ชื่อวิทยานิพนธ์ สารยับยั้งอะไมเลสในเปลือกฝักสะตอ

ผู้เขียน นางสาวรัตวรรณ พูดเพราะ

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

เปลือกฝักสะตอ ประกอบด้วยสารยับยั้งอะไมเลสชนิดที่ไม่เป็นโปรตีน เมื่อสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัม/ลิตร และทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย 95% เมทานอล แล้วนำส่วนใส (Aq 95% MeOH) ซึ่งมีค่าการยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสจากน้ำลาย เมื่อทำบริสุทธิ์ต่อโดยโครมาโทกราฟี่ผ่าน Sephadex G-75 พบว่ามีความบริสุทธิ์เป็น 0.52 เท่า ด้วยร้อยละการเก็บเกี่ยว 0.107 มีค่าการยับยั้งจำเพาะต่อเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสจากน้ำลาย 2.641 เท่า เมื่อเทียบกับสารสกัดเริ่มต้น

เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ผลของอุณหภูมิ pH เกลือต่างๆต่อกิจกรรมการยับยั้ง และความคงตัวของสารสกัดหยาบ และสารยับยั้งที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 พบว่า ทั้งสารสกัดหยาบ สารยับยั้งที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 มีคุณสมบัติไม่แตกต่างกัน คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการยับยั้งอยู่ระหว่าง 4-37°C มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4-40°C ลดลงเล็กน้อยที 50-60°C และมีความคงตัวน้อยที่อุณหภูมิ 80-90°C ส่วน pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการยับยั้งอยู่ที่ pH7 และมีความคงตัวในสภาวะที่เป็นกรด pH ระหว่าง 5-7 ในขณะที่ เกลือต่างๆได้แก่ NaCl, KCl, $CaCl_2$, และ $MgSO_4$ ไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้ง

การศึกษาผลของสารยับยั้งต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งในระบบทางเดินอาหารพบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายคน มอลเตสจากยีสต์ อะไมเลสจากตับอ่อนหมู มอลเตสจากลำไส้เล็กหมู และซูเครสจากยีสต์ ตามลำดับ ส่วนสารยับยั้งที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 สามารถยับยั้ง มอลเตสจากยีสต์ อะไมเลสจากนำลายคน อะไมเลสจากตับอ่อนหมู มอลเตสจากลำไส้เล็กหมู และซูเครสจากยีสต์ได้ตามลำดับ โดยจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส มอลเตส และ ซูเครสจากยีสต์ เป็นแบบ mixed noncompetitive การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ตัวยับยั้งชอบที่จะจับกับเอนไซม์อิสระ มากกว่าเอ็นไซม์ที่จับกับสับสเตรท ส่วนการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส และ ซูเครสจากยีสต์ ตัวยับ ยั้งชอบที่จะจับกับเอ็นไซม์ที่จับกับสับสเตรท มากกว่าเอนไซม์อิสระ

การศึกษากิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดหยาบ และ สารยับยั้งที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ต่อเอนไซม์อะไมเลสจากแมลงซึ่งเป็นศัตรูพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Callosobruchus chinensis*, *Callosobruchus maculatus* และ *Sitophilus oryzae* พบว่า สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสของ *S. oryzae* และ *C. chinensis* ตามลำดับ ขณะที่สารยับยั้งที่ได้จากคอลัมน์ ยับยั้งเฉพาะ *S. oryzae* แต่ไม่ยับยั้งอะไมเลสของ *C. chinensis* และ *C. maculatus* เมื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบ และ สารยับยั้งที่ได้จากคอลัมน์ ต่อ การเจริญเติบโตของ *C. chinensis* และ *C. maculatus* โดยการผสมสารยับยั้งลงในอาหารเทียมที่ทำขึ้น และการเคลือบที่ผิวเมล็ดถั่วเขียว พบว่า สารยับยั้งไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงทั้ง 2 ได้

การจำแนกชนิดของสารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ โดย การทำปฏิกิริยากับสารละลายโฟลิน ตรวจรูปแบบสเปคตรัมรังสีอินฟราเรด และ ตรวจตำแหน่งการเคลื่อนที่บนโครมาโทกราฟี่แบบแผ่นบางของสารที่ได้จากการย่อยสารยับยั้งด้วยกรดไฮโดรคลอริกและสกัดไว้ในชั้นของอีเทอร์ กับสารมาตรฐาน กรดแทนนิก และแกลลิก พอจะสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารยับยั้งอะไมเลสในเปลือกฝักสะตอข้าวน่าจะเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอล ที่มีหมู่ทำหน้าที่เป็นคาร์บอซิล เป็นองค์ประกอบ

Thesis Title	Amylase Inhibitor in Pericarp of Sataw (*Parkia speciosa* Hassk.)
Author	Miss Rattawan Poodproh
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2006

ABSTRACT

Pericarp of *Parkia speciosa* Hassk. contains a nonptroteinaceous amylase inhibitor which was extracted by phosphate buffer pH 6.9 containing 9 g/litre NaCl and partial purified with 95% methanol. The obtained supernatant (Aq 95%MeOH) with amylase inhibitory activity was further purified by a conventional chromatography using Sephadex G-75 eluted with phosphate buffer pH 6.9 containing 0.01 M NaCl. The purified inhibitor (Sephadex G-75 fraction) had 0.52 purification fold with 0.107 % recovery at 2.641 of specific inhibitory activity unit.

Results of biochemical characterization revealed optimum temperature between 4-37°C with pH optimum at 7 for the inhibition of α-amylase from saliva by the inhibitor either in the form of crude extract or the puried form. Keeping the crude extract or purified inhibitor 30 min at 4-40°C did not affect its inhibitory activity against α-amylase from saliva, but at 50-60°C its inhibitory activity gradually decreased and dropped down seriously at 80-90°C. Salts including NaCl, KCl, $CaCl_2$, and $MgSO_4$ at 0.01 M showed no effect on the inhibitory activity.

Potential application of α-amylase inhibitor *via* luminal enzymes, the inhibitor have a high potency in inhibiting salivary α-amylase, yeast maltase, porcine pancreatic α-amylase, porcine intestinal maltase and yeast sucrase, respectively. In addition, the kinetic inhibition is a mixed noncompetitive which the inhibitor preferably binds α-amylase in the form of free enzyme more than enzyme-substrate complex, but with maltase and sucrase the inhibitor did in opposite direction.

Potential application of the inhibitor on pest control; α-amylase inhibitor in crude extract inhibited amylase of *Sitophilus orysea* and C*allosobruchus chinensis*

but did not inhibit amylase of *Callosobruchus maculatus* Sephadex G-75 fraction inhibited amylase of *S. orysea* but did not inhibit amylase of C*. chinensis* and *C. maculatus*. Treatment of the inhibitor either by mixing the inhibitor solution with mungbean powder or coating the solution on the skin of mungbean seeds and air dried, showed no effect in controlling the growth of *C. chinensis* and *C. maculatus*.

Identification of the purified amylase inhibitor *via* the reaction of Folin solution, the IR spectrum and the migration of its acid hydrolysate on thin layer chromatography comparing with standards tannic acid and gallic acid preliminary suggested that the inhibitor may be a phenolic compound with a carboxyl functional groups in its molecule.