# บทที่ 2

## วารสารปริทัศน์

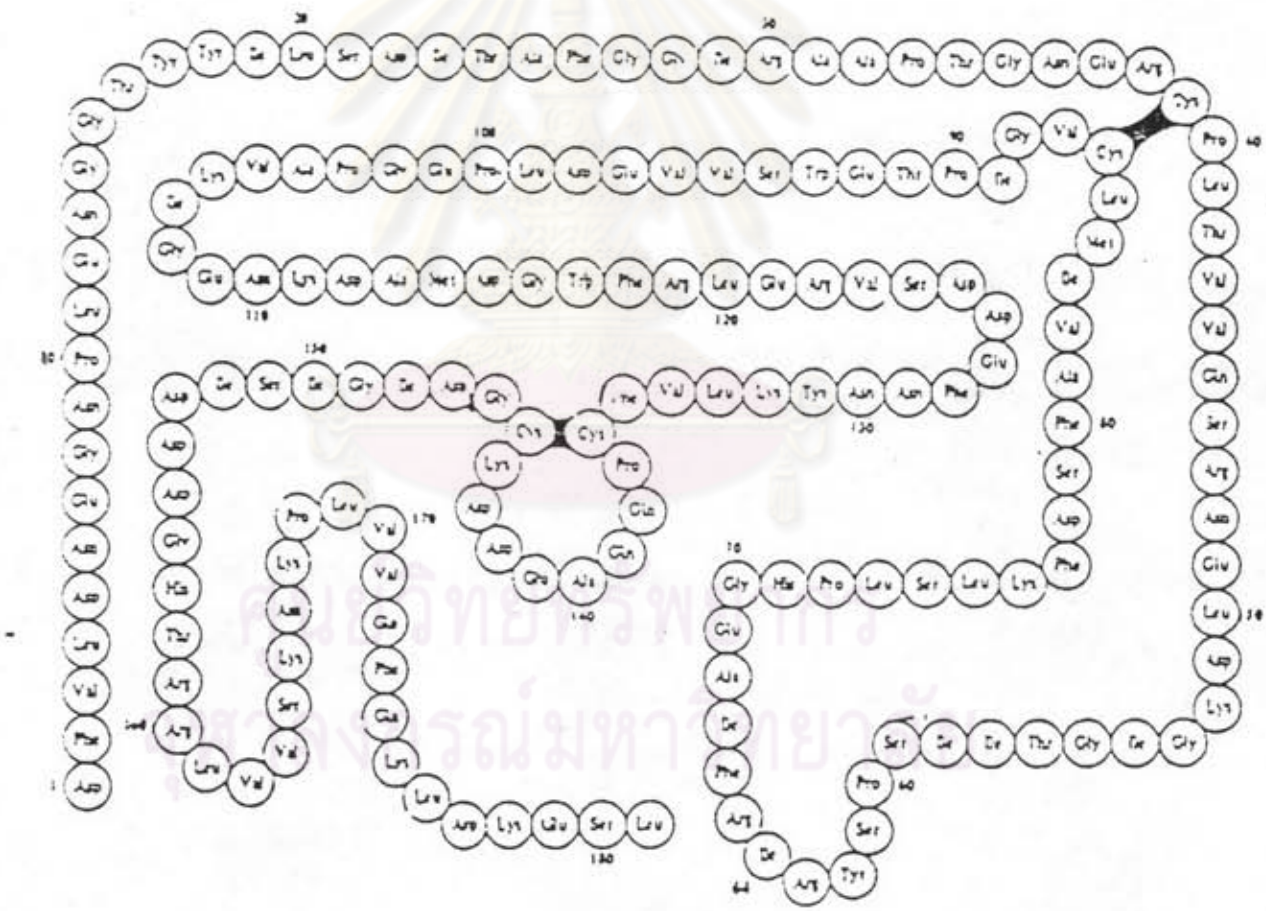
สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน จัดเป็นสารด้านคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งมีโครงสร้างเป็นพอลีเปปไทด์ โดยจะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดพืช ซึ่งจะมีการเรียงลำดับของกรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล และค่าไอโซอิเลคทริคแตกต่างกัน (Odani และ Ikenaka, 1977; Iwasaki และคณะ, 1976; Belew และ Eaker, 1976) ทำให้มีความสามารถในการยับยั้งน้ำย่อยโปรตีนชนิดต่างๆได้แตกต่างกัน(Krahnและ Stevens,1970)โดยบางชนิดจะยับยั้งได้เฉพาะ เอนไซม์ทริปซิน บางชนิดจะยับยั้งได้ทั้งเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์คีโมทริปซิน เช่น ในถั่วเหลืองจะพบสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน 2 ชนิด สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินทั้ง 2 ชนิดคือ

### 1. คูนิทซ์ ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Kunitz trypsin inhibitor)

คูนิทซ์ ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่แยกได้จากถั่วเหลือง โดยทำการแยกได้หลายวิธี เช่น โครมาโตกราฟี (Chromatography), เจลอีเลคโทรโฟรีซีส (Gel electrophoresis)และ ไอโซอีเลคทริค โฟคัสซิ่ง (Isoelectric focusing) ( Koide และ Ikenaka, 1973;Kunitz, 1947)

จากการแยกสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วเหลือง พบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18,000 ถึง 20,000 และมีค่าไอโซอิเลคทริคที่พีเอช 3.5-4.4 ส่วนประกอบนี้คือ คูนิทซ์ ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ ซึ่งในโครงสร้างจะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 181 ตัว ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ และมีการเชื่อมด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) จำนวน 2 พันธะ พันธะแรกเชื่อมกันระหว่างกรดอะมิโนซิสทีน (Cystine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนลำดับที่ 36 และ 86 ส่วนอีกพันธะจะเชื่อมระหว่างกรดอะมิโนซิสทีนตำแหน่งที่ 136 และ 145

โดยตำแหน่งที่ใช้เข้าจับ (Reactive site) ซึ่งใช้จับเอนไซม์ทริปซินจะอยู่ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ 63 และ 64 ซึ่งเป็นกรดอะมิโน อาร์จินีน (Arginine) และไอโซลูซีน (Isoleucine) ตามลำดับ โครงสร้างของคูนิทซ์ ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลำดับของกรดอะมิโนในคูนิทซ์ ทริปซิน อินฮิบิเตอร์

การวิเคราะห์โดยใช้ เอกซ์เรย์ คริสทัลโลกราฟิก (X-ray crystallographic) ซึ่งสามารถวิเคราะห์โครงสร้างที่แท้จริงของ คูนิทซ์ ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ พบว่าจะอยู่ในลักษณะที่ขดกลมแบบอิสระ (Random coil)เป็นส่วนใหญ่ โดยแตกต่างจากโปรตีนรูปกลม (Globular protein) ทั่วๆ ไป คือสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินชนิดนี้จะมีความทนทานต่อสารทำให้สลายตัว (Denaturing agent) เช่น ยูเรีย และควอนิดิเนียม คลอไรด์ ได้ดี ถึงแม้ว่าพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 136 และ 145 จะถูกแยกออกก็ไม่ทำให้สูญเสียสมรรถนะแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามหากพันธะไดซัลไฟด์เกิดการแตกออกทั้ง 2 พันธะ ก็จะทำให้สูญเสียสมรรถนะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

2. โบวแมน-เบริค อินฮิบิเตอร์ (Bowman-Birk inhibitor)

โบวแมน-เบริค อินฮิบิเตอร์ เป็นสารยับยั้งเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่พบในถั่วเหลือง Birk และคณะ (1961) ได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์ และมีการอธิบายเป็นครั้งแรก Bowman (1971) พบข้อแตกต่างระหว่าง โบวแมน-เบริค อินฮิบิเตอร์ และ คูนิทซ์ อินฮิบิเตอร์ ดังนี้

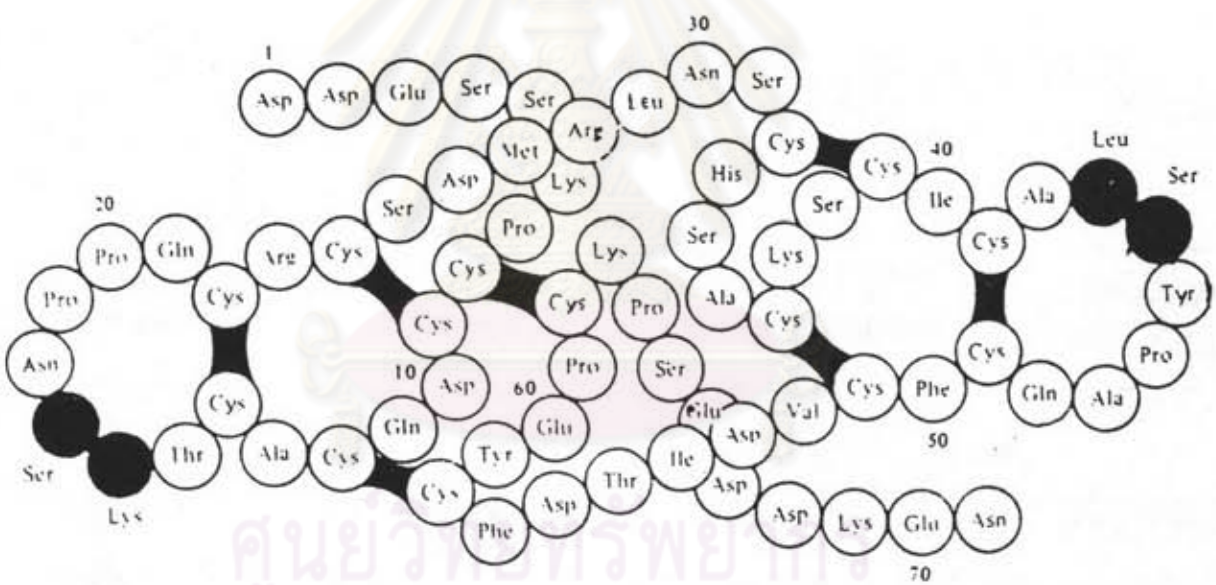
2.1 โบวแมน-เบริค อินฮิบิเตอร์ มีโมเลกุลที่เล็กกว่า โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8,000

2.2 มีกรดอะมิโนซีสทีน(Cystine) อยู่ปริมาณมาก จึงทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ถึง 7 พันธะในโมเลกุล แต่จะไม่มีไกลซีน (Glycine) และทริปโตแฟน (Tryptophan)

2.3 มีบริเวณเข้าจับที่เป็นอิสระ (Independent binding site) จึงจับได้ทั้งเอนไซม์ไคโมทริปซิน และเอนไซม์ทริปซิน

2.4 มีความคงทนต่อความร้อน กรด และด่าง เนื่องจากมีพันธะไดซัลไฟด์ที่พบอยู่ในโมเลกุลเป็นจำนวนมาก

โครงสร้างของโบวแมน-เบริค อินฮิบิเตอร์ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 71 ตัว เชื่อมต่อกันเป็นสายพอลีเปปไทด์ มีพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้างถึง 7 พันธะ โครงสร้างของโบวแมน-เบริค อินฮิบิเตอร์ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2 (Odani และ Ikenaka, 1972)




รูปที่ 2 ลำดับของกรดอะมิโนในโบวแมน-เบริค อินฮิบิเตอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**พืชที่พบสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน**

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน มักพบในเมล็ด (Seed) แต่อาจพบในส่วนอื่นๆ ของพืชได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 (Liener, 1980)

**ตารางที่ 1 พืชที่พบสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน และส่วนของพืชที่พบสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน**

| ชื่อทางพฤกษศาสตร์ | ชื่อสามัญ | ส่วนของพืช |
|---|---|---|
| *Anacardium occidentale* | Cashew nut | Nut |
| *Arachis hypogaea* | Peanut, groundnut | Nut |
| *Avena sativa* | Oats | Endosperm |
| *Bambusa arundinaria* | Bamboo | Sprouts |
| *Beta vulgaris* | Beet, beetroot | Tuber |
| *Brassica oleracea* | Broccoli, brussels sprouts | Seed |
| *Colocasia esculenta* | Taro | Tuber |
| *Cucurbita maxima* | Squash | Leaves |
| *Dolichos biflorus* | Horse gram | Seed |
| *Glycine max* | Soybean | Seed |
| *Hordeum vulgare* | Barley | Endosperm, embryo |
| *Helianthus annuus* | Sunflower | Seed |
| *Ipomoea batata* | Sweet potato | Tuber |
| *Solanum tuberosum* | Potato | Tuber, leaves |
| *Zea mays* | Corn, maize | Kernel |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในประเทศไทยได้มีผู้วิจัยหาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในเมล็ดฟักทอง ใบกระถิน และเมล็ดกระถิน ได้ผลตามตารางที่ 2 (ชุติมา, 2532)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในใบกระถิน เมล็ดกระถิน และเมล็ดฟักทอง

| ชนิด | ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (TIU/มก.) |
|---|---|
| ใบกระถิน | 0.48 |
| เมล็ดกระถิน | 1.71 |
| เมล็ดฟักทอง | 0.07 |

นอกจากนี้ได้มีการวิจัยหาสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในเห็ดชนิดต่างๆ ได้ผลตามตารางที่ 3 (Naranin, 1992)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดตีนแรด

| ชนิด | ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (TIU/มก.) |
|---|---|
| เห็ดโคน | 3.37±0.14 |
| เห็ดฟาง | 3.69±0.66 |
| เห็ดตีนแรด | 2.51±0.14 |

Sotelo และ Alvarez(1991) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในพืชพวกทรีโอโบรมา (*Theobroma* species) คือ *Theobroma cacao*, *Theobroma bicolor* และ *Theobroma angustifolium* ได้ผลตามตารางที่ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

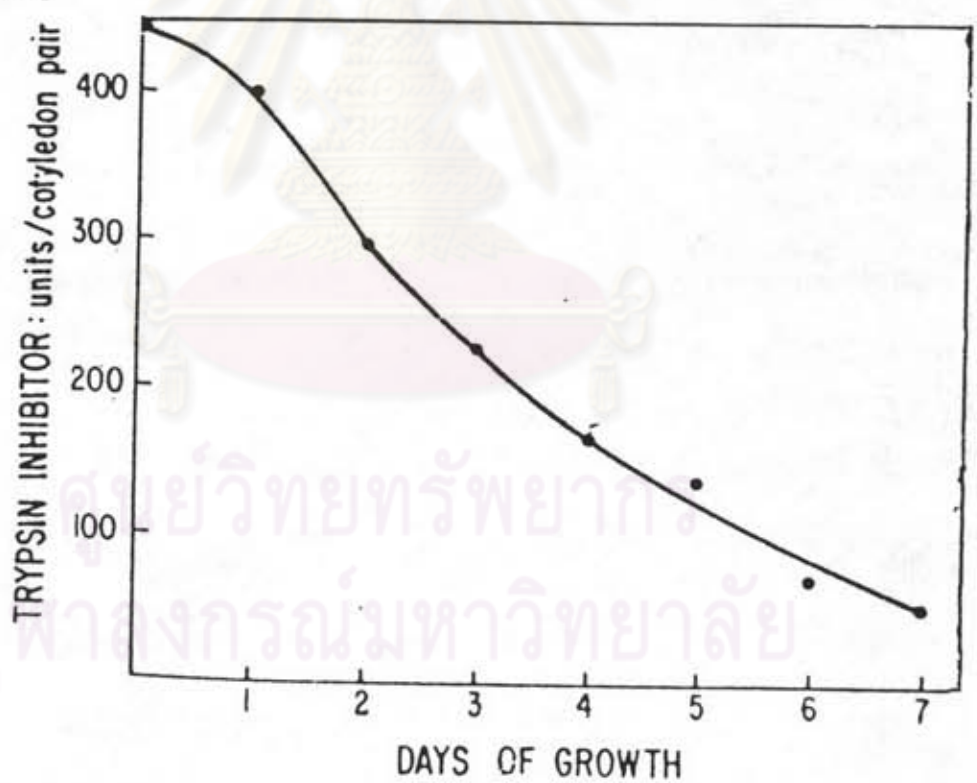
ตารางที่ 4 ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในพืชพวกทรีโอโบรมา (*Theobroma* species)

| ตัวอย่าง | สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน TIU/มก.น้ำหนักแห้ง |
|---|---|
| *Theobroma cacao* | |
| *Costarrica* variety | |
| seeds | 39.06 |
| leaves | 13.75 |
| shell | - |
| *Criollo* variety | |
| seeds | 41.43 |
| leaves | 7.83 |
| shell | - |
| *Theobroma bicolor* | |
| seeds | 8.00 |
| leaves | 7.83 |
| shell | - |
| *Theobroma angustifolium* | |
| seeds | 8.57 |
| leaves | 15.27 |
| shell | - |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทบาทของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินต่อพืช

จากการศึกษาในพืชหลายชนิด พบว่าปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะลดลงในระหว่างการงอก (Germination)(Udupa และ Pattabiraman, 1987) ในประเทศไทยได้มีการวิจัยโดย อรอนงค์ นัยวิกุล และพัชรี โสธนาสมบูรณ์ (2532)โดยการนำเอาถั่วเขียว 4 พันธุ์คือถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์กำแพงแสน 1 ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์พื้นเมือง และถั่วเขียวผิวมันพันธุ์อู่ทอง 1 มาเพาะ 3 วัน เป็นถั่วงอกขนาดที่ใช้บริโภคทั่วไป พบว่าถั่วงอกมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเกือบ 10 เท่า แต่สารอาหารอื่นๆ ส่วนใหญ่ลดลงรวมทั้งสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงมาก Maarten และBaumgartner(1978) ได้ทำการวิจัยเปรียบเทียบปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในใบเลี้ยง(Cotyledon)ของถั่วเขียวที่ระยะเวลาต่างๆ ของการงอก ได้ผลดังรูปที่ 3




รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการงอก และปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเขียว (Maarten และBaumgartner,1978)

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่มีปริมาณลดลงนี้เกิดขึ้น เพื่อส่งเสริมให้เกิดการสลายโปรตีนที่ใช้ในระหว่างการงอก (Protein catabolism) โดยจะแตกต่างกับระยะก่อนหน้านี้ที่เมล็ดอยู่ในระหว่างการเติบโต (Seed maturation) ซึ่งปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะสูงเนื่องจากป้องกันการสลายโปรตีนที่เก็บไว้เพื่อมิให้เกิดการย่อยตัวเอง (Autolysis)

นอกจากบทบาทของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่เกี่ยวกับการควบคุมเอนไซม์ย่อยโปรตีนในพืชแล้วสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินยังมีบทบาทในการป้องกันพืชจากการทำลายของเชื้อรา และแบคทีเรีย ซึ่งมีผู้พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากข้าวโพดสามารถทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราบางชนิดช้าลงได้ (Abdul ,1973) โดยการชลอการเจริญเติบโตนี้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

**บทบาทของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินต่อสัตว์**

Obsorn และ Mendel (1917) พบว่าหนูที่เลี้ยงด้วยถั่วเหลืองดิบ จะไม่เจริญเติบโตเท่าที่ควร แต่เมื่อนำถั่วเหลืองมาทำให้สุกด้วยความร้อน จะสามารถช่วยให้การเจริญเติบโตของหนูดีขึ้น นอกจากนี้ได้มีการทดลองในพืชอื่นๆ ซึ่งให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน Chernick และคณะ (1948) พบว่าสัตว์ที่เลี้ยงด้วยถั่วเหลืองดิบจะมีตับอ่อนที่ขยายตัวใหญ่ขึ้น (Kakade และคณะ, 1976) ผลดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินไปรบกวนการดูดซึมของกรดอะมิโน(Krogdahlและ Holm,1979)และมีการสลายกรดอะมิโน เพื่อนำไปสร้างน้ำย่อยเพิ่มขึ้น เพื่อชดเชยน้ำย่อยที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินแต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ตับอ่อนจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตน้ำย่อยให้มากพอกับความต้องการการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลองก็มิได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการสลายกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นส่วนประกอบ เพื่อนำไปใช้สร้างน้ำย่อย แทนที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของร่างกาย

Kakade และ Thomson (1976) ได้ศึกษาถึงความไวของการตอบสนองต่อสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ พบว่าสัตว์ที่มีน้ำหนักของตับอ่อนมากกว่าร้อยละ

0.3 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัว จะมีความไวต่อการเกิดการขยายตัวของตับอ่อนเมื่อได้รับสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมากกว่าสัตว์ที่มีน้ำหนักของตับอ่อนต่ำกว่าร้อยละ 0.3 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัว ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของตับอ่อนของสัตว์แต่ละชนิดและการเกิดการขยายตัวของตับอ่อนเมื่อได้รับสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเหลืองดิบ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

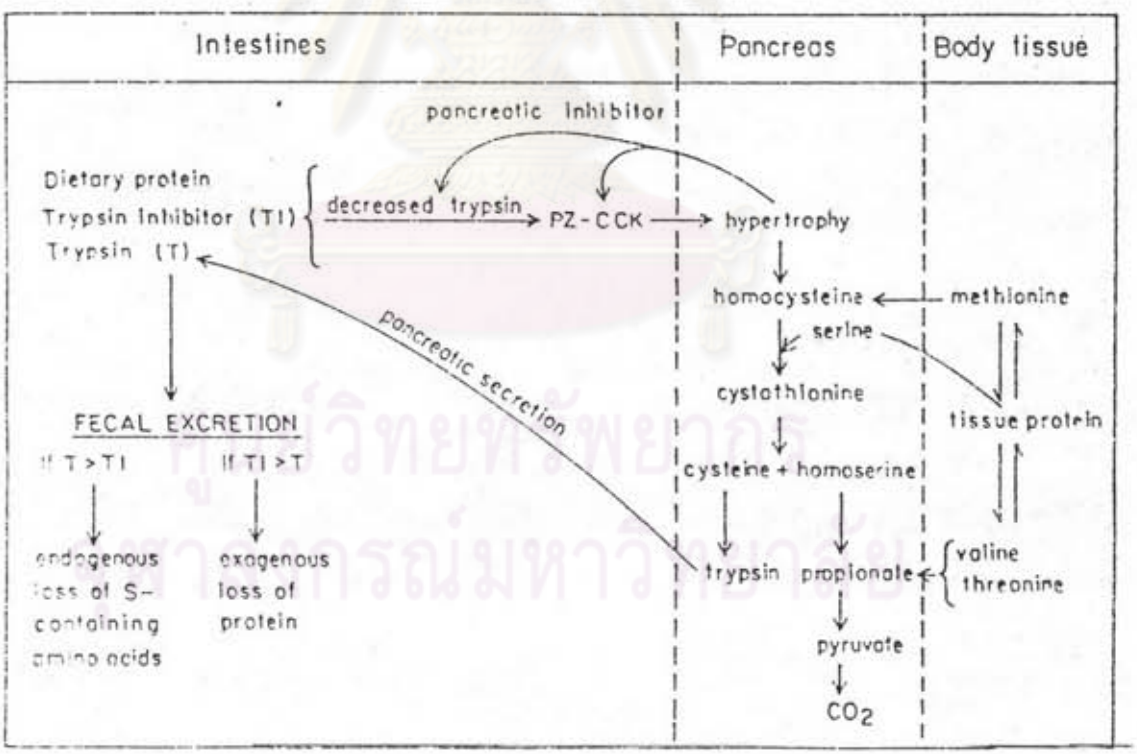
**ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของตับอ่อนของสัตว์แต่ละชนิด และการเกิดการขยายตัวของตับอ่อนเมื่อได้รับสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเหลืองดิบ (Kakade และ Thomson, 1976)**

| ชนิดสัตว์ | ขนาดของตับอ่อน (ร้อยละของน้ำหนักตัว) | การเกิดขยายตัวของตับอ่อน |
|---|---|---|
| หนู (Mouse) | 0.6-0.8 | + |
| หนู (Rat | 0.5-0.6 | + |
| ไก่ (Chick) | 0.4-0.6 | + |
| หนูตะเภา | 0.29 | ± (ไม่เปลี่ยนแปลง) |
| สุนัข | 0.21-0.24 | - |
| หมู | 0.10-0.12 | - |
| คน | 0.09-0.12 | - |
| วัว | 0.06-0.08 | - |

จากความสัมพันธ์ที่แสดงไว้ในตารางที่ 5 จึงเชื่อว่าถ้าคนรับประทานถั่วเหลืองดิบจะไม่ก่อให้เกิดการขยายตัวของตับอ่อน เนื่องจากน้ำหนักของตับอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวจะมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 0.3 ในขณะที่หนู, ไก่ มีแนวโน้มที่จะเกิดการขยายตัวของตับอ่อนได้มากกว่า ทั้งนี้หนูและไก่ จะต้องการกรดอะมิโนชนิดที่มีกำมะถันเป็นส่วนประกอบเพื่อใช้ในการสร้างน้ำย่อยสูงกว่าในคน, วัว, หมู และสุนัข เนื่องจากมีขนาดของตับอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามหากสามารถกำจัดหรือลดปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

ในอาหารลงได้ ก็จะปลอดภัยต่อการบริโภค และได้รับคุณค่าอาหารมากยิ่งขึ้น

การขยายตัวของตับอ่อนเมื่อได้รับสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินนี้จะเกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขนาดของเซลล์มากกว่าการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Krogdahl และ Holm, 1979) ทั้งนี้สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินทำให้เกิดการหลั่งน้ำย่อยจากตับอ่อนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะต้องใช้กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นส่วนประกอบเพื่อสร้างเป็นน้ำย่อยดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งจะเห็นว่าเมทไธโอนีน (Methionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีปริมาณจำกัด (Limiting amino acid) ในถั่วเหลืองจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นซีสทีน และเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการเผาผลาญเพิ่มมากขึ้น กลไกของการควบคุมการหลั่งน้ำย่อยจากตับอ่อนได้แสดงไว้ในรูปที่ 4




รูปที่ 4 กลไกการควบคุมการหลั่งน้ำย่อยจากตับอ่อน (Liener และ Kakade, 1980)

การหลั่งน้ำย่อยจากตับอ่อนนี้มีการควบคุมให้หยุดสร้าง (Negative feedback) โดยระดับของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินที่มากเกินพอ โดยจะไปกดการหลั่งของน้ำย่อยจากตับอ่อน สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะออกฤทธิ์โดยการจับกับเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในลำไส้ เพื่อมิให้เกิดการยับยั้งให้หยุดสร้าง (Negative feedback) จึงส่งผลให้ตับอ่อนหลั่งน้ำย่อยเพิ่มขึ้น ปริมาณโปรตีนที่ได้รับจากอาหาร (Dietary protein)ก็ทำหน้าที่ควบคุมการหลั่งน้ำย่อยจากตับอ่อนได้เช่นกัน โดยจะไปจับกับเอนไซม์ทริปซินเกิดเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อน ทำให้ปริมาณเอนไซม์ทริปซินอิสระที่จะไปยับยั้งการหลั่งมีน้อยลง มีผลทำให้ตับอ่อนหลั่งน้ำย่อยเพิ่มขึ้น ตับอ่อนเองก็มีกลไกเพื่อกระตุ้นการหลั่งน้ำย่อยเช่นกัน โดยอาศัยสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ตับอ่อนสร้างขึ้นเอง และสารนี้จะจับกับเอนไซม์ทริปซินอิสระที่จะไปควบคุมการหยุดสร้าง ทำให้เกิดการหลั่งน้ำย่อยเพิ่มขึ้น (Kassel และ Laskowski, 1956)

มีผู้พบว่าตับอ่อนของหนูซึ่งได้รับพลาสมาจากหนูที่ได้รับสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะมีการหลั่งน้ำย่อยออกมามาก เนื่องจากมีการถ่ายทอดพลาสมาเฟคเตอร์ (Plasma factor) ซึ่งต่อมาพบว่าเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 และมีลักษณะคล้ายแพนครีโอไซมิน (Pancreozymin) ซึ่งสารนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งน้ำย่อยจากตับอ่อนของหนูได้ (Liener และKakade,1980) ได้มีการทดลองสนับสนุนโดยการฉีดสารแพนคลีโอไซมิน-โคลี่ซีสโตไคนิน (PZ-CCK) แก่หนู พบว่าตับอ่อนของหนูมีการเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของเอนไซม์ทริปซิน และสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในลำไส้เล็ก สามารถกำหนดรูปแบบของการสูญเสียไนโตรเจนในร่างกายได้เช่น ในลูกไก่ที่ตับอ่อนมีการตอบสนองช้า เนื่องจากเกิดการขยายตัวของตับอ่อน (Hypertrophy) ทำให้ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่สร้างจากตับอ่อนมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะหักล้างกับสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ ทำให้ในลำไส้มีระดับสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในปริมาณสูง มีผลทำให้การย่อยโปรตีนถูกยับยั้ง ดังนั้นโปรตีนจากอาหารจึงถูกขับออกมาทางอุจจาระซึ่งถือว่าเป็นการสูญเสียไนโตรเจนที่ได้รับเข้ามา แต่ในกรณีของหนู หรือไก่ที่มีอายุมากระดับของเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนจะเพียงพอต่อการป้องกันการยับยั้งการย่อยโปรตีน รูปแบบของการสูญเสียไนโตรเจน จึงเป็นแบบเอนโดจีเนียส (Endogenous) ซึ่งเป็นการสูญเสียไนโตรเจนทางลำไส้ในรูปน้ำย่อยตามปกติ (Liener และ Kakade,1980)

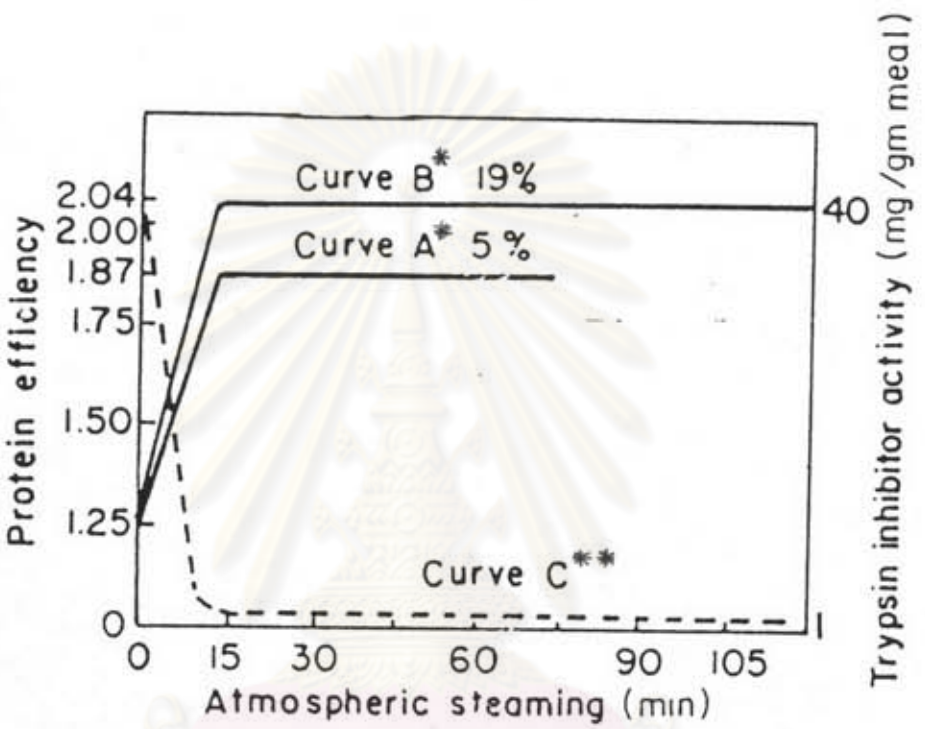
## การลดปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

ได้มีผู้ศึกษาถึงวิธีการลดปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งสามารถกระทำได้หลายวิธีดังนี้

### 1. ใช้ความร้อน

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ส่วนใหญ่จะถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อน ซึ่งจะทำให้คุณค่าทางโภชนาการของอาหารเพิ่มขึ้นได้ (Liener, 1980) วิธีการให้ความร้อน อาจทำได้หลายวิธี เช่น การให้ความร้อนในรูปของไอน้ำโดยหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) การต้ม การใช้รังสีไมโครเวฟ หรือการใช้ความร้อนจากพลังงานไฟฟ้า รวมทั้งการทำให้แห้งด้วยความร้อน (Albrecht และคณะ, 1966; Wing และ Alexander, 1971; Mendel และคณะ,1990) ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะถูกทำลายไปมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ระดับอุณหภูมิ ปริมาณความชื้น ระยะเวลาของการให้ความร้อน ตลอดจนขนาดอนุภาคของอาหาร Borchers และคณะ (1972) พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในของเหลวสกัด (Solvent extract) จากถั่วเหลือง จะถูกทำลายโดยการนึ่งด้วยไอน้ำ (Steaming) เป็นเวลา 60 นาที หรือนึ่งโดยหม้อนึ่งอัดไอ ภายใต้ภาวะต่างๆ ดังนี้ ที่ความดัน 5 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที ที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที, ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที, ที่ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที Collins และ Beaty (1980) พบว่าการต้มถั่วเหลืองในน้ำเดือดนาน 3 นาที จะทำให้สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงได้ถึงร้อยละ 90

มีผู้ทำการทดลองโดยนำถั่วเหลืองที่ลอกเปลือกและสกัดเอาไขมันออกแล้วซึ่งมีความชื้นแตกต่างกัน 2 ระดับคือ ระดับความชื้นร้อยละ 5 และร้อยละ 19 มาให้ความร้อนโดยการนึ่งภายใต้บรรยากาศ(Atmospheric steaming) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะถูกทำลายภายในเวลา 15 นาที หลังจากให้ความร้อน แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าการนำโปรตีนไปใช้(Protein efficiency)พบว่าถั่วเหลืองที่มีความชื้นร้อยละ 19 จะมีค่าการนำโปรตีนไปใช้สูงกว่าถั่วเหลืองที่มีความชื้นร้อยละ 5 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 5




รูปที่ 5 ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและค่าประสิทธิภาพของการนำโปรตีนไปใช้ในถั่วเหลืองดิบลอกเปลือกที่ผ่านการนึ่งภายใต้บรรยากาศ ที่ระดับความชื้นร้อยละ 5 และร้อยละ 19 (Liener และ Kakade, 1980)

* Curve A และ B แสดงค่าการนำโปรตีนไปใช้ของถั่วเหลืองที่มีความชื้นร้อยละ 5 และร้อยละ 19 เมื่อผ่านการนึ่งภายใต้บรรยากาศ

** Curve C แสดงปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเหลือง เมื่อผ่านการนึ่งภายใต้บรรยากาศ

ความร้อนสามารถทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ เนื่องจากความร้อนไปสลายพันธะไดซัลไฟด์(Disulfide bond) ในโครงสร้างของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (Tsukamoto และคณะ,1983 , Rackis,1966) อย่างไรก็ตามมีผู้พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในพืชบางชนิด เช่นถั่วพู (Winged bean) มีความทนต่อความร้อนได้ดีกว่าพืชชนิดอื่น (Tan และ Wang, 1982)

มีผู้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการบรรจุถั่วกระป๋อง (Navy bean (*Phaseolus vulgaris*)) พบว่าการให้ความร้อนโดยวิธีลวกด้วยน้ำร้อน (Blanching) ซึ่งเป็นความร้อนชื้น (Wet heat) สามารถทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ดีกว่าใช้ความร้อนแห้ง (Dry heat) โดยปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในผลิตภัณฑ์เมื่อผ่านความร้อนชื้นจะมีค่าเท่ากับ 2700 ทริปซินอินฮิบิเตอร์ยูนิตต่อกรัมของแข็งแห้ง ในขณะที่ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในเมล็ดถั่วอบแห้งจะมีค่าเท่ากับ 18650 ทริปซินอินฮิบิเตอร์ยูนิต ต่อกรัมของแข็งแห้ง พบว่าระดับความชื้นร้อยละ 30 สามารถทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในช่วงความชื้นร้อยละ 2 ถึงร้อยละ 55 โดยพบว่าการปรุงอาหารโดยใช้ความดัน (Pressure cooking) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จะทำให้คุณค่าทางอาหารลดลงการให้ความร้อนโดยการนึ่งอัดไอ (Retort process) ที่อุณหภูมิ 115.6องศาเซลเซียสเป็นเวลา 35 นาที หรือ 121.1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีควบคู่กับการใช้ตัวกลางในการบรรจุกระป๋องเป็นน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ1.25 โดยมีแคลเซียมคลอไรด์และอีดีทีเอจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ปราศจากเชื้อ มีเนื้อสัมผัส (Firmness) ที่ดีและยังสามารถทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ดีกว่าการใช้ตัวกลางในการบรรจุกระป๋องเป็นน้ำเกลือธรรมดา ทั้งนี้เนื่องจากแคลเซียมคลอไรด์และอีดีทีเอทำให้ความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงไปจึงมีผลทำให้เนื้อสัมผัสยังคงน่ารับประทาน และลดปริมาณเอนไซม์ทริปซินได้ดี (Wang และ Chang, 1988)

2. การงอก

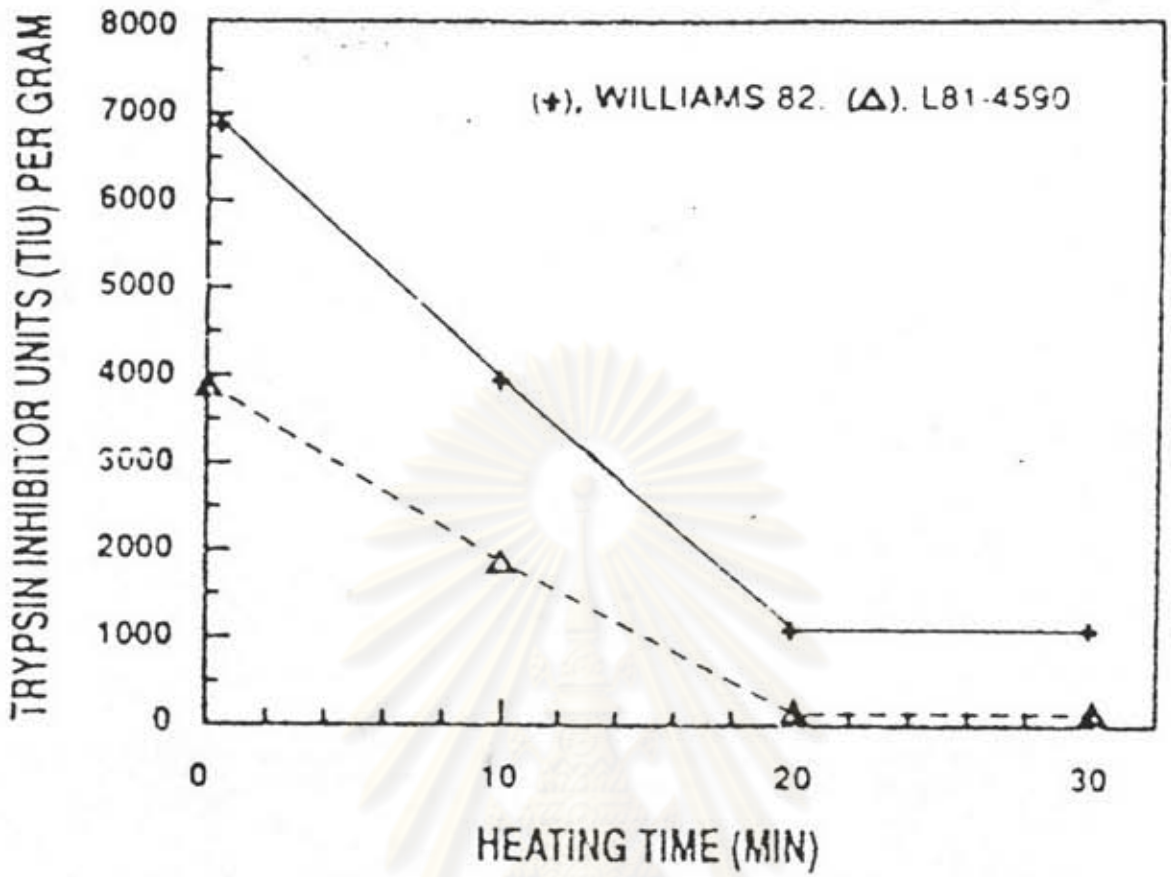
ผลของการงอกต่อปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน จะเกี่ยวข้องกับบทบาทของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินต่อพืช ซึ่งมีผู้ศึกษามากมายแต่ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด เนื่องจากมีผู้ทดลองพบว่าปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะลดลงในขณะที่เมล็ดพืชกำลังงอก (Udupa และ Pattabiraman, 1987) ในขณะที่มีผู้พบว่าปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเหลืองที่กำลังงอกมีแนวโน้มสูงขึ้น (Liu และ Markakis,1989) แต่ Collins และ Sanders (1976) พบว่าปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเหลืองที่กำลังงอกนั้นไม่เปลี่ยนแปลง

3. การสกัดโปรตีน

ชุติมา (2533) ได้ทำการสกัดโปรตีนจากเมล็ดฟักทอง เมล็ดกระถิน และใบกระถิน โดยใช้วิธีการสกัดต่างๆ คือ สกัดด้วยความร้อน สกัดด้วยการปรับพีเอช และสกัดด้วยแคลเซียมซัลเฟต พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในโปรตีนสกัดที่ได้จากทั้ง 3 วิธีมีปริมาณต่ำกว่าในพืชดิบ แต่อย่างไรก็ตามมีการวิจัยชี้ให้เห็นว่า โปรตีนสกัดจากพืชที่ไม่ได้ผ่านความร้อนจะมีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ แต่เมื่อผ่านความร้อนแล้วจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากโปรตีนสกัดมีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินอยู่ด้วย แต่เมื่อนำไปประกอบอาหารโดยใช้ความร้อนจะทำให้ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงทำให้คุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น (ลัดดา และไกรสิทธิ์, 1982)

4. การปรับปรุงสายพันธุ์ของพืช

มีผู้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของถั่วเหลือง เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินต่ำ สายพันธุ์ดังกล่าวเรียกว่า ไอโซไลน์ 81-4590 (L81-4590) ซึ่งมีปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินต่ำกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ที่ใช้ในทางการค้า (Williams 82)นอกจากนี้ยังมีความไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนมากกว่า โดยความร้อนจะสามารถทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้เกือบทั้งหมด (Mendel และคณะ, 1991) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 6




รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเหลืองพันธุ์วิลเลี่ยม 82 และพันธุ์แอล 81-4590 เมื่อผ่านการนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (Mendel และคณะ,1991)

5. การหมัก

Smith และคณะ(1964) พบว่าอาหารที่ได้จากการหมักถั่วเหลือง เช่น เทมป้ (Tempeh) หรือแนตโต้(Natto)จะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น และมีปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลง ซึ่งเนื่องจากกรรมวิธีในการผลิตต้องใช้ความร้อน จึงเป็นผลให้สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินถูกทำลาย นอกจากนี้ตับอ่อนของหนูที่เลี้ยงด้วยเทมเป้จะไม่เกิดการขยายใหญ่ขึ้นแต่อย่างไรก็ตาม มีผู้พบว่าการหมักข้าวโพดที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก 2.5 TIU/กรัม ลงเหลือ 1.8 TIU/กรัม และพบว่าการหมักผสมข้าวโพด และถั่วเหลือง โดยใช้วิธีการเดียวกันจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงจากเดิม(Chompeeda และ fields,1984)