บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สารยับยั้งอะไมเลส (Amylase inhibitor, AI) เป็นสารที่สามารถลดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ผลที่ตามมาทำให้การย่อยแป้งลดลง ส่งผลให้การดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือดลดลงด้วย สารยับยั้งอะไมเลสสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือชนิดที่เป็นโปรตีน และชนิดที่ไม่เป็นโปรตีน

สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนพบได้จากหลายแหล่งอาทิ จากแบคทีเรียกลุ่ม *Actonoplanes* (Brunkhorst และ Schneider 2005) และ *Streptomyces* ที่สร้างสารยับยั้งอะไมเลส ซึ่งเป็นสารพวก pseudotetrasaccharide เช่น acarbose ที่มีโครงสร้างเฉพาะที่เรียกว่า acarviosine ซึ่งเป็น cyclitol unit ที่ไม่อิ่มตัวและเชื่อมกับ 4,6-dideoxy-4-amino-D-glucose โครงสร้างนี้มีความสำคัญในการยับยั้งอะไมเลส (Kim และคณะ 2002) นอกจากนี้พบว่าอนุพันธ์ของ ascorbic acid มีความสามารถยับยั้งแบบแข่งขัน โดยส่วน ene-diol moiety ของโมเลกุลไปจับกับ active site cleft และตำแหน่งข้างเคียงของเอนไซม์ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Gerrard และคณะ 2000) ในกระเจี๊ยบพบสาร Hibicus acid ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ เชื้อราได้ (Hansawasdi และคณะ 2000)

สารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็นโปรตีน สามารถพบได้โดยทั่วไปทั้งใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สารยับยั้งอะไมเลสในพืชพบได้จากธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และข้าวเจ้า นอกจากนี้ยังพบมากในพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วแดง (Franco และคณะ 2002) สารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่เป็นโปรตีนอาจแบ่งกลุ่มตามโครงสร้าง tertiary ได้ 6 กลุ่มประกอบด้วย กลุ่ม lectin, knottin, thaumatin, γ-purothionin, kunitz และ กลุ่ม cereal ตามลำดับ โดยโปรตีนยับยั้งอะไมเลสในกลุ่มสุดท้ายนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ด้วย ตัวอย่างเช่นโปรตีนยับยั้งอะไมเลสจากข้าวสาลี เป็นต้น (Franken และคณะ 1994 ; Kusaba-Nakayama และคณะ 2000)

ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายกำจัดสิ่งแปลกปลอม (antigen) โดยอาศัยการทำงานของแอนติบอดีพวกอิมมูโนกลอบูลิน (immunoglobulin, Ig) จับสิ่งแปลกปลอมที่มีความจำเพาะกัน แต่หากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมีมากเกินไป (hypersensitivity) จะเกิดภาวะภูมิแพ้ (allergy) เป็น

ภาวะการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในร่างกายให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะขึ้นจนเกิดความผิดปกติต่าง ๆ เช่น อาการ anaphylaxis ที่มี allergen กระตุ้น IgE บน mast cell ให้หลั่ง histamine เกิดอาการอักเสบขึ้น (กนกธร ปียธำรงวัฒน์ 2537)

สารก่อภูมิแพ้ (allergen) ส่วนมากเป็นสารพวกโปรตีน (อารียา เทพชาตรี 2527) แบ่งได้หลายกลุ่มและมีหลายขนาด เช่น กลุ่ม β-1,3 glucanases จากน้ำยางพารา และกลุ่ม class I chitinase จากพืชที่สร้างเมล็ด ซึ่งมีขนาด 25-35 kDa ในกลุ่ม lipid transfer protein จากผลไม้ มีขนาดประมาณ 9 kDa กลุ่มโปรตีนยับยั้ง protease และamylase จากธัญพืช และกลุ่ม profilin จากผลไม้มีขนาด12-15 kDa

โปรตีนก่อภูมิแพ้ที่พบได้ในพืชชั้นสูง มี 2 แบบ คือ แบบที่เป็น pathogenesis related protein (PRs) และแบบที่ไม่เป็น PRs พืชชั้นสูงสร้างสารเหล่านี้เพื่อใช้ป้องกันตัวเองจากการทำลายของเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส บาดแผล หรือ สารเคมี สารก่อภูมิแพ้กลุ่มที่เป็น PRs ได้แก่ PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-10 และ PR-14 และแบบที่ไม่เป็น PRs ได้แก่ สารยับยั้งเอนไซม์ protease และ α-amylase, เอนไซม์ peroxidase, profilins, โปรตีนในเมล็ดพืช, เอนไซม์ thiol-proteases และ lectins

อาการภูมิแพ้ข้าวสาลี และอาการแพ้ผลไม้ที่สัมพันธ์กับการแพ้น้ำยางพารา (Latex-fruit syndrome) เป็นปัญหาหนึ่งในปัจจุบันที่ควรได้รับการศึกษาวิจัย เนื่องจากในรายที่มีอาการแพ้รุนแรงอาจทำให้เสียชีวิตได้ มีรายงานถึงโปรตีนที่ก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลีว่าเป็นโปรตีนยับยั้งอะไมเลส ในข้าวสาลี *Triticum aestivum* โปรตีนขนาด 15 kDa เป็นตัวก่อภูมิแพ้ (Franken และคณะ 1994 ; James และคณะ 1997) โปรตีนยับยั้งอะไมเลสในข้าวสาลี *Triticum durum* มีโครงสร้าง tetrameric มีหน่วยย่อย CM3 เป็นสาเหตุของอาการภูมิแพ้ชนิด atopic dermatitis (AD) (Kubasa-Nakayama และคณะ 2000) นอกจากนี้ใน buck wheat ยังมีโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal คล้ายกับโปรตีนยับยั้งอะไมเลสขนาด 19 kDa และเป็นสาเหตุของอาการแพ้

โปรตีนก่อภูมิแพ้ในพืช และผลไม้อื่น ได้แก่ class I chitinase ในผลกล้วย (Makinen-kiljunen 1994) เป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N (N-terminal) คล้ายกับโปรตีน hevein ที่เป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางพารา (Mikkola และคณะ 1998; Sanchez-Monge และคณะ 1999) น้ำยางมะละกอมีโปรตีน chitinase (Lynn และ Clevette - Radford 1987) และโปรตีนในกลุ่ม β-1, 3-glucanase (Azarkan และคณะ 2003) ที่เป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้ เช่นเดียวกับโปรตีนที่ก่อภูมิแพ้ที่พบในน้ำยางพารา

ทางภาคใต้ประชาชนส่วนใหญ่มีอาชีพในการทำสวนยางพาราดังนั้นจึงมีโอกาสสัมผัสโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางพารามาก ส่วนกล้วย และมะละกอเป็นอาหารที่ใช้บริโภคประจำวัน หรือเพื่อจำหน่าย ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวจึงมีโอกาสสัมผัสกับน้ำยางกล้วยและมะละกอได้สูงเช่นเดียวกัน ความสัมพันธ์เหล่านี้อาจก่ออาการ Fruit latex syndrome ได้ โปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ทั้งในน้ำยางกล้วย มะละกอ และยางพารา ยังไม่เคยมีรายงานการมีคุณสมบัติต่อการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสเหมือนกับโปรตีนยับยั้งอะไมเลสในข้าวสาลี (wheat) ที่เป็นตัวก่อภูมิแพ้หลัก จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาว่าน้ำยางกล้วย น้ำยางมะละกอ และ น้ำยางพารา มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสหรือไม่ หากมี มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่าใด ขนาดเดียวกัน หรือ ใกล้เคียงกับโปรตีนยับยั้งอะไมเลสที่ก่อภูมิแพ้หลักในข้าวสาลีหรือไม่ จากการศึกษาเบื้องต้นของ อนงค์ อัตตะโน (2546) พบว่า น้ำยางจาก กล้วย มะละกอ และยางพารา ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายได้ร้อยละ 97 98 และ 93 ตามลำดับ (จากค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ) ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสของน้ำยางจากพืชตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด และหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนเปรียบเทียบขนาดกับโปรตีนยับยั้งที่ก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลี

การตรวจเอกสาร

1. เอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลส (α-1,4-glucan-4-glucanohydrolases EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่พบได้โดยทั่วไปใน จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ ทำหน้าที่ทำลายพันธะ o-glycosidic ในแป้ง ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ ที่พบได้มากในเมล็ดพืช แป้งประกอบด้วยหน่วยย่อยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic ที่เอนไซม์อะไมเลสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 2 ชนิด คือ salivary α-amylase จากต่อมน้ำลายและ pancreatic α-amylase จากตับอ่อน การย่อยอาหารประเภทแป้งเริ่มจากอะไมเลสในน้ำลาย จากนั้นจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กโดยอะไมเลสจากตับอ่อน แบคทีเรียและราปล่อยเอนไซม์อะไมเลสออกมาเพื่อย่อยแป้งให้เป็น maltodextrin แล้วนำสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงาน ส่วนในพืชใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อยสลายแป้งที่ได้จากการสังเคราะห์แสงเพื่อใช้เป็นพลังงาน ตัวอย่างเช่น ใน เมล็ดพืชที่กำลังงอก

2. สารยับยั้งอะไมเลส

เป็นสารที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสได้ ซึ่งสามารถพบได้ในพืชชั้นสูง เช่น ในพืชตระกูลถั่ว ธัญพืช และในจุลินทรีย์ เช่น เชื้อ *Streptomyces terdae 4158* (Graziano และคณะ 2000) หรืออาจพบได้ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Payan 2004) สารยับยั้งอะไมเลสแบ่งเป็นประเภทที่เป็นโปรตีน และไม่เป็นโปรตีน ในประเภทที่เป็นโปรตีน ส่วนมากจะเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตัวจากแมลงและ จุลินทรีย์ สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังตารางที่ 1 โครงสร้างของโปรตีนยับยั้งอะไมเลสนี้มีทั้ง monomeric ขนาด 5 kDa 9 kDa และ 13 kDa homodimeric, heterodimeric มีขนาด 26 kDa และโครงสร้างแบบ tetrameric ขนาด 50 kDa โปรตีนยับยั้งอะไมเลส

เหล่านี้มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้แตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มาของเอนไซม์ แต่โดยส่วนมากโปรตีนยับยั้งเหล่านี้จะยับยั้งเอนไซม์ที่ได้มาจากแหล่งต่าง ๆ ได้

Sivakumar และคณะ (2006) ศึกษาโปรตีนยับยั้งอะไมเลสที่สกัดได้จากเมล็ด little millet (*Panicum sumatrense*) และ finger millet แสดงการยับยั้งต่อเอนไซม์อะไมเลส จาก *Collosoloruchus chinensis* ด้วยค่าการยับยั้งร้อยละ 70 และ 50 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ายังยับยั้งอะไมเลสจาก *Acaca janata*, *C. cephalonica*, *Sitophilus oryzae* และ *Tribolium castaneum* ได้อีกด้วย

ตารางที่ 1 กลุ่มโปรตีนยับยั้งที่พบในพืชชั้นสูง

กลุ่มโปรตีนยับยั้ง	แหล่งที่พบ	Amino acid residue number	Disulfide bond
Lectin type	Common beans	240-250	5
Knottin type	Amaranth	32	3
Cereal type	Wheat, barley and finger millet	124-160	5
Kunitz type	Barley, wheat and rice	176-181	1-2
Thaumatin type	Maize	173-235	5-8
γ-Purothionin type	Sorghum	47-48	5

อ้างโดย (Franco และคณะ 2002)

ส่วนสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่เป็นโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ กลไกการยับยั้งของสารประกอบเหล่านี้อาศัยโครงสร้างวงแหวน (Cyclic structure) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันกับสับสเตรทของอะไมเลส ดังนั้นจึงสามารถเข้าไปจับเอนไซม์ตรงตำแหน่ง catalytic site ได้ เช่น

Hibiscus acid ในกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa*) ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและจากเชื้อราได้ (Hansawasdi และคณะ 2000) acarbose ที่มีคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสเป็นแบบ non-competitive (Kadziola และคณะ 1998) และ อนุพันธ์ของกรด ascorbic ที่มีการยับยั้งแบบแข่งขัน โดยส่วน ene-diol moiety ของตัวยับยั้งไปจับกับบริเวณ active site cleft และตำแหน่งข้างเคียงของเอนไซม์ (Gerrard และคณะ 2000) acarviosine-glucose, isoacarbose และ cyclodextrins เป็นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับของมนุษย์และหมูได้ดี สารประกอบฟีโนลิค (phenolic compound) หลายกลุ่มมีรายงานว่ามีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้

Kandra และคณะ (2004) พบว่าการยับยั้งของ tannin ที่มีต่อเอนไซม์อะไมเลสเป็นแบบ mixed non-competitive type เมื่อ 2-chloro-4-nitrophenyl-4-o-β-D-galactopyranosyl-maltoside (GalG2CNP) เป็นสับสเตรท

Correia และคณะ (2004) พบว่าสารประกอบฟีโนลิค ที่ได้จากการหมักกากสับปะรด (*Ananas cosmosus*) กับเชื้อ *Rhizopus oligosporus* สามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนหมูได้สูง และกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีโนลิค ในสารสกัด นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จากการหมักกากสับปะรดกับแป้งถั่วเหลืองที่สัดส่วน 9: 1 (w/w) มีความคงตัวสูงไม่ว่าจะนำสารสกัดไปทำให้แห้ง หรือ autoclave

McCue และคณะ (2004) สกัดสารประกอบฟีโนลิค จากยอด oregano (*Origanum vulgare*) ด้วยเอธานอลร้อยละ 50 เมื่อนำสารสกัดไปวิเคราห์ด้วย HPLC พบว่าประกอบด้วยสารประกอบฟีโนลิค พวก rosmarinic acid protochatechuic acid quercetin และ *p*-coumaric acid และสารสกัดสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนหมูได้ โดยมีความสามารถในการยับยั้งแปรผันตามชนิดของสารประกอบฟีโนลิค

Ali และคณะ (2006) ได้สกัดสารจากพืชท้องถิ่นของประเทศมาเลเซีย ที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน คือ *Anacardium occidentale Linn Lagerstroemia speciosa Pers. Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. *Pithecellobium jiringa* Prain *Pakia speciosa* และ *Averrhoa bilimbi* Linn ด้วย hexane และ dichloromethane และพบว่าสารที่สกัดด้วย hexane ของ *Phyllanthus amarus* ให้ค่าการยับยั้งสูงที่สุด เมื่อนำสารสกัดไปแยกด้วย TLC วิเคราะห์สารที่แยกได้โดย MS, ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR พบว่ามี triacontanol dotriacontanyl docosanoate oleanolic acid และ ursolic acid เป็นองค์ประกอบ และพบว่าเมื่อผสม oleanolic acid กับ ursolic acid ในสัดส่วน 2:1 (v/v) จะมีศักยภาพการยับยั้งอะไมเลสสูงที่สุด คือมีค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งอะไมเลสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 2.01 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร

ผลกล้วยดิบ (Green banana) มี tannins สารประกอบ polyphenols ปริมาณมาก มีปริมาณเส้นใยและโปรตีนน้อย Valderrama (2006) ศึกษาหาวิธีการสกัด tannins ออกจากผลกล้วยดิบ ด้วย แอลกอฮอล์ น้ำ และสารผสมของแอลกอฮอล์ และน้ำ โดยใช้สัดส่วนผลกล้วยดิบ 1% น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร (w/v) และพบว่าการสกัด tannins ด้วย แอลกอฮอล์ ที่ผสมกับน้ำในสัดส่วน 1 ต่อ 1 มีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าการสกัดด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว

3. สารยับยั้งอะไมเลสในข้าวสาลี

โปรตีนยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสในข้าวสาลี *Triticum aestivum* มีทั้งโครงสร้างที่เป็น tetrameric (60 kDa), dimeric (24 kDa) และ monomeric (12 kDa) โดยโปรตีนยับยั้งที่เป็น tetrameric และ monomeric มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากแมลงได้สูง ส่วนโปรตีน dimeric สามารถยับยั้งได้ทั้งอะไมสเลสจากแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โปรตีนยับยั้งจากข้าวสาลี *Triticum tergidum* และ *Triticum tauschii* มีคุณสมบัติเหมือนกับโปรตีนยับยั้งจากข้าวสาลี *Triticum aestivum* เว้นแต่โปรตีน monomeric มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสจากแมลงน้อยกว่า

โปรตีนยับยั้งที่กล่าวถึงข้างต้นสกัดได้จาก endosperm ของข้าวสาลี โปรตีนนี้อยู่ในกลุ่ม globulin ชื่อว่า CM protein ซึ่งมีหลายชนิด เช่น CM1, CM2, CM3, CM16 และ CM17 แต่ละชนิดจะมีรูปแบบการเคลื่อนที่ใน two-dimensional electrophoresis แตกต่างกัน CM1, CM3 และ CM17 เป็นโปรตีนที่พบได้ในข้าวสาลี *Triticum tauschii* CM2, CM3, และ CM16 พบในข้าวสาลี *Triticum tergidum* ส่วนโปรตีน CM1, CM2, CM3, CM16 และ CM17 พบได้ในข้าวสาลี *Triticum aestivum* (Gomez และคณะ 1989) Sanchez-Monge และคณะ (1992) พบว่าส่วน Sugar moiety ของ CM16 มีความสำคัญต่อกลไกการยับยั้งอะไมเลสและมีความสามารถจับกับ IgE ของผู้ป่วยภูมิแพ้ Baker's asthma ได้

Franken และคณะ (1994) และ James และคณะ (1997) นำโปรตีนจากข้าวสาลี *Triticum aestivum* มาทำ immunoblotting กับ serum จากผู้ป่วย 8 ราย และพบว่าโปรตีนก่อภูมิแพ้นี้มีขนาด 15 kDa ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย N ตัวที่ 1 –20 บ่งชี้ว่าโปรตีนนี้เป็นสารยับยั้งอะไมเลสในกลุ่ม cereal type ส่วนข้าวสาลี *Triticum durum* พบโปรตีนยับยั้งอะไมเลสที่มีโครงสร้างแบบ tetrameric ประกอบด้วยหน่วยย่อย CM2 2 หน่วย CM3 และ CM16 อย่างละหน่วย แต่เมื่อนำไปทดสอบด้วย immunoblotting พบว่าโปรตีน CM3 เท่านั้นที่จับกับ IgE จากเลือดของผู้ป่วยที่เป็นภูมิแพ้ชนิด atopic dermatitis (AD) แสดงว่าโปรตีน CM3 เป็นสาเหตุของอาการภูมิแพ้ชนิด AD (Kubasa-Nakayama และคณะ 2000)

Park และคณะ (2000) พบโปรตีนขนาด 19 kDa จาก buckwheat ที่มีลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal คล้ายกับโปรตีนยับยั้งอะไมเลสในข้าวฟ่างและมีสมบัติเป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้ด้วย

Heidari และคณะ (2005) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวสาลี *Triticum aestivum Var. Zarrin* และพบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจาก น้ำลายมนุษย์ และจากเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยมีค่าการยับยั้งร้อยละ 97.07 และ 89.97 ตามลำดับ

4. การสกัด จำแนก ทำบริสุทธิ์ สารที่สนใจจากพืช

4.1 โปรตีนทั่วไปจากพืช

Clendennen และคณะ (1998) ศึกษาโปรตีนในผลกล้วย (*Musa acuminate* cv. Grant Nain) โดยทำเนื้อกล้วยให้แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นบดให้ละเอียด แล้วนำไปสกัด จากนั้นนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate ที่ร้อยละความอิ่มตัวในช่วง 40-60 เพื่อนำโปรตีนไปศึกษาต่อไป

Peumans และคณะ (2002) ได้สกัดโปรตีนจากผลกล้วยและทำบริสุทธิ์ Class III chitinase โดยนำเนื้อกล้วยมาบดผสมกับ ascorbic acid จากนั้นปรับ pH 6 ด้วย NaOH นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 8,000 x g นาน 10 นาที แยกส่วนใสเติม ammonium sulfate ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 M ตั้งทิ้งไว้ที่ 2 °ซ นาน 1 ชม. นำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง แยกส่วนใสที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง นำสารที่กรองได้ผ่านคอลัมน์ phenyl-sepharose ล้างคอลัมน์ด้วย 1 M ammonium sulfate แล้วชะโปรตีนด้วย 20 mM Tris-HCl - 0.2 M NaCl รวมสารละลายที่มีโปรตีนที่ต้องการมาผ่านคอลัมน์ Mono-Q anion-exchange (type HR 5/5) ชะโปรตีนที่ต้องการด้วยเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-0.5 M

Blanco และคณะ (1998) สกัดโปรตีนก่อภูมิแพ้จากละอองเกสรของดอกมะละกอ (*Carica papaya*) ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 8 ด้วยสัดส่วน ร้อยละ 15 (w/v) นาน 4 ชม. ที่ 4 °ซ นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 30 นาที แยกส่วนใสไดอะไลซ์ กับ PBS ที่ 4 °ซ นาน 24 ชม. จากนั้นนำไปกรอง (0.22 μm filter) แล้วนำสารที่กรองได้ไปทำแห้งโดยการ freeze dried นอกจากนี้ยังสกัดโปรตีนจากผลมะละกอด้วยวิธีเดียวกันกับข้างต้น

Monti และคณะ (2000) ทำบริสุทธิ์ papain จากน้ำยางมะละกอโดยเติม EDTA ลงในน้ำยางมะละกอ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM นำสารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ 12,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แยกส่วนใสที่ได้ไปปรับ pH 9 ด้วย 0.1 M NaOH นำไปเซนตริฟิวจ์

แยกส่วนใสและเติมน้ำกลั่น 30 มล. จากนั้นแช่ใน ice bath เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของ papain นำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งเพื่อแยกตะกอนที่ได้ไปล้าง และละลายตะกอนด้วย 1 mM EDTA pH 7 ที่ 4 °ซ จากนั้นทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 และ CM-cellulose โดยใช้ 1 mM EDTA เป็นตัวชะ

Pereira และคณะ (1999) แยกโปรตีนในน้ำยาง *Manihot glaziovii* Muell. Arg. โดยเก็บน้ำยางผสมกับน้ำกลั่น สัดส่วน 1:1 (v/v) เซนตริฟิวจ์ ที่ 17,000 x g เป็นเวลา 1 ชม. ทิ้ง ส่วนใสเก็บส่วนซีรัม (crude latex) เพื่อใช้ศึกษา

Jekel และคณะ (2003) แยกโปรตีน patatin-like จากน้ำยางพารา โดยเซนตริฟิวจ์น้ำยางพารา แล้วแยก B-serum ไปแช่แข็งและ ทำให้ละลายสลับกัน เซนตริฟิวจ์อีกครั้ง เพื่อแยกส่วนใสไปทำ lyophilized ก่อนที่จะละลายคืนและทำให้เป็นเนื้อเดียวกันในน้ำกลั่นที่ผสม sodium dithionite จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ แยกส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แยกตะกอนมาละลายใน 0.1 M Tris buffer pH 8 ที่ผสม sodium dithionite นำสารที่ได้มาผ่านคอลัมน์ cation exchange chromatography (carboxymethylcellulose CM32 column) แล้วนำสารที่ไม่จับกับคอลัมน์มาผ่าน anion exchange chromatography (DEAE-cellulose column) นอกจากนี้ยังนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วย reverse-phase HPLC ต่อไปอีกด้วย

Karisola และคณะ (2005) สกัดโปรตีนจากกล้วยและอะโวกาโด ด้วย acetate buffer (50 mM acetic acid, 0.2 M NaCl และ 10 mM thiourea pH 4) นาน 16 ชม. นำสารสกัดไปเซนตริ-ฟิวจ์ ที่ 5,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 15 นาที แยกส่วนใสไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่ 25,000 x g ที่ 4°ซ นาน 1 ชม. แยกส่วนใสมากรอง (0.4 μm filter) นำสารที่กรองได้มาทำบริสุทธิ์ด้วย chitin column และ Vydac column ตามลำดับ นอกจากนี้ยังแยกโปรตีน prohevein จาก B-serum โดยทำบริสุทธิ์ด้วย gel filtration (superdex 75 HR 16/60 column และ Biogel P6 desalting column), anion exchange (MonoQ column) และ reverse phase chromatography (TSK gel TMS-250 column) ตามลำดับ

4.2 สารยับยั้งอะไมเลสจากพืช

4.2.1 สารยับยั้งที่เป็นโปรตีน

Grant และคณะ (1995) หาระดับสารยับยั้งอะไมเลสในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว โดยทำการสกัดสารยับยั้งในเมล็ดถั่วด้วย phosphate buffer pH 6.9 จากนั้นเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกส่วนใสไปให้ความร้อนที่ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ทนความร้อนออกไป Marshall และ

Lauda (1975) และ Le Berre-Anton และคณะ (1997) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดถั่วด้วยน้ำสัดส่วน 5.5 มล. ต่อ กรัมถั่ว ที่ 4 °ซ แล้วให้ความร้อน และนำส่วนใสหลังการเซนตริฟิวจ์ให้ความร้อนที่ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เช่นเดียวกัน เพื่อทำลายเอนไซม์อะไมเลสจากพืช Iulek และคณะ (2000) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวไรย์ ด้วย เอทธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 เซนตริฟิวจ์เพื่อแยกส่วนใสไปให้ความร้อนที่ 70 °ซ 1 ชม. เพื่อเอาโปรตีนที่ไม่ทนความร้อนและเอนไซม์อะไมเลสออกจากสารสกัด

Iulek และคณะ (2000) ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวไรย์ (rye) โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate pH 6.9 ผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose ion exchange ชะด้วย phosphate buffer pH 6.9 ก่อน และชะอีกครั้งด้วย 0-1.0 M NaCl รวมหลอดที่มีกิจกรรมเข้าด้วยกัน ไดอะไลซ์ใน 50 mM acetate buffer pH 5 นำไปผ่านคอลัมน์ CM-Sepharose ion exchange ชะด้วย acetate buffer แล้วชะอีกครั้งด้วย 0-1.0 M NaCl รวมหลอดที่มีกิจกรรมเข้าด้วยกัน

