyo and Delgado-Salinas (1997) | Grant *et al*.(1995) ไม่ให้ความร้อน | Grant *et al*.(1995) ให้ความร้อน | Peuyo and Delgado-Salinas (1997) | Grant *et al*.(1995) ไม่ให้ความร้อน | Grant *et al*.(1995) ให้ความร้อน |
| on amylase | 1.89 ±0.01 | 1.60 ±0.02 | 1.75 ±0.02 | 4.09 ±0.38 | 3.48 ±0.35 | 3.48 ±0.36 |
| on maltase | 0.06 ±0.01 | 0.03 ±0.01 | 0.03 ±0.01 | 40.75 ±0.06 | 157.73 ±0.14 | 154.96 ±0.06 |
| on sucrase | 0.03 ±0.01 | 0.03 ±0.00 | 0.03 ±0.00 | 86.69 ±0.02 | 93.48 ±0.06 | 90.23 ±0.02 |

The values were average of 3 replications

* Specific inhibitory activity (unit/mg.protein) for amylase represented value at 50%inhibition, for maltase and sucrase were at 40%inhibition

** Concentration of extract (mg/ml) for amylase was at 50%inhibition, for maltase and sucrase were at 40%inhibition

สำหรับเอนไซม์อะไมเลส เปรียบเทียบโดยวิธีทางสถิติโดยใช้ค่า specific inhibitory activity ที่ร้อยละ 50 ของการยับยั้งมีค่าดังนี้ สำหรับวิธี Peuyo และคณะ (1997), Grant และคณะ (1995) แบบให้ความร้อน และ Grant และคณะ (1995) แบบไม่ให้ความร้อน เท่ากับ $1.89 \pm 0.01$, $1.60 \pm 0.02$, $1.75 \pm 0.02$ ตามลำดับพบว่า ประสิทธิภาพในการสกัดทั้ง 3 วิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05

สำหรับเอนไซม์มอลเตส เปรียบเทียบโดยวิธีทางสถิติโดยใช้ค่า specific inhibitory

activity ที่ร้อยละ 40 ของการยับยั้งมีค่าดังนี้ สำหรับวิธี Peuyo และคณะ (1997), Grant และคณะ (1995) แบบให้ความร้อน และ Grant และคณะ (1995) แบบไม่ให้ความร้อน เท่ากับ 0.06±0.01, 0.03±0.01, 0.03±0.01 ตามลำดับพบว่าวิธี Peuyo และคณะ (1997) มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธี Grant และคณะ (1995) แบบให้ความร้อนและไม่ให้ความร้อนอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05

สำหรับเอนไซม์ซูเครส เปรียบเทียบโดยวิธีทางสถิติโดยใช้ค่า specific inhibitory activity ที่ร้อยละ 40 ของการยับยั้งมีค่าดังนี้ สำหรับวิธี Peuyo และคณะ (1997), Grant และคณะ (1995) แบบให้ความร้อน และ Grant และคณะ (1995) แบบไม่ให้ความร้อน เท่ากับ 0.03±0.01, 0.03±0.00, 0.03±0.01 ตามลำดับพบว่าประสิทธิภาพในการสกัดทั้ง 3 วิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ วิธีที่ใช้ทั้ง 3 วิธี ไม่มีผลต่อการสกัดสารยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลสและซูเครส แต่การสกัดสารยับยั้งมอลเตสต่อเอนไซม์มอลเตส วิธีPeuyo และคณะ (1997) สกัดสารออกมาได้ประมาณ 2 เท่าของวิธีอื่น แต่อย่างไรก็ตามการทดลองในขั้นต่อไปจะเลือกวิธีสกัด Grant และคณะ (1995) แบบไม่ให้ความร้อน เนื่องจาก

1. สามารถสกัดสารยับยั้งต่ออะไมเลส มอลเตสและซูเครสได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารยับยั้งต่ออะไมเลสและซูเครส ให้ผลการสกัดใกล้เคียงกับอีก 2 วิธี
2. วิธี Grant และคณะ (1995) แบบไม่ให้ความร้อน ใช้สารในการสกัดที่ไม่เป็นอันตรายในการบริโภค เป็นบัฟเฟอร์ที่มี pH และองค์ประกอบเช่นเดียวกับบัฟเฟอร์ในร่างกาย และไม่ต้องยุ่งยากในการนำไปให้ความร้อนที่ 70°ซ เพื่อทำลายโปรตีนที่ไม่ทนร้อนออกไป
3. วิธี Peuyo และคณะ (1997) ไม่เลือกเพราะสารที่ใช้ในการสกัดนั้น เป็นอันตรายต่อการบริโภคได้แก่β-mercaptoethanolและPMSF เป็นสารที่น่าจะไม่เหมาะที่จะใช้ในการสกัดสารยับยั้งเพื่ออุตสาหกรรมเกี่ยวกับการบริโภคและเวชภัณฑ์ยา

## 2. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสารสกัดถั่วแดงสุ่มจาก 3 แหล่งซื้อต่อการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส มอลเตสและซูเครส

ผลการเปรียบเทียบสารสกัดถั่วแดงที่สุ่มซื้อจากต่างแหล่ง ได้แก่ แมคโคร โลตัสและตลาดสด มีค่า specific inhibitory activity ต่อเอนไซม์อะไมเลสที่ร้อยละ 50 ของการยับยั้งเท่ากับ 1.35±0.24, 1.67±0.19, 2.41±0.73 ตามลำดับ ต่อเอนไซม์มอลเตส ที่ร้อยละ 40 ของการยับยั้ง

เท่ากับ 0.04±0.00, 0.04±0.00, 0.03±0.00 และต่อเอนไซม์ซูเครส ที่ร้อยละ 40 ของการยับยั้งเท่ากับ 0.04±0.00, 0.04±0.00, 0.04±0.00 เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-valueน้อยกว่า0.05 ของการยับยั้งอะไมเลส มอลเตสและซูเครสของถั่วแดงในแต่ละแหล่งที่สุ่มซื้อดังนั้นถั่วแดงที่สุ่มซื้อจากแหล่งต่างกันจึงไม่มีผลต่อปริมาณสารยับยั้งที่มีในเมล็ดถั่วแดง

**3. เปรียบเทียบร้อยละแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดตัวอย่าง**

ในการคัดเลือกร้อยละความอิ่มตัวผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนสารยับยั้งอะไมเลส โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0, 50, 60, 70 และ 80 พบว่าที่ร้อยละความอิ่มตัวเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆมีความแตกต่างของค่าspecific inhibitory activity อย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า0.05 ซึ่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 50 ของความอิ่มตัวจะให้ค่าการยับยั้งสูงที่สุด ดังรูปที่ 1 ดังนั้นในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจึงตกตะกอนด้วยเกลือที่ความอิ่มตัวร้อยละ 50

**4. การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส**

**4.1 สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วดิบ**

นำเมล็ดถั่วแดง 200 กรัมสกัดด้วยวิธี Grant และคณะ (1995) โดยไม่ให้ความร้อน จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปตรวจหากิจกรรมการยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลสที่ pH 6.9 อุณหภูมิ 37°ซ และใช้น้ำแป้ง 2%เป็นสับสเตรท จากการทดลองพบว่า สารสกัดถั่วแดงมีกิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด (total inhibitory activity) คิดเป็น 17,770 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 17,770 มก. คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะ (specific inhibitory activity) ของสารยับยั้งเท่ากับ 1 หน่วย/มก.โปรตีน

**4.2 การตกตะกอนโปรตีนในสารสกัดถั่วแดงด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต**

นำสารสกัดข้อ 4.1 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 50 จากนั้น ไดอะไลซ์ใน 0.01 M Phosphate buffer pH 6.9 ที่ 4°ซ นาน 12 ชม.หลังจากนั้นทำให้เข้มข้นด้วยแอควาไซด์ดูดน้ำ การทดลองพบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 13,531.5 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 3,600 มก.และมีค่าการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 3.75 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 76.15 %ของปริมาณสารยับยั้งเริ่มต้น มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.75 เท่า ดังแสดงค่าตามตารางที่ 4

**4.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์** DEAE-cellulose

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.2 มาทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose ดังรายละเอียดวิธีในข้อ 7.2 จากผลการทดลองพบว่า สามารถแยกสารยับยั้งอะไมเลส ออกจากโปรตีนตัวอื่นในสารละลาย โดยการชะคอลัมน์ด้วย NaCl โปรตีนจะถูกชะออกมาดังแสดงในรูปที่ 2 หลังจากที่เก็บสารละลายเฉพาะหลอดที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงๆมารวมเข้าด้วยกัน และทำให้เข้มข้น พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 11,318.4 หน่วย ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1,839.6 มก.คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 6.15 หน่วย/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 6.15 เท่า เหลือสารยับยั้ง 63.69 %จากปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสเริ่มต้น ดังแสดงค่าในตารางที่ 4

**4.4 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์** Sephadex G-100

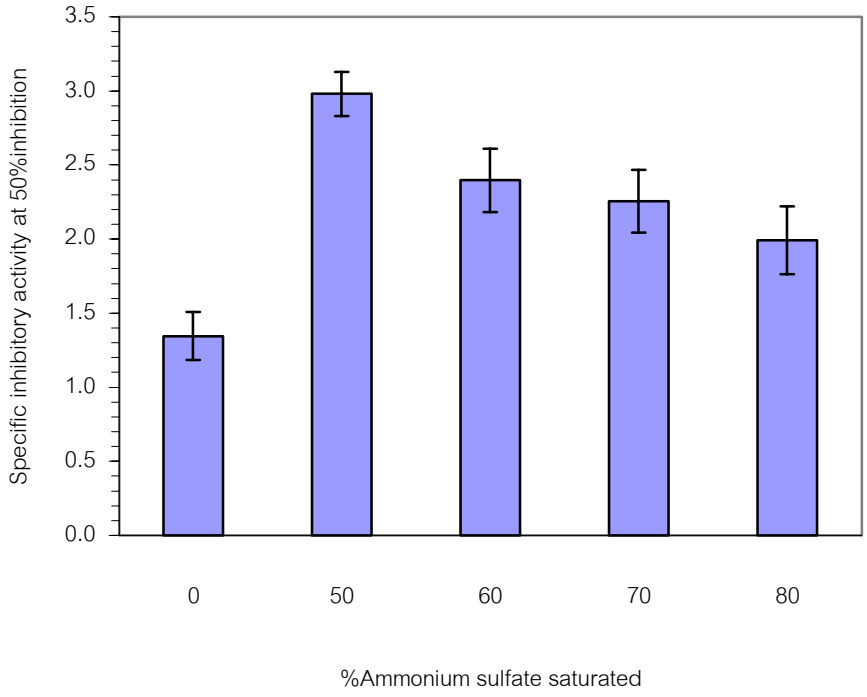
นำสารละลายในข้อ4.3 ที่ทำให้เข้มข้นแล้วมาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephadex G-100 ซึ่งชะด้วยบัฟเฟอร์ 0.01 M Phosphate buffer pH 6.9 ดังรายละเอียดวิธีการในข้อ 7.3 พบว่าโปรตีนจะถูกชะออกมา ดังรูปที่ 3 ซึ่งสารยับยั้งอะไมเลสส่วนใหญ่ออกมาในพีคที่ 2 นำสารละลายเฉพาะหลอดที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงๆมารวมกันและทำให้เข้มข้น พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 9232.3 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1839.6 มก. คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 9.29 หน่วย/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 9.29 เท่า เหลือปริมาณสารยับยั้งอะไมเลส 51.95% จากปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสเริ่มต้น ดังแสดงค่าในตารางที่ 4

