# 1. บทนำ

## บทนำต้นเรื่อง

สารยับยั้งอะไมเลส (amylase inhibitor, AI) คือสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรทที่เน้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ สารยับยั้งอะไมเลสเป็นสารประเภทโปรตีนที่พบได้ในพืชตระกูลถั่วแหล่งอาหารโปรตีนของคนทั่วโลก ตลอดจนเมล็ดและส่วนต่างๆ ของพืชตระกูลอื่นๆ เช่น ข้าวสาลี มะม่วง (Thomson, 1993) การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งอะไมเลส ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของคน สัตว์ และแมลง โดยกลุ่มวิจัยประเทศต่างๆ พบว่ามีความเป็นไปได้ในการนำสารยับยั้งอะไมเลส มาใช้ประโยชน์ได้ 2 แนวทางคือ 1). ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน (diabetes) โรคอ้วน (obesity) และโรคไขมันอุดตันในหลอดเลือด (hyperlipidemia) ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขของโลกในยุคปัจจุบัน เพราะผลการยับยั้งของสารต่ออะไมเลสมีผลต่อ carbohydrate tolerance, gastric emptying, satiety ตลอดจนการเพิ่มน้ำหนัก (Doi *et.al*., 1995; Koike *et.al*., 1995) 2). ใช้ในการป้องกันแมลงศัตรูพืช โดยสร้างพืชให้มีสารนี้ (Suzuki and Ishimoto, 1999)

ก่อนการนำสารยับยั้งอะไมเลส มาใช้ในทั้ง 2 แนวทางอย่างจริงจัง มีความจำเป็นที่ต้องทราบปริมาณที่มีอยู่จริงในพืชธรรมชาติที่คนและสัตว์บริโภค เพื่อทราบปริมาณที่ควรได้รับ ชนิดของพืชที่มี ตลอดจนตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลส ที่มีอยู่ในพืชต่างๆ อย่างแน่ชัด เนื่องจากได้มีหลักฐานยืนยันว่าสารยับยั้งอะไมเลส ของพืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะ และเลือกจับหรือยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสจากแหล่งต่างๆ แตกต่างกัน Ishimoto และ Kitamura (1992) พบว่า bean weevil (*Acanthoscelides obtectus* Say) และ Mexican bean weevil (*Zabrotes subfaciatus* Boheman) ทนต่อสารยับยั้งอะไมเลสของถั่ว และเป็นต้นเหตุของการสูญเสียหลังเก็บเกี่ยวเป็นอย่างมาก ดังนั้นการค้นหาสารยับยั้งอะไมเลสซึ่งมีผลต่ออะไมเลส

ที่มีความจำเพาะต่อ pathogens แต่ไม่มีผลต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมย่อมนำประโยชน์สู่คนได้

การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสให้ปราศจากสารรบกวนอื่นในธรรมชาติจะช่วยให้การตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมีอันได้แก่ ขนาดโมเลกุล กลไกในการทำงานเป็นไปอย่างเที่ยงตรง งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก และวิธีการที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์พร้อมกับตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของสารนี้ ตลอดจนนำไปเปรียบเทียบกับสารยับยั้งอะไมเลสในพืชอื่นซึ่งมีรายงานแล้ว เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ประโยชน์ในแนวทางต่างๆต่อไป

**การตรวจเอกสาร**

## 1.1 สมบัติทั่วไปของสารยับยั้งอะไมเลส

สารยับยั้งอะไมเลส ($\alpha$-amylase inhibitor ย่อว่า AI) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ($\alpha$-amylase หรือ $\alpha$-1,4-D-glucan- 4 – glucanohydrolase) พบได้ทั่วไปในพืชเช่น ข้าวสาลี ข้าวไร และพืชตระกูลถั่ว ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งอะไมเลสจากสัตว์แต่ไม่ยับยั้งอะไมเลสในแบคทีเรีย, รา และพืชต่างๆ (Jaffe *et al*., 1972; Marshall and Lauda, 1975; Power and Whitaker, 1977a,b; Pick and Wober, 1978; Lajolo and Finardi-Filho, 1985 อ้างโดย Chrispeels *et al*., 1998) และมีสมบัติเป็น antifeedant หรือ โปรตีนปกป้องเมล็ดจากแมลงศัตรูพืช สารยับยั้งอะไมเลสเป็นสารประเภทไกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลตามธรรมชาติเฉลี่ย 10-80 กิโลดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชันและอิเล็กโทรฟอรีซิส จากการศึกษารูปแบบโมเลกุลพบว่ามีหน่วยย่อยเป็นทั้งแบบไตรเมอร์ (trimer) หรือเตตระเมอร์ (tetramer) ทั้งแบบโพลีเปปไทด์ที่เหมือนกันหรือโพลีเปปไทด์ที่ต่างกัน มีหน่วยย่อยกรดอะมิโนความยาวในช่วง 47-246 ตัว (Chagolla-Lopez *et al*., 1994) สารยับยั้งอะไมเลสส่วนใหญ่ มีลักษณะการยับยั้งเป็นแบบไม่

แข่งขัน (non-competitive) โดยจะจับอย่างเชิงซ้อน (complex) กับอะไมเลสเป็นแบบเสถียร 1:1 ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70-80 °ซ ได้ มีความคงตัวและทำงานได้ดีที่ pH เป็นกลาง สารยับยั้งอะไมเลสจากพืชบางชนิดมีสมบัติคล้ายเลคติน (lectin-like proteins) คือสามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้

มีการเริ่มศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสตั้งแต่ปี 1945 (Bowman, 1945) การตรวจเอกสารจนถึงปัจจุบันพบว่ามีรูปแบบของโมเลกุลโปรตีนที่หลากหลายในเมล็ดข้าวสาลี สามารถยับยั้งอะไมเลสในแมลงและอะไมเลสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในระดับต่างๆกัน (Saunders and Lang, 1973; Silano *et al*., 1973 และ 1975; Petrucci *et al*., 1974; Bedetti *et al*., 1974 อ้างโดย O'Donnell and McGeeney, 1976) ความจำเพาะของสารยับยั้งที่พบในพืชพวกข้าวสาลีและถั่วต่างๆต่ออะไมเลสของสัตว์ ถูกค้นพบเมื่อ 60 ปีก่อน (Kneen *et al*., 1943; Bowman, 1945) ข้าวสาลีมีความจำเพาะต่ออะไมเลสจากน้ำลายของคน (human salivary amylase) เป็น 100 เท่า เมื่อเทียบกับอะไมเลสจากตับอ่อนของคน (human pancreatic amylase) และเป็น 600 เท่าเมื่อเทียบกับอะไมเลสจากตับอ่อนของหมู (porcine pancreatic amylase) (O'Donnell and McGeeney, 1976) kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) มีสารยับยั้งอะไมเลสที่มีชื่อว่า phaseolamin สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของอะไมเลสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ในมนุษย์, หมู และในแมลง แต่ไม่มีผลยับยั้งในพืชและจุลชีพต่างๆ (Chrispeels and Raikhel, 1991; Marshall and Lauda, 1975) สารยับยั้งอะไมเลสของ pigeonpea (*Gajanus cajan L*) สามารถยับยั้งได้ทั้งอะไมเลสในน้ำลายมนุษย์ และอะไมเลสจากตับอ่อนวัว แต่ไม่ยับยั้งอะไมเลสในพวกแบคทีเรีย, รา และอะไมเลสในเมล็ดของ pigeonpea

สารยับยั้งอะไมเลสของถั่วขาวที่ความเข้มข้น 0.4 -0.5 % ของน้ำหนักแห้ง เมื่อทำบริสุทธิ์จะพบไกลโคโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 49,000 ดาลตัน จากการวิเคราะห์พบว่าเป็นไกลโคโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรทอยู่ประมาณ 9-10 % ซึ่งคาร์โบไฮเดรทในไกลโคโปรตีน อาจเป็นส่วนสำคัญในแง่ของความจำเพาะ ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการยับยั้งต่อ

อะไมเลส เมื่อเกิดการรวมตัวตรงบริเวณที่เป็นที่จับกับสับสเตรทของเอนไซม์นี้ ขณะเกิดการยับยั้งที่เป็นแบบไม่แข่งขัน (Marshall and Lauda, 1975)

หน่วยย่อย (subunits) ของสารยับยั้งอะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุล 15,000-18,000 ดาลตัน (Lajolo and Finardi-Fiho,1985; Pick and Wober ,1978; Powers and Whitaker,1977) *Phaseolus vulgaris* ประกอบด้วยสารยับยั้งอะไมเลส 2 ชนิด คือ แบบทนต่อความร้อน (AI-S) และไม่ทนต่อความร้อน (AI-U) AI-S ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ $\alpha_2\beta_2$ มี 2 active sites (Kasahara *et al*., 1996) AI-U ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ $\alpha$, $\beta$ และ $\gamma$ (Wato *et al*., 2000) สารยับยั้งอะไมเลสของ *phaseolus vulgaris* มีความยาวกรดอะมิโน 77 ถึง 146 ตัว ซึ่งคล้ายคลึงกันกับองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบในสารยับยั้งอะไมเลส และโปรตีนphytohemagglutininsที่พบในแหล่งอื่นๆ (Moreno and Chrispeels, 1989) สารยับยั้งอะไมเลสในเมล็ดของ *Amaranthus hypocondriacus* พันธุ์เมกซิกัน มีความยาวกรดอะมิโน 32 ตัว มี disulfide bridge 3 แห่ง โดยสรุปโครงสร้างกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ของสารยับยั้งอะไมเลส ค่อนข้างแตกต่างกันตามแหล่งที่พบดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงโครงสร้างกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ของ AI ตามแหล่งต่างๆ

| Class | Source | No of amino acid |
|---|---|---|
| Kunitz type | Barley, Wheat, rice | 176-180 |
| Cereal type | Wheat, barley, indian finger millet | 124-160 |
| $\gamma$-Purothionin type | Sorghum | 47-48 |
| Ragi I-2 type | Indian finger millet | 95 |
| Legume lectin type | Common beans | 246 |
| Thaumatin type | Maize | 173-235 |
| Prokaryotic type | Actinomycetes | 75-120 |

(หมายเหตุ : จำแนกโดย Richardson, 1990 อ้างโดย Chagolla-Lopez *et al*., 1994)

การยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสของสารยับยั้งอะไมเลส พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบบไม่แข่งขัน โดยจะจับกันด้วยสัดส่วน 1:1 และเป็นแบบเสถียร การจับกันนี้ขึ้นกับปัจจัยสำคัญ pH, ionic strength, อุณหภูมิ, เวลาในการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้นของสารยับยั้งอะไมเลส การสร้าง complex นี้สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของอะไมเลสทำให้ลดการย่อยแป้งลง การจับกันแบบ 1:1 นี้ จะแตกตัวที่ pH ต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์ และไม่แตกตัวโดยสภาวะอื่นๆที่ไม่เหมาะสมต่อการยับยั้ง (pH สูง หรืออุณหภูมิต่ำ) (Powers and Whitaker, 1977; Wilcox and Whitaker, 1984) การยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสของสารยับยั้งอะไมเลส เกิดได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ 5.5 จนถึง pH เป็นกลาง (pH 7.0) การจับกันของสารยับยั้งอะไมเลสและอะไมเลสสามารถถูกทำลายลงที่อุณหภูมิ 100 °ซ

ความคงทนต่อความร้อนของตัวยับยั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับเลคตินในถั่ว เมื่อให้ความร้อนที่ 80 °ซ ประมาณ 30 นาที จะไม่ทำให้ระดับของปฏิกิริยาการยับยั้งในถั่วเปลี่ยนแปลงไป และเมื่อให้ความร้อนที่ 90 °ซ ประมาณ 30 นาที จะทำให้ปฏิกิริยาการยับยั้งลดลงอย่างมาก แต่ยังไม่สูญเสียอย่างสิ้นเชิง ถ้าให้ความร้อนที่ 100 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที จึงจะทำให้ปฏิกิริยาในสารยับยั้งอะไมเลสหมดไป ความแตกต่างระหว่างสารยับยั้งอะไมเลสของถั่ว (phaseolamin) และสารยับยั้งอะไมเลสของข้าวสาลี คือสารยับยั้งอะไมเลสของข้าวสาลีเป็นโปรตีนที่ทนความร้อน ส่วน phaseolamin ค่อนข้างทนความร้อน จึงใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °ซ ในการทำบริสุทธิ์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม phaseolamin ถูกทำลายอย่างรวดเร็วที่ความร้อน 100 °ซ (Marshall and Lauda, 1975) สารยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดเมล็ดของ pigeonpea คงตัวและทำงานได้ดีในช่วง pH 4.5-9.5 โดยมีค่าการยับยั้งต่ออะไมเลสจากน้ำลายสูงสุดที่ pH 7.0 ค่า Isoelectric point ของสารยับยั้งอะไมเลส ตรวจสอบโดยการย้อมแอคทิวิตีหลังจากทำ isoelectro focusing gel มีค่าเท่ากับ 6.2 ทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น trypsin, chymotrypsin, bromelain และโปรตีเอสในเมล็ดของ pigeonpea เอง สารยับยั้งอะไมเลส ของ pigeonpea คงตัวที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาหลายชั่วโมง และการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นหลังจากบ่มไว้ที่ 60 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากมี

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบไม่ย้อนกลับ นำมาซึ่งการเพิ่มจำนวนของ active sites มากกว่า native inhibitors แต่ถ้าให้ความร้อนที่ 80 °ซ เป็นเวลา 10 นาที กิจกรรมการยับยั้งจะถูกทำลายหมดไป และการให้ความร้อน 100 °ซ 8 นาที กิจกรรมการยับยั้งจะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ การบ่มสารยับยั้งอะไมเลส ด้วย β-mercaptoethanol จะทำลายกิจกรรมการยับยั้งได้เช่นกัน (Giri and Kachole, 1998)

สารยับยั้งอะไมเลสจากพืชบางชนิดมีสมบัติของเลคติน การศึกษาโปรตีนกลุ่มที่มีสมบัติของเลคตินในเมล็ดของ lima bean (*P. lunatus*) พบว่าโปรตีนเหล่านี้มีสมบัติเป็นสารยับยั้งอะไมเลสด้วย (amylase inhibitor-like, ย่อว่า AIL) (Sparvoli *et al.*, 2001) Fakhoury และ Woloshuk (2001) รายงานว่า สารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์สารสกัดของ *Lablab purpureus* (AILP) ซึ่งสามารถยับยั้งอะไมเลสจากเชื้อรา (fungi) หลายชนิด มีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเลคตินในกลุ่ม lectin-arcelin-alpha-amylase inhibitor ซึ่งพบได้ในพืชตระกูลถั่วทั่วไป อันเป็นองค์ประกอบสำคัญในการต่อต้านแมลงศัตรูพืช การศึกษาคุณสมบัติพบว่า AILP สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน และกระต่าย ซึ่งบ่มกับเอนไซม์จากมะละกอไว้ก่อนได้ การทดลองนี้ย้ำให้เห็นว่า AILP มีสมบัติที่เป็นทั้งสารยับยั้งอะไมเลส และเลคติน อย่างไรก็ตามสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชบางชนิดอาจไม่มีคุณสมบัติของเลคตินได้ เช่น สารยับยั้งอะไมเลสจาก kidney bean ซึ่งเรียกว่า phaseolamin ไม่สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน แม้ว่าใช้ปริมาณถึง 1.08 มก./มล. ในขณะที่สารสกัดของ kidney bean เอง สามารถเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคนได้ เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดเพียง 0.02 มก./มล. การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด kidney bean มีสมบัติของเลคติน หรือมีโปรตีนอื่นที่เป็นเลคตินปนอยู่กับ phaseolamin (Marshall and Lauda, 1975)

## 1.2 แหล่งค้นพบและการสร้างสารยับยั้งอะไมเลสของพืช

การศึกษาสารยับยั้งอะไมเลสในพืชตระกูลถั่ว เช่น *Phaseolus vulgaris* (common bean) cv. Greensleeves พบสารยับยั้งอะไมเลส อยู่ในแกน (axes) และใบเลี้ยง (cotyledon) ของต้นอ่อน ซึ่งสังเคราะห์พร้อมกันกับ phaseolin และ

phytohemagglutinin เป็นโพลีเปปไทด์ขนาดเล็ก ($M_r$ 15,000-19,000) สะสมอยู่ใน vacuoles ที่เก็บสะสมโปรตีน (protein bodies) สารยับยั้งอะไมเลส ถูกสังเคราะห์ใน rough endoplasmic reticulum (RER) และปรับแต่งโครงสร้างใน golgi complex แล้วถูกขนส่งเข้าสู่ vacuoles เพื่อเก็บสะสมไว้ (Moreno *et al*., 1990)

ข้าวไร, ข้าวบาร์เล่ย์, เมล็ดและต้นของข้าวสาลี มีโปรตีนยับยั้งอะไมเลสอยู่ 2 ชนิดคือ ชนิดป้องกัน (Defense type, D-type) และชนิดควบคุม (Regulating type, R-type) โดยชนิดป้องกันมีผลยับยั้งอะไมเลสของแมลง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ชนิดควบคุมยับยั้งอะไมเลสของธัญพืชเอง จากการศึกษาในข้าวสาลีพบว่ากิจกรรมของ สารยับยั้งอะไมเลส ทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังการผสมพันธุ์ (fertilization) และสูงสุดเมื่อพัฒนาเป็นเมล็ดแก่ (Robertson and Hill, 1989; Robertson *et al*., 1989) ข้าวสาลีพันธุ์ white winter พบ R-type ปริมาณสูงในรำข้าวซึ่งเป็นส่วนของ aleurone (Morris and Paulsen, 1988) ข้าวสาลีพันธุ์ triticum ซึ่งมี $\alpha$-amylase ต่ำจะมีกิจกรรมของ สารยับยั้งอะไมเลส ชนิด R-type ต่ำกว่าพันธุ์ที่มี $\alpha$-amylase สูง (Masojc and Larsson-Raznikiewicz, 1991) ขณะที่เมล็ดข้าวสาลีกำลังงอกพบว่ากิจกรรมของ สารยับยั้งอะไมเลสไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 48 ชม. แรก แม้ว่ากิจกรรมของ $\alpha$-amylase จะเพิ่มขึ้นสูง การค้นพบนี้แสดงว่าสารยับยั้งอะไมเลส และ $\alpha$-amylase อยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อ embryo ต่างบริเวณกัน (Kanzaki *et al*., 1993) การศึกษาของ Taufel *et al*. (1997) โดยใช้ข้าวไรเป็นตัวอย่างพบ สารยับยั้งอะไมเลส ทั้ง 2 ชนิด (D และR-type) เช่น ข้าวสาลี โดย D-type มีปริมาณสูงในส่วนของ embryo และ endosperm แต่มีปริมาณค่อนข้างต่ำในส่วนของ aleurone ส่วนใน epidermis พบได้น้อย ปริมาณความเข้มข้นของ D และR-type ยังแปรผันตามสภาพแวดล้อมช่วงการงอกของเมล็ด ถ้าสภาพอากาศเย็นและชื้น สารยับยั้งอะไมเลส ชนิด D-type จะมีปริมาณต่ำ สภาพอากาศแห้ง D-type มีปริมาณสูง ส่วน R-type มีปริมาณสูงในสภาพอากาศชื้น และมีปริมาณต่ำเมื่ออากาศแห้ง กิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสชนิด D และR-type ของข้าวไรทุกๆสายพันธุ์ที่ทดลองจะคงที่ช่วง 72 ชม.แรกของการงอก คล้ายกับที่พบในข้าวสาลี (Taufel *et al*., 1997)

สารยับยั้งอะไมเลส ของ pigeonpea สร้างในช่วงระยะปลายของการพัฒนาเมล็ดและสลายไปในระยะปลายของการงอกของเมล็ด ผลการศึกษา Giri และ Kachole, 1998 ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดเมล็ดที่ 20 วันหลังจากออกดอก (20 DAF) แต่เริ่มตรวจพบกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสในเมล็ดที่ 40 วันหลังจากออกดอก (40 DAF)(14.8 หน่วยกิจกรรม) สูงขึ้นอีกที่เมล็ด 50 วันหลังจากออกดอก (50 DAF)(25.6 หน่วยกิจกรรม) และสูงสุดเมื่อเมล็ดแก่เต็มที่ (32.5 หน่วยกิจกรรม) กิจกรรมของ สารยับยั้งอะไมเลส ลดลงตามระยะเวลาในการงอกของเมล็ด ซึ่งอาจเนื่องจากเกิดการย่อยสลายโปรตีนสารยับยั้งอะไมเลส ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการงอกของเมล็ด ในการศึกษาพบว่ากิจกรรมของ $\alpha$-amylase ของสารสกัดเมล็ดสูงสุดที่ 40 หลังจากออกดอก (90.8 หน่วยกิจกรรม) แล้วเริ่มลดลงที่ 50 หลังจากออกดอก (87.5 หน่วยกิจกรรม) และต่ำสุดเมื่อเมล็ดแก่ (2.6 หน่วยกิจกรรม) โดยไม่ส่งผลใดๆกับสารยับยั้งอะไมเลสภายในเมล็ด

### 1.3 การใช้ประโยชน์ของสารยับยั้งอะไมเลส

การใช้ประโยชน์จากสารยับยั้งอะไมเลสมีได้ 3 แนวทาง คือ

1). ทางการแพทย์ สารยับยั้งอะไมเลสสามารถชะลอการย่อยแป้งในทางเดินอาหาร ช่วยให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง เป็นประโยชน์แก่การรักษาโรคเบาหวานและโรคอ้วน

2). ทางการเกษตร สารยับยั้งอะไมเลสมีคุณสมบัติยับยั้งอะไมเลสของแมลง ช่วยให้สามารถใช้ประโยชน์ในการต้านทานแมลงศัตรูพืชได้

3). ทางอุตสาหกรรม การชะลอการย่อยสลายแป้งของสารยับยั้งอะไมเลสขณะที่มีการพัฒนาของเมล็ด อาจมีประโยชน์สำหรับอุตสาหกรรมทำขนมปัง

เนื่องจาก $\alpha$-amylase มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ การมี สารยับยั้งอะไมเลส ในอาหารจึงมีความสำคัญในการทำลายการย่อยแป้ง ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ของการรักษาและการควบคุมอาหาร (Marshall, 1975; Puls and Keup, 1973) สารยับยั้งอะไมเลส จากพืชโดยส่วนใหญ่จะยับยั้งอะไมเลส

ของสัตว์แต่ไม่ยับยั้งอะไมเลสของแบคทีเรีย, รา และพืชต่างๆ การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งอะไมเลส ในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของคน,สัตว์ และแมลง โดยกลุ่มวิจัยประเทศต่างๆ พบว่ามีความเป็นไปได้ในการนำสารยับยั้งอะไมเลส มาใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน,โรคอ้วนและโรคไขมันอุดตันในหลอดเลือด ปัญหาสาธารณสุขที่เกิดกับประชากรในโลกยุคปัจจุบัน เพราะผลการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลสต่ออะไมเลส เอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรทนี้มีผลต่อ carbohydrate tolerance, gastric emptying, satiety ตลอดจนการเพิ่มของน้ำหนัก (Doi *et al*., 1995; Koike *et al*., 1995)

สารยับยั้งอะไมเลส สามารถจับกับเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรทแอลฟาอะไมเลส($\alpha$-amylase)ที่ผลิตจากต่อมน้ำลาย(salivary $\alpha$-amylase) และตับอ่อน(pancreatic $\alpha$-amylase)ของคนและสัตว์ได้ ผลของการจับกันของสารยับยั้งอะไมเลสและเอนไซม์อะไมเลส ทำให้เอนไซม์ไม่ทำงานส่งผลให้การย่อยแป้งลดลง Jenkins *et al.* (1986) และ Thompson (1988) ได้ทำการศึกษาวิจัยและพบว่าสาร anti-nutrients ประเภท สารยับยั้งอะไมเลส ในพืชตระกูลถั่ว ส่งผลต่อการลดน้ำตาลในกระแสเลือดของคน โดยไปยับยั้งการย่อยสารอาหารคาร์โบไฮเดรท Choudhury *et al*. (1996) พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์จากข้าวสาลียับยั้งกิจกรรมอะไมเลสจากตับอ่อนภายในลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ได้มากกว่า 90% Koike *et al*. (1995) พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากข้าวสาลี 1.5 กรัม เมื่อทำการทดลองให้สุนัขกินเป็นเวลา 9 สัปดาห์ สามารถลดระดับกิจกรรมอะไมเลสจากตับอ่อนลงจนส่งผลต่อการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด Doi *et al*. (1995) พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสชะลอการย่อยอาหารพวกแป้ง ส่งผลลดกลูโคสในพลาสมาเหลือ 10 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ใน 15 นาที หลังอาหาร และยังลดระดับ ketone bodies หรือ 3-hydroxybutyric acid (3-OHBA) ด้วย Kataoka และ Dimagno (1999) พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสในข้าวสาลีมีปริมาณการยับยั้งอะไมเลสได้มากกว่าสารยับยั้งอะไมเลสในถั่วขาว สารยับยั้งอะไมเลสนี้มีประโยชน์ต่อการช่วยลดน้ำหนักในโรคอ้วน และช่วยในการรักษาโรคเบาหวานได้

การย่อยอาหารประเภทแป้งลดลงมากกว่า 20 % เมื่อในลำไส้มีสารยับยั้งอะไมเลสที่มีความเข้มข้น 3-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อาหารที่เป็นคาร์โบไฮเดรทจะเกิดการย่อยอย่างไม่สมบูรณ์ (Layer *et al*.,1985) การย่อยแป้งและการดูดซึมที่ช้าลงและการเพิ่มขึ้นของคาร์โบไฮเดรทที่ผ่านเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ อาจเป็นประโยชน์ต่อการรักษาโรคเบาหวานหรือโรคอ้วน อัตราการย่อยคาร์โบไฮเดรทในทางเดินอาหารสามารถตรวจสอบโดยหาปริมาณกลูโคสในพลาสมาหลังอาหาร (Jenkins *et al*., 1980; O'Dea *et al*., 1981)

การศึกษาทางชีวเคมีพบว่าเราสามารถพัฒนาการสร้างกลไกทางธรรมชาติเพื่อปกป้องการทำลายเมล็ดพืชจากแมลงและเชื้อโรคต่างๆ ได้ 2 แนวทางคือ

1). เหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์สารยับยั้งอะไมเลสโดยเร็วในระยะที่อ่อนแอที่สุดต่อการถูกแมลงรุกราน และ/หรือ

2). สร้าง transgenic plants ที่มีสารยับยั้งอะไมเลสซึ่งมีความจำเพาะหลากหลายต่อการยับยั้งอะไมเลสของแมลงชนิดต่างๆ (Gatehouse *et al*., 1986; Baker, 1988; Ishimoto and Kitamura, 1989; Gomez *et al*., 1991)

Shade *et al*. (1994) สร้าง Transgenic pea (*Pisum sartivum*) ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยนำยีน สารยับยั้งอะไมเลส ของ *Phaseolus vulgaris* ไปใส่ เพื่อให้เมล็ดของ pea ต้านทานแมลงได้ Chrispeels *et al*. (1998) สร้าง transgenic pea (*Pisum sartivum*) และ adzuki bean (*Vigna angularis*) โดยการนำ cDNA ของ αAI-1 จาก *Phaseolus vulgaris* การแสดงออกของยีนช่วยให้ pea และ adzuki bean สามารถต้านทานการกัดกินของแมลงกลุ่ม old world bruchids ได้ถึง 3 สายพันธุ์ คือ pea weevil (*Bruchus pisorum*), cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) และ adzuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis*) Ishimoto และ Kitamura (1989), Chrispeels และ Raikhel (1991) พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสจาก kidney bean มีพิษต่อ cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) และ adzuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis*) ที่ความเข้มข้น 2-5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร แต่ Grant *et al*. (1995) ได้แนะนำว่าการสร้าง transgenic plant ที่

มีสารยับยั้งอะไมเลสในปริมาณสูงอาจทำให้คนหรือสัตว์ที่กินพืชได้รับพลังงานจากสารคาร์โบไฮเดรทลดน้อยลง ก่อนทำ transgenic plant จึงควรหาค่าเฉลี่ยของสารยับยั้งอะไมเลสในพืชทุกชนิดอย่างหลากหลายถึงปริมาณที่สามารถบริโภคได้โดยไม่เกิดพิษ ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ต่อไปอีก เพื่อจะได้นำสารยับยั้งอะไมเลสมาใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่

หน้าที่หลักของ สารยับยั้งอะไมเลส คือ ควบคุมกิจกรรมของอะไมเลสขณะที่เมล็ดกำลังสังเคราะห์เม็ดแป้ง (starch granule) ในระหว่างการเจริญเติบโต และสามารถป้องกันการทำลายต้นอ่อนในเมล็ดจากอะไมเลสก่อนการเก็บเกี่ยวได้ (Mundy *et al*., 1983; Robertson and Hill, 1989) สารยับยั้งอะไมเลสจึงอาจมีประโยชน์ในโรงงานทำขนมปัง จากการศึกษาพบว่าสามารถปรับปรุงสมบัติในขนมปังของผงแป้งจากต้นอ่อนของข้าวสาลี ได้โดยเติม $\alpha$-amylase/subtilisin inhibitor (BASI) (Zawistowska *et al*., 1988) ในอุตสาหกรรมเบียร์ พบว่า BASI อาจมีผลต่ออัตราการย่อยแป้งในระยะแรกของการบด แต่ปฏิกิริยาการยับยั้งอาจสูญเสียในการบดแป้งที่อุณหภูมิปกติได้ (Munck *et al*., 1985)

## 1.4 วิธีการสกัดสารยับยั้งอะไมเลส

การสกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากตัวอย่างมี 2 วิธีหลักคือ แบบที่ใช้ความร้อนและไม่ใช้ความร้อนในการสกัด

1). วิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัด

วิธีของ Moreno *et al*. (1990) โดยนำ cotyledons ของเมล็ดถั่ว *Phaseolus vulgaris* (common bean) cv. Greensleeves มาบดใน 10 mM $\beta$-mercaptoethanol (1:3 w/v) เซนตริฟิวจ์ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำส่วนใสมาเติมบัฟเฟอร์ 0.2 M succinate, 0.1 M $CaCl_2$ (pH 3.8)(110 $\mu$l/ml) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 10 นาที กำจัดตะกอนโปรตีนโดยการเซนตริฟิวส์ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสมาปรับ pH เป็น 5.6 ด้วย NaOH เก็บไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป

Grant *et al*. (1995) นำเมล็ดถั่วมาบดแล้วสกัดใน 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.9, NaCl 9 กรัม/ลิตร (1:5 w/v) คนเป็นเวลา 16 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ หลังจากนั้นนำมาเซนตริฟิวจ์ที่ 50,000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใส นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงทันทีด้วยน้ำแข็ง แล้วจึงเซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่ 50,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาเก็บไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป

Marshall และ Lauda (1975) นำเมล็ดถั่วมาบดให้ละเอียดแล้วคนด้วย 1% สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 1 ชม.ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเซนตริฟิวจ์ที่ 27,000 g เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสมาบ่มที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 15 นาที กำจัดตะกอนโปรตีนโดยเซนตริฟิวจ์ที่ 27,000 g เป็นเวลา 60 นาที เก็บส่วนใสไว้ทำการทดลองต่อไป

2). วิธีที่ไม่ใช้ความร้อนในการสกัด

Giri และ Kachole (1996) นำเมล็ดถั่ว (pigeonpea) มาล้างและทำแห้ง แล้วนำไปบดละเอียดเป็นผงแล้วละลายใน hexane เพื่อกำจัดไขมันออกไป ทำแห้งและบดอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นนำมาคนด้วย 0.1 M HCl ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M NaCl และ 1% PVP (1:6 w/v) เป็นเวลา 2-2.5 ชม. นำไปเซนตริฟิวส์ที่ 12,000 g แล้วจึงปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1 M NaOH นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเท่าเดิมอีกครั้งหนึ่ง เก็บส่วนใสไว้ทำการทดลองต่อไป

PVP เป็นตัวตกตะกอน polyphenols(Singh, 1984) สารสกัดที่มีและไม่มี PVP จะมีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสคล้ายกัน แสดงว่ากิจกรรมการยับยั้งในสารสกัดของเมล็ด pigeonpea ไม่เกี่ยวข้องกับ free polyphenols

Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) นำเมล็ดถั่วแช่น้ำค้างคืนไว้แล้วนำไปบดในโกร่งบดที่เย็นด้วยบัฟเฟอร์ 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1 M NaCl, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (1:10 w/v) นำมาเซนตริฟิวจ์ที่ 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ทำการทดลองต่อไป

**1.5 วิธีการหาค่าร้อยละการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลส (% inhibition of amylase)**

การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลส ประกอบด้วย 3 ขั้นหลักๆ คือ

1). ให้ สารยับยั้งอะไมเลส จับกับเอนไซม์อะไมเลสตามระยะเวลา

2). วัดกิจกรรมอะไมเลสที่เหลือจากการจับโดยใช้ปฏิกิริยาการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวกลูโคส

3). ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นซึ่งมีหลายวิธีคือ วิธีทดสอบโดย 3,5-dinitrosalicylic acid, วิธีทดสอบโดย alkaline copper reagent หรือตรวจวัดปริมาณสับสเตรทแป้งที่ไม่ถูกย่อยโดยวิธีไอโอดีน

Marshall และ Lauda (1975) หาค่าร้อยละการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลสโดยนำสารยับยั้งอะไมเลส มาบ่มกับอะไมเลสที่แต่ละอุณหภูมิ (0, 25 และ 37 °ซ) ในบัฟเฟอร์ 33.3 mM sodium glycerophosphate, pH 6.9 ค่ากิจกรรมที่เหลือจากการถูกยับยั้งของอะไมเลส ตรวจสอบโดยวิธี iodine staining assay ซึ่งเป็นวิธีการวัดความเข้มของสีย้อมไอโอดีนที่ลดลงในระหว่างปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลสกับน้ำแป้ง โดยเตรียมอะไมเลส 1 หน่วย (จำนวนซึ่งทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของ reducing sugar ต่อ 1 นาที) ปริมาตรรวม 2.5 มล. กิจกรรมที่เหลือหลังจากการบ่มอะไมเลสกับสารยับยั้ง นำมาตรวจสอบการย่อยโดยดูปฏิกิริยาเอนไซม์จากการเติมน้ำแป้ง หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 5 นาที นำสารตัวอย่าง 0.1 มล. จากการย่อยมาเติมในสารละลาย 0.02 % iodine ใน 0.2 % potassium iodide (KI) แล้วจึงนำไปวัดความเข้มของสีที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร ในการศึกษาคุณสมบัติของ phaseolamin โดยใช้อะไมเลสจากตับอ่อนของหมูมีขั้นตอนที่คล้ายกัน ยกเว้นปฏิกิริยาเอนไซม์ในการย่อยทำโดยเติมน้ำแป้งในบัฟเฟอร์ 40 mM sodium glycerophosphate, pH 6.9 การวัดกิจกรรมของอะไมเลสที่เหลือทำโดยบัฟเฟอร์ด้วย pH 6.9 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ แล้วตรวจสอบ reducing sugars ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อน้ำแป้ง โดยใช้

alkaline copper reagent

Giri และ Kachole (1996) ทำการตรวจสอบโดยตรวจวัดปริมาณมอลโตส ที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยด้วยอะไมเลสจากต่อมน้ำลาย โดยใช้ dinitrosalisylic acid reagent (DNS) (Bernfeld, 1955; Fossum and Whitaker, 1974) กิจกรรมอะไมเลส 1 หน่วย หมายถึง การเกิดมอลโตส 1 มก. จากแป้งที่อุณหภูมิ 37 °ซ pH 6.9 ในเวลา 3 นาที ส่วนกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส 1 หน่วย หมายถึง อะไมเลส 1 หน่วย ที่ถูกยับยั้งภายใต้ภาวะดังกล่าว

Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) ทำการตรวจสอบโดยบ่มเอนไซม์กับสารสกัดสารยับยั้งอะไมเลส เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในบัฟเฟอร์ 15 mM succinate (pH 5.6), 20 mM $CaCl_2$, 0.5 M NaCl และ 2 มก./มล. BSA ก่อนทำการตรวจสอบกิจกรรมอะไมเลสซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Bernfeld (1955) โดยนำเอนไซม์มาบ่มกับ 1% น้ำแป้งที่เตรียมใน 40 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, pH 6.9 หยุดยั้งปฏิกิริยาโดยเติม 1 มล. dinitrosalisylic acid reagent แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที เติมน้ำ 8 มล. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 nm ผลที่ได้เปรียบเทียบกับจำนวนที่เท่ากันของเอนไซม์ที่ไม่มีสารยับยั้งรวมอยู่ด้วย (amylase inhibitor 1 unit หมายถึง จำนวนของสารยับยั้งอะไมเลสที่ยับยั้ง amylase 1 unit อย่างสมบูรณ์) กราฟมาตรฐานเตรียมโดยใช้มอลโตส (amylase 1 unit หมายถึง จำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 μmol ของมอลโตสใน 1 นาทีที่อุณหภูมิ 25 °ซ)

การตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งอะไมเลส ทำโดยวัดอัตราการยับยั้งต่ออะไมเลส เช่น นำสารละลายสารยับยั้งอะไมเลส จำนวนหนึ่งมาบ่มกับอะไมเลสจากตับอ่อนของหมูที่อุณหภูมิ 37 °ซ (ประมาณ 1 ไมโครกรัม ประกอบด้วย 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์) ใน 33.3 mM sodium glycerophosphate buffer, pH 6.9 ปริมาตรรวม 1.5 มล. หลังจากบ่มในระยะเวลาหนึ่งแล้ว ก็เติมน้ำแป้งลงไป 1 มล. ทำการวัดกิจกรรมอะไมเลสที่เหลือด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นพร้อมกับ substrate blank และน้ำย่อยที่เป็นตัวควบคุมเห็นว่าการยับยั้งได้สัดส่วนกับจำนวนของสารยับยั้ง การใช้จำนวนของสารยับยั้ง และระยะเวลาในการบ่ม ไม่ควรให้ค่าการยับยั้งต่อกิจกรรมอะไมเลสเกิน

50 % มักจะใช้เวลาบ่ม 20 นาที และหากิจกรรมอะไมเลสที่เหลือในเวลา 5 นาที (1 หน่วย ของกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลส คือจำนวนที่ทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสที่ 50 % ในเวลา 20 นาที ภายใต้ภาวะดังกล่าว) แม้ว่าส่วนใหญ่แล้วกิจกรรมของสารยับยั้งอะไมเลส ทำการวัดที่ pH 6.9 แต่เมื่อศึกษาคุณสมบัติของสาร สารยับยั้งอะไมเลส ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว แสดงให้เห็นว่าไม่ใช่ pH สูงสุดสำหรับทำการหาค่าการยับยั้ง การศึกษาคุณสมบัติส่วนใหญ่ของ สารยับยั้งอะไมเลส ทำโดยบ่มกับอะไมเลสที่ pH 5.5 ตามด้วยวัดกิจกรรมอะไมเลสที่เหลือที่ pH 6.9 (Marshall and Lauda, 1975)

ปฏิกิริยาของอะไมเลสกับสารยับยั้ง ตรวจสอบโดยบ่มอะไมเลส (0.81 μg) กับสารยับยั้งอะไมเลส (0.4 μg) ด้วยระยะเวลาที่ต่างกันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่สุด โดยทำที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในสารละลาย 6.7 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ซึ่งมีส่วนประกอบเดิม ปริมาณ 1.5 มล. ส่วนกิจกรรมอะไมเลสที่เหลือหลังจากการบ่ม ตรวจวัดโดยเติมสารละลายน้ำแป้ง และนำมาทดสอบการย้อมด้วยไอโอดีน จำนวนของอะไมเลสคำนวณโดยใช้ molar extinction coefficient ที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 nm (Caldwell *et al*., 1952) ส่วนจำนวนของสารยับยั้งอะไมเลสตรวจวัดภายใต้น้ำหนักแห้งรวม การยับยั้งเกิดขึ้นสูงสุดที่ 41.5 % ซึ่งใช้อะไมเลส 0.34 μg สามารถยับยั้งโดยสารยับยั้งอะไมเลส 0.4 μg มวลโมเลกุลของอะไมเลส คือ 51,300 ดาลตัน ส่วนสารยับยั้งอะไมเลสคือ 49,000 ดาลตัน ในการคำนวณสมมติว่าโปรตีนทั้งหมดในอะไมเลสคือ active enzyme

อัตราการยับยั้งต่อ hog pancreatic, helix pomatia α-amylase(ได้จาก human intestinal juice) และ human salivary เมื่อ ตรวจสอบโดยทำการบ่มกับสารยับยั้งอะไมเลสที่ระยะเวลาต่างกัน หลังจากบ่มแล้ววัดกิจกรรมอะไมเลสที่เหลือด้วยวิธี iodine staining assay ผลการทดลองพบว่า hog pancreatic, salivary α-amylase และhelix pomatia α-amylase มีอัตราการยับยั้งใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 97 ,94 และ 100 ตามลำดับ

## 1.6 วิธีการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส

การทำบริสุทธิ์ สารยับยั้งอะไมเลส ทำได้หลายวิธีโดยมีขั้นตอนหลักๆคือ

1). ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และการกำจัดโปรตีนด้วยความร้อน

2). ผ่านคอลัมน์โครมาโตรกราฟีแบบต่างๆ

3). ทดสอบความบริสุทธิ์โดยการหากิจกรรม และทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

การทำบริสุทธิ์มีได้หลายวิธีดังนี้

จากวิธีของ Marshall และ Lauda (1975) พบว่า kidney beans, *Phaseolus vulgaris* ซึ่งมีตัวยับยั้งของอะไมเลสที่มีชื่อว่า phaseolamin ทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธี heat treatment, dialysis และ ผ่าน chromatography แบบ DEAE-cellulose, sephadex G-100 และ CM-cellulose ซึ่ง phaseolamin จะปรากฏอยู่ในระดับ 4-5 กรัม/กิโลกรัม ของปริมาณถั่วที่ใช้ การทำบริสุทธิ์ของ phaseolamin ใช้ affinity binding โดยแยกอะไมเลสจากตับอ่อนของหมู จากสารสกัดหยาบหรือสารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์แล้วบางส่วน โดยใช้หลักการจับกับ sepharose 4 B ตามวิธีของ Porah *et al*. (1967) Sepharose-$\alpha$-amylase conjugate นี้เก็บที่ 20 mM acetate buffer, pH 5.5 ซึ่งประกอบด้วย 4 mM $CaCl_2$ การเตรียมสารยับยั้งอะไมเลส มีวิธีการคือนำสารยับยั้งอะไมเลสมาละลายหรือไดอะไลส์ใน 20 mM acetate buffer, pH 5.5 ที่มี 4 mM $CaCl_2$ แล้วเติม immobilized $\alpha$-amylase หลังจากนั้นนำมาบ่มที่ 37 $^{o}$ซ เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว แล้วเจลจะถูกแยกออกจากสารละลายโดยการเซนตริฟิวส์และล้างด้วยบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นทำให้สารยับยั้งอะไมเลสหลุดออกจาก complex bound $\alpha$-amylase โดยล้างด้วย 100 mM citrate/phosphate buffer, pH 3.1 อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความสะดวกน้อยกว่าใช้เทคนิคการตกตะกอน เนื่องจากเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ยิ่งกว่านั้นวิธี affinity binding ไม่สามารถกระทำการโดยใช้ column chromatography เนื่องจากความจำเป็นที่จะบ่มเอนไซม์และสารยับยั้งที่อุณหภูมิสูง ข้อเสียอีกอย่างของ affinity method คือมักเกิดการทำลายโดยภาวะ pH ต่ำซึ่งจำเป็นในการกลับคืนสภาพ

เดิมของ phaseolamin เพื่อยับยั้งการทำงานของอะไมเลส แต่วิธีการนี้ก็ต้องกล่าวถึงเพราะอาจจะเป็นทางเลือกอย่างหนึ่งสำหรับการแยกสารยับยั้งอะไมเลสจากแหล่งอื่นๆ ที่ไม่สามารถทำบริสุทธิ์โดยวิธีธรรมดาได้ วิธี affinity chromatography ชนิดนี้ใช้บ่อยในการแยกสารยับยั้งของ proteolytic enzyme (Fritz *et al*., 1970; Feinstein, 1971)

จากวิธีของ Yamagata *et al*. (1998) สารยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดตัวอย่างถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 60% ของความอิ่มตัว แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์แยกตะกอนออกมา ละลายคืนด้วยปริมาตรน้อยที่สุดใน 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 และไดอะไลส์เป็นเวลา 3 วัน ในบัฟเฟอร์เดิม โปรตีนที่ไม่ละลายจะถูกกำจัดออกโดยการเซนตริฟิวจ์ แล้วนำสารละลายที่ได้มาผ่านลงบนคอลัมน์ CM-cellulose หลังจากล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมแล้วชะคอลัมน์ด้วย linear gradient ของ 0-0.2 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดิม นำหลอดที่มีกิจกรรมของการยับยั้งอะไมเลสมารวมเข้าด้วยกัน และตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 60% ของความอิ่มตัวอีกครั้ง เก็บตะกอนหลังจากเซนตริฟิวจ์และละลายคืนด้วยปริมาตรน้อยที่สุดในบัฟเฟอร์เดิม นำสารละลายที่ได้นี้มาผ่านลงบนคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม นำหลอดที่มีกิจกรรมของการยับยั้งอะไมเลสมารวมเข้าด้วยกันอีก แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 60% ของความอิ่มตัว หลังจากเซนตริฟิวจ์ นำตะกอนมาละลายคืนด้วยปริมาตรน้อยที่สุดในบัฟเฟอร์เดิม แล้วจึงทำวิธีเจลฟิลเตรชั่นแบบเดิมซ้ำอีก 1 รอบ ในครั้งนี้เมื่อรวมหลอดที่มีสารยับยั้งอะไมเลสได้แล้ว ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำมาละลายคืนใน 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ไดอะไลส์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมเป็นเวลา 2 วัน นำสารละลายที่ได้มาผ่านลงบนคอลัมน์ CM-cellulose หลังจากล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมแล้ว ชะคอลัมน์ด้วย linear gradient ของ 0-0.25 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดิม นำหลอดที่มีกิจกรรมของการยับยั้งอะไมเลสมารวมเข้าด้วยกัน และตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอีกครั้ง เก็บตะกอนหลังจากเซนตริฟิวจ์ และละลายคืนด้วยปริมาตรน้อยที่สุดในบัฟเฟอร์เดิม นำสารละลายมาผ่านคอลัมน์ CM-cellulose ด้วยวิธีเดิมอีกครั้ง รวมหลอดที่มีกิจกรรมของการยับยั้ง

อะไมเลสมารวมเข้าด้วยกัน และตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอีกครั้ง เก็บตะกอนหลังจากเซนตริฟิวจ์ และละลายคืนด้วยปริมาตรน้อยที่สุดในบัฟเฟอร์เดิม นำสารละลายมาผ่านคอลัมน์ CM-cellulose ด้วยวิธีเดิมอีกครั้ง รวมหลอดที่มีกิจกรรมของการยับยั้งอะไมเลสเข้าด้วยกัน แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ละลายคืนด้วย 1 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 แล้วไดอะไลส์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมเป็นเวลา 2 วัน นำสารละลายที่ได้มาผ่านลงบนคอลัมน์ Hydroxyapatite หลังจากล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมแล้ว ชะคอลัมน์ด้วย stepwise elution ของ 10, 100 และ 500 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 นำหลอดที่มีกิจกรรมของการยับยั้งอะไมเลสมารวมเข้าด้วยกัน และตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

### 1.7 การหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลส

การหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสสามารถทำได้ 2 วิธีคือ ตรวจสอบโดยใช้อิเล็กโทรฟอรีซิส และวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตรกราฟี

Moreno และ Chrispeels. (1989) พบว่าจากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสของสารยับยั้งอะไมเลส แสดงให้เห็น polypeptides 3 แถบ ในช่วงมวลโมเลกุล 30,000-35,000 ดาลตัน เมื่อทำให้เกิดโพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่มีขนาดมวลโมเลกุล 25,000 ดาลตัน แสดงให้เห็นว่า โพลีเปปไทด์ 3 แถบนี้แตกต่างกันด้วยจำนวนของไกลแคน (เช่น เป็นพวกไกลโคฟอร์ม ซึ่งได้จากการวิเคราะห์สภาพของคาร์โบไฮเดรทในโพลีเปปไทด์ของสารยับยั้งอะไมเลส) หลังจาก deglycosylation แล้ว เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าหน่วยย่อยของสารยับยั้งอะไมเลส มีมวลโมเลกุล 15,000 ดาลตัน Power และ Whitaker (1977) พบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE น้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสอาจต่ำกว่าเมื่อเทียบกับที่คำนวนจากการผ่านเจลฟิลเตรชัน เนื่องจากอาจเกิดการคลาดเคลื่อนของไกลโคโปรตีนเมื่อผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน Giri และ Kachole (1998) นำสารสกัดและสารที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำ Native-PAGE 7% ซึ่งมี 0.5% น้ำแป้งจากวิธีของ Davis (1964) หลังจากนั้นนำไปทำให้สมดุลในบัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์หากิจกรรมอะไมเลสเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงบ่มในสาร

ละลายอะไมเลส (20 หน่วย/มล.) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ล้างผ่านน้ำแล้วนำไปย้อมในสารละลายไอโอดีน (10 mM $I_2$ ใน 14 mM KI) เป็นเวลา 5 นาที ล้างไอโอดีนส่วนเกินออกด้วยน้ำ พบแถบที่เป็นสารยับยั้งอะไมเลสติดสีน้ำเงินเพราะมีการจับกับสารละลายอะไมเลสทำให้ไม่มีอะไมเลสเหลือไปย่อยน้ำแป้ง เมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน

Marshall และ Lauda (1975) หาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลส โดยใช้ sephadex chromatography ที่มีขนาดแตกต่างกันคือ sephadex G-100 บนคอลัมน์ขนาด 90 x 1.5 ซม. และ G-200 บนคอลัมน์ขนาด 86 x 2.5 ซม. ซึ่งใน sephadex G-100 สารยับยั้งอะไมเลสจะออกมาที่ขนาดมวลโมเลกุล 43,500 ดาลตัน เมื่อใช้ปริมาณตัวอย่าง 50 มก. และใน sephadex G-200 ออกมาที่ขนาดมวลโมเลกุล 49,000 ดาลตัน เมื่อใช้ปริมาณตัวอย่าง 100 มก. แสดงว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 40,000-50,000 ดาลตัน

Yamagata *et al*. (1998) หาขนาดมวลโมเลกุลโดยวิธีของ Andrews (1964) ซึ่งใช้เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีคอลัมน์ Sephadex G-75 ทำให้สมดุลด้วย 0.1 M acetic acid ใช้โปรตีนมาตรฐานคือ myoglobin ($M_r$ 17,000 ดาลตัน), chymotrypsinogen A (25,000 ดาลตัน) และ ovalbumin (45,000 ดาลตัน) เก็บสารละลายที่ออกมาหลอดละ 3 มล. ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร หาขนาดมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยโดยวิธี SDS-PAGE ด้วยโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวรวมทั้ง bovine serum albumin ($M_r$ 17,000 ดาลตัน)

## 1.8 เกี่ยวกับตัวอย่าง

เนียงนก (*Archidendron clypearia*) พืชเป้าหมายในการศึกษา เป็นพืชท้องถิ่นที่มีกลิ่นฉุนรุนแรงของสารประกอบซัลเฟอร์ที่สูง การศึกษาวิจัยของ Utarabhand (1990) พบว่าโปรตีนในสารสกัดเมล็ดเนียงนก มีคุณสมบัติของเลคตินคือสามารถจับกลุ่มอสุจิได้ เมื่อพิจารณาจากข้อมูลการวิจัยพื้นฐานตามผลงานดังกล่าว ประกอบกับความรู้ที่ได้จากการตรวจเอกสารในเรื่องคุณสมบัติทั่วไปของสารยับยั้งอะไมเลส

และการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของสารยับยั้งอะไมเลสที่สกัดได้จากแหล่งต่างๆว่า สารยับยั้งอะไมเลสเป็นโปรตีนที่มีปริมาณกรดอะมิโน cystein สูง (Strobl *et al.* 1995; Nitti *et al.* 1995) มีสมบัติของเลคติน และงานวิจัยเบื้องต้นของผศ.ดร.อโนชา ตั้งโพธิธรรม ได้พบว่าในสารสกัดเนียงนกมีสารยับยั้งอะไมเลสอยู่ระดับหนึ่ง(ไม่ได้ตีพิมพ์) งานวิจัยนี้จึงเลือกเนียงนกเป็นตัวอย่างในการศึกษาวิเคราะห์ถึงคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารนี้โดยละเอียด

เนียงนกเป็นพืชสกุลถั่วคล้ายสะตอ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Archidendron clypearia* หรือ *Archidendron bubalinum* Nielsen หรือ *Abarema bubalinum* Kosterm หรือ *Pithecolobium bubalinum* Benth หรือ *Pithecellobium bubalinum* Berkil เนียงนกเป็นพืชในวงศ์เดียวกับเนียงธรรมดา คือ sub-family Mimosaceae มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามพื้นที่ เช่น แถวจังหวัดปัตตานีเรียก กะนัวะ หรือ ยิริงบูกง แถวจังหวัดนราธิวาสเรียกว่า กือด๊ะ ลักษณะทั่วไปของเนียงนกคล้ายคลึงกับเนียงธรรมดามาก โดยเฉพาะใบ ส่วนลักษณะเด่นของเนียงนกที่แตกต่างไปจากเนียงธรรมดา คือ ฝักเกือบไม่มีส่วนคอดเว้าระหว่างเมล็ด มีขนาดกว้าง 2.5 ซม. ตัวฝักตรงหรือบิดเพียงเล็กน้อยมีขนปกคลุม ผิวด้านในของฝักมีสีแดงอมส้ม ผิวด้านนอกมักมีสีเขียว ช่อดอกออกตามปลายกิ่งและง่ามใบ เปลือกแตกเป็นร่อง ความยาวของฝักประมาณ 7-10 ซม. ขนาดฝักมะขาม มีเมล็ดรูปไข่ จำนวน 8-10 เมล็ดต่อฝักขนาดเล็กกว่าเนียงธรรมดา เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีม่วง เมล็ดยาวประมาณ 2 ซม. (รูปที่ 1) เนียงนกออกดอกประมาณเดือนมกราคม – มีนาคม ฝักจะแก่ประมาณเดือนพฤษภาคม พบเนียงนกขึ้นห่างๆ ตามชายป่าดิบชื้นบนพื้นที่ค่อนข้างราบ เฉพาะทางภาคใต้เท่านั้น (กรมป่าไม้, 2426 อ้างโดย นพรัตน์ บำรุงรักษ์, 2536) ในจังหวัดนราธิวาสพบมาก แต่ในจังหวัดภาคใต้ตอนบนแทบไม่เห็นเนียงนกขึ้นอยู่เลย เมล็ดเนียงนกใช้รับประทานได้เช่นเดียวกับเนียงธรรมดา แต่รสชาติด้อยกว่าจึงไม่เป็นที่นิยม ชาวพื้นเมืองดั้งเดิมของเกาะสุมาตราและในประเทศมาเลเซียยังใช้เนียงนกเป็นอาหารอยู่มาก นอกจากนี้ต้นเนียงนกยังเป็นไม้ที่ให้ร่มเงาได้ดีอีกด้วย ในการใช้เนียงนกเป็นอาหารมักบริโภคทั้งเปลือกหุ้มเมล็ด เพราะเชื่อว่าไม่ทำให้มีกลิ่นติดปากเหมือนเนียงธรรมดา ในด้านราคาเนียงนกมีราคาแพงกว่าเนียงธรรมดา

เนียงนกเป็นพืชสกุลถั่วจึงมีคุณค่าทางโภชนาการแน่นอน การเกิดเนียงนกเป็นพิษนั้นเกิดเฉพาะบางรายที่บริโภคเนียงนกมากเกินไป และไม่ถูกวิธี (นพรัตน์ บำรุงรักษ์, 2536)

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของเมล็ด และฝักของเนียงนก

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก
2. เพื่อตรวจหาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก
3. เพื่อศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลสจากสารสกัดเมล็ดเนียงนก
4. เพื่อทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากสารสกัดเมล็ดเนียงนก
5. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนก
6. เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของการยับยั้งในสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดเนียงนก