บทที่ 3

ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 น้ำยางกล้วย

1.1 เปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากสารสกัดน้ำยางกล้วยที่ได้จากกล้วย 4 ต้น

เพื่อศึกษาความแปรผันของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสระหว่างต้นกล้วยจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสจากกล้วย 4 ต้น โดยเก็บน้ำยางกล้วยจาก 4 ต้น เพื่อนำไปสกัดสารยับยั้งอะไมเลสและนำไปหาค่าการยับยั้งจำเพาะ พบว่าสารสกัดน้ำยางกล้วย จากกล้วยทั้ง 4 ต้นให้ค่าการยับยั้งจำเพาะ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ) ดังนี้ 46.19 ± 4.92, 53.45 ± 4.17, 49.34 ± 0.47 และ 47.86 ± 7.28 หน่วย ต่อ มก.ฟีโนลิค สำหรับกล้วยต้นที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าค่าการยับยั้งจำเพาะของสารสกัดน้ำยางกล้วยจากกล้วยทั้ง 4 ต้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเก็บสารสกัดน้ำยางกล้วยจาก 4 ต้นดังกล่าวรวมกันเพื่อศึกษาต่อไป

1.2 ผลการตกตะกอนสารสกัดน้ำยางกล้วย

1.2.1 ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารสกัดน้ำยางกล้วยซึ่งได้จากการรวมน้ำยาง 4 ต้นจากผลการทดลองข้อ 1.1 เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัวให้ได้ ร้อยละ 0, 40, 60 และ 80 ตามลำดับ ตรวจวัดกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส หาปริมาณฟีโนลิค และคำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ เพื่อคัดเลือกความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด

จากการทดลองพบว่าหลังการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วไม่พบตะกอนเกิดขึ้นในทุกร้อยละความอิ่มตัว

1.2.2 ตกตะกอนด้วยเอทธานอล

นำสารสกัดน้ำยางกล้วยทดลองในข้อ 1.1 มาเติมเอทธานอลให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 20 40, 60 และ 95 ตามลำดับ หลังเซนตริฟิวส์แยกส่วนใสและส่วนตะกอนไปตรวจวัดกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส หาปริมาณฟีโนลิค และคำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของเอทธานอลที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด จากการทดลองพบว่าส่วนของตะกอนที่ได้จากทุกความเข้มข้นของเอทธานอลจะไม่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสแต่ส่วนของส่วนใสที่ได้จากเอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 มีค่าการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกับส่วนใสที่ได้จากเอทธานอลความเข้มข้นอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังตารางที่ 4 ดังนั้นจึงใช้เอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ตกตะกอนน้ำยางกล้วย และนำส่วนใสที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอนสารสกัดน้ำยางกล้วยด้วยเอทธานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

% เอทธานอล	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AI unit)	มก. ฟีโนลิค*	ค่าการยับยั้งจำเพาะ* (AI unit / มก.ฟีโนลิค)
20	0.51 ± 0.02	0.206 ± 0.00	2.47 ± 0.10
40	0.53 ± 0.03	0.219 ± 0.00	2.43 ± 0.14
60	0.51 ± 0.01	0.229 ± 0.00	2.21 ± 0.06
95	0.58 ± 0.04	0.233 ± 0.00	2.50 ± 0.05

*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (ตกตะกอน 2 ครั้ง และวิเคราะห์ 1 ซ้ำในหลอดทดลอง)

1.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางกล้วย

1.3.1 เตรียมสารสกัดน้ำยางกล้วย

เก็บน้ำยางกล้วยมา 40 มล. โดยรวมน้ำยางกล้วยทั้ง 4 ต้นจากการทดลองในข้อ 1.1 เตรียมสารสกัดน้ำยางกล้วยตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 ได้สารสกัดน้ำยางกล้วย (B) ปริมาตร 30 มล. นำไปตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสที่ pH 6.9 อุณหภูมิ 37°ซ โดยใช้น้ำแป้งร้อยละ 0.2 เป็น

สับสเตรท พบว่า มีกิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด (total inhibitory activity) คิดเป็น 10,333.33 หน่วย (AI unit) มีค่าการยับยั้งจำเพาะของสารยับยั้งเท่ากับ 154.99 หน่วย/ มก.ฟีโนลิค

1.3.2 การตกตะกอนสารสกัดน้ำยางกล้วยด้วยเอทธานอล

นำสารสกัดน้ำยางกล้วย ข้อ 1.3.1 ปริมาตร 20 มล. ตกตะกอนด้วยเอทธานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 นำไปเซนตริฟิวจ์แล้วนำส่วนใสที่ได้ไประเหยเอทธานอลออกด้วยเครื่อง evaporator ที่ความดัน 275 bars อุณหภูมิ 60 ºซ นำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณฟีโนลิค และค่าการยับยั้งจำเพาะการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส พบว่าส่วนใสที่ได้มีปริมาณฟีโนลิคทั้งหมด 157.20 มก. มีค่ากิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด 93,000 หน่วยมีค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 591.60 หน่วย / มก.ฟีโนลิค และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.82 เท่าจากขั้นตอนเริ่มต้น

1.3.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ Sephadex G-75

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1.3.2 ปริมาตร 3 มล. มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 1.9.3.1 พบว่ามีสารถูกชะออกมา 2 พีค ดังรูปที่ 5 ซึ่งสารยับยั้งอะไมเลสจะออกมาในพีคแรก (ปริมาตรวอยด์) นำสารละลายเฉพาะหลอดที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส มารวมกัน (หลอด 17 ถึง 50) และทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer จากนั้นละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 3 มล. (ได้สารละลายเรียก B_{G-75}) นำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณฟีโนลิค และค่าการยับยั้งจำเพาะที่การยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส พบว่ามีปริมาณฟีโนลิค 40 มก. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด 26,350 หน่วย คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 658.75 หน่วย/มก.ฟีโนลิค และมีความบริสุทธิ์เป็น 4.25 เท่า จากขั้นตอนเริ่มต้น

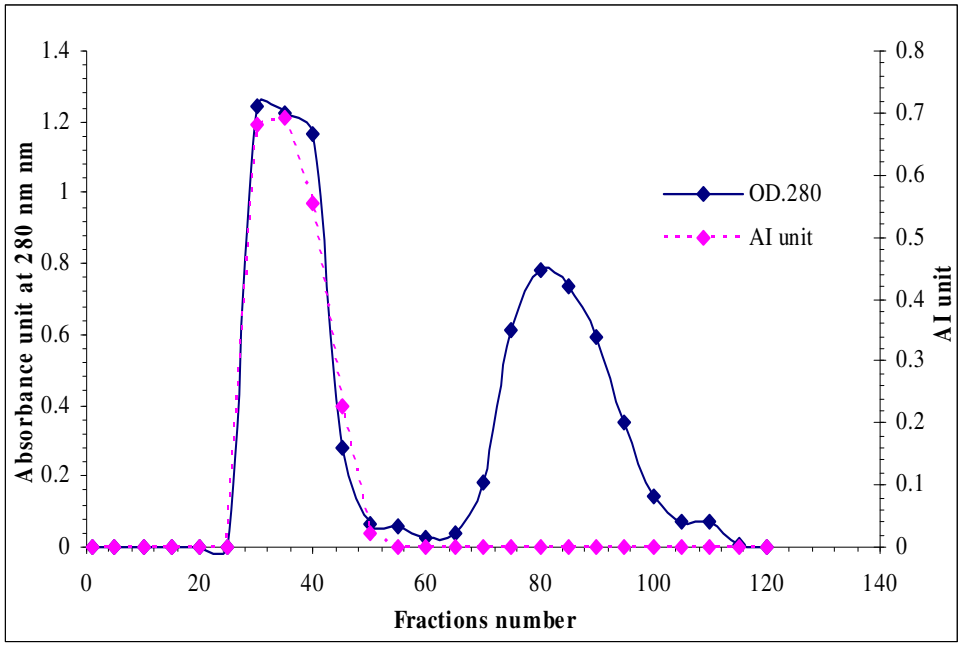
1.4 น้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจากสารสกัดน้ำยางมะละกอโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น

การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลส โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น คอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีในข้อ 1.9 พบว่าสารที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสถูกชะออกมาตรงตำแหน่งเดียวกันกับบลูเด็กซ์แทรน ดังรูปที่ 6 ขนาดของสารยับยั้งอะไมเลสจึงมีขนาดใหญ่กว่าความสามารถในการแยกของ Sephadex G-75 คือมีขนาดใหญ่กว่า 70 kDa

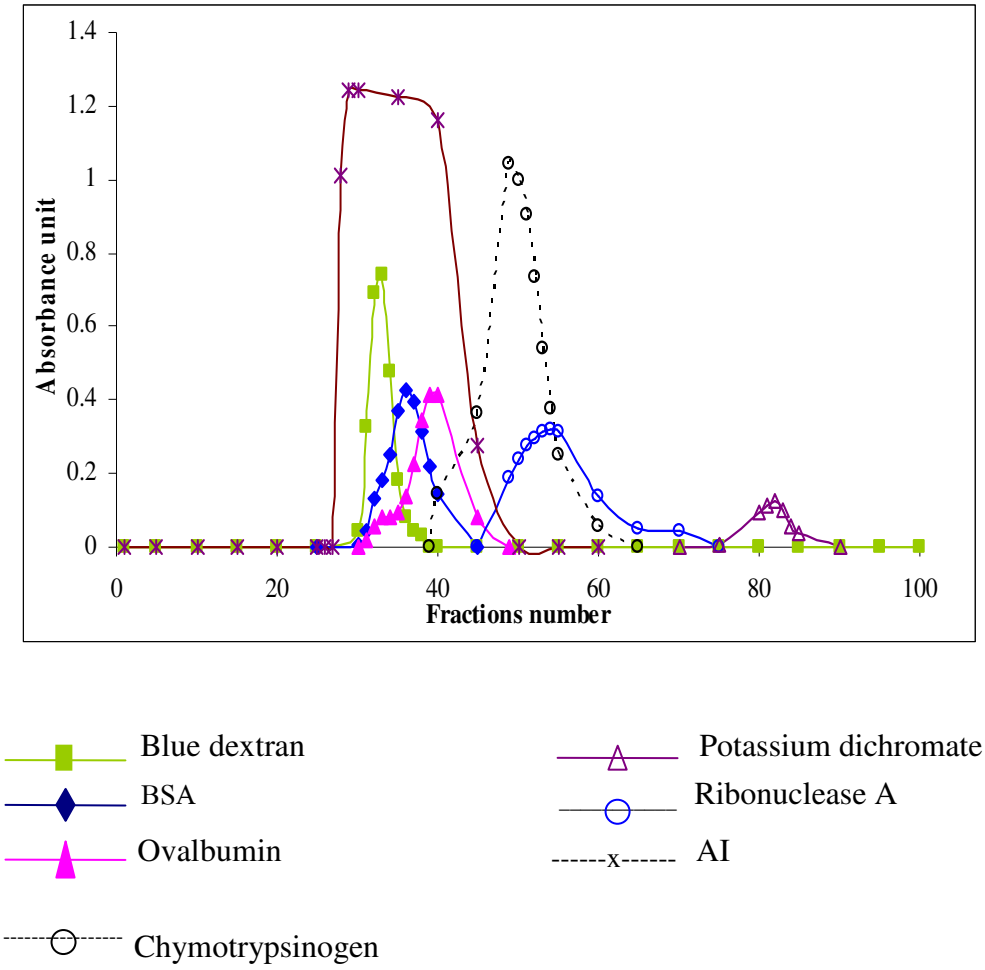
1.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์

1.5.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสโดยโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ

นำสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางกล้วยที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ มาศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วย Native-PAGE ที่มีความเข้มข้นเจล 10% หลังจากย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไม่ปรากฏแถบโปรตีนในทุกตัวอย่าง แต่จะปรากฏเป็นทางยาวแทน ดังรูปที่ 7 ลักษณะดังกล่าวไม่น่าจะใช่ลักษณะสารพวกโปรตีน ดังนั้นจึงข้ามการทดสอบด้วย Starch –PAGE และ SDS-PAGE และเน้นไปศึกษาสารยับยั้งอะไมเลสแบบที่ไม่เป็นโปรตีนต่อไป

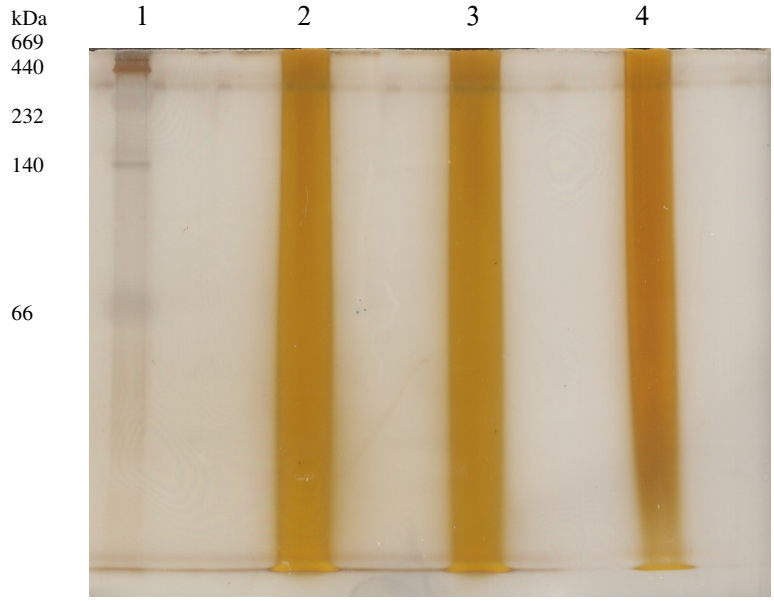


รูปที่ 5 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางกล้วยโดยคอลัมน์ Sephadex G-75 การแยกส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอนสารสกัดน้ำยางกล้วยด้วยเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 110 x1.3 ซม. และชะคอลัมน์ด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9-0.01 M NaCl เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. ที่ อุณหภูมิ 4°ซ ติดตามการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส รวมสารละลายหลอดที่ 17 ถึง 50 ทำแห้งด้วย freeze dryer เพื่อละลายกลับสำหรับศึกษาต่อไป



รูปที่ 6 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจาก น้ำยางกล้วย ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

คอลัมน์ชะด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9-0.01 M NaCl อัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน blue dextran และ potassium dichromate ที่ความยาวคลื่น 280, 620 และ 480 นาโนเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 7 แสดงแบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) ที่ 10% เจล ของขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางกล้วย โดยย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์

แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาดโมเลกุลใหญ่

แถวที่ 2 สารสกัดน้ำยางกล้วย (B) มีโปรตีน 100 μg

แถวที่ 3 ส่วนใส (B_{95}) ที่ได้จากการตกตะกอน B ด้วยเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 มีโปรตีน 100 μg

แถวที่ 4 ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 (B_{G-75}) มีโปรตีน 100 μg

1.6 ผลการศึกษาสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน

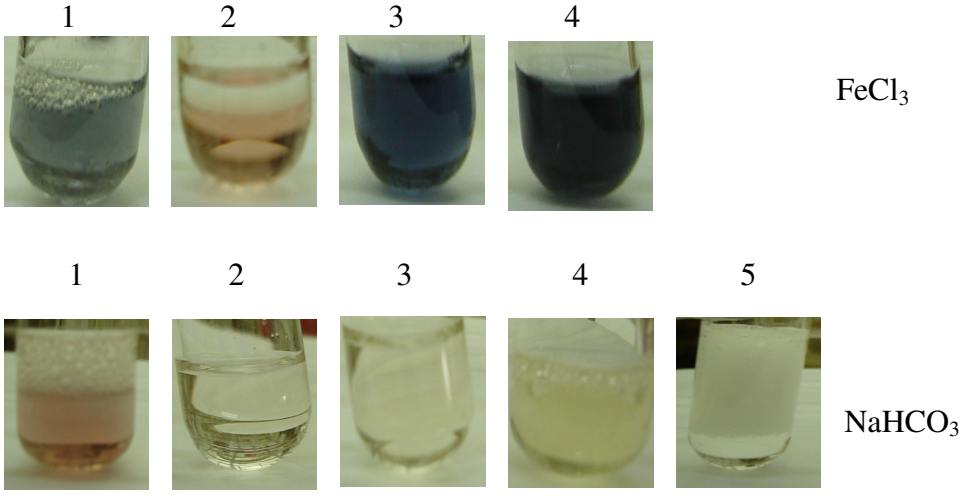
การตรวจเอกสารพบว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนเป็นสารประกอบพวกฟีนอล (McCue และคณะ 2004; Correia และคณะ 2004) งานวิจัยนี้จึงออกแบบทดสอบจำแนกชนิดของสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนว่าเป็นสารกลุ่มฟีนอลหรือไม่ด้วยวิธีดังนี้

1.6.1 ปฏิกิริยากับ ferric chloride ($FeCl_3$)

เมื่อนำตัวอย่าง B_{G-75} และสารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysate มาทดสอบกับสารละลาย $FeCl_3$ พบว่าสาร B_{G-75} และสารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเป็นสีน้ำเงิน-ดำ และสีม่วง ตามลำดับเช่นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับสารมาตรฐาน gallic acid และ tannin (รูปที่ 8 A)

1.6.2 ปฏิกิริยากับ สารละลาย sodium hydrogencarbonate ($NaHCO_3$) อิ่มตัว

เมื่อนำตัวอย่าง B_{G-75} และสารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysate มาทดสอบกับสารละลาย $NaHCO_3$ พบการเกิดฟองอากาศปุดขึ้นในสารละลายของตัวอย่าง B_{G-75} และสารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysate เช่นปฏิกิริยาของ acetic acid และสารมาตรฐาน gallic acid และ tannin (รูปที่ 8 B)

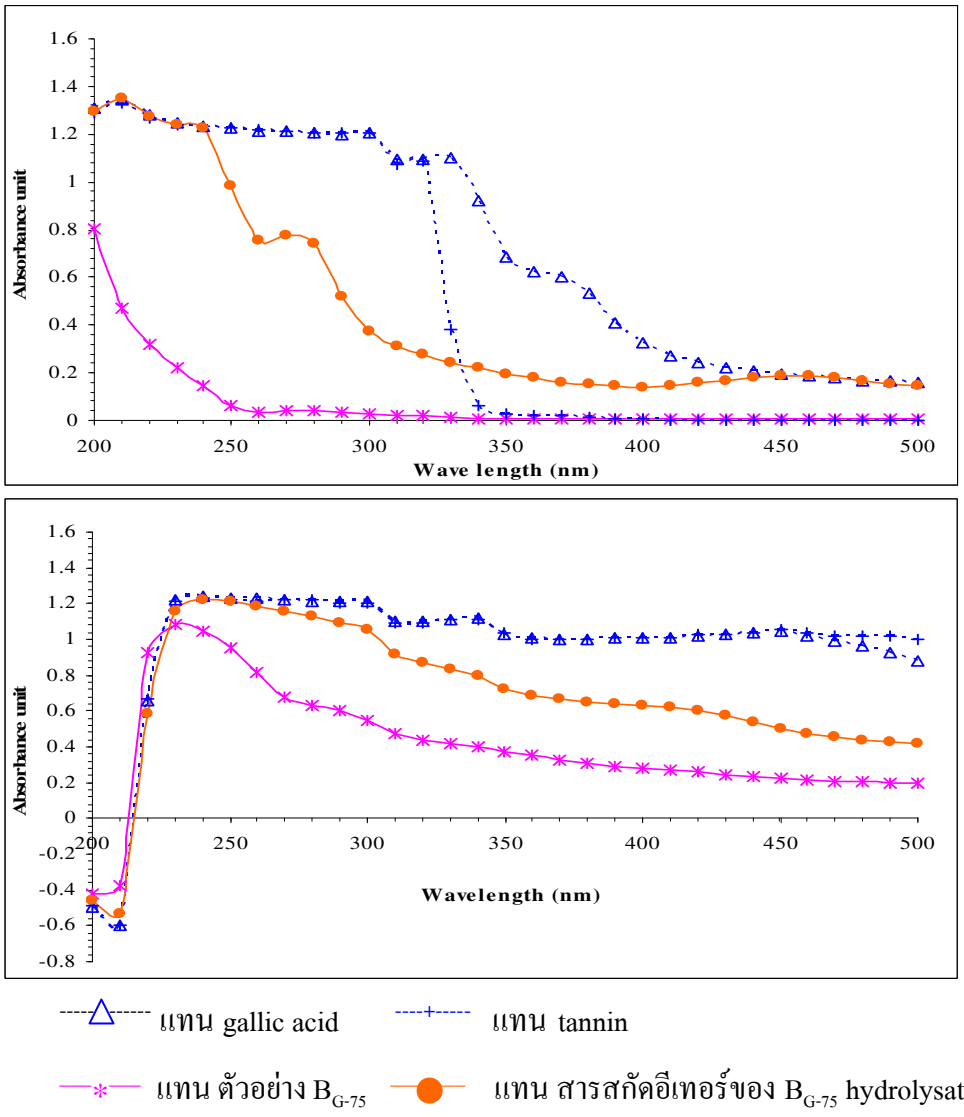


รูปที่ 8 แสดงการเกิดปฏิกิริยากับสารละลาย $FeCl_3$ และ $NaHCO_3$ ของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน gallic acid และ tannin

1 สารละลาย B_{G-75}, 2 สารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysate, 3 gallic acid 4 tannin และ 5 acetic acid

1.6.4 รูปแบบ Bathochromic shift สเปคตรัมช่วง UV-Vis ของตัวอย่าง

หลังนำตัวอย่างสารสกัดน้ำยางกล้วย (B) ส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทธานอล 95 % (B_{95}) ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 (B_{G-75}) และสารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysate มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 200 -500 นาโนเมตร พบว่าหลังจากที่เติม 6 M NaOH ลงไป รูปแบบการดูดกลืนแสงในทุกตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ Bathochromic shift ซึ่งลักษณะดังกล่าวเหมือนกับสารมาตรฐาน gallic acid และ tannin ที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 9 A และB ตามลำดับ



รูปที่ 9 แสดงรูปแบบการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร

A รูปแบบการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B รูปแบบการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในน้ำกลั่น และเติม 6 M NaOH

1.6.5 ศึกษาหมู่ฟังก์ชันนัลด้วยรังสีอินฟราเรดสเปคตรัม

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่าง B_{G-75} และสารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysate ด้วยเครื่อง FT-IR เปรียบเทียบกับตัวอย่างมาตรฐาน (gallic acid และ tannin) พบว่ามีรูปแบบอินฟราเรดสเปคตรัม (รูปที่ 10) ดังนี้

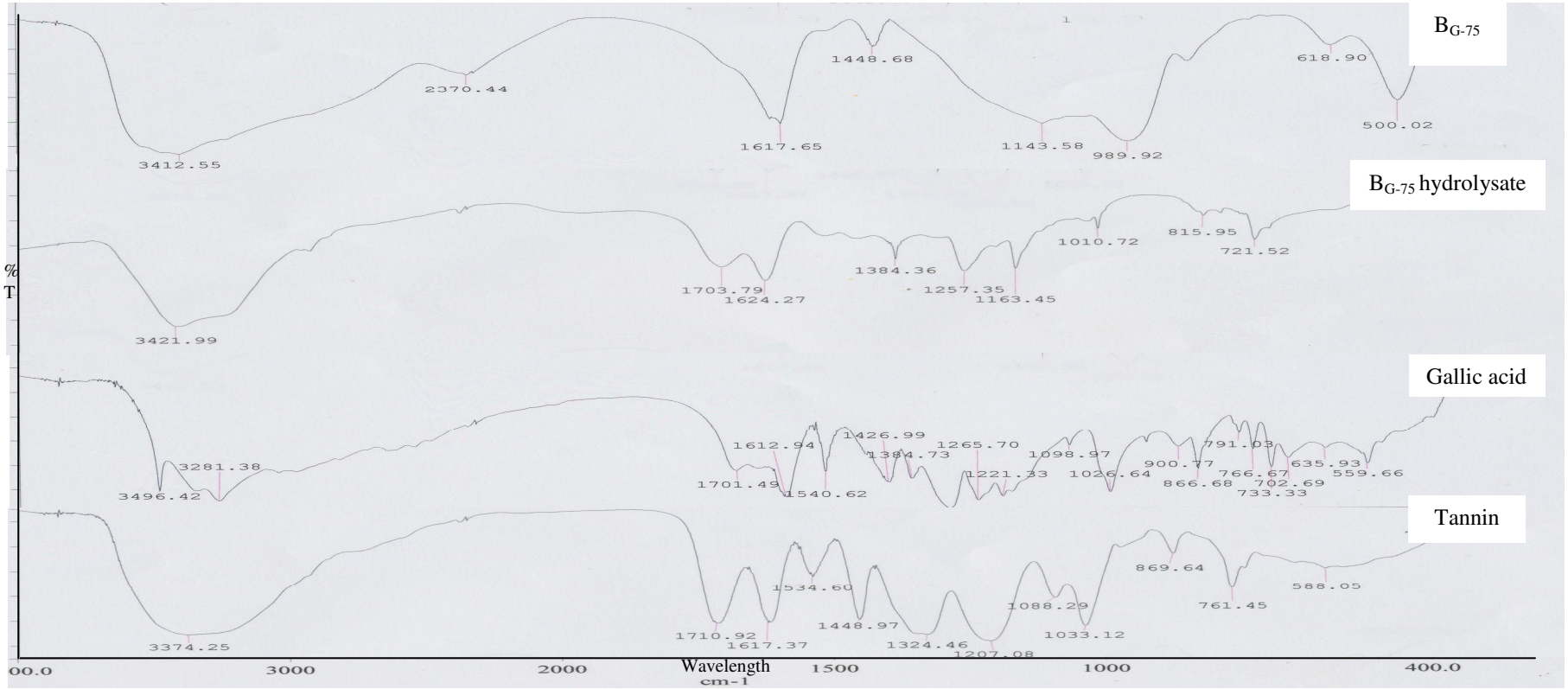
ในตัวอย่าง B_{G-75}แสดงพีคของหมู่ฟังก์ชันนัล O-H stretching ที่ย่านความถี่ 3412.55 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล benzene (substitution pattern region) ที่ย่านความถี่ 1617.65 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล C-C stretching (aromatic compound) ที่ย่านความถี่ 1448.68ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล C-H bending (aromatic substitution) ที่ย่านความถี่ 875.52 ซม$^{-1}$

ในสารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysate แสดงพีคของหมู่ฟังก์ชันนัล O-H stretching ที่ย่านความถี่ 3421.99 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล benzene (substitution pattern region) ที่ย่านความถี่ 1703.79 ซม$^{-1}$และ 1624.27 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล C=C stretching (aromatic compound) ที่ย่านความถี่ 1516.08 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล O-H bending (phenol) และ C-O stretching (phenol) ที่ย่านความถี่ 1384.36 ซม$^{-1}$หมู่ฟังก์ชันนัล C-H bending (aromatic substitution) ที่ย่านความถี่ 815.95 ซม$^{-1}$

ในสารมาตรฐาน gallic acid แสดงพีคของหมู่ฟังก์ชันนัล O-H stretching ที่ย่านความถี่ 3281 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล benzene (substitution pattern region) ที่ย่านความถี่ 1701.49 ซม$^{-1}$ และ 1612.94 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล C=C stretching (aromatic compound) ที่ย่านความถี่ 1540.62 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล O-H bending (phenol) และ C-O stretching (phenol) ที่ย่านความถี่ 1384.73 ซม$^{-1}$ และ 1317.29 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล C-H bending (aromatic substitution) ที่ย่านความถี่ 866.68 ซม$^{-1}$

ในสารมาตรฐาน tannin แสดงพีคของหมู่ฟังก์ชันนัล O-H stretching ที่ย่านความถี่ 3374.25 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล benzene (substitution pattern region) ที่ย่านความถี่ 1710.92 ซม$^{-1}$ และ 1617.37 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล C=C stretching (aromatic compound) ที่ย่านความถี่ 1534.60 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล C-C stretching (aromatic compound) ที่ย่านความถี่ 1448.97 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล O-H bending (phenol) และ C-O stretching (phenol) ที่ย่านความถี่ 1324.46 ซม$^{-1}$ และ 1207.08 ซม$^{-1}$ หมู่ฟังก์ชันนัล C-H bending (aromatic substitution) ที่ย่านความถี่ 869.64 ซม$^{-1}$ และ 761.45 ซม$^{-1}$

ดังนั้นสารยับยั้งอะไมเลสจากตัวอย่าง B_{G-75} และ B_{G-75} hydrolysate น่าจะมีหมู่ฟังก์ชันนัล ดังนี้ benzene ring, O-H, C=C, C-C, C-H และ C-O ตามลำดับ



รูปที่ 10 อินฟราเรดสเปคตรัมของตัวอย่าง B_{G-75} และ สารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysateจากน้ำยางกล้วย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และ tannin ที่ช่วงความยาวคลื่น 400 ─ 4000 ซม$^{-1}$ (ดูภาพขยายแต่ละตัวอย่างในภาคผนวกภาพ B1-B4)

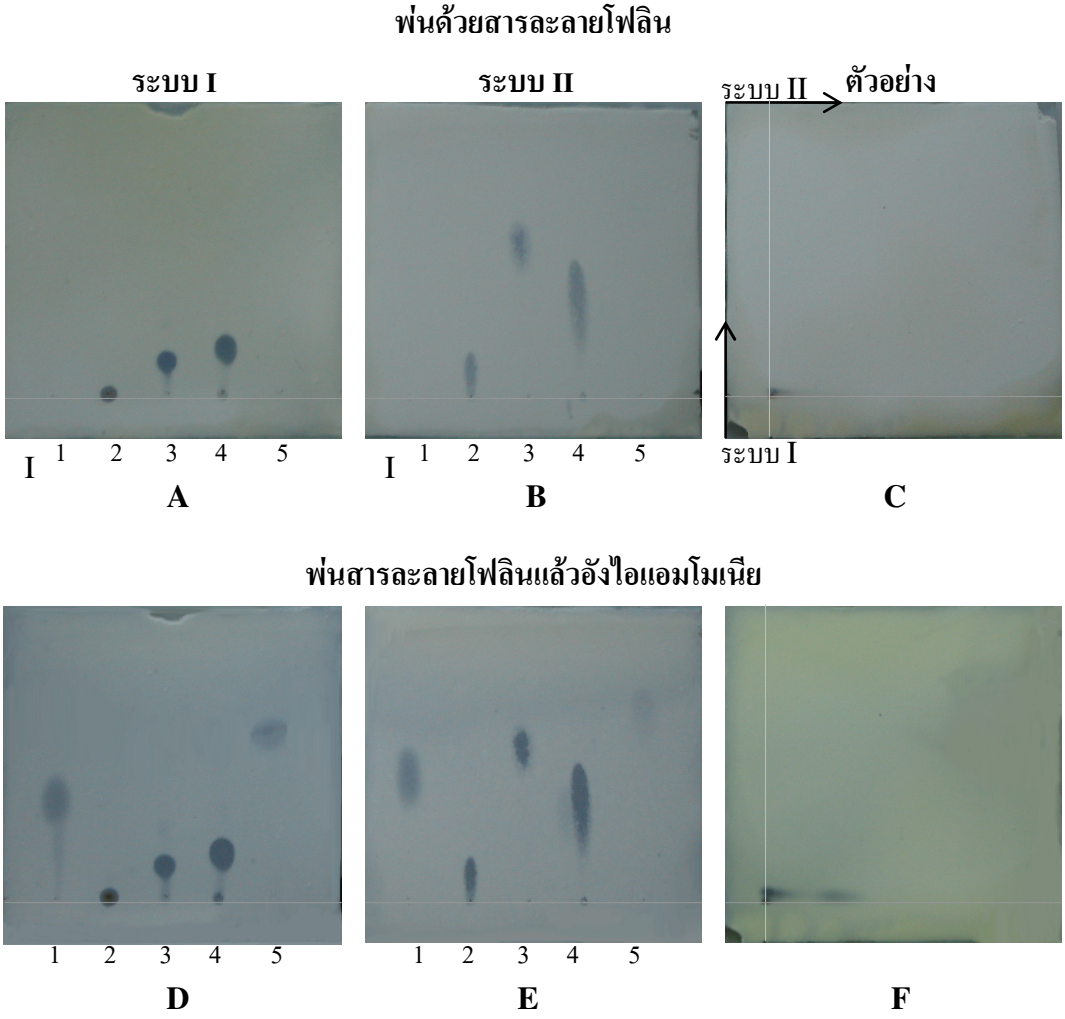
1.6.6 การจำแนกสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

ผลการจำแนกสารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} ที่ผ่านการย่อยด้วยกรด 6M HCl บนแผ่น TLC แบบ 2 ทิศทางพบว่า ปรากฏจุดสีน้ำเงิน-ดำ ขึ้นหลังจากพ่นสารละลายโฟลิน มีค่า R_f ในระบบที่ 1 และ 2 เท่ากับ 0.05 และ 0.15 ตามลำดับ ดังรูปที่ 11 C

เมื่อนำแผ่น TLC หลังพ่นโฟลิน มาอังไอแอมโมเนียและผึ่งแห้งปรากฏจุดเพิ่มอีก 1 จุด ในตำแหน่ง R_f ของระบบที่ 1 และ 2 เท่ากับ 0.05 และ 0.3 ตามลำดับ ดังรูปที่ 11F ผลการจำแนกสารมาตรฐานในแต่ละระบบเป็นดังนี้

ระบบที่ 1 หลังพ่นโฟลิน gallic acid R_f= 0.05, hydroquinone R_f = 0.20, 2,5-dihydroxybenzoic acid R_f = 0.25 ดังรูป 11 A หลังอังไอแอมโมเนีย hydroxybenzoic acid R_f= 0.40 และ salicylic acid R_f = 0.70 ดังรูป 11 D

ระบบที่ 2 หลังพ่นโฟลิน gallic acid R_f = 0.20, hydroquinone R_f = 0.60, 2,5-dihydroxybenzoic acid R_f = 0.50 ดังรูปที่ 11 B หลังอังไอแอมโมเนีย hydroxybenzoic acid R_f = 0.50 และ salicylic acid R_f =0.80 ดังรูปที่ 11 E



รูปที่ 11 การจำแนกสารตัวอย่าง B_{G-75} hydrolysate โดยวิธี TLC

ระบบ I = ระบบตัวทำละลายที่ 1 ประกอบด้วย acetic acid : chloroform (1:9 v/v)

ระบบ II = ระบบตัวทำละลายที่ 2 ประกอบด้วย ethyl acetate : benzene (9:11 v/v)

สารมาตรฐานที่ใช้คือ 1= hydroxybenzoic acid, 2 = gallic acid, 3 = hydroquinone, 4 = 2, 5-dihydroxy benzoic acid และ 5 = salicylic acid

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือ สารสกัดอีเทอร์ของ B_{G-75} hydrolysate

ส่วนที่ 2 น้ำยางมะละกอ

2.1 เปรียบเทียบวิธีการเตรียมน้ำยางมะละกอเพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด

เพื่อคัดเลือกวิธีการเตรียมน้ำยางมะละกอเพื่อให้ได้สารสกัดที่ให้กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงที่สุดโดยเปรียบเทียบวิธีการเก็บน้ำยางมะละกอผสมกับสารละลายต่างๆ 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น สารละลาย methyl methanethio sulfonate (MMTS) และบัฟเฟอร์ A โดยใช้สัดส่วน 1:1 (v/v) นำส่วนใสที่ได้หลังการเซนตริฟิวส์มาทดสอบกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3 พบว่าส่วนใสที่ได้จากน้ำยางมะละกอผสมกับน้ำกลั่นให้กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมกับสารอื่น ๆ แต่ค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังตารางที่ 5 ดังนั้นจึงเลือกวิธีดังกล่าวเพื่อเก็บน้ำยางมะละกอไปใช้สกัดสารยับยั้งอะไมเลสต่อไป

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางมะละกอที่เก็บผสมสารต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ร้อยละการยับยั้ง*	หน่วยการยับยั้ง* (AI unit)
น้ำยางมะละกอ + น้ำกลั่น	30.70 ± 5.87	0.19 ± 0.04
น้ำยางมะละกอ + MMTS	22.72 ± 3.56	0.14 ± 0.02
น้ำยางมะละกอ + บัฟเฟอร์ A	25.57 ± 0.23	0.16 ± 0.00

*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (เก็บน้ำยางมะละกอจากต้นครั้งเดียวและทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำในหลอดทดลอง)

2.2 เปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากสารสกัดน้ำยางมะละกอ (P) ที่ได้จากมะละกอ 4 ต้น

เพื่อศึกษาความแปรผันของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสระหว่างมะละกอแต่ละต้นจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสจากมะละกอ 4 ต้น โดยเก็บน้ำยางมะละกอจาก 4 ต้น เพื่อนำไปสกัดสารยับยั้งอะไมเลสและนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสในหน่วย ค่าการยับยั้งจำเพาะที่การยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 40 (ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดยางมะละกอไม่ถึงร้อยละ 50) พบว่าสารสกัดน้ำยางมะละกอ จากมะละกอทั้ง 4 ต้นให้ค่าการยับยั้งจำเพาะ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ) ดังนี้ 0.341± 0.066, 0.362± 0.008, 0.408± 0.050 และ 0.296± 0.010 สำหรับมะละกอต้นที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าค่าการยับยั้งจำเพาะของสารสกัดน้ำยางมะละกอจากมะละกอทั้ง 4 ต้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05

ดังนั้นจึงทำการเก็บน้ำยางมะละกอจาก 4 ต้นดังกล่าว โดยเก็บน้ำยางรวมกันเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.3 ผลของร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นสารยับยั้งอะไมเลสจากสารสกัดน้ำยางมะละกอ

นำสารสกัดน้ำยางมะละกอซึ่งได้จากการรวมน้ำยาง 4 ต้นจากผลการทดลองข้อ 2.2 เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัว 0, 40, 60 และ 80 ตามลำดับ ตรวจวัดกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส หาปริมาณโปรตีน และคำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ (specific inhibitory activity) เพื่อคัดเลือกความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด จากการทดลองพบว่าที่ร้อยละความอิ่มตัว 80 จะให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด ดังตารางที่ 6 ดังนั้นจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัว 80 เพื่อตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดน้ำยางมะละกอในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 6 กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวต่าง ๆ

%ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AI unit)	มก. โปรตีน*	ค่าการยับยั้งจำเพาะ* (AI unit / มก.โปรตีน)
0	0.21± 0.00	1.33± 0.00	0.16± 0.00
40	0.07 ± 0.01	1.03 ± 0.04	0.06 ± 0.00
60	0.28 ± 0.05	1.12 ± 0.01	0.25 ± 0.04
80	0.38 ± 0.04	1.27 ± 0.06	0.30 ± 0.04

*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ตกตะกอน 3 ครั้ง และวิเคราะห์ 1 ซ้ำในหลอดทดลอง)

2.4 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางมะละกอ

2.4.1 เตรียมสารสกัดน้ำยางมะละกอ

เก็บน้ำยางมะละกอมา 50 กรัม โดยรวมน้ำยางจากมะละกอทั้ง 4 ต้นจากการทดลองในข้อ 2.2 เตรียมสารสกัดน้ำยางมะละกอตามวิธีการทดลองข้อ 2.2 ได้สารสกัดน้ำยางมะละกอ (P) ปริมาตร 60 มล. นำไปตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสที่ pH 6.9 อุณหภูมิ 37°ซ โดยใช้น้ำแป้งร้อยละ 0.2 เป็นสับสเตรท พบว่า มีกิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด (total inhibitory activity) คิดเป็น 168.09 หน่วย (AI unit) มีปริมาณโปรตีน 810.78 มก. คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะของสารยับยั้งเท่ากับ 0.21 หน่วย/มก.โปรตีน (ทุกค่าที่ได้คำนวณจากค่าการยับยั้งอะไมเลสที่ร้อยละ 40) ดังแสดงในตารางที่ 7

2.4.2 การตกตะกอนโปรตีนในสารสกัดน้ำยางมะละกอด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารสกัดน้ำยางมะละกอ จากผลการทดลองข้อ 2.4.1 ปริมาตร 50 มล. มีโปรตีน 730 มก. มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 นำตะกอนที่ได้มาละลายคืนปริมาตรด้วย buffer A และหลังจากนำไปไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน และค่าการยับยั้งจำเพาะที่การยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสร้อยละ 40 พบว่าตะกอนที่ได้มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 441.53 มก. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด 108.55 หน่วยหรือ ได้ผลผลิตกลับคืน(% yield) ร้อยละ 64.58 คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 0.25 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.19 เท่าจากขั้นตอนเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 7

2.4.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ Sephadex G-75

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 6 มล. มีโปรตีน 183.6 มก. มาผ่านคอลัมน์ (ขนาด 110 x 1.3 ซม.) ซึ่งบรรจุด้วย Sephadex G-75 ชะคอลัมน์ด้วย buffer A ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 2.9.3.1 พบว่าโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค ดังรูปที่ 12 ซึ่งสารยับยั้งอะไมเลสจะออกมาในพีคแรก นำสารละลายเฉพาะหลอดที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสมารวมกัน (หลอด 52 ถึง 75) และทำเข้มข้นโดยใช้เครื่อง freeze dryer ได้สารแห้งเป็นผง จากนั้นละลายกลับด้วย buffer A

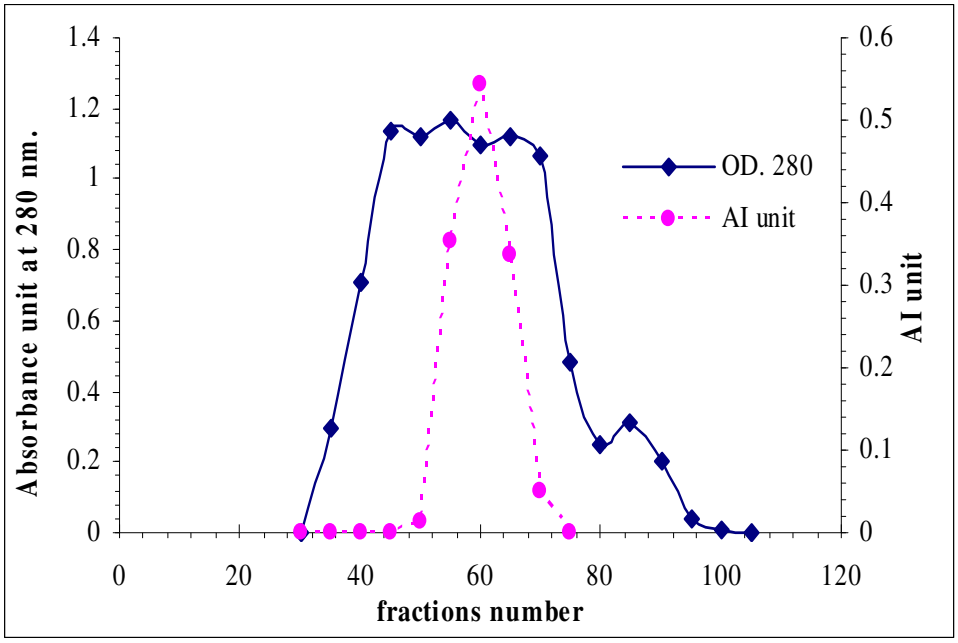
ปริมาตร 5 มล. (ได้สารละลายเรียก P_{G-75}) เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน และค่าการยับยั้งจำเพาะที่การยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสร้อยละ 40 พบว่าปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 271.25 มก. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด 93.3 หน่วย ได้ผลผลิตกลับคืน ร้อยละ 55.51 คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 0.344 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.66 เท่า จากขั้นตอนเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 7

2.5 น้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจากสารสกัดน้ำยางมะละกอโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น

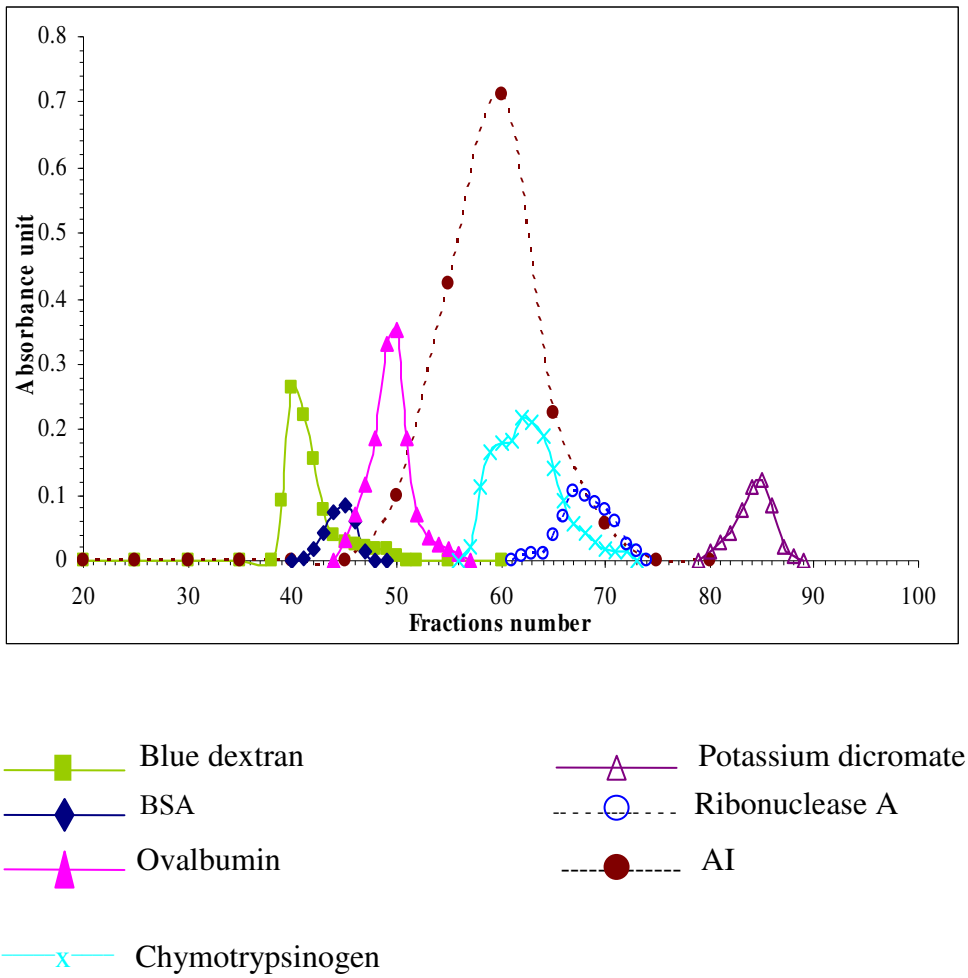
การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลส โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น คอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีในข้อ 2.10 พบว่าโปรตีนที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสถูกชะออกมาที่ค่า K_{av} 0.44 ดังรูปที่ 13 และเมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่า log น้ำหนักโมเลกุล กับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสได้เท่ากับ 24,380 ดาลตัน ดังรูปที่ 14

ตารางที่ 7 ผลการทำบริสุทธิ์ขั้นตอนต่างๆของสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางมะละกอ

Step	Total inhibitory activity (AI unit)	Total protein (mg)	Specific inhibitory activity (AI unit / mg. protein)	Yield (%)	Purification (Fold)
Papaya latex extract	168.09	810.78	0.207	100	1.00
80%$(NH_4)_2SO_4$	108.55	441.53	0.246	64.58	1.19
Sephadex G-75	93.30	271.25	0.344	55.51	1.66

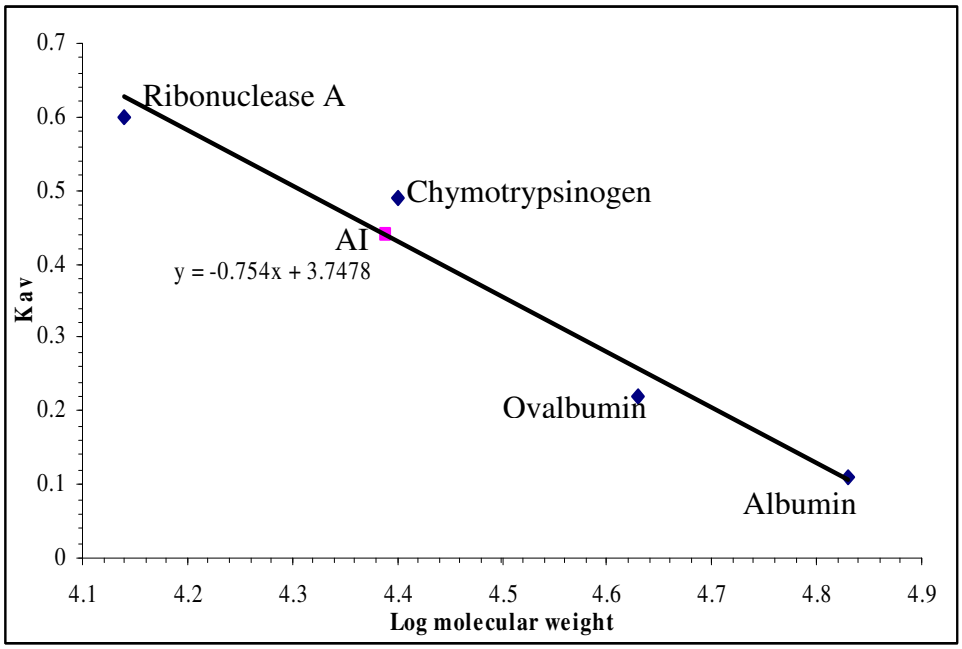


รูปที่ 12 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางมะละกอโดยคอลัมน์ Sephadex G-75 การแยกตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนสารสกัดน้ำยางมะละกอด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด120 x1.3 ซม. และชะคอลัมน์ด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9-0.01 M NaCl เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ด้วยอัตราการไหล 10 มล./ชม. ที่อุณหภูมิ 4°ซ ติดตามการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส รวมสารละลายหลอดที่ 52 ถึง 75 ทำแห้งด้วย freeze dryer เพื่อละลายกลับสำหรับใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 13 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจาก น้ำยางมะละกอ ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

คอลัมน์ชะด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9-0.01 M NaCl อัตราการไหล 10 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน blue dextran และ potassium dichromate ที่ความยาวคลื่น 280, 620 และ 480 นาโนเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางมะละกอที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75

แกน x : log molecular weight ของโปรตีนมาตรฐาน

แกน y : ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient, K_{av}) ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด

2.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์

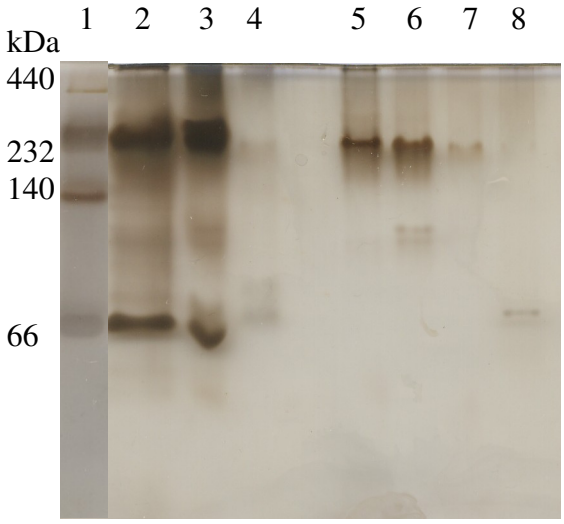
2.6.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสโดยโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ

นำสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางมะละกอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ มาศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วย Native-PAGE ที่มีความเข้มข้นเจล 10% หลังจากย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ พบแถบโปรตีนหลายแถบในสารสกัดน้ำยางมะละกอแต่แถบโปรตีนจะลดลงเมื่อนำตัวอย่างผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ดังรูปที่ 15 และ 16A โดยมีช่วงของขนาดโมเลกุลตั้งแต่ เล็กกว่า 66 kDa ไปจนถึงใหญ่กว่า 230 kDa ผลที่ได้นี้ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าแถบโปรตีนใดเป็นสารยับยั้งอะไมเลส

2.6.2 การตรวจสอบกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสโดยโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ Starch-PAGE

นำตัวอย่าง P_{G-75} มาตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสด้วย Starch-PAGE ที่มีความเข้มข้นเจล 10% หลังจากย้อมเจลด้วยสารละลายไอโอดีน พบแถบสีน้ำเงินของสารยับยั้งอะไมเลสที่มีขนาดประมาณ 60 kDa ดังรูปที่ 16B

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการผ่านคอลัมน์จากผลการทดลองข้อ 2.4.3 หลอดที่ 50 มาตรวจสอบแบบแผนโปรตีนด้วย Native-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10%) หลังจากย้อมเจลด้วยซิล-เวอร์พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งตรงกับตำแหน่งของสารยับยั้งอะไมเลส (รูปที่16 C) และเมื่อนำไปทดสอบ Starch-PAGE พบแถบสีน้ำเงินของสารยับยั้งอะไมเลสตำแหน่งเดียวกับแถบสีน้ำเงินจากสารละลาย P_{G-75} (รูปที่16D) จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงว่าสารละลายที่ได้จากคอลัมน์หลอดที่ 50 เป็นสารยับยั้งอะไมเลสและมีความบริสุทธิ์ จึงนำสารดังกล่าวทดสอบหาขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE ต่อไป



รูปที่ 15 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) ที่ 10% เจล ของขั้นตอนต่างๆในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางมะละกอโดยย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์

แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาดโมเลกุลใหญ่

แถวที่ 2 สารสกัดน้ำยางมะละกอ มีโปรตีน 1 μg

แถวที่ 3 ตะกอนโปรตีนจากสารสกัดน้ำยางมะละกอ มีโปรตีน 1 μg

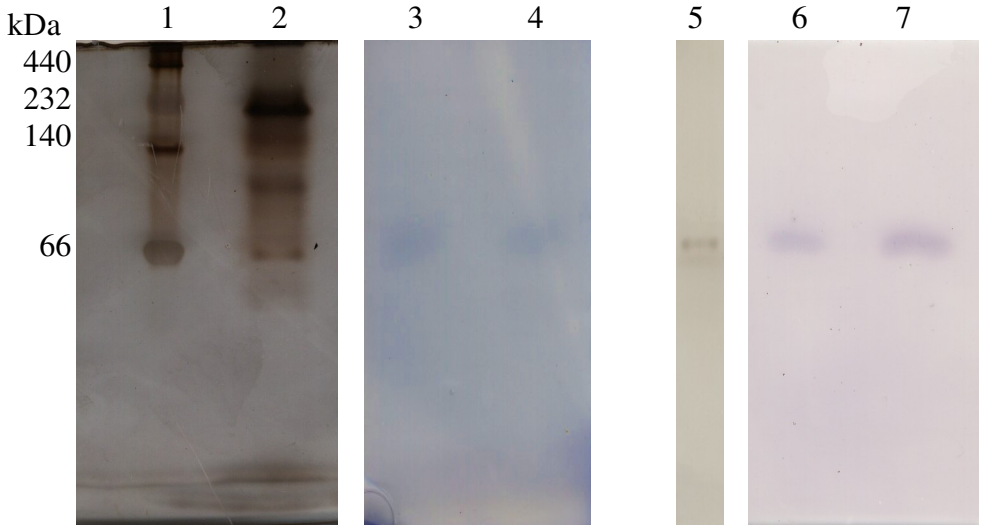
แถวที่ 4 สารละลาย AI ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 (P_{G-75}) มีโปรตีน 1 μg

แถวที่ 5 สารละลายที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 หลอดที่ 35

แถวที่ 6 สารละลายที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 หลอดที่ 40

แถวที่ 7 สารละลายที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 หลอดที่ 45

แถวที่ 8 สารละลายที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 หลอดที่ 50



รูปที่ 16 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) และแบบ Starch-PAGE

A. Native – PAGE ความเข้มข้นเจล 10% ย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาดโมเลกุลใหญ่ (แถวที่ 1)
สารละลายตัวอย่าง P_{G-75}ปริมาณโปรตีน 10 μg (แถวที่ 2)

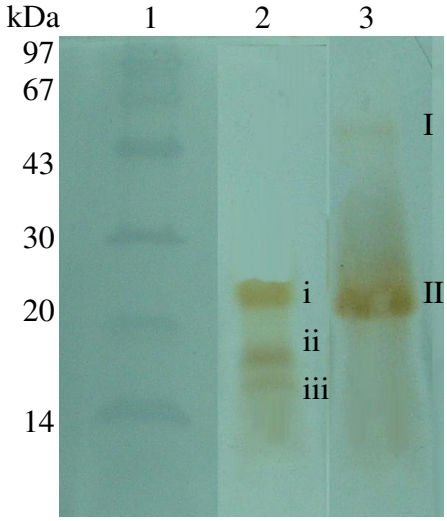
B. Starch-PAGE ความเข้มข้นเจล 10% ผสมน้ำแป้ง 0.1% ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนของสารละลายตัวอย่าง P_{G-75} ปริมาณโปรตีน 10 μg พบแถบสีน้ำเงินของสารยับยั้งอะไมเลส (แถวที่ 3 และ 4)

C. Native–PAGE ความเข้มข้นเจล 10% ย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์ของสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 หลอดที่ 50 โปรตีน 10 μg (แถวที่ 5)

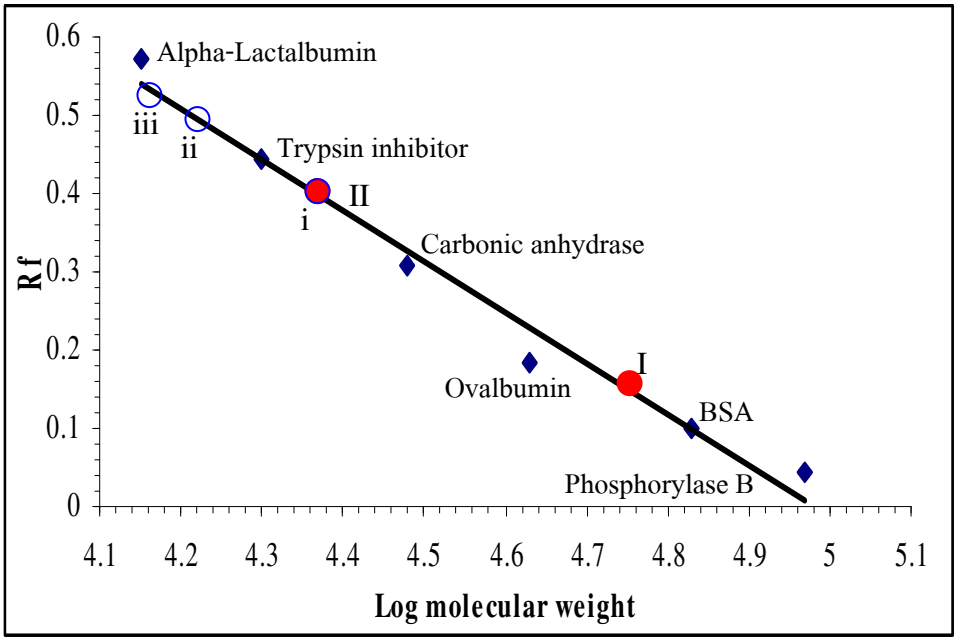
D. Starch–PAGE ของสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 หลอดที่ 50 โปรตีน 10 μg พบแถบสีน้ำเงินของสารยับยั้งอะไมเลส (แถวที่ 6 และ 7)

3.7 หาขนาดโมเลกุลย่อยของสารยับยั้งอะไมเลสโดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพระบบไตรซีน (Tricine SDS-PAGE)

นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์หลอดที่ 50 ที่ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย Native–PAGE และแสดงโปรตีนเพียงแถบเดียวดังผลการทดลองข้อ 2.6.2 ไปหาขนาดโมเลกุล (15 ไมโครลิตร) ผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างที่มี และไม่มี β-mercaptoethanol (5 ไมโครลิตร) นำไปต้มที่ 100°ซ นาน 5 นาที จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพ ระบบ Tricine SDS-PAGE ที่มีความเข้มข้นเจล 14-17 % หลังย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์พบแถบโปรตีนดังนี้
ตัวอย่างที่ผสม β-mercaptoethanol พบแถบโปรตีน 3 แถบ ขนาด 23,857 ดาลตัน 16,723 ดาลตัน และ 14,715 ดาลตัน ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่ไม่ผสม β-mercaptoethanol ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ ขนาด 55,185 ดาลตัน และ 23,857 ดาลตัน ตามลำดับ (รูปที่ 17) โดยเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของแถบโปรตีนตัวอย่างกับกราฟระหว่างค่า R_f ของแถบโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 17 แบบแผนโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลส (AI) จากน้ำยางมะละกอ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพที่ความเข้มข้นเจล 14-17 % ย้อมโปรตีนด้วยซิลเวอร์
แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาดโมเลกุลเล็ก
แถวที่ 2 สารละลาย P_{G-75} หลอดที่ 50 โปรตีน 5 μg ที่ผสมบัฟเฟอร์ตัวอย่าง ที่มี β-mercaptoethanol โดยที่ i, ii, iii แทนโปรตีนแถบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ
แถวที่ 3 สารละลาย P_{G-75} หลอดที่ 50 โปรตีน 5 μg ที่ผสมบัฟเฟอร์ตัวอย่าง ที่ไม่มี β-mercaptoethanol โดยที่ I และ II แทนโปรตีนแถบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



● AI จากตัวอย่างที่ไม่ได้ผสม Mercaptoethanol (I and II)

○ AI จากตัวอย่างที่ผสม Mercaptoethanol (i, ii and iii)

รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางมะละกอโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพที่ความเข้มข้นเจล 14-17 %
แกน x : log molecular weight ของโปรตีนมาตรฐาน
แกน y : ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด (R_f)

ส่วนที่ 3 น้ำยางพารา

3.1 เปรียบเทียบวิธีการเตรียมน้ำยางพาราเพื่อให้ได้ C-serum ที่มีการยับยั้งสูงสุด

เพื่อคัดเลือกวิธีการเตรียมน้ำยางพาราที่ให้ C-serum ที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงที่สุด ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมน้ำยางพาราสด 3 วิธีคือ

1. เก็บน้ำยางพาราสดอย่างเดียว
2. เก็บน้ำยางพาราสดผสมกับ glycerinated buffer ตามวิธีของ Akasawa และคณะ (1995) แต่ไม่เติม glycerol หลังแยก C-serum
3. เก็บน้ำยางพาราสดผสมกับ glycerinated buffer และเติม glycerol ใน C-serum (1:1 v/v)

หลังนำมาทดสอบกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีทดลองในข้อ 1.3 พบว่า C-serum ที่แยกจากน้ำยางสดอย่างเดียว ให้กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 (โปรแกรม SPSS ใช้ One-Way ANOVA และ LSD test) ดังตารางที่ 8 จึงเลือกวิธีดังกล่าวเพื่อเตรียมน้ำยางพาราไว้ศึกษาต่อไป

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบวิธีการเตรียมน้ำยางพาราทั้ง 3 วิธี

ตัวอย่าง	ร้อยละการยับยั้ง*	หน่วยการยับยั้ง* (AI unit)
น้ำยาง	79.98 ± 3.03^{a}	0.14 ± 0.01^{a}
น้ำยาง+ glycerinated buffer	9.93 ± 5.97^{b}	0.02 ± 0.01^{b}
น้ำยาง+ glycerinated buffer+ glycerol	14.55 ± 5.01^{b}	0.03 ± 0.01^{b}

*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (เก็บน้ำยางพาราจากต้นครั้งเดียว และทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำในหลอดทดลอง)

a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p-value < 0.05

3.2 เปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจาก C-serum ที่ได้จากน้ำยางพารา 4 ต้น

เพื่อศึกษาความแปรผันของปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสระหว่างต้นยางพาราจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสจากยางพารา 4 ต้น โดยเก็บน้ำยางพาราแยก C-serum หาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส มิลลิกรัมโปรตีน และ ค่าการยับยั้งจำเพาะที่การยับยั้งอะไมเลส ร้อยละ 50 พบว่า C-serum จากน้ำยางพาราทั้ง 4 ต้นให้ค่าการยับยั้งจำเพาะ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน

มาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งเดียว) ดังนี้ 0.848± 0.046, 0.638± 0.026, 0.697± 0.025 และ 0.704± 0.009 สำหรับยางพาราต้นที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าค่าการยับยั้งจำเพาะของ C-serum จากยางพาราต้นที่ 1 มีความแตกต่างกับ อีก 3 ต้นที่เหลือ ในขณะที่ค่าการยับยั้งจำเพาะจากยางพารา 3 ต้นดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05

ดังนั้นจึงทำการเก็บจากต้นยางพาราจาก 3 ต้นที่มีค่าการยับยั้งจำเพาะไม่แตกต่างกันในการศึกษาเรื่องต่างๆต่อไป

3.3 ผลของร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นสารยับยั้งอะไมเลสจาก C-serum

นำ C-serum ซึ่งได้จากการรวมน้ำยาง 3 ต้นที่คัดเลือกจากผลการทดลองข้อ 1.2 เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัว 0, 20, 40, 60 และ 80 ตามลำดับ เซนตริฟิวส์ นำตะกอนไปตรวจวัดกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส หาปริมาณโปรตีน และคำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ เพื่อคัดเลือกความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด จากการทดลองพบว่าที่ร้อยละความอิ่มตัว 80 ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด ดังตารางที่ 9 ดังนั้นจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัว 80 เพื่อตกตะกอนโปรตีนจาก C-serum ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 9 กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของตะกอนโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวต่างๆ

%ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AI unit)	มก. โปรตีน*	ค่าการยับยั้งจำเพาะ* (AI unit / มก.โปรตีน)
0	0.46± 0.00	0.77± 0.00	0.60± 0.00
40	0.06 ± 0.06	0.49 ± 0.04	0.12 ± 0.11
60	0.46 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.73 ± 0.04
80	0.48 ± 0.00	0.48 ± 0.03	1.00 ± 0.08

*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (ตกตะกอน 3 ครั้ง และวิเคราะห์ 1 ซ้ำในหลอดทดลอง)

3.4 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจาก C-serum

3.4.1 เตรียม C-serum น้ำยางพารา

เก็บน้ำยางพาราสดโดยรวมน้ำยางจาก 3 ต้นที่เลือกจากผลการทดลองในข้อ 1.2 ได้น้ำยาง 950 มล. เตรียม C-serum ตามวิธีการทดลองในข้อ 1.2 ได้ C-serum ปริมาตร 153 มล. นำไปตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสที่ pH 6.9 อุณหภูมิ 37°ซ โดยใช้น้ำแป้งร้อยละ 0.2 เป็นสับสเตรท พบว่า C-serum ก่อนการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ มีกิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด (total inhibitory activity) คิดเป็น 887.35 หน่วย (AI unit) มีปริมาณโปรตีน 1806.96 มก.) คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะของสารยับยั้งเท่ากับ 0.49 หน่วย/มก.โปรตีน (ทุกค่าที่ได้คำนวนจากค่าการยับยั้งอะ-ไมเลสที่ร้อยละ 50) ดังแสดงในตารางที่ 10

3.4.2 การตกตะกอนโปรตีนใน C-serum ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำ C-serum จากผลการทดลองข้อ 1.4.1 ปริมาตร 80 มล. มีโปรตีน 982.4 มก. มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 นำตะกอนที่ได้มาละลายคืนปริมาตรด้วย buffer A แล้วหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน และค่าการยับยั้งจำเพาะที่การยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสร้อยละ 50 พบว่าตะกอนที่ได้มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1326.41 มก. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด 847.86 หน่วยหรือ ได้ผลผลิตกลับคืน (% yield) ร้อยละ 95.55 คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 0.64 หน่วย / มก.โปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 10

3.4.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ Sephadex G-75

นำสารละลายที่ได้จากผลการทดลองข้อ 1.4.2 ปริมาตร 6.5 มล.มีโปรตีน 251.55 มก. มาผ่านคอลัมน์ (ขนาด 110 x 1.3 ซม.) ซึ่งบรรจุด้วย Sephadex G-75 ชะคอลัมน์ด้วย buffer A ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 1.9.3.1 พบว่าโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีคดังรูปที่ 19 ซึ่งสารยับยั้งอะไมเลสจะออกมาในพีคที่ 2 นำสารละลายเฉพาะหลอดที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสมารวมกัน (หลอด 130 ถึง 160) และทำเข้มข้นโดยใช้เครื่อง freeze dryer ได้สารแห้งเป็นผง จากนั้นละลายกลับด้วย buffer A ปริมาตร 5 มล. (ได้สารละลายเรียก C_{G-75}) เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป และนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน และค่าการยับยั้งจำเพาะที่การยับยั้ง

กิจกรรมอะไมเลสร้อยละ 50 พบว่าปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 44.11 มก. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด 503.40 หน่วย ได้ผลผลิตกลับคืน(% yield) ร้อยละ 56.73 คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 11.41 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 23.24 เท่า จากขั้นตอนเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 10

เมื่อหาขนาดโปรตีนของพีคที่ 2 โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานชนิดโมเลกุลขนาดเล็ก ตามวิธีการทดลองในข้อ 1.10 พบว่ามีขนาดประมาณ 1,200 ดาลตัน ดังนั้นจึงทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 ซึ่งมีความสามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลในช่วง 1,000-5,000 ดาลตัน

3.4.4 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์ Sephadex G-25

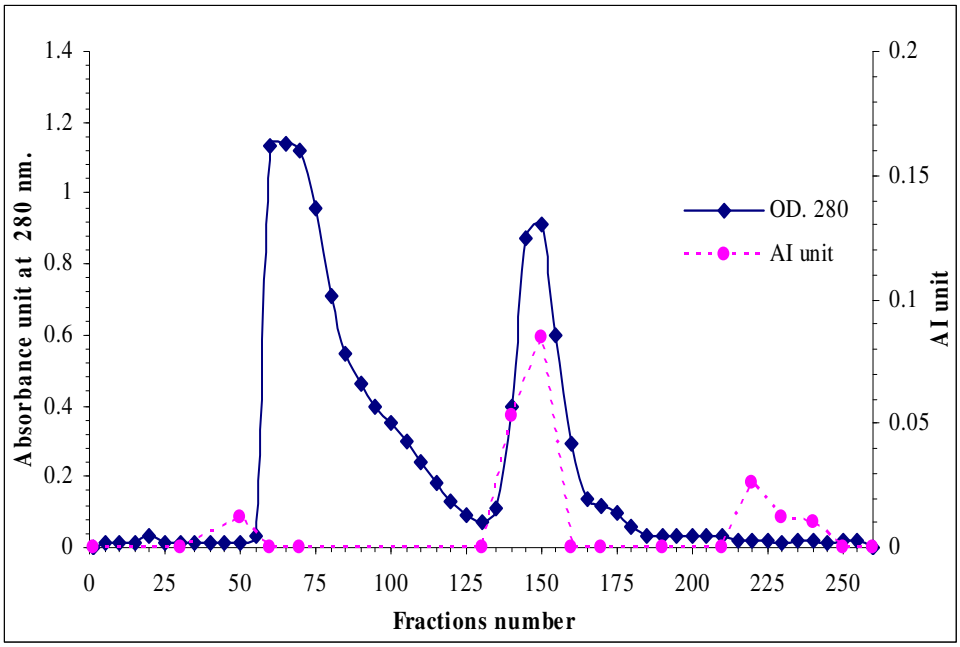
นำสารละลายที่ได้จากผลการทดลองข้อ 1.4.3 ปริมาตร 4.5 มล. มีปริมาณโปรตีน 6.93 มก. ผ่านคอลัมน์ (ขนาด 110 x 1.3 ซม.) ซึ่งบรรจุด้วย Sephadex G-25 ชะคอลัมน์ด้วย buffer A ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 1.9.3.2 พบว่าโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค ดังรูปที่ 20 สารยับยั้งอะไมเลสจะออกมาในพีคแรก รวมสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้ง และทำเข้มข้นด้วยการ freeze dry และละลายผงที่ได้กลับด้วย buffer A ปริมาตร 5 มล. หาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน และค่าการยับยั้งจำเพาะที่การยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสร้อยละ 50 พบว่าปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 13.10 มก. และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งทั้งหมด 201.86 หน่วย ได้ผลผลิตกลับคืน (% yield) ร้อยละ 22.75 คิดเป็นค่าการยับยั้งจำเพาะได้เท่ากับ 15.44 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 31.38 เท่าจากขั้นตอนเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 10

3.5 น้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจาก C-serum ในน้ำยางพาราโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น

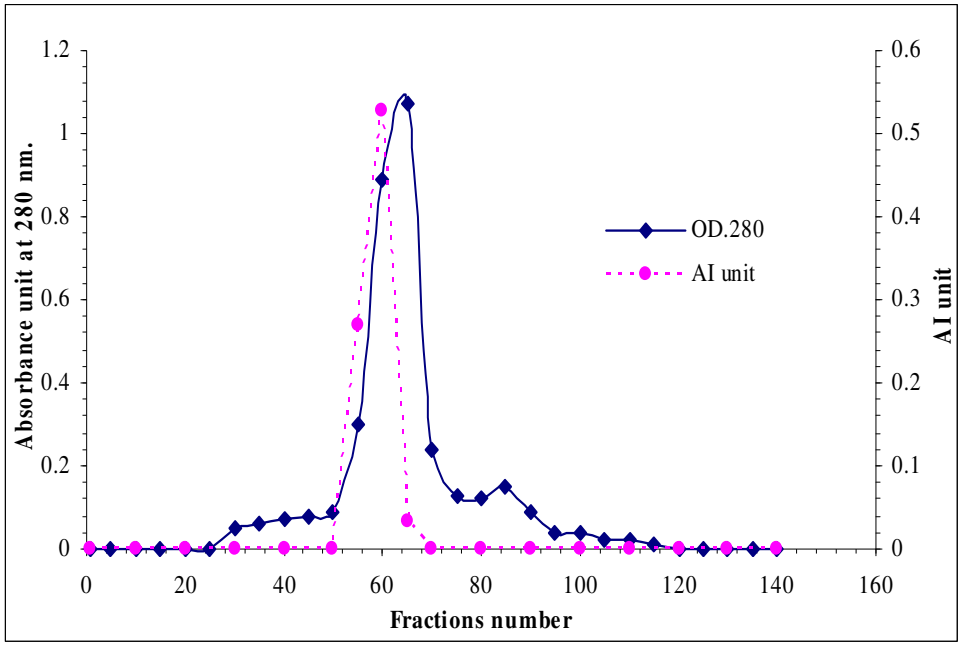
ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลส โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นคอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีในข้อ 1.10 พบว่าโปรตีนที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสถูกชะ ออกมาที่ค่า K_{av} 0.97 ซึ่งตรงกับตำแหน่งของ potassium dichromate ดังรูปที่ 21 และเมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่า log น้ำหนักโมเลกุล กับค่า K_{av}ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสได้เท่ากับ 1,200 ดาลตัน ดังรูปที่ 22

ตารางที่ 10 ผลการทำบริสุทธิ์ขั้นตอนต่างๆของสารยับยั้งอะไมเลสจาก C-serum ของน้ำยางพารา

Step	Total inhibitory activity (AI unit)	Total protein (mg)	Specific inhibitory activity (AI unit / mg. protein)	Yield (%)	Purification (Fold)
C-serum	887.35	1806.96	0.49	100	1.00
80% $(NH_4)_2SO_4$	847.86	1326.41	0.64	95.55	1.30
Sephadex G-75	503.40	44.11	11.41	56.73	23.24
Sephadex G-25	201.86	13.10	15.41	22.75	31.38

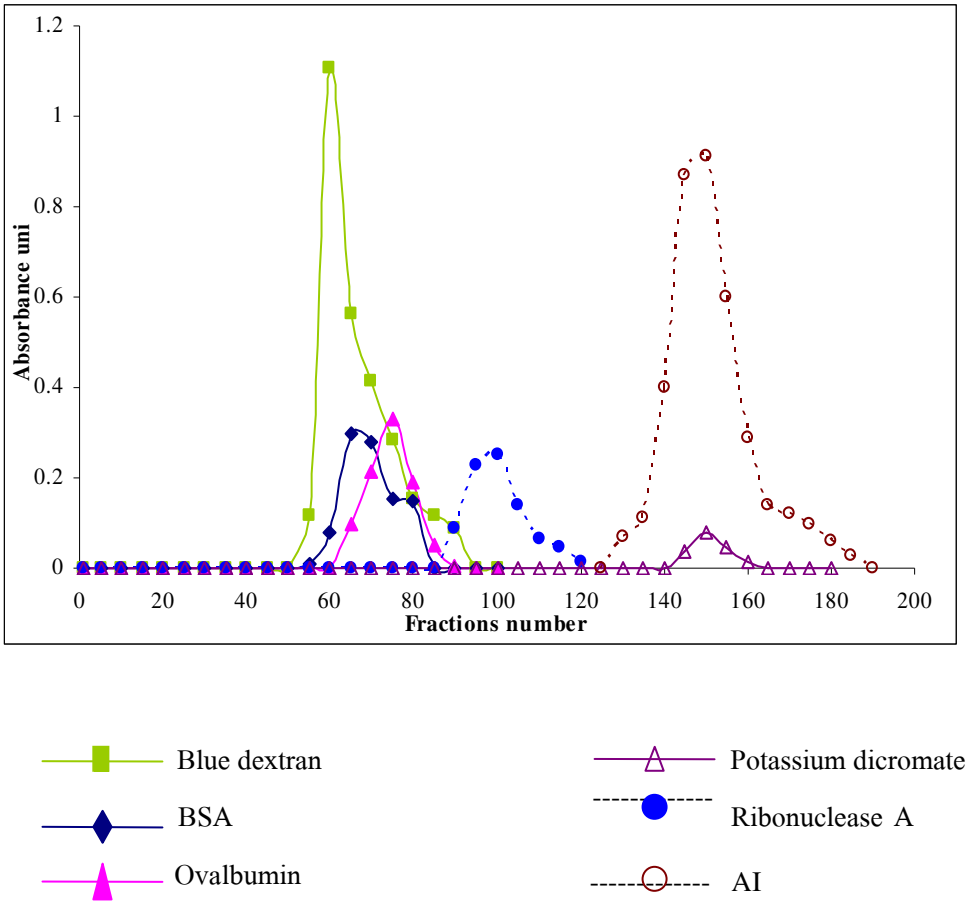


รูปที่ 19 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางพาราโดยคอลัมน์ Sephadex G-75 การแยกตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอน C-serum ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 110 x1.3 ซม. และชะคอลัมน์ด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9-0.01 M NaCl เก็บสารละลายหลอดละ 1 มล. ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. ที่อุณหภูมิ 4°ซ ติดตามการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส รวมสารละลายหลอดที่ 130 ถึง 160 ทำแห้งด้วย freeze dryer ละลายกลับเพื่อทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25



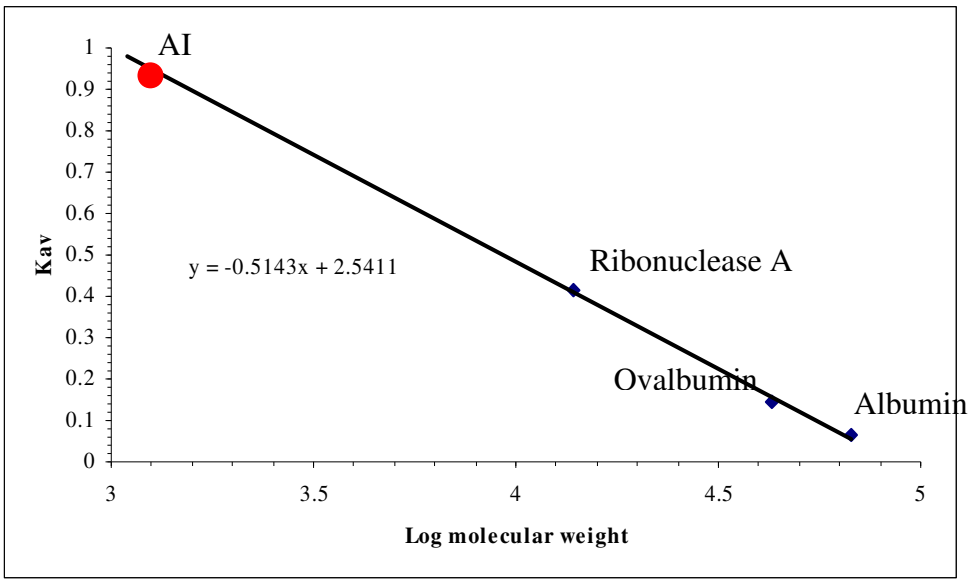
รูปที่ 20 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางพาราโดยคอลัมน์ Sephadex G-25

นำโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 มาทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 ขนาด 110 x1.3 ซม. และชะคอลัมน์ด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9-0.01 M NaCl เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. ที่อุณหภูมิ 4°ซ ติดตามการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส รวมสารละลายหลอดที่ 50 ถึง 65 ทำแห้งด้วย freeze dryer เพื่อละลายกลับสำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 21 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจาก C-serum ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

คอลัมน์ชะด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9-0.01 M NaCl อัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 1 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน blue dextran และ potassium dichromate ที่ความยาวคลื่น 280, 620 และ 480 นาโนเมตร ตามลำดับ



รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสจาก C-serum ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75

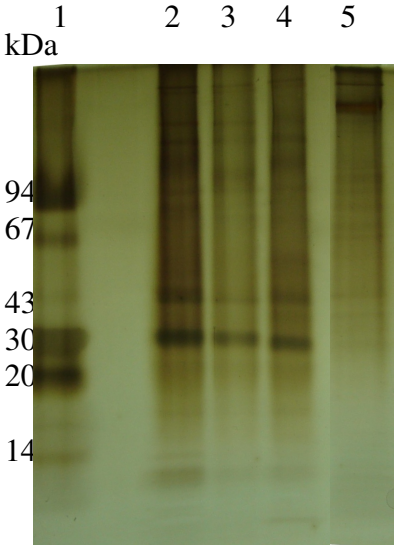
แกน x : log molecular weight ของโปรตีนมาตรฐาน

แกน y : ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient, K_{av}) ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด

3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์

3.6.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสโดยโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ

นำสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางพาราที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ มาศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วย Native-PAGE ที่มีความเข้มข้นเจล 10% หลังจากย้อมเจลด้วยซิลเวอร์พบแถบโปรตีนจำนวนมากใน C-serum แต่แถบโปรตีนจะลดลงเมื่อนำตัวอย่างผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 และ Sephadex G-25 ดังรูปที่ 23 และ 24A ตามลำดับ โดยในตัวอย่าง C_{G-25} จะมีช่วงของขนาดโมเลกุลตั้งแต่ เล็กกว่า 66 kDa ไปจนถึงใหญ่กว่า 400 kDa ผลที่ได้นี้ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าแถบโปรตีนใดเป็นสารยับยั้งอะไมเลส



รูปที่ 23 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) ที่ 10% เจล ของขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางพารา โดยย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์

แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาดโมเลกุลเล็ก

แถวที่ 2 C-serum โปรตีน 0.8 μg

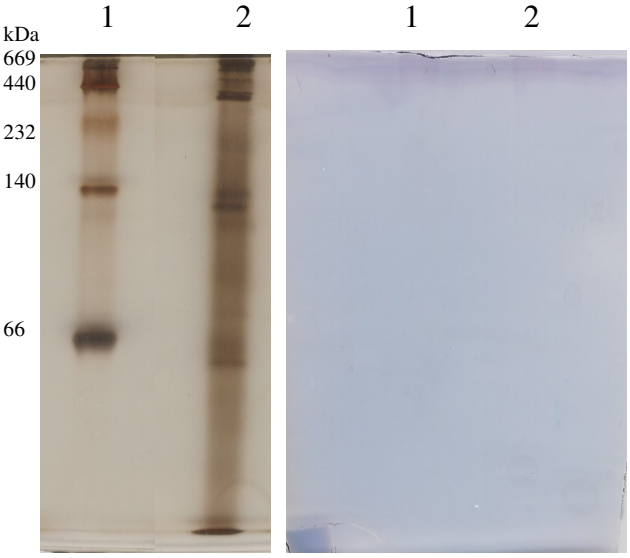
แถวที่ 3 C-serum โปรตีน 0.1 μg

แถวที่ 4 ตะกอนโปรตีนจาก C-serum (C_{80}) โปรตีน 0.1 μg

แถวที่ 5 สารละลาย AI ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 โปรตีน 0.1 μg

3.6.2 การตรวจสอบกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสโดยโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ-Starch-PAGE

นำตัวอย่าง C_{G-25} มาตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสด้วย Starch-PAGE ที่มีความเข้มข้นเจล 10% หลังจากย้อมเจลด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่าไม่ปรากฏแถบสีน้ำเงินของสารยับยั้งอะไมเลส ตามที่คาดหวังไว้ ดังรูปที่ 24B



รูปที่ 24 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพและแบบ Starch-PAGE ของสารละลาย C_{G-25} โดย

A. Native–PAGE ความเข้มข้นเจล 10% ย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์
แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาดโมเลกุลใหญ่
แถวที่ 2 สารละลายตัวอย่าง C_{G-25} ปริมาณโปรตีน 7.5 μg

B. Starch- PAGE ความเข้มข้นเจล 10% ผสมน้ำแป้ง 0.1% ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน
แถวที่ 1, 2 เป็นสารละลายตัวอย่าง C_{G-25} ปริมาณโปรตีน 7.5 μg ซึ่งไม่พบแถบสีน้ำเงินของสารยับยั้งอะไมเลส

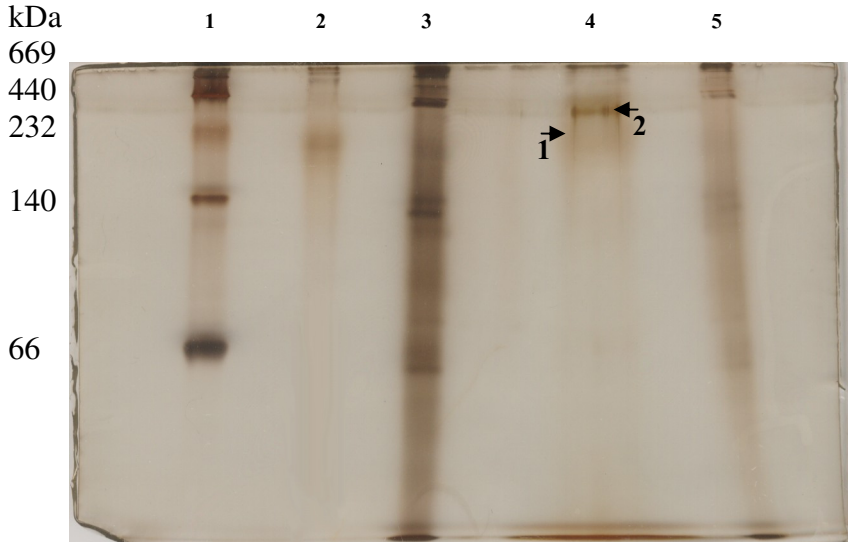
3.7 ขนาดโมเลกุลย่อยของสารยับยั้งอะไมเลส โดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพระบบไตรซีน

รูปที่ 25 แสดง Native–PAGE 10 % เจล ย้อมด้วยซิลเวอร์ ของตัวอย่างที่ปริมาตรวอยด์ (Vo) จาก Sephadex G-25 ขนาด 25 x 1.0 ซม. จากรูป พบแถบโปรตีน 2 แถบในแถว 4 ของตัวอย่างที่ปริมาตรวอยด์ (Vo) โดยแถบแรกมีขนาด 230 kDa ของอะไมเลส แถบที่สองขนาด 350 kDa ของสารยับยั้งอะไมเลส และแถวที่ 3 ของสารละลาย C_{G-25}

ผลงานของ ปิยวรรณ สิทธิพงศ์ (2548) สนับสนุนว่าการจับกันของเอนไซม์อะไมเลส กับสารยับยั้งอะไมเลส จากถั่วแดงสามารถแยกเป็น 2 แถบ ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ (รูป B5 ในภาคผนวก)

รูปที่ 26A แสดงความบริสุทธิ์ของโปรตีนสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากการตัดเจลตามวิธีในข้อ 3.12 โดย พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว แถบโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสในแถวที่ 4 (รูปที่ 25) ไม่น่าเป็นสารเชิงซ้อนระหว่างสารยับยั้งอะไมเลสและเอนไซม์อะไมเลส เนื่องจาก

1) ผล SDS-PAGE ในรูปที่ 26A ได้แถบโปรตีน 1 แถบ ขนาด 61,165 Da เมื่อเทียบกับค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 27) ทั้งตัวอย่างที่ผสม และไม่ผสม β-mercaptoethanol
2) งานวิจัยของ Wong 1995; Brena และคณะ 1996; Fisher และคณะ 2006 รายงานว่าเอนไซม์อะไมเลสมีขนาด 50 -57 kDa ใน SDS-PAGE



รูปที่ 25 แบบแผนโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางพาราในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ ที่ 10% เจล ย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์

โดยแต่ละตัวอย่างได้จากการชะคอลัมน์ Sephadex G-25 ด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9 - 0.01 M NaCl อัตราการไหล 15 มล./ชม.

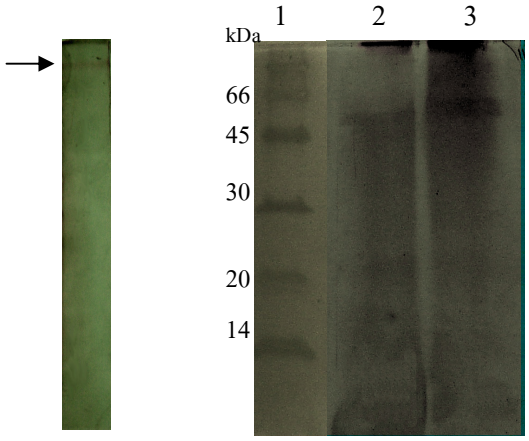
แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาดโมเลกุลใหญ่

แถวที่ 2 สารละลายเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณโปรตีน 0.4 μg

แถวที่ 3 สารละลาย C_{G-25} ปริมาณโปรตีน 7.5 μg

แถวที่ 4 สารละลายผสมอะไมเลสกับ C_{G-25} ที่ผ่านคอลัมน์ออกที่ปริมาตรวอยด์ (หลอดยอดพีคที่ 9) ปริมาณโปรตีน 1 μg

แถวที่ 5 สารละลายผสมอะไมเลสกับ C_{G-25} ที่ออกหลังปริมาตรวอยด์ (หลอดยอดพีคที่ 17) ปริมาณโปรตีน 1 μg



รูปที่ 26 แบบแผนโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางพาราในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงและไม่แปลงสภาพ ย้อมด้วยซิลเวอร์

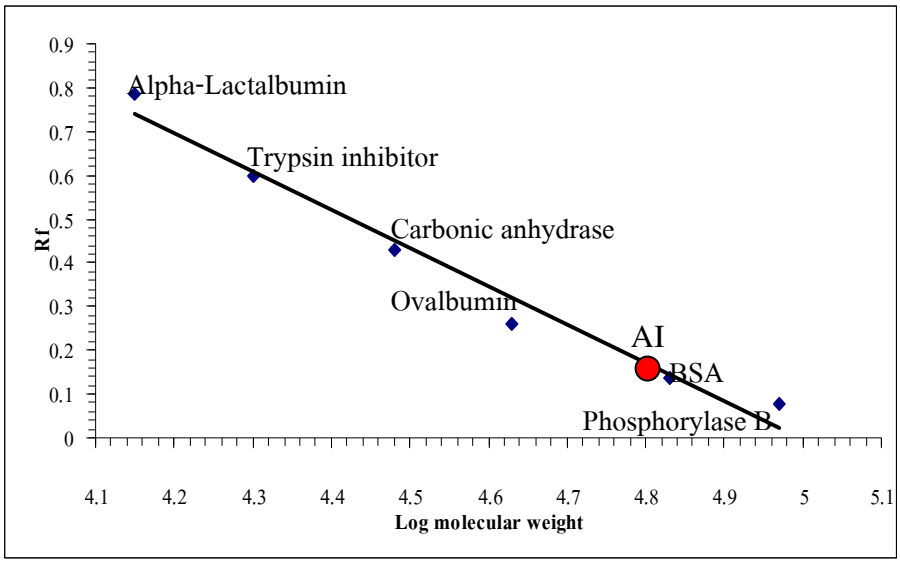
A. แบบไม่แปลงสภาพ ที่ความเข้มข้นเจล 10%

B. แบบแปลงสภาพที่ความเข้มข้นเจล 14-17 %

แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานขนาดโมเลกุลเล็ก

แถวที่ 2 สารละลาย AI โปรตีน 5µg ผสม sample buffer ที่มี β-mercaptoethanol

แถวที่ 3 สารละลาย AI โปรตีน 5µg ผสม sample buffer ที่ไม่มี β-mercaptoethanol



รูปที่ 27 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพที่ความเข้มข้นเจล 14-17 %
แกน x : log molecular weight ของโปรตีนมาตรฐาน
แกน y : ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด (R_f)