บทที่ 1

บทนำ

ตัวยับยั้งเอ็นไซม์อัลฟา-อะมิเลส (∝-Amylase inhibitor) ในธรรมชาติพบในพืช หรือสร้างจากจุลินทรีย์ (Microorganisms) (1) ตัวยับยั้งนี้อาจเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือสูง

ตัวยับยั้งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้แก่ Salicylic acid, Absciscis acid, สารปฏิชีวนะ norjirimycin (5-Amino-5-deoxy-D-glycopyranose) และ oligosaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1500 ซึ่งสร้างจาก strain ของ streptomyces พวกอนุพันธ์ของ oligosaccharideและ polysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 5000-8000 เป็นตัวยับยั้งที่ดีของ ∝-Amylase สารดังกล่าวสร้างจาก species ของ Ampullariella และ Actinoplanes หลายชนิด

ส่วนตัวยับยั้งที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเป็นสารพวกโปรตีนพบในพืช เช่นพบในข้าวสาลี (2, 3) ข้าวไรน์ ข้าวฟ่าง (2) ถั่วแดง (4) lima beans, runner beans, garbenzo beans, ถั่วแขก (lentils) และในมะม่วงดิบ แต่ไม่ปรากฏพบในข้าว ข้าวโพด

ผู้ทำการวิจัยได้ survey หาตัวยับยั้งในพืชหลายชนิดเช่น มันแกว ข้าวเหนียว มันฝรั่ง หัวกลอย มันเทศ และหัวเผือก แต่พบในหัวเผือกและมันเทศเท่านั้น

ในการทำการวิจัยนี้ตอนแรกได้แยก ∝-Amylase จากน้ำลายของคน และตอนหลังได้ศึกษาคุณสมบัติบางอย่างของตัวยับยั้งเอ็นไซม์อัลฟา-อะมิเลสที่สกัดจากหัวเผือก (Taro root)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1 เผือก (Taro, Eddo, Cocoyam)

ชื่อวิทยาศาสตร์ - Colocasia esculenta (5, 6)

สกุล - Colocasia

วงศ์ - Araceae

เป็นพืชหัว ที่กินได้ขึ้นอยู่ทั่วไปในแถบเขตร้อน เจริญเติบโตได้ดีบริเวณใกล้ ๆ แหล่งน้ำหรือที่ ๆ มีความชื้นพอเพียง เป็นพืชพื้นเมืองของอาเซียตะวันออกเฉียงใต้ และกระจายไปอยู่แถบ polynesia และหมู่เกาะปาซิฟิก ต่อมาได้นำไปปลูกในอเมริกาและอัฟริกา

ส่วนที่ใช้ประโยชน์คือ ส่วนที่เป็นหัว มีประชาชนหลายล้านคนที่ยังดำรงชีพด้วยการกินหัวเผือกเป็นอาหารโดยเฉพาะในหมู่เกาะฮาวาย หัวเผือกมีลักษณะค่อนข้างกลม รอบ ๆ หัวเผือกมีวงหลาย ๆ วงแทนข้อของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ตอนบนของวงเหล่านี้เป็นที่เจริญเติบโตของตาซึ่งใช้สำหรับขยายพันธุ์ต่อไป ลักษณะของใบมีขนาดใหญ่มีสีเขียวเข้มและค่อนข้างกลม เมื่อโตเต็มที่เผือกสูงประมาณ 2-3 ฟุต หัวเผือกจะโตเต็มที่มีอายุประมาณ 6-8 เดือน

หัวเผือกมีแป้งอยู่สูง มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่ามันฝรั่ง (7) คือประกอบด้วยโปรตีน แคลเซี่ยม และฟอสฟอรัสสูงกว่า มีวิตามินเอและบีหนึ่งอยู่บ้าง แต่มีวิตามินซีอยู่น้อยมาก นอกจากนี้ยังประกอบด้วยผลึกของแคลเซี่ยมออกซาเลท ซึ่งเป็นสารที่ทำให้หัวเผือกมีรสชมเมื่อรับประทานดิบ ๆ อย่างไรก็ตามรสชมจะหายไปเมื่อนำไปต้ม ปิ้ง หรือล้างด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต

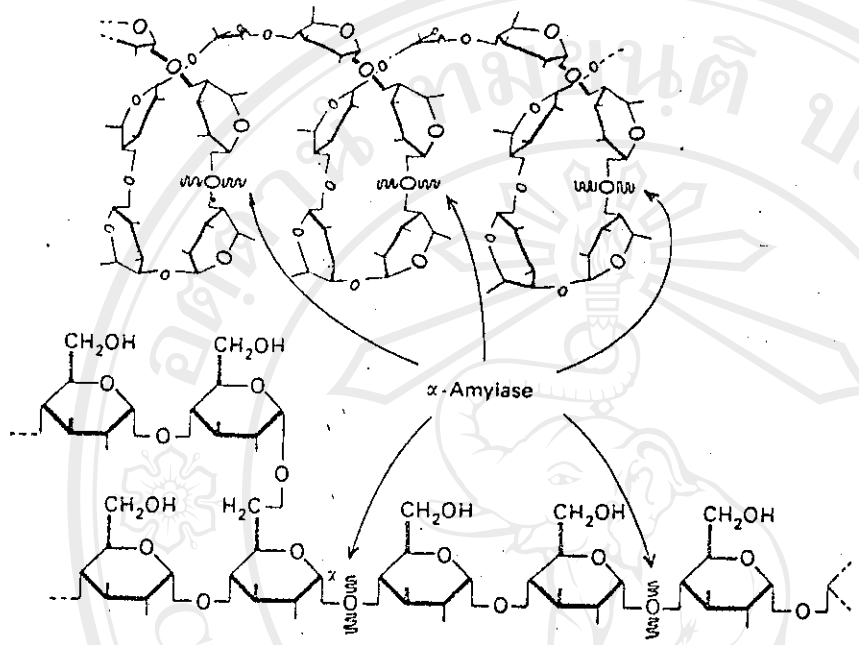
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 α-Amylase [(1 → 4)-α-D-glycan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1]

เป็นเอ็นไซม์ที่พบในน้ำลายและตับอ่อนของมนุษย์ในน้ำลาย เรียกว่า Salivary amylase (Ptyalin) จากตับอ่อนเรียกว่า Pancreatic amylase (Amylopsin)

α-Amylase ทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาการสลาย Polysaccharide (8) เช่น แป้งจากส่วนในของโมเลกุลตรงตำแหน่ง α-1,4-linkage (รูปที่ 1.1) จะได้ oligosaccharide ประกอบด้วยกลูโคส 6-7 หน่วย ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลส์ต่อไปเป็นมอลโตส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1.1 Schematic diagram of hydrolysis of starch by α-Amylase.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 ตัวยับยั้งเอ็นไซม์ (Enzyme inhibitor) (9, 10)

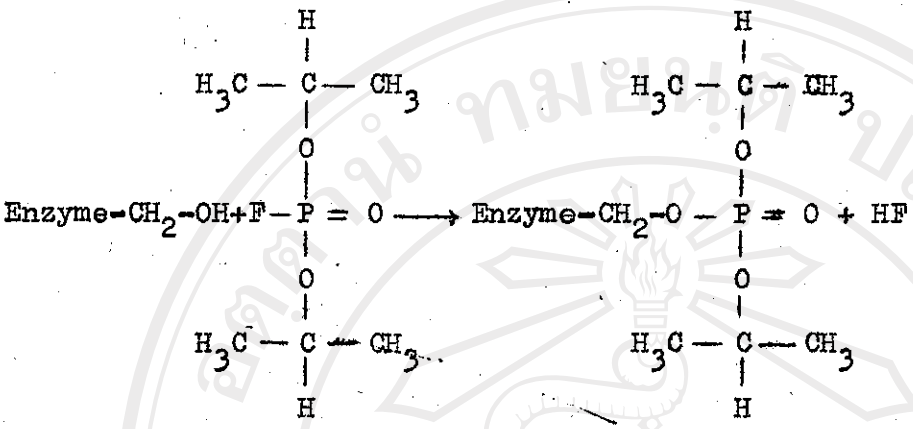
ตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ หมายถึงสารที่ทำให้เอ็นไซม์ทำงานช้าลงหรือหยุดการทำงาน การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์โดยโมเลกุลเล็กและอิออนมีความสำคัญเพราะว่าเป็นกลไกควบคุมสำคัญในระบบต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ยาและสารพิษหลายชนิดทำหน้าที่ยับยั้งเอ็นไซม์ด้วย ตัวยับยั้งแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

ก. ตัวยับยั้งแบบไม่ทวนกลับ (Irreversible inhibitor)

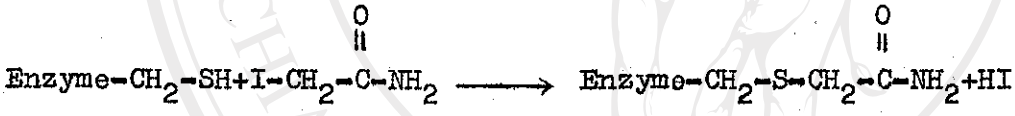
ตัวยับยั้งสามารถจับกับเอ็นไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ หรือจับอย่างแน่นหนามากทำให้แยกออกจากเอ็นไซม์ได้ช้า ตัวยับยั้งประเภทนี้เช่น Diisopropylphosphofluoridate (DIPF) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีผลต่อประสาท (nerve gas) โดยไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำงานของระบบประสาท สารนี้ทำปฏิกริยากับ serine residue ที่ active site ของเอ็นไซม์เกิดเป็น inactive diisopropylphosphoryl enzyme (รูปที่ 1.2)

นอกจากนี้ alkylation reagent เช่น iodoacetate ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ โดยทำปฏิกริยากับ cysteine residue บนโมเลกุลของเอ็นไซม์ (รูปที่ 1.3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1.2 แสดง DIPF ทำปฏิกริยากับ -OH ของ serine ของเอ็นไซม์



รูปที่ 1.3 แสดง iodoacetamide ทำปฏิกริยากับ -SH ของ cysteine ของเอ็นไซม์

ข. ตัวยับยั้งแบบกลับได้ (Reversible-inhibitor) แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) ตัวยับยั้งมีลักษณะคล้ายคลึงกับสับเสตรท จึงมีการแข่งขันกันจับกับเอ็นไซม์ได้อีก ถ้ามีตัวยับยั้งมากปฏิกริยาดำเนินไปช้า เนื่องจากสับเสตรทไม่สามารถจับกับเอ็นไซม์ได้ แต่ถ้ามีสับสเตรทมาก ตัวยับยั้งไม่สามารถทำให้ปฏิกริยาช้าลงหรือหยุดได้ สามารถเขียนสมการแสดงปฏิกริยาที่เกิดขึ้นได้ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$E + S \underset{}{\overset{K_s}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_o} E + P \quad \text{-----1}$$

$$E + I \overset{K_i}{\rightleftharpoons} EI \quad \text{-----2}$$

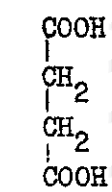
อัตราความเร็วของปฏิกริยาเมื่อมีตัวยับยั้ง (I) มีค่าดังนี้

$$v = \frac{V_{max}\left[S\right]}{K_m\left[1 + \frac{\left[I\right]}{K_i}\right] + \left[S\right]} \quad \text{-----3}$$

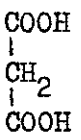
จากสมการ (3) จะเห็นว่าในปฏิกริยาเอ็นไซม์ที่มี I อยู่ด้วย V_{max} ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ K_m ที่วัดหรือที่ปรากฏคือ K_m(app.) จะมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ I สูงขึ้น (รูปที่ 1.5 ก.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

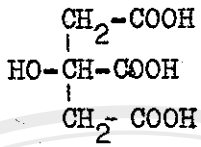
ตัวอย่างตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (11) ได้แก่ (รูปที่ 1.4)



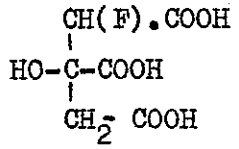
Succinic acid



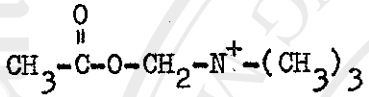
Malonic acid (inhibitor)



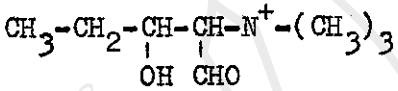
Citric acid



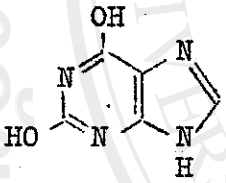
Fluorocitric acid (inhibitor)



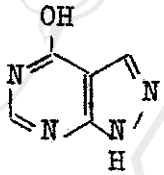
Acetylcholine



Muscarine (inhibitor)



Xanthine



4-Hydroxypyrazolopyrimidine (HPP ; inhibitor)

รูปที่ 1.4 แสดงตัวยับยั้งแบบแข่งขันของสารต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. <u>ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน</u> (Noncompetitive inhibitor)

ตัวยับยั้งสามารถจับกับเอ็นไซม์ในลักษณะทวนกลับได้ถึงแม้จะมีสับสเตรทจับอยู่ทำให้เกิดมีทั้ง EI และ EIS complex ซึ่งไม่สามารถทำปฏิกริยาได้ เนื่องจากตัวยับยั้งประเภทนี้ไม่ได้จับที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์

ตัวยับยั้งชนิดนี้ทำหน้าที่ไปลดค่า Turnover number ของเอ็นไซม์มากว่าที่จะลดสัดส่วนของเอ็นไซม์ที่จับกับสับสเตรท

สมการแสดงปฏิกริยาต่าง ๆ ดังนี้

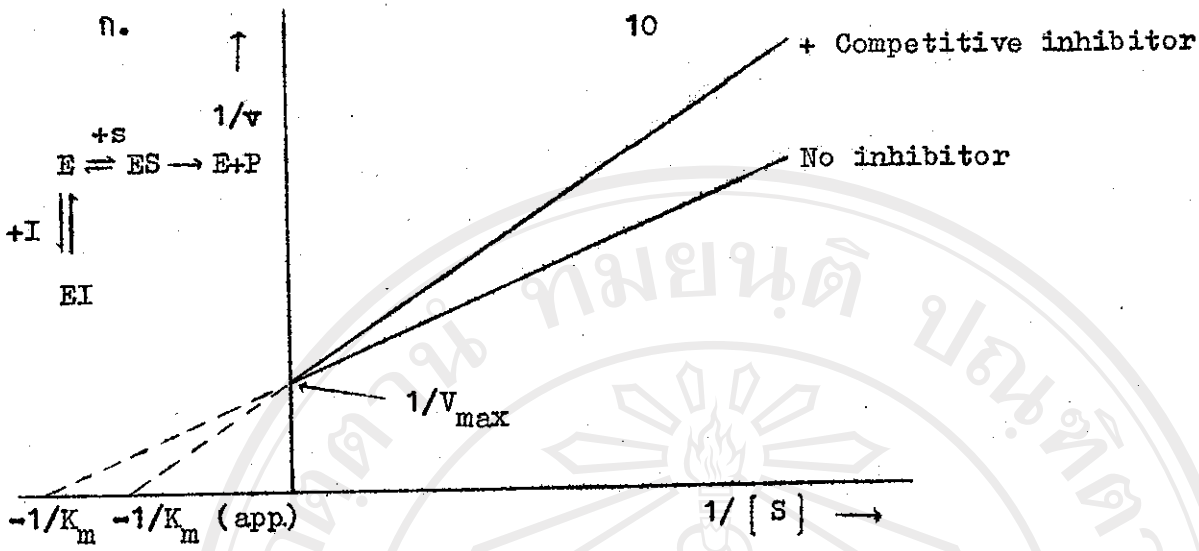
$$E + S \underset{}{\overset{K_s}{\rightleftharpoons}} ES \longrightarrow P + E \qquad \text{------ 4}$$

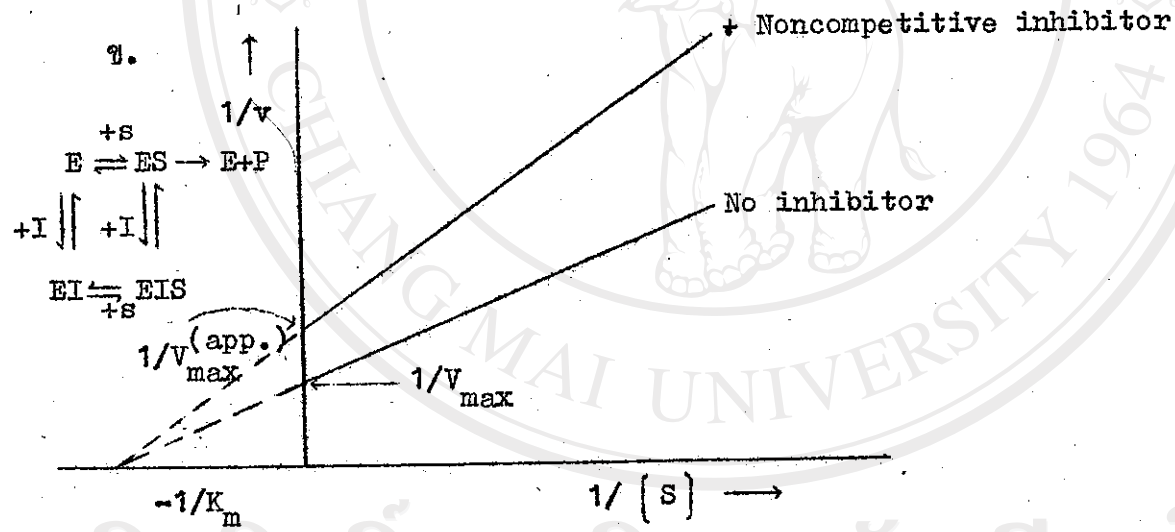
$$E + I \overset{K_i}{\rightleftharpoons} EI \qquad \text{------ 5}$$

$$ES + I \overset{K_i}{\rightleftharpoons} EIS \qquad \text{------ 6}$$

$$EI + S \overset{K_s}{\rightleftharpoons} EIS \qquad \text{------ 7}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved





รูปที่ 1.5 แสดง Lineweaver-Burk plot ของปฏิกริยาโดยเอ็นไซม์เมื่อไม่มีตัวยับยั้งเทียบกับเมื่อมีตัวยับยั้ง

ก. Competitive inhibitor

ข. Noncompetitive inhibitor

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัตราความเร็วของปฏิกริยาเมื่อมี I อยู่ด้วยมีค่าดังนี้

$$v = \frac{V_{max}[S]}{\left[K_m + [S]\right]\left[1 + \frac{[I]}{K_i}\right]} \quad ------ 8$$

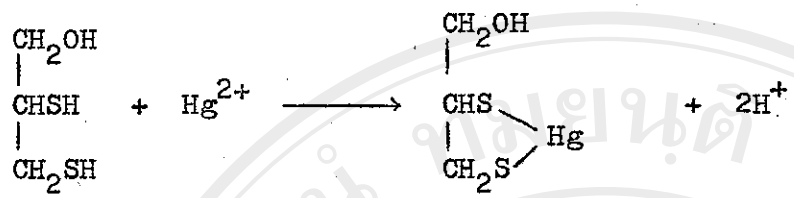
ดังนั้น ในการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ค่า K_m คงเดิม แต่ V_{max} ที่ปรากฏจะมีค่าลดลง (รูปที่ 1.5 ข.)

$$V_{max}(app.) = V_{max} / \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad ------ 9$$

ตัวอย่างตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน[12] ได้แก่พวกโลหะหนัก เช่น ปรอท ตะกั่ว แคดเมี่ยม โครเมี่ยม และแทลเลี่ยม ซึ่งจะทำปฏิกริยากับ -SH ของ cysteine บนเอ็นไซม์หลายชนิด โลหะหนักจะยับยั้งเอ็นไซม์เหล่านี้อย่างแน่นหนาทำให้เอ็นไซม์ไม่สามารถทำงานต่อไปได้เช่น ปรอท จะยับยั้งเอ็นไซม์ Urease

อย่างไรก็ตามสามารถแก้โลหะหนักที่เป็นพิษเหล่านี้เช่น ปรอทและตะกั่ว โดยเติมสารที่สามารถเกิด complex ได้กับโลหะทั้งสองโดยใช้ chelating agent เช่น Dimercaprol (BAL) และ EDTA (รูปที่ 1.6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



BAL Complex

รูปที่ 1.6 แสดงการเกิดปฏิกริยาระหว่างโลหะหนัก (Hg^{2+}, Pb^{+2}) กับ chelating agent

เพื่อที่จะดูว่าการทำปฏิกริยาของตัวยับยั้งและเอ็นไซม์เป็นแบบ reversible หรือ irreversible สามารถทำได้โดยทดสอบทางจลน์ศาสตร์แบบง่าย ๆ คือ

1. โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของตัวยับยั้ง และให้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์คงที่ และนำผลที่ได้มา plot 2 วิธี

   1.1 plot ระหว่างความเข้มข้นของตัวยับยั้งกับเศษส่วนของความเร็วของปฏิกริยา

   1.2 plot ระหว่างความเข้มข้นของตัวยับยั้งกับ percentage of inhibition

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

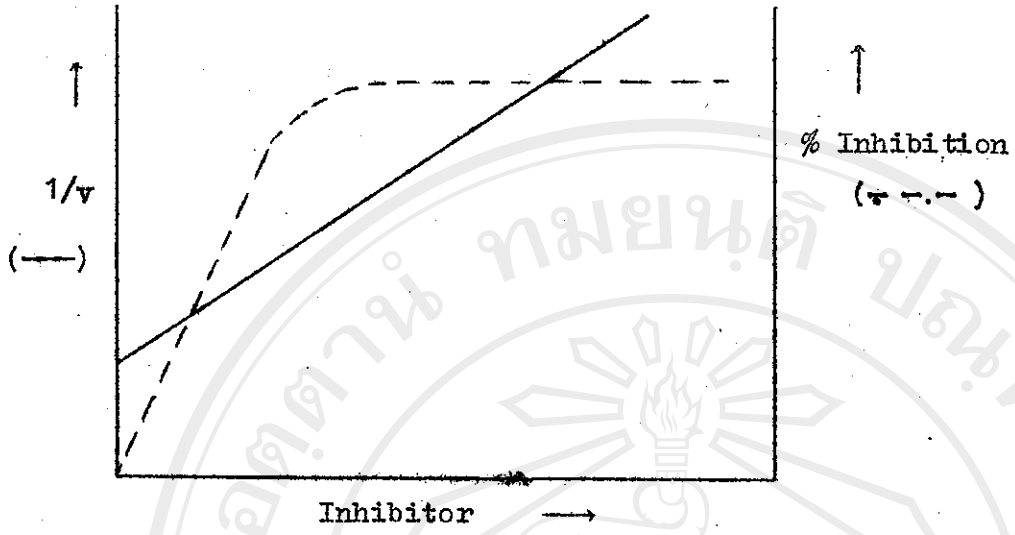
ถ้า Enzyme-inhibitor complex เป็น reversible การ plot ในข้อ 1.1 จะให้เส้นตรง และในข้อ 1.2 จะให้ curve ดังแสดงในรูป 1.7 ก. ในทางกลับกันถ้า Enzyme-inhibitor complex เป็น irreversible การ plot โดยวิธีแรกจะให้ curve และในวิธีที่สองจะให้เส้นตรงดังในรูป 1.7 ข.

2. โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของเอ็นไซม์และให้ความเข้มข้นของตัวยับยั้งคงที่ และนำผลที่ได้มา plot ระหว่าง percentage of inhibition กับความเข้มข้นของเอ็นไซม์ ถ้า Enzyme-inhibitor complex เป็น irreversible. Percentage of inhibition จะมีค่าเท่ากันคือ ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเอ็นไซม์จนกว่า E มากกว่า I (20) ดังรูปที่ 1.8 ก.

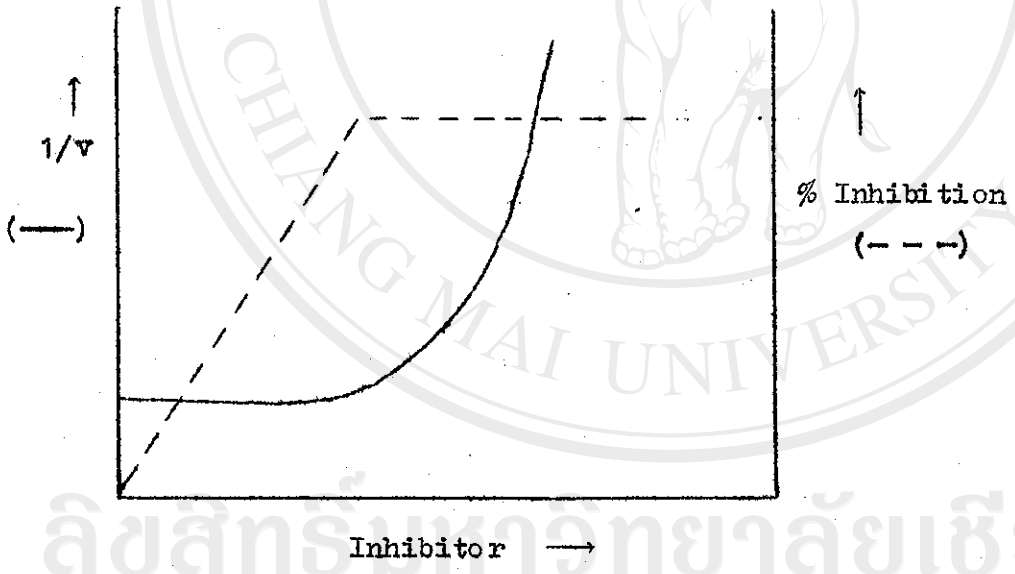
ในทางตรงข้ามถ้า Enzyme-inhibitor complex เป็น reversible. Percentage of inhibition จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอ็นไซม์ (รูปที่ 1.8 ข.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก.



ข.

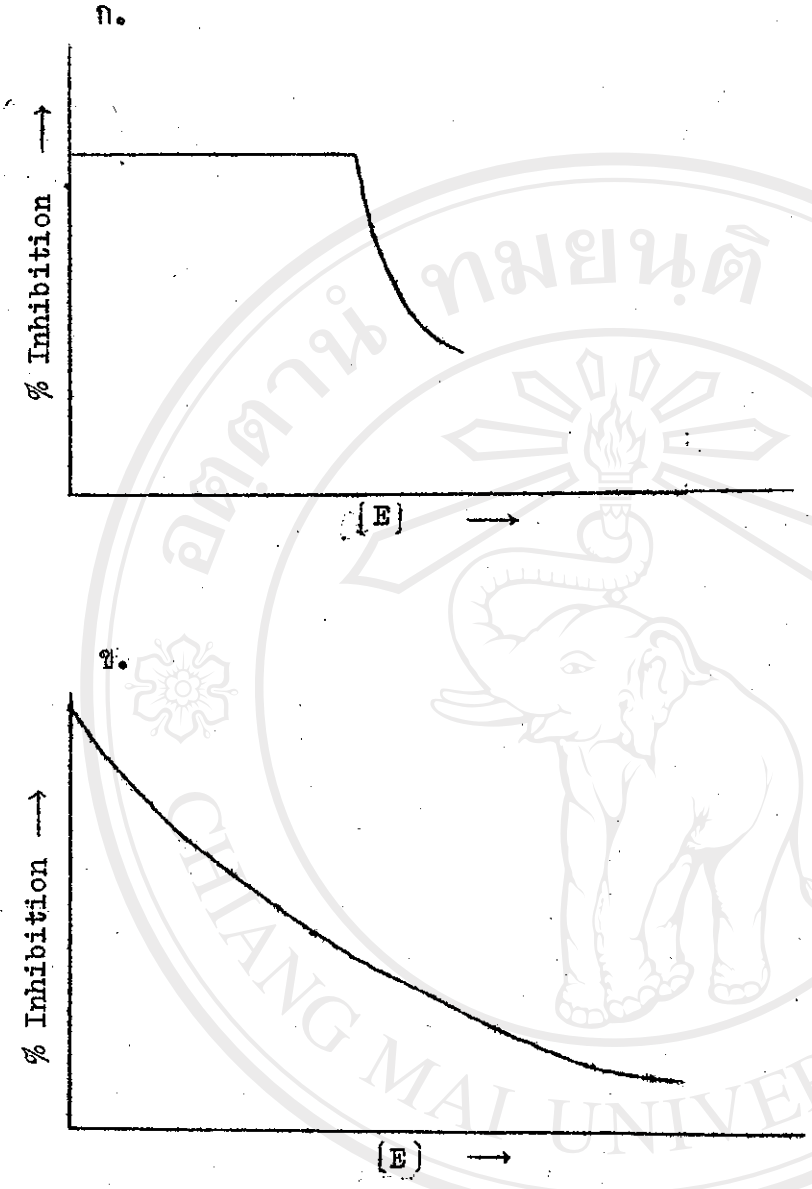


รูปที่ 1.7 แสดง Plots ของ 1/V และ % inhibition กับความเข้มข้นของ inhibitor

ก. Reversible interaction

ข. Irreversible interaction

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1.8 แสดง Plot ของ percentage of inhibition กับความเข้มข้นของเอ็นไซม์

ก. Irreversible mechanism

ข. Reversible mechanism

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 เทคนิคที่ใช้ในการทำการทดลอง

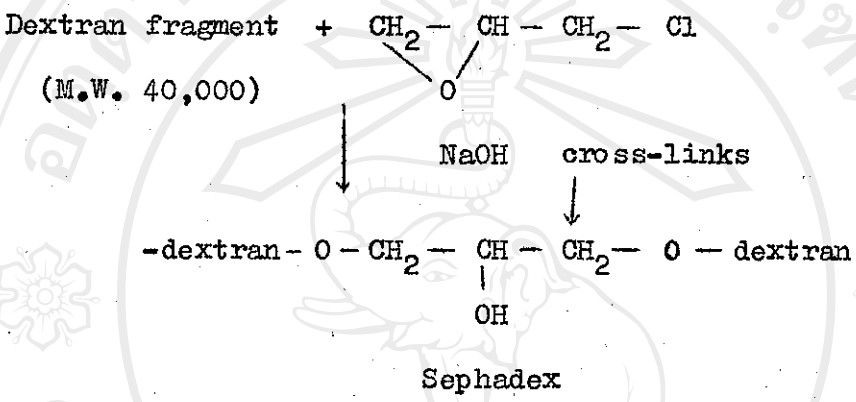
1.4.1 Gel Chromatography (Gel filtration) (13, 14, 15)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยก heterogenous mixture ของโมเลกุลโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล เจลส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับแยกนี้เตรียมจากโพลีเมอร์ของ cross-linking dextran ดังนั้น polysaccharide chain พับกันเกิดขึ้นเป็น three-dimensional network ภายในเจล เมื่อแช่เจลในสารละลาย เจลจะดูดตัวทำละลายไว้จำนวนหนึ่งซึ่งเป็นสัดส่วนกับขนาดของ Cross-linkage ซึ่งเป็นรูที่มีขนาดต่าง ๆ ภายในเจล โมเลกุลถูกแยกตามขนาด เพราะโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่มีขนาดใหญ่กว่ารูที่ใหญ่ที่สุดของเจล ไม่สามารถผ่านทะลุเนื้อเจลได้ ดังนั้นโมเลกุลจึงผ่านในของเหลวระหว่างเม็ดเจลและออกมากับตัวทำละลายที่ใช้ไล่ (elute) ออกมาทาง column ก่อน ส่วนโมเลกุลที่มีขนาดปานกลางหรือเล็กสามารถผ่านทะลุเข้าไปในอนุภาคของเจลได้ โมเลกุลที่มีขนาดเล็กที่สุดหรืออิออนในสารผสมสามารถเข้าไปอยู่ในทุกส่วนของรูภายในเจล ฉะนั้นโมเลกุลเล็กและอิออนจะถูกไล่ออกมาจาก column หลังสุด Gel filtration ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางและได้ผลดีคือ Sephadex

Sephadex คือเจลพวก dextran สังเคราะห์จากส่วนของ dextran ที่เกิด cross-linking กับ epichlorohydrin (รูปที่ 1.9) dextran เป็นโพลีเมอร์ของ D-glucopyranose unit ต่อกันโดย α-(1,6)-glucosidic linkage และบางครั้งก็เป็น α-(1, 3) และ α-(1, 4)-linkage

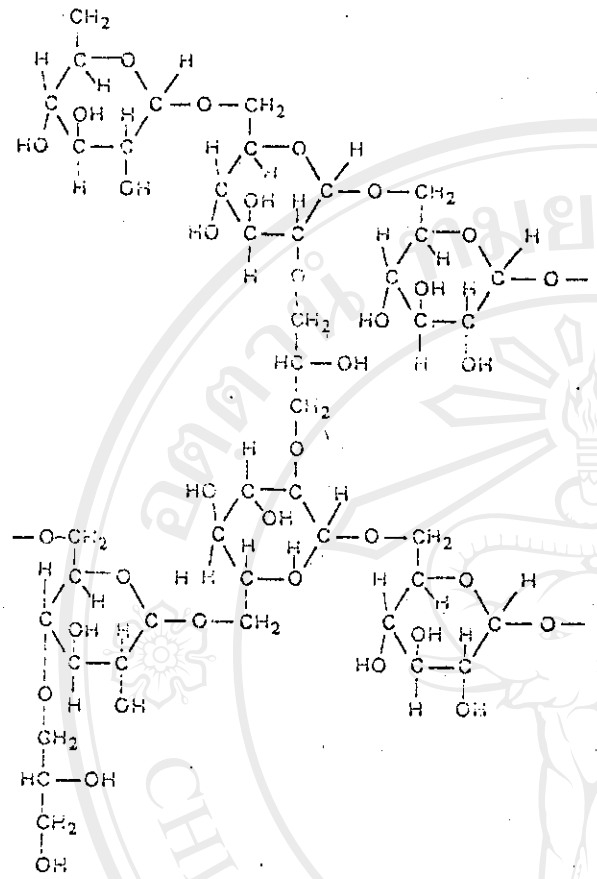
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Cross-linked product ที่เกิดจากปฏิกริยาของ dextran กับ epichlorohydrin ประกอบด้วย 1,3-glyceryl ether bridge และ glyceryl side chain (รูปที่ 1.10)



รูปที่ 1.9 แสดงการสังเคราะห์ Sephadex จากปฏิกริยาของ dextran กับ epichlorohydrin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1.10 Structural formula showing the essential features of a dextran cross-linked with epichlorohydrin.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.2 Ion-exchange chromatography (16)

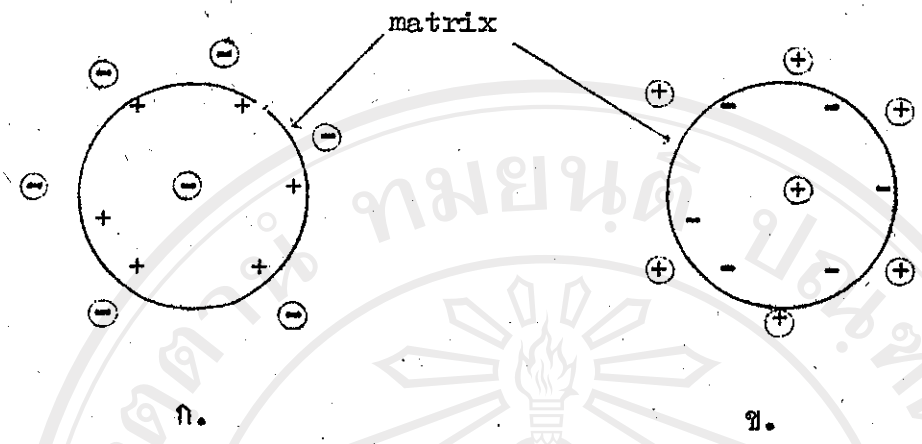
Ion exchange เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

1. charged group
2. mobile counter-ions

mobile counter-ions สามารถแลกเปลี่ยนกลับไปกลับมากับอิออนอื่นที่มีประจุเหมือนกันได้ โดยไม่ทำให้คุณสมบัติในการไม่ละลายน้ำของ matrix เสียไป ion-exchange แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. Anion exchanger : matrix เป็นหมู่ที่มีประจุบวก (Positive group) counter-ion เป็นลบ (negative) (รูปที่ 1.11 ก.) anion exchanger สามารถแลกเปลี่ยนกับอิออนลบ (negative ion) อื่นได้
2. Cation exchanger : matrix เป็นหมู่ที่มีประจุลบ (negative group) counter-ion เป็นบวก (positive) (รูปที่ 1.11 ข.) ในทำนองเดียวกัน cation exchanger สามารถแลกเปลี่ยนกับอิออนบวก (Positive ion) อื่นได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ก. ข.

รูปที่ 1.11 แสดงลักษณะของ ion exchanger

ก. Anion exchanger

ข. Cation exchanger

matrix นี้อาจเป็น Aluminium silicate, Synthetic resin, polysaccharide และอื่น ๆ คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของ ion exchanger คือ charged group เพราะชนิดของ charged group เป็นตัวกำหนดชนิดและ strength ของ ion exchanger

phenolic, hydroxyl, carboxyl และ Sulphoric group เป็น matrix สำหรับ cation exchanger ที่ใช้กันมาก และนิยมใช้ Aliphatic หรือ Aromatic-amino group เป็น matrix สำหรับ anion exchanger

cellulose ion exchanger (14, 17) เป็น ion exchanger ที่ได้จากการ esterify ionic group เข้าไปใน cellulose (รูปที่ 1.10) นิยมใช้กันมากและใช้ได้ผลดีในการแยกสารมีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่มีประจุอยู่มากเช่น โปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cellulose ion exchanger มีใช้กันหลายชนิด แต่ที่ใช้กันกว้างขวางมากที่สุดคือ

1. DEAE-(Diethylaminoethyl)-cellulose เป็น anion exchanger ใช้สำหรับแยก neutral และ acidic protein
2. CM-(Carboxymethyl)-cellulose เป็น Cation exchanger ใช้สำหรับแยก neutral และ basic protein
3. ECTEOLA-(Epichlorohydrin triethanolamine)-Cellulose ใช้แยก nucleotides, nucleic acid และ virus

$Cellulose\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N\text{=}(C_2H_5)_2$ = DEAE-Cellulose

$Cellulose\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}COOH$ = CM-Cellulose

$Cellulose\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}N^{+}\text{=}(C_2H_5OH)_3$ = ECTEOLA-Cellulose

รูปที่ 1.12 แสดงสูตรของ cellulose ion exchanger บางตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved