ชื่อวิทยานิพนธ์ สารยับยั้งอะไมเลสในน้ำยางกล้วย มะละกอ และยางพารา

ผู้เขียน นายจตุรงค์ สินแก้ว

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

ได้มีรายงานว่าน้ำยางกล้วย มะละกอ และยางพาราเป็นสาเหตุการก่ออาการแพ้ แต่ยังไม่มีรายงานว่าในน้ำยางเหล่านี้มีสารยับยั้งอะไมเลส ในขณะที่โปรตีนก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลีขนาด 60 กิโลดาลตัน ในสภาพธรรมชาติ ที่มีหน่วยย่อยขนาด 13-16 กิโลดาลตัน มีรายงานว่ามีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสในน้ำยางของพืชดังกล่าว และตรวจหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลี

ยางจากเครือกล้วย ผลมะละกอ และลำต้นของยางพารา ได้จากอำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา ประเทศไทย แยกส่วนใสจากน้ำยางของพืชแต่ละชนิดด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ 50,000 x g ที่ 4°ซ ตรวจหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสโดยใช้สารละลายน้ำแป้ง 2% เป็นสับสเตรท และสารละลายน้ำตาลมอลโทสเป็นสารมาตรฐาน ทำบริสุทธิ์ส่วนใสที่ได้จากน้ำยางแต่ละชนิดด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชั่น รวมสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้ง นำไปหาขนาดโมเลกุลด้วยเจลฟิลเตรชั่น ตรวจแบบแผนโปรตีนด้วย Native-PAGE และหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนหน่วยย่อยด้วย Tricine SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

ผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางกล้วยแสดงกิจกรรมการยับยั้ง 27.27 หน่วย ต่อ ปริมาณน้ำยางที่เก็บ 1 มล. ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Sephadex G-75 แสดงกิจกรรมการยับยั้ง 150 หน่วย ต่อ ปริมาณน้ำยางที่เก็บ 1 มล. และไม่พบแถบโปรตีนใน Native-PAGE สารยับยั้งดังกล่าวเกิดปฏิกิริยาเชิงบวกสารละลายสีน้ำเงินเข้มกับสารละลาย ferric chloride และสารละลายโฟลิน และเกิดฟองก๊าซกับสารละลาย sodium bicarbonate ผลการเกิด bathochromic shift ในสารละลายด่าง และผลการวิเคราะห์ด้วย Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) ของสารยับยั้งที่ทำบริสุทธิ์ สนับสนุนลักษณะของสารประกอบฟีโนลิคที่มีหมู่ carboxylic นอกจากนี้ผล Thin layer chromatography (TLC) ของสารยับยั้งที่ถูกย่อยและสกัดด้วยอีเทอร์ เสริมความเป็นไปได้ว่าสารยับยั้งอะไมเลสในน้ำยางกล้วยเป็นสารประกอบฟีโนลิค ที่มี gallic acid เป็นหน่วยย่อย ข้อมูลที่ได้นี้แสดงว่าสารยับยั้งในน้ำยางกล้วยเป็นสารยับยั้งอะไมเลส

ประเภทที่ไม่ใช่โปรตีน ถ้าเป็น tannin สารนี้จะมีน้ำหนักโมเลกุล 500 ถึงมากกว่า 20,000 ดาลตัน เมื่อมีกรดแกลลิคขนาด 170 ดาลตัน เป็นโครงสร้างพื้นฐานภายในโมเลกุล

สารยับยั้งอะไมเลสในน้ำยางมะละกอแสดงกิจกรรมการยับยั้ง 0.43 หน่วย ต่อ ปริมาณน้ำยางที่เก็บ 1 มล. ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Sephadex G-75 แสดงกิจกรรมการยับยั้ง 2.83 หน่วย ต่อ ปริมาณน้ำยางที่เก็บ 1 มล. มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน Native-PAGE ใน SDS-PAGE พบแถบโปรตีน 3 หน่วยย่อยขนาด 23,857 ดาลตัน 16,723 ดาลตัน และ 14,715 ดาลตัน ขนาดดังกล่าวใกล้เคียงกับสารยับยั้งอะไมเลสที่ก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลี

สารยับยั้งอะไมเลสในน้ำยางพาราแสดงกิจกรรมการยับยั้ง 0.10 หน่วย ต่อ ปริมาณน้ำยางที่เก็บ 1 มล. ที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วย Sephadex G-25 แสดงค่าการยับยั้ง 18.75 หน่วย ต่อ ปริมาณน้ำยางที่เก็บ 1 มล. มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน Native-PAGE ใน SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาด 61,165 ดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่ก่อภูมิแพ้ในข้าวสาลี

Thesis Title Amylase Inhibitor in Latexes of Banana, Papaya and Rubber

Author Mr. Jaturong Sinkheaw

Major Program Biochemistry

Academic Year 2006

ABSTRACT

Latexes of banana, papaya and rubber have been reported for the cause of allergy. These plant latexes have not been reported to contain amylase inhibitor (AI) while a wheat allergen of native molecular weight of 60 kDa with subunits of 13-16 kDa has been reported to contain amylase inhibitory activity. This study thus aims to determine the amylase inhibitory activity in these plants latexes and its molecular weight comparing with the size of wheat AI allergen.

Latex samples were collected from the bunch of bananas, fruits of papaya and trunks of rubber trees from Namom district, Songkhla province, Thailand. Each plant latex was centrifuged at 50,000 x g under 4^{o}C, the supernatant was collected and assayed for their amylase inhibitory activity using 2 % starch solution as a substrate and maltose as standard. The leftover supernatant of each plant latex was partial purified through gel filtration technique, pooled fractions of inhibitory activity, and determined for its native molecular weight by gel filtration, its proteins patterns by Native-PAGE and its subunits molecular weight by tricine SDS-PAGE system staining with silver nitrate reagent.

Banana latex has inhibitory activity at 27.27 units per mL collected latex. Its purified AI from Sephadex G-75 showed inhibitory activity at 150 units per mL collected latex, without protein bands on the Native-PAGE. The purified AI of banana gave positive dark blue color of phenolic compound with ferric chloride and Folin reagents, and gas bubbles with the solution of saturated sodium bicarbonate of carboxylic functional group. Bathochromic shift in alkaline condition and result from Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) analysis of the purified AI supported phenol properties with carboxylic functional group of the previous tests. Results from TLC of the purified AI hydrolysate in ether with various standards indicated the possibility that AI in banana is a phenolic compound containing gallic acid as a basic structure.

These information shows that banana AI is a nonproteinaceous inhibitor type with molecular weight of 500 to > 20,000 Da if it is assumed to be tannin containing 170 Da of gallic acid basic structure.

Papaya latex has inhibitory activity at 0.43 units per mL collected latex. Its purified AI from Sephadex G-75 showed inhibitory activity at 2.83 units per mL collected latex, with one protein band on the Native-PAGE. By SDS-PAGE the purified AI comprised of three subunits of protein molecular weight 23,857 Da, 16,723 Da and 14,715 Da which corresponding to the size of allergen AI subunits in wheat.

Rubber latex has inhibitory activity at 0.10 units per mL collected latex. Its purified AI from Sephadex G-25 showed inhibitory activity at 18.75 units per mL collected latex, with one protein band on the Native-PAGE and one band of 61,165 Da on SDS-PAGE. This result shows that molecular weight of AI subunits in latex of rubber is larger than the size of allergen AI subunits in wheat.