



## รายงานภคยฉบับสมบูรณ์

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารบริสุทธิ์จากน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอม  
Anti-tyrosinase activity of a purified compound in essential oil from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R. M. Sm. leaves

อ.ดร. สมชาติ แม่นปิ่น

โครงการภคยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559  
มหาภคยาภคยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802086

สัญญาเลขที่ 170/2559

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารบริสุทธิ์จากน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอม  
Anti-tyrosinase activity of a purified compound in essential oil from *Etlingera*  
*pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R. M. Sm. leaves

อ.ดร. สมชาติ แม่นปิ่น  
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา

ตุลาคม 2558

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 170/2559

## บทคัดย่อ

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีไอออนโลหะคอปเปอร์ 2 ตัวเป็นโคแฟกเตอร์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโรซินและโดปาที่พบอยู่ในกระบวนการสร้างเมลานิน โดยในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์นั้นเมลานินมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันผิวหนังจากแสงแดด อย่างไรก็ตามการผลิตเมลานินที่มากเกินไปจนอาจก่อให้เกิดโรคความผิดปกติของสีผิวได้ เพราะฉะนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถช่วยลดปริมาณเมลานินที่มากเกินไปได้ โดยในปัจจุบันสารที่ใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นได้มาจากสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่นิยมใช้ผสมในเครื่องสำอาง ได้แก่กรดโคจิกที่เป็นสารในกลุ่มไฮดรอกซีไพราโนนและอาร์บูตินที่เป็นสารในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรควิโนน เป็นต้น ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารตั้งต้น ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารประกอบทางเคมีที่ได้จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ในแถบพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยในการศึกษานี้ได้สกัดสารประกอบทางเคมีจากใบเร่วหอมซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากภาคการเกษตร โดยองค์ประกอบทางเคมีที่พบอยู่มากนั้นจะอยู่ในส่วนสกัดที่เป็นน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอมซึ่งก็คือสารเมทิลซาวิคอล โดยวิธีการศึกษานี้ใช้วิธีการวัดจลนศาสตร์การยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารเมทิลซาวิคอลด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี เปรียบเทียบกับสารยับยั้งที่เป็นกรดโคจิก ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสารเมทิลซาวิคอลนั้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ทั้งในปฏิกิริยาที่ใช้ไทโรซินและโดปาเป็นสารตั้งต้น โดยสารเมทิลซาวิคอลจะใช้กลไกการยับยั้งแบบแข่งขันในสภาวะที่ใช้ไทโรซินเป็นสารตั้งต้น ด้วยค่าคงที่การยับยั้งเท่ากับ 0.28 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ในสภาวะที่ใช้โดปาเป็นสารตั้งต้นนั้นสารเมทิลซาวิคอลจะใช้กลไกการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ด้วยค่าคงที่การยับยั้ง 2 ค่าเท่ากับ 0.79 และ 3.60 มิลลิโมลาร์ โดยรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารเมทิลซาวิคอลนั้นสอดคล้องกับรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของกรดโคจิกภายใต้สภาวะที่ใช้สารตั้งต้นชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตามค่าคงที่การยับยั้งเอนไซม์โดยกรดโคจิกในสภาวะที่ใช้ไทโรซินเป็นสารตั้งต้นนั้นมีค่าน้อยกว่าการยับยั้งด้วยสารเมทิลซาวิคอลประมาณ 39 เท่า และในสภาวะที่ใช้โดปาเป็นสารตั้งต้นพบว่าค่าคงที่การยับยั้งเอนไซม์โดยกรดโคจิกมีค่าน้อยกว่าการยับยั้งด้วยสารเมทิลซาวิคอลประมาณ 21 และ 50 เท่าตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าสารเมทิลซาวิคอลที่ได้จากส่วนสกัดที่เป็นน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอมนั้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้และมีรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไปในทิศทางเดียวกันกับกรดโคจิก ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นจะต่ำกว่ากรดโคจิกก็ตาม โดยผลการศึกษาที่ได้นี้จะเป็นข้อมูลฐานสำคัญสำหรับการพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับสารเมทิลซาวิคอลได้ในอนาคต

**คำสำคัญ:** เอนไซม์ไทโรซิเนส, ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, น้ำมันหอมระเหย, เมทิลซาวิคอล, เร่วหอม

## Abstract

Tyrosinase is a dicopper polyphenol oxidase that catalyzes the oxidation of L-tyrosine and L-DOPA and found as the first reaction in melanogenesis. In human, melanin produced from melanocytes is responsible for skin protection from sunlight. However, the excess production of melanin can cause hyperpigmentation. Therefore, inhibition of tyrosinase activity can reduce the pigmentation disorders. In the present, the use of natural extract to inhibit tyrosinase activity has been recently of interest and widely used in pharmaceutical industry. Kojic acid, a hydroxypyranone derivative, and arbutin, a glycosylated hydroquinone derivative, are the compounds that have been extracted from natural sources and have anti-tyrosinase activity. These two compounds contain aromatic component that is similar to tyrosinase substrates, L-tyrosine and L-DOPA. Hence, in this project, we attempt to investigate the kinetics of tyrosinase inhibition by a naturally isolated compound, methyl chavicol, which was extracted from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R. M. Sm. leaves and mainly found in essential oil extract, using spectrophotometry. The tyrosinase inhibition by methyl chavicol was also compared with the inhibition by kojic acid. The results showed that methyl chavicol which was derived from *E. pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R. M. Sm. leave extract can inhibit tyrosinase activity in the reaction using either L-tyrosine or L-DOPA as a substrate. Using L-tyrosine as a substrate, methyl chavicol inhibits tyrosinase via competitive inhibition with inhibition constant ( $K_i$ ) value of 0.28 mM. While, tyrosinase inhibition by methyl chavicol is non-competitive type when L-DOPA used as a substrate. Two inhibition constants,  $K_{iE}$  and  $K_{iES}$ , for non-competitive inhibition can be determined to be 0.79 and 3.60 mM, respectively. These two types of tyrosinase inhibition by methyl chavicol are similar to the inhibition by kojic acid, albeit the inhibition constant values obtained from both types of inhibition are much higher. Although, the inhibition constant values obtained from methyl chavicol inhibition are much higher than that obtained from kojic acid inhibition, this study indicates that methyl chavicol which was derived from *E. pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R. M. Sm. leave extract is able to inhibit tyrosinase activity. The results obtained in this study are the basis for future development of anti-tyrosinase agents that have structure similar to methyl chavicol.

**Keywords:** Tyrosinase, anti-tyrosinase activity, essential oil, methyl chavicol, *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R. M. Sm.

## สารบัญเรื่อง

|                                 | หน้า |
|---------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                 | 1    |
| บทคัดย่อ                        | 2    |
| Abstract                        | 3    |
| บทนำ                            | 10   |
| วิธีการทดลอง                    | 16   |
| ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง | 22   |
| สรุปผลการทดลอง                  | 36   |
| ข้อเสนอแนะ                      | 36   |
| บรรณานุกรม                      | 37   |
| ประวัติคณะผู้วิจัย              | 40   |

## สารบัญตาราง

|  | หน้า |
|--|------|
| <b>ตารางที่ 1</b> ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารตั้งต้นที่เป็น <i>L</i> -tyrosine และ <i>L</i> -DOPA ในปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ             | 28   |
| <b>ตารางที่ 2</b> ค่าคงที่ของการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้น <i>L</i> -tyrosine และ <i>L</i> -DOPA ที่กำหนด ตามลำดับ | 30   |
| <b>ตารางที่ 3</b> ค่าคงที่การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสาร methyl chavicol เปรียบเทียบกับสาร kojic acid               | 35   |

## สารบัญภาพ

|  | หน้า |
|--|------|
| <b>ภาพที่ 1</b> วิธีการสร้างเมลานิน (melanogenesis) โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญตัวแรกในวิถีซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันและออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็น <i>L</i> -tyrosine และ <i>L</i> -DOPA ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางที่มีสีคือ โดปาโครม (dopachrome) แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นเมลานินในขั้นตอนสุดท้าย (Chang, 2009)   | 12   |
| <b>ภาพที่ 2</b> โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากการวิเคราะห์ทาง X-ray Crystallography แสดงว่าเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยใหญ่ 2 หน่วย ซึ่งแต่ละหน่วยใหญ่มีบริเวณเร่งที่ประกอบด้วยโคแฟกเตอร์ คือ คอปเปอร์ไอออน 2 ไอออนในบริเวณเร่ง และหน่วยเล็ก 2 หน่วย (A) แสดงการจัดเรียงตัวของโมเลกุล tropolone ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (B) (Ismaya et al., 2011)   | 13   |
| <b>ภาพที่ 3</b> การเปลี่ยนสภาวะออกซิเดชันของคอปเปอร์ไอออนที่บริเวณเร่งตามกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Olivares et al., 2009)   | 13   |
| <b>ภาพที่ 4</b> กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้ง monophenolase และ diphenolase activity โดยใช้ออกซิเจน และอาศัยการเปลี่ยนสภาวะเลขออกซิเดชันของไอออนของคอปเปอร์ที่อยู่ในบริเวณเร่ง (Olivares et al., 2009)   | 15   |
| <b>ภาพที่ 5</b> โครงสร้างของสาร methyl chavicol  | 16   |
| <b>ภาพที่ 6</b> เส้นสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด ที่ pH 7.0 ได้แก่ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaOH (A), Tris/HCl (B), Imidazole/HCl (C), MOPS/NaOH (D), Bis-Tris/HCl (E), Triethanolamine/HCl (F), HEPES/NaOH (G) และ mixed buffer (Triethanolamine-Acetic acid-Bis-Tris/NaOH) (H) และจลนศาสตร์ความเร็วของสาร methyl chavicol ที่ความยาวคลื่น 275 nm ที่เวลาใดๆ (I) ที่แสดงความเสถียรของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับเส้นสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (J) และเส้นจลนศาสตร์ที่ความยาวคลื่น 275 nm (K) ที่แสดงความเสถียรของสาร methyl chavicol ที่เวลาใดๆ ในตัวทำละลาย DMSO | 23   |
| <b>ภาพที่ 7</b> เส้นสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate ที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 6.0 (A), 7.0 (B), 8.0 (C), 9.0 (D)   | 25   |



## สารบัญภาพ (ต่อ)

|  | หน้า |
|--|------|
| และ 10.0 (E) และจลนศาสตร์ความเสถียรของสาร methyl chavicol ที่ความยาวคลื่น 275 nm ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 และ 720 นาที (F) และภาพขยายจลนศาสตร์ที่เวลาในช่วง 0-30 นาที (G)  |      |
| <b>ภาพที่ 8</b> การหาความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity (A) และ diphenolase activity (B) สำหรับใช้ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสภาวะที่ใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ   | 26   |
| <b>ภาพที่ 9</b> จลนศาสตร์ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้สารตั้งต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ (A) L-tyrosine (0.02 (รูปเส้นที่มีวงกลมโปร่ง), 0.04 (รูปเส้นที่มีวงกลมทึบ), 0.08 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมโปร่ง), 0.16 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมทึบ), 0.32 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดโปร่ง), 0.64 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดทึบ), 1.28 mM (รูปเส้นที่มีสามเหลี่ยมโปร่ง)) และ (B) L-DOPA (0.2 (รูปเส้นที่มีวงกลมโปร่ง), 0.4 (รูปเส้นที่มีวงกลมทึบ), 0.8 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมโปร่ง), 1.6 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมทึบ), 3.2 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดโปร่ง), 6.4 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดทึบ), 12.8 mM (รูปเส้นที่มีสามเหลี่ยมโปร่ง)) และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับความเข้มข้นต่างๆ ของสารตั้งต้น L-tyrosine (C) และ L-DOPA (D) ทำให้สามารถคำนวณหาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ได้ ดังแสดงค่าในตารางที่ 1 | 28   |
| <b>ภาพที่ 10</b> ร้อยละคงเหลือของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ถูกยับยั้งด้วยสาร methyl chavicol (A และ B) และ kojic acid (C และ D) ที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้น L-tyrosine (1.5 mM) และ L-DOPA (5 mM) สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ที่กำหนด ตามลำดับ   | 30   |
| <b>ภาพที่ 11</b> จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity (A) และ diphenolase activity (B) ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ   | 32   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ของสาร methyl chavicol (0 (รูปเส้นที่มีวงกลมโปร่ง), 0.1 (รูปเส้นที่มีวงกลมทึบ), 0.2 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมโปร่ง), 0.4 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมทึบ), 0.8 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดโปร่ง), 1.6 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดทึบ) mM) ในสถานะที่ใช้ *L*-tyrosine (0.02-1.28 mM) และ *L*-DOPA (0.2-12.8 mM) เป็นสารตั้งต้น และรูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยสาร methyl chavicol ที่เป็นแบบ competitive inhibition (C) และ non-competitive inhibition (D) ตามลำดับ โดยค่า  $K_i$  สำหรับการยับยั้งแบบ competitive inhibition เท่ากับ 279.03  $\mu\text{M}$  (E) และค่า  $K_{iE}$  และ  $K_{iES}$  สำหรับการยับยั้งแบบ non-competitive inhibition เท่ากับ 792.15 (F) และ 3596.43  $\mu\text{M}$  (G) ตามลำดับ

**ภาพที่ 12** จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity (A)

34

และ diphenolase activity (B) ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสาร kojic acid (0 (รูปเส้นที่มีวงกลมโปร่ง), 0.02 (รูปเส้นที่มีวงกลมทึบ), 0.04 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมโปร่ง), 0.08 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมทึบ), 0.16 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดโปร่ง), 0.32 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดทึบ) mM) ในสถานะที่ใช้ *L*-tyrosine (0.02-1.28 mM) และ *L*-DOPA (0.2-12.8 mM) เป็นสารตั้งต้น และรูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสาร kojic acid ที่เป็นแบบ competitive inhibition (C) และ non-competitive inhibition (D) ตามลำดับ โดยค่า  $K_i$  สำหรับการยับยั้งแบบ competitive inhibition เท่ากับ 7.16  $\mu\text{M}$  (E) และค่า  $K_{iE}$  และ  $K_{iES}$  สำหรับการยับยั้งแบบ non-competitive inhibition เท่ากับ 37.20 (F) และ 71.29  $\mu\text{M}$  (G) ตามลำดับ

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| L-DOPA                           | 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine                       |
| DMSO                             | Dimethyl sulfoxide                                  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Dihydrogen phosphate monosodium salt                |
| Tris                             | Tris(hydroxymethyl)aminomethane                     |
| MOPS                             | 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid                |
| Bis-Tris                         | Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane |
| HEPES                            | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid  |

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เอนไซม์ไทโรซิเนส (EC 1.14.18.1) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโพลีฟีนอลออกซิเดส พบทั้งในคน สัตว์ พืช เห็ด และแบคทีเรีย จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidoreductase) (Khan, 2007) ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค X-ray crystallography ทำให้ทราบว่าภายในบริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยโคแฟกเตอร์ คือ คอปเปอร์ไอออน 2 ไอออน เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา (Ismaya et al., 2011) โดยแบ่งการทำงานเป็น 2 กิจกรรมคือ monophenolase activity โดยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอล ได้แก่ กรดอะมิโน *L*-tyrosine และ diphenolase activity โดยการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบไดฟีนอล ได้แก่ *L*-DOPA โดยใช้ออกซิเจน และได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ *o*-dopaquinone แล้วต่อจากนั้นจึงเปลี่ยนไปเป็นโดปาโครม (dopachrome) ซึ่งมีการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร (Song et al., 2006) เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสร้างเมลานิน ซึ่งเมลานินนี้มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันผิวหนังจากแสงแดด แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเมลานินที่มากเกินไปทำให้เกิดโรคความผิดปกติของการสร้างเม็ดสี (hyperpigmentation) อาทิ การเกิดฝ้า กระ จุดด่างดำในมนุษย์ หรือการเกิดสีคล้ำในพืช ผักและผลไม้ ซึ่งมีผลต่ออุตสาหกรรมเหล่านั้นอีกด้วย (Chang, 2009) เพราะฉะนั้นเพื่อเป็นการลดปัญหาดังกล่าว การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเม็ดสีจึงมีความจำเป็น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นให้ความสนใจในการศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเห็ด *Agaricus bisporus* ซึ่งใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา โดยอาศัยความรู้ทางจุลชีววิทยาของเห็ดมาอธิบายประสิทธิภาพของตัวยับยั้ง ซึ่งตัวยับยั้งที่ใช้ในการศึกษานี้จะเป็นสาร methyl chavicol ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากใบของเร่วหอม (*Etlintera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R. M. Sm.) โดยที่เร่วหอมนี้เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ในแถบพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และเป็นพืชที่มีการปลูกเพื่อตัดเหง้าจำหน่าย ในขณะที่ใบของเร่วหอมเป็นของวัสดุทางการเกษตรที่เหลือทิ้งซึ่งมีการรายงานว่ามีน้ำมันหอมระเหยจากใบเร่วหอมมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2556) ดังนั้นในการศึกษานี้จะทำการศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสาร methyl chavicol โดยเปรียบเทียบปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ด้วยกรดโคจิก ซึ่งที่เป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทั้งนี้องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถต่อยอดเพื่อการค้นหาตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร methyl chavicol ที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอม

## ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการศึกษานี้ กลุ่มผู้วิจัยจะทำการสกัดและทำบริสุทธิ์สารจากน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอม และ พิสูจน์โครงสร้างโดยวิธีสเปกโตรสโกปี โดยสารบริสุทธิ์ที่ผ่านการพิสูจน์โครงสร้างแล้วจะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และจลนศาสตร์ของการยับยั้งเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับกรดโคจิก ที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

## ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของคอปเปอร์เป็นโคแฟกเตอร์ที่ช่วยเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันและออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลและไดฟีนอลด้วยการทำงานของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ โดยใช้ออกซิเจน และได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ o-dopaquinone และด้วยความสำคัญทางชีวภาพของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสร้างเมลานินซึ่งพบได้ทั้งในแบคทีเรีย เห็ดรา พืช สัตว์ รวมทั้งในมนุษย์ โดยเฉพาะในมนุษย์นั้นเมลานินนี้มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันผิวหนังจากแสงแดดและช่วยป้องกันอันตรายจากรังสียูวี (Khan, 2007; Song et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเมลานินที่มากเกินไปจนอาจทำให้เกิดโรคความผิดปกติของการสร้างเม็ดสี (hyperpigmentation) และทำให้เกิด ผื่น กระ จุดต่างดำได้ (Chen et al., 2013) ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส นั้นทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาการยับยั้งโดยสารชนิดต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการทางเคมี และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

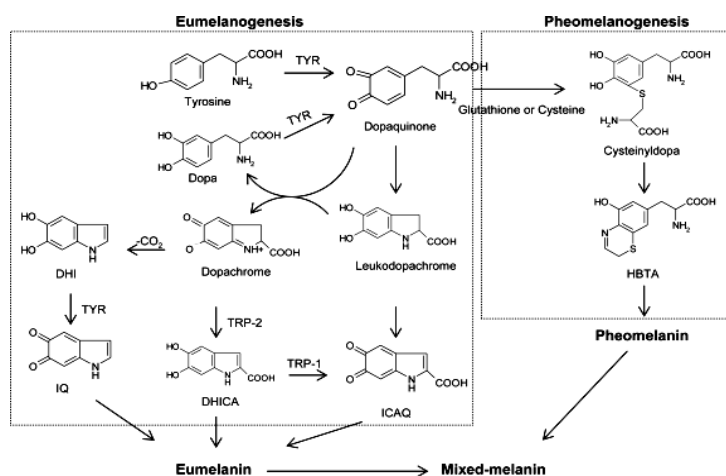
สารที่ใช้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในปัจจุบันนั้นคือ กรดโคจิก (kojic acid) และอาร์บูติน (arbutin) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีไพราโนน และไกลโคซิลไฮโดรควิโนน ตามลำดับ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง สารอนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้ได้มาจากการสกัดจากธรรมชาติ โดยกรดโคจิกนั้นเป็นสารอนุพันธ์ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักข้าวโมลต์โดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* (Yabuta, 1924; Bently, 2006, Yamada et al., 2014) ในขณะที่สารอาร์บูตินนั้นได้จากการสกัดจากพืชตระกูลแบร์เบอร์รี่ (Pop et al., 2009) ผลการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าสารอนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นทั้ง monophenolase activity และ diphenolase activity ได้ เนื่องจากคุณสมบัติของการเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารตั้งต้นทั้งที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลและไดฟีนอล

ด้วยเหตุนี้ในโครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาหาสารประกอบทางเคมีที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยเฉพาะจากส่วนสกัดจากพืชพื้นบ้าน ซึ่งน่าจะมีสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารตั้งต้นและสามารถแสดงผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ นอกจากนี้ยังจะศึกษาสมบัติทางกายภาพและความเสถียรของสารที่สกัดได้ เพื่อประเมินศักยภาพของสารในการพัฒนาเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในอนาคต

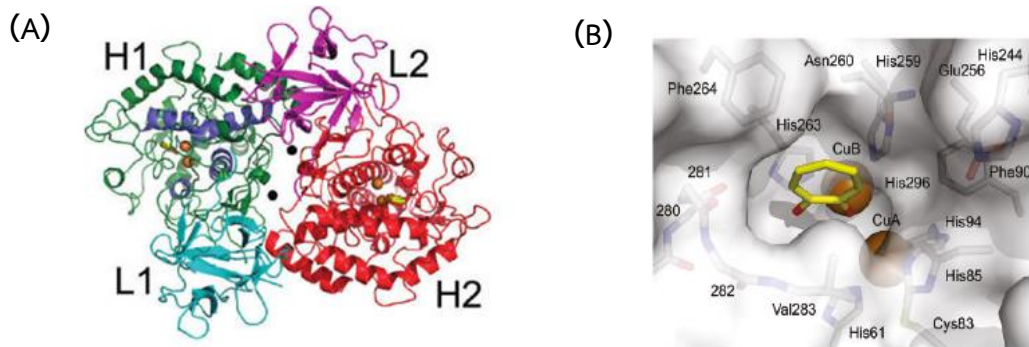
## การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบได้หลากหลายในธรรมชาติทั้งในมนุษย์ สัตว์ พืช เห็ดรา หรือแบคทีเรีย มีบทบาทสำคัญคือ เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสร้างเมลานิน (melanogenesis) ในมนุษย์ เมลาเนียนจะทำหน้าที่สำคัญในการป้องกันอันตรายจากรังสียูวี (Khan, 2007; Chang, 2009; Olivares and Solano, 2009) เอนไซม์ไทโรซิเนสมีกิจกรรมการทำงาน 2 กิจกรรม ได้แก่ monophenolase activity และ diphenolase activity สำหรับ monophenolase activity ของเอนไซม์นั้น จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันและออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีโนล ได้แก่ *L*-tyrosine ส่วน diphenolase activity เอนไซม์จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบไดฟีโนล ได้แก่ *L*-dihydroxyphenylalanine (*L*-DOPA) โดยใช้ออกซิเจน ให้ได้สารผลิตภัณฑ์ *o*-dopaquinone แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีสีคือ โดปาโครม (dopachrome) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร (Chang, 2009; Siegbahn, 2003) และสุดท้ายจะถูกเปลี่ยนเป็นเมลานินดังแสดงในภาพที่ 1

การศึกษาโครงสร้างของรีคอมบิแนนท์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเห็ด *Agaricus bisporus* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไทโรซิเนสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมสูง (Chang, 2009) ด้วยการตกผลึกเอนไซม์ในสภาวะที่มีตัวยับยั้ง tropolone ทำให้พบว่า เอนไซม์มีหน่วยย่อยขนาดใหญ่ 2 หน่วย ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนเท่ากับ 392 ตัว และหน่วยย่อยขนาดเล็ก 2 หน่วยซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนเท่ากับ 150 ตัว และยังพบโคแฟกเตอร์คือ คอปเปอร์ ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ไอออน 2 ไอออนที่บริเวณเร่ง ซึ่งแต่ละไอออนของคอปเปอร์จะถูกจับไว้ด้วยแขนงข้าง (side chain) ของกรดอะมิโนฮิสทีดีนตำแหน่งที่ 61, 85, 94, 259, 263 และ 296 ดังแสดงในภาพที่ 2 (Ismaya et al., 2011)



ภาพที่ 1 วิถีการสร้างเมลานิน (melanogenesis) โดยมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญตัวแรกในวิถีซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันและออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็น *L*-tyrosine และ *L*-DOPA ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางที่มีสีคือ โดปาโครม (dopachrome) แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นเมลานินในขั้นตอนสุดท้าย (Chang, 2009)



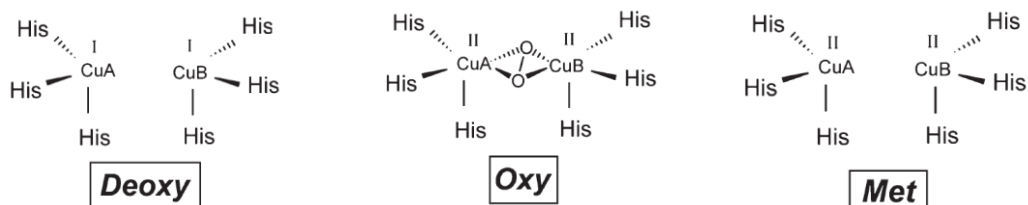
ภาพที่ 2 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากการวิเคราะห์ทาง X-ray Crystallography แสดงว่า เอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยใหญ่ 2 หน่วยซึ่งแต่ละหน่วยใหญ่มีบริเวณเร่งที่ประกอบด้วยโคแฟกเตอร์ คือคอปเปอร์ ไอออน 2 ไอออนในบริเวณเร่ง และหน่วยเล็ก 2 หน่วย (A) แสดงการจัดเรียงตัวของโมเลกุล tropolone ในบริเวณ เร่งของเอนไซม์ (B) (Ismaya et al., 2011)

ไอออนของคอปเปอร์ทั้งสองจะมีการเปลี่ยนสถานะเลขออกซิเดชันตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยา ดังแสดง ในภาพที่ 3 (Ismaya et al., 2011; Chang, 2009; Gonzalvez et al., 2012) ดังนี้คือ

1) Deoxy form ( $E_{\text{deoxy}}$ ) เป็นรูปที่เอนไซม์ไม่ได้จับกับโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้คอปเปอร์ทั้งสองมี สถานะออกซิเดชันเป็น +1 ซึ่งเป็นรูปที่เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

2) Oxy form ( $E_{\text{oxy}}$ ) เป็นรูปที่เอนไซม์จับโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้คอปเปอร์ทั้งสองมีสถานะ ออกซิเดชันเป็น +2 ซึ่งเป็นรูปที่เอนไซม์พร้อมจะรับสารตั้งต้นที่เป็นโมโนฟีนอลหรือไดฟีนอลเพื่อเร่งปฏิกิริยาต่อไป โดยจะพบเอนไซม์อยู่ในรูปนี้ ประมาณร้อยละ 15

3) Met form ( $E_{\text{met}}$ ) เป็นรูปที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็นโมโนฟีนอลหรือไดฟี นอลเรียบร้อยแล้ว จึงทำให้คอปเปอร์ทั้งสองมีสถานะออกซิเดชันเป็น +2 แต่ไม่ได้จับกับโมเลกุลของออกซิเจน โดย จะพบเอนไซม์ในรูปนี้ประมาณร้อยละ 85



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนสถานะออกซิเดชันของคอปเปอร์ไอออนที่บริเวณเร่งตามกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโร ซิเนส (Olivares et al., 2009)

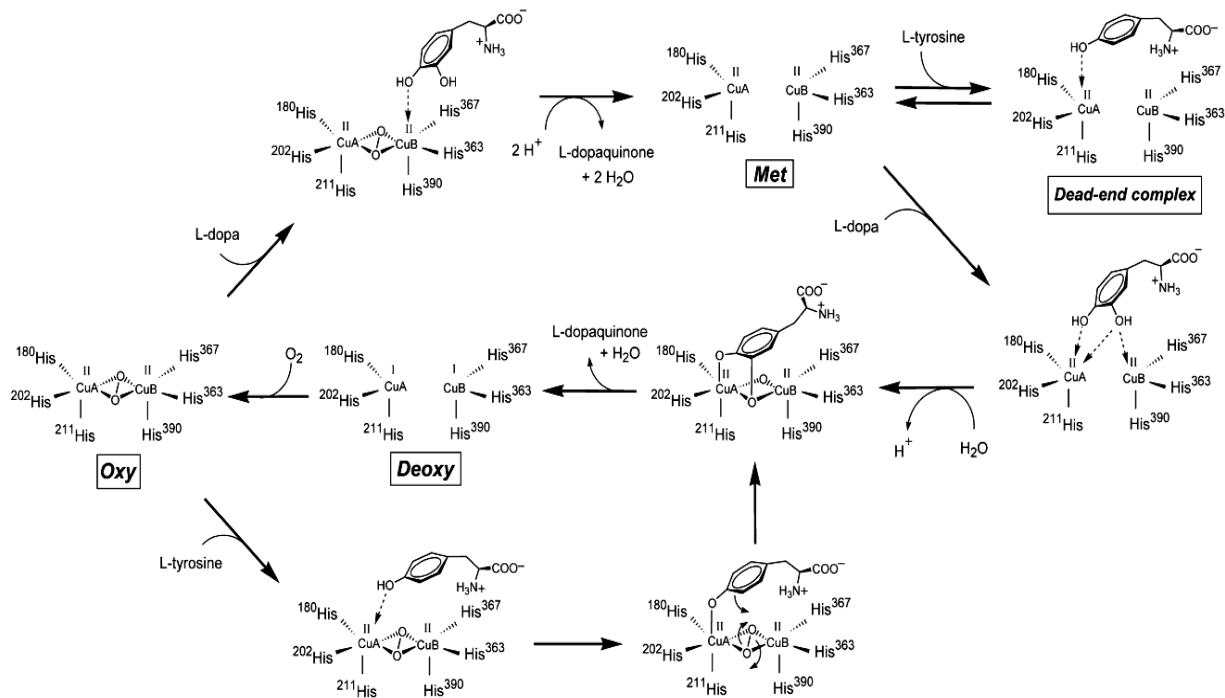
การเปลี่ยนแปลงรูปของเอนไซม์จะเปลี่ยนไปในระหว่างการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะพบว่าสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบไดฟีนอลสามารถถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ทั้งในรูปที่เป็น Oxy form และ Met form แต่สารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลจะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ที่อยู่ในรูป Oxy form เท่านั้น ทั้งนี้เมื่อสารตั้งต้นทั้งสองถูกเร่งปฏิกิริยาแล้วจะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์คือ *o*-dopaquinone แล้วเอนไซม์จะกลับสู่รูปที่เป็น Deoxy form และเข้าสู่การเร่งปฏิกิริยารอบใหม่อีกครั้ง หากสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลเข้าจับกับเอนไซม์ที่อยู่ในรูป Met form จะทำให้เกิด dead-end complex ซึ่งทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และจะทำให้เกิดช่วง lag phase ขึ้นระยะหนึ่งก่อนที่จะเริ่มเข้าสู่สภาวะการเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลและไดฟีนอล และปริมาณของเอนไซม์ (Chang, 2009; Olivares et al., 2009) ดังภาพที่ 4 ซึ่งด้วยรูปแบบของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีอยู่หลากหลายทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาโดยใช้สารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบทั้งโมโนฟีนอลและไดฟีนอลที่หลากหลายเช่นกัน และด้วยกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ของคอปเปอร์เป็นตัวช่วยในการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันและออกซิเดชันของสารตั้งต้นทั้งสองชนิด ทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับสารกลุ่มที่มีโครงสร้างคล้ายกับสารตั้งต้น ซึ่งอาจจะสามารถเข้าจับกับเอนไซม์และก่อให้เกิดการยับยั้งได้ดังแสดงในโครงสร้างภาพที่ 2

ถึงแม้ว่าปัจจุบันนี้จะมีสารจำนวนมากที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งรวมถึงกรดโคจิกและสารอาร์บูตินที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าหาสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสยังคงดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมทั้งพืชผักสมุนไพร โดยก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการวิจัยการใช้ส่วนสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชผักสวนครัว อาทิ ใบกะเพรา, ใบโหระพา, ขมิ้น, ข่าน้อย, พลู่, ตะไคร้, ตะไคร้หอม, โพล, หล้าแฝก, ลาเวนเดอร์, ใบมะกรูด, เปลือกมะกรูด และพริกไทยดำ มายับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจากการทดสอบทำให้ทราบว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นถูกยับยั้ง 85-100% นั้นแสดงให้เห็นศักยภาพของสารในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Manosroi et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชผักสวนครัว ได้แก่ ตะไคร้ และโหระพา สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งพบว่าตะไคร้นั้นสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงสุดตามด้วยโหระพา โดยมีค่าการยับยั้งเอนไซม์เป็น  $69 \pm 4$  และ  $66 \pm 3\%$  ตามลำดับ (Saeio et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา citral และ myrcene ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุลส้ม จากการศึกษาค้นพบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีค่าคงที่การยับยั้งเท่ากับ 0.318 และ 2.38 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ของ citral เป็นแบบ noncompetitive และ myrcene เป็นแบบ competitive ตามลำดับ (Matsuura et al., 2006)

ดังนั้นในการศึกษานี้ทางคณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยพืชสมุนไพรที่นำมาศึกษา ได้แก่ เรว์หอม หรือมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ใน



วงศ์ Zingiberaceae และพบมากในพื้นที่จังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550a) โดยทุกส่วนของพืชชนิดนี้ก็มีกลิ่นหอมแรง ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำเหง้าของเร่วหอมมาใช้เป็นเครื่องเทศผสมในแกง และ ก๋วยเตี๋ยว (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550b) นอกจากนี้ในพื้นที่ภาคตะวันออกของไทย มีการปลูกเร่วหอมในเชิงพาณิชย์ เพื่อขุดเหง้าจำหน่าย มีการส่งออกเหง้าเร่วหอมไปจำหน่ายในต่างประเทศ เช่น ประเทศจีน เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น เป็นจำนวนถึงปีละ 200 ตัน มีมูลค่าถึง 30 ล้านบาท เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และ อุตสาหกรรมอาหาร (วารสารเคหเกษตร, มปป.; รายการเกษตรกรรมนำรู้, 2553) ดังนั้นในแต่ละปีจะมีวัสดุทางการเกษตรที่เหลือทิ้งจากการส่งออกเหง้าเร่วหอมในปริมาณมาก ซึ่งก็คือ ส่วนใบของต้นเร่วหอม โดยผลการศึกษา ก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าและใบเร่วหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2556) และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบอีกด้วย (Palachot et al., 2017) รวมทั้งจะศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและความเสถียรของสารสกัด โดยผลการศึกษาที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการนำไปใช้เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และ เครื่องสำอางในอนาคตได้



ภาพที่ 4 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้ง monophenolase และ diphenolase activity โดยใช้ ออกซิเจน และอาศัยการเปลี่ยนสถานะเลขออกซิเดชันของไอออนของคอปเปอร์ที่อยู่ในบริเวณเร่ง (Olivares et al., 2009)

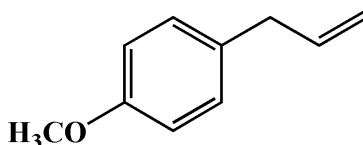
## วิธีการทดลอง

### 1. สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด *Agaricus bisporus* L-tyrosine tyramine 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) dopamine และ kojic acid ได้ซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วน dimethyl sulfoxide หรือ DMSO และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ซื้อมาจากบริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน และเป็นสารเคมีเกรดสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

สำหรับสาร methyl chavicol นั้นได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จากส่วนสกัดจากใบเร่วหอมในรูปของน้ำมันหอมระเหยโดย รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี และถูกพิสูจน์โครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีทางสเปกโตรสโกปีทั้งแบบ nuclear magnetic resonance และ mass spectrometry โดยสาร methyl chavicol มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 5 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 148.20 g/mol (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2556)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิด Shimadzu UV PC2501 double-beam UV/Vis spectrophotometer รุ่น ของบริษัท Shimadzu Scientific Instruments Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา และ VersaMax ELISA Microplate Reader ของบริษัท Molecular Devices ประเทศสหรัฐอเมริกา ถูกใช้สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงและวัดจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส



ภาพที่ 5 โครงสร้างของสาร methyl chavicol

### 2. การเตรียมสารละลายและหาความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลอง

สำหรับการเตรียมสารละลาย L-tyrosine tyramine dopamine และ L-DOPA ทำโดยการละลายสารเหล่านี้ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 และหาความเข้มข้นของสารละลายเหล่านี้โดยอาศัยคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิด ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการของ Beer-Lambert ดังแสดงในสมการที่ 1 โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง  $\epsilon$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสง (molar extinction coefficient) ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) c คือ ความเข้มข้น (M) และ l คือ ระยะทางที่แสงผ่านสารละลาย (1 cm) โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 274 280 และ 280 nm ตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นของสารเหล่านี้เท่ากับ 1.34 1.474 2.67 และ 2.63  $mM^{-1}cm^{-1}$  ตามลำดับ

(Dawson et al., 1986) ส่วนสารผลิตภัณฑ์ที่เป็นโดปาโครม (dopachrome) นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 475 nm และมีค่า  $\epsilon$  ที่ความยาวคลื่นนี้เท่ากับ  $3.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Qiu et al., 2009)

สำหรับการเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นจะทำได้โดยการละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ในรูปผงในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 และหาความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์โดยใช้ค่า  $\epsilon$  ที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $301.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  โดยค่า  $\epsilon$  ของเอนไซม์ไทโรซิเนสนี้ได้จากการใช้ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ (PDB code 2y9w) (Ismaya et al., 2011) มาคำนวณโดยใช้โปรแกรมการคำนวณทางชีวสารสนเทศ ProtParam tool ใน ExPasy Bioinformatics Resource Portal (<https://web.expasy.org/protparam/>)

$$A = \epsilon cl$$

สมการที่ 1

สำหรับการเตรียมสารละลายและการหาความเข้มข้นของสาร methyl chavicol นั้นจะแตกต่างจากสารดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากสาร methyl chavicol เป็นสารสกัดบริสุทธิ์ที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอม ไม่สามารถละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ได้ ดังนั้นการเตรียมสารละลาย methyl chavicol จึงทำได้โดยการชั่งน้ำหนักที่ต้องการแล้วละลายในตัวทำละลายที่เป็น DMSO และคำนวณความเข้มข้นของสารโดยใช้น้ำหนักโมเลกุล

### 3. การทดสอบความเสถียรของสาร methyl chavicol

#### 3.1 การทดสอบความเสถียรของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ pH 7.0 และในตัวทำละลาย DMSO

ผสมสารละลาย methyl chavicol ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีความเข้มข้น 50 mM และ pH 7.0 ได้แก่  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , Tris/HCl, Imidazole/HCl, MOPS-NaOH, Bis-Tris-HCl, Triethanolamine/HCl, HEPES/NaOH และ Triethanolamine-Acetic acid-Bis-Tris/NaOH และในตัวทำละลาย DMSO ในปริมาตรรวม 1000  $\mu\text{L}$  โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร methyl chavicol เท่ากับ 100  $\mu\text{M}$  แล้วนำไปตรวจวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย methyl chavicol ตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่น 220-700 นาโนเมตร ที่เวลาที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 และ 720 นาที ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง จากนั้นวิเคราะห์เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการทดลอง

#### 3.2 การทดสอบความเสถียรของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate ที่ pH ต่างๆ กัน

ผสมสารละลาย methyl chavicol ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate ที่ pH ต่างๆ กัน ได้แก่ 6, 7, 8, 9 และ 10 ในปริมาตรรวม 1000  $\mu\text{L}$  โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร methyl chavicol

เท่ากับ 100  $\mu\text{M}$  แล้วนำไปตรวจวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย methyl chavicol ตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่น 220-700 นาโนเมตร ที่เวลาที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 และ 720 นาที ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง จากนั้นวิเคราะห์เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการทดลอง

#### 4. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส

เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนสมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทั้ง monophenolase activity และ diphenolase activity ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เหมาะสมสำหรับการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นในปฏิกิริยาที่ใช้สารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลที่เป็น L-tyrosine และไดฟีนอลที่เป็น L-DOPA

โดยในการศึกษานี้จะผสมสารตั้งต้น L-tyrosine (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.7 mM) หรือ L-DOPA (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 mM) ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 50, 100, 200, 300, 400, 600 และ 800 นาโนโมลาร์ สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้สารตั้งต้น L-tyrosine และ 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 นาโนโมลาร์ สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้สารตั้งต้น L-DOPA ในปริมาตรรวม 200  $\mu\text{L}$  จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 475 nm เป็นเวลา 600 วินาที และ 300 วินาที สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้สารตั้งต้น L-tyrosine และ L-DOPA ตามลำดับ ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิด microplate reader จากนั้นนำเส้นจลนศาสตร์ที่ได้มาหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้น ( $v_0$ ) ด้วยโปรแกรม A ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Chun-Jen Chiu, Rong Chang, Jole Dinerno, และ David P. Ballou, the University of Michigan, Ann Arbor, ประเทศสหรัฐอเมริกา แล้วนำค่า  $v_0$  ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $v_0$  กับความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์โดยใช้โปรแกรม KaleidaGraph version 4.0 พร้อมทั้งกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น L-tyrosine และ L-DOPA ในการทดลองต่อไป

#### 5. การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารประกอบโมโนฟีนอลและไดฟีนอลเป็นสารตั้งต้น

จากผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองในข้อ 4 ทำให้สามารถกำหนดช่วงความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เหมาะสมสำหรับการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้ง monophenolase activity และ diphenolase activity ที่ความเข้มข้นช่วง 100-600 nM และ 25-50 nM ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารประกอบโมโนฟีนอลที่เป็น L-tyrosine และ tyramine เป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และใช้สารประกอบไดฟีนอลที่เป็น L-DOPA และ dopamine เป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาของ diphenolase activity นั้นทำได้โดยการผสมสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอล หรือไดฟีนอล (L-tyrosine หรือ tyramine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.02,

0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 และ 1.28 mM และ L-DOPA หรือ dopamine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 และ 12.8 mM) กับเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 194 และ 24 nM สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 ปริมาตรรวม 1000  $\mu\text{L}$  แล้วติดตามจลนศาสตร์ของการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เป็นเวลา 600 และ 300 วินาที สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง จากนั้นนำเส้นจลนศาสตร์ที่ได้มาวิเคราะห์หาค่า  $v_0$  แล้วนำค่า  $v_0$  ที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ dopachrome ที่เกิดขึ้นต่อหน่วยเวลา เพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $v_0$  ที่ได้จากการคำนวณ กับ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารตั้งต้นที่ใช้ในปฏิกิริยา จากนั้นคำนวณหาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสในปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ด้วยสมการที่ 2 โดยที่  $v_0$  (initial velocity) คือค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา  $V_{max}$  (maximum velocity) คือค่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาที่มีค่าคงที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากเกินไป  $K_m$  (Michaelis constant) คือ ค่าคงที่ของไมเคิลิส ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ทำให้ปฏิกิริยามีอัตราเร็วเริ่มต้นเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด และ  $[S]$  คือความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ในปฏิกิริยา โดยอาศัยการคำนวณด้วย Marquardt-Lavenberg algorithms ในโปรแกรม KaleidaGraph version 4.0 จากนั้นเปรียบเทียบค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{สมการที่ 2}$$

## 6. การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสาร methyl chavicol เพื่อหาค่าคงที่ของการยับยั้งเอนไซม์ที่สถานะความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่กำหนด (apparent inhibition constant)

ผสมสารตั้งต้นแต่ละชนิด (*L*-tyrosine (1.5 mM) และ *L*-DOPA (5 mM)) กับเอนไซม์ไทโรซิเนส (200 และ 25 nM สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ที่ใช้ *L*-tyrosine และ *L*-DOPA เป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ) ในสถานะที่ไม่มี และมีความเข้มข้นต่างๆ กันของสาร methyl chavicol โดยในปฏิกิริยาของ monophenolase activity จะใช้สาร methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 และ 6.4 mM ส่วนในปฏิกิริยา diphenolase activity จะใช้ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6 และ 51.2 mM โดยกำหนดให้ร้อยละของตัวทำละลาย DMSO ในทั้ง 2 สถานะมีอยู่ไม่เกิน 1% (v/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 ปริมาตรรวม 1000  $\mu\text{L}$  จากนั้นติดตามจลนศาสตร์ของการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เป็นเวลา 600 และ 300 วินาที สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ แล้วคำนวณหาค่า  $v_0$  ดังได้อธิบายในการ

ทดลองข้อ 5 แล้วนำค่า  $v_o$  ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสาร methyl chavicol เพื่อคำนวณหาค่าคงที่การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ที่สถานะความเข้มข้นของสารตั้งต้นแต่ละชนิดที่กำหนดขึ้น (apparent  $K_i$ ) ด้วยสมการที่ 3 (Stein, 2011) โดยที่  $v_o$  คือ ค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา  $v_{background}$  (background velocity) คือ อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของตัวยับยั้ง  $V_{max}$  คือ อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาที่มีค่าคงที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากเกินไป  $^{app}K_i$  (apparent inhibition constant) คือ ค่าคงที่การยับยั้ง ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่ทำให้ปฏิกิริยามีอัตราเร็วเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด  $n$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของ Hill (Hill coefficient) ซึ่งกำหนดให้มีค่าเท่ากับ 1 โดยอยู่บนสมมติฐานที่ว่า การเข้าจับของตัวยับยั้งกับเอนไซม์เป็นแบบอย่างง่าย (simple binding) และ  $[I]$  คือความเข้มข้นของตัวยับยั้ง โดยอาศัยการคำนวณด้วย Marquardt-Lavenberg algorithms ในโปรแกรม KaleidaGraph version 4.0

ทำการศึกษากิจกรรมเดียวกันโดยใช้ kojic acid เป็นตัวยับยั้งแทนสาร methyl chavicol ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 และ 0.64 mM สำหรับการศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity ส่วนการศึกษากิจกรรมการยับยั้งปฏิกิริยาของ diphenolase activity จะใช้ความเข้มข้นต่างๆ กันของ kojic acid ได้แก่ 0.016, 0.032, 0.064, 0.128, 0.256, 0.512 และ 1.024 mM จากนั้นเปรียบเทียบค่า apparent  $K_i$  สำหรับการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสาร methyl chavicol และ kojic acid ทั้งในปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity

$$v_o = \left( \frac{V_{max} - v_{background}}{1 + \left( \frac{[I]}{^{app}K_i} \right)^n} \right) + v_{background} \quad \text{สมการที่ 3}$$

## 7. รูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร methyl chavicol เปรียบเทียบกับ kojic acid

จากผลการทดลองที่ได้ในการทดลองข้อ 6 ทำให้ทราบว่าปฏิกิริยาทั้งของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสสามารถถูกยับยั้งด้วยสาร methyl chavicol ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร methyl chavicol และเปรียบเทียบกับกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสาร kojic acid โดยในการทดลองนั้นจะผสมสารตั้งต้นแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ (สำหรับ L-tyrosine ใช้ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 และ 1.28 mM และ สำหรับ L-DOPA ใช้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 และ 12.8 mM) กับเอนไซม์ไทโรซิเนส (200 และ 25 nM สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ) ในสถานะที่มีความเข้มข้นต่างๆ ของสาร methyl chavicol (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 mM) หรือ kojic acid (0.02, 0.04, 0.08,

0.16 และ 0.32 mM) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 ปริมาตรรวม 1000  $\mu$ L จากนั้นติดตามจลนศาสตร์ของการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร เป็นเวลา 600 และ 300 วินาที สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ จากนั้นคำนวณหา  $v_0$  แล้วนำ  $v_0$  ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ส่วนกลับแบบเส้นตรง Lineweaver-Burk ระหว่าง  $v_0$  กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารตั้งต้นแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นใดๆ ของสาร methyl chavicol หรือ kojic acid จากนั้นวิเคราะห์กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส พร้อมทั้งหาค่าคงที่การยับยั้ง monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยอาศัยสมการที่ใช้อธิบายกลไกการยับยั้งที่แตกต่างกัน ได้แก่ การยับยั้งแบบ competitive inhibition แบบ non-competitive inhibition และแบบ uncompetitive inhibition ดังสมการที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ (Engel, 1981; Cook & Cleland, 2007)

$$\frac{1}{v_0} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{สมการที่ 4}$$

$$\frac{1}{v_0} = \left(1 + \frac{[I]}{K_{iE}}\right) \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{iES}}\right)}{V_{max}} \quad \text{สมการที่ 5}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_{iES}}\right)}{V_{max}} \quad \text{สมการที่ 6}$$

## ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

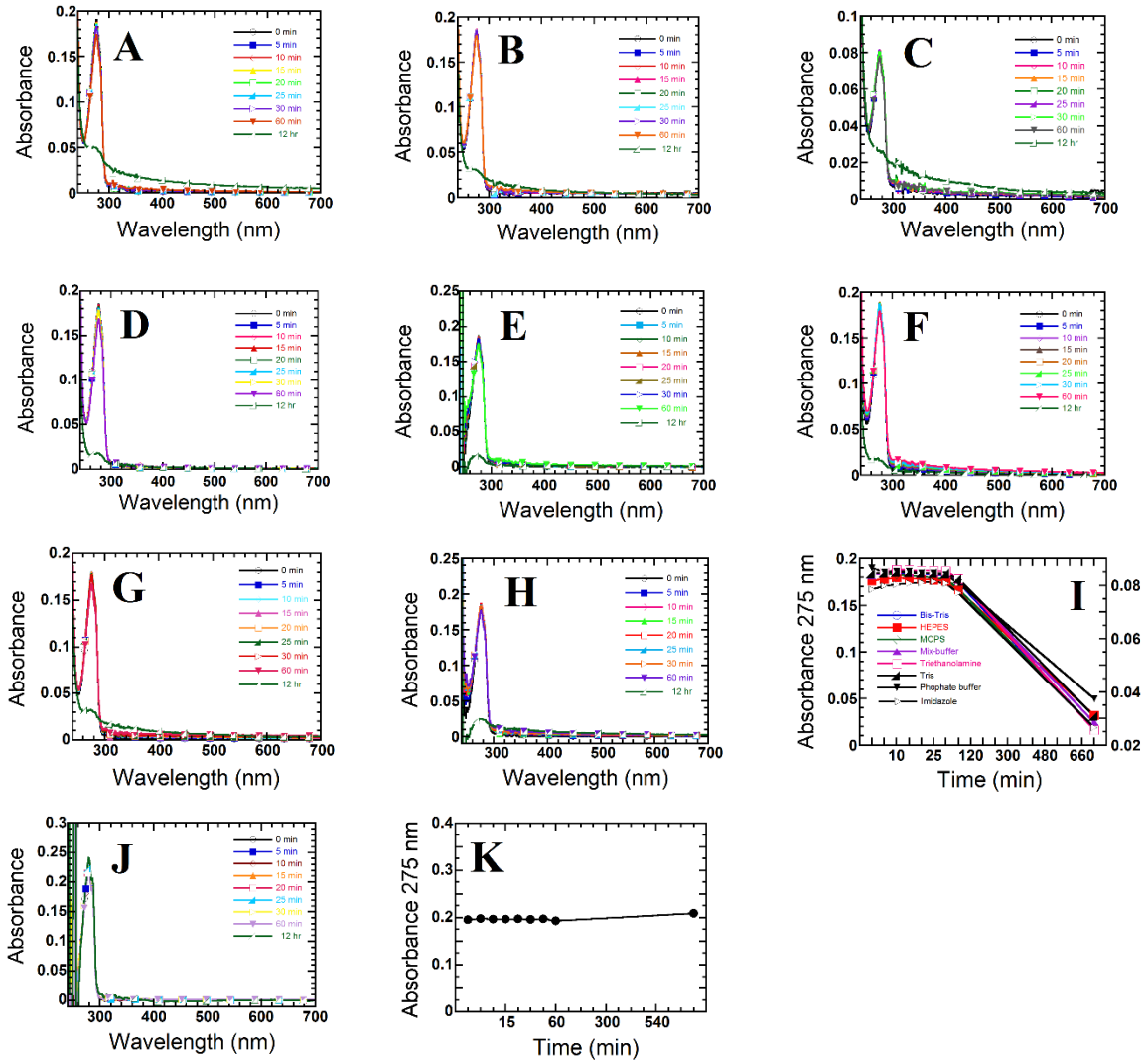
### 1. ความเสถียรของสาร methyl chavicol

#### 1.1 ความเสถียรของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ pH 7.0 และในตัวทำละลาย DMSO

ผลการศึกษาเส้นสเปกตรัมของสาร methyl chavicol ความเข้มข้น  $100 \mu\text{M}$  ที่ผสมในสารละลายบัฟเฟอร์ (50 mM) ชนิดต่างๆ ที่ pH 7.0 ซึ่งได้แก่  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  (ภาพที่ 6A), Tris/HCl (ภาพที่ 6B), Imidazole/HCl (ภาพที่ 6C), MOPS/NaOH (ภาพที่ 6D), Bis-Tris/HCl (ภาพที่ 6E), Triethanolamine/HCl (ภาพที่ 6F), HEPES/NaOH (ภาพที่ 6G) และ mixed buffer (Triethanolamine-Acetic acid-Bis-Tris/NaOH) (ภาพที่ 6H) ที่ช่วงความยาวคลื่น 220-700 นาโนเมตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือ 720 นาที โดยการติดตามเป็นช่วงเวลาดังนี้คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 และ 720 นาที ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และจลนศาสตร์ ความเสถียรของสาร methyl chavicol ที่ความยาวคลื่น 275 nm ที่เวลาดังกล่าว (ภาพที่ 6I) ทำให้พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสาร methyl chavicol ที่ความยาวคลื่น 275 nm ในสารละลายบัฟเฟอร์ทุกชนิดที่ pH 7.0 นั้นจะไม่มีเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลา 30 นาที แต่หลังจากนั้นจะค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนั้นจะลดลงอย่างมากเมื่อปล่อยให้สาร methyl chavicol อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ทุกชนิดที่ pH 7.0 นาน 720 นาที นั้นแสดงให้เห็นว่า สาร methyl chavicol มีความเสถียรในสารละลายบัฟเฟอร์ทุกชนิดที่ pH 7.0 ได้ไม่เกิน 30 นาที (ภาพที่ 6I) ซึ่งผลการศึกษาได้ชี้แนะว่า ควรศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 7.0 ภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่สาร methyl chavicol นั้นยังคงความเสถียรอยู่ได้

ในขณะที่ผลการศึกษาเส้นสเปกตรัม (ภาพที่ 6J) และจลนศาสตร์ (ภาพที่ 6K) ความเสถียรของสาร methyl chavicol ความเข้มข้น  $100 \mu\text{M}$  ในตัวทำละลาย DMSO ที่ความยาวคลื่น 275 nm นั้นให้ผลที่แตกต่างออกไป โดยพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 nm ของสาร methyl chavicol ที่ผสมอยู่ในตัวทำละลาย DMSO นั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป นั้นแสดงให้เห็นว่า DMSO เป็นตัวทำละลายที่ดีของสาร methyl chavicol และสามารถทำให้สาร methyl chavicol เสถียรอยู่ได้ ทั้งนี้เป็นเพราะตัวทำละลาย DMSO นั้นเป็น polar aprotic solvent ที่มีความสามารถในการเป็นตัวทำละลายสารที่มีคุณสมบัติทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ จึงทำให้สาร methyl chavicol ซึ่งถูกสกัดและทำบริสุทธิ์อยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหยสามารถที่จะละลายได้ดีในตัวทำละลาย DMSO แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร methyl chavicol นั้นจะควบคุมความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลาย DMSO ที่ใช้ไม่เกิน 1% (v/v) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่ทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสเสียสภาพระหว่างการทดสอบปฏิกิริยา (ไม่แสดงข้อมูล)

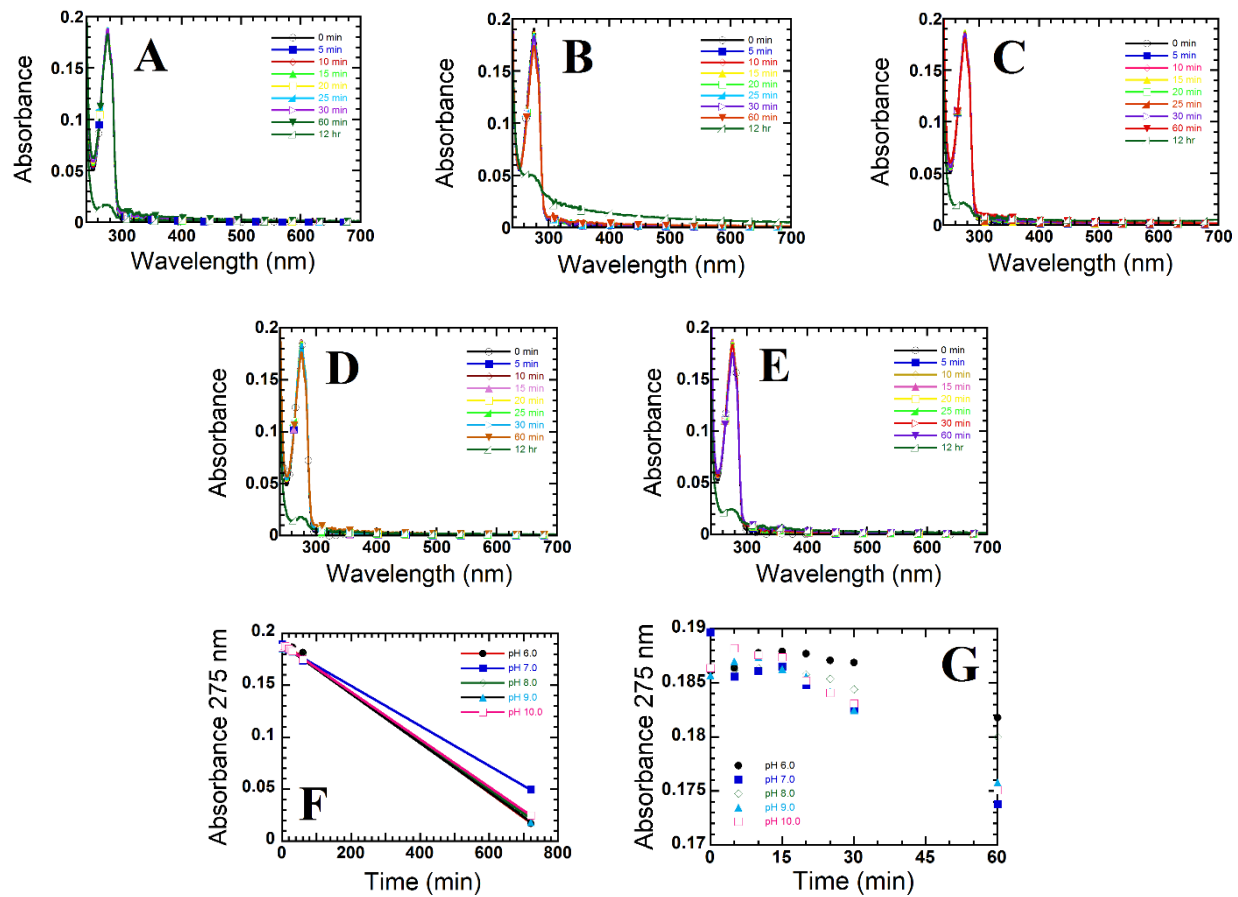




ภาพที่ 6 เส้นสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด ที่ pH 7.0 ได้แก่ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH (A), Tris/HCl (B), Imidazole/HCl (C), MOPS/NaOH (D), Bis-Tris/HCl (E), Triethanolamine/HCl (F), HEPES/NaOH (G) และ mixed buffer (Triethanolamine-Acetic acid-Bis-Tris/NaOH) (H) และจลนศาสตร์ความเสถียรของสาร methyl chavicol ที่ความยาวคลื่น 275 nm ที่เวลาใดๆ (I) ที่แสดงความเสถียรของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับเส้นสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (J) และเส้นจลนศาสตร์ที่ความยาวคลื่น 275 nm (K) ที่แสดงความเสถียรของสาร methyl chavicol ที่เวลาใดๆ ในตัวทำละลาย DMSO

## 1.2 ความเสถียรของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate ที่ pH ต่างๆ กัน

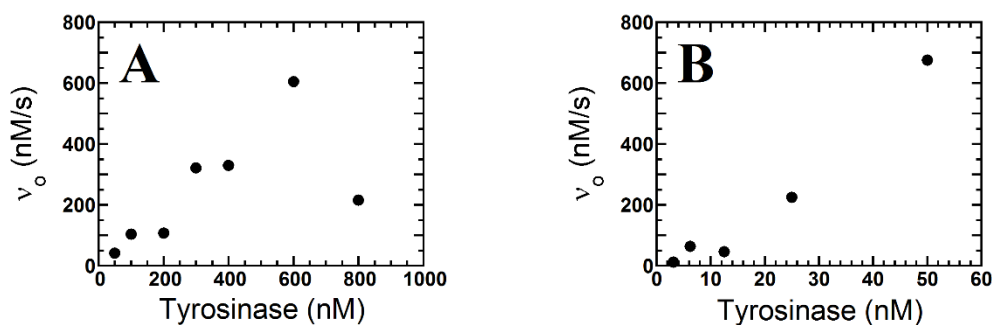
ผลการศึกษาความเสถียรของสาร methyl chavicol ความเข้มข้น 100  $\mu\text{M}$  ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate ที่ pH ต่างๆ กันได้แก่ 6.0 (ภาพที่ 7A), 7.0 (ภาพที่ 7B), 8.0 (ภาพที่ 7C), 9.0 (ภาพที่ 7E) และ 10.0 (ภาพที่ 7F) โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเส้นสเปกตรัมของสาร methyl chavicol ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาใดๆ (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 และ 720 นาที) ทำให้พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 nm ของสาร methyl chavicol ที่ผสมอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate ของทุก pH นั้นลดลงไปอย่างมากเมื่อเวลาผ่านไป 720 นาที หรือ 7 ชั่วโมง นั้นแสดงให้เห็นว่า สาร methyl chavicol ไม่มีความเสถียรในทุก pH ที่ทดสอบ (ภาพที่ 7F) แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลา 30 นาทีแรกนั้น สาร methyl chavicol ยังคงความเสถียรอยู่ โดยสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในช่วงเวลาดังกล่าว (ภาพที่ 7G) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 nm ของสาร methyl chavicol ที่ผสมอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate ที่ pH 7.0 ที่เวลา 7 ชั่วโมงนั้น (ภาพที่ 7B) มีค่าสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงของสาร methyl chavicol ที่ผสมอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate ที่ pH อื่นๆ นั้นชี้ให้เห็นว่าสาร methyl chavicol นั้นมีความคงตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate ที่ pH 7.0 มากกว่า pH อื่นๆ ที่เวลา 7 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 เส้นสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสาร methyl chavicol ในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate ที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 6.0 (A), 7.0 (B), 8.0 (C), 9.0 (D) และ 10.0 (E) และจลนศาสตร์ความเสถียรของสาร methyl chavicol ที่ความยาวคลื่น 275 nm ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 และ 720 นาที (F) และภาพขยายจลนศาสตร์ที่เวลาในช่วง 0-30 นาที (G)

## 2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผลการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เหมาะสมสำหรับทั้ง monophenolase activity และ diphenolase activity สำหรับใช้ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสภาวะที่ใช้ *L*-tyrosine และ *L*-DOPA เป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ ทำให้พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มขึ้น อัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของทั้ง monophenolase activity (ภาพที่ 8A) และ diphenolase activity (ภาพที่ 8B) ก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ยกเว้นในปฏิกิริยาของ monophenolase activity ที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสไปจนถึง 800 nM แล้ว อัตราเร็วเริ่มต้นที่วัดได้จากปฏิกิริยามีค่าลดลง นั่นอาจเป็นเพราะว่า ปฏิกิริยาได้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้ไม่สามารถ วัดอัตราเร็วเริ่มต้นที่แท้จริงได้ ทำให้อัตราเร็วที่วัดได้ต่ำกว่าความเป็นจริง และจากข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองนี้ทำให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นจะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 100-600 nM และ 25-50 nM สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ โดยจากช่วงความเข้มข้นดังกล่าวจึงทำให้สามารถกำหนดช่วงความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เหมาะสมสำหรับการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้ง monophenolase activity และ diphenolase activity ที่ความเข้มข้น 200 nM และ 25 nM ตามลำดับ เพื่อการศึกษาจลนศาสตร์ตลอดทั้งการศึกษาทดลอง

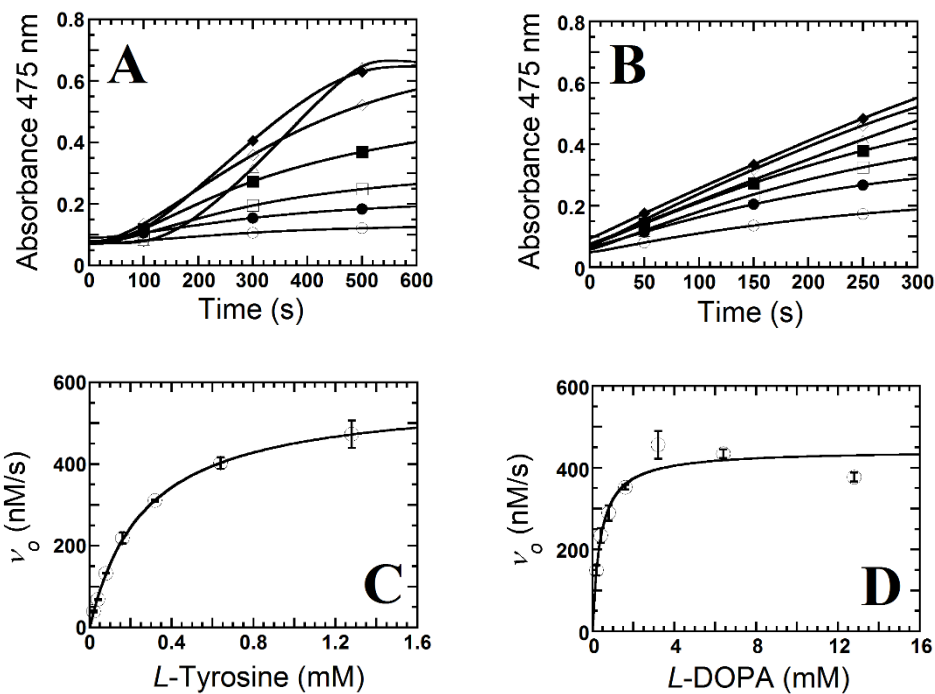


ภาพที่ 8 การหาความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity (A) และ diphenolase activity (B) สำหรับใช้ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสภาวะที่ใช้ *L*-tyrosine และ *L*-DOPA เป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ

### 3. จลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารประกอบโมโนฟีนอลและไดฟีนอลเป็นสารตั้งต้น

เมื่อนำเส้นจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ที่ใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันของ *L*-tyrosine (0.02-1.28 mM) (ภาพที่ 9A) และ *L*-DOPA (0.2-12.8 mM) (ภาพที่ 9B) สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ ที่ได้จากแต่ละปฏิกิริยามาวิเคราะห์พร้อมทั้งคำนวณอัตราเร็วเริ่มต้น และนำมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้ง *L*-tyrosine (ภาพที่ 9C) และ *L*-DOPA (ภาพที่ 8D) ทำให้สามารถคำนวณหาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ตามลำดับ และได้ผลการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งทำให้พบว่าค่าคงที่อัตราของการเร่งปฏิกิริยา ( $k_{cat}$  หรือ turnover number) ของเอนไซม์ไทโรซิเนสในปฏิกิริยาของ monophenolase activity นั้นน้อยกว่าปฏิกิริยาของ diphenolase activity ถึง 6.5 เท่า นั้นแสดงให้เห็นว่าการเร่งปฏิกิริยาของ monophenolase activity โดยใช้ *L*-tyrosine เป็นสารตั้งต้นนั้นช้ากว่าปฏิกิริยาของ diphenolase activity ที่ใช้ *L*-DOPA เป็นสารตั้งต้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารประกอบไดฟีนอลเป็นสารตั้งต้นที่เอนไซม์ไทโรซิเนสเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า ในขณะที่ค่าคงที่ของไมเคิลิส ( $K_m$ ) ของปฏิกิริยา monophenolase activity มีค่าไม่ต่างจากปฏิกิริยาของ diphenolase activity มากนัก แต่พบว่าประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของ monophenolase activity นั้นน้อยกว่า diphenolase activity ถึงเกือบ 5 เท่า ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นชัดว่าปฏิกิริยาของ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นเกิดขึ้นได้ดีกว่าปฏิกิริยาของ monophenolase activity

นอกจากจะได้ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสแล้วนั้น ในผลการศึกษาจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาของ monophenolase activity (ภาพที่ 9A) นี้ยังทำให้เห็นการเกิด lag phase ในช่วงแรกของการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงการเกิดขึ้นของ lag phase เนื่องจากสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลมีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสในรูป met form สูง (Selinheimo et al., 2008) ซึ่งในธรรมชาติมีเอนไซม์ไทโรซิเนสในรูป met form อยู่มากถึงร้อยละ 85 ดังนั้นสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลจึงทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนสในรูป met form ทำให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อน dead-end complex ที่ไม่ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ (Chang, 2009) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นพบว่าระยะเวลาการเกิด lag phase ลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่มากขึ้นจะไปเปลี่ยนสมดุลให้สารตั้งต้นจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสในรูป oxy form ได้มากขึ้น ทำให้เกิดสารเชิงซ้อน productive complex ระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นและเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ ในขณะที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นน้อยๆ โอกาสของการเกิดเป็นสารเชิงซ้อน dead-end complex มีมากกว่า จึงทำให้เกิด lag phase ในระยะเวลาที่นานกว่า (Chang, 2009)



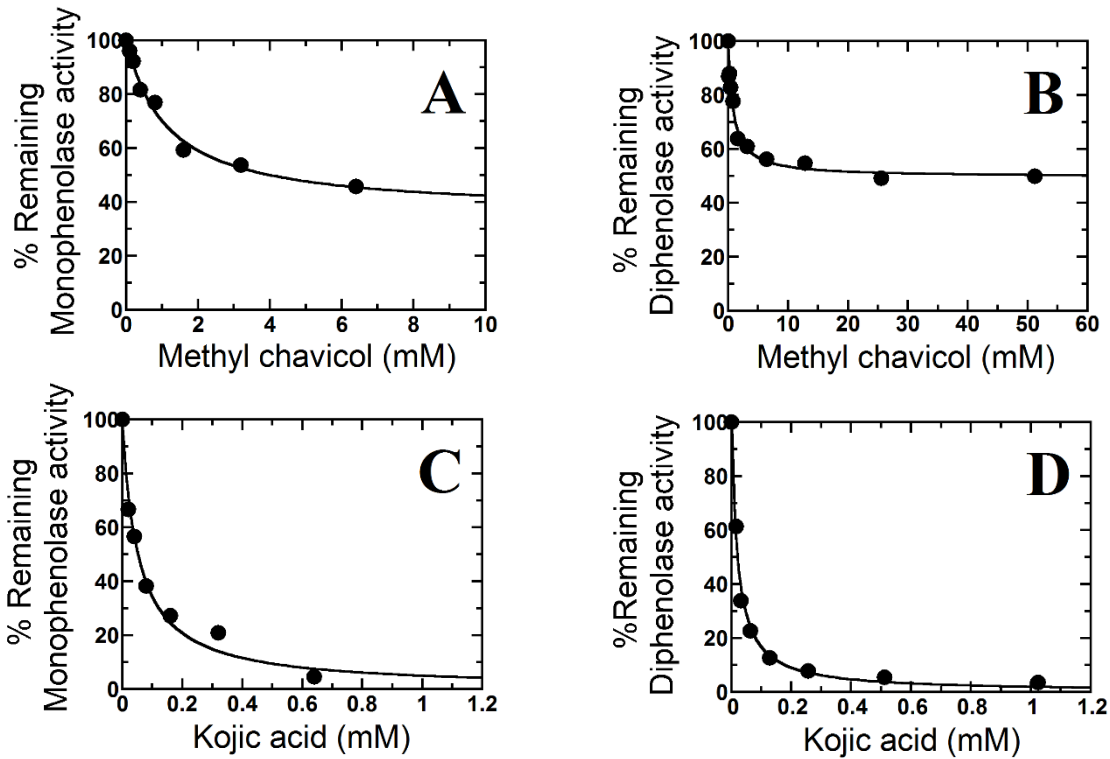
ภาพที่ 9 จลนศาสตร์ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้สารตั้งต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ (A) *L*-tyrosine (0.02 (รูปเส้นที่มีวงกลมโปร่ง), 0.04 (รูปเส้นที่มีวงกลมทึบ), 0.08 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมโปร่ง), 0.16 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมทึบ), 0.32 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดโปร่ง), 0.64 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดทึบ), 1.28 mM (รูปเส้นที่มีสามเหลี่ยมโปร่ง)) และ (B) *L*-DOPA (0.2 (รูปเส้นที่มีวงกลมโปร่ง), 0.4 (รูปเส้นที่มีวงกลมทึบ), 0.8 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมโปร่ง), 1.6 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมทึบ), 3.2 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดโปร่ง), 6.4 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดทึบ), 12.8 mM (รูปเส้นที่มีสามเหลี่ยมโปร่ง)) และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับความเข้มข้นต่างๆ ของสารตั้งต้น *L*-tyrosine (C) และ *L*-DOPA (D) ทำให้สามารถคำนวณค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ได้ดังแสดงค่าในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารตั้งต้นที่เป็น *L*-tyrosine และ *L*-DOPA ในปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ

| สารตั้งต้น         | $K_m$ (mM)      | $V_{max}$ (nM/s)   | $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ ) |
|--------------------|-----------------|--------------------|------------------------|-----------------------------------|
| <i>L</i> -Tyrosine | $0.27 \pm 0.01$ | $570.70 \pm 5.53$  | 2.85                   | 10.55                             |
| <i>L</i> -DOPA     | $0.37 \pm 0.10$ | $442.61 \pm 25.68$ | 18.44                  | 49.84                             |

#### 4. จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสาร methyl chavicol เพื่อหาค่าคงที่ของการยับยั้งเอนไซม์ที่สถานะความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่กำหนด (apparent inhibition constant)

ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสาร methyl chavicol (0.1-6.4 mM ในปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ 0.1-51.2 mM ในปฏิกิริยาของ diphenolase activity) โดยใช้ *L*-tyrosine (1.5 mM) และ *L*-DOPA (5 mM) เป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity (200 nM) และ diphenolase activity (25 nM) ตามลำดับ ซึ่งติดตามจลนศาสตร์การเกิดปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ dopachrome ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตรที่เวลาใดๆ เพื่อหาอัตราเร็วเริ่มต้นและนำผลที่ได้มาคำนวณหาร้อยละกิจกรรมของการทำงานของเอนไซม์ที่คงเหลือ (% remaining activity) โดยผลการศึกษานี้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย kojic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0.02-0.64 mM ในปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ 0.016-1.024 mM ในปฏิกิริยาของ diphenolase activity) ซึ่งผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าค่าคงที่ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สถานะความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่กำหนด หรือ apparent  $K_i$  ของสาร methyl chavicol ในปฏิกิริยาที่ใช้ *L*-tyrosine และ *L*-DOPA เป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity (ภาพที่ 10A) และ diphenolase activity (ภาพที่ 10B) ตามลำดับ มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งด้วย kojic acid (ภาพที่ 10C และ 10D) ได้ชี้ให้เห็นว่าสาร methyl chavicol ในปฏิกิริยาการยับยั้ง monophenolase activity และ diphenolase activity นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อยกว่า kojic acid ประมาณ 13 และ 47 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงสรุปค่าในตารางที่ 2 และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นสุดท้ายของปฏิกิริยาจะเห็นว่า ความเข้มข้นสุดท้ายของ kojic acid ที่ความเข้มข้น 1 mM นั้นส่งผลให้ร้อยละของกิจกรรมการทำงานที่คงเหลือนั้นน้อยมากประมาณร้อยละ 5 ในขณะที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 6.4 และ 51.2 mM นั้นส่งผลให้ร้อยละของกิจกรรมการทำงานที่คงเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 40 และ 50 สำหรับปฏิกิริยาการยับยั้ง monophenolase activity (ภาพที่ 10A) และ diphenolase activity (ภาพที่ 10B) ตามลำดับ นั้นแสดงให้เห็นว่ายังคงมีเอนไซม์ไทโรซิเนสอิสระที่ไม่ได้ถูกยับยั้งโดยสาร methyl chavicol ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความสามารถในการละลายของสาร methyl chavicol ซึ่งมีคุณสมบัติความมีขี้ขำ อีกทั้งในระหว่างการทำปฏิกิริยาต้องควบคุมความเข้มข้นของตัวละลาย DMSO ให้อยู่ที่ 1%(v/v) จึงทำให้มีข้อจำกัดในการละลายของสาร และส่งผลต่อความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส



ภาพที่ 10 ร้อยละคงเหลือของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ถูกยับยั้งด้วยสาร methyl chavicol (A และ B) และ kojic acid (C และ D) ที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้น *L*-tyrosine (1.5 mM) และ *L*-DOPA (5 mM) สำหรับปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ที่กำหนด ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่าคงที่ของการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้น *L*-tyrosine และ *L*-DOPA ที่กำหนด ตามลำดับ

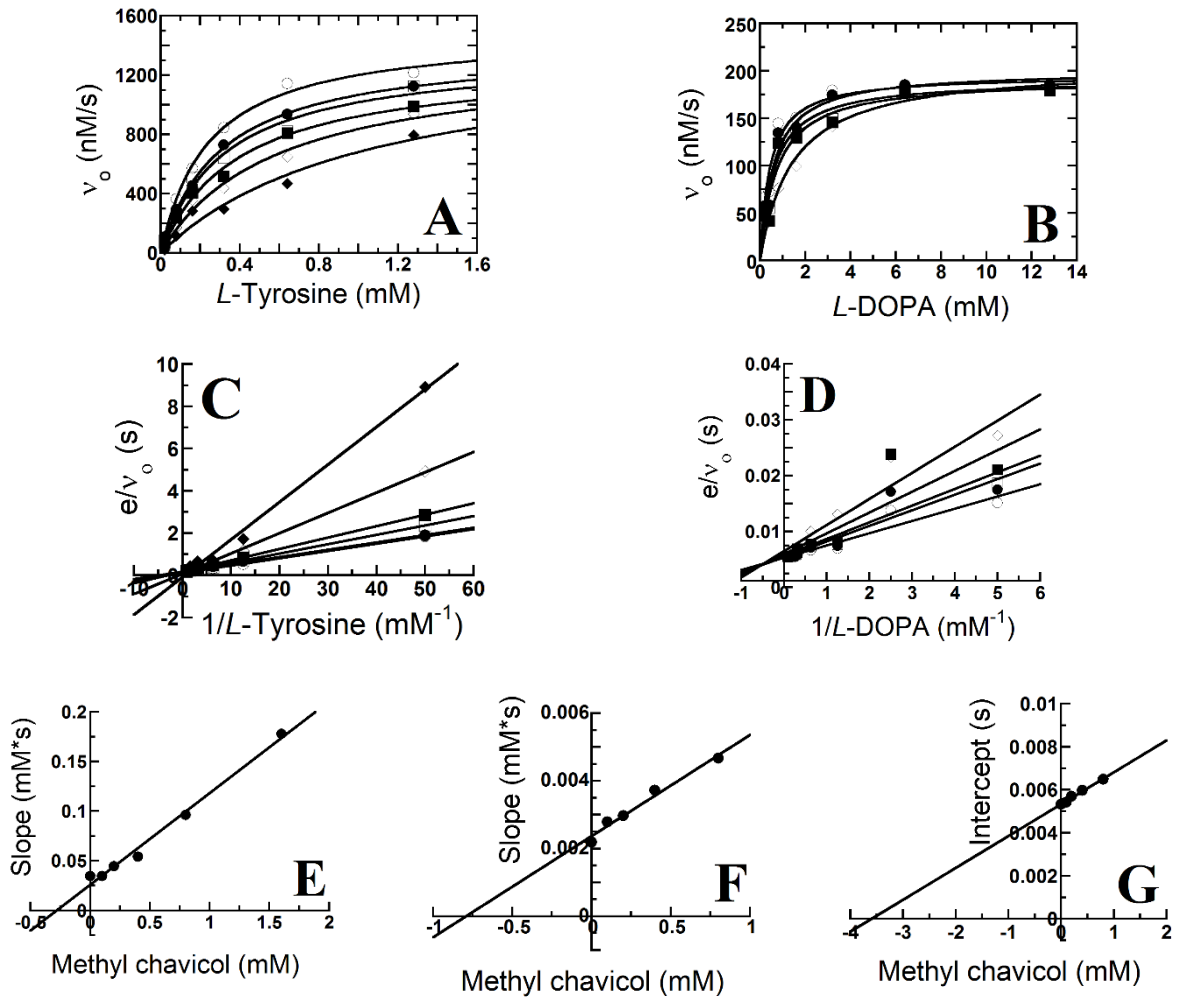
| ปฏิกิริยา              | สารตั้งต้น         | ตัวยับยั้ง      | $^{app}K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) |
|------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------------|
| Monophenolase activity | <i>L</i> -Tyrosine | Methyl chavicol | $1008 \pm 248$                |
|                        |                    | Kojic acid      | $79 \pm 48$                   |
| Diphenolase activity   | <i>L</i> -DOPA     | Methyl chavicol | $932 \pm 253$                 |
|                        |                    | Kojic acid      | $20 \pm 1$                    |



## 5. รูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร methyl chavicol เปรียบเทียบกับ kojic acid

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษารูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสาร methyl chavicol ที่ความเข้มข้น 0.1-1.6 mM เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาการยับยั้งโดย kojic acid ที่ความเข้มข้น 0.02-0.32 mM ในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นต่างๆ ของสารตั้งต้น *L*-tyrosine (0.02-1.28 mM) และ *L*-DOPA (0.2-12.8 mM) สำหรับการศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งของ monophenolase activity (200 nM) และ diphenolase activity (25 nM) ตามลำดับ ซึ่งอัตราเร็วเริ่มต้น ( $v_0$ ) ที่คำนวณได้จากแต่ละปฏิกิริยาจะถูกนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์โดยตรง (direct plot) และความสัมพันธ์แบบส่วนกลับ (reciprocal plot) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ที่แต่ละความเข้มข้นของตัวยับยั้ง ทั้งในปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อใช้ในการกำหนดรูปแบบ และหาค่าคงที่ของการยับยั้งในทั้ง 2 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส

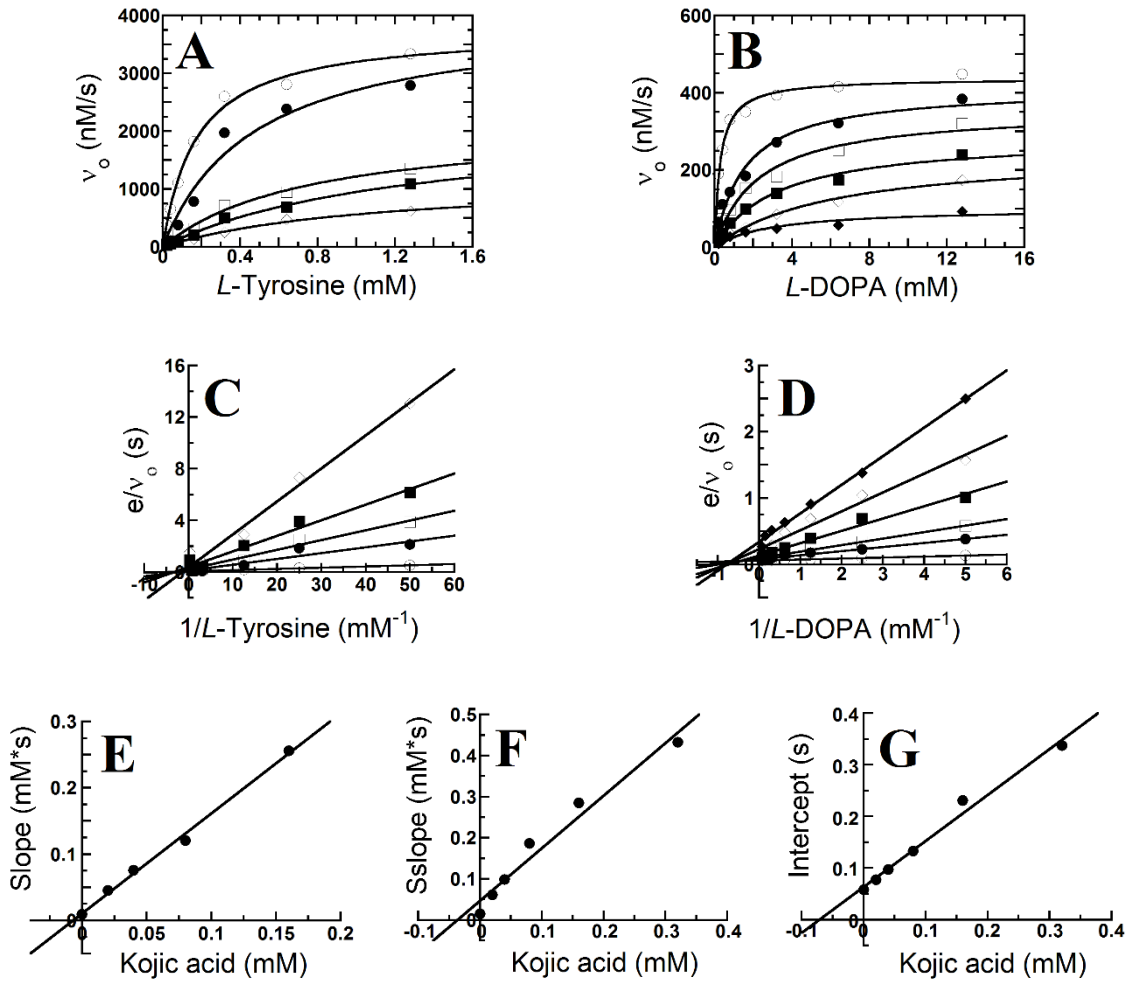
โดยผลการศึกษารูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยความเข้มข้นต่างๆ สาร methyl chavicol ทำให้พบว่า อัตราเร็วเริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารตั้งต้น *L*-tyrosine และ *L*-DOPA ในปฏิกิริยาของ monophenolase activity (ภาพที่ 11A) และ diphenolase activity (ภาพที่ 11B) ตามลำดับ นั้นจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร methyl chavicol และเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์แบบส่วนกลับ (reciprocal plot) ระหว่างอัตราส่วนของความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมดต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของแต่ละปฏิกิริยา ( $e/v_0$ ) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งสองที่ความเข้มข้นใดๆ ของสาร methyl chavicol จะทำให้ได้รูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร methyl chavicol ซึ่งพบว่าสาร methyl chavicol นั้นจะมีรูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นแบบ competitive inhibition (ภาพที่ 11C) และ non-competitive inhibition (ภาพที่ 11D) เมื่อใช้ *L*-tyrosine และ *L*-DOPA เป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ ซึ่งจากกราฟที่ได้นี้สามารถนำมาคำนวณหาค่าคงที่การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์แบบส่วนกลับ กับความเข้มข้นต่างๆ ของสาร methyl chavicol (ภาพที่ 11E) สำหรับรูปแบบการยับยั้งแบบ competitive inhibition และโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชัน (ภาพที่ 11F) และค่าจุดตัดแกนตั้ง (ภาพที่ 11G) ของกราฟความสัมพันธ์แบบส่วนกลับ กับความเข้มข้นต่างๆ ของสาร methyl chavicol สำหรับรูปแบบการยับยั้งแบบ non-competitive inhibition โดยพบว่าค่าคงที่การยับยั้งแบบ competitive inhibition ( $K_i$ ) โดยสาร methyl chavicol นั้นมีค่าเท่ากับ 279.03  $\mu\text{M}$  ในขณะที่ค่าคงที่การยับยั้งแบบ non-competitive inhibition นั้นมี 2 ค่าคือค่า  $K_{IE}$  และ  $K_{IES}$  ซึ่งเป็นค่าคงที่การยับยั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนสารตั้งต้น โดยมีค่าเท่ากับ 792.15 และ 3596.43  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ ดังแสดงสรุปในตารางที่ 3



ภาพที่ 11 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity (A) และ diphenolase activity (B) ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสาร methyl chavicol (0 (รูปเส้นที่มีวงกลมโปร่ง), 0.1 (รูปเส้นที่มีวงกลมทึบ), 0.2 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมโปร่ง), 0.4 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมทึบ), 0.8 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดโปร่ง), 1.6 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดทึบ) mM) ในสภาวะที่ใช้ L-tyrosine (0.02-1.28 mM) และ L-DOPA (0.2-12.8 mM) เป็นสารตั้งต้น และรูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสาร methyl chavicol ที่เป็นแบบ competitive inhibition (C) และ non-competitive inhibition (D) ตามลำดับ โดยค่า  $K_i$  สำหรับการยับยั้งแบบ competitive inhibition เท่ากับ 279.03  $\mu\text{M}$  (E) และค่า  $K_{iE}$  และ  $K_{iES}$  สำหรับการยับยั้งแบบ non-competitive inhibition เท่ากับ 792.15 (F) และ 3596.43  $\mu\text{M}$  (G) ตามลำดับ

ในขณะที่ผลการศึกษารูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยความเข้มข้นต่างๆ สาร kojic acid นั้นทำให้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ kojic acid สูงขึ้น อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาของ monophenolase activity (ภาพที่ 12A) และ diphenolase activity (ภาพที่ 12B) ของเอนไซม์ไทโรซิเนส นั้นลดลงอย่างมาก และมากกว่าการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ด้วยสาร methyl chavicol และเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์แบบส่วนกลับระหว่าง  $e/v_0$  กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งสองที่ความเข้มข้นใดๆ ของสาร kojic acid จะทำให้ได้รูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร kojic acid ทำให้ทราบว่าสาร kojic acid นั้นจะมีรูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นแบบ competitive inhibition (ภาพที่ 12C) และ non-competitive inhibition (ภาพที่ 12D) เมื่อใช้ *L*-tyrosine และ *L*-DOPA เป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่าคงที่การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์แบบส่วนกลับ กับความเข้มข้นต่างๆ ของสาร kojic acid (ภาพที่ 12E) สำหรับรูปแบบการยับยั้งแบบ competitive inhibition และโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชัน (ภาพที่ 12F) และค่าจุดตัดแกนตั้ง (ภาพที่ 12G) ของกราฟความสัมพันธ์แบบส่วนกลับ กับความเข้มข้นต่างๆ ของสาร kojic acid สำหรับรูปแบบการยับยั้งแบบ non-competitive inhibition ซึ่งพบว่าค่าคงที่การยับยั้งแบบ competitive inhibition ( $K_i$ ) โดยสาร kojic acid นั้นมีค่าเท่ากับ  $7.16 \mu\text{M}$  ในขณะที่ค่าคงที่การยับยั้งแบบ non-competitive inhibition นั้นมี 2 ค่าคือค่า  $K_{iE}$  และ  $K_{iES}$  ซึ่งเป็นค่าคงที่การยับยั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่อยู่ในรูปแบบเชิงซ้อนสารตั้งต้น โดยมีค่าเท่ากับ  $37.20$  และ  $71.29 \mu\text{M}$  ตามลำดับ ดังแสดงสรุปในตารางที่ 3

เมื่อพิจารณาารูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity โดยสาร methyl chavicol แล้วจะพบว่า รูปแบบการยับยั้งโดยสาร methyl chavicol นั้นเหมือนกันกับการยับยั้งโดยสาร kojic acid นั้นคือมีรูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ที่เป็นแบบ competitive inhibition และ non-competitive inhibition ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าค่าคงที่การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร methyl chavicol จะมีค่าสูงมาก และส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาทั้ง 2 ของเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นต่ำกว่าการยับยั้งโดยสาร kojic acid อย่างมากก็ตาม แต่สาร methyl chavicol ก็ให้ผลการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับสาร kojic acid ซึ่งนั่นทำให้เห็นว่า สาร methyl chavicol สามารถถูกนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นสารต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์สารที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต



ภาพที่ 12 จลนศาสตร์การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity (A) และ diphenolase activity (B) ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสาร kojic acid (0 (รูปเส้นที่มีวงกลมโปร่ง), 0.02 (รูปเส้นที่มีวงกลมทึบ), 0.04 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมโปร่ง), 0.08 (รูปเส้นที่มีสี่เหลี่ยมทึบ), 0.16 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดโปร่ง), 0.32 (รูปเส้นที่มีข้ามหลามตัดทึบ) mM) ในสภาวะที่ใช้ L-tyrosine (0.02-1.28 mM) และ L-DOPA (0.2-12.8 mM) เป็นสารตั้งต้น และรูปแบบการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสาร kojic acid ที่เป็นแบบ competitive inhibition (C) และ non-competitive inhibition (D) ตามลำดับ โดยค่า  $K_i$  สำหรับการยับยั้งแบบ competitive inhibition เท่ากับ  $7.16 \mu\text{M}$  (E) และ ค่า  $K_{IE}$  และ  $K_{IES}$  สำหรับการยับยั้งแบบ non-competitive inhibition เท่ากับ  $37.20$  (F) และ  $71.29 \mu\text{M}$  (G) ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่าคงที่การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ของสาร methyl chavicol เปรียบเทียบกับสาร kojic acid

| ปฏิกิริยา              | สารตั้งต้น | ตัวยับยั้ง      | ชนิดการยับยั้ง          |                            |                             |
|------------------------|------------|-----------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                        |            |                 | Competitive             | Non-competitive            |                             |
|                        |            |                 | $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) | $K_{iE}$ ( $\mu\text{M}$ ) | $K_{iES}$ ( $\mu\text{M}$ ) |
| Monophenolase activity | L-Tyrosine | Methyl chavicol | 279.03                  | -                          | -                           |
|                        |            | Kojic acid      | 7.16                    | -                          | -                           |
| Diphenolase activity   | L-DOPA     | Methyl chavicol | -                       | 794.15                     | 3596.43                     |
|                        |            | Kojic acid      | -                       | 37.20                      | 71.29                       |

- หมายถึง ไม่มีการคำนวณหาค่า

## สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของ เอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร methyl chavicol ทำให้พบว่าสาร methyl chavicol นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ในทั้ง 2 ปฏิกิริยา โดยสาร methyl chavicol จะใช้กลไกการยับยั้งแบบ competitive inhibition ในการยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity ด้วยค่าคงที่การยับยั้งเท่ากับ 0.28 mM ในขณะที่การยับยั้งปฏิกิริยาของ diphenolase activity นั้นจะใช้กลไกการยับยั้งแบบ non-competitive inhibitor ด้วยค่าคงที่การยับยั้ง 2 ค่าเท่ากับ 0.79 และ 3.60 mM โดยรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในทั้ง 2 ปฏิกิริยาของสาร methyl chavicol นั้นสอดคล้องกับรูปแบบการยับยั้งทั้งในปฏิกิริยาของ monophenolase activity และ diphenolase activity ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสาร kojic acid อย่างไรก็ตามค่าคงที่การยับยั้งปฏิกิริยาของ monophenolase activity โดยสาร kojic acid นั้นมีค่าน้อยกว่าการยับยั้งด้วยสาร methyl chavicol ประมาณ 39 เท่า และค่าคงที่การยับยั้งปฏิกิริยาของ diphenolase activity โดยสาร kojic acid มีค่าน้อยกว่าการยับยั้งด้วยสาร methyl chavicol ประมาณ 21 และ 50 เท่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ได้ชี้ให้เห็นว่า สาร methyl chavicol ที่ได้จากส่วนสกัดที่เป็นน้ำมันหอมระเหยของใบเร่วหอมนั้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้และมีรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไปในทิศทางเดียวกันกับสาร kojic acid ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นจะต่ำกว่าสาร kojic acid ก็ตาม โดยผลการศึกษาที่ได้นี้จะป็นข้อมูลฐานสำคัญสำหรับการพัฒนาตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับสาร methyl chavicol ได้ในอนาคต

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการละลายสาร methyl chavicol และเหมาะสมสำหรับการศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส
2. ควรเพิ่มสารที่ช่วยในการละลายสาร methyl chavicol เพื่อให้สามารถเข้ากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ และเพื่อประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้ในอนาค

## บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข (2556). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบ  
เร่วหอม: มูลค่าเพิ่มจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- รายการเกษตรน่ารู้. พืชสมุนไพร เร่วหอม. สถานีโทรทัศน์กองทัพบกช่อง 7. 28 ตุลาคม 2553.
- พงศศักดิ์ พลเสนา. (2550a). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมาย  
เหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากหลายพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- พงศศักดิ์ พลเสนา. (2550b). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด  
เจตนารมณัฎณ์ท์ ปราจีนบุรี. 301น.
- วารสารเคหเกษตร. เร่วหอม สมุนไพรที่ขยายพันธุ์ ปลูก และแปรรูป ไม่ยาก. [http://www.kehakaset.com/  
index.php?option=com\\_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38](http://www.kehakaset.com/index.php?option=com_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38).  
สืบค้นวันที่ 26 กันยายน 2554.
- Bentley, R. (2006). From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid.  
*Natural Product Report*, 23, 1046-1062.
- Chang, T. (2009). An update review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular  
Sciences*, 10, 2440-2475.
- Chen, X.X., Zhang, J., Chai, W.M., Xiang, Z.H., Feng, H.L., Shen, D.Y., & Chen, Q.X. (2013). Reversible  
and competitive inhibitory kinetics of amoxicillin on mushroom tyrosinase. *International  
Journal of Biological Macromolecules*, 62, 726-733.
- Cook PF, Cleland WW. Enzyme kinetics and mechanisms. New York, USA: Garland Science  
Publishing 2007.
- Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., & Jones, K.M. Data for biochemical research. 3<sup>rd</sup> ed.  
Clarendon Press, Oxford 1986.
- Engel, P.C. Enzyme kinetics: The steady-state approach. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, United Kingdom:  
University Printing House 1981.
- Gonzalez, A.G., Urena, A.G., Lewis, R.J., & Zwan, G. (2012). Spectroscopy and kinetics of tyrosinase  
catalyzed trans-resveratrol oxidation. *Journal of Physical Chemistry B*, 10, 1-27.
- Ismaya, W.T., Rozeboom, H.J., Weijn, A., Mes, J.J., Fusetti, F., Wichers, H.J., & Dijkstra, B.W. (2011).  
Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer  
subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*, 50, 5477-5486.

- Khan, M.T.H. (2007). Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. *Pure and Applied Chemistry*, 79, 2277–2295.
- Manosroi, A., & Manosroi, J. (2005). Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of aromatic volatile oil from Thai medicinal plants for cosmetic uses. In Palaniswamy UR, Craker LE, Gardner ZE. *Traditional Medicine & Nutraceuticals*. Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University. 6, 97-100.
- Matsuura, R., Ukeda, H., & Sawamura, M. (2006). Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 54, 2309-2313.
- Olivares, C., & Solano, F. (2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment & Cell Melanoma Research*, 22, 750-760.
- Srisook, E., Palachot, M., Mankhong, S., & Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory effect of *Etilingera pavieana* ((Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacognosy Magazine*, 13, S230-S235.
- Pop, C., Vlase, L., and Tamas, M. (2009). Natural resources containing arbutin: Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37, 129–132.
- Qiu, L., Chen, Q.H., Zhuang, J.X., Zhong, X., Zhou, G.Y.J., & Chen, Q.X. (2009). Inhibitory effects of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*, 112, 609-613.
- Saeio, K., Chaiyana, W., & Okonogi, S. (2011). Antityrosinase and antioxidant activities of essential oils of edible Thai plants. *Drug Discoveries and Therapeutics*, 5, 144-149.
- Selinheimo, E., Gasparetti, C., Mattinen, M.L., Steffensen, C.L., Buchert, J., & Kruus, K. (2008). Comparison of substrate specificity of tyrosinases from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 1-10.
- Siegbahn, P.E.M. (2003). The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8, 567-576.
- Song, K.K., Han, H.H.P., Zhang, C.L., Shi, Y., and Chen, Q.X. (2006). Inhibitory effects of *cis*- and *trans*-isomers of 3,5-dihydroxystilbene on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 1147-1151.
- Stein, R.L. Kinetics of enzyme action: Essential principles for drug hunters. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2011.



Yabuta, T. (1924). The constitution of kojic acid, a gamma-pyrone derivative formed by *Aspergillus oryzae* from carbohydrates. *Journal of the Chemical Society Perkin 1*, 125, 575–587.

Yamada, R., Yoshie, T., Wakai, S., Asai-Nakashima, N., Okazaki, F., Ogino, C., Hisada, H., Tsutsumi, H., Hata, Y., & Kondo, A. (2014). *Aspergillus oryzae*-based cell factory for direct kojic acid production from cellulose. *Microbial Cell Factories*, 13, 71-78.