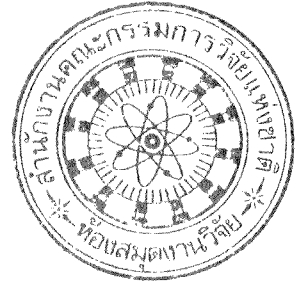


สรุปผลการทดลอง



จากการทดลองนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาแยกด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดต่างๆ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ปาเปน

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือการใช้เอนไซม์ปาเปน 50 มิลลิกรัม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่มีค่ากิจกรรม 7,302 ซีดียู/ มิลลิกรัม สารละลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองปริมาตร 3.5 มิลลิตร ร้อยละของการย่อยโปรตีนสูงที่สุด คือร้อยละ 28.63 เวลาการย่อยที่เหมาะสมคือ 90 นาที

2. การศึกษาการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองปริมาณด้วยเอนไซม์ไฟเซน

จากการศึกษาการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ไฟเซนพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือการใช้เอนไซม์ไฟเซน 50 มิลลิกรัม ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่มีค่ากิจกรรม 11,624 ซีดียู/มิลลิกรัม สารละลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองปริมาตร 3.5 มิลลิตร ร้อยละของการย่อยสลายโปรตีนสูงที่สุด คือร้อยละ 28.56 เวลาการย่อยเหมาะสม 90 นาที

3. การศึกษาการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดต่างๆ โดยการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสทำให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงซึ่งเวลา ที่เหมาะสมที่ใช้ในการย่อยของเอนไซม์ไฟเซนเท่ากับที่เวลา 120 นาที, ของเอนไซม์เพปซินเท่ากับ 30 นาที, ของเอนไซม์ทริปซินเท่ากับ 30 นาที, ของเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Bacillus licheniformis* เท่ากับ 30 นาที และของเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Aspergillus oryzae* เท่ากับ 90 นาที เป็นเวลาที่ต่ำที่สุดที่ทำให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กที่สุด

4. การประยุกต์ใช้เครื่อง MALDI TOF Mass Spectrometry ในการศึกษาเปปไทด์จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรตีนเอสชนิดต่างๆ ที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K M.W. cut off พบว่าโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสสูงสุดที่ 28% เมื่อนำเปปไทด์จากการถูกย่อยมาวิเคราะห์ด้วย MALDI TOF Mass Spectrometry และพบความหลากหลายของเปปไทด์ในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 61.177-2,626.909 ดาลตัน ส่วนชนิดของเปปไทด์ที่พบปริมาณมากที่สุดของเอนไซม์ไฟเซน, เอนไซม์เพปซิน, เอนไซม์ทริปซิน, เอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Bacillus licheniformis*, เอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Aspergillus oryzae* น้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 294.414 ดาลตัน, 172.237 ดาลตัน, 862.628 ดาลตัน, 2,636.909 ดาลตัน และ 294.414 ดาลตัน

5. การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH ของเปปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการคัดแยกเปปไทด์ด้วย Amicon Ultramembrane ขนาด 3K M.W. cut off พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่ใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 84.36 ของเอนไซม์เพปซินซึ่งมากที่สุดเมื่อเทียบกับผลในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากเอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นๆ ที่ความเข้มข้น 100% และเอนไซม์ชนิดที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดร้อยละ 65.14 ของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* โดยให้การต้านอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ของเอนไซม์ไฟซิน, เอนไซม์เพปซิน, เอนไซม์ทริปซิน, เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis*, เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* เท่ากับ 1.95, 8.07, 1.40, 5.30 และ 8.06 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของสารมาตรฐาน (Vitamin C) เท่ากับ 11.9 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร

6. การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการคัดแยกเปปไทด์ด้วย Amicon Ultramembrane ขนาด 3K พบว่าเอนไซม์ทริปซินมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น โดยให้ Inhibition Zone เท่ากับ 16.5 มิลลิเมตร ซึ่งเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

7. เมื่อนำเปปไทด์สายสั้นที่ได้จากเอนไซม์ทริปซิน และเพปซินที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) และเมื่อนำเปปไทด์สายสั้นที่ได้จากทริปซินและทริปซินไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนพบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์เพปซินตัดโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองพบกรดอะมิโนทั้งหมด 9 ชนิด โดยพบกรดอะมิโนชนิดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 298.10 มิลลิกรัม/100 กรัม และพบฟีนิลอลานีน น้อยที่สุดเท่ากับ 68.65 มิลลิกรัม/100 กรัม ในขณะที่เปปไทด์ที่ได้จากเอนไซม์ทริปซินจะพบกรดอะมิโนทั้งหมด 13 ชนิด โดยพบกรดอะมิโนชนิดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 553.03 มิลลิกรัม/100 กรัม และพบไทโรซีน น้อยที่สุดเท่ากับ 50.12 มิลลิกรัม/100 กรัม

8. เมื่อนำเปปไทด์จากทริปซินที่ผ่าน ultramembrane ที่มี molecular weight cut off 3 กิโลดาลตัน ไปแยกเปปไทด์โดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ด้วยคอลัมน์ชนิด Superose™ 12 พบโปรตีนที่น่าสนใจ 2 แพรกชั้นคือ 11 และ 18 และได้นำโปรตีนที่ได้ในแต่ละแพรกชั้นไปวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ของเอนไซม์ angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity (ACEi) และ วิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Liquid Chromatography-Mass spectrometry

และเมื่อนำแฟรกชันที่ 11 และ 18 ไปวิเคราะห์ ACEi พบว่ามีค่า ACEi เท่ากับร้อยละ 80.69 ± 0.53 และ 91.79 ± 0.10 ตามลำดับ และจากการนำเปปไทด์ทั้งสองแฟรกชันนี้ไปวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Liquid Chromatography-Mass spectrometry พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Gly-Gly-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys และ Thr-Asn-Ala-Glu-Asn-Glu-Phe-Val-Thr-Ile-Lys-Lys

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเปปไทด์สายสั้นจากโปรตีนสกัดหัวใจที่แยกด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ มีสมบัติที่สำคัญหลายประการ ได้แก่สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ angiotensin I-converting ซึ่งมีผลลดการสลายตัวของ bradykinin หมดแล้ว ACEi มีผลทำให้ความดันโลหิตต่ำ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งสมบัติในข้อนี้ยังต้องทำการศึกษาในจุลินทรีย์อีกหลายชนิดเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้นอีกต่อไป