3. ผลการทดลอง และวิจารณ์

3.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสกัด 4 วิธี

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสกัด 4 วิธี พบว่า Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก โดยให้ค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลสสูงที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่นดังนี้ ตัวอย่างรุ่นที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 102.8±9.3, 36.2±0.3, และ 101.4+0.2 (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ) ตามลำดับ ในขณะที่วิธีอื่นๆมีค่าร้อยละการยับยั้งต่ำกว่า 25

เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น พบว่า

1) วิธี Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) เป็นวิธีที่ง่ายและมีขั้นตอนในการสกัดน้อยที่สุด
2) วิธี Pueyo และ Delgado-Salinas(1997) จะไม่มีการใช้ความร้อนในขั้นตอนการสกัด ซึ่งมีข้อมูลมากมายที่ระบุว่าสารยับยั้งอะไมเลสนั้นมีทั้งชนิดที่ทนความร้อน (heat stable) และไม่ทนความร้อน (heat labile) (Grant *et al*., 1995; Yamagata *et al*., 1998) ดังนั้นวิธีซึ่งไม่ใช้ความร้อนจึงน่าที่จะสกัดสารยับยั้งอะไมเลสได้ทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่วิธี Moreno *et al*.(1990) และวิธี Grant *et al*.(1995) ซึ่งใช้ความร้อนที่ 70 °ซ ในการสกัด จึงทำให้มีสารยับยั้งอะไมเลสน้อยกว่าวิธีแรก เนื่องจากสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่ทนความร้อนถูกทำลายไป
3) จากเหตุผลข้อ 2) แสดงว่า สารยับยั้งอะไมเลสในเมล็ดเนียงนก น่าจะมีเฉพาะชนิดที่ไม่ทนต่อความร้อน จึงไม่พบค่าการยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดจากวิธี Moreno *et al*.(1990) และวิธี Grant *et al*. (1995)
4) เมื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารซึ่งใช้ในการสกัดคือ บัฟเฟอร์ 10 mM Tris-HCl, pH 7.5-10 mM β-mercaptoethanol-0.1 M NaCl-0.2 mM PMSF พบว่า PMSF

นั้นมีฤทธิ์ช่วยปกป้องการย่อยสารยับยั้งอะไมเลสซึ่งเป็นโปรตีน จากเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) ซึ่งมักเกิดขึ้นเมื่อเซลล์แตกออก และบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดมีสาร β-mercaptoethanol ซึ่งจะช่วยลดการทำลายโปรตีนจากกระบวณการออกซิเดชั่นในขั้นตอนการสกัดได้

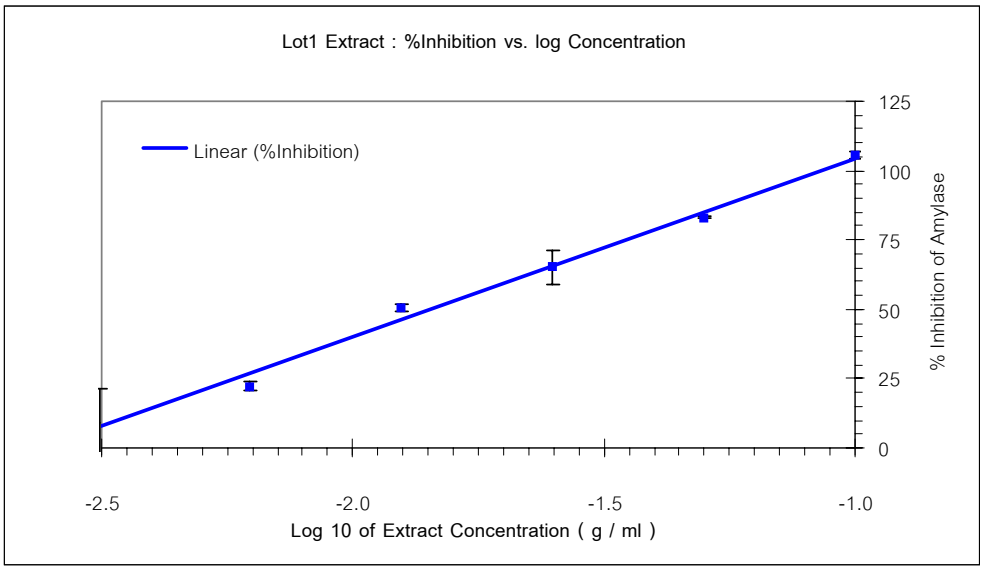
3.2 ปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสในเมล็ดเนียงนก

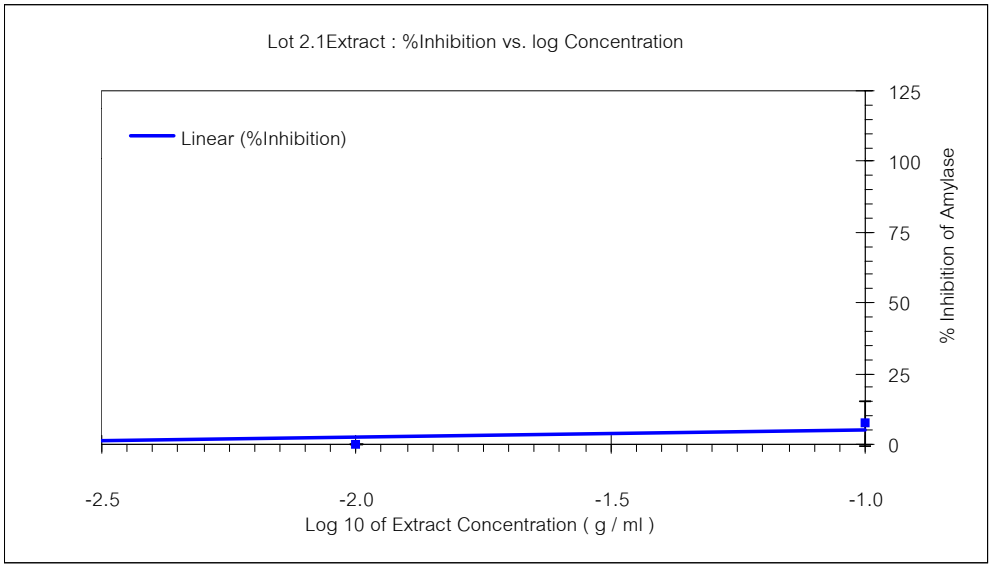
นำสารสกัดเมล็ดเนียงนก 100 กรัม ที่สกัดด้วยวิธี Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) ไปหาค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลสตามข้อที่ 2.2 (รูปที่ 4) แล้วนำไปหาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสในหน่วย กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่างที่การยับยั้งร้อยละ 50 ตามข้อที่ 2.3 พบว่าสารสกัดแต่ละรุ่นมีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่างที่การยับยั้งร้อยละ 50 (ค่าเฉลี่ย$\pm$ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ) ดังนี้ (รูปที่ 5)

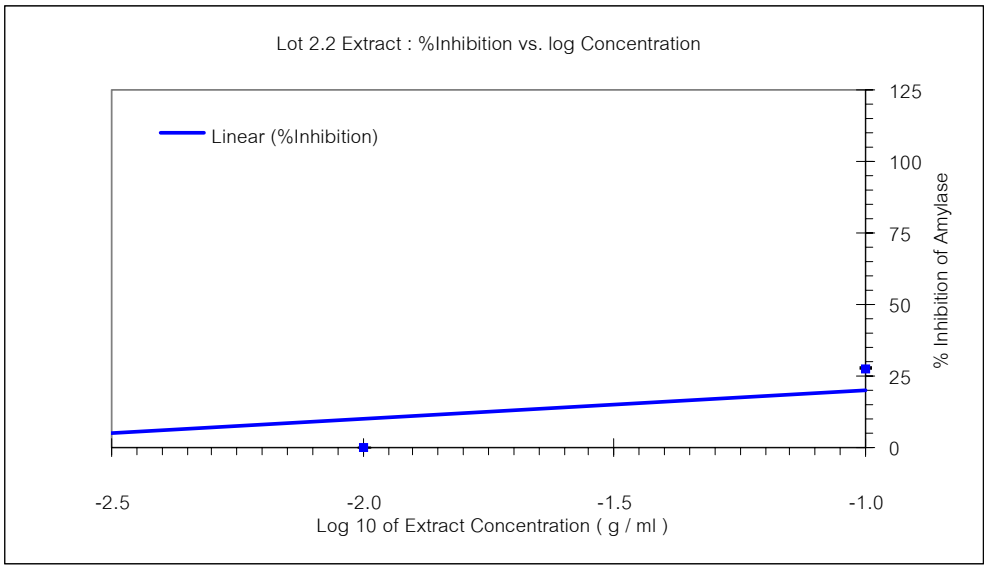
ตัวอย่างรุ่นที่ 1 เท่ากับ 0.26$\pm$0.01 ตัวอย่างรุ่นที่ 3 เท่ากับ 0.27$\pm$0.01 จากค่าที่ได้จะเห็นได้ว่าเนียงนกรุ่นที่ 1 (ตัวแทนตัวอย่างปี 2541) และรุ่นที่ 3 (ตัวแทนตัวอย่างปี 2544) มีปริมาณใกล้เคียงกัน (ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แบบ ANOVA และ LSD-Test ที่ p-value น้อยกว่า 0.05)

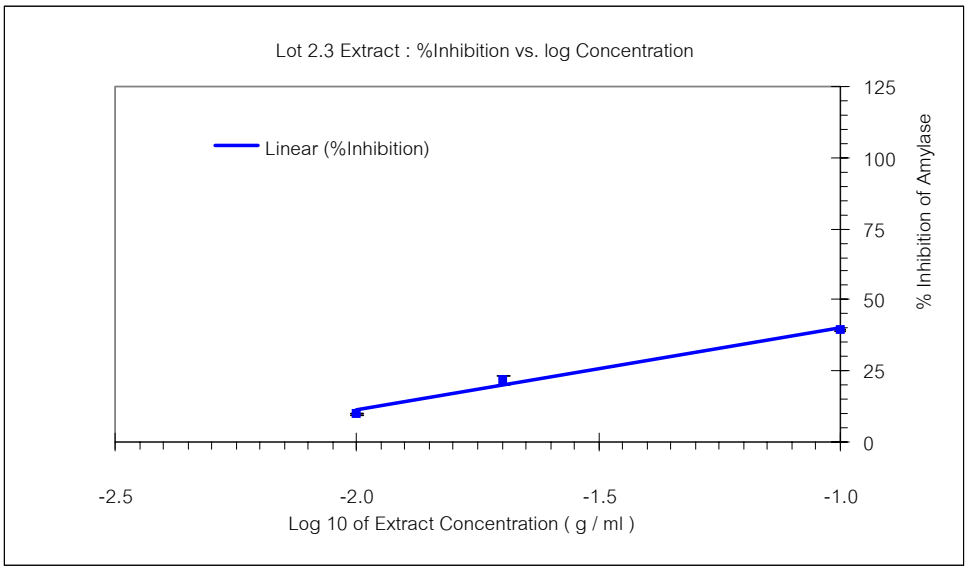
ส่วนตัวอย่างรุ่นที่ 2 (ตัวแทนตัวอย่าง ปี 2543) ซึ่งทำการสุ่มตัวอย่าง 3 ครั้ง (2.1, 2.2 ,2.3) ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่างที่การยับยั้งร้อยละ 50 ได้ เนื่องจากค่าการยับยั้งของสารสกัดของแต่ละรุ่นต่ำกว่าร้อยละ 50 ตามลำดับดังนี้ 7.36$\pm$7.81, 27.74$\pm$0.24, และ 39.42$\pm$0.18 ปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสที่ต่ำนี้ อาจเป็นได้ว่าในช่วงปี 2542 มีฝนตกชุกเป็นเวลายาวนานตลอดทั้งปี ความอุดมสมบูรณ์ของดินอาจลดลงกว่าภาวะปกติ ผู้ทดลองได้นำเนียงนกรุ่นที่ 2 ให้คนพื้นบ้านชิม ก็พบว่ารสชาดจืดกว่าปกติ เพื่อให้เห็นถึงค่าพิสัยของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสที่แน่ชัด ควรมีการวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อเนื่องเป็นระยะเวลาหลายปี เพื่อรวมผลกระทบต่อฤดูกาลด้วย

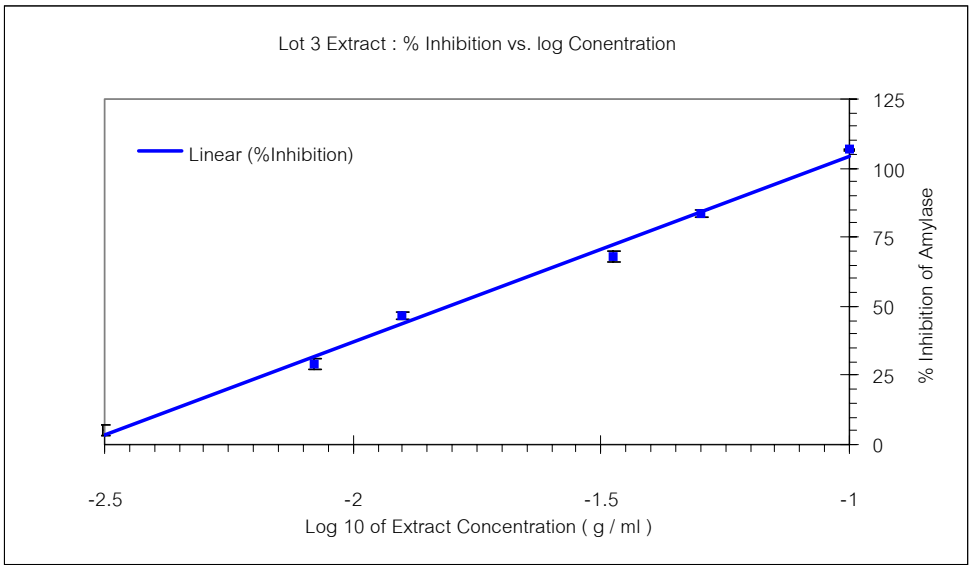
รูปที่ 4 ร้อยละการยับยั้งอะไมเลส ของสารสกัดตัวอย่าง ที่ค่า log ความเข้มข้น (กรัม/มล.) ของสารสกัด (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ)

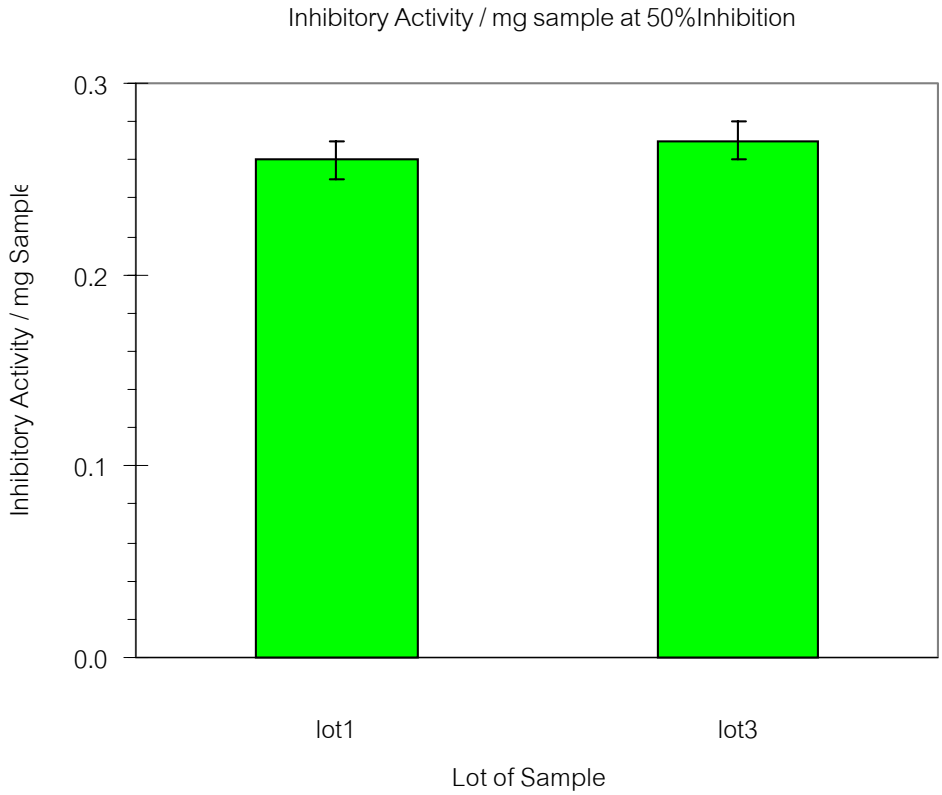

Lot1 Extract : %Inhibition vs. log Concentration
Linear (%Inhibition)
125
100
75
50
25
0
% Inhibition of Amylase
-2.5
-2.0
-1.5
-1.0
Log 10 of Extract Concentration (g / ml)


Lot 2.1Extract : %Inhibition vs. log Concentration
Linear (%Inhibition)
125
100
75
50
25
0
% Inhibition of Amylase
-2.5
-2.0
-1.5
-1.0
Log 10 of Extract Concentration (g / ml)


Lot 2.2 Extract : %Inhibition vs. log Concentration
Linear (%Inhibition)
125
100
75
50
25
0
% Inhibition of Amylase
-2.5
-2.0
-1.5
-1.0
Log 10 of Extract Concentration (g / ml)


Lot 2.3 Extract : %Inhibition vs. log Concentration
Linear (%Inhibition)
125
100
75
50
25
0
% Inhibition of Amylase
-2.5
-2.0
-1.5
-1.0
Log 10 of Extract Concentration (g / ml)


Lot 3 Extract : % Inhibition vs. log Conentration
Linear (%Inhibition)
125
100
75
50
25
0
% Inhibition of Amylase
-2.5
-2
-1.5
-1
Log 10 of Extract Concentration (g / ml)



รูปที่ 5 กราฟแท่งเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่างที่ให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 ของตัวอย่างรุ่นต่างๆ

3.3 ศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ

3.3.1 เมื่อเก็บในรูปสารสกัด

ผลการตรวจวัดปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสจากตัวอย่างพืชข้อ 3.2 แสดงว่า เมล็ดเนียงนก เป็นพืชที่มีสารยับยั้งอะไมเลสอยู่ สามารถนำไปศึกษาในรายละเอียดทางชีวเคมี เพื่อพัฒนาใช้ประโยชน์ต่อไปได้ แต่พืชนี้เป็นพืชที่ออกตามฤดูกาล (บำรุงรักษ์ 2536) ฉะนั้นจึงต้องมีหลักประกันที่จะมีตัวอย่าง อย่างต่อเนื่องในการศึกษาวิจัย การเตรียมตัวอย่างในรูปสารสกัดหยาบ(crude extract) เก็บไว้ที่ -20°ซ เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กัน ในการศึกษาทางชีวเคมีเกี่ยวกับเอนไซม์ เนื่องจากการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมากไม่ทำลายกิจกรรม(activity) ของเอนไซม์ และช่วยยืดอายุการเก็บรักษา การสกัดเป็นวิธีทำให้บริสุทธิ์ เบื้องต้น ช่วยแยกสารที่สนใจศึกษาออกจาก organelles สารรบกวนสับสเตรท ตลอดจนองค์ประกอบที่หลากหลายของตัวอย่าง ระดับหนึ่ง การเก็บเอนไซม์ไว้ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าpH ความเข้มข้นของเกลือพอเหมาะ ช่วยลดการทำลายจาก proteolytic enzymes ที่อาจเกิดขึ้นกรณีเก็บตัวอย่างรูปพืชสด จากการแตกทำลายของ lysosomes (Scopes, 1978)

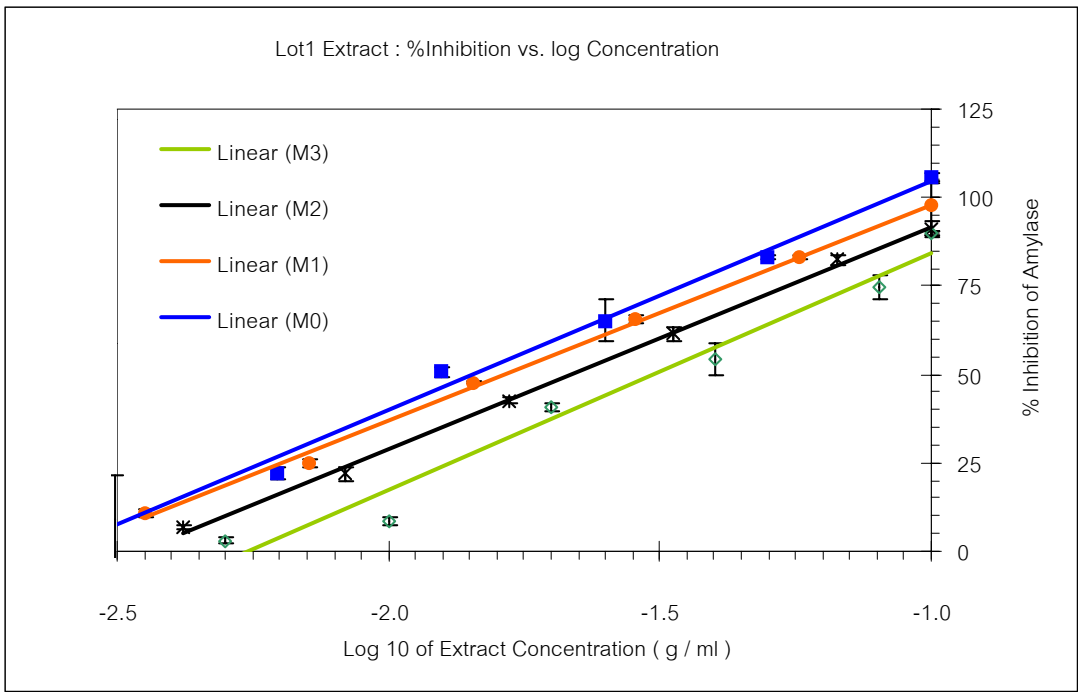
สารยับยั้งอะไมเลส เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน จึงน่าที่จะประยุกต์วิธีที่ใช้ในการเก็บรักษาเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนเช่นกันมาใช้ได้ เพื่อที่จะมีตัวอย่างไว้ใช้ตลอดทั้งปี ขณะทำการศึกษาวิจัยลำดับต่อไป แต่เนื่องจากปัจจุบันนี้ยังไม่มีผู้ใดรายงานเกี่ยวกับการเก็บรักษาสารสกัดยับยั้งอะไมเลส และสารยับยั้งอะไมเลสของเนียงนก ยังไม่มีผู้ทำมาก่อน ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลสที่เก็บในรูปของสารสกัดที่ –20°ซ นาน 1-3 เดือน เพื่อให้แน่ใจถึงผลของการเก็บรักษาได้ ศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลสในสารสกัด เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ นาน 0 1, 2 และ 3 เดือนเปรียบเทียบกัน โดยใช้สารสกัดจากตัวอย่าง รุ่น 1 กับ รุ่น 3 ซึ่งมีปริมาณกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่าง ที่ให้ค่ายับยั้งที่ร้อยละ 50 ใกล้เคียงกัน โดยนำสารสกัดที่เก็บไว้มาหาค่าร้อยละการยับยั้งอะไมเลส เมื่อครบเวลาเก็บแต่ละช่วงเดือนตามวิธีในข้อ 2.2 (รูปที่ 6) และหาปริมาณโปรตีนตามข้อ 2.4 นำค่าต่างๆที่ได้ไปหาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลส ในหน่วยกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่างที่

การยับยั้งร้อยละ 50 ตามข้อที่ 2.3 แล้วนำไปเขียนกราฟแท่งกับระยะเวลาเก็บ (เดือน) (รูปที่ 7 ก และข) พบว่าปริมาณของสารยับยั้งของใน1 เดือนที่ 0, 1, 2 และ 3 ของตัวอย่างรุ่นที่1 มีค่าลดลงตามลำดับดังนี้ 0.26$\pm$0.01; 0.20$\pm$0.01; 0.18$\pm$0.00; 0.11$\pm$0.00 และ ตัวอย่างรุ่นที่ 3 มีค่าลดลงตามลำดับดังนี้ 0.27$\pm$0.01; 0.16$\pm$0.01; 0.11$\pm$0.00; 0.07$\pm$0.00

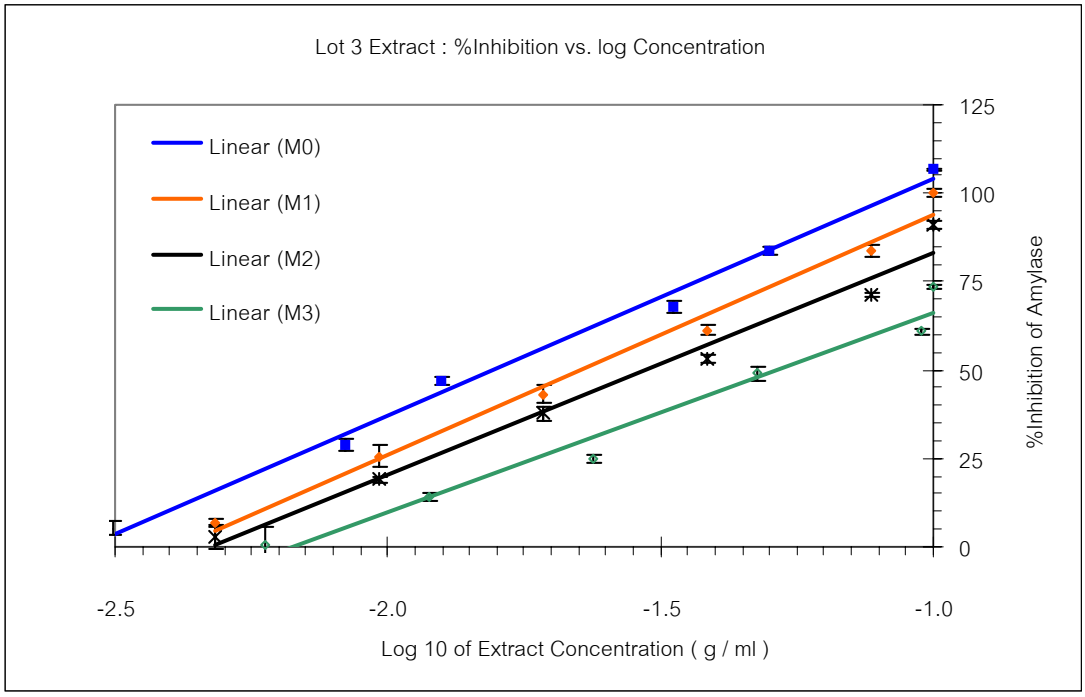
การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA และ LSD-Test พบว่าการลดลงของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสระหว่างการเก็บเกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 โดยความแตกต่างของการลดลงระหว่างเดือนที่ 2 และ 3 มีนัยสำคัญที่น้อยกว่าเดือนอื่นๆ

เมื่อเทียบค่ากับกราฟเส้นของปริมาณมิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิกรัมตัวอย่าง ที่ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 กับระยะเวลาเก็บ พบว่าปริมาณโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value น้อยกว่า 0.05 สอดคล้องกันกับการลดลงของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลส แสดงให้เห็นถึงการสลายของ สารยับยั้งอะไมเลส ซึ่งเป็นโปรตีน องค์ประกอบหนึ่งในโปรตีนของสารสกัด

การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA และ LSD-Test เปรียบเทียบระหว่างการลดลงของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสของตัวอย่างรุ่นที่ 1 กับ รุ่นที่ 3 พบว่าการลดลงระหว่างการเก็บเดือนที่ 1, 2 และ 3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.001 ซึ่งแสดงว่า สารสกัดตัวอย่างรุ่นที่ 3 มีความคงตัวน้อยกว่ารุ่นที่ 1 เล็กน้อย

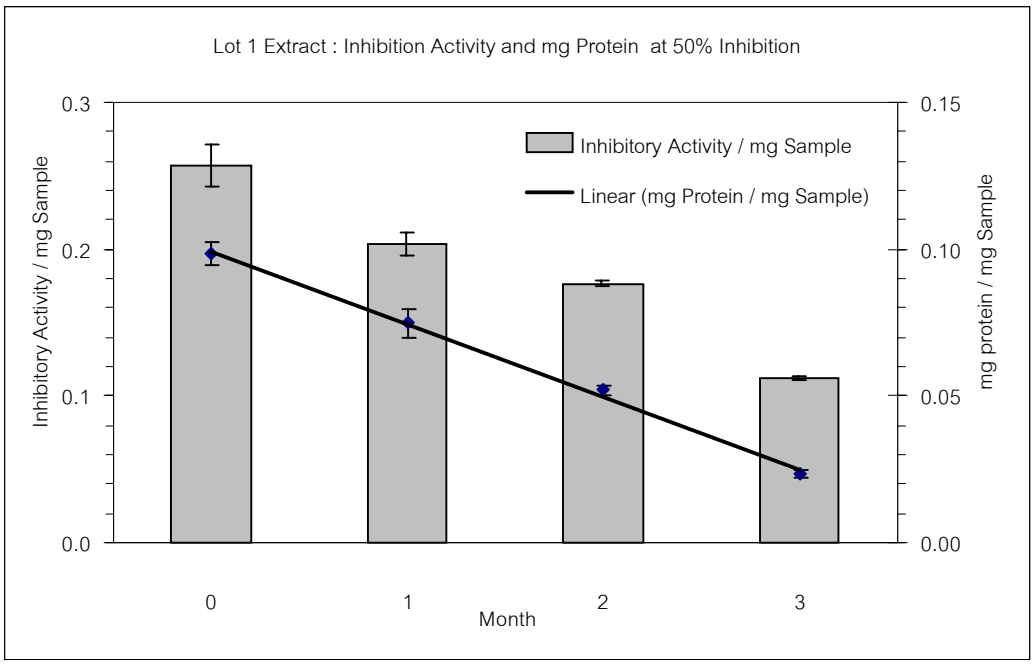


รูป ก. ตัวอย่างรุ่นที่ 1

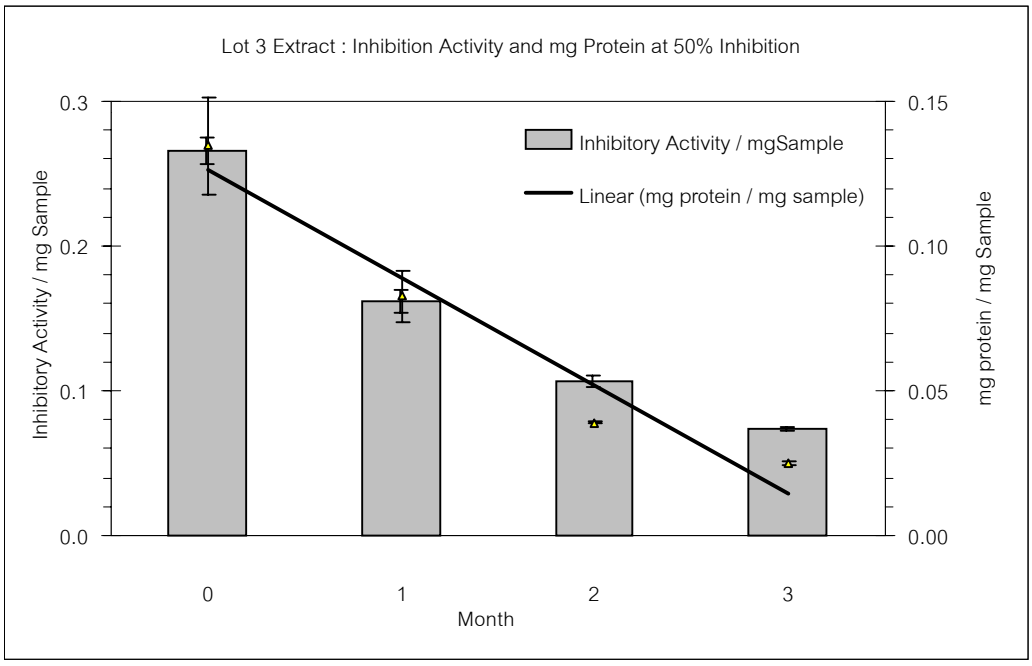


รูป ข. ตัวอย่างรุ่นที่ 3

รูปที่ 6 ร้อยละการยับยั้งอะไมเลสของสารสกัดตัวอย่างรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 3 กับค่า Log 10 ความเข้มข้นสารสกัดต่างๆ ตลอด 3 เดือน (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, จากการทดลอง 2 ซ้ำ)



รูป ก. สารสกัด ของ รุ่น 1



รูป ข. สารสกัด ของ รุ่น 3

รูปที่ 7 กราฟเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่าง และ มิลลิกรัมโปรตีน / มิลลิกรัมตัวอย่าง ที่ให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 ของตัวอย่างสารสกัดของ รุ่น 1 และรุ่น 3 ตลอด 3 เดือน (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, จากการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.3.2 เมื่อเก็บในรูปสารสกัดเทียบกับเมล็ด

ได้ศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลส ในเมล็ด เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ นาน 1, 2 และ 3 เดือน เปรียบเทียบกับเมื่อเก็บในรูปสารสกัด โดยใช้ตัวอย่างรุ่นที่ 3 โดยทุก 1 เดือน จะนำเมล็ดที่เก็บไว้ครบระยะเวลากำหนดมาสกัด แล้วนำสารสกัดที่ได้ มาหาร้อยละการยับยั้งอะไมเลส (รูปที่ 8 ก และ ข) และหาปริมาณโปรตีน

นำค่าต่างๆที่ได้ไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่าง ที่ให้ค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 ดังอธิบายไว้ในข้อ 2.3 แล้วนำไปเขียนกราฟแท่งกับระยะเวลาเก็บ (เดือน) (รูปที่ 9 ก และ ข) พบว่าปริมาณของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเดือนที่ 0, 1, 2 และ 3 มีค่าตามลำดับดังนี้ 0.27 ± 0.01; 0.18 ± 0.00; 0.13 ± 0.00; 0.09 ± 0.00 การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA และ LSD-Test พบว่าการลดลงของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสเมื่อเก็บในรูปเมล็ด ระหว่างเดือนที่ 1, 2, 3 เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05

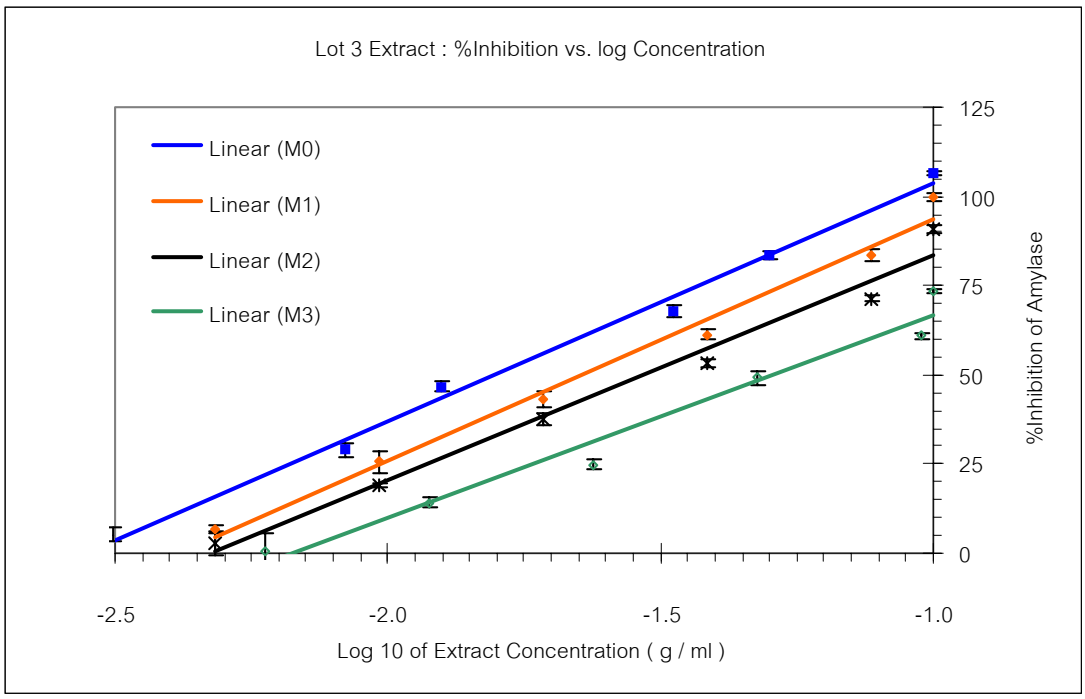
เมื่อเทียบค่ากับกราฟเส้นของปริมาณมิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิกรัมตัวอย่าง ที่ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 กับระยะเวลาเก็บ พบว่าปริมาณโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลส แสดงให้เห็นถึงการสลายของสารยับยั้งอะไมเลส ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบหนึ่งในโปรตีนของสารสกัด

การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ ANOVA และ LSD-Test เปรียบเทียบการลดลงของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสระหว่างการเก็บตัวอย่างในรูปเมล็ดกับสารสกัด พบว่าการลดลงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value เท่ากับ 0.05 ที่ระยะเวลาเก็บเดือนที่ 1 และ 2 ซึ่งแสดงว่าการเก็บในรูปเมล็ดมีความคงตัวดีกว่าสารสกัดในช่วง 2 เดือนแรกของการเก็บ ส่วนเดือนที่ 3 ปริมาณการลดลงของสารยับยั้งอะไมเลสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

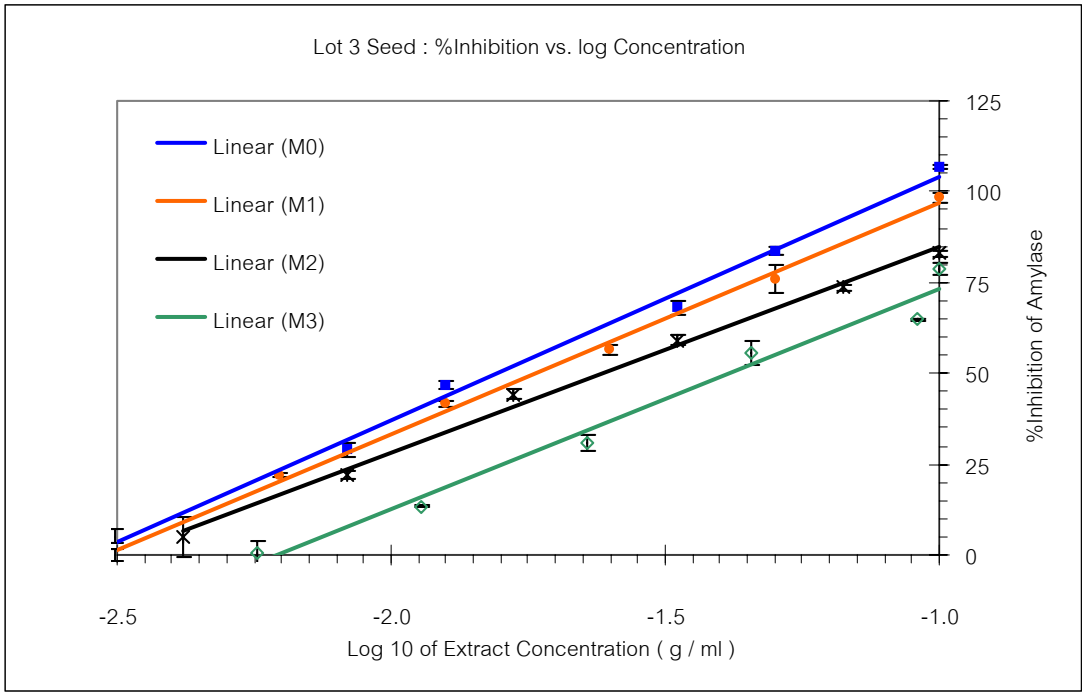
ข้อมูลจากการศึกษาที่พบสารยับยั้งอะไมเลสในเมล็ดเนียงนก เป็นข้อมูลพื้นฐานที่พบใหม่ ไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับพืชนี้ และเป็นพืชตามฤดูกาล การศึกษา

ความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลสจึงมีความจำเป็น เพื่อให้สามารถมีตัวอย่างไว้ใช้อย่างต่อเนื่องขณะทำวิจัย

ผลการศึกษาความคงตัวเมื่อเก็บในรูปสารสกัดของพืช และในรูปของเมล็ดที่ –20°ซ นาน 3 เดือน พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่สกัดได้จากพืชไม่คงตัว เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสลดลงตลอดระยะเวลาเก็บ การเก็บในรูปเมล็ดแล้วทำการสกัดเมื่อต้องการใช้จะมีความคงตัวค่อนข้างดีกว่าการเก็บในรูปสารสกัด