Rekha และคณะ (2004) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจาก sweet potato และ taro โดยตกตะกอนสารสกัดด้วย trichloroacetic acid ก่อนที่จะทำบริสุทธิ์ด้วย dimethyl aminoethyl-cellulose chromatography

Sivakumar และคณะ (2006) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดข้าวฟ่าง โดยบดผสมกับ 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 นำไปเซนตริฟิวจ์ แยกตะกอนที่ได้มาละลายกลับด้วย 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.9- 0.3 M NaCl เซนตริฟิวจ์อีกครั้งเพื่อแยกส่วนใสไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °ซ นาน 20 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่าง นำไปเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกส่วนใสไปตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate ละลายตะกอนโปรตีนคืนด้วยบัฟเฟอร์เดิมก่อนที่จะนำไปไดอะไลซ์เพื่อกำจัดเกลือต่อไป

4.2.2 สารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีน

Kim และคณะ (2000) จำแนกสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ Whatman K6F silica gel plate ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย ethyl acetate : isopropyl alcohol : water (1:3:1 v/v) หลังจากทำการชะ 2 ครั้ง ดูการเกิดสีบนแผ่น TLC ที่แห้งโดยการฉีดพ่นสารละลายที่ประกอบด้วย
0.3% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, 5% (w/v) H_2SO_4 ใน เมทธานอล ให้ความร้อนที่ 110° ซ เป็นเวลา 10 นาที

Kim และคณะ (2002) สกัดสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส มอลเตส และ ซูเครส ซึ่งเป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Actinoplanes sp* โดยการตกตะกอนด้วยเมทธานอล นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนต่อด้วยเอทธานอล นำตะกอนที่ได้ละลายใน sodium acetate buffer pH 6 ก่อนจะนำไปศึกษาต่อไป

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

Matsuura และคณะ (2004) ได้สกัดสารยับยั้ง α-glucosidase จากใบพืชสมุนไพร (*H. officinalis*) โดยการบดใบแห้งกับ สารผสมของ เมทธานอล และน้ำ (7:3 v/v) นำไปกรอง ทำเข้มข้น และทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่าง ethyl acetate และ น้ำ โดยนำส่วนที่เป็นชั้นน้ำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟี เพื่อให้ได้สารยับยั้งที่ต้องการ

Ali และคณะ (2006) ได้สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชท้องถิ่นของมาเลเซีย โดยเปรียบเทียบสารที่ใช้สกัด ระหว่าง hexane และ dichloromethane นำสารที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายที่ใช้สกัดออกโดยใช้ evaporator ภายใต้ความดันและอุณหภูมิ 40°ซ ก่อนที่จะนำไปหากิจกรรมการยับยั้งต่อไป

5. สารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้

ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายกำจัดสิ่งแปลกปลอม (antigen) โดยอาศัยการทำงานของแอนติบอดีพวกอิมมูโนกลอบูลิน (immunoglobulin, Ig) จับสิ่งแปลกปลอมที่มีความจำเพาะกัน แต่หากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมีมากเกินไป (hypersensitivity) จะเกิดภาวะภูมิแพ้ (allergy)

ภาวะภูมิแพ้เป็นภาวะการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในร่างกายที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารแปลกปลอม (allergen) ให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะขึ้นจนเกิดความผิดปกติต่างๆ เช่น อาการ anaphylaxis ที่มี allergen กระตุ้น IgE บน mast cell ให้หลั่ง histamine เกิดอาการอักเสบขึ้น (กนกธร ปิยธำรงวัฒน์ 2537)

สารก่อภูมิแพ้มีทั้งที่เป็นโปรตีน และไม่เป็นโปรตีน แต่ส่วนมากจะเป็นโปรตีน (อารียา เทพชาตรี 2527) ซึ่งแบ่งได้หลายกลุ่ม และมีขนาดที่หลากหลาย เช่น กลุ่ม β-1,3-glucanases จากน้ำยางพารา และกลุ่ม class I chitinase จากพืชที่สร้างเมล็ด จะมีโปรตีนขนาด 25-35 kDa ใน

กลุ่ม lipid transfer protein จากผลไม้ มีโปรตีนขนาดประมาณ 9 kDa กลุ่มโปรตีนยับยั้ง protease และ amylase จากธัญพืช และกลุ่ม profilin จากผลไม้ที่มีโปรตีนขนาด 12-15 kDa

โปรตีนก่อภูมิแพ้ที่พบได้ในพืชชั้นสูง มี 2 แบบ คือ แบบที่เป็น pathogenesis related protein (PRs) และแบบที่ไม่เป็น PRs พืชชั้นสูงสร้างสารเหล่านี้เพื่อใช้ป้องกันตัวเองจากการทำลายของเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส บาดแผล หรือ สารเคมี สารก่อภูมิแพ้กลุ่มที่เป็น PRs และแบบที่ไม่เป็น PRs ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 Pathogenesis related protein (PRs) ที่พบในพืชชั้นสูง

ชนิดของ antigen	ชนิดของ Protein	แหล่งที่พบ allergen
PR-2 type	β-1,3-glucanase	Fruit, vegetables
PR-3 type	Basic class I chitinase	Avocado(Pers 1), chestnut, banana
PR-4 type	Chitinases similar to potato win proteins	Turnip, elderberry
PR-5 type	Thaumatin –like proteins	Cherry (Pru av 2), apple (Mal d2), bell pepper
PR-10 type	Bet v I –homologous protein	Apple (Mal d1), cherry (Pru av 1), apricot (Pru ar 1), pear (Pvr c1), celery(Api g1), carrot (Dan c1), parsley (pcPR), potato (pSTH)
PR-14 type	Lipid transfer protein	Peach (Pru p 3), apple (Mald d3)

