รายงานการวิจัย

เรื่อง

การทำบริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสในเมล็ดเนียงนก

Purification and characterization of a purified amylase inhibitor in Nieng Nok Bean (*Archidendron clypearia*)

โดย

ผศ. ดร. อโนชา ตั้งโพธิธรรม หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดย

ทุนอุดหนุนเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์

ประเภททั่วไป ปีงบประมาณ 2544

เลขหมู่ QK 495.L52 C93 2544 b

Bib Key 237907

บทคัดย่อ

สารยับยั้งอะไมเลส เป็นสารประเภทไกลโคโปรตีน ที่พบได้ในพืชตระกูลถั่ว เมล็ด และส่วนต่างๆ ของพืชตระกูลอื่น มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และแมลง การนำสารยับยั้งอะไมเลส มาใช้งานเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือด หรือสร้างพืชต้านแมลง จำเป็นต้องทราบปริมาณที่มีอยู่จริงในพืชธรรมชาติโดยไม่มีอันตรายต่อการบริโภค คุณสมบัติทางชีวเคมีของสาร เนื่องจากได้มีหลักฐานว่าสารยับยั้งอะไมเลส ของพืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะและเลือกจับ หรือยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสจากแหล่งต่างๆแตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาเพื่อ 1). ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก 2). ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์ และ 3). ศึกษาจลนศาสตร์ของการยับยั้ง ผลการศึกษาพบว่า การตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัวร้อยละ 80 ของแอมโมเนียมซัลเฟต และการทำบริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์ CM-cellulose คอลัมน์ Sephadex G-75 และคอลัมน์ hydroxyapatite เป็นวิธีทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสได้ 101.7 เท่า ที่ปริมาณกิจกรรมการยับยั้งคงอยู่ 18.1%ของเริ่มต้น สารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์เป็นไกลโคเปปไทด์ 1 หน่วย มีกรดอะมิโน 18 ชนิดเป็นองค์ประกอบ มีขนาดมวลโมเลกุล 68,400 ดาลตันโดยวิธีเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ SDS-PAGE และ 70,800 ดาลตัน โดยวิธีเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ Native-PAGE และเมื่อตรวจสอบด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-75 มีขนาดมวลโมเลกุล 70,000 ดาลตัน มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ pH 7.0 และที่อุณหภูมิ 40°ซ และมีลักษณะการยับยั้งเป็นแบบไม่แข่งขันขัน (non-competitive) เนื่องจากมีค่า K_m เท่าเดิม และค่า V_{max} ลดลง สารสกัดและสารบริสุทธิ์ไม่มีคุณสมบัติของเลคตินเช่นโปรตีนป้องกันอื่น เนื่องจากไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน, กระต่าย, หนู รวมทั้งไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์และไม่เจริญพันธุ์

Abstract

Amylase inhibitor (AI) is a glycoprotein found in plants of legume family, seeds and parts of other families. This AI can form complex with salivary and pancreatic α-amylase of human, animal and insect. Before using AI for lowering blood glucose and creating transgenic plant, it is necessary to know natural amount of AI generally consumed by human and animals. Understanding in its biochemical property is also important since there is an evidence that AI of plants have species specific in reacting with amylase. The aim of this study was 1). to purify a proteinaceous amylase inhibitor from nieng nok bean, 2). to do biochemical characterization of the purified AI, and 3). to do its inhibition kinetic study. The use of 80% saturation of ammonium sulphate and three series of column chromatography: CM cellulose, Sephadex G-75 and hydroxyapatite, the inhibitor was sucessfully purified with 101.7 purification fold at 18.1% recovered inhibitory activity. The purified AI comprised of one single glycopeptide unit with 18 types of amino acid. Its molecular mass was 68,400 daltons by SDS-PAGE electrophoresis, 70,800 daltons by Native-PAGE electrophoresis, and 70,000 daltons by Sephadex G-75 gel filtration chromatography. The optimum pH for inhibitory activity of AI was at 7.0 and the optimum temperature of AI was at 40 °C. Kinetic study revealed that its inhibitory activity was a non-competitive type because of its constant K_m and its decreasing of maximum velocity. Testing for hemagglutination activity and sperm coagulation gave negative results to both crude extract and the purified inhibitor. AI of nieng nok bean thus had no lectin properties.