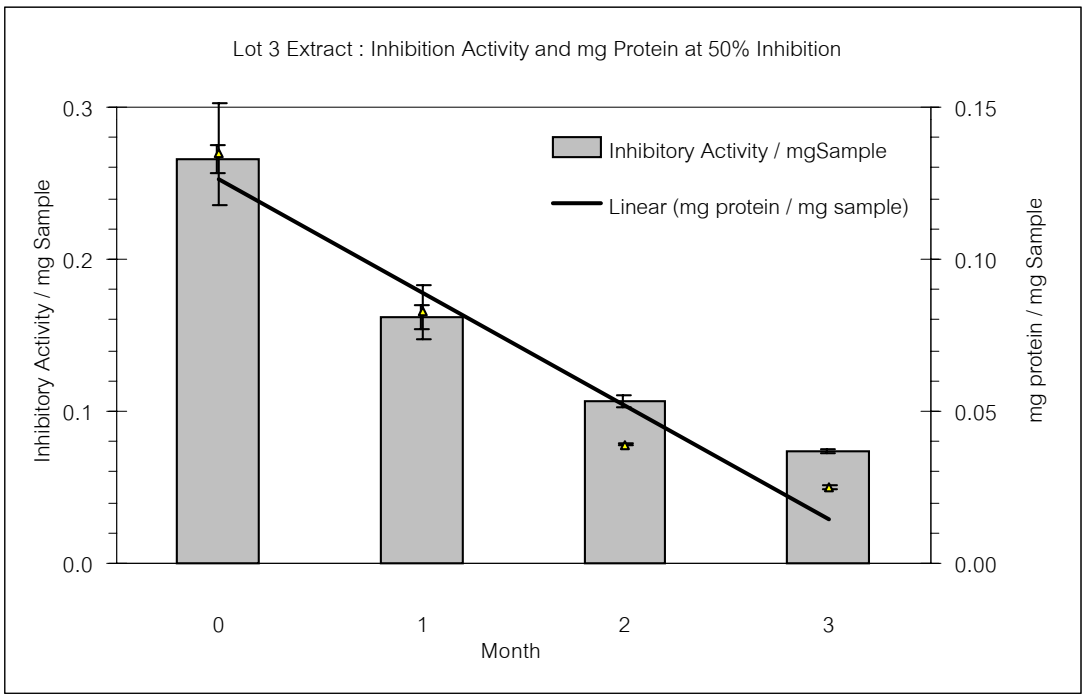


รูป ก. สารสกัดตัวอย่างรุ่นที่ 3

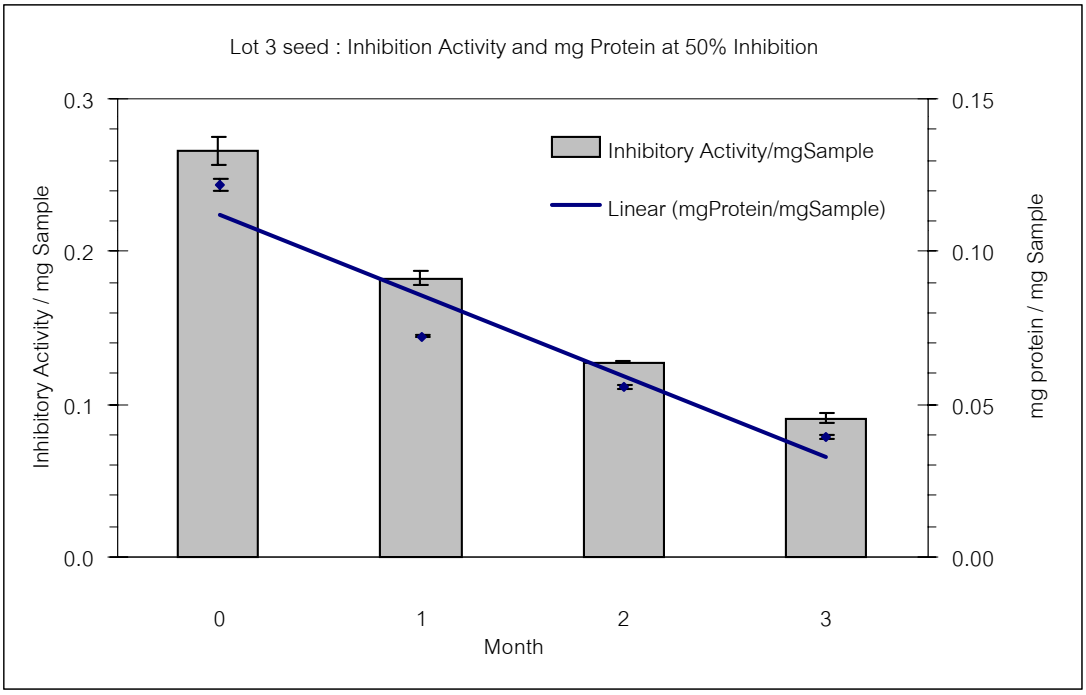


รูป ข. สารสกัดจากเมล็ดรุ่นที่ 3ในวันทดลอง

รูปที่ 8 กราฟร้อยละการยับยั้งอะไมเลส กับค่า Log 10 ความเข้มข้นสารสกัดต่างๆ ตลอด 3 เดือน ของสารสกัด กับสารสกัดจากเมล็ดในวันทดลอง (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 2 ซ้ำ)



รูป ก. สารสกัดตัวอย่างรุ่นที่ 3



รูป ข. สารสกัดจากเมล็ดรุ่นที่ 3ในวันทดลอง

รูปที่ 9 กราฟแท่งเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส / มิลลิกรัมตัวอย่างที่ให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 ของตัวอย่างรุ่น 3 (เมล็ด) ตลอด 3 เดือน

3.4 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากการสกัดเมล็ดเนียงนก

3.4.1 การสกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก

เมื่อนำเมล็ดเนียงนก 100 กรัม มาสกัดด้วยวิธี Pueyo และ Delgado-Salinas(1997) แล้วนำเฉพาะส่วนใสมาตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลสที่ pH 6.8 อุณหภูมิ 37 °ซ โดยใช้น้ำแป้งร้อยละ 0.2 เป็นสับสเตรท พบว่าสารสกัดจากเมล็ดเนียงนกมีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสทั้งหมด (total inhibitory activity) คิดเป็น 4,710 หน่วย มีปริมาณโปรตีน 7,890 มก. คำนวณเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะ (specific inhibitory activity) ของสารยับยั้งได้เป็น 0.60 หน่วย/มก.โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 6

3.4.2 การคัดเลือกร้อยละความอิ่มตัวผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลส

ในการคัดเลือกร้อยละความอิ่มตัวผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อตกตะกอนโปรตีนสารยับยั้งอะไมเลส โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100 พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 80 ของความอิ่มตัว จะให้ค่าการยับยั้งและค่าการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด ดังตารางที่ 4 จึงเลือกมาใช้ในการตกตะกอนเพื่อทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสต่อไป

3.4.3 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำไดอะไลซ์

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 4 °C โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสและค่าการยับยั้งจำเพาะที่ได้หลังจากไดอะไลซ์เป็นเวลา 16 และ 72 ชั่วโมง พบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างกันดังตารางที่ 5 จึงเลือกเวลาน้อยกว่าคือ 16 ชั่วโมง มาทำไดอะไลซ์เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสต่อไป

ตารางที่ 4 ผลของร้อยละความอิ่มตัวผลึกแอมโมเนียมซัลเฟต ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งและค่าการยับยั้งจำเพาะของสารยับยั้งอะไมเลส

%ความอิ่มตัวผลึกแอมโมเนียมซัลเฟต	ค่ากิจกรรมการ* ยับยั้ง	มก.โปรตีน*	ค่าการยับยั้งจำเพาะ*
20	0	0.30±0.03	0
40	0	1.23±0.09	0
60	0.20±0.16	1.69±0.10	0.12±0.06
80	6.96±0.04	2.03±0.09	3.43±0.05
100	4.40±0.09	2.12±0.11	2.08±0.07

*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s.d.)จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบเวลาในการไดอะไลซ์แอมโมเนียมซัลเฟตออกจากโปรตีน

เวลา(ชั่วโมง)	ค่ากิจกรรมการ* ยับยั้ง	มก.โปรตีน*	ค่าการยับยั้งจำเพาะ*
16	5.98±0.29	3.00±0	1.99±0.09
72	6.36±0.05	3.20±0	1.99±0.01

3.4.4 การตกตะกอนโปรตีนในสารสกัดเมล็ดเนียงนกด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อนำสารสกัดเมล็ดเนียงนกจากข้อ 3.4.1 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 พบว่า มีปริมาณโปรตีนอยู่ในตะกอนทั้งหมด 3,672 มก. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลส อยู่ในส่วนนี้ทั้งหมด 3,386 หน่วย หรือประมาณ 71.89% ของปริมาณการยับยั้งเริ่มต้น (% yield) ดังนั้นจึงคิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 0.92 หน่วย/มก.โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 6

3.4.5 การไดอะไลซ์

หลังจากตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว นำสารที่ได้มาทำการไดอะไลซ์ต่อใน 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 หลังการไดอะไลซ์ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้แอควาไซด์ พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลสลดลงเหลือ 2,916 หน่วย หรือคิดเป็น 61.91% ของปริมาณการยับยั้งเริ่มต้น มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1,620 มก. และมีค่าการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 1.80 หน่วย/มก.โปรตีน สารยับยั้งอะไมเลสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.02 เท่า จากค่าการยับยั้งจำเพาะในตอนเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 6

3.4.6 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ CM-cellulose

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.4.5 มาทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนกับ CM-cellulose ดังรายละเอียดในวิธีการข้อ 2.7.4 จากผลการทดลอง พบว่าสามารถแยกสารยับยั้งอะไมเลสออกจากโปรตีนส่วนใหญ่ในสารละลายดังกล่าวได้โดยการชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.17 M ดังแสดงในรูปที่ 10 หลังจากนำสารละลายเฉพาะในหลอดที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงๆ มารวมกันและทำให้เข้มข้น พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสโดยรวมเท่ากับ 1,323 หน่วย ซึ่งเป็นปริมาณสุทธิของสารยับยั้งอะไมเลสเท่ากับ 28.09% โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 539 มก. และคิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 2.45 หน่วย/มก.โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 6

3.4.7 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ Sephadex G-75

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.4.6 มาผ่านลงในคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วย Sephadex G-75 แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมคือ 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ดังรายละเอียดในข้อ 2.7.5 พบว่าจะมีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค ดังรูปที่ 11 ซึ่งสารยับยั้งอะไมเลสส่วนใหญ่จะออกมาในพีคแรก นำสารละลายเฉพาะในหลอดที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงๆ มารวมกัน และทำให้เข้มข้น พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสเป็น 1,078 หน่วย ซึ่งเป็นปริมาณสุทธิของสารยับยั้งอะไมเลสเท่ากับ 22.89% ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 44 มก. คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 24.50 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 41.04 เท่า จากตอนเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 6

3.4.8 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ Hydroxyapatite

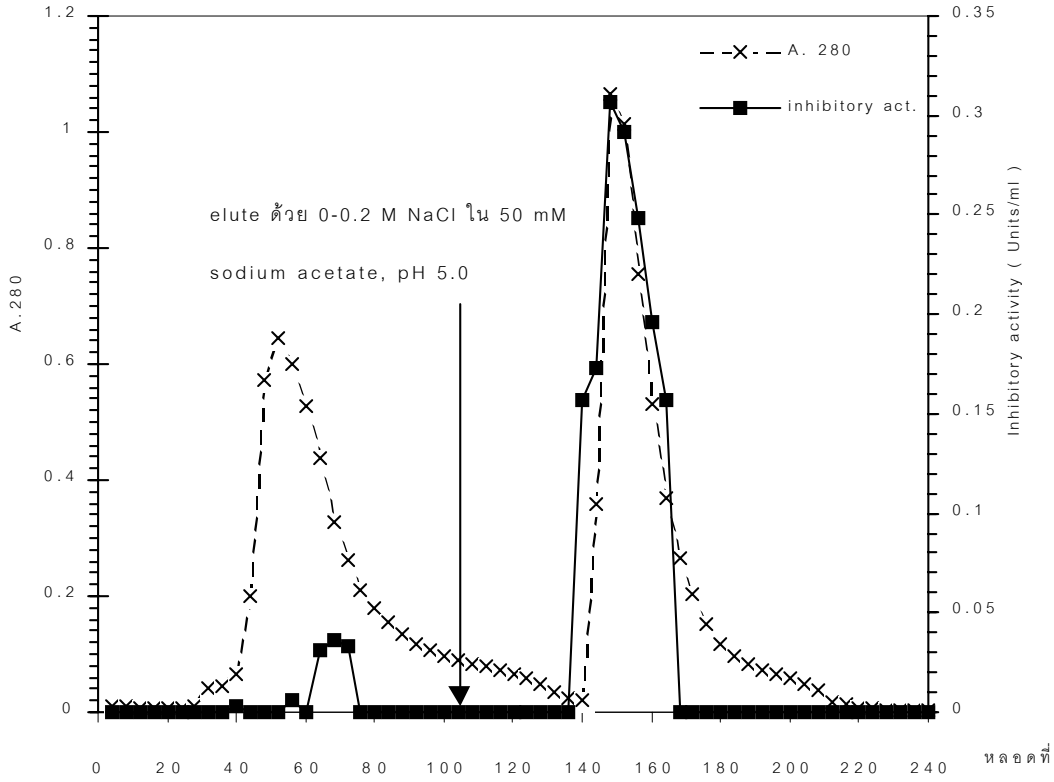
เมื่อนำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.4.7 มาผ่านลงในคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วย Hydroxyapatite แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ 1, 10, 100 และ 500 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 ดังรายละเอียดในข้อ 2.7.6 พบว่า สารยับยั้งอะไมเลสส่วนใหญ่จะถูกชะออกมาในบัฟเฟอร์ 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 ดังปรากฏเป็นพีคของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ในรูปที่ 12 นำสารละลายเฉพาะในหลอดที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงๆ มารวมกัน และทำให้เข้มข้น พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสเป็น 850 หน่วย ซึ่งเป็นปริมาณสุทธิของสารยับยั้งอะไมเลส เท่ากับ 18.05% ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 14 มก. คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 60.71 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 101.69 เท่า จากตอนเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 6

จากผลการทดลองพบว่า ในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ CM-cellulose พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสออกมาโดยการชะด้วย 0-0.2 M NaCl ใน 50 mM sodium acetate, pH 5.0 แสดงว่าสารยับยั้งอะไมเลสสามารถจับคอลัมน์ได้ ซึ่งหมายถึงสารยับยั้งอะไมเลสนี้มีประจุเป็นบวก หรือเป็น basidic protein เมื่อนำมาแยก

ต่อโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75 โปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค ซึ่งพบค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสอยู่ในพีคแรกใกล้เคียงกับที่ BSA ถูกชะออกมา เมื่อนำมาแยกต่อโดยใช้คอลัมน์ Hydroxyapatite พบว่าโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีคเช่นเดียวกัน แต่สารยับยั้งอะไมเลสถูกชะออกมาในช่วงที่ชะด้วย 100 mM sodium phosphate, pH 6.8 ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส 850 หน่วย และ 60.71 หน่วย/มก.โปรตีน คิดเป็น 18.05% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 101.69 เท่าของสารสกัดหยาบเริ่มต้น ซึ่งในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากรำข้าว (*Oryza sativa* L.) ด้วยวิธีเดียวกันนี้โดย Yamagata *et al*. (1998) พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 93 เท่า ใกล้เคียงกัน

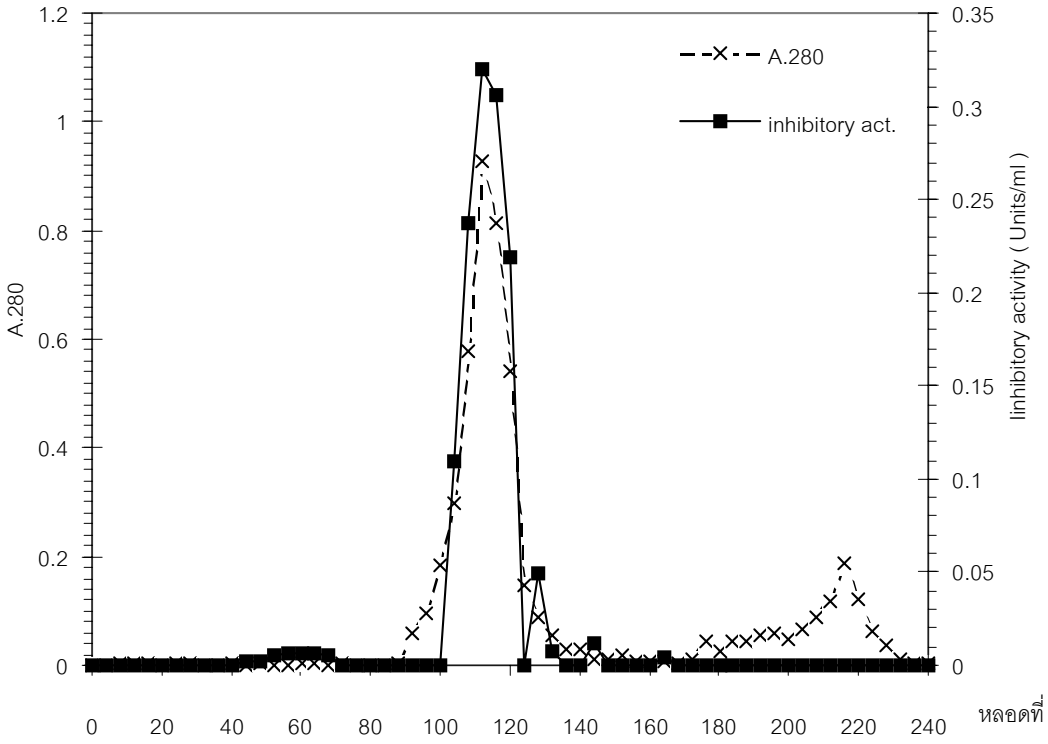
ตารางที่ 6 ผลการสกัดและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก 100 กรัม ในขั้นตอนต่างๆ

Step	Total inhibitory activity Unit (mg glucose/3 min)	Total protein (mg)	Specific inhibitory activity (Unit/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	4,710	7,890	0.60	100	1.00
80% $(NH_4)_2SO_4$	3,386	3672	0.92	71.89	1.53
Dialysis	2,916	1,620	1.80	61.91	3.02
CM-cellulose	1,323	539	2.45	28.09	4.10
Sephadex G-75	1,078	44	24.50	22.89	41.04
Hydroxyapatite	850	14	60.71	18.05	101.69



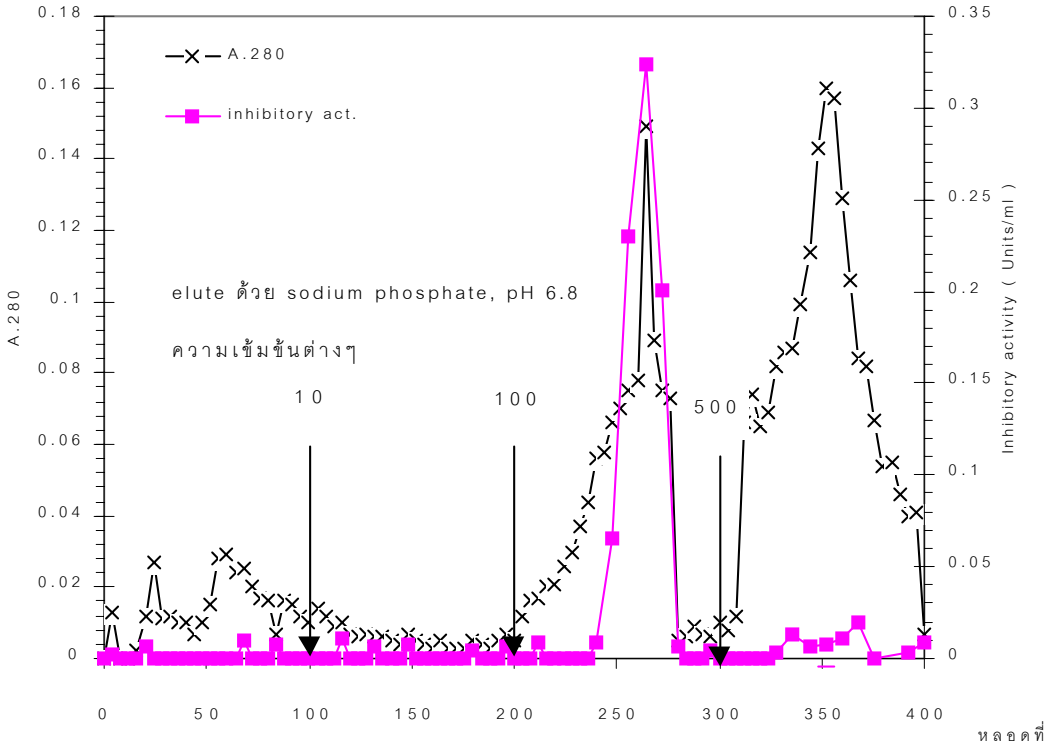
รูปที่ 10 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส โดยคอลัมน์ CM-cellulose

นำโปรตีนจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% ซึ่งไดอะไลซ์ และทำให้เข้มข้นแล้ว ผ่านคอลัมน์ CM-cellulose ขนาด 2.5 × 12 ซม. ล้างด้วย 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 อัตราเร็ว 24 มล./ซม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้วชะด้วย gradient 0-0.2 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดียวกันอย่างต่อเนื่องที่ความเร็วเดิม เก็บสารละลายแยกส่วน (fraction) หลอดละ 1 มล. ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส



รูปที่ 11 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส โดยคอลัมน์ Sephadex G-75

นำโปรตีนจากคอลัมน์ CM-cellulose ซึ่งไดอะไลซ์และทำให้เข้มข้นแล้ว ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 2.0 × 60 ซม. ชะคอลัมน์ด้วย 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 อัตราเร็ว 20 มล./ซม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บสารละลายแยกส่วน (fraction) หลอดละ 1 มล. ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส



รูปที่ 12 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส โดยคอลัมน์ Hydroxyapatite

นำโปรตีนจากคอลัมน์ Sephadex G-75 ซึ่งไดอะไลซ์และทำให้เข้มข้นแล้ว ผ่านคอลัมน์ Hydroxyapatite ขนาด 3.0 × 12 ซม. ชะด้วย 1, 10, 100, 500 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 อัตราเร็ว 20 มล./ซม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บสารละลายแยกส่วน (fraction) หลอดละ 1 มล. ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส

3.5 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่าง ๆ

3.5.1 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสที่แยกได้จากขั้นตอนต่าง ๆ โดยโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

เมื่อนำสารละลายตัวอย่างจากขั้นตอนต่างๆ ของการสกัดและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากเมล็ดเนียงนก ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพธรรมชาติ ตามวิธีในหัวข้อ 2.8.1 เพื่อเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนตัวอย่างที่เตรียมได้จากแต่ละขั้นตอนดังกล่าว พบว่ามีแถบโปรตีนจำนวนมากในตัวอย่างสารสกัดเมล็ดเนียงนก และแถบโปรตีนเหล่านี้ถูกกำจัดออกไปจากการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ จนถึงขั้นตอนสุดท้ายคือ คอลัมน์ Hydroxyapatite ปรากฏว่าเหลือแถบโปรตีนอยู่เพียงแถบเดียว ที่ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.62 มีขนาดประมาณ 70,000 ดาลตัน เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 13

3.5.2 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสที่แยกได้จากขั้นตอนต่าง ๆ โดยโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ

เมื่อนำสารละลายตัวอย่างจากขั้นตอนต่างๆ ของการสกัดและทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากเมล็ดเนียงนก ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ และย้อมด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลูอาร์ 250 ตามวิธีการในข้อ 2.8.2 พบว่าแถวที่ 3 และ 4 เป็นสารสกัดเมล็ดเนียงนกและ dialysate ซึ่งจะมีแถบโปรตีนที่ชัดเจนหลายแถบและแถบจางๆ เล็กๆ อีกหลายแถบ ในแถวที่ 5 เป็นโปรตีนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ CM-cellulose มีแถบโปรตีนลักษณะคล้ายกับแถวที่ 4 มีการกำจัดโปรตีนออกมาบางส่วนเท่านั้น ส่วนแถวที่ 6 เป็นโปรตีนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 โปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 67,000 ดาลตัน เหลือเพียงแถบเดียว และโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 67,000 ดาลตัน ถูกกำจัดออกไปเหลือเพียงบางส่วน แถวที่ 7 เป็นสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Hydroxyapatite

ปรากฏโปรตีนที่เป็นแถบสารยับยั้งอะไมเลสได้ชัดเจน 1 แถบ ดังรูปที่ 14 มีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.48

3.5.3 ผลการตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยอิเล็กโทรฟอรีซิส

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัด และทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก มาตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลส โดยเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบ starch-PAGE 2 แผ่น เปรียบเทียบผลจากการย้อมแผ่นที่ 1 ด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู อาร์ 250 และแผ่นที่ 2 ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่าแผ่นที่ 2 มีส่วนที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสปรากฏเป็นแถบตรงกันทุกแถว ของสารละลายตัวอย่างจากทุกขั้นตอนการสกัดและทำบริสุทธิ์ ซึ่งอยู่ในบริเวณเดียวกันกับแถบโปรตีนในแผ่นที่ 1 คือแถบของสารตัวอย่างที่ได้จากคอลัม Hydroxyapatite ดังรูปที่ 15 ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสารตัวอย่างจากคอลัมน์ Hydroxyapatite เป็นสารยับยั้งอะไมเลส

เมื่อติดตามการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสทั้งแบบแปลงสภาพ, ไม่แปลงสภาพ และการตรวจกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสแบบ Starch-PAGE พบว่าขั้นตอนต่างๆที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ ได้กำจัดโปรตีนอื่นๆออกไป จนเหลือเฉพาะสารยับยั้งอะไมเลสในสารละลายหลังจากผ่านคอลัมน์ Hydroxyapatite เป็นแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ และแสดงกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส เนื่องจากปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบใน SDS-PAGE และมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ Native-PAGE ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนกไม่มีหน่วยย่อย

3.5.4 ผลการย้อมไกลโคโปรตีน

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัด และทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก มาย้อมไกลโคโปรตีนด้วยสารละลายฟุกซิน-ซัลไฟต์ เทียบกับเมื่อย้อมโปรตีนด้วยสารละลายสีคูมาซีบิลเลียนบลู อาร์ 250 พบว่าทั้งสองวิธี ปรากฏแถบของสารสกัด และทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากขั้นตอนต่างๆ ที่บริเวณเดียวกัน ดังรูปที่ 13-14 และพบว่าแถบของสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากคอลัมน์ Hydroxyapatite มีค่า

การเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับที่ได้จากการย้อมด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู ดังนั้นสารยับยั้งอะไมเลสในเมล็ดเนียงนกเป็นไกลโคโปรตีน

แถบโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากเมล็ดเนียงนกย้อมติดสีฟุกชิน-ซัลไฟต์จึงมีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน คล้ายกับที่พบในสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งอื่น เช่น สารยับยั้งอะไมเลสจาก *Phaseolus vulgaris* ในถั่วมีคาร์โบไฮเดรท 15% (Moreno *et al*., 1990) phaseolamin ในถั่วขาวและถั่วแดงมีคาร์โบไฮเดรท 9-10% (Layer et al., 1985)

3.6 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลส

3.6.1 น้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนกโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากขั้นตอนคอลัมน์ Sephadex G-75 โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน หาได้โดยใช้คอลัมน์เดียวกัน ตามวิธีการในข้อ 2.9.1 พบว่าโปรตีนที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสถูกชะออกมาที่ค่า K_{av} 0.15 ใกล้เคียงกับที่สารละลาย BSA ถูกชะออกมา ดังรูปที่ 16 เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุล กับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสได้ ซึ่งมีขนาด 70,000 ดาลตัน (Log M_r 4.85) ดังรูปที่ 17

3.6.2 น้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสในสภาพธรรมชาติ

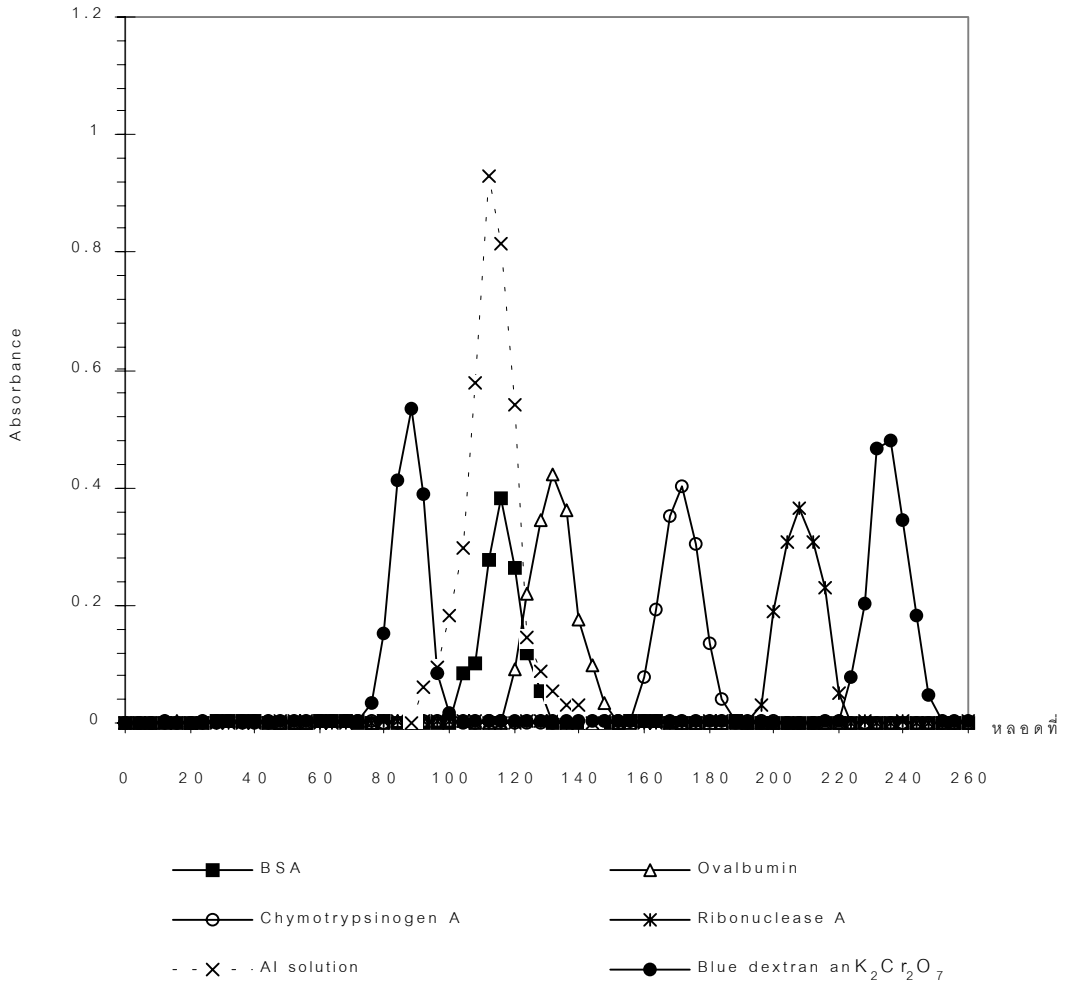
น้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสหาได้โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสในสภาพธรรมชาติจากตัวอย่างที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ เนื่องจากมีโปรตีนมาตรฐานชนิด HMW เปรียบเทียบอยู่แล้ว ตามวิธีการในข้อ 2.9.2 พบว่าทั้งส่วนที่ย้อมโปรตีนและกิจกรรมในการยับยั้งอะไมเลสของสารยับยั้งนั้น ย้อมติดแถบที่บริเวณเดียวกัน ดังรูปที่ 15 แถบสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งก็คือจาก Hydroxyapatite มีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ประมาณ 0.62 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70,800 ดาลตัน ดังรูปที่ 18

3.6.3 น้ำหนักโมเลกุลย่อยของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนกโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ

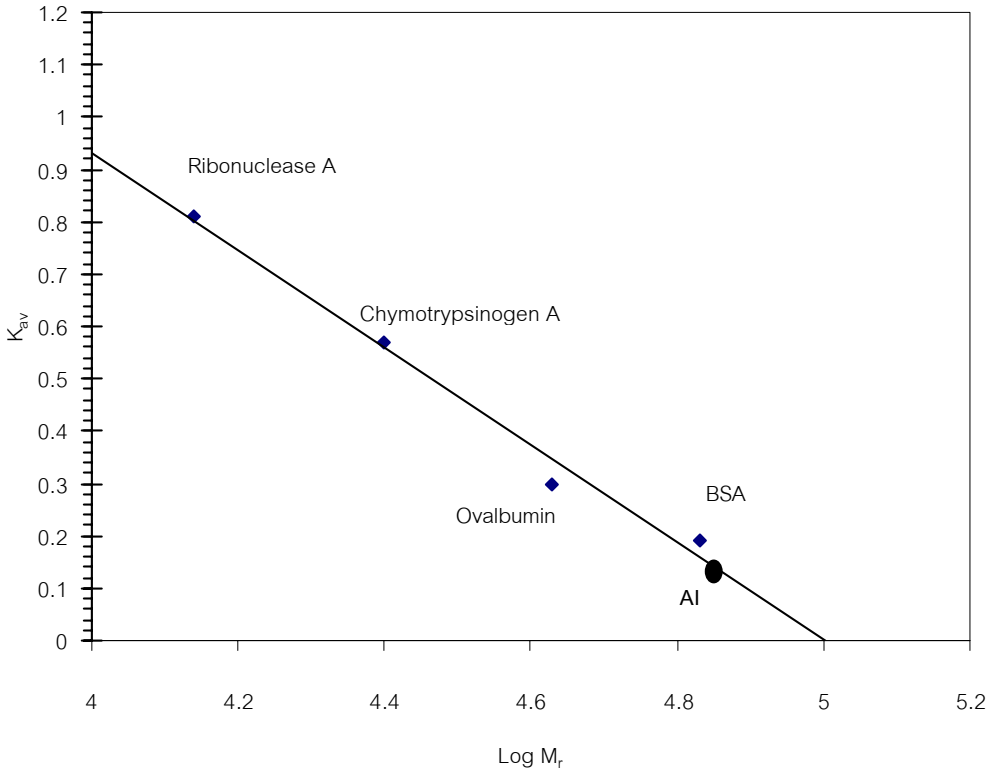
เมื่อนำตัวอย่างสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนทั้งหมดของการทำบริสุทธิ์แล้ว มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ ตามรายละเอียดของวิธีการซึ่งระบุไว้ในหัวข้อ 2.9.3 พบว่า แถบโปรตีนที่ปรากฏมี 1 แถบ (ดังแสดงในรูปที่ 14 ซึ่งสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยได้ เท่ากับ 68,400 ดาลตัน โดยการเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์หรือ R_f ของสารยับยั้งอะไมเลสดังกล่าวกับกราฟระหว่างค่า R_f ของแถบโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรีเลส บี, BSA,

โอวัลบูมิน,คาร์บอนิกแอนไฮเดรส, ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ และแอลฟา-แลคทัลบูมิน กับค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด ดังแสดงในรูปที่ 19

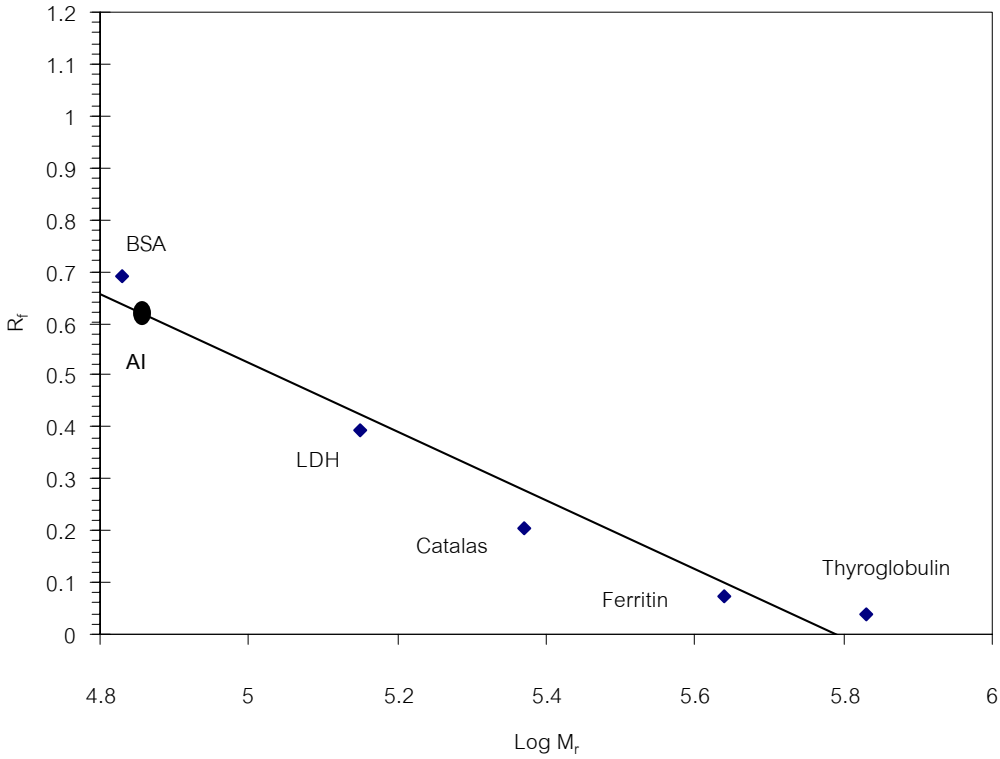
การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของสารยับยั้งอะไมเลสกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสแบบไม่แปลงสภาพ มีน้ำหนักโมเลกุล 70,800 ดาลตัน ใกล้เคียงกับแบบแปลงสภาพคือ 68,400 ดาลตัน และใกล้เคียงกับเมื่อหาโดยวิธีเจลฟิลเตรชันคือ 70,000 ดาลตัน ตามลำดับ และขนาดโมเลกุลที่พบนี้อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับในสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งอื่น เช่น สารยับยั้งอะไมเลสจาก phaseolamin (*Phaseolus vulgaris*) มีขนาดมวลโมเลกุล 49,000 ดาลตัน (Layer *et al*., 1985) และสารยับยั้งอะไมเลสจาก *Streptomyces tendae* มีขนาดมวลโมเลกุล 60,000 ดาลตัน (Haas-Lauterbach *et al*., 1993)



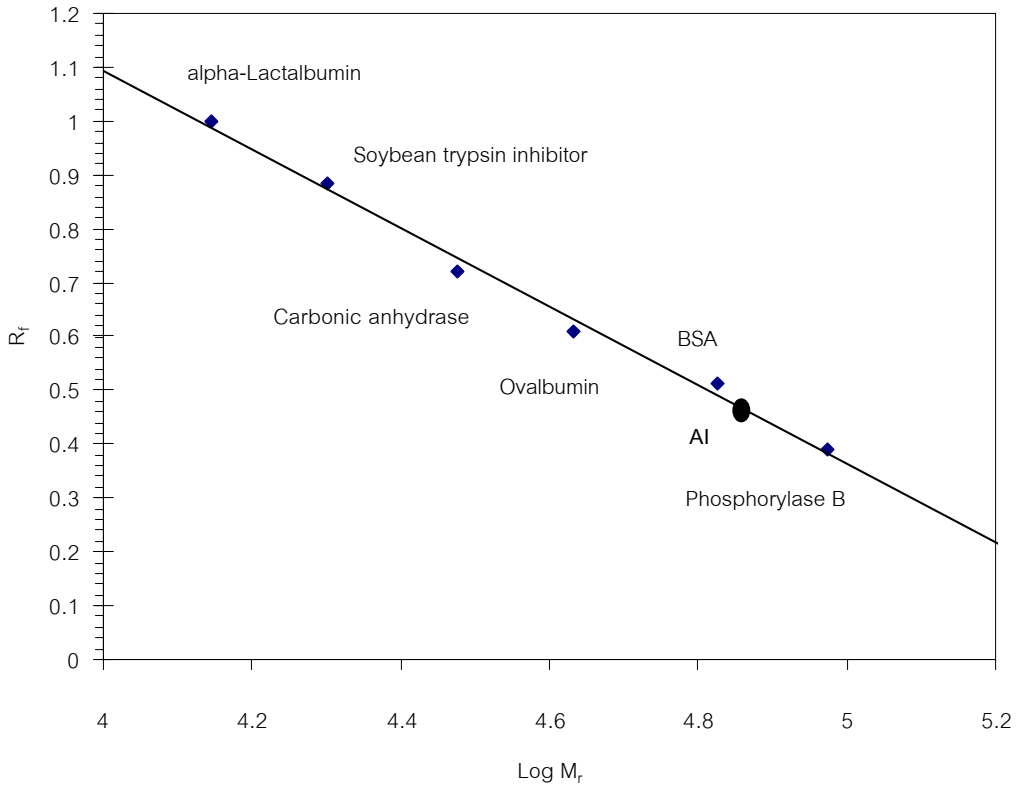
รูปที่ 16 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ CM-cellulose โดยคอลัมน์ Sephadex G-75



รูปที่ 17 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากคอลัมน์ CM-cellulose โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 จากกราฟมาตรฐาน (แกน x : Log M_r ของโปรตีนมาตรฐาน และแกน y : K_{av} ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด)



รูปที่ 18 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Hydroxyapatite โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ ไม่แปลงสภาพที่ 7% เจลจากกราฟมาตรฐาน (แกน x : Log M_r ของโปรตีนมาตรฐาน และ แกน y : R_f ซึ่งเป็นค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด)



รูปที่ 19 การหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากคอลัมน์ Hydroxyapatite โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพที่ 4-10% เจล จากกราฟมาตรฐาน (แกน x : Log M_r ของโปรตีนมาตรฐาน และ แกน y : R_f ซึ่งเป็นค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด)

3.7 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งอะไมเลส

3.7.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บสารยับยั้งอะไมเลสในรูปของสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 37, 4 และ –20 °ซ

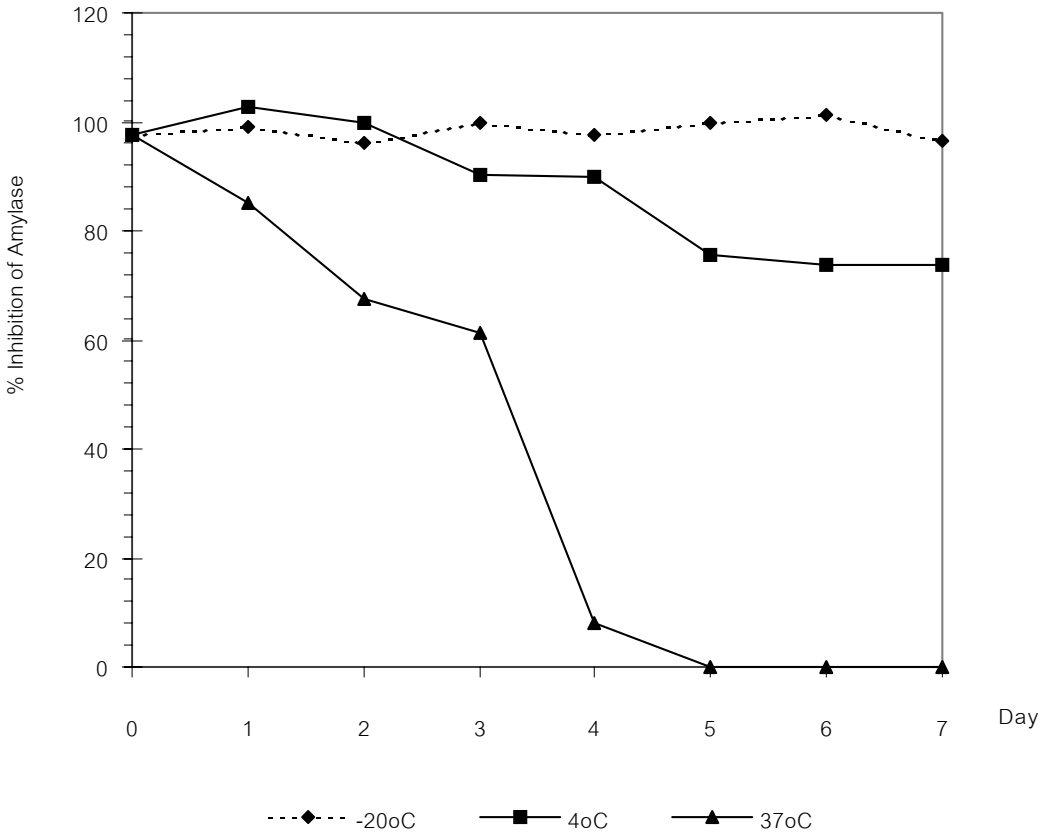
เมื่อนำสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากเมล็ดเนียงนก หลังจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แล้ว มาทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บสารยับยั้งอะไมเลสในรูปของสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 37, 4 และ –20 °ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า ค่าร้อยละกิจกรรมการยับยั้ง เมื่อเก็บสารยับยั้งอะไมเลสที่อุณหภูมิ –20 °ซ มีค่าค่อนข้างคงที่ ส่วนที่อุณหภูมิ 4 °ซ เริ่มมีค่าลดลงในวันที่ 5 และพบว่าสามารถเก็บสารยับยั้งอะไมเลสไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ได้เพียง 1 วัน เพราะหลังจากนั้นค่าร้อยละกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสจะลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าเท่ากับ 0 ดังกราฟรูปที่ 20

สารยับยั้งอะไมเลสเป็นสารประเภทโปรตีนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ ทำให้เกิดการคงตัวได้มากกว่าเมื่อเก็บที่ 4 และ 37 °ซ เพราะโปรตีนจะไม่เสียสภาพ ซึ่งโดยทั่วไปก็นิยมเก็บในอุณหภูมิ –20 °ซ

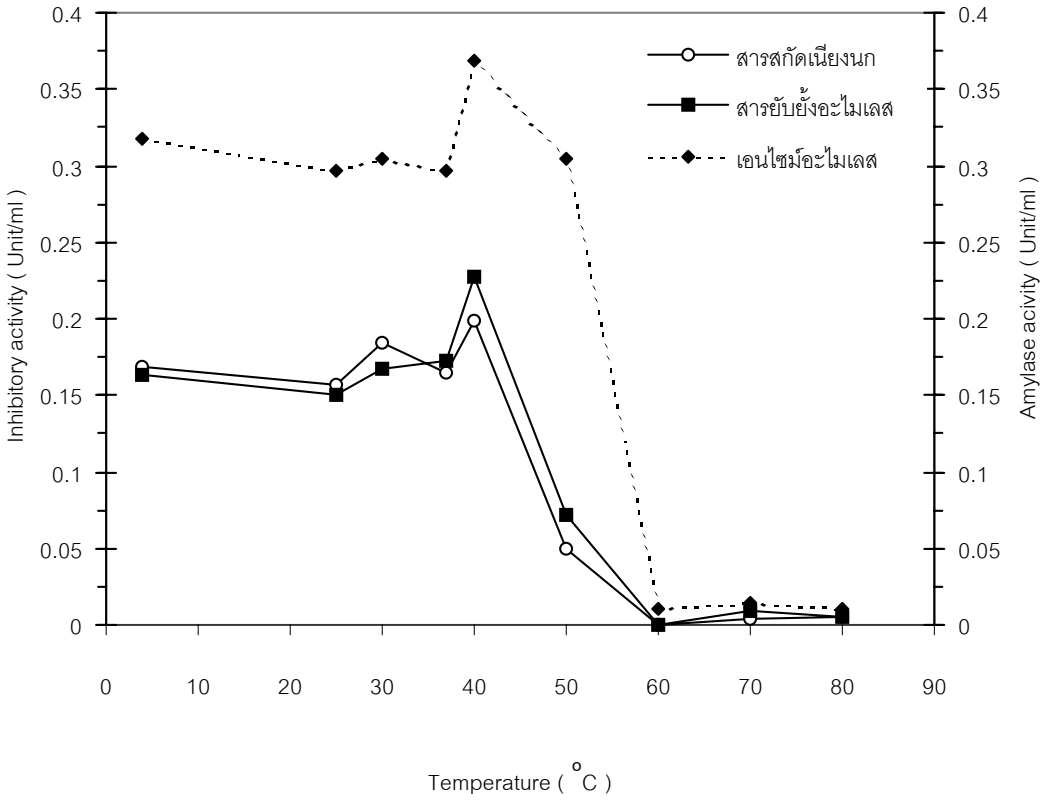
3.7.2 ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส

เมื่อนำสารละลายที่ผ่านการสกัด และทำบริสุทธิ์แล้ว มาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก เปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าสารสกัด และสารที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ทำงานได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิคล้ายกัน คือที่อุณหภูมิในช่วง 4-37 °ซ สามารถทำงานได้ดี มีค่าค่อนข้างคงที่ และพบว่าอุณหภูมิที่ทำงานได้ดีที่สุดคือ 40 °ซ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ ขึ้นไปพบว่าทำงานได้ลดลง และไม่สามารถทำงานได้อีกที่อุณหภูมิ 50 °ซ ขึ้นไป ซึ่งอาจเนื่องมาจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสลดลง และสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ สารยับยั้งอะไมเลสไม่สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสอีกต่อไป (รูปที่ 21) ตามผลการทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารยับยั้งอะไมเลสถูกสกัดได้ดีด้วยวิธีไม่ใช้ความร้อน คือวิธีของ Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) ผลการทดลองนี้ สนับสนุนว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก เป็นชนิดไม่ทนความร้อน

สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนกสามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ 4-50 °ซ แต่สามารถทำงานได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 40 °ซ เมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งอื่นๆ พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสส่วนใหญ่ ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 °ซ และสามารถทนความร้อนได้ถึง 70-80 °ซ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงมากนัก อาจทำให้สารยับยั้งอะไมเลสเสียสภาพและทำงานไม่ได้ (Marshall and Lauda, 1975)



รูปที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อการเก็บสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว นาน 1 สัปดาห์



รูปที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลสของสารสกัดและสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว

3.7.3 ผลของ pH ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส

การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของสารสกัดจากเมล็ดเนียงนก และสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าสารสกัด และสารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์ ทำงานได้ดีในช่วง pH คล้ายกัน คือ ที่ pH 6.0-6.8 และสามารถยับยั้งได้สูงสุดที่ pH 7.0 ส่วนที่ pH 5.0 และช่วง pH 8.0-9.0 เป็นช่วง pH ที่ไม่เหมาะกับการทำงาน ดังรูปที่ 22

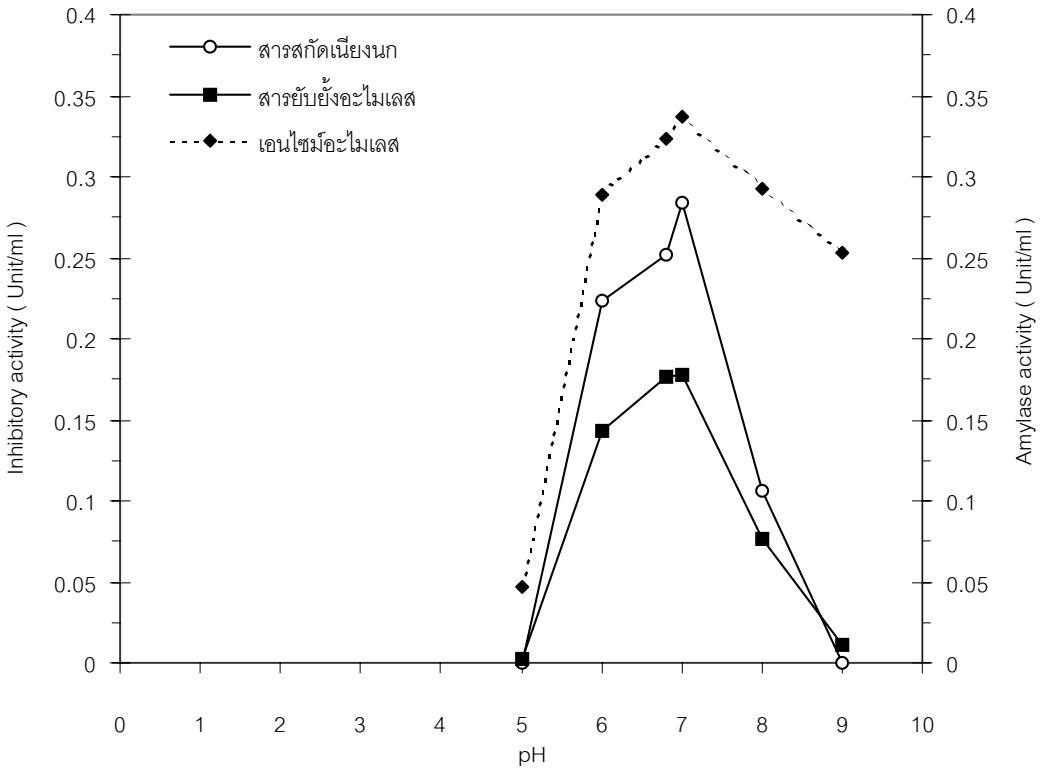
pH ที่เหมาะสมในการทำงานของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนกคือ pH ในช่วง 6.0-8.0 และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 ซึ่งพบว่าใกล้เคียงกับช่วง pH ของสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งอื่นๆ ที่พบว่าทำงานได้ดีที่ pH เป็นกลาง เช่น phaseolamin มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ pH ในช่วง 6.0-8.0 (Marshall and Lauda, 1975)ส่วน pigeonpea มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ pH 7.0(Giri and Kachole, 1998)

3.7.4 ผลการศึกษาจลศาสตร์ของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก

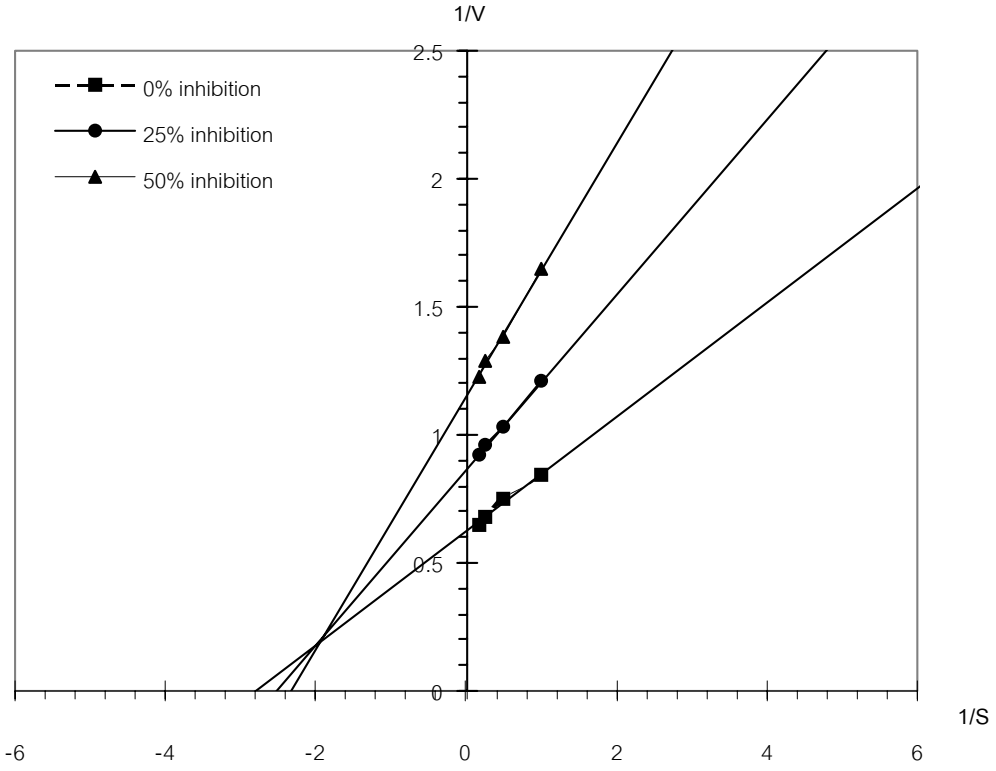
จากการนำสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ปริมาณ 3 ความเข้มข้น มาทดสอบหาจลนศาสตร์ของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก เพื่อจำแนกลักษณะการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลสที่มีต่อเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้สารตั้งต้นคือน้ำแป้งที่ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าค่า K_m ไม่เปลี่ยนแปลง แต่อัตราความเร็วสูงสุด V_{max} มีค่าลดลง ดังรูปที่ 23 ดังนั้นสารยับยั้งอะไมเลสมีลักษณะการยับยั้งเป็นแบบ non-competitive

จากกราฟจะเห็นว่าค่า K_m ไม่ตกบนแกน 1/S ตามทฤษฎีของจลนศาสตร์แสดงว่า AI ที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนก มีความชอบที่จะจับกับในรูปของ ES complex มากกว่าจับในรูปของเอนไซม์อิสระ เพราะว่าถ้าสารยับยั้งอะไมเลสชอบจับกับเอนไซม์อิสระจริง กราฟของค่า K_m จะตัดบนแกน x ซึ่งประสบการณ์จากการทดลองได้สนับสนุนดังนี้ ในครั้งแรกๆที่ทำการทดลองได้ใส่สับสเตรท (น้ำแป้ง) กับสารยับยั้งอะไมเลสลงไปก่อน แล้วจึงใส่เอนไซม์อะไมเลส พบว่าค่าการยับยั้งค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเปลี่ยนลำดับการใส่เป็น สารยับยั้งอะไมเลส เอนไซม์ และสับสเตรท ตามลำดับ (Marshall and Lauda, 1975) พบว่าค่า K_m สูงมากกว่าหลายเท่า

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก พบว่าค่า K_m ที่ได้จาก Lineweaver-Burk plot กับน้ำแป้งมีค่าคงที่ และค่า V_{max} ลดลง สอดคล้องกับสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งอื่นๆ ที่ส่วนใหญ่มีการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน เช่น *Phaseolus vulgaris* (Marshall and Lauda, 1975), เมล็ดข้าวสาลี (O' Donnell and McGeeney, 1976)



รูปที่ 22 ผลของ pH ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของสารสกัด และสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว โดยทดสอบที่ pH ต่างๆ คือ 5.0, 6.0, 6.8, 7.0, 8.0 และ 9.0



รูปที่ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1/V ที่เวลา 3 นาที และ 1/S กับผลความเข้มข้นของสารยับยั้งอะไมเลสที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนกที่ 0, 25 และ 50% ที่ความเข้มข้นของน้ำแป้ง (S) เท่ากับ 0, 1, 2, 4 และ 6% น้ำแป้งในบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.8 โดยค่า V คือความเร็วของปฏิกิริยา หรือ mg glucose ที่เกิดขึ้นที่เวลา 3 นาที ที่ 37 °ซ

3.7.5 ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นเลคตินของสารสกัดเนียงนก และสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว

ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นเลคตินของสารสกัดเนียงนก และสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วด้วย 2 วิธีคือ

(1) การทดสอบเลคตินโดยวิธี Heamagglutinating activity

การทดสอบเลคตินในสารสกัดเนียงนก และสารยับยังอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว โดยทดสอบการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงของคนในเพศชายและหญิงทั้ง 4 หมู่คือ A, B, AB และ O และทดสอบการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงของหนู และกระต่าย พบว่าสารตัวอย่างทั้ง 2 ไม่สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงจากทั้งของคน,หนู และกระต่าย จึงกล่าวได้ว่าสารสกัด และสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วไม่มีสมบัติเลคติน

(2) การทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนู

การทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนู ทั้งตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์ และตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์ กับสารสกัดเนียงนกและสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์แล้ว พบว่าไม่เกิดการเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนู จึงสรุปได้ว่าทั้งสารสกัด และสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนกนั้น ไม่มีสมบัติเลคตินอยู่เลย สอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ (1)

จากผลการทดลองกล่าวได้ว่า สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนกไม่มีสมบัติการเป็นเลคติน ต่างจากผลของ ประภาพร อุทารพันธุ์ (2533) ที่พบว่าสารสกัดเมล็ดเนียงนกมีสมบัติเป็นเลคติน อาจเป็นไปได้ว่าเมล็ดเนียงนกมีปริมาณของเลคตินไม่คงที่ในแต่ละรุ่น จึงพบปริมาณเลคตินแตกต่างกันไปได้ แต่ส่วนใหญ่แล้วพืชที่พบสารยับยั้งอะไมเลสมักมีสมบัติของเลคตินอยู่ด้วย เช่นเมล็ดของ *Phaseolus* species ใน lima bean (*P. lunatus*) (Spavoli *et al*., 2001), *Lablab purpureus* (AILP) (Fakhoury, 2001)

3.7.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งอะไมเลสจากมอดแป้งสาลี และด้วงถั่วเขียว

เมื่อทำการสกัดเอนไซม์อะไมเลสจากมอดแป้งสาลี และด้วงถั่วเขียว แล้วทดสอบกิจกรรมการย่อยแป้งพบว่าได้ผลดังตารางที่ 7

ผลการทดสอบสารสกัด และสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว จากเมล็ดเนียงนก และถั่วแดง กับอะไมเลสจากมอดแป้งสาลี พบว่าสารสกัด และสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนก ยับยั้งอะไมเลสจากมอดแป้งสาลีได้ดีกว่า สารสกัด และสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วแดง (ตารางที่ 8 และรูปที่ 24)
ผลการทดสอบกับ อะไมเลสจากด้วงถั่วเขียว พบว่าสารที่สกัด และทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนกยับยั้งได้น้อยกว่า สารที่สกัด และทำบริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วแดง
ดังตารางที่ 9 และรูปที่ 25

จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่สกัดและทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนกสามารถยับยั้งอะไมเลสจากมอดแป้งสาลีได้มากกว่าด้วงถั่วเขียว สอดคล้องกับสมบัติที่พบในสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งอื่นที่กล่าวว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งต่างกันจะต้านทานต่อแมลงได้ต่างชนิดกัน เช่น RASI ยับยั้งอะไมเลสจากตัวอ่อนของ red flour beetle (*Tribolium castaneum*), *P. vulgaris* ยับยั้งอะไมเลสจาก common bean weevils (*Zabrotes subfasciatus* และ *Acanthoscelides obtectus* (Osborn et al., 1988)

ตารางที่ 7 ค่ากิจกรรมและค่ากิจกรรมจำเพาะของอะไมเลสที่สกัดจากมอดแป้งสาลี และด้วงถั่วเขียว

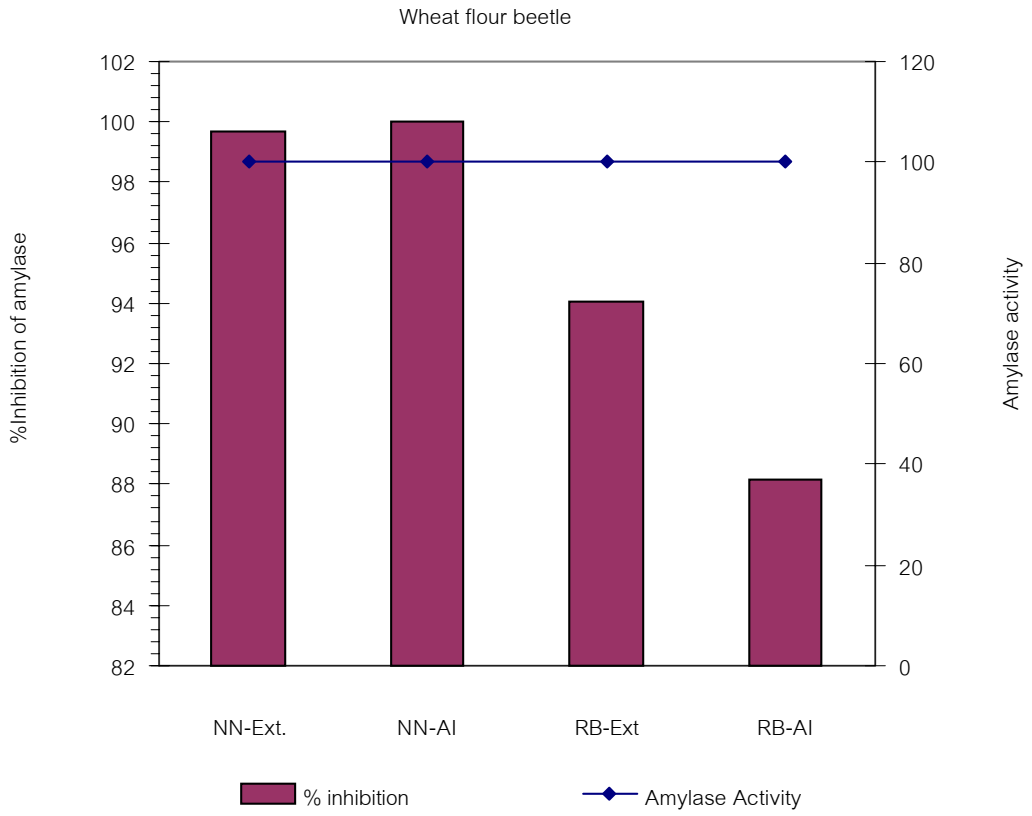
ชนิดของแมลง	Amylase activity (mg glucose/3 min)	mg protein	Specific activity (mg glucose at 3 min/mg protein)
มอดแป้งสาลี	0.552	0.302	1.828
ด้วงถั่วเขียว	0.158	0.272	0.581

ตารางที่ 8 ร้อยละการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลส แหล่งต่างๆ ต่อ อะไมเลสที่สกัดจากมอดแป้งสาลี และด้วงถั่วเขียว

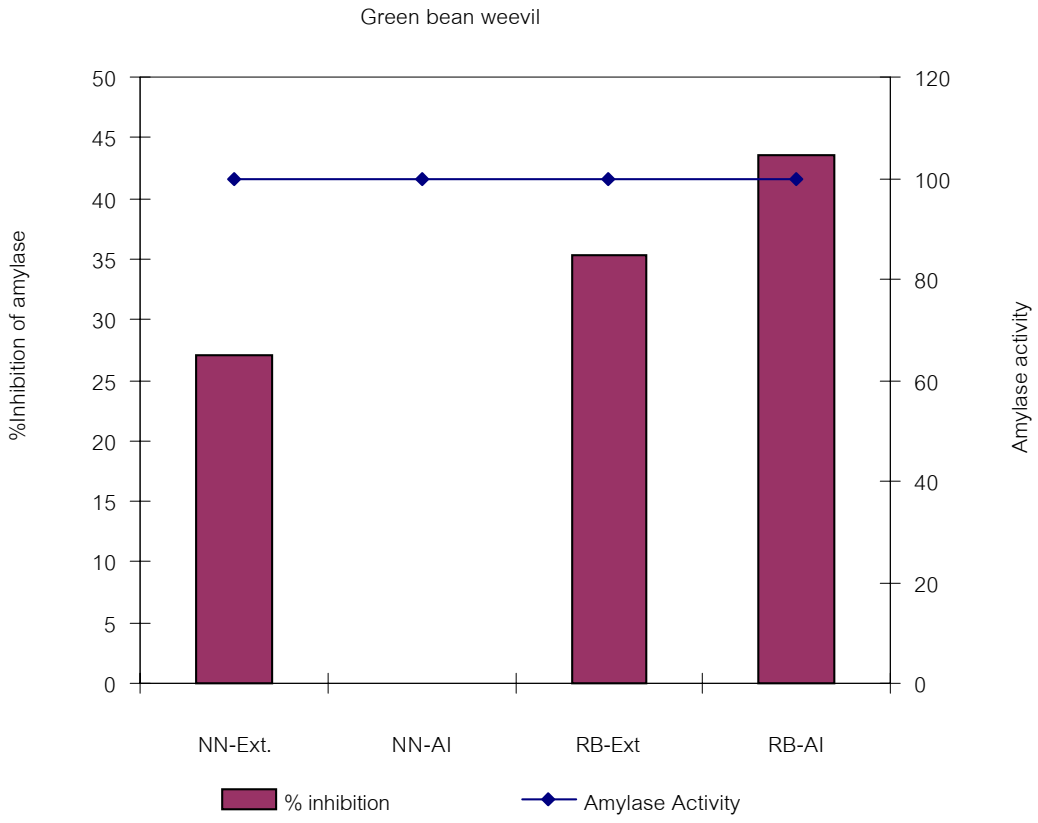
แหล่งของสารยับยั้ง	%การยับยั้งอะไมเลสของแมลง	
	มอดแป้งสาลี	ด้วงถั่วเขียว
สารสกัดเนียงนก	99.69	27.06
สาร AI จากเนียงนก	100	0
สารสกัดถั่วแดง	94.08	35.29
สาร AI จากถั่วแดง	88.16	43.53

หมายเหตุ : กิจกรรมอะไมเลสมอดแป้งสาลี = 0.552 หน่วย

กิจกรรมอะไมเลสด้วงถั่วเขียว = 0.158 หน่วย



รูปที่ 24 แสดงผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดเมล็ดเนียงนก (NN-Ext.), สารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนก (NN-AI), สารสกัดเมล็ดถั่วแดง (RB-Ext.) และ สารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วแดง (RB-AI) ในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากมอดแป้งสาลี



รูปที่ 25 แสดงผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดเมล็ดเนียงนก (NN-Ext.), สารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนก (NN-AI), สารสกัดเมล็ดถั่วแดง (RB-Ext.) และ สารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วแดง (RB-AI) ในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากด้วงถั่วเขียว