1.บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สารยับยั้งอะไมเลส (alpha amylase inhibior, α-AI) มี 2 ชนิดคือ สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีน (proteinaceous inhibitor) และสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่ใช่โปรตีน (nonproteinaceous inhibitor) โดยสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็นโปรตีน พบได้ทั่วไปในเมล็ดธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว ทำหน้าที่ในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งจะช่วยลดปริมาณน้ำตาลหลังการรับประทานอาหาร มีความสำคัญมากต่อผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type II Diabetes Mellitus : Non- Insulin Dependent Diabetes Mellitus) เมล็ดถั่ว (common bean : *Phaseolus vulgaris*) ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งอาหารสำคัญของมนุษย์ มีสารยับยั้งอะไมเลสชนิดโปรตีน 1 ชนิด หรือมากกว่า โดยจะยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสที่มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และจากแมลงแต่จะไม่ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสในพืช (endogenous amylase) ในการศึกษาถึงธรรมชาติที่เกิดขึ้นของ α -AI นั้นมีความสำคัญเพราะจะมีผลในการควบคุมแมลงที่มากัดกินเมล็ดถั่วและผลต่อโภชนาการอาหารของมนุษย์ซึ่งการเข้าใจถึงกลไกในการยับยั้งอะไมเลสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและจากแมลงจะเป็นกุญแจสำคัญในการคัดเลือกสารยับยั้งที่มีศักยภาพเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานต่างๆเช่นการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ตลอดจนถึงการป้องกันตัวของพืช

สารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่เป็นโปรตีน เป็นสารยับยั้งที่เป็นคาร์โบไฮเดรท สารยับยั้งนี้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ α -amylase, maltase และ sucrase ในลำไส้เล็ก (Muller *et al*.,1980; Kim *et al*.,1999; Kazaz *et al*.,1998) สารยับยั้งเหล่านี้มีลักษณะคล้ายสาร pseudo-oligosaccharide สารตัวนี้จะมีโครงสร้างเฉพาะที่เรียกว่า acarviosine (ซึ่งเป็น unsaturated cyclitol unit เชื่อมกับ 4,6-dideoxy 4- amino-D-glucose) เป็นโครงสร้างที่จำเป็นในการทำหน้าที่ยับยั้ง โดยหน่วยดังกล่าวจะเชื่อมต่อด้วยพันธะ α -1,4 o-glycosidic กับหางที่เป็นน้ำตาลกลูโคสได้หลายๆตัว ตัวอย่างสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่ใช่โปรตีนได้แก่ สารอะคาร์โบส (acarbose) เป็นสารประกอบ pseudotetrasaccharide ใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวานในกลุ่มยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิเดส (มอลเตสและซูเครส) สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย (Kim *et al*., 2002) นอกจากนี้สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนยังพบได้จากสารสกัดพืชหลายชนิดเช่นกระเจี๊ยบ(roselles)และบัว(lotus) (Hansawasdi *et al*., 2000)

สารยับยั้งอะไมเลสทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับอ่อนของคนและสัตว์ สารยับยั้งอะไมเลสชนิดโปรตีนมีการศึกษาในแง่การยับยั้งอะไมเลสเป็นหลัก มีการ

วิจัยเพื่อตรวจหาปริมาณที่มีในธรรมชาติของพืชต่างๆที่คนและสัตว์บริโภคอยู่โดยไม่ก่อพิษใดๆในท้องถิ่น แต่ยังไม่แพร่หลายและการตรวจเอกสารพบว่ายังขาดข้อมูลการศึกษาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสชนิดโปรตีนในพืชบริเวณแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ส่วนสารยับยั้งอะไมเลสชนิดไม่ใช่โปรตีนพบว่านอกจากสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสแล้ว ยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มกลูโคซิเดส ซึ่งได้แก่ มอลเตสและซูเครส มีการวิจัยเพื่อตรวจหาปริมาณที่มีในธรรมชาติของพืชต่างๆที่คนและสัตว์บริโภคเช่นเดียวกัน แต่ยังขาดความหลากหลายในชนิดของพืชและยังไม่มีรายงาน การศึกษาวิจัยในพืชพวกธัญพืชและพืชตระกูลถั่วที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส จากน้ำลายคนและตับอ่อนคนและสัตว์

อะไมเลส (EC 3.2.1.1) มอลเตส(EC 3.2.1.20) และซูเครส (EC 3.2.1.26) (Sorensen *et al*., 2004) เป็นเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรทที่พบในทางเดินอาหาร อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่พบในน้ำลาย และลำไส้เล็กโดยการสังเคราะห์มาจากตับอ่อน มีหน้าที่ย่อยพันธะ อัลฟา ไกลโคซิดิกในแป้งให้เป็นน้ำตาลมอลโตส กลูโคสและเด็กตริน การยับยั้งการทำงานเอนไซม์ อัลฟา อะไมเลส จึงมีประโยชน์ในการลดน้ำตาลที่ร่างกายจะดูดซึมได้ได้ (Doi *et al.,*1995, Sorensen *et al*., 2004, Heacock *et al*., 2005) ปัจจุบันทั่วโลกจึงให้ความสนใจในการใช้สารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากพืชธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคเบาหวาน มอลเตสหรือที่รู้จักในชื่อ อัลฟา กลูโคซิเดส (alpha glucosidase) และซูเครสหรือที่รู้จักในชื่อ อินเวอร์เทส (invertase) ทำงานในบริเวณไมโครวิลไล (microvilli) ของลำไส้เล็ก ยากลุ่มยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิเดสในลำไส้เช่น อะคาร์โบส (acarbose) ยับยั้งเอนไซม์ มอลเตสและซูเครส (Muller *et al*.,1980, Truscheit *et al*., 1981, Heacock *et al*., 2005) ส่งผลให้การย่อยสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรทชนิดน้ำตาลโมเลกุลคู่ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ ทำให้การดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดลดลง

จากที่กล่าวมามีประเด็นน่าสนใจศึกษาเกี่ยวกับ 1).ปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสในพืชสายพันธุ์ที่ปลูกและบริโภคในท้องถิ่น 2). ผลของสารสกัดจากพืชต่อเอนไซม์มอลเตส ซูเครส ว่าเป็นเช่นเดียวกับเอนไซม์อะไมเลสซึ่งเป็นเอนไซม์จำเพาะต่อการตัดพันธะไกลโคซิดิกหรือไม่ 3).สารยับยั้งอะไมเลสของพืชเป็นแบบใดชนิดที่เป็นโปรตีนหรือไม่ใช่โปรตีน หรือมีทั้งสองชนิด การวิจัยในโครงการนี้ใช้ถั่วแดงสายพันธุ์ของพืชตระกูลถั่วที่ปลูกและนิยมบริโภคในประเทศไทยเป็นตัวอย่างการวิจัย

ถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) เป็นพืชที่นักวิจัยได้ให้ความสนใจกันอย่างกว้างขวาง เพื่อนำไปสู่การใช้สารสกัดธรรมชาติที่ใช้ลดระดับน้ำตาลในเลือด เนื่องจากมีสารยับยั้งอะไมเลสชนิดโปรตีนอยู่และเป็นแหล่งอาหารสำคัญของประชากรโลก ประเทศไทยการผลิตมีถั่วแดงมากและ

นิยมบริโภคกันมาก ถั่วแดงในประเทศไทยมี 2 สายพันธุ์คือ 1). พันธุ์ชนิดสีแดงเข้ม (Dark Red Kidney bean) ซึ่งมีด้วยกันหลายพันธุ์ เช่น Montcalm, California, Royal ซึ่งพันธุ์ Royal จะให้ผลดีกว่าพันธุ์อื่นๆและมีสีสวยงามเป็นที่ต้องการของตลาด 2). ชนิดพันธุ์สีชมพู (Light Red Kidney bean) ปัจจุบันมีพันธุ์เดียวคือ Moniton พันธุ์นี้มีเมล็ดเล็กกว่าชนิดแรกเล็กน้อย แต่สีของเมล็ดไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (สมบัติ ศรีชูวงศ์ 2526)

ด้วยเหตุผลที่กล่าวข้างต้น โครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าประสงค์ที่จะตรวจหาสารประกอบจากถั่วแดง ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส มอลเตสและซูเครส สกัดสารและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งทั้งแบบที่เป็นโปรตีนและไม่เป็นโปรตีน ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์แล้วเพื่อมองหาศักยภาพในการใช้ประโยชน์ของสารชีวโมเลกุล (bioactive molecule) ในถั่วแดง

การตรวจเอกสาร

1. เอนไซม์อะไมเลส มอลเตสและซูเครส

เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α-amylase; α-1,4-glucan-4-glucanohydrolases EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ย่อยแป้งให้กลายเป็นมอลโตสและเด็กตริน พบได้ใน แบคทีเรีย รา พืช สัตว์และคน (Robyt 1984) เอนไซม์อะไมเลสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 2 ชนิด คือ salivary α-amylase จากต่อมน้ำลายและ pancreatic α-amylase จากตับอ่อน การย่อยอาหารประเภทแป้งเริ่มจากเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลาย จากนั้นจะถูกย่อยอย่างสมบูรณ์โดยเอนไซม์ในลำไส้เล็กที่ผลิตจากตับอ่อน ส่วนแบคทีเรียและราจะปล่อยเอนไซม์อะไมเลสออกมาเพื่อย่อยแป้งให้เป็นมอลโตเด็กตรินแล้วนำสู่เข้าเซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงาน ในพืชจะผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อสลายแป้งที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นพลังงาน

เอนไซม์มอลเตส หรือ อัลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase; EC 3.2.1.20) เป็นเอนไซม์ย่อยน้ำตาลมอลโตสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล พบได้ใน พืช แบคทีเรีย ยีสต์และคน ในคนเอนไซม์มอลเตสจะหลั่งในลำไส้เล็กบริเวณ microvilli

เอนไซม์ซูเครส (α-D-glucohydrolase) หรืออีกชื่อคือ Invertase (EC 3.2.1.26) เป็นเอนไซม์ย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส พบได้ใน ยีสต์และ ในลำไส้เล็กของคนและสัตว์ ในคนเอนไซม์ซูเครสจะอยู่บริเวณ brush border microvilli ทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (Devlin 1986)

2. สารยับยั้งอะไมเลส มอลเตสและซูเครส

สารยับยั้งอะไมเลสมี 2 ประเภทคือ เป็นโปรตีนและไม่เป็นโปรตีน สารยับยั้งที่เป็นโปรตีนมีการศึกษาและวิจัยกันมาก สารยับยั้งอะไมเลส (alpha amylase inhibitor, α-AI) พบได้ในธัญพืชและพืชตระกูลถั่วซึ่งเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของคนทั้งโลกมีรายงานการพบครั้งแรกโดย Bowman และคณะ (1945) โดยสารยับยั้งอะไมเลสเป็นสารประกอบ ซึ่งทำให้เอนไซม์อะไมเลสไม่ทำงานโดยการเกิดเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารยับยั้ง สารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสที่เป็นโปรตีนซึ่งพบได้ในธรรมชาติ มีลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติที่คล้ายกันแบ่งได้เป็น 7 ชนิด (Franco *et al.,* 2002, Garcia-Olmedo *et al.,* 1987, Ho *et al.,* 1994, Lu *et al.,* 1999) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็นโปรตีนที่พบในธรรมชาติ

Inhibitor type	Source	α-amylase targets	Size(aa residures)
1. Microbial	*Streptomyces*	Mammalian, bacteria	74-76
2. Knottin-like	Amaranth	Insect	32
3. γ-Thionin-like	Sorghum	Insect, (mammalian)	47-48
4. CM-proteins	Barley, wheat, ragi, rye	Mammalian, insect, bacteria	124-160
5. Kunitz-type	Barley, wheat, rice	Cereal, insect	176-181
6. Thaumatin-like	Maize	Insect	173-235
7. Legume lectin like	Common bean	Mammalian, insect, (fungi)	240-250

สารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วได้รับความสนใจมากเนื่องจากมีศักยภาพสูงในการยับยั้งเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งที่ได้จาก species อื่นๆ (Leiner *et al*., 1984) สารยับยั้งอะไมเลสจะถูกสังเคราะห์มาเป็น proprotein ที่บริเวณ endoplasmic reticulum และผ่านกระบวนการ proteolyticหลังจากนั้นเมื่อมาถึงตรงตำแหน่งกักเก็บโปรตีนคือ vacuoleจะกลายเป็น polypeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15,000 – 18,000 ดาลตันและสารยับยั้งจะเป็นตัวยับยั้งที่ไม่ทำงานจนกว่า polypeptide จะผ่านกระบวนการ proteolytic ที่ Asn 77 (Santino *et al.,* 1992)

สารยับยั้งอะไมเลสในถั่วแต่ละชนิดมีความคล้ายกัน โดยจะประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยหรือมากกว่า และสารยับยั้งอะไมเลสส่วนใหญ่จะมี Alanine และ Serine อยู่ด้าน N-terminal อย่างไร

ก็ตาม สารยับยั้งอะไมเลสที่มาจากถั่วต่างกันจะมีความแตกต่างกันในด้าน คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพและคุณสมบัติความจำเพาะซึ่งความแตกต่างดังกล่าวได้แก่ ขนาดของน้ำหนักโมเลกุล ค่า pI ปริมาณคาร์โบไฮเดรทที่มีในสารยับยั้ง จำนวนหน่วยย่อยและความจำเพาะในการจับกับเอนไซม์อะไมเลสที่มาจากแหล่งต่างกัน (Ho *et al*.,1994)

สารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติแล้วนั้นจะมีความแตกต่างกันในแต่ละถั่ว รวมถึง ถั่วขาว ถั่วแดง ถั่วดำ (Lajolo and Finardi-Filho. 1985) สารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากถั่วขาวประกอบด้วยหน่วยย่อย α (10.8 kDa) และ β (15 kDa) ที่จับกันด้วยพันธะ noncovalent มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ pH 5.5 ที่ 37 °ซ และการยับยั้งของสารยับยั้งเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ pancreatic amylase ของหมูโดยจับกันในอัตราส่วน 1:1 สารยับยั้งนี้จะไม่ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากพืช เชื้อราและแบคทีเรียแต่จะยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากน้ำลายและตับอ่อนของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเอนไซม์อะไมเลสจากแมลง (Power and Whitaker. 1977)

สารยับยั้งอะไมเลสจาก kidney bean (*P. vulgaris* L.cv Tendergreen) มี 2 ชนิดคือ α -AI1 และ α -AI1' สารยับยั้งอะไมเลสชนิดหลักคือ α -AI1 ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส จากตับอ่อนในคนและสัตว์ แต่จะไม่ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียและเชื้อรา จลนศาสตร์การยับยั้งเป็นแบบ mixed noncompetitive และ α-AI1 จับเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ pancreatic amylase ของหมู ในอัตราส่วน 1:2 α -AI1 ทำงานได้ดีที่ pH 4.5 ที่ 30°ซ (Le Berre-Anton *et al.*,1997)

สารยับยั้งอะไมเลส ตรวจสอบโดยการย้อมแอคทิวิตี้หลังการทำ Isoelectrofocusing gel มีค่า pI เท่ากับ 6.2 ทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น trypsin, chymotrypsin, bromelain และ protease ในเมล็ดของ pigeonpea เอง สารยับยั้งอะไมเลสจาก pigeonpea คงตัวที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาหลายชั่วโมง และการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นหลังจากที่บ่มไว้ที่ 60°ซ เป็นเวลา 10 นาที ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบไม่ย้อนกลับ นำมาซึ่งการเพิ่มจำนวน active site มากกว่าสารยับยั้งที่เป็น native แต่ถ้าให้ความร้อนที่ 80 °ซ เป็นเวลา 10 นาที กิจกรรมการยับยั้งจะถูกทำลายหมดและการให้ความร้อนที่ 100 °ซ 8 นาที กิจกรรม การยับยั้งจะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์และการบ่มสารยับยั้งอะไมเลสด้วย β-mercaptoethanol จะเป็นการทำลายกิจกรรมการยับยั้งได้เช่นกัน (Giri and Kachole. 1998)

สารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จาก kidney bean (*P. vulgaris*) มีชื่อเรียกว่า Phaseolamin เมื่อทำบริสุทธิ์และนำมาวิเคราะห์พบว่าเป็นไกลโคโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรทอยู่ประมาณ 9-10% ซึ่งคาร์โบไฮเดรทในไกลโคโปรตีน อาจเป็นส่วนสำคัญในแง่ความจำเพาะที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการ

ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสเมื่อเกิดการรวมตัวตรงบริเวณที่จับกับสับสเตรทของเอนไซม์ ขณะเกิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน นอกจากนี้ Phaseolamin จะถูกทำลายที่ 100 °ซ 10 นาที และพบว่าการยับยั้งจะไม่เกิดขึ้นที่ 0 °ซ การยับยั้งจะทำงานได้ดีที่ pH 5.5 การยับยั้งจะลดลงเมื่อ pH มากกว่า 6 (Marshall and Lauda. 1975)

Gibbs และ Alli (1998) ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วขาวและศึกษาคุณสมบัติ พบว่าสารยับยั้งเป็นไกลโคโปรตีน มีขนาดโมเลกุล 54,847 โดยวิธี electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) มีด้าน C-terminal เป็น serine ตามด้วย alanine และ tyrosine และพบว่า chloride ion มีความสำคัญต่อกิจกรรมการยับยั้งในขณะที่ calcium ion จะช่วยเพิ่มอัตราการจับกันของเอนไซม์และสารยับยั้ง ส่วน magnesium และ sulfate ion ไม่มีผลต่อการยับยั้งมีจลนศาสตร์การยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน

Takahashi และคณะ (1999) สนใจศึกษาการจำแนกกรดอะมิโนที่จำเป็นในสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วขาว (*P. vulgaris*) โดยใช้วิธีทางเคมี ร่วมกับการหาลำดับกรดอะมิโน และ mass spectrometry และพบว่า arginine ด้านปลายจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกิจกรรมการยับยั้ง สารยับยั้งอะไมเลสในถั่วขาวประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยคือ แอลฟาและเบต้า โดยมี arginine, tryptophan และ tyrosine อยู่ด้านปลาย โดยกรดอะมิโนเหล่านี้มีความจำเป็นต่อกิจกรรมการยับยั้ง

การตรวจเอกสารยังไม่พบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับผลของสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์มอลเตสและซูเครส

สารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่ใช่โปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์และมีหลายชนิดได้แก่ acarbose, isoacarbose, acarviosine–glucose, hibicus acid และ cyclodextrins ซึ่ง acarbose เป็นสารที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย ปัจจุบันใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ส่วน hibicus acid และ cyclodextrins เป็นสารซึ่งสกัดได้จากชบา (*Hibicus sabdariffa*)

สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน ได้แก่ acarbose เดิมทีเป็นสารยับยั้งมอลเตส แต่ในภายหลังงานวิจัยของ Kim และคณะ (2002) ได้ศึกษาและพบว่า acarbose และอนุพันธุ์ ยังสามารถยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส นอกจากนี้ Kim และคณะ (2004) พบว่า สารสกัดของเปลือกสนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α-amylase และ α-glucosidase จากสัตว์ และทำหน้าที่เป็น antihyperglycemic

cyclodextrin ยับยั้ง pancreatic amylaseของหมู โดยขึ้นกับ pH , อุณหภูมิ และชนิดของสับสเตรท เมื่อใช้สับสเตรทเป็น amylose จะมีการยับยั้งแบบแบบ competitive แต่เมื่อใช้สับสเตรทเป็น maltopentose การยับยั้งจะเป็นแบบ noncompetitive (Koukiekolo *et al*., 2001) แต่สำหรับอะคาร์โบสจะมีการยับยั้งแบบ noncompetitive ไม่ว่าสับสเตรทจะเป็นแบบใด (Koukiekolo *et al.,* 1999)

4^{IV} maltohexaosyl acarbose (G6-Aca)และ 4^{IV} maltododecaosyl acarbose (G12-Aca) เป็นอนุพันธุ์ของ acarbose เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส 4 ชนิดคือ อะไมเลสจาก *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, human salivary และ pancreatic amylase ของหมู พบว่ามีการยับยั้งเป็นแบบ mixed noncompetitive ค่า K_i สำหรับ G6-Aca เป็น 33, 37, 14และ 7 nM ตามลำดับ ค่า K_i สำหรับ G12-Aca เป็น 59, 81, 18และ 11 nM ค่า K_i สำหรับ acarbose เป็น 270, 13, 1.27และ0.80 μM จากค่า K_i พบว่า อนุพันธุ์ของ acarbose ทั้ง 2 ตัวมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้สูงมาก (Yoon and Robyt. 2003)

Hibicus acid 6-methyl ester เป็นสารที่ได้จากการสกัดจากดอกกระเจี๊ยบซึ่งแสดงค่าการยับยั้งต่อ pancreatic amylase ของหมู (PPA) Hibicus acid เป็น lactone form ของ (+) –allo-hydroxycitric acid พบได้ในส่วนของกระเปาะและก้านดอกของชบาตระกูล *H.sabdariffa* (Hansawasdi *et al*., 2000)

สารสกัดจากใบแห้งของ hyssop (*Hyssopus officinalis*) พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อัลฟากลูโคซิเดส ซึ่งสารที่แยกได้มีโครงสร้างเป็น (7S, 8S)-syringoylglycerol-9-o-(6'-o-cinnamoyl)-β-D-glucopyranoside (Mutsuura *et al*., 2004)

Kim และคณะ (2000) ได้นำ flavonoids จากธรรมชาติ 21 ชนิด มาทดสอบการยับยั้งต่อเอนไซม์ α-glucosidase (EC 3.2.1.20) และ α-amylase (EC 3.2.1.1) พบว่าสาร luteolin, amentoflavone, luteolin 7-*o*-glucoside และ daidzein เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงเมื่อเทียบกับสารที่นำมาทดสอบทั้งหมด 21 ชนิด โดยluteolin ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase ได้ 36% ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml และยับยั้งดีกว่า acarbose เมื่อดูถึงศักยภาพในการยับยั้งจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีผลลด postprandial hyperglycemia ในคนไข้ที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 นอกจากนี้ luteolin ยังมีผลยับยั้งเอนไซม์ α-amylase แต่การยับยั้งจะน้อยกว่า acarbose ซึ่งในอนาคตคาดว่าจะนำไปใช้ในการรักษาโรคได้

Fukumori และคณะ (2000) ได้ศึกษาการตอบสนองของระดับน้ำตาลในเลือดและระดับอินซูลิน เมื่อทดลองในหนูโดยการให้ซูโครสหรือสารละลายแป้งที่ประกอบด้วย adenosine,

inosine และ cytosine พบว่าการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดและระดับอินซูลินจะเพิ่มตามการให้ซูโครส 2.5 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู หรือสารละลายแป้ง 1.875 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู และระดับน้ำตาลในเลือดและระดับอินซูลินจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการให้ adenosine, inosine และ cytosine ปริมาณ 0.0625 – 0.125 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู ซึ่ง nucleotide ดังกล่าวที่ให้หนูนั้น พบว่ามีกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ซูเครส มอลเตส ไอโซมอลเตสและ กลูโคอะไมเลส ซึ่งได้จากการเตรียมเป็นสารสกัดหยาบจากลำไส้เล็กหนู ดังนั้นการลดระดับน้ำตาลในเลือดและระดับอินซูลิน มีผลให้ลดการดูดซึมกลูโคสเช่นกัน เนื่องมาจากผลของ nucleotide ต่อเอนไซม์ย่อย sucrose, maltose, malto- และ isomalto-oligosaccharides ที่อยู่ในลำไส้

ซึ่งสารสกัดถั่วแดงยังไม่มีใครศึกษาเกี่ยวกับสารยับยั้งอะไมเลส มอลเตสและซูเครสในแง่สารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีนเลย

3. การสกัด จำแนก ทำบริสุทธิ์ สารยับยั้งจากพืช

3.1 สารยับยั้งชนิดเป็นโปรตีน

การตรวจเอกสารพบว่าการสกัดสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็นโปรตีนจากตัวอย่างมี 2 วิธีหลักๆ คือ แบบให้ความร้อนและไม่ให้ความร้อนในการสกัดดังนี้

Grant และคณะ (1995) วิเคราะห์หาระดับสารยับยั้งอะไมเลสในพืชผักกลุ่ม Bean และ peas ที่นิยมบริโภคในยุโรป 18 ชนิด โดยสกัดตัวอย่างในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ภายหลังการเซนตริฟิวจ์ ให้ความร้อนส่วนสารละลายที่ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนไม่ทนความร้อนออกไป เช่นวิธีของ Marshall และ Lauda (1975), Le Berrre-Anton และคณะ (1997) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วด้วยน้ำ สัดส่วน 5.5ml/g ที่ 4 °ซ แล้วให้ความร้อน ส่วนสารละลายหลังการเซนตริฟิวจ์ให้ความร้อนที่ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เช่นกัน เพื่อทำลายอะไมเลสในพืช Iulek และคณะ (2000) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวไรย์ (rye)ที่บดละเอียดด้วย 70% ethanolic solution(v/v) นำสารละลายที่ได้หลังการเซนตริฟิวจ์ให้ความร้อนที่ 70 °ซ 1 ชั่วโมง เพื่อเอาโปรตีนที่ไม่ทนความร้อนและอะไมเลสในพืชออก

Giri และ Kachole (1996) และ Peuyo และ Delgado-Salinas (1997) ต่างสกัดสารยับยั้งอะไมเลสโดยไม่ใช้ความร้อนเช่นเดียวกันโดย Giri และ Kachole กำจัดไขมันจากเมล็ดถั่วก่อนด้วย hexane แล้วสกัดด้วย 0.1 M NaCl และ 1%PVP pH 7.0 ส่วน Peuyo และDelgado-Salinas สกัดด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 , 10mM β-mercaptoethanol, 0.1M NaCl, 0.2 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) อัตราส่วน1:10w/v โดยไม่กำจัดไขมันก่อน

Yamada และคณะ (2001) สกัดสารยับยั้งจาก tepary bean โดยใช้บัฟเฟอร์ 20 mM sodium phosphate buffer (PBS) pH6.7 สกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง Gibbs และ Alli (1998) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วขาวโดยใช้สารละลายที่มี pH 2 (10%hydrochloric acid), pH 7 และ pH 10 (10%ammonium bicarbonate) แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 40 micron

การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสชนิดโปรตีนทำได้หลายวิธีโดยมีขั้นตอนหลักๆคือ 1).ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและ/หรือกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการด้วยความร้อน 2).ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบต่างๆและ 3).ทดสอบความบริสุทธิ์โดยหากิจกรรมและทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

Le Berre-Anton และคณะ (1997) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจาก kidney bean ทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40% ไดอะไลซ์และทำแห้ง ละลายผงที่แห้งแล้ว 200 มิลลิกรัมใน 25 mM L-histidine monohydrochloric buffer pH 6.2 เซนตริฟิวจ์ นำน้ำใสที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ PBE94 (Pharmacia) ขนาด 40x1 ซม. ปรับสมดุลย์ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายผง จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยสารผสมของ Polybuffer 96 (3%v/v) และ Polybuffer 74 (5%v/v)ปรับ pH 4.0 ด้วย HCl สารยับยั้ง 2 ชนิดที่อยู่ใน fraction จะถูกชะออกมาที่ pH 4.6 (α-AI isoform 1 : α -AI1) และ pH 4.3 (α -AI isoform 2: α -AI') รวมหลอดที่มีค่ากิจกรรมสูงตกตะกอนต่อด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 90% ละลายตะกอนที่ได้ ด้วยบัฟเฟอร์ นำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200 ขนาด 100x15 ซม. รวมหลอดที่มีกิจกรรมเข้าด้วยกัน ตกตะกอนที่ความอิ่มตัว 90% การทำบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ใช้ถั่ว 100 กรัม ให้ α -AI isoform 1ปริมาณ 50 มิลลิกรัม และ α -AI isoform 2ปริมาณ 20 มิลลิกรัม

Yamagata และคณะ (1998) ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60% ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ นำมาผ่านคอลัมน์ CM-cellulose ชะด้วย gradient ของ 0-0.2 M NaCl รวมหลอดที่มีกิจกรรมเข้าด้วยกัน ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60% นำสารละลายที่ได้ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 รวมหลอดที่มีกิจกรรมเข้าด้วยกัน ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60% นำมาผ่าน Sephadex G-75 อีกครั้ง ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60% และนำไปไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate pH 5.5 นำมาผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose 2 ครั้ง ชะแบบ gradient ด้วย 0-0.25 M NaCl รวมหลอดที่มีกิจกรรม นำไป ไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ 1mM phosphate buffer pH 6.8 นำไปผ่านคอลัมน์ Hydroxyapatite ชะแบบ

stepwise ด้วย 10, 100 และ 500 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 รวมหลอดที่มีกิจกรรมเข้าด้วยกัน

Iulek และคณะ (2000) ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวไรย์ (rye) โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 20-50% ที่ 4 °ซ ละลายตะกอนและ ไดอะไลซ์ใน 20 mM phosphate buffer pH 6.9 ผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose ion exchange ขนาด 24x2.6 ซม. ชะแบบ stepwise ด้วย 20, 30 และ 200 mM phosphate buffer pH 6.9 ตามด้วยการชะแบบ gradient 0- 1.0 M NaCl รวมหลอดที่มีกิจกรรมเข้าด้วยกัน และไดอะไลซ์ใน 50 mM acetate buffer pH 5.0 นำไปผ่านคอลัมน์ CM-sepharose ion exchange ขนาด 57x1.6 ซม. ชะแบบ stepwise 50, 100 และ 500 mM acetate buffer แล้วตามด้วยการชะแบบ gradient 0-1.0 M NaCl รวมหลอดที่มีกิจกรรมเข้าด้วยกัน

3.2 สารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่เป็นโปรตีน

จากการตรวจเอกสารพบว่าสารยับยั้งชนิดไม่เป็นโปรตีนสามารถสกัดจำแนก ทำบริสุทธิ์ได้ดังนี้

Chaplin และ Kenedy (1987), Hansawasdi และคณะ (2000) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนจาก *H. sabdariffa* Linn.โดยวิธี Phase separation ด้วย 50%เมทานอล จากนั้นเติม ethyl acetate เพื่อให้เกิดการแยกชั้นเมทธานอลและน้ำ ระเหยเมทานอล แล้วนำส่วนที่เหลือไปทดลองต่อไป

Kim และคณะ (2002) สกัดสารจำพวกคาร์โบไฮเดรท ซึ่งยับยั้งอะไมเลส มอลเตสและซูเครส จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Actinoplanes sp.* โดยการตกตะกอนด้วยเมทานอล ตกตะกอนส่วนใสต่อด้วยเอทานอล ละลายตะกอนที่ได้ในบัฟเฟอร์ sodium acetate pH6.0 เพื่อใช้ทดลองหาค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อไป

Matsuura และคณะ (2004) สกัดสารยับยั้ง α-glucosidase จากใบพืชสมุนไพร (*H. officinalis*) โดยการบดใบแห้งกับเมทานอล-น้ำ ในอัตราส่วน 7:3 กรอง ทำให้เข้มข้น และทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่าง ethyl alcohol และ H_2O นำส่วนที่เป็นชั้นน้ำไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยวิธีโครมาโตกราฟี ก็จะได้สารยับยั้ง α-glucosidase

หลังการสกัด Kim และคณะ (2000) จำแนกสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่ใช่โปรตีนด้วยโครมาโตกราฟีแบบ Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ Whatman K6F silica gel plate (Fischer Sciencetific, Pittsburgh,PA) ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย ethyl acetate : isopropyl alcohol : water (1:3:1 v/v) หลังจากทำการชะ 2 ครั้ง ดูการเกิดสีบนแผ่น TLC ที่แห้ง

โดยการฉีดพ่นสารละลายที่ประกอบด้วย 0.3%(w/v)N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, 5%(w/v)H_2SO_4 ในเมทานอล ให้ความร้อนที่ 110°ซ 10 นาที

Yoon และ Robyt (2002) วิเคราะห์อนุพันธุ์ของอะคาร์โบส โดยการหยดตัวอย่าง 1-5 μl ลงบน Whatman K5 หรือ K6 ขนาด 10X20 ซม. ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย acetonitrile - ethyl acetate- 1-propanol- water ในอัตราส่วน 85:20:50:50 (v/v) ดูการเคลื่อนที่ของสารพวกคาร์โบไฮเดรทโดยการจุ่มลงในเมทานอลที่ประกอบด้วย 0.3%(w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine และ 5%(v/v)H_2SO_4 ตามด้วยการให้ความร้อนที่ 120° ซ 10 นาที

4. การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็นโปรตีน

การหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลส สามารถทำได้ 2 วิธีคือ ตรวจสอบโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซีส และวิธีเจลฟิลเตรชั่น

Yamada และคณะ (2001) หาขนาดน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น Superdex 200 ขนาด 1x30 ซม. ชะคอลัมน์ด้วย 50 mM Phosphate buffer saline pH 6.7, 0.015 M NaCl ด้วยอัตราการไหล 0.5 มล./นาที พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสจาก terapy bean αAI-Pa1 มีขนาดโมเลกุล 39.6 กิโลดาลตัน และ α AI-Pa2 มีขนาดโมเลกุล 28.1 กิโลดาลตัน

Yamagata และคณะ (1998) หาขนาดน้ำหนักโมเลกุลจากข้าวสาลี โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น Sephadex G-75 ปรับสมดุลด้วย 0.1 M acedic acid

Sharma และ Gupta (2001) หาขนาดน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) 15%เจล พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสจาก wheat germ ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยขั้นตอนเดียวมีแถบโปรตีนหลักขนาด 21 กิโลดาลตัน ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ สารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวสาลี

Le Berre-Anton และคณะ (1997) หาขนาดน้ำหนักโมเลกุลสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)และวิธีเจลฟิลเตรชั่น สำหรับวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส พบว่า α -AI มีแถบโปรตีน 3 แถบ โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 14-19 กิโลดาลตัน มีขนาดรวมกัน 32 กิโลดาลตัน โดยแถบโปรตีนที่มีขนาดระหว่าง14-19 กิโลดาลตันนั้นจะตรงกับหน่วยย่อยα และ β โดยมีความต่างกันที่ degree of glycosylation อย่างไรก็ตามเป็นการยากมากที่จะหาน้ำหนักโมเลกุลของไกลโคโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE เพราะว่าเมื่อไกลโคโปรตีนจับกับ SDS เป็นสารเชิงซ้อนทำให้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ใหญ่มากในการประมาณขนาด ด้วยเหตุนี้จึงใช้สารเคมีและวิธี enzymatic deglycosylation เพื่อหาหน่วยย่อย α และ β เมื่อคำนวณขนาดน้ำหนักโมเลกุล

โดย SDS-PAGE พบว่าได้ขนาด 7.8 และ 14 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โปรตีนที่มีขนาด 32 กิโลดาลตันนั้นบางครั้งอาจเป็น α-AI ที่ไม่ผ่านกระบวนการหรือเป็น proprotein ซึ่งมีรายงานเช่นเดียวกับ Moreno และ Chrispeels (1989) และ Pueyo และคณะ (1993) สำหรับวิธีเจลฟิลเตรชั่น

Sephadex G-75 พบว่าสารยับยั้งมีขนาดโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน สำหรับ α -AI1และ α -AI1'

ดังนั้นสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชที่ต่างชนิดกันพบว่ามีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกันแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งที่ต่างกัน

Plant	Molecular weight (Da)	Method	Reference
Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)	49,000 45,000-50,000	Sephadex G-200 Sephadex G-100	Marshall and Lauda. 1975
Wheat	21,000	Sephadex G-50	O'Donnell *et al*., 1976
Red kidney bean	49,000	Sephadex G-100	Power and Whitaker. 1977
Common bean (*Phaseolus vulgaris* cv greensleeves)	subunit 15,000-18,000	SDS-PAGE	Moreno *et al*., 1990
Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.cv Tendegreen)	Subunit :14,000-19,000 α -AI isoform1= 43,600 α -AI isoform2= 39,800 43,000	SDS-PAGE Native -PAGE Sephadex G-75	Le Berre-Anton *et al*., 1997
White kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)	54,857	Electrospray ionization mass spectrometry	Gibb and Alli. 1998
Rye (*Secale cereale*)	13,000	SDS-PAGE	Iulek *et al*., 2000
Terapy Bean (*Phaseolus acutifolious*)	α-AI-Pa1=39,600 α -AI-Pa2=28,100	Superdex G-200	Yamada *et al*., 2001
Wheat germ	21,000	SDS-PAGE	Sharma and Gupta. 2001

4. การประยุกต์ใช้สารยับยั้งอะไมเลส

ในทางการแพทย์ สารยับยั้งอะไมเลสช่วยยับยั้งน้ำตาลในเลือดได้โดย สารยับยั้งที่สกัดได้จากพืชสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลายและจากตับอ่อนของคนได้ ส่งผลให้การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลลดลงจึงช่วยลดการดูดซึมปริมาณน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือด จากรายงานของ Lankisch และคณะ (1998) ทำงานวิจัยสนับสนุนการใช้สารสกัดจากพืช Wheat ซึ่งมีสารยับยั้งอะไมเลส (WAI) อยู่ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และโรคอ้วน ผลการศึกษาพบว่า WAI มีผลต่อ postprandial ของการดูดซึมคาร์โบไฮเดรท ระดับน้ำตาลในเลือดและระดับฮอร์โมน Jenkins และคณะ (1986) และ Thompson (1988) ได้ทำการศึกษาวิจัยและพบว่าสาร anti-nutrients ประเภทสารยับยั้งอะไมเลส ในพืชตระกูลถั่ว ส่งผลต่อการลดน้ำตาลในกระแสเลือดของคน โดยไปยับยั้งการย่อยสารอาหารคาร์โบไฮเดรท Doi และคณะ (1995) พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสชะลอการย่อยอาหารพวกแป้ง ส่งผลลดกลูโคสในพลาสมาเหลือ 10 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ใน 15 นาที หลังอาหาร และยังลดระดับ ketone bodies หรือ 3-hydroxybutyric acid (3-OHBA) ด้วย นอกจากนี้ยังมีสารยับยั้งอะไมเลส (AI) ที่สกัดได้จาก Wheat วางจำหน่ายแล้ว และยังมี ผลิตภัณฑ์ลดน้ำหนักที่ใช้ชื่อเรียกว่า “Starch blocker” เป็นสารยับยั้งอะไมเลสชนิดโปรตีนที่สกัดได้จาก White kidney bean (*P. vulgaris*) ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งในทางเดินอาหาร มีผลให้การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่จะดูดซึมได้ในลำไส้เล็กยาวนานออกไป ซึ่งกลไกนี้อาจเพิ่มจำนวนแป้งที่ยังไม่ได้ย่อยสู่บริเวณลำไส้ใหญ่โดยตรงและขับออกจากร่างกายพร้อมอุจจาระ และการย่อยคาร์โบไฮเดรทที่ยาวนานออกไปจะเอื้อประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจในการลดน้ำหนัก หรือเพิ่มความสามารถในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ Heacock และคณะ (2005) ศึกษาผลของสารยับยั้ง α-glucosidase จากสารสกัดพืชสมุนไพร (*Salacia oblonga*) ที่มีอยู่ในอาหารเพื่อสุขภาพต่อ Posprandial glycemic และ Insulinaemia ในผู้ใหญ่ พบว่า 1,000 mg ของสารสกัด *S. oblonga* สามารถลดระดับ glucose plasma และ serum insulin ซึ่งในอนาคตจะมีการศึกษาผลของสารสกัด *S. oblonga* ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และความปลอดภัยระยะยาวในการใช้สารสกัดในการรักษา

ส่วนที่ใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่สารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่เป็นโปรตีนในชื่อ acarbose เตรียมได้จากเชื้อ *Actinoplanes* strain SE 50 Murai และคณะ (2002) ได้ทดลองใช้สาร 4^2-o-β-D-galactosyl maltobionolactone(LG2O) ซึ่งมีผลในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสนำไปสู่การควบคุมปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือดหนู โดยทำการทดลองในหนูที่ไม่เป็นเบาหวาน (non-diabetic ddY)และหนูที่เป็นเบาหวาน (KK-A^y)โดยให้กินอาหารที่เป็นคาร์โบไฮเดรทและ

ผสมด้วย LG2O หลังจาก 5 ชั่วโมงทำการวัดปริมาณน้ำตาลในเลือด พบว่า LG2O ได้ลดการเพิ่มขึ้นของกลูโคสในกระแสเลือดหลังกินอาหาร ทั้งหนูไม่เป็นเบาหวานและหนูที่เป็นเบาหวาน และ LG2O ยังเป็นตัวบ่งบอกถึงการลดการเพิ่มขึ้นของ plasma insulin อีกด้วย และพบว่าหลังการย่อยอาหาร LG2O จะผลิตขึ้นมาเพิ่มเป็น 1.5 – 3.5 เท่าใน gut และมีปริมาณน้ำตาลในลำไส้เล็กลดลง ถึงแม้ว่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในกระเพาะจะต่ำมากๆเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมอะไมเลสในลำไส้เล็กแต่ LG2O ก็ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสในลำไส้ส่วนต้นได้ และจากการทดลองการย่อยคาร์โบไฮเดรทในหลอดทดลอง พบว่า LG2Oปริมาณ 7.5 mM สามารถลดการผลิต น้ำตาลได้ 75%เมื่อสับสเตรทเป็นdextrin 25%เมื่อสับสเตรทเป็น starch และ 60% เมื่อสับสเตรทเป็นแป้งดิบ Yamagishi และคณะ (2005) ศึกษาถึงความหวังในการใช้ acarbose ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็น nonalcoholic steatohepatitis (NASH) เนื่องจาก acarbose(Glucobay) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิเดส ช่วยรักษา postpandial hyperglycemia ให้ดีขึ้น และลดอัตราเสี่ยงในการพัฒนาเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และความดันโลหิตสูงในผู้ป่วยที่ไม่สามารถรักษาระดับน้ำตาลในเลือดได้ ในการศึกษา การใช้ acarbose เพื่อรักษานั้นพบว่าช่วยลดน้ำหนักตัวและ รอบเอวของผู้ป่วยเหล่านี้ได้เช่นกัน นอกจากนี้การศึกษาระยะยาวด้วย acarbose ยังช่วยให้ระดับของ triglyceride น้ำหนักตัวและความดันของผู้ป่วยดีขึ้น และยังช่วยป้องกันการเป็น myocardial infarction ในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้อีกด้วย เพราะว่า acarbose ช่วยให้ postprandial hyperglycemia ดีขึ้นโดย ชะลอการปล่อย น้ำตาลกลูโคสจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรทสู่กระแสเลือด Cheng และ Josse (2004) ได้ศึกษาการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยใช้สารยับยั้งในลำไส้ โรคเบาหวานเป็นโรคที่ซับซ้อนและเรื้อรัง ปัจจุบันประชากรเป็นเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการรักษาโรคเบาหวานจึงมีความจำเป็นที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ซึ่งการป้องกันจากโรคนี้จะเป็นประโยชน์แก่ตัวเองและสังคม โดยสารยับยั้งในลำไส้ดังกล่าวได้แก่ α-glucosidase inhibitor และ lipase inhibitor มีบทบาทสัมพันธ์กันที่จะช่วยรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในประชากรที่มีความเสี่ยง เนื่องจาก α-glucosidase inhibitor จะช่วยชะลอการดูดซึมของอาหารพวกคาร์โบไฮเดรท (ลด postprandial hyperglycemia) และ lipase inhibitor ช่วยลดการดูดซึมอาหารประเภทไขมัน ซึ่งสารยับยั้งทั้ง 2 ชนิดนี้ได้มีการทดลองทางการแพทย์ถึงผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดและข้อจำกัดในการใช้สารยับยั้งเพื่อรักษาโรคเบาหวานแล้ว

ในแง่การเกษตร Bellincampi และคณะ (2004) ได้วิจารณ์ถึงบทบาททางชีวภาพของสารยับยั้ง α-glucosidase ที่มีในพืช เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสารพวกคาร์โบไฮเดรทได้แก่ glycosidase, transglycosidase, polysaccharide lyase, carbohydrate esterase มีบทบาท

สำคัญในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับคาร์โบไฮเดรทในพืช เอนไซม์บางตัวที่ใช้ย่อยคาร์โบไฮเดรทผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ และในแมลง เอนไซม์เหล่านี้มีผลทำลายพืชได้ ดังนั้นพืชจึงมีการพัฒนาการมีสารยับยั้งชนิดโปรตีน เพื่อควบคุมกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าว ปัจจุบันการค้นพบสารยับยั้งชนิดใหม่ๆ บ่งชี้ถึงการวิจัยที่กว้างขวางขึ้น นำไปสู่การพัฒนา ซึ่งการวิจารณ์ผลการวิจัยที่ผ่านมาของคุณสมบัติของสารยับยั้ง และชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์สารยับยั้งและมีบทบาททางเทคโนโลยีชีวภาพในสิ่งมีชีวิต ในพืชมีการพัฒนา สารยับยั้งชนิดที่เป็นโปรตีนต่อเอนไซม์ใช้ย่อยคาร์โบไฮเดรทที่ผลิตได้จาก สัตว์ แมลงและเชื้อจุลินทรีย์ สารยับยั้งเหล่านี้ในพืชมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตส่วนสารยับยั้งบางตัวจะใช้เป็นตัวป้องกันตัวของพืช BASI (Barley amylase/ sublisin inhibitor) เป็นสารยับยั้งที่พบได้ในข้าวสาลี สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสและ ซีรีนโปรตีเอส ทำหน้าที่ในการควบคุมการงอกของเมล็ดข้าวสาลีและป้องกันศัตรูพืช สารยับยั้งบางตัวสร้างมาจากกลุ่มของยีนเดียวกัน และบางครั้งอาจพบสารยับยั้งนี้ได้ทั่วไปแต่ยากที่จะจำแนก ซึ่งคุณสมบัติของสารยับยั้งที่มาจากต่างกลุ่มกันมีการพัฒนาโครงสร้าง นำไปสู่ความหลากหลายของความจำเพาะซึ่งความหลากหลายในความจำเพาะนี้ ทำให้มีประโยชน์ต่อการคัดเลือกการใช้สารยับยั้งกลุ่มของสารยับยั้งที่ต่างกัน จะมีการควบคุมที่ต่างกันในการเจริญเติบโตของพืช มีความเป็นไปได้ที่จะดัดแปลงการแสดงออกของสารยับยั้งในพืช เช่นให้มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อ หรือในขั้นตอนการเจริญเติบโต หรือ ในสภาพกดดันการทำงาน ในพืชจะมีสารยับยั้งต่อเอนไซม์จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์พืช อยู่บริเวณผนังเซลล์เป็นเหมือนโมเลกุลที่เป็นเกราะป้องกันต่อเอนไซม์ของ จุลินทรีย์ โดยจะมีการแสดงออกอย่างรวดเร็วและจะเกิดในระยะแรกของการติดเชื้อเมื่อมีเอนไซม์จากจุลินทรีย์เกิดขึ้น ในทางตรงข้ามสารยับยั้งของเอนไซม์ในพืชจะทำหน้าที่ตรงข้ามกันต่อโมเลกุลที่เป็นเป้าหมาย ความต่างกันของการควบคุมนี้ แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งต่อเอนไซม์จากจุลินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อโรคที่เข้ามาบุกรุก การเข้าใจถึงพื้นฐานโครงสร้างถึงการจับกันระหว่างเอนไซม์และสารยับยั้งจำเป็นสำหรับการพัฒนาการทดลอง เพื่อที่จะออกแบบให้สารยับยั้งมีประสิทธิภาพและมีหน้าที่ คุณสมบัติตามต้องการ มากไปกว่านั้นยังมีความเป็นไปได้ที่จะเสริมให้พืชป้องกันต่อศัตรูพืช โดยการพัฒนาพืชสายพันธุ์ใหม่ที่มีการแสดงออกของตัวยับยั้งดีที่สุด และนำมาผสมผสานกับสารยับยั้งที่มีอยู่ในธรรมชาติ

มีการใช้สารยับยั้งอะไมเลสในการป้องกันแมลงศัตรูพืช ตัวอ่อนของแมลง โดยสร้างพืช (transgenic crop plant)ให้มีการผลิตสารยับยั้งอะไมเลสในปริมาณที่สูง Ishimoto และคณะ (1999), Chrispeels และคณะ (1998) สร้าง transgenic pea (*Pisum sativum*) และ adzuki bean (*Vigna angularis*) โดยการนำ cDNA ของ αAI-1 จาก *P. vulgaris* ใส่ในเวคเตอร์ที่มี 5’

และ3'ของยีน dLec2 (PHA-L) การแสดงออกของยีนช่วยให้ pea และ adzuki bean สามารถต้านทานการกัดกินของแมลงกลุ่ม old world bruchids ได้ถึง 3 สายพันธุ์ คือ pea weevil (*Bruchus pisorum*), cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) และ adzuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis*) Ishimoto และ Kitamura (1989), Chrispeels และ Raikhel (1991) พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสจาก kidney bean มีพิษต่อ cowpea weevil (*C. maculatus*) และ adzuki bean weevil (*C. chinensis*) ที่ความเข้มข้น 2-5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร แต่ Grant และคณะ (1995) ได้แนะนำว่าการสร้าง transgenic plant ที่มีสารยับยั้งอะไมเลสในปริมาณสูงอาจทำให้คนหรือสัตว์ที่กินพืชได้รับพลังงานจากสารคาร์โบไฮเดรทลดน้อยลง ก่อนทำ transgenic plant จึงควรหาค่าเฉลี่ยของสารยับยั้งอะไมเลสในพืชทุกชนิดอย่างหลากหลายถึงปริมาณที่สามารถบริโภคได้โดยไม่เกิดพิษ ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ต่อไปอีกเพื่อจะได้นำสารยับยั้งอะไมเลสมาใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ Morton และคณะ (2000) ได้ศึกษาถึงการย้ายยีนที่สร้างโปรตีนที่พืชใช้ป้องกันตัวเอง (defense protein) จาก common bean ไปสู่พืชอื่นๆโดยพันธุวิศวกรรม ทำให้พืชนั้นๆต่อต้านศัตรูพืชได้ การทดลองย้ายยีนดังกล่าวเข้ามาใน pea และทำให้มีการแสดงออกของยีน α-AI1 ทำให้พืชนั้นสามารถป้องกันตัวจากแมลง pea weevil ได้อย่างสมบูรณ์ การสร้างพืชที่เป็น transgenic plant นั้น เพื่อต้องการลดการใช้ยาฆ่าแมลงซึ่งทำจากสารเคมีและเพื่อต้องการทดแทนการใช้สารเคมีด้วยยาฆ่าแมลงที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีความจำเพาะต่อศัตรูพืชสูง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาถึงคุณลักษณะ การคัดเลือกและการประยุกต์ใช้สารชีวโมเลกุล และความเป็นไปได้ของการเกิดการ cross-reaction สู่ nontarget species

ในแง่อุตสาหกรรม Sorensen และคณะ (2004) ได้วิจารณ์ถึงบทบาทของสารยับยั้ง glycosidase เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ Glycosidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะ α,β glycosidic ในอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรทมีความสำคัญมากในโภชนาการอาหารและในหลายๆกระบวนการ เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ glycosidase จัดอยู่ในกลุ่ม EC 3.2.1 รวมไปถึง amylase, pectinase และ xylanase ซึ่งพบได้ในอาหารหลายๆชนิดเช่น ธัญพืช แต่จะพบมากในจุลินทรีย์ เอนไซม์เหล่านี้จะถูกเติมลงไปในกระบวนการการผลิตอาหารหลายชนิดได้แก่ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เบียร์ การผลิต glucose, fructose, dextrin, hydrolase lactone หรือช่วยในกระบวนการปรับปรุงการผลิต อย่างไรก็ตามในพืชที่ใช้เป็นอาหารจะมีสารยับยั้งอยู่เช่นกัน ทำหน้าที่ในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ glycosidase โดยเฉพาะ โปรตีน เปปไทด์ สารประกอบเชิงซ้อนและ สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสารยับยั้งชนิดโปรตีนในพืชต่อเอนไซม์ glycosidase มี

ความสำคัญในการศึกษาถึงผลและความซับซ้อนของสารยับยั้งเหล่านี้ในอุตสาหกรรมการผลิตและการประยุกต์ จะช่วยในกระบวนการอุตสาหกรรม โดยการดัดแปลงเอนไซม์ โดยไม่มีอิทธิพลต่อสารยับยั้งที่มีอยู่ในธรรมชาติ จากการวิจารณ์นี้พบว่าเอนไซม์กลูโคซิเดสได้ถูกใช้ในหลายๆด้าน เช่นอุตสาหกรรมผลิต detergent อุตสาหกรรมน้ำผลไม้เป็นต้น ที่ผ่านมาได้มีการค้นพบสารยับยั้งกลูโคซิเดส ซึ่งมีรายงานเป็นจำนวนมาก และได้มีการศึกษาถึงรายละเอียดเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์กลูโคซิเดสและสารยับยั้งกลูโคซิเดส โดยนำความรู้เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อค้นหาบทบาทและศักยภาพในกระบวนการทางอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ การประยุกต์ใช้สารยับยั้งกลูโคซิเดสบางตัวได้เคยมีรายงานแล้วแต่ยังไม่มีรายงานในงานอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามในอนาคตคาดว่าน่าจะมีการใช้สารยับยั้งกลูโคซิเดสอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมที่มีการปรับเปลี่ยนเทคโนโลยีใหม่ๆและเมื่อมีผลิตภัณฑ์สารยับยั้งวางขายทั่วไป

วัตถุประสงค์

1. ตรวจหาสารยับยั้งอะไมเลส มอลเตส และซูเครส ในถั่วแดง
2. ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส มอลเตส และซูเครส
3. ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์แล้ว