อ้างโดย (Breiteneder และ Ebner 2000)

ตารางที่ 3 Non pathogenesis related protein (non-PRs) ที่พบในพืชชั้นสูง

ชนิดของ Protein	แหล่งที่พบ allergen
Inhibitors of proteases and α-amylase	Soybean, cereal, barlay, wheat, rye, rice
Peroxidase	Wheat, barlay
Profilins	Peanut, apple, carrot, tomao
Seed storage protein	
2S albumins	Oilseed rape, brazil nut, walnut
Vicilins	Peanut, walnut
Conglutins	Peanut
Glycinins	Peanut, soybean
β-Conglycinin	Soybean
Thiol-proteases	Papaya, pineapple, kiwi, soybean
Lectins	Peanut

อ้างโดย (Breiteneder และ Ebner 2000)

โปรตีนยับยั้งอะไมเลสกลุ่ม thaumatin type มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันกับโปรตีนที่ก่อภูมิแพ้ชนิด PR-5 (Franco และคณะ 2002) ซึ่งโปรตีนชนิด PR-5 นี้เป็นสาเหตุของอาการแพ้ในพืชหลายชนิด

Pastorello และคณะ (2003) พบโปรตีนก่อภูมิแพ้ในองุ่นที่มีขนาด 24 kDa ซึ่งเมื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีความคล้ายคลึงกับโปรตีน thaumatin ใน cherry

Gavrovic-Jankulovic และคณะ (2002) ศึกษาโปรตีนในผลกีวี หลังจากทำบริสุทธิ์ด้วย gel filtration, ion exchange และ affinity chromatography และเมื่อนำไปทดสอบ immunoblot และ skin prick test พบโปรตีนก่อภูมิแพ้ขนาด 24 kDa เมื่อหาลำดับกรดอะมิโนพบว่าอยู่ในกลุ่ม PR-5 (thaumatin-like protein) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้

Krebitz และคณะ (2003) ได้ศึกษาอาการแพ้ใน apple พบโปรตีน*Malus domestica* 2 (Mal d2) ขนาด 23 kDa และจากการหาลำดับกรดอะมิโนพบว่าเป็นโปรตีนกลุ่ม thaumatin เช่นเดียวกัน

Helm และคณะ (2000) ได้สกัดโปรตีนจากถั่วเหลืองและนำมาทดสอบภูมิแพ้ด้วยวิธี IgE immunoblot และเมื่อหาลำดับกรดอะมิโนพบโปรตีนขนาด 22 kDa เป็นตัวก่อภูมิแพ้และเป็นโปรตีน glycinin ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม seed storage protein

Garcia-Menaya และคณะ (2000) พบโปรตีนก่อภูมิแพ้จาก pine nut ขนาด 17 kDa การทดสอบ skin prick test กับสารสกัด pine nut พบเกิดผลบวกกับผู้ป่วยภูมิแพ้ชนิด atopic และจากการทำ immunoblotting พบว่า IgE จากเลือดผู้ป่วยสามารถจดจำโปรตีนนี้ได้

Varjonen และคณะ (2000) พบโปรตีน gliadin ขนาด 14 kDa ในข้าวสาลีเป็นตัวก่อภูมิแพ้ที่เกี่ยวข้องกับอาการแพ้ชนิด atopic dermatitis (AD)

Pasini และคณะ (2002) ศึกษาอาการแพ้ในข้าวโพดพบโปรตีนก่อภูมิแพ้ขนาด 50 kDa จากการทำ immunoblotting พบว่าโปรตีนนี้จับกับ IgE จากเลือดของผู้ป่วย และการทดสอบ skin prick test กับผู้ป่วยเกิดผลบวกขึ้น

Battais และคณะ (2003) ศึกษาโปรตีนก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลี และพบว่าโปรตีน gliadins และ glutemin ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเป็นตัวก่อภูมิแพ้หลัก ส่วน glutemin ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่เป็นตัวก่อภูมิแพ้รอง

6. งานวิจัยเกี่ยวกับน้ำยางกล้วย น้ำยางมะละกอ และน้ำยางพารา

จากการศึกษาของ Delbourg และคณะ (1996) โดย CAP Radio-allergosorbent test (CAP RAST) และ SDS-PAGE immunoblotting พบว่าโปรตีนในกล้วยขนาด 33 และ 37 kDa เป็นโปรตีนสำคัญที่ก่อภูมิแพ้ โดยสามารถจับกับ IgE ของผู้ป่วยที่แพ้น้ำยางพารา

Mikkola และคณะ (1998) และ Sanchez-Monge และคณะ (1999) สกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีนจากกล้วยด้วยวิธีโครมาโตกราฟี เพื่อทดสอบ immunodetection กับเซรั่มจากผู้ป่วยที่แพ้น้ำยางพารา และทดสอบ antichitinase antibody CAP-immunoblot inhibition tests พบว่าโปรตีนขนาด 32 และ 34 kDa เป็นโปรตีนหลักที่ก่อภูมิแพ้ และจากการจำแนกชนิดโปรตีนโดย N-terminal sequencing enzyme activity assay พบว่าโปรตีนนี้มีความคล้ายกับโปรตีน hevein ที่ก่อภูมิแพ้ในน้ำยางพาราซึ่งอยู่ในกลุ่มโปรตีน class I chitinase

Makinen-kiljunen (1994) อธิบายอาการแพ้กล้วยในผู้ป่วยที่มีประวัติแพ้ยางพารา (Latex-fruit syndrome) ว่าเกิดจาก antibody ต่อน้ำยางพารามี epitope ที่สามารถจับกับโปรตีนในกล้วยซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโปรตีน hevein ของน้ำยางพารา

นอกจากกล้วยแล้ว ยังพบโปรตีนก่อภูมิแพ้ในน้ำยางมะละกอ เช่น chitinase (Lynn และ Clevette - Radford 1987) และโปรตีนในกลุ่ม β-1,3-glucanase (Azarkan และคณะ 2003) เช่นเดียวกับโปรตีนก่อภูมิแพ้ที่พบในน้ำยางพารา การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนต่อการก่อภูมิแพ้ด้วยปฏิกิริยากับ specific IgE antibody ในผู้ป่วยภูมิแพ้ พบว่าโปรตีนจากน้ำยางมะละกอให้ผลบวกกับการทดสอบ (Ebo และคณะ 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนในกลุ่ม chitinase ของน้ำยางมะละกอ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30-45 kDa มีบทบาทเกี่ยวข้องกับอาการ Latex-fruit syndrome อีกด้วย (Diaz-Perales และคณะ1999)

Azarkan และคณะ (2004) จำแนกชนิดของโปรตีนในน้ำยางมะละกอเป็น 3 กลุ่มคือ 1). Trypsin inhibitor 2). Class II chitinase และ 3). Glutaminyl cyclase ตามคุณลักษณะของกิจกรรมเอนไซม์ กิจกรรมการยับยั้ง และรูปแบบการแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟี

Farias และคณะ (2007) สกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดมะละกอ (*Carica papaya*) ด้วย 0.6 M NaCl -0.1% HCl ทำบริสุทธิ์ด้วย CM-cellulose column และ HPLC พบว่า สารที่มีขนาดโมเลกุล 4.5 kDa สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจาก *Callosobruchus maculates* อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ยางพาราอาการแพ้ เกิดจากโปรตีน Hevein b (Hev b) (Hev b 1 ถึง 13) ในน้ำยาง (Yeang และคณะ 2002) ผู้ป่วยที่มีอาการแพ้น้ำยางมักจะมีอาการภูมิแพ้ต่ออาหารจากพืชโดยเฉพาะผักและผลไม้ที่บริโภคสด เช่นในกล้วย (Raulf-Heimsoth และคณะ 1997) และ มะละกอ (Sanchez-Monge และคณะ 1999) อาการแพ้น้ำยางพาราที่มีความสัมพันธ์กับอาการแพ้ในพืชชนิดอื่นที่กล่าวนี้เรียกว่า latex - fruit syndrome

โปรตีนที่ก่ออาการแพ้ในน้ำยางพาราเกิดจากโปรตีน HeV b ซึ่งพบได้ในส่วนเนื้อยาง ส่วน C-serum หรือ ส่วน B-serum HeV b มีหลายชนิด ดังนี้ HeV b1 (elongation factor), HeV b2 (β-1,3-glucanase), HeV b3 (small rubber particle protein), HeV b4 (component of microhelic complex), HeV b5 (acidic protein), HeV b6.01 (prohevein), HeV b6.02 (hevein), HeV b6.03 (c-terminal fragment), HeV b7.01 (hom-patatin), HeV b7.02 (hom:patatin from C-serum), HeV b8 (profilin), HeV b9 (enolase), HeV b10 (Mn superoxide dismutase), HeV b11 (class I chitinase), HeV b12 (lipid transferprotein) และ HeV b13 (esterase)

โดย HeV b1 มีขนาด 14 kDa, HeV b2 ขนาด 36 kDa, HeV b5 ขนาด 16 kDa , HeV b6.01 ขนาด 20 kDa, HeV b6.02 ขนาด 4 kDa, และ HeV b6.03 ขนาด 14 kDa ซึ่ง HeV b6.03 เป็นตัวก่อภูมิแพ้หลัก (Yeang และคณะ 2002)

อาการแพ้น้ำยางพารามีความสัมพันธ์กับการแพ้ผลไม้ชนิดอื่นๆ ด้วย โดยผู้ป่วยที่แพ้น้ำยางพาราจะมีความเสี่ยงต่อการแพ้ผลไม้อื่นๆ 35% ส่วนผู้ป่วยที่แพ้ผลไม้อื่นๆจะมีความเสี่ยงต่อการแพ้น้ำยางพาราเพียง 11% (Hepner และ Castells 2003)

จากการศึกษาทั้งหมดข้างต้นยังไม่เคยมีรายงานการพบสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในน้ำยางกล้วย มะละกอ และยางพารา ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาว่า น้ำยางกล้วย มะละกอ และ ยางพารา มีสารยับยั้งอะไมเลสหรือไม่ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสของน้ำยางจากพืชตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด และหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งเปรียบเทียบขนาดกับสารยับยั้งอะไมเลสที่ก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสของน้ำยางกล้วย มะละกอ และยางพารา
2. เพื่อศึกษาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารยับยั้งอะไมเลสที่ก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลี