



การศึกษาสมบัติของแอลฟา-อะไมเลสทนความร้อนจากเมล็ดถั่วขอกำลังงอก Characterization of Thermostable α -Amylase from Germinating Cowitch (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) Seeds

สายใจ ปอสูงเนิน¹, กมณชนก วงศ์สุขสิน¹, จินดา จันดาเรือง², บังอร ประจันบาล³,

สุทธิเดช ปรีชารัมย์⁴ และ ธีระ ธรรมวงศา^{5*}

Saijai Posoongnoen¹, Kamonchanok Wongsooksin¹, Jinda Jandaruang², Bung-on Prajanban³,

Sutthidech Preecharram⁴ and Theera Thummavongsa^{5*}

¹ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

² สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

³ สาขาวิชานวัตกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

⁴ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

⁵ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University

² Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University

³ Department of Agricultural Innovation, Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sakaeo Campus

⁴ Department of General Science, Faculty of Science and Engineering, Kasetsart University Chalemphrakiat Sakon Nakhon Province Campus

⁵ Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University

Received : 22 September 2022

Revised : 29 November 2022

Accepted : 21 December 2022

บทคัดย่อ

การแยกบริสุทธิ์แอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดถั่วขอกำลังงอก (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) (MpAmy) ด้วย 2 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 35 – 65% (w/v) และ β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 216.4 เท่า และมีกิจกรรมจำเพาะ 91.0 U/mg การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE) พบว่าเอนไซม์มีขนาดโมเลกุล 58 kDa ซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่สอดคล้องกับกิจกรรมการทำงานโดย Zymographic method การศึกษาสมบัติของ MpAmy พบว่าแรงปฏิกิริยาได้สูงที่พีเอช 5.0 – 6.0 และอุณหภูมิสูง 50.0 – 90.0 °C โดยมีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 60.0 °C และยังมีเสถียรสูงในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้างคือ พีเอช 5.0 – 7.0 และอุณหภูมิ 30.0 – 90.0 °C การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่ามีค่าคงที่ไมเคลิส (K_m) และความเร็วสูงสุด (V_{max}) สำหรับการสลายโมเลกุลแป้ง คือ 2.1 mg/mL และ 0.2 μ mol/min/mL ตามลำดับ เอนไซม์มีความจำเพาะในการสลายโมเลกุลแป้งสูงที่สุด รองลงมาคือ อะไมโลเพคติน และไกลโคเจน เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาสลายสารตั้งต้น Ethylidene-pNP-G7 เท่ากับ 280.8 nmol/min/mL แสดงว่าเป็นอะไมเลสชนิดแอลฟา จากการศึกษาสมบัติแสดงให้เห็นว่า MpAmy เป็นแอลฟาอะไมเลสทนความร้อน ซึ่งมีความสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมแป้งต่อไป

คำสำคัญ : แอลฟาอะไมเลส ; ทนความร้อน ; การศึกษาสมบัติ ; การแยกบริสุทธิ์ ; ถั่วขอ



Abstract

Purification of α -amylase from germinating cowitch (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) seeds (MpAmy) was carried out using two steps of 35 – 65% (w/v) Ammonium sulphate fractionation and β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography. The enzyme was purified 216.4-fold with a final specific activity of 91.0 U/mg. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE) analysis exhibited a molecular weight of MpAmy at 58 kDa which corresponded with amylase activity by Zymographic method. Characterization of MpAmy showed high activity at the pH of 5.0 – 6.0 and the high temperature of 50.0 – 90.0 °C. The optimum pH and temperature for the enzyme were at pH 5.0 and 60.0 °C, respectively. Furthermore, MpAmy was found stable at a wide range of pH 5.0 to 7.0, pH and the temperature between 30 °C to 90 °C. The Michalis constant (K_m) and Maximum velocity (V_{max}) for hydrolysis of starch were 2.1 mg/mL and 0.2 μ moles/min/mL, respectively. The MpAmy showed the highest specific activity toward starch followed by amylopectin and glycogen as their natural substrates. The enzyme catalyzed Ethylidene-pNP-G7 at 280.8 nmol/min/mL, indicating it was an alpha amylase. The results from enzyme characterization indicated that MpAmy is the Thermostable α -amylase. Therefore, MpAmy has the potential for applying in different industries, especially the starch industry.

Keywords : α -amylase ; thermostable ; characterization ; purification ; *Mucuna pruriens* (L.) DC.



บทนำ

แอลฟาอะไมเลส (α -amylase, 1,4- α -D-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะ α -1,4 glycosidic แบบสุ่มในพอลิแซคคาไรด์ เช่น แป้ง และไกลโคเจน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ และกลูโคส (Farooq *et al.*, 2021) อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่นิยมและมีการนำไปประยุกต์ใช้มากที่สุด โดยมีการใช้ประมาณ 30% ของตลาดเอนไซม์โลกทั้งหมด มีการนำแอลฟาอะไมเลสไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมแป้ง อาหาร กระดาษ สิ่งทอ สารซักฟอก ยารักษาโรค การผลิตพลังงานชีวภาพ และการวิเคราะห์ทางเคมี เป็นต้น (Paul *et al.*, 2021) ปัจจุบันในอุตสาหกรรมมุ่งความสนใจในการนำเอนไซม์มาใช้แทนสารเคมีจำนวนมาก เนื่องจากเอนไซม์สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เร่งปฏิกิริยาได้รวดเร็ว มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและปฏิกิริยา มีประสิทธิภาพเร่งปฏิกิริยาได้สูง ทำงานได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง ทำให้ประหยัดพลังงานและวัตถุดิบ มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และผู้บริโภค (Jegannathan & Nielsen, 2013; Sundarram *et al.*, 2014) แหล่งของเอนไซม์อะไมเลสที่สำคัญ คือ จุลินทรีย์ สัตว์ และพืช โดยในเมล็ดพืชกำลังงอก มีการผลิตแอลฟาอะไมเลส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุลแป้งที่สะสมในเมล็ดพืช ทำให้ได้น้ำตาลเพื่อใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของพืชต่อไป (Xie *et al.*, 2007) โดยแอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดพืชกำลังงอกจัดว่ามีความเหมาะสมและเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการประยุกต์ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และอาหาร (Muralikrishna & Nirmala, 2005) จะเห็นได้ว่ามีการนำแอลฟาอะไมเลสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมจำนวนมาก ซึ่งในแต่ละอุตสาหกรรมจะมีสภาวะ เช่น พีเอช และอุณหภูมิ ในกระบวนการของอุตสาหกรรมที่แตกต่างกันไปด้วย จึงจำเป็นต้องใช้แอลฟาอะไมเลสที่มีคุณสมบัติที่หลากหลายและคุณสมบัติเฉพาะกับอุตสาหกรรมนั้น ๆ เพื่อให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูง แต่ปัจจุบันแอลฟาอะไมเลสทางการค้ายังมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพียงบางช่วงเท่านั้น เช่น อะไมเลสทางการค้า Termamyl มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา คือ พีเอช 5.5 – 6.5 และอุณหภูมิ 90 °C ตามลำดับ ทำให้การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในด้านต่าง ๆ ถูกจำกัดตามสมบัติของเอนไซม์ด้วย (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006) ดังนั้นการค้นหาแหล่งของเอนไซม์ใหม่ ๆ เพื่อให้ได้คุณสมบัติของเอนไซม์ที่หลากหลาย ในการเป็นทางเลือกสำหรับประยุกต์ใช้ที่หลากหลายจึงมีความสำคัญ จากรายงานการศึกษาก่อนหน้า แอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดพืชกำลังงอก พบว่ามีคุณสมบัติที่น่าสนใจคือ เร่งปฏิกิริยาได้สูงในพีเอชช่วง 5.0 – 6.0 และสามารถทำงานได้ดี มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงในช่วง 65.0 – 70.0 °C (Posoongnoen & Thummavongsa, 2020) ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่มีพีเอชเป็นกรดอ่อน และอุณหภูมิสูงในกระบวนการ เช่น อุตสาหกรรมแป้ง เนื่องจากแป้งจะมีพีเอชในช่วง 3.2 – 6.0 อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาแอลฟาอะไมเลสในถั่วขอ (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) ซึ่งเป็นไม้เลื้อย ดอกและผิวเมล็ดมีสีขาว พบทั่วไปในประเทศไทย เป็นพืชที่ปลูกง่าย ผลผลิตสูง นิยมปลูกเพื่อทานเมล็ด โดยเมล็ดถั่วขอเป็นแหล่งอาหารที่ดีอุดมไปด้วยโปรตีน กรดไขมันและกรดอะมิโนจำเป็น แป้ง และแร่ธาตุที่สำคัญ โดยมีโปรตีนสูง 27.42% นอกจากนี้ยังพบสารแอลโดปา (L-dopa, L-3,4-dihydroxy phenylalanine) 2.10% ซึ่งเป็นสารที่ใช้รักษาโรคพาร์กินสัน (Parkinson's) (Lampariello *et al.*, 2012) ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาสมบัติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดถั่วขอกำลังงอก เพื่อหาแหล่งเอนไซม์อะไมเลสชนิดใหม่ในการพัฒนา และประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ต่อไป



วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมและสกัดเอนไซม์จากเมล็ดถั่วขอกำลังงอก

ทำการเก็บตัวอย่างเมล็ดถั่วขอกำลังงอกจากพื้นที่ในจังหวัดนครราชสีมา จากนั้นคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด แช่ในน้ำกลั่น 12 ชั่วโมง นำมาเพาะบนกระดาษทิชชูเปียกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สกัดและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 °C ตลอดการทดลอง นำเมล็ดถั่วขอกำลังงอก (500.00 กรัม) มาผสมกับ 50 mM Sodium acetate buffer, pH 5.5 ปริมาตร 1500.00 มิลลิลิตร แล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 21000xg 25 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลายส่วนใสเป็นสารสกัดหยาบเอนไซม์ (crude enzyme) (Singh *et al.*, 2017; Posoongnoen & Thummavongsa, 2020)

2. การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

การวัดกิจกรรมการทำงานของอะไมเลส (amylase activity assay) ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959) นำ 1.0% w/v Soluble starch ใน 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.5 ปริมาตร 0.25 mL ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37.0 °C เป็นเวลา 5 นาที เติมสารสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 0.25 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37.0 °C นาน 10 นาที เพื่อให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาละลายโมเลกุลแป้ง จากนั้นตรวจวัดผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 mL ต้มนาน 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UH-5300, Hitachi) ที่ความยาวคลื่น 520 nm คำนวณหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสในหน่วยยูนิต (Unit, U) กำหนดให้ 1 หน่วยยูนิตเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแล้วทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ที่สภาวะพีเอช 5.5 อุณหภูมิ 37 °C

การศึกษากิจกรรมการทำงานของสารตั้งต้นจำเพาะของแอลฟาอะไมเลสโดยใช้ Amylase assay kit (Abnova) นำสารสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 50 μL ผสมกับ Ethylidene-pNP-G7 ปริมาตร 50 μL และ Assay buffer ปริมาตร 50 μL เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน p-Nitrophenol แล้วคำนวณหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในหน่วย Unit โดย 1 Unit ของแอลฟาอะไมเลส คือปริมาณของแอลฟาอะไมเลสที่เร่งปฏิกิริยาละลาย Ethylidene-pNP-G7 แล้วทำให้เกิด p-Nitrophenol 1.0 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ที่สภาวะพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 °C (Posoongnoen *et al.*, 2015)

การศึกษากิจกรรมการทำงานของอะไมเลสด้วย Zymographic method นำสารสกัดเอนไซม์มาแยกด้วย 13% SDS – PAGE ที่ผสมกับ 0.1% w/v Soluble starch จากนั้นนำแผ่นเจลมาล้างด้วย 1% v/v Triton X-100 นาน 1 ชั่วโมง นำมาบ่มใน 0.2% w/v Starch in 50 mM Sodium acetate buffer pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำมาย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน (Posoongnoen *et al.*, 2021)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนโดย Bradford method (Bradford, 1976) ผสมสารละลายเบรดฟอร์ด (Bradford reagent) ปริมาตร 800 μL กับสารสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 200 μL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่า



การดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UH-5300, Hitachi) ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนในหน่วย mg/mL

4. การแยกบริสุทธิ์อัลฟาอะไมเลส

4.1 การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ ปริมาตร 500 mL มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 35 – 65% (w/v) ที่อุณหภูมิ 4 °C กวนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 21000xg นาน 25 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เติมน้ำล้างละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 50 mM Sodium acetate buffer, pH 5.5 ปริมาตร 10 mL นำสารละลายที่ได้มากำจัดเกลือโดยวิธีไดอะไลซิส แล้วนำไปแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

4.2 การแยกบริสุทธิ์อัลฟาอะไมเลสด้วยเทคนิค β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography

แยกบริสุทธิ์อัลฟาอะไมเลสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) โดยใช้เฟสคงที่ Epoxy-activated sepharose 6B ที่เชื่อมต่อกับลิแกนด์ β -cyclodextrin (Vretblad, 1974; Posoongnoen *et al.*, 2020) ทำการปรับสภาพคอลัมน์ด้วย 50 mM Sodium acetate buffer (pH 6.0) ที่มี 5 mM CaCl_2 ที่อัตราการไหล 0.5 mL/min จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิส (20 mg Protein) ลงในคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ให้ไหลออก ทดลอง หลอดละ 1.5 mL ล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการออกด้วย Washing buffer (20 mM Sodium acetate buffer (pH 6.0) ที่มี 25 mM CaCl_2 และ 200 mM NaCl) จนกระทั่งสารละลายที่ผ่านคอลัมน์มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm เท่ากับ 0 จากนั้นชะอัลฟาอะไมเลสออกจากคอลัมน์ด้วย Washing buffer ที่มี 10 mg/mL β -cyclodextrin นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส รวมสารละลายที่มีกิจกรรมการทำงาน ของอะไมเลส แล้วนำไปกำจัด β -cyclodextrin ออกโดยวิธีไดอะไลซิส

5. การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของอัลฟาอะไมเลส

ทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และขนาดโมเลกุลของเอนไซม์โดยเทคนิค SDS – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE) (Laemmli, 1970) เตรียมตัวอย่างโดยผสมสารสกัดเอนไซม์ (20 μ g Protein) กับสารละลาย Loading buffer ต้มนาน 5 นาที นำไปแยกโปรตีนด้วย 15% SDS – PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 Volt จากนั้นนำมาย้อม แถบโปรตีนด้วย 0.1% w/v Comassie Brilliant Blue R-250 ทำการคำนวณขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานขนาด 17 – 250 kDa (ENZMART Biotech)

6. การศึกษาสมบัติของอัลฟาอะไมเลสจากเมล็ดถั่วซอกกำลังออก

6.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสม และพีเอชที่เสถียรต่อการทำงานของอัลฟาอะไมเลส

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของอัลฟาอะไมเลส โดยนำเอนไซม์มาวัดกิจกรรมการทำงานของอะไมเลส ด้วย Amylase activity assay ที่สภาวะพีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่พีเอช 4.0 – 9.0 โดยใช้บัฟเฟอร์ดังนี้ 0.1 M Sodium acetate buffer (pH 4.0 – 5.0); 0.1 M Citrate phosphate buffer (pH 5.0 – 6.0); 0.1 M Potassium phosphate buffer (pH 6.0 – 7.0);



0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0 – 9.0) ที่อุณหภูมิ 37.0 °C คำนวณกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในหน่วย % Relative activity โดยเทียบกับพีเอชที่ส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานสูงสุด (100% Activity)

ศึกษาพีเอชที่เสถียรต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส โดยนำเอนไซม์ไปบ่มที่สภาวะพีเอชต่าง ๆ คือพีเอช 4.0 – 9.0 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานที่เหลืออยู่โดย Amylase activity assay คำนวณกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ในหน่วย %Residual activity โดยคำนวณจากกิจกรรมการทำงานที่เวลา 60 นาที เทียบกับที่ 0 นาที (100% Activity)

6.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม และอุณหภูมิที่เสถียรต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยนำเอนไซม์ไปวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสโดย Amylase activity assay ที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30.0 – 90.0 °C ที่พีเอช 5.5 คำนวณกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในหน่วย %Relative activity โดยเทียบกับอุณหภูมิที่ส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานสูงสุด (100% Activity)

ศึกษาอุณหภูมิที่เสถียรต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โดยนำเอนไซม์ไปบ่มที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30.0 – 90.0 °C เป็นเวลา 60 นาที ที่พีเอช 5.5 จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานที่เหลืออยู่โดย Amylase activity assay คำนวณกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ในหน่วย %Residual activity โดยคำนวณจากกิจกรรมการทำงานที่เวลา 60 นาทีเทียบกับที่ 0 นาที (100% Activity)

6.3 การศึกษาความจำเพาะของแอลฟาอะไมเลสต่อสารตั้งต้น

ทำการศึกษากิจกรรมการทำงานของแอลฟาอะไมเลสโดย Amylase activity assay โดยใช้สารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ คือ แป้ง อะไมโลเพคติน และไกลโคเจน โดยนำเอนไซม์ ปริมาตร 0.25 mL ผสมกับ 0.1% w/v สารตั้งต้น ปริมาตร 0.25 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที เพื่อให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้น โดยการเติมสารละลาย DNS ต้ม 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UH-5300, Hitachi) ที่ความยาวคลื่น 520 nm คำนวณกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในหน่วย %Relative activity โดยเทียบกับสารตั้งต้นที่ส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานสูงสุด (100% Activity)

6.4 การศึกษาจลนศาสตร์ของแอลฟาอะไมเลส

ทำการศึกษากิจกรรมการทำงานของแอลฟาอะไมเลสโดย Amylase activity assay ที่ความเข้มข้น 1 – 10 mg/mL starch ใน 0.1 M Potassium phosphate buffer pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟไลน์วีเวอร์เบอร์ก (Lineweaver-Burk plots) เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารเริ่มต้นที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด (Michaelis-Menten Constant, K_m) และความเร็วสูงสุด (Maximum velocity, V_{max}) ของการทำงานของเอนไซม์



7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองรายงานในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย (\bar{x}) \pm SE (standard error) วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาการแยกบริสุทธิ์อัลฟาอะไมเลสจากเมล็ดถั่วขอกำลังงอก

การแยกบริสุทธิ์อัลฟาอะไมเลส (α -amylase) จากเมล็ดถั่วขอกำลังงอก (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) (MpAmy) เมื่อนำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 35 – 65% (w/v) พบว่าสามารถทำให้อัลฟาอะไมเลสมีความบริสุทธิ์ (purification fold) เพิ่มขึ้น 25.1 เท่า และมีกิจกรรมการทำงานจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 10.6 U/mg จากนั้นเมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) โดยใช้เฟสคงที่ Epoxy-activated sepharose 6B ที่เชื่อมต่อกับลิแกนด์ β -cyclodextrin (β -CD) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของอัลฟาอะไมเลส ดังนั้นจึงทำให้มีความจำเพาะในการแยกบริสุทธิ์กับอัลฟาอะไมเลสสูงจากกราฟการแยกบริสุทธิ์พบพีคโปรตีน 2 พีค และหลังจากทำการชะด้วย β -cyclodextrin พบพีคกิจกรรมการทำงานของอัลฟาอะไมเลส (amylase activity) 1 พีค (ภาพที่ 1) จากกระบวนการแยกบริสุทธิ์ทั้ง 2 ขั้นตอน ทำให้อัลฟาอะไมเลสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 216.4 เท่า กิจกรรมจำเพาะ 91.0 U/mg และผลผลิต (yield) 6.3% (ตารางที่ 1)

Table 1 Summary of purification of α -amylase from germinating Cowitch (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) (MpAmy).

Purification steps	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude enzyme extract	1677.6	3988.8	0.4	1.0	100.0
35 – 65% Ammonium sulphate fractionation	197.1	18.6	10.6	25.1	11.8
β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography	105.1	1.2	91.0	216.4	6.3

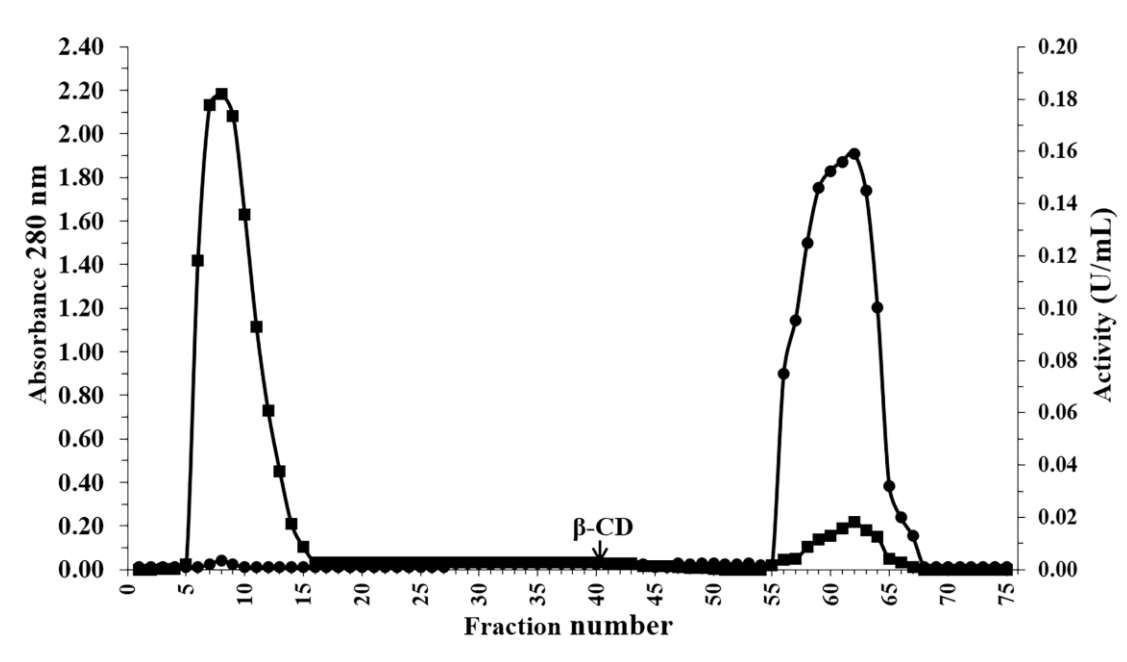


Figure 1 Elution profile of purification of α -amylase (MpAmy) by β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography. The fractions were analyzed for amylase activity by Amylase activity assay (●) and protein content at 280 nm (■). β -CD = β -cyclodextrin

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอลฟาอะไมเลสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS – PAGE พบว่ามีแถบโปรตีน 1 แถบ ที่ขนาดโมเลกุล 58 kDa ซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่สอดคล้องกับการศึกษากิจกรรมการทำงานของแอลฟาอะไมเลสด้วย Zymographic method (ภาพที่ 2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดถั่วชอกกำลังงอก (MpAmy) ที่แยกบริสุทธิ์ได้มีความบริสุทธิ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในตารางที่ 1 คือหลังจากผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์ทำให้ แอลฟาอะไมเลสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 216.4 เท่า จากนั้นเมื่อนำเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานกับสารตั้งต้น Ethylidene-pNP-G7 ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์อะไมเลสชนิดแอลฟา (α -type) เท่านั้น พบว่าเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุล Ethylidene-pNP-G7 ได้เท่ากับ 280.8 nmol/min/mL แสดงว่าเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากเมล็ดถั่วชอกกำลังงอกนั้นเป็นเอนไซม์อะไมเลสชนิดแอลฟา (α -type)

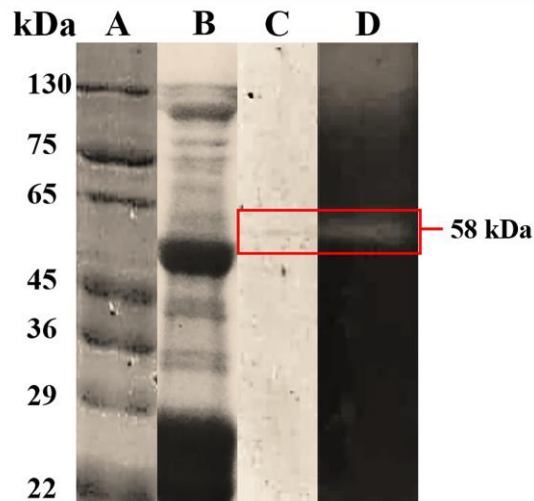


Figure 2 Protein pattern and amylase activity. Molecular weight markers (lane A), crude enzyme extract (lane B) and purified α -amylase (MpAmy) (lane D) by SDS – PAGE, amylase activity by Zymographic method (lane D).

4. พีเอชที่เหมาะสมและเสถียรต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส

MpAmy มีกิจกรรมการทำงานในการเร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุลสารตั้งต้นแป้งได้สูง ในช่วงพีเอช 5.0 – 6.0 โดยมีกิจกรรมการทำงานสูงสุด (optimum pH) ที่พีเอช 5.0 นอกจากนี้ MpAmy ยังสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่กว้าง ในช่วงพีเอช 5.0 – 8.0 โดยมี %Relative activity มากกว่า 50% (ภาพที่ 3A) และมีความเสถียรสูงในช่วงพีเอช 5.0 – 6.0 ซึ่งมีกิจกรรมการทำงานเหลืออยู่มากกว่า 90% โดยที่พีเอช 5.0 มีกิจกรรมการทำงานเหลืออยู่มากถึง 99% Residual activity นอกจากนี้ ที่สภาวะพีเอช 4.0 7.0 8.0 และ 9.0 ยังมีความเสถียรสูง (มากกว่า 60% residual activity) (ภาพที่ 3B) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า MpAmy สามารถเร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุลสารตั้งต้นแป้งได้สูง และมีความเสถียรที่พีเอชช่วงกรดอ่อน

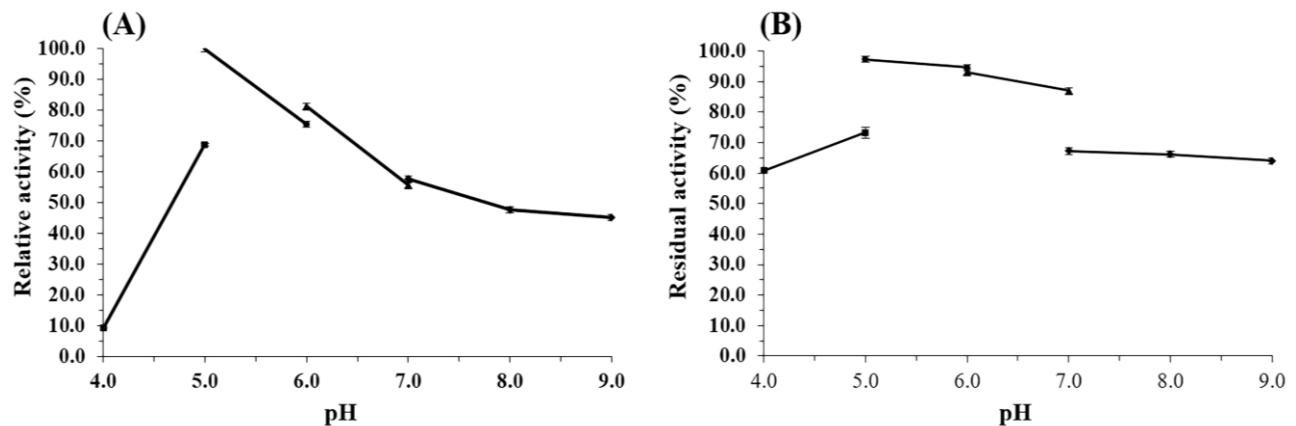


Figure 3 Effect of pH on activity (A) and stability (B) of α -amylase (MpAmy) at pH 4.0 – 9.0. The pH conditions were adjusted using the following 100 mM sodium acetate buffer pH range 4.0 – 5.0, 100 mM citrate phosphate buffer pH 5.0 – 6.0, 100 mM potassium phosphate buffer pH range 6.0 – 7.0, 100mM Tris-HCl buffer pH range 7.0 – 9.0. The data represent the mean \pm standard error from three replicates.

5. อุณหภูมิที่เหมาะสมและเสถียรต่อการทำงานของแอลฟาอะไมเลส

MpAmy สามารถเร่งปฏิกิริยาละลายโมเลกุลสารตั้งต้นแป้งได้สูงในช่วงอุณหภูมิที่กว้างตั้งแต่ 30.0 – 90.0 °C โดยมีกิจกรรมการทำงานสูงสุด (optimum temperature) ที่ 60.0 °C ขณะที่อุณหภูมิสูงมากในช่วง 70.0 – 90.0 °C เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้สูงมากกว่า 80% Relative activity (ภาพที่ 4A) นอกจากนี้ยังมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิที่กว้างตั้งแต่ 30.0 – 90.0 °C โดยมีกิจกรรมการทำงานเหลืออยู่มากกว่า 70% Residual activity และในช่วงที่อุณหภูมิสูง 70.0 80.0 และ 90.0 °C เอนไซม์ยังมีกิจกรรมการทำงานคงเหลืออยู่ 81.3 77.5 และ 73.6% Residual activity ตามลำดับ (ภาพที่ 4B) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า MpAmy สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูง และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงคาดว่าเอนไซม์มีสมบัติเป็น Thermostable α -amylase ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดี และเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่มีอุณหภูมิสูงในกระบวนการ เช่น การย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (liquefaction) ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอล

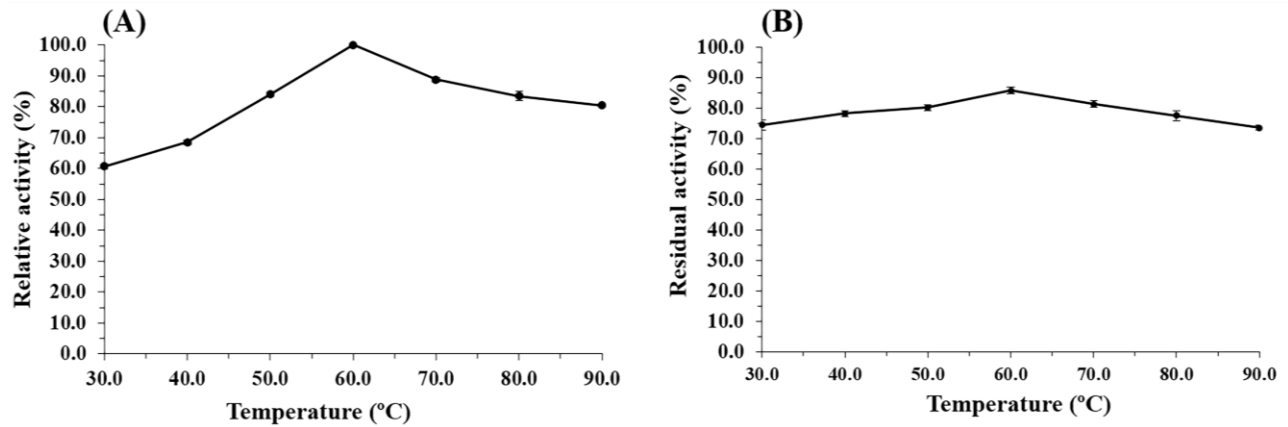


Figure 4 Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of α -amylase (MpAmy) at 30.0 – 90.0 °C. The data represent the mean \pm standard error from three replicates.

6. ความจำเพาะกับสารตั้งต้นของแอลฟาอะไมเลส

MpAmy มีความจำเพาะกับแป้งมากที่สุด และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุลอะไมโลเพคตินได้สูง แต่เร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุลไกลโคเจนได้ต่ำ โดยมี %Relative activity คือ 100.00 84.07 และ 18.12 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากผลการศึกษาค้นคว้าความจำเพาะกับสารตั้งต้น จะเห็นได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุลสารตั้งต้นจะลดลง พร้อมกับการลดลงของจำนวนพันธะ α -1,4 glycosidic และการเพิ่มขึ้นของจำนวนพันธะ α -1,6 glycosidic ในสารตั้งต้น แสดงว่าสารตั้งต้นที่มีพันธะ α -1,4 glycosidic เป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะกับ MpAmy และเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาสลายพันธะ α -1,4 glycosidic ได้ดี ทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยากับสารตั้งต้นนั้นได้สูง และมีประสิทธิภาพ

Table 2 Substrate specificity of α -amylase (MpAmy).

Substrates	Relative Activity (%)
Starch	100.00 \pm 0.09 ^c
Amylopectin	84.07 \pm 0.20 ^b
Glycogen	18.12 \pm 0.04 ^a

Mean value \pm standard error followed by different letters differs significantly ($p \leq 0.05$).

7. ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของแอลฟาอะไมเลส

การศึกษาจลนศาสตร์ของ MpAmy โดยใช้แบ่งเป็นสารตั้งต้น จากกราฟ Lineweaver–Burk plot (ภาพที่ 5) พบว่า เอนไซม์มีค่าคงที่ของไมเคิลิส (K_m) เท่ากับ 2.1 mg/mL และมีค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) เท่ากับ 0.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ โดยค่า K_m ที่ต่ำ แสดงว่า MpAmy มีความจำเพาะกับแป้งสูง ทำให้สามารถเข้าจับกับแป้ง เพื่อเร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะ จึงส่งผลทำให้สามารถเร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุลแป้งได้สูง และมีประสิทธิภาพตามไปด้วย ซึ่งผลของค่า K_m ที่ต่ำของ MpAmy นั้นมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาความจำเพาะกับสารตั้งต้น ซึ่งพบว่า MpAmy มีความจำเพาะกับแป้งสูงเช่นเดียวกัน

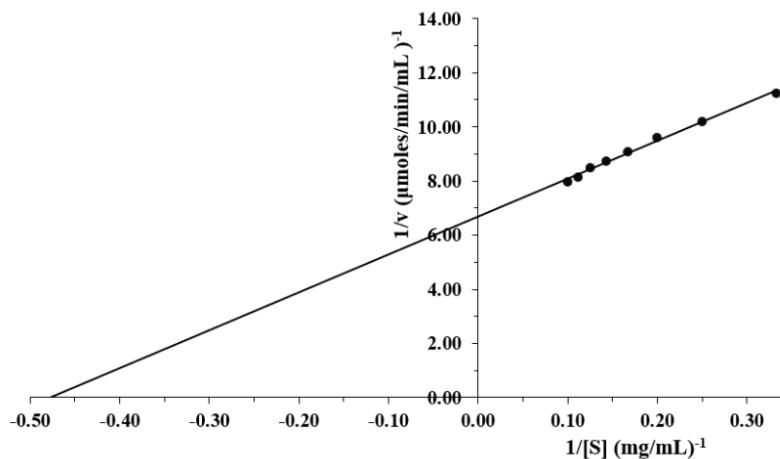


Figure 5 Lineweaver–Burk plots in the presence of different concentration of soluble starch of α -amylase (MpAmy). The data represent the mean \pm standard error from three replicates.

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นรายงานวิจัยแรกในการแยกบริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของแอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดถั่วขอ กำลังงอก (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) โดยทำการแยกบริสุทธิ์ด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกจะทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย 35 – 65% (w/v) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งในขั้นตอนนี้จะช่วยกำจัดน้ำตาล สิ่งเจือปนต่าง ๆ และตัวยับยั้งแอลฟาอะไมเลสที่ขัดขวางกระบวนการแยกบริสุทธิ์ของแอลฟาอะไมเลส (Wisessing *et al.*, 2010) และยังสามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกบางส่วนจึงส่งผลให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (Kumari *et al.*, 2010) ซึ่งทำให้ MpAmy มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 25.1 เท่า จากนั้นจะนำมาแยกบริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้เทคนิค β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography ซึ่งทำให้ MpAmy มีความบริสุทธิ์สูงถึง 216.4 เท่า ได้ผลผลิต 6.3% คาดว่าในระหว่างกระบวนการแยกบริสุทธิ์อาจทำให้แอลฟาอะไมเลสบางส่วนเสียหาย จึงทำให้ได้ร้อยละผลผลิตต่ำ จากรายงานการศึกษาก่อนหน้าการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography เป็นเทคนิคที่สามารถแยกบริสุทธิ์



แอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ การแยกบริสุทธิ์แอลฟาอะไมเลสในเมล็ดถั่วเหลือง และถั่วปากอ้า พบว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 400.63 เท่า (Kumari *et al.*, 2010) และ 2,050 เท่า (Singh *et al.*, 2017) ตามลำดับ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2020 มีรายงานวิจัยการแยกบริสุทธิ์แอลฟาอะไมเลสในเมล็ดถั่วอิตาลีดำก้างงอก (*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.) ด้วยเทคนิค β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography พบว่าแอลฟาอะไมเลสที่ได้มีกิจกรรมจำเพาะ 750.0 U/mg มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 507.8 เท่า และได้ผลผลิต 14.0% (Posoongnoen & Thummavongsa, 2020) เมื่อนำแอลฟาอะไมเลสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้ว มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS – PAGE และ Zymographic พบว่า MpAmy มีความบริสุทธิ์ และมีขนาดโมเลกุล 58 kDa ซึ่งมีความสอดคล้องกับความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้น 216.4 เท่า (ตารางที่ 1) โดยขนาดโมเลกุลของ MpAmy มีความสอดคล้องกับขนาดโมเลกุลของแอลฟาอะไมเลสจากพืชที่มีรายงานการศึกษา ก่อนหน้า ซึ่งมีขนาดโมเลกุลในช่วง 32 – 84 kDa และมีค่าใกล้เคียงกับแอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดถั่วอิตาลีดำก้างงอก (50 kDa) (Posoongnoen & Thummavongsa, 2020) แอลฟาอะไมเลสจากถั่วปากอ้า ข้าวสาลี และถั่วเขียว มีขนาดโมเลกุล 45.0 kDa (Singh *et al.*, 2017) 32.0 kDa (Singh & Kayastha, 2014) และ 46.0 kDa (Thipathi *et al.*, 2007) ตามลำดับ การศึกษาการเร่งปฏิกิริยากับสารตั้งต้นสังเคราะห์ Ethylidene-pNP-G7 จะเห็นได้ว่า MpAmy เป็นเอนไซม์อะไมเลสชนิดแอลฟา (α -Type) เนื่องจากสามารถเร่งปฏิกิริยาสลายสารตั้งต้น Ethylidene-pNP-G7 ซึ่งแอลฟาอะไมเลสเท่านั้นจึงจะสามารถเร่งปฏิกิริยาสลายพันธะ α -1,4 glycosidic แบบสุ่ม (random) ในโมเลกุลของสารตั้งต้นนี้ได้ เมื่อนำไปศึกษาสมบัติต่าง ๆ พบว่า MpAmy มีพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) คือพีเอช 5.0 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับแอลฟาอะไมเลสจากถั่วเขียว (พีเอช 5.6) ถั่วเหลือง (พีเอช 5.5) และข้าวสาลี (พีเอช 5.0) (Tripathi *et al.*, 2007; Kumari *et al.*, 2010; Singh & Kayastha, 2014) ในขณะที่แอลฟาอะไมเลสจากถั่วปากอ้า และถั่วอิตาลีดำ มีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่พีเอช 6.0 (Singh *et al.*, 2017; Posoongnoen & Thummavongsa, 2020) และ MpAmy มีความเสถียรสูงที่พีเอช 5.0 – 6.0 จากการเร่งปฏิกิริยาได้สูงที่พีเอชช่วงกรดอ่อน แสดงให้เห็นว่า MpAmy มีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง โดยในปัจจุบันแอลฟาอะไมเลสที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมแป้งส่วนใหญ่จะมีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 6.8 ดังนั้นจึงสามารถเร่งปฏิกิริยาสลายแป้งได้ต่ำที่พีเอช 3.2 – 6.0 ซึ่งเป็นพีเอชของแป้งในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรม (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006) ดังนั้นการค้นหาแหล่งของเอนไซม์ใหม่ที่สามารถมีกิจกรรมและความเสถียรสูงในพีเอชช่วงกรดอ่อน จึงเหมาะสมในการมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง และเป็นการลดค่าใช้จ่าย และเวลาในการปรับพีเอชของแป้งจากพีเอช 3.2 – 6.0 มาที่พีเอช 6.8 ซึ่งเป็น Optimum pH ของแอลฟาอะไมเลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมปัจจุบัน เพื่อให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้สูง (Wu *et al.*, 2018) นอกจากนี้ MpAmy มีอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ที่ 60.0 °C ที่อุณหภูมิสูง 70.0 – 90.0 °C เอนไซม์ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงมากกว่า 80% Relative activity ที่อุณหภูมิสูง 70.0 – 90.0 °C เอนไซม์ยังมีความเสถียรสูงมีกิจกรรมการทำงานเหลืออยู่มากกว่า 75% Residual activity แสดงว่า MpAmy มีสมบัติเป็น Thermostable α -amylase จากรายงานการศึกษาก่อนหน้า พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมของ MpAmy มีความใกล้เคียงกับอุณหภูมิของแอลฟาอะไมเลสจากถั่วอิตาลีดำ (70 °C) (Posoongnoen & Thummavongsa, 2020) ถั่วปากอ้า (65 °C) (Singh *et al.*, 2017) ข้าวสาลี (68 °C) (Singh & Kayastha, 2014) ถั่วเหลือง (70 °C) (Kumari *et al.*, 2010) และถั่วเขียว (65 °C) (Thipathi *et al.*, 2007) นอกจากนี้ MpAmy ยังมี



ความจำเพาะสูงกับสารตั้งต้นที่มีพันธะ α -1,4 glycosidic ในโมเลกุล แสดงว่าเป็นแอลฟาอะไมเลสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา สลายพันธะ α -1,4 glycosidic ภายในโมเลกุลพอลิแซ็กคาไรด์แบบสุ่ม (random) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ และกลูโคส สารตั้งต้นที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และประกอบด้วยพันธะ α -1,4 glycosidic จัดว่าเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมของ แอลฟาอะไมเลส (Noman *et al.*, 2006) จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับความจำเพาะของสารตั้งต้นกับแอลฟา อะไมเลส จากเมล็ดถั่วปากอ้า พบว่าเอนไซม์สามารถเร่งสลายสารตั้งต้นแป้ง อะไมโลเพคติน และไกลโคเจนได้ โดยมี %Relative activity เท่ากับ 100.0, 26.7 และ 8.6 ตามลำดับ (Singh *et al.*, 2017) และมีความสอดคล้องกับแอลฟา อะไมเลสจากเมล็ดถั่ววี้ได้ ซึ่งเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นแป้งมากที่สุด (100.00% relative activity) รองลงคือ อะไมโลเพคติน (96.59% relative activity) และไกลโคเจน (59.58% relative activity) ตามลำดับ (Posoongnoen & Thummavongsa, 2020) การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่า $MpAmy$ มีค่าคงที่ของไมเคลิส (K_m) เท่ากับ 2.1 mg/mL โดยค่า K_m มีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของแอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดพืชกำลังงอก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.71 – 4.60 mg/mL (Posoongnoen & Thummavongsa, 2020) โดยค่า K_m สำหรับสารตั้งต้นแป้งของ $MpAmy$ มีค่าที่ต่ำกว่า ค่า K_m ของแอลฟาอะไมเลสจากถั่วปากอ้า (4.60 mg/mL) (Singh *et al.*, 2017) ถั่ววี้ได้ (3.12 mg/mL) (Posoongnoen & Thummavongsa, 2020) และเปลือกแก้วมังกร (2.70 mg/mL) (Amid & Manap, 2014) ซึ่งค่า K_m ที่ต่ำ แสดงว่าเอนไซม์มีความจำเพาะกับแป้งสูง ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาแรก และการค้นพบแหล่งของแอลฟาอะไมเลสชนิดใหม่ในเมล็ด ถั่วขอของประเทศไทย ซึ่งมีคุณสมบัติที่น่าสนใจ คือ เร่งปฏิกิริยาได้สูงที่พีเอช 5.0 – 6.0 และอุณหภูมิ 50.0 – 90.0 °C จึง คาดว่ามีสมบัติเป็น Thermostable α -amylase และมีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยากับแป้งสูง จึงเหมาะสมในการนำไป ประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมแป้ง และนำไปพัฒนาโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การแยกบริสุทธิ์แอลฟาอะไมเลสจากเมล็ดถั่วขอกำลังงอก (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) ($MpAmy$) โดยใช้ 2 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 35 – 65% (w/v) และ β -cyclodextrin sepharose 6B affinity chromatography ทำให้เอนไซม์มีความจำเพาะ 91.0 U/mg มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 216.4 เท่า เมื่อนำ $MpAmy$ มาศึกษา สมบัติพบว่า มีขนาดโมเลกุล 58 kDa เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดที่พีเอช 5.0 และ 60.0 °C มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่กว้างตั้งแต่ 5.0 – 7.0 และอุณหภูมิที่กว้างตั้งแต่ 30.0 – 90.0 °C เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาสลายสารตั้งต้น Ethylidene-pNP-G7 เท่ากับ 280.8 nmol/min/mL แสดงว่า $MpAmy$ เป็นอะไมเลสชนิดแอลฟา (α -type) เอนไซม์มีความจำเพาะกับแป้งมากที่สุด รองลงมาคือ อะไมโลเพคติน และไกลโคเจน ตามลำดับ การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์สำหรับสารตั้งต้นแป้ง พบว่ามีค่า K_m 2.1 mg/mL และ V_{max} 0.2 μ mol/min/mL จากสมบัติของ $MpAmy$ คาดว่ามีสมบัติเป็น Thermostable α -amylase ซึ่งเป็น สมบัติที่ดีในการนำไปพัฒนาและประยุกต์ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมที่มีสภาพที่ใช้ความร้อนในกระบวนการผลิต เช่น อุตสาหกรรมแป้ง และการผลิตพลังงานชีวภาพไบโอเอทานอลในอนาคตต่อไป



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับบุคลากรคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ขอขอบคุณคุณธรรทิพย์ แมลงพันธ์ และคุณมาริษา แจ่มศรีสุข ผู้ช่วยวิจัยในการศึกษาสภาวะในการศึกษาแบบแผนโปรตีนเบื้องต้น ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ สาขาวิชาเคมี และสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ที่สนับสนุนอุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Amid, M. & Abd. Manap, M.Y. (2014). Purification and characterization of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *Food Chem*, 165, 412–418.
- Bradford, M.M. (1977). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–254.
- Farooq, M.A., Ali, A., Hassan, A., Tahir, H.M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2012). Biosynthesis and industrial applications of α -Amylase: a review. *Arch Microbiol*, 203, 1281–1292.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., & Fogarty, W.M. (2000). Review: cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. *Enzyme Microb Technol*, 26, 561–567.
- Jegannathan, K.R. & Nielsen, P.H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *J Clean Prod*, 42, 228–240.
- Kumari, A., Singh, V.K., Fitter, J., Polen, T., & Kayastha, A.M. (2010). α -Amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds–purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. *Phytochemistry*, 71, 1657–1666.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lampariello, L.R., Cortelazzo, A., Guerranti, R., Sticozzi, C., & Valacchi, G. (2012). The Magic Velvet Bean of *Mucuna pruriens*. *J Tradit Complementary Med*, 2, 331–339.



Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31, 426–428.

Muralikrishna, G. & Nirmala, M. (2005). Cereal α -amylases—an overview. *Carbohydr Polym*, 60, 163–173.

Noman, A.S.M., Hoque, M.A., Sen, P.K., & Karim, M.R. (2006). Purification and some properties of α -amylase from post-harvest *Pachyrhizus erosus* L. tuber. *Food Chem*, 99, 444–449.

Paul, J.S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S., & Jadhav, S.K. (2021). Aspects and recent trends in microbial α -amylase: a review. *Appl Biochem Biotechnol*, 193, 2649–2698.

Posoongnoen, S., Ubonbal, R., Thummasirak, S., Daduang, J., Minami, H., Yamamoto, K., & Daduang, S. (2015). α -Amylase from Mon Thong durian (*Durio zibethinus* Murr. cv. Mon Thong)—nucleotide sequence analysis, cloning and expression. *Plant Biotechnol*, 32, 1–10.

Posoongnoen, S. & Thummavongsa, T. (2020). Purification and characterization of thermostable α -amylase from germinating Sword bean (*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.) seed. *Plant Biotechnol*, 37, 31–38.

Posoongnoen, S., Ubonbal, R., Klaynongsruang, S., Daduang, J., Roytrakul, S., & Daduang, S. (2021). Characterization and molecular cloning of secreted α -amylase with dominant activity from Mon Thong durian (*Durio zibethinus* Murr. cv. Mon Thong). *Rev Bras Frutic, Jaboticabal*, 43, 1–19.

Singh, K. & Kayastha, A.M. (2014). α -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: its purification, biochemical attributes and active site studies. *Food Chem*, 162, 1–9.

Singh, K., Ahmad, F., Singh, V.K., Kayastha, K., & Kayastha, A.M. (2017). Purification, biochemical characterization and Insilico modelling of α -amylase from *Vicia faba*. *J Mol Liq*, 234, 133–141.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., & Pandey, A. (2006). α -amylases from microbial sources – An overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, 44, 173–184.



- Sundarram, A. & Murthy, T.P.K. (2014). α -Amylase production and applications: A review. *J Appl Environ Microbiol*, 2, 166–175.
- Tripathi, P., Lo Leggio, L., Mansfeld, J., Ulbrich–Hofmann, R., & Kayastha, A.M. (2007). α -Amylase from mung beans (*Vigna radiata*)–Correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling. *Phytochemistry*, 68, 1623–1631.
- Vretblad, P. (1974). Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatographic via their hydroxyl group, the cyclohexa amylose– β -amylase system. *FEBS Lett*, 47, 86–89.
- Wisessing, A., Engkagul, A., Wongpiyasatid, A., & Choowongkamon, K. (2010). Biochemical characterization of the α -amylase inhibitor in mung beans and its application in inhibiting the growth of *Callosobruchus maculatus*. *J Agric Food Chem*, 58, 2131–2137.
- Wu, X., Wang, Y., Tong, B., Chen, X., & Chen, J. (2018). Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid–stable alpha–amylase from *Bacillus licheniformis* B4–423. *Int J Biol Macromol*, 109, 329–337.
- Xie, Z., Zhang, Z.L., Hanzlik, S., Cook E., & Shen, Q.J. (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin – induced alpha–amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic–acid–inducible WRKY gene. *Plant Mol Biol*, 64, 293–303.