**4.5 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์** Hydroxyapatite

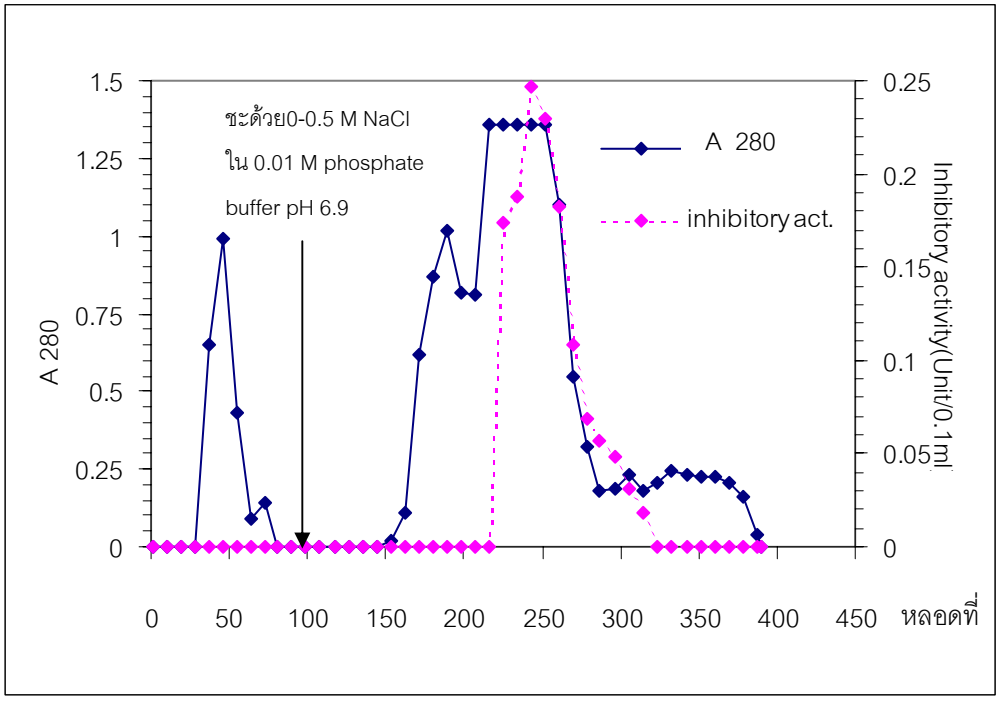
นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.4 ผ่านลงคอลัมน์ที่บรรจุด้วย hydroxyapatite และทำการ ชะแบบ gradient ด้วย 1-500 mM sodium phosphate pH 6.8 ดังรายละเอียดวิธีในข้อ 7.4 โปรตีนถูกชะออกมา ตามรูปที่ 4 นำสารละลายเฉพาะหลอดที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงๆมารวมกันและทำให้เข้มข้น พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสทั้งหมดเท่ากับ 3,802.11 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 91.12 มก.คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 41.73 หน่วย/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 41.73 เท่า เหลือปริมาณสารยับยั้งอะไมเลส 21.40 %จากสารยับยั้งอะไมเลสเริ่มต้น ดังแสดงค่าในตารางที่ 4

จากผลการทดลองทั้งหมดของขั้นตอนการทำบริสุทธิ์พบว่าในขั้นการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose สารยับยั้งอะไมเลสออกมาโดยการชะด้วย 0-0.5 M NaCl ใน 0.01 M Phosphate buffer pH 6.9 แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งอะไมเลสสามารถจับกับคอลัมน์ได้ ซึ่งหมายถึงสารยับยั้งอะไมเลสนี้มีประจุเป็นลบหรือเป็นพวก acidic protein เมื่อนำมา

แยกต่อโดยคอลัมน์ Sephadex G-100 โปรตีนจะถูกชะออกมา 4 พีค พีคแรกมีสีน้ำตาล พีคที่ 2,3 จะไม่มีสี และพีคที่ 4 จะมีสีเหลืองอ่อน พีคที่ 1,2 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลส และเมื่อนำพีคที่ 2 มาแยกต่อในคอลัมน์ hydroxyapatite พบว่าโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค โดยสารยับยั้งอะไมเลสถูกชะออกมาในพีคที่ 2

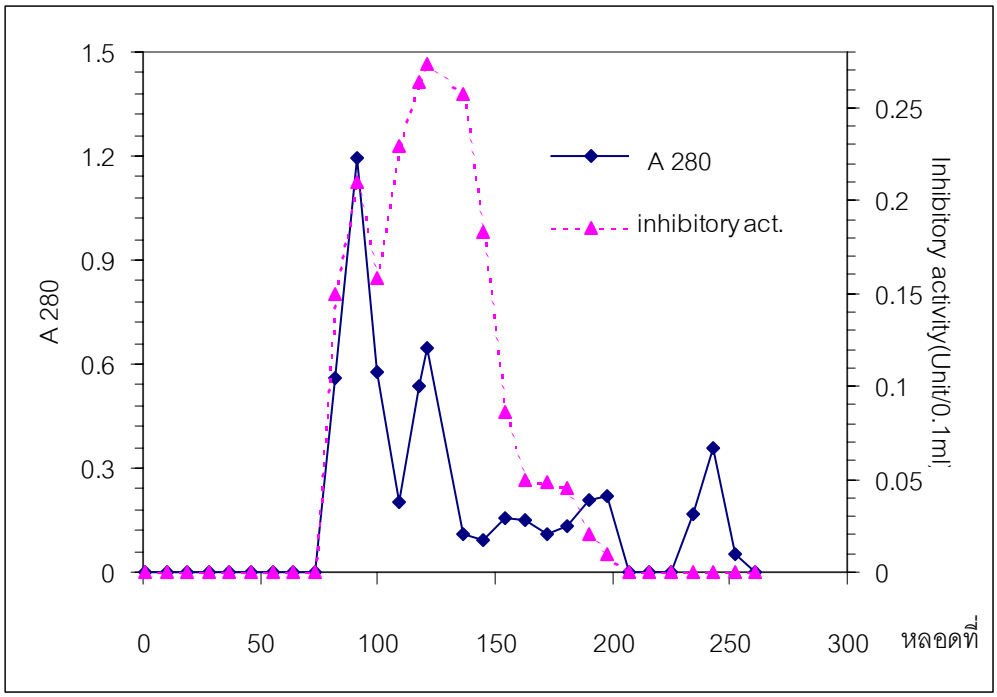



รูปที่ 1 ผลของร้อยละความอิ่มตัวผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตต่อค่าร้อยละ 50ของค่าการยับยั้งจำเพาะ ด้วยการทดลอง 4 ซ้ำ โดยการนำสารสกัดถั่วแดงมาตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆ จากนั้นหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส



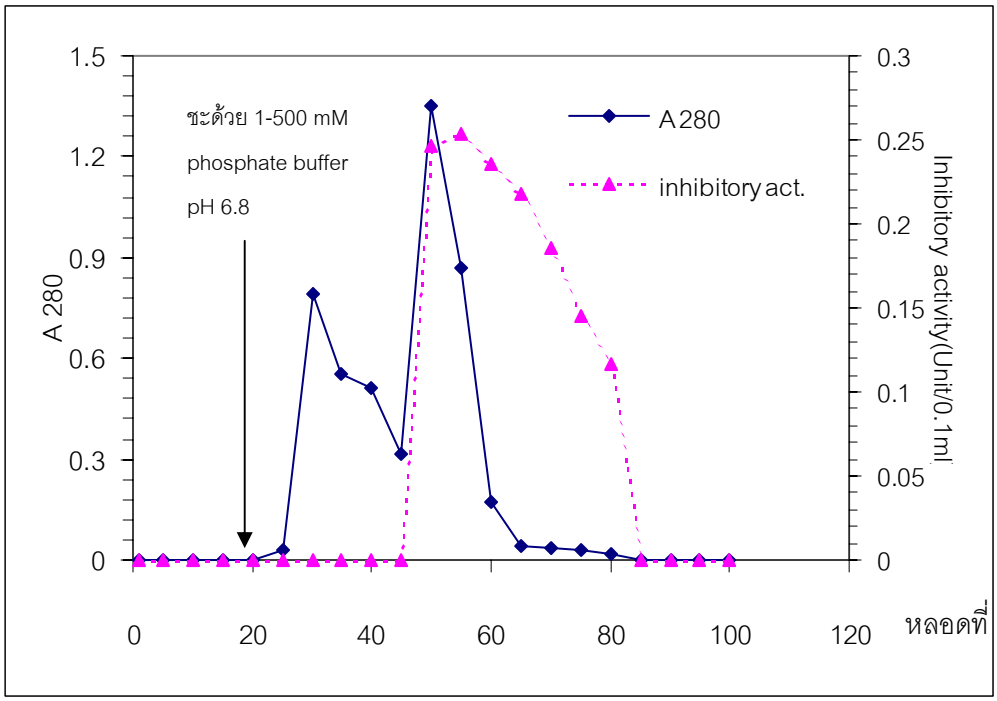

รูปที่ 2 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ DEAE-cellulose

นำโปรตีนจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 50 ซึ่งผ่านการไดอะไลซ์และทำให้เข้มข้นแล้ว ผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ขนาด 2.5x12 ซม. ล้างคอลัมน์ด้วย 0.01 M phosphate buffer pH 6.9 ด้วยอัตราการไหล 30 มล/ชม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้วชะโปรตีนด้วย gradient 0-0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดียวกันที่อัตราการไหลเท่าเดิม เก็บสารละลายแยกส่วน (fraction) หลอดละ 1 มล. ติดตามโปรตีนที่ถูกชะออกมา โดยดูค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส รวมหลอดที่ 220-300 และทำให้เข้มข้น นำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100




รูปที่ 3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ Sephadex G-100

นำโปรตีนจากคอลัมน์ DEAE-cellulose มาทำให้เข้มข้นและผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ขนาด 2.0x60 ซม. ชะคอลัมน์ด้วย 0.01 M phosphate buffer pH 6.9 ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บสารละลายแยกส่วน (fraction) หลอดละ 1 มล. ติดตามโปรตีนที่ออกมาที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร และหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส รวมหลอดที่ 110-150 และทำให้เข้มข้น นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Hydroxyapatite




รูปที่ 4 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ Hydroxyapatite

นำโปรตีนจากคอลัมน์sephadexG-100ที่ทำให้เข้มข้นแล้วผ่านคอลัมน์ Hydroxyapatite ขนาด 0.5 x 6 ซม. ชะด้วย gradient 1-500 mm phosphate buffer pH 6.8 ด้วยอัตราการไหล 10 มล./ชม. เก็บสารละลายแยกส่วน (fraction) หลอดละ 0.25 มล. ติดตามโปรตีนที่ออกมาโดยดูค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส รวมหลอดที่ 50-80 และทำให้เข้มข้นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

**ตารางที่ 4** ค่าการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส

| step | Total protein (mg) | Total inhibitory activity (AI unit) | Specific activity (AIunit/mg. protein) | %yield | Purification fold |
|---|---|---|---|---|---|
| Crude extract | 17,770 | 17,770 | 1 | 100 | 1 |
| Dialysate | 3,600 | 13,531.50 | 3.75 | 76.15 | 3.75 |
| DEAE | 1,839.60 | 11,318.40 | 6.15 | 63.69 | 6.15 |
| Sephadex G-100 | 994.28 | 9,232.20 | 9.29 | 51.95 | 9.29 |
| Hydroxyapatite | 91.12 | 3,802.11 | 41.73 | 21.40 | 41.73 |

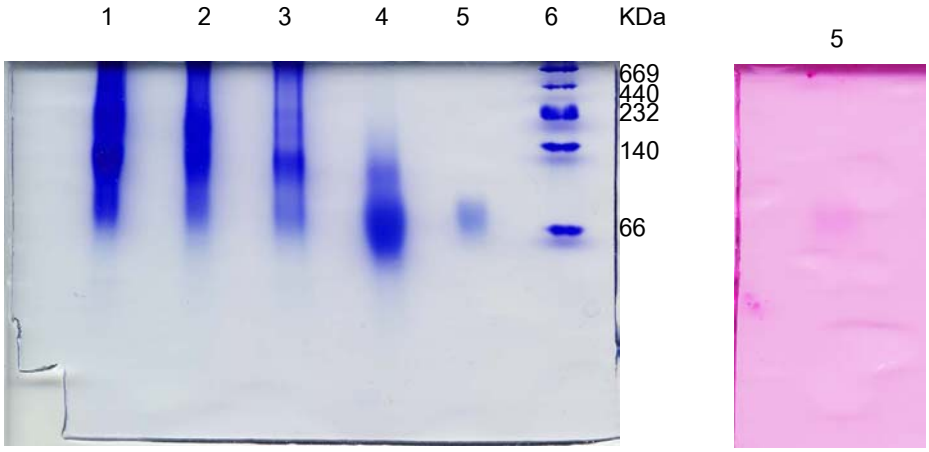
**5. ผลการตรวจความบริสุทธิ์ สารยับยั้งอะไมเลสในขั้นตอนต่าง ๆของการทำบริสุทธิ์**

**5.1 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสที่แยกได้จากขั้นตอนต่าง ๆโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ**

นำสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆมาทำ โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบไม่แปลงสภาพธรรมชาติ ตามวิธีในหัวข้อ 8.1 เพื่อนำมาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในขั้นต่างๆ พบว่า มีแถบโปรตีนจำนวนมากในสารสกัดถั่วแดงตัวอย่าง และแถบเหล่านี้จะลดลงเรื่อยๆเมื่อผ่านขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ จนเหลือโปรตีนเพียงแถบเดียวในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายคือสารละลายAI ที่ได้จากคอลัมน์ Hydroxyapatite ที่มีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.48 และโปรตีนขั้นสุดท้ายที่บริสุทธิ์แล้วย้อมไกลโคโปรตีนให้สีชมพูดังนั้นแสดงว่าสารยับยั้งอะไมเลสเป็นไกลโคโปรตีน ดังในรูปที่ 5

**5.2 ผลการตรวจความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสที่แยกได้จากขั้นตอนต่าง ๆ โดยโพลีอะคริลาไมด์อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ**

นำสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆมาทำโพลีอะคริลาไมด์อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ ตามวิธีในหัวข้อ 8.2 พบว่าแถบโปรตีนของสารสกัดถั่วแดงมีโปรตีนจำนวนมากและโปรตีนบางตัวจะหายไปเล็กน้อยหลังจากตกตะกอนโปรตีนและ เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose จะพบแถบโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสชัดขึ้น ส่วนโปรตีนตัวอื่นจะหายไป เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ต่อ พบว่ายิ่งเห็นแถบโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสชัดขึ้นมากแต่ยังคงมีโปรตีนตัวอื่นปนอยู่เล็กน้อยในขั้นตอนสุดท้าย นำไปผ่านคอลัมน์ Hydroxyapatite จะเหลือโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสเพียงอย่างเดียว จะเห็นเป็นแถบโปรตีน 2 แถบ พบว่ามีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ สำหรับโปรตีนแถบบนเท่ากับ 0.92 และโปรตีนแถบล่างเท่ากับ 0.93 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 17,378 และ 16,596 ดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อนำไปย้อมไกลโคโปรตีน พบว่าแถบโปรตีนทั้ง 2 ติดสีชมพู แสดงว่า สารยับยั้งอะไมเลสเป็นไกลโคโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 6




รูปที่ 5 แบบแผนโพลีอะคริลาไมด์อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพที่ 10%เจล ของขั้นตอนต่างๆในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส

A : ย้อมโปรตีน B : ย้อมไกลโคโปรตีน

แถวที่ 1 สารสกัดถั่วแดง มีโปรตีน 100 μg

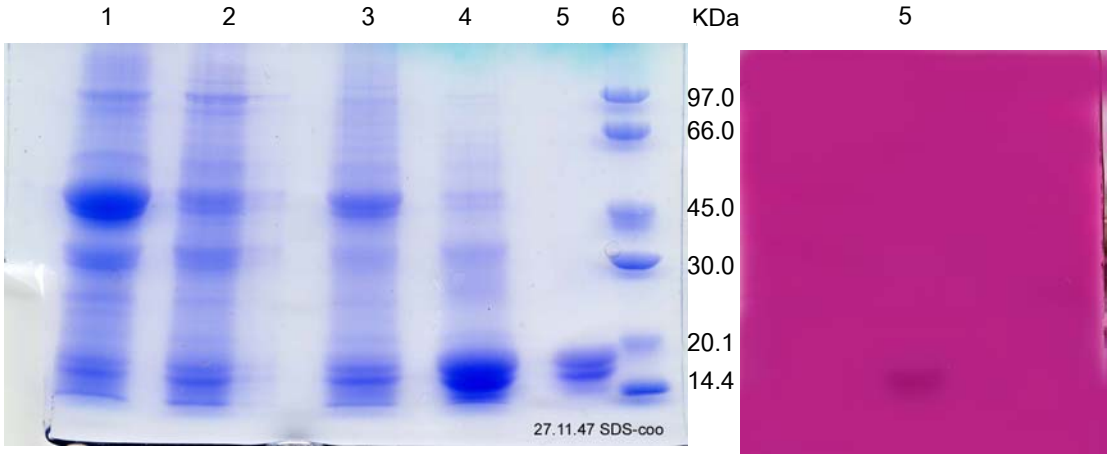
แถวที่ 2 Dialysate มีโปรตีน 100 μg

แถวที่ 3 สารละลาย AI ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose มีโปรตีน 100 μg

แถวที่ 4 สารละลาย AI ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีโปรตีน 100 μg

แถวที่ 5 สารละลาย AI ที่ได้จากคอลัมน์ Hydroxyapatite มีโปรตีน 100 μg

แถวที่ 6 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ชนิด HMW




A B

รูปที่ 6 แบบแผนโพลีอะคริลาไมด์อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพที่ 12%เจล ของขั้นตอนต่างๆในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส

A : ย้อมโปรตีน B : ย้อมไกลโคโปรตีน

แถวที่ 1 สารสกัดถั่วแดง มีโปรตีน 100 μg
แถวที่ 2 Dialysate มีโปรตีน 100 μg
แถวที่ 3 สารละลาย AI ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose มีโปรตีน 100 μg
แถวที่ 4 สารละลาย AI ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีโปรตีน 100 μg
แถวที่ 5 สารละลาย AI ที่ได้จากคอลัมน์ Hydroxyapatite มีโปรตีน 100 μg
แถวที่ 6 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ชนิด HMW

**6. ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลส**

**6.1 น้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น**

การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลส โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น หาโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 ตามวิธีในข้อ 7.3 พบว่ามีโปรตีนที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสถูกชะออกมาที่ค่า $K_{av}$ 0.18 ดังรูปที่ 7 เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุล กับค่า $K_{av}$ ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสได้ ซึ่งมีขนาด 56,234 ดาลตัน ดังรูปที่ 8 Mashall และคณะ (1975) หาขนาดโมเลกุลสารยับยั้ง อะไมเลสจาก kidney bean (*P. vulgaris*) พบว่ามีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 45,000-50,000 ดาลตัน โดย Sephadex G-100

**6.2 น้ำหนักโมเลกุลย่อยของสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ**

เมื่อนำตัวอย่างสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้วมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดย วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ ตามวิธีการข้อ 8.2 พบแถบโปรตีน 2 แถบ (ดังแสดงในรูป 6) ซึ่งสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลย่อยได้ จากการเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ หรือ $R_f$ ของสารยับยั้งอะไมเลสกับกราฟระหว่างค่า $R_f$ ของแถบโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด คือ phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor, $\alpha$-lactalbumin กับค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด โดยโปรตีนแถบบนมีขนาดน้ำหนักเท่ากับ 17,378 ดาลตัน และโปรตีนแถบล่างมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 16,596 ดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 9

การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสด้วย โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ โดยเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของสารยับยั้งอะไมเลสกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า มี 2 subunit คือ 17,378 และ 16,596 ดาลตัน และขนาดโมเลกุลนี้พบอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งอื่น ได้แก่ สารยับยั้งอะไมเลสจาก kidney bean (*P. vulgaris*) มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14,000-19,000 ดาลตัน โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ (Le Berre-Anton *et al.,* 1997) และสารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวไรย์ (*Secale cereale*) มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13,000 ดาลตัน (Iulek *et al*., 2000)

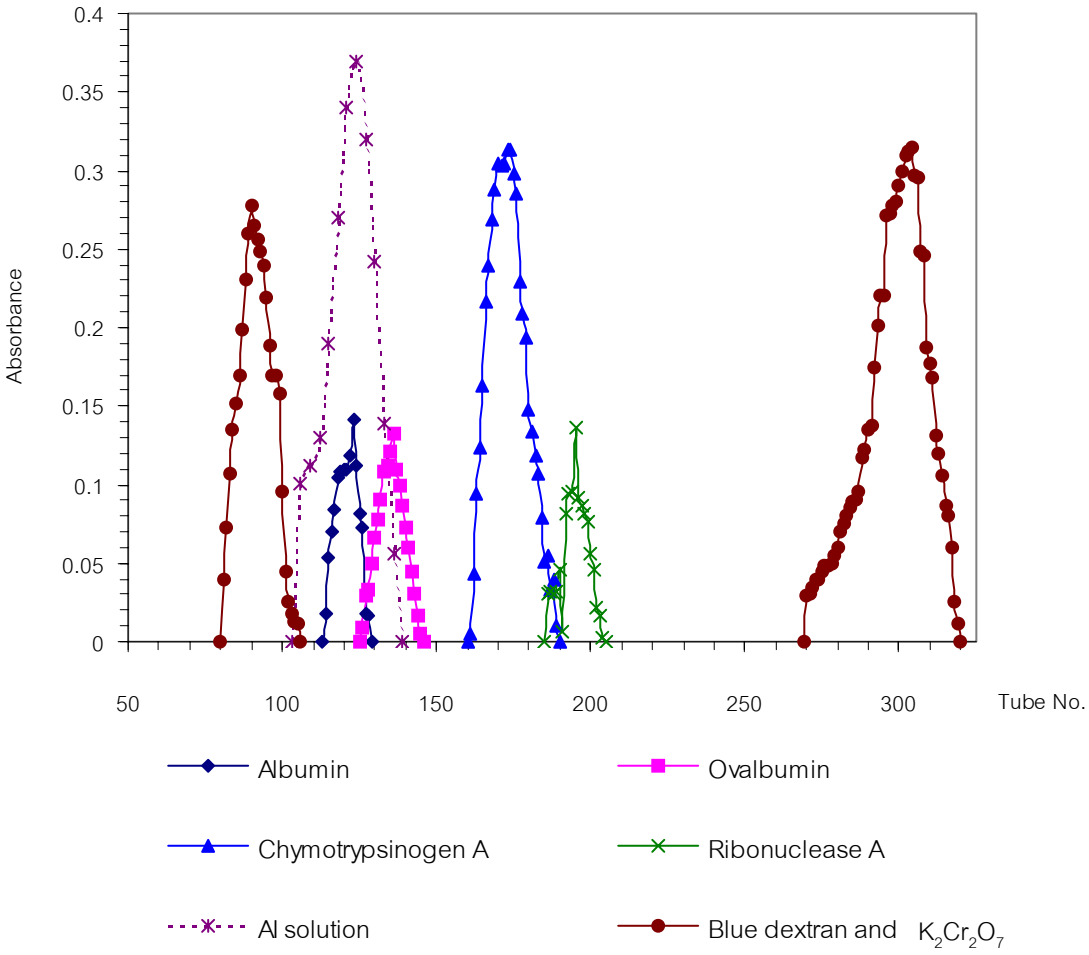
เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากวิธีเจลฟิลเตรชั่น คือ 56,234ดาลตัน และเมื่อนำข้อมูลจาก SDS-PAGE และ gel filtration มาประมวลพร้อมลักษณะแถบโปรตีนที่ $R_f$ 0.92

และ 0.93 (รูปที่ 6) สารยับยั้งนี้น่าจะมี 3 หน่วยย่อย ได้แก่ 2 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากันคือ 17,378 ดาลตัน และอีก 1 หน่วยย่อยคือ 16,596 ดาลตัน ดังนั้นสารยับยั้งอะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุลรวมเป็น 51,352 ดาลตัน

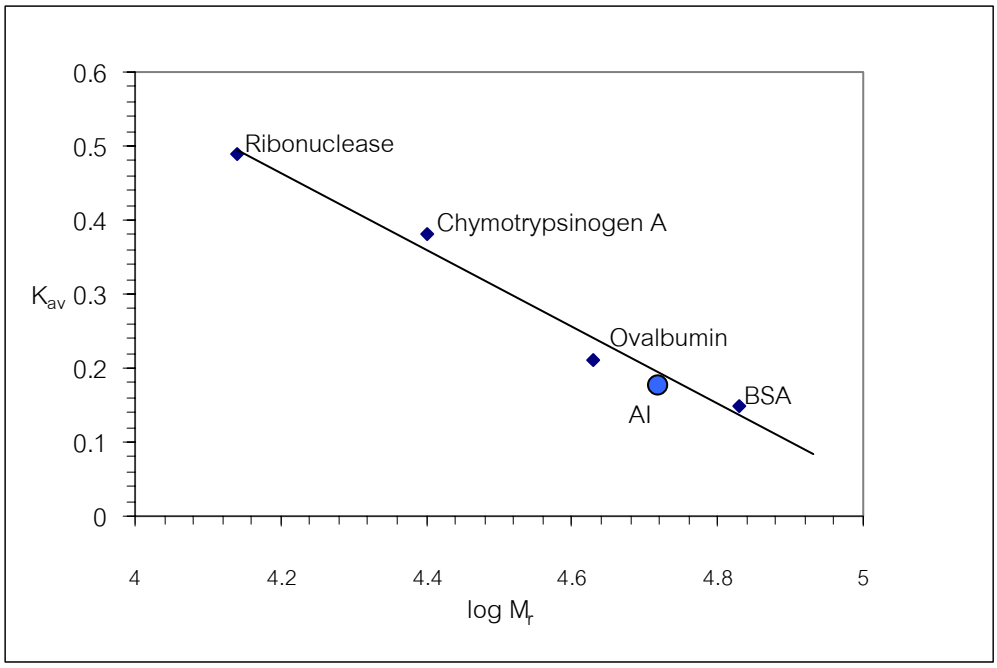
**7. การศึกษาลักษณะการจับกันของสารยับยั้งอะไมเลสกับเอนไซม์อะไมเลส**

เมื่อนำสารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์บ่มกับเอนไซม์อะไมเลสที่ 37°ซ 30นาทีเพื่อดูลักษณะโมเลกุลของสารยับยั้งหลังบ่มกับเอนไซม์อะไมเลส โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ ย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

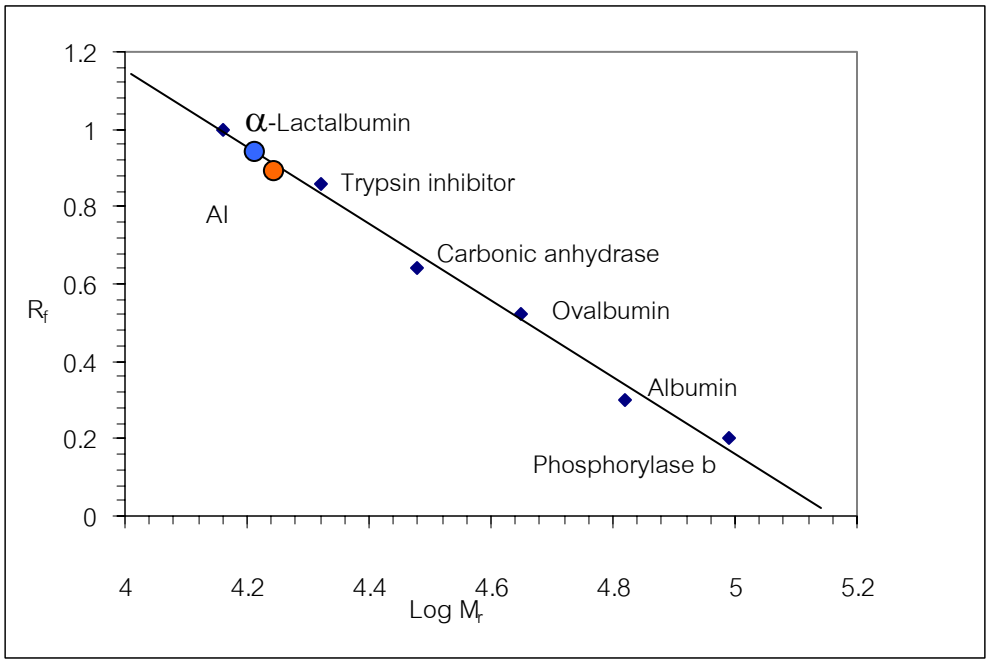
จากการทดลองจะพบว่าหลังการบ่มเอนไซม์อะไมเลสด้วยสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้ว พบว่าขนาดโมเลกุลของเอนไซม์อะไมเลสและสารยับยั้ง ก่อนบ่มและหลังบ่มยังมีขนาดเท่าเดิมแสดงว่าการจับกันระหว่างเอนไซม์อะไมเลสกับสารยับยั้งไม่ได้จับกันแบบ covalent และสารยับยั้งอะไมเลสไม่ได้ไปทำลายโครงสร้างหรือตัดเอนไซม์อะไมเลสเพื่อให้เกิดการเสียสภาพจนเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ดังรูปที่ 10



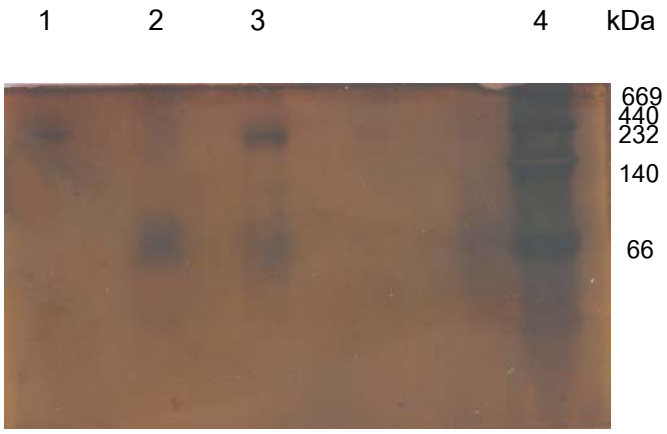

รูปที่ 7 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้ว โดยคอลัมน์ Sephadex G-100 , (วัดค่าดูกลืนแสงโปรตีนที่ 280 nm, Bluedextran วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm และ$K_2Cr_2O_7$ วัดค่าการดูกลืนแสงที่ 480 nm )




รูปที่ 8 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้ว โดยคอลัมน์ Sephadex G-100 จากกราฟมาตรฐาน (แกน X : Log $M_r$ ของโปรตีนมาตรฐาน และแกน Y : $K_{av}$ เป็นค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด )




รูปที่ 9 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Hydroxyapatiteโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพที่ 12%เจล จากกราฟมาตรฐาน (แกน X : log $M_r$ ของโปรตีนมาตรฐาน และ แกน Y : $R_f$ เป็นการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด)




รูปที่ 10 แบบแผนโพลีอะคริลาไมด์อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพที่ 10%เจล ของสารยับยั้งหลังบ่มกับเอนไซม์อะไมเลส ย้อมด้วยซิลเวอร์

แถวที่ 1 เอนไซม์อะไมเลส 5 μg
แถวที่ 2 สารยับยั้งอะไมเลส 4 μg
แถวที่ 3 เอนไซม์อะไมเลส (แถวที่1)บ่มกับสารยับยั้งอะไมเลส(แถวที่2) ที่37°ซ 30 นาที
แถวที่ 4 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ชนิด HMW

**8. ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งอะไมเลส**

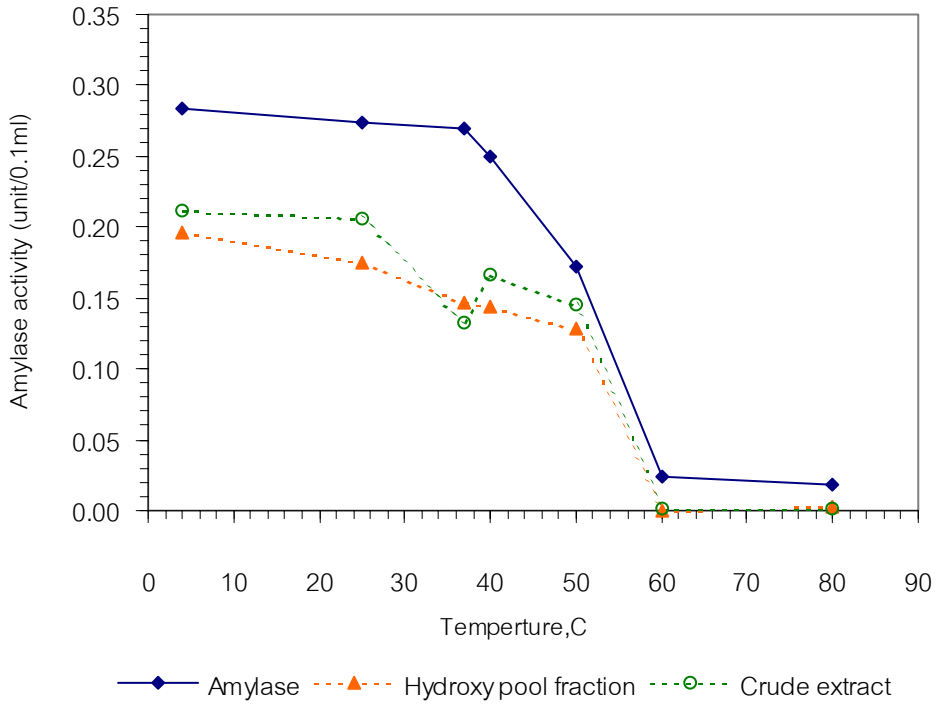
**8.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารยับยั้งอะไมเลส**

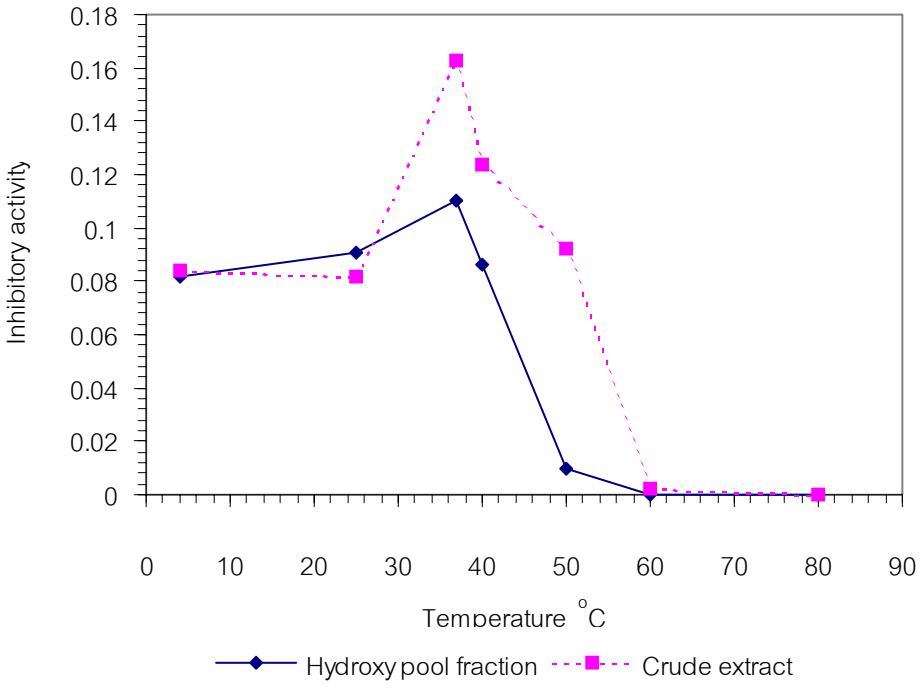
เมื่อนำสารสกัดถั่วแดงและสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งเทียบกับการทำงานของอะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าสารสกัดถั่วแดงและสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 4-50 °ซ โดยที่อุณหภูมิ 4°ซ สารสกัดและสารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์แล้ว สามารถยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสได้เท่าๆกันจากกิจกรรมอะไมเลส 0.36 หน่วย เหลือ 0.2 หน่วยและอุณหภูมิที่สารยับยั้งอะไมเลสทำงานได้ดีที่สุดคือ 37 °ซ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกว่า 40°ซ พบว่าค่าการยับยั้งและกิจกรรมอะไมเลสจะค่อยๆลดลง เมื่อดูกิจกรรมอะไมเลสที่ไม่ได้เติมสารยับยั้ง จะเห็นว่ากิจกรรมอะไมเลสค่อนข้างคง ที่ในช่วง 4-40°ซ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น กิจกรรมอะไมเลสลดลงเรื่อยๆและเป็นศูนย์ตั้งแต่ 60-80 °ซ ซึ่งน่าจะเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ เอนไซม์อะไมเลสจึงไม่สามารถทำงานได้ ดังรูปที่ 11

**8.2 ผลการศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลสที่อุณหภูมิต่าง ๆต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส**

เมื่อนำสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้วไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้ง พบว่าสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้วสามารถยับยั้งได้คงตัวในช่วงอุณหภูมิ 4-40°ซ แต่เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 40°ซ สารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้วยับยั้งอะไมเลสได้ลดลง จนถึงอุณหภูมิ 80°ซสารยับยั้งก็ยังคงสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้แต่น้อยกว่าช่วงอุณหภูมิ 4-40°ซ ซึ่งแสดงว่าสารยับยั้งอะไมเลสชนิดนี้ ณ อุณหภูมิ 80°ซ ยังไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติเพราะสารยับยั้งยังคงสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้ ดังรูปที่ 12

จากผลการศึกษาในข้อ 8.1 (รูปที่ 11) ช่วงอุณหภูมิ 60-80 °ซ เมื่อเทียบกับผลการศึกษาข้อ 8.2 (รูปที่ 12) การยับยั้งที่ไม่เห็นในช่วงอุณหภูมินั้นน่าจะเกิดจากเอนไซม์อะไมเลสสูญเสียสภาพธรรมชาติ ไม่ใช่สารยับยั้งทำงานไม่ได้ เพราะในรูปที่ 12 สารยับยั้งยังมีการยับยั้งช่วงได้อุณหภูมิ 60-80 °ซ

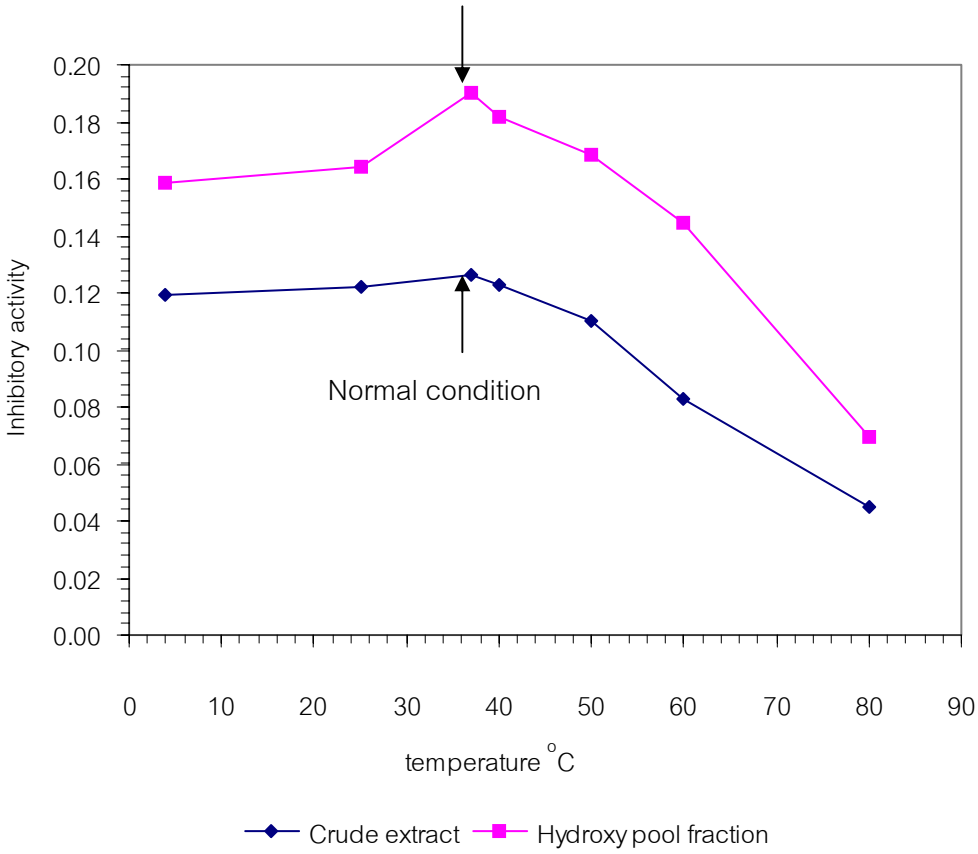



A

รูปที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว

ที่อุณหภูมิ 4, 25, 37, 40, 50, 60, 80°ซ A : กิจกรรมอะไมเลสเริ่มต้นและกิจกรรมอะไมเลสที่เหลือหลังการยับยั้ง B: แสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส




รูปที่ 12 ผลของความคงตัวของสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

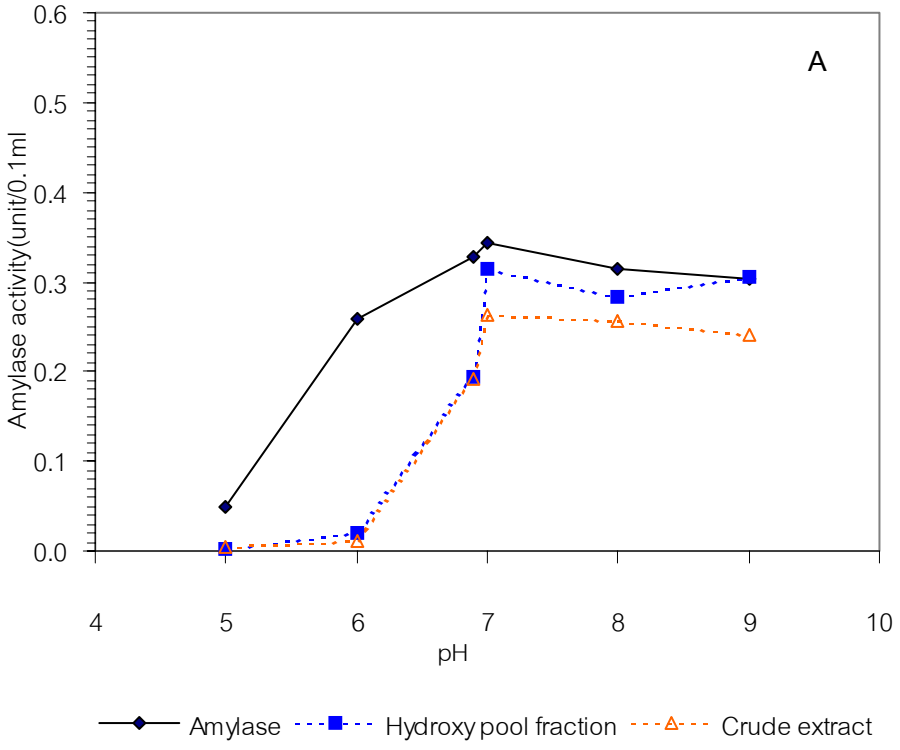
โดยการบ่มสารยับยั้งอะไมเลสที่อุณหภูมิ 4, 25, 37, 40, 50, 60, 80 °ซ หลังจากนั้นนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสที่ 37°ซ 3 นาที

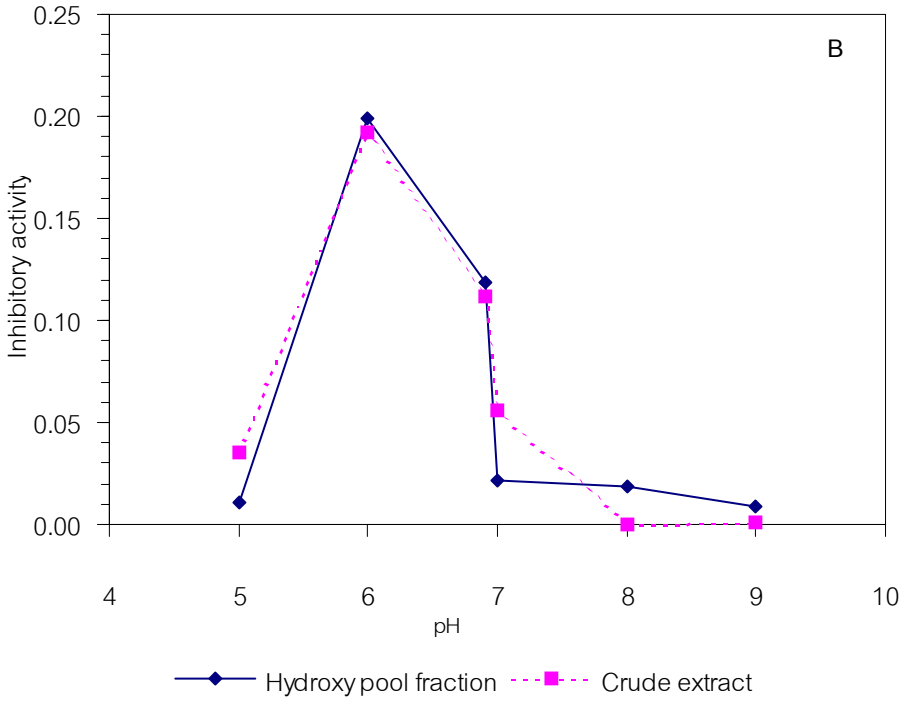
**8.3 ผลการศึกษาผลของ pH ต่อกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส**

การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้วที่อุณหภูมิ 37 °ซ เปรียบเทียบกับการทำงานเอนไซม์อะไมเลส พบว่าสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์มี optimum pH ของการยับยั้งอะไมเลสที่ pH 6.0 ดังรูป 13 ที่ภาวะปกติซึ่งใช้ในการทดลองทั่วไป ( pH 6.9, 37°ซ ) ซึ่งเป็น physiological condition ทั้งสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้วยับยั้งอะไมเลสได้พอๆกันคือ 0.08 unit โดยเฉลี่ย Le Berre-Anton และคณะ (1997) พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้วจากถั่วขาว (*P.vulgaris)* มี optimum pH ที่ pH 4.5 Marshall และคณะ (1975) พบสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วขาว (*P. vulgaris)* มี optimum pHที่ pH 5.5 ดังนั้นพบว่า สารยับยั้งอะไมเลสส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีที่ pH ต่ำ ซึ่งการยับยั้งได้ที่ pH ต่ำๆนี้สามารถอธิบายได้ว่าเหตุใด สารยับยั้งอะไมเลสจึงสามารถยับยั้งอะไมเลสในกระเพาะของแมลงซึ่งมีความเป็นกรดได้ (Le Berre-Anton *et al*., 1977) ดังนั้นการมีสารยับยั้งในเมล็ดถั่ว จึงช่วยป้องกันการกัดกินของแมลงได้ด้วยการนำยีนส์สารยับยั้งอะไมเลสใส่ลงใน transgenic plant

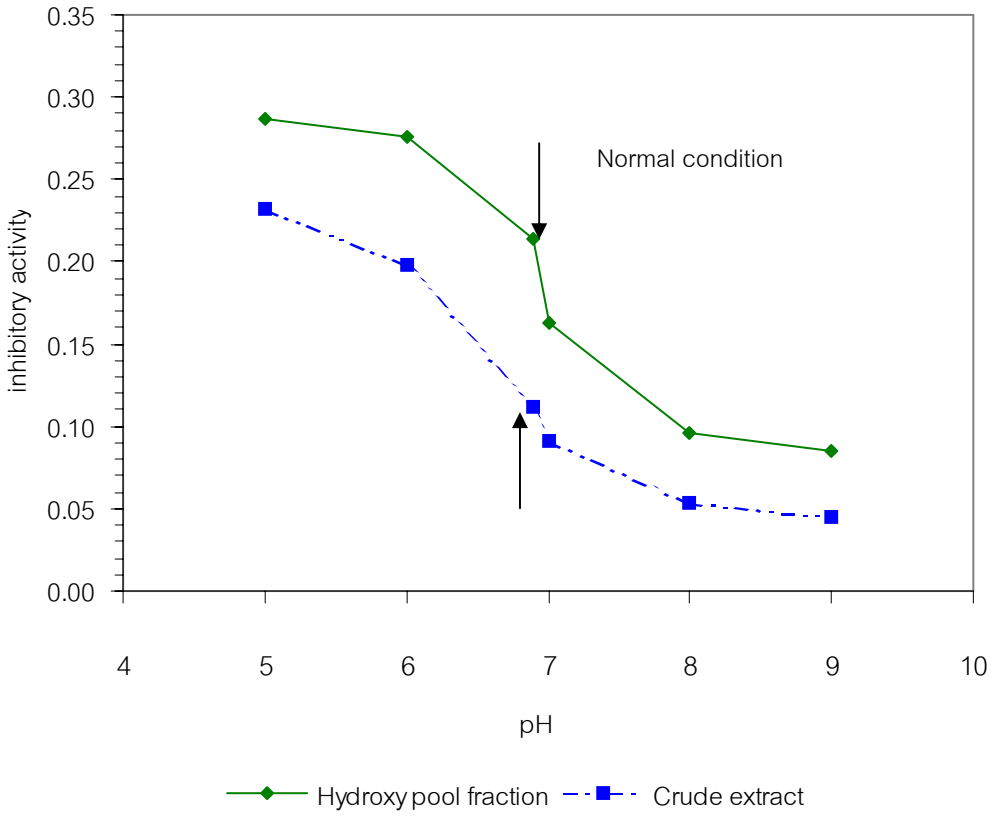
**8.4 ผลการศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลสที่ pH ต่าง ๆ**

เมื่อนำสารสกัดถั่วแดงและสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้ว นำมาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างๆ และนำมาหาค่ากิจกรรมการยับยั้ง พบว่าทั้งสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้วสามารถยับยั้งอะไมเลสได้ดีและคงตัวในช่วง pH 5.0-6.0 แต่เมื่อ pH สูงขึ้นการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสลดลง เนื่องมาจากสภาวะไม่เหมาะสมต่อการยับยั้งอะไมเลส ดังรูปที่ 14


A
Amylase activity(unit/0.1ml
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
4
5
6
7
8
9
10
pH
Amylase
Hydroxy pool fraction
Crude extract


B
Inhibitory activity
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
4
5
6
7
8
9
10
pH
Hydroxy pool fraction
Crude extract

รูปที่ 13 ผลของ pH ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว โดยทดสอบที่ pH 5.0, 6.0, 6.9, 7.0, 8.0, 9.0 A : แสดงกิจกรรมอะไมเลสเริ่มต้นและกิจกรรมอะไมเลสที่เหลือจากการยับยั้ง B : แสดงค่าการยับยั้งอะไมเลส

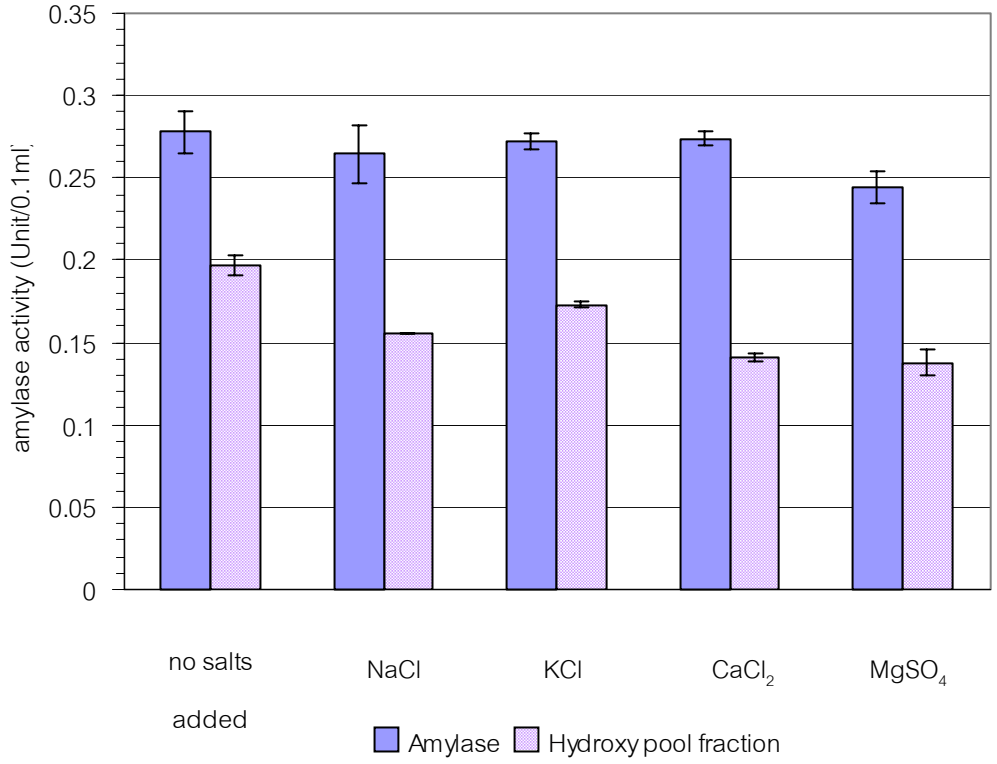



รูปที่ 14 ผลของความคงตัวของสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่ pH ต่างๆ โดยการเจือจางสารยับยั้งอะไมเลสที่ pH 5.0, 6.0, 6.9, 7.0, 8.0, 9.0 หลังจากนั้นนำมาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสที่ 37°ซ 3 นาที

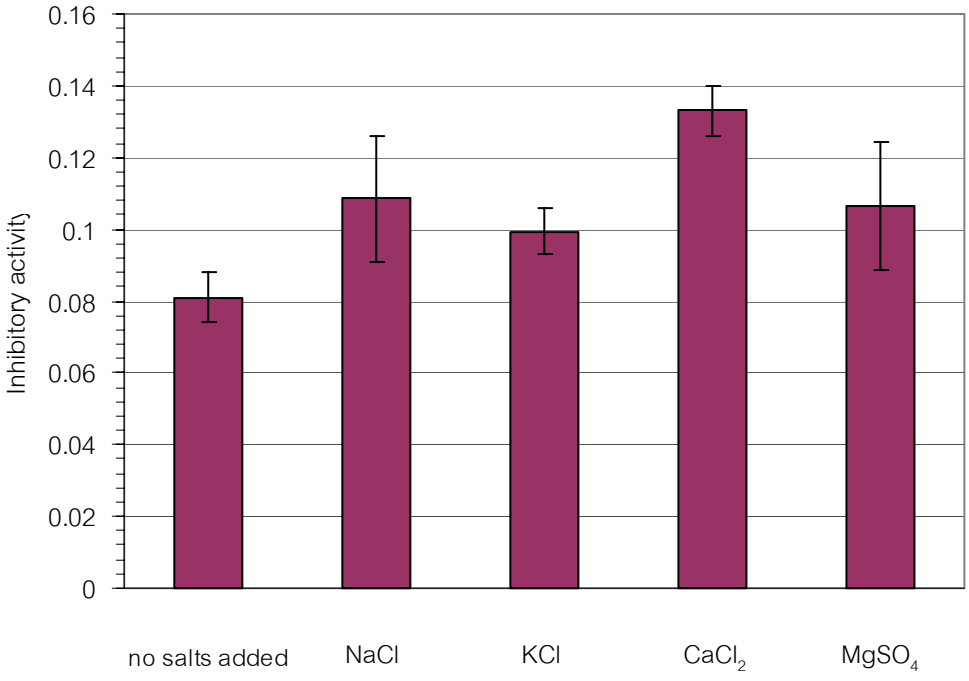
### 8.5 ผลการศึกษาผลของอิออนต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส

เมื่อนำสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้วมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 0.015 M NaCl หรือ 0.015 M KCl หรือ 0.015 M $CaCl_2$ หรือ 0.015 M $MgSO_4$ จากนั้นหาค่ากิจกรรมการยับยั้ง พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งจากมากไปน้อยดังนี้ $CaCl_2$>NaCl> $MgSO_4$>KCl>no added salt จากผลการทดลองจะเห็นว่า ในบัฟเฟอร์ที่มี $CaCl_2$ อยู่จะช่วยให้มีการยับยั้งสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อะไมเลสเริ่มต้น เนื่องจาก $CaCl_2$ เป็นตัวช่วยเพิ่มให้การจับระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ดีขึ้น ส่วน $MgSO_4$ มีผลลดกิจกรรมของอะไมเลสและไม่มีผลต่อการยับยั้ง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับงานของ Gibbs และคณะ (1998) ดังแสดงตามรูปที่ 15

A


0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
amylase activity (Unit/0.1ml)
no salts added
NaCl
KCl
CaCl2
MgSO4
Amylase
Hydroxy pool fraction

B


0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
Inhibitory activity
no salts added
NaCl
KCl
CaCl2
MgSO4

รูปที่ 15 ผลของ 0.015 M อิออนต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ด้วยการทดลอง 2 ซ้ำ

A: แสดงกิจกรรมอะไมเลสเริ่มต้นและกิจกรรมอะไมเลสที่เหลือหลังการยับยั้ง

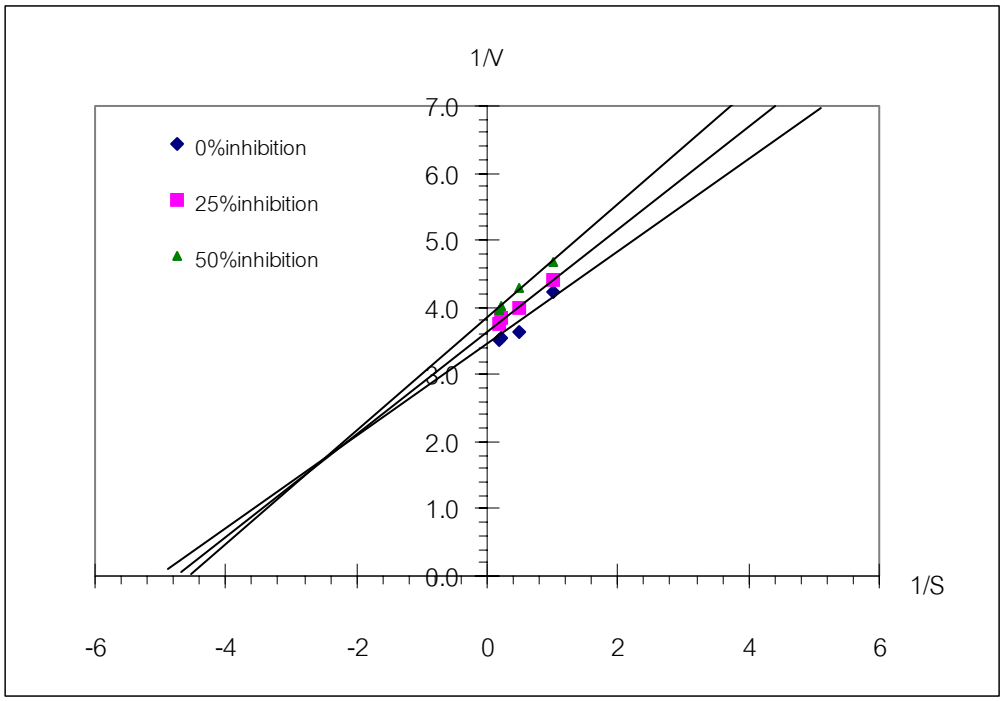
B : แสดงค่าการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

**8.6 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดง**

จากการนำสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ปริมาณ 3 ความเข้มข้นมาทดสอบหาจลนศาสตร์ของสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดง เพื่อจำแนกลักษณะการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลสที่มีต่อเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้สารตั้งต้นคือ น้ำแป้งที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่า $K_m$ เปลี่ยนแปลงและอัตราความเร็วสูงสุด $V_{max}$ มีค่าลดลง ดังรูปที่ 16 ดังนั้นสารยับยั้งอะไมเลสมีการยับยั้งแบบ mixed noncompetitive

จากกราฟจะเห็นว่าจุดตัดเส้นกราฟ ไม่ตกบนแกน 1/S ตามทฤษฎีของจลนศาสตร์แสดงว่า สารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์จากถั่วแดง มีความชอบที่จะจับกันในรูปของ ES complex มากกว่าจับกับเอนไซม์อิสระ เพราะว่าถ้าสารยับยั้งอะไมเลสชอบจับกับเอนไซม์อิสระจริง กราฟของค่า $K_m$ จะตัดเป็นจุดเดียวบนแกน X ซึ่งประสบการณ์จากการทดลองได้สนับสนุนดังนี้ ในครั้งแรกที่ทำการทดลองได้ใส่สับสเตรท (น้ำแป้ง) กับสารยับยั้งอะไมเลสลงไปก่อน แล้วจึงใส่เอนไซม์อะไมเลส พบว่าค่าการยับยั้งค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเปลี่ยนลำดับการใส่เป็น สารยับยั้งอะไมเลส เอนไซม์ และสับสเตรท ตามลำดับ พบว่าค่า $k_m$ สูงมากกว่าหลายเท่า

Le Berre-Anton และคณะ (1997) ศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งจากถั่ว *P. vulgaris* พบว่ามีการยับยั้งแบบ mixed noncompetitive ส่วน Marshall และ Lauda (1975) ศึกษาจลนศาสตร์ของสารยับยั้งถั่วขาวพบว่ามีจลนศาสตร์การยับยั้งแบบ noncompetitive




รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1/V ที่เวลา 3 นาที และ 1/S กับผลความเข้มข้นของสารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์จากถั่วแดงที่ 0, 25 และ 50%การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ที่ความเข้มข้นของน้ำแป้ง (S) เท่ากับ 0, 1, 2, 4 และ 6%น้ำแป้งในบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate buffer, 0.015 M NaCl pH 6.9 ซึ่งค่า V คือ ความเร็วของปฏิกิริยา หรือ mg. maltose ที่เกิดขึ้นที่เวลา 3 นาที 37 °ซ

**8.7 ผลการยับยั้งอะไมเลส มอลเตสและซูเครสของสารสกัดถั่วแดงและสารที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ขั้นต่าง ๆ**

นำสารสกัดถั่วแดงและสารที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนขั้นต่างๆ คือ Dialysate, DEAE fraction, Sephadex G-100 fraction และ Hydroxyapatite fraction ปริมาตร 0.1 มล. ผสมกับเอนไซม์อะไมเลส มอลเตสและซูเครส จากแหล่งต่างๆ 0.1 มล. บ่มและตรวจหากิจกรรมการยับยั้งเช่นที่กล่าวข้างต้นในข้อ 2.1และ 2.2 เพื่อดูความจำเพาะของสารยับยั้งต่อเอนไซม์และศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ได้แก่ การลดน้ำตาลในเลือด ผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรทเป็นกลูโคสในทางเดินอาหารอันได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส มอลเตสและซูเครส ผลการทดลองตารางที่ 5 พบว่า

สารสกัดถั่วแดงสามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายคนและตับอ่อนของหมูได้โดยมีค่า specific inhibitory activity ต่อตับอ่อนหมูสูงกว่าน้ำลายคน (0.162 และ 0.075 ตามลำดับ) สามารถยับยั้งมอลเตสจากยีสต์และลำไส้ duodenum ของหมูเท่าๆกัน (0.019) สามารถยับยั้งซูเครสได้ 0.015 Unit/mg.protein

Dialysate สามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายคนและตับอ่อนของหมูได้โดยมีค่า specific inhibitory activity ต่อตับอ่อนหมูสูงกว่าน้ำลายคน (0.224 และ 0.143 ตามลำดับ) สามารถยับยั้งมอลเตสจากยีสต์และลำไส้ duodenum ของหมูได้ใกล้เคียงกัน (0.005 และ 0.006 ตามลำดับ) และสามารถยับยั้งซูเครสได้เล็กน้อย (0.001 Unit/mg.protein)

DEAE fraction สามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายคนและตับอ่อนของหมูได้โดยมีค่า specific inhibitory activity ต่อตับอ่อนหมูสูงกว่าน้ำลายคน (0.44 และ 0.296 ตามลำดับ) สามารถยับยั้งมอลเตสจากยีสต์ได้สูงกว่ามอลเตสจากลำไส้ duodenum ของหมู (0.017 และ 0.008 ตามลำดับ) สามารถยับยั้งซูเครสได้ 0.013 Unit/mg.protein

Sephadex G-100 fraction สามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายคนและตับอ่อนของหมูได้โดยมีค่า specific inhibitory activity ต่อตับอ่อนหมูสูงกว่าน้ำลายคน (0.577 และ 0.312 ตามลำดับ) สามารถยับยั้งมอลเตสจากลำไส้ duodenum ของหมูได้ 0.004 แต่ไม่ยับยั้งมอลเตสจากยีสต์ สามารถยับยั้งซูเครสจากยีสต์ได้ 0.015 Unit/mg.protein

Hydroxyapatite fraction สามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายคนและตับอ่อนของหมูได้โดยมีค่า specific inhibitory activity ต่อตับอ่อนหมูสูงกว่าน้ำลายคน (4.22 และ 3.14

ตามลำดับ) สามารถยับยั้งมอลเตสจากลำไส้ duodenum ของหมูได้ 0.014 แต่ไม่ยับยั้งมอลเตสจากยีสต์ และซูเครสจากยีสต์

จากการทดลองพบว่า สารยับยั้งชนิดโปรตีนในแต่ละขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ มีศักยภาพในการยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดเมื่อเทียบกับ เอนไซม์มอลเตสและซูเครสจากแหล่งต่างๆ โดยขั้นตอนสุดท้ายของการทำบริสุทธิ์ด้วย Hydroxyapatite column มีการยับยั้งสูงสุด และ Hydroxy fraction ยังยับยั้งมอลเตสจาก Porcine small intestinal extract ได้ค่า specific inhibitory activity 0.014 Unit/mg.protein ซึ่งจากการตรวจเอกสารพบว่ายังไม่มีการศึกษาถึงสารยับยั้งชนิดที่เป็นโปรตีนต่อการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสและซูเครส จากการทดลองพบว่าสารยับยั้งชนิดที่เป็นโปรตีนสามารถยับยั้งเอนไซม์มอลเตสและซูเครสได้ ในอนาคตสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาคนที่เป็นโรคเบาหวาน โรคอ้วน เพื่อช่วยลดการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดโดยการไปยับยั้งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรทที่ทางเดินอาหาร

**9. ผลการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีนและศึกษาคุณสมบัติ**

เมื่อนำสารสกัดถั่วแดง(วิธีเตรียมข้อ 5.1(2)) มาทำให้บริสุทธิ์จากโปรตีนด้วยเมทานอล เอทานอล ตามวิธี Kim และคณะ (2002) พบว่าเมื่อละลายตะกอนที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate, 0.015 M NaCl, pH 6.9 ด้วยปริมาตรน้อยที่สุด สารละลายนี้มีโปรตีน 0.54 mg/ml จากสารสกัดที่มีโปรตีน 35.54 mg/ml โดยวิธี Lowry และคณะ (1951) และมีน้ำตาลรีดิวส์ 0.83 mg/ml โดยวิธี Bernfeld (1955)

การจำแนกชนิดสารด้วย TLC (Whatman KF6 Silica plate) ตามวิธี Kim และคณะ (2002) เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน อะคาร์โบสและอนุพันธ์พบว่าได้ผลดังรูปที่ 17 สารละลายที่ไม่เป็นโปรตีนแยกได้เป็น 4 จุดที่ค่า $R_f$ จุดที่ (1) 0.94 (2) 0.82 (3) 0.49 (4) 0.16 ตามลำดับ ซึ่งมีจุดตรงกับ acarbose ($R_f$ 0.82) เมื่อย้อมความสามารถต่อการยับยั้งอะไมเลสด้วยวิธี Chen และคณะ (2004) พบว่าจุดที่มี $R_f$ ตรงกับอะคาร์โบสให้ผลยับยั้งเช่นเดียวกันกับ acarbose ข้อสังเกตจากประสบการณ์การทดลอง สารตัวอย่างนี้ไม่ทนต่อความร้อนที่ 100°ซ แต่ acarbose ทนต่อความร้อน เนื่องจากถ้าเทวุ้นขณะร้อนทับ TLC ตัวอย่างจะไม่แสดงผลการยับยั้งในขณะที่ acarbose ยับยั้งได้

การศึกษาคุณสมบัติต่อการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรท ในทางเดินอาหารได้แก่ มอลเตสและซูเครส ซึ่งจากการตรวจเอกสารยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาเลย พบว่าสาร

สกัดถั่วแดงส่วนที่ไม่เป็นโปรตีน สามารถยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลาย 52.2% อะไมเลสจากตับอ่อนหมู 34.7% มอลเตสจากยีสต์ 20.8% มอลเตสจาก small intestinal extract ของหมู 16.4% ซูเครสจากยีสต์ 13.9% ดังตารางที่ 6 เมื่อเทียบผลที่ได้ สารที่ไม่เป็นโปรตีนมีศักยภาพต่อการยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายคนและตับอ่อนหมูดีกว่ามอลเตสและซูเครส 2 เท่า Kim และคณะ (2002) พบว่าสารที่เป็น nonproteinaceous (acarbose)และอนุพันธุ์(GlcAcvGlc) สกัดได้จากเชื้อ *Actinoplanes sp.*สามารถยับยั้งมอลเตส ซูเครสจากลำไส้เล็กหนูและยังสามารถยับยั้งอะไมเลสจากตับอ่อนหมู โดยมีค่า $IC_{50}$(μM)เป็น 0.24, 0.96 และ2.7 ตามลำดับ

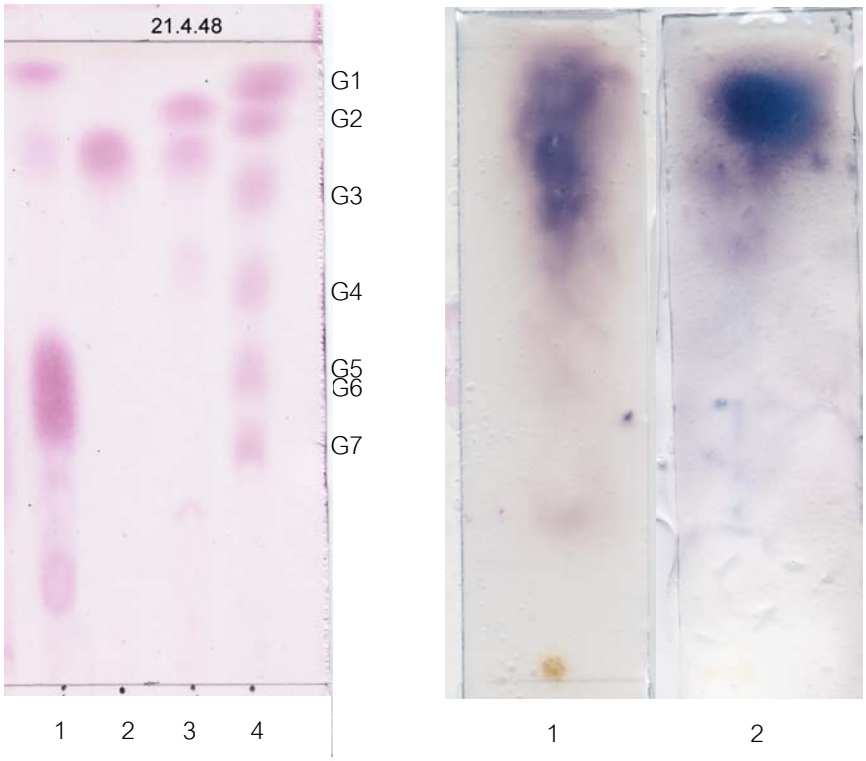
ผลการทดลองนี้น่าจะเป็นทางเลือกเพิ่มเติมในการใช้ส่วนที่ไม่เป็นโปรตีนแทนอะคาร์โบสหรือสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน

**ตารางที่** 6 ร้อยละการยับยั้งของสารที่ไม่เป็นโปรตีนต่อเอนไซม์ อะไมเลส มอลเตสและซูเครสจากแหล่งต่างๆ

| Source of enzyme | %Inhibition |
|---|---|
| **Amylase** | |
| - Human salivary | 52.2 |
| - Porcine pancreatic crude extract | 34.7 |
| **Maltase** | |
| - Yeast | 20.8 |
| - Porcine small intestinal extract | 16.4 |
| **Sucrase** | |
| - Yeast | 13.9 |

* การทดลอง 2 ซ้ำ

* Initial activity of human salivary amylase, Porcine pancreatic crude extract at 0.1 ml. :0.225 , 0.466 mg.maltose/3 min 37 °C Maltase : from yeast, porcine small intestinal extract at 0.1 ml. : 0.054, 0.058 mg.glucose/3 min 37 °C Sucrase at 0.1 ml. :from yeast 0.046 mg.glucose/3 min 37 °C




A B

รูปที่ 17 การจำแนกสารยับยั้งชนิดที่ไม่เป็นโปรตีนจากสารสกัดถั่วแดงโดย TLC

A : สเปรย์ N-(1-naphthyl)-ethylenediamine B : ย้อมกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส

แถวที่ 1 สารสกัดถั่วแดงที่สกัดสารยับยั้งที่ไม่ใช่โปรตีนโดยวิธี Kim และคณะ (2002)

แถวที่ 2 สารละลาย acarbose 10 mg/ml

แถวที่ 3 acarbose และ อนุพันธ์ 3.3 mg/ml

แถวที่ 4 น้ำตาลมาตรฐาน (glucose, G1, to maltoheptaose, G7) 3.3mg/ml