

ชื่อวิทยานิพนธ์      สมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก  
ผู้เขียน              นางสาวจุฬา วิริยะบุบผา  
สาขาวิชา              ชีวเคมี  
ปีการศึกษา            2545

### บทคัดย่อ

สารยับยั้งอะไมเลส (Amylase Inhibitor, AI) ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต เป็นสารประเภทไกลโคโปรตีน ซึ่งพบกระจายอยู่ทั่วไปในพืช เช่น ข้าว, ข้าวไร และพืชตระกูลถั่ว สารยับยั้งอะไมเลสเหล่านี้สามารถจับกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากต่อมน้ำลายและตับอ่อนของคนและสัตว์ ทำให้มีการย่อยแบ่งลดลง จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งอะไมเลส ตรวจสอบหาระดับของสารยับยั้งอะไมเลส ทำบริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสที่สกัดและทำบริสุทธิ์แล้วจากเมล็ดเนียงนก (*Archidendron clypearia*)

ผลการศึกษาพบว่า วิธีของ Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) เป็นวิธีที่ดีในการสกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก วิธีนี้ใช้สารยับยั้งโปรตีน (PMSF) และไม่ใช้ความร้อนในการสกัด มีค่าเฉลี่ยปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสที่การยับยั้งร้อยละ 50 ของเมล็ดเนียงนกเก็บในปี 2541 และ 2544 ใกล้เคียงกันคือ  $0.26 \pm 0.01$  และ  $0.27 \pm 0.01$  หน่วยกิจกรรมการยับยั้ง/มก.ตัวอย่าง ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) การศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลส ขณะเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$  นาน 3 เดือนพบว่า กิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลสในรูปของสารสกัด ลดลงเร็วกว่าเมื่อเก็บในรูปเมล็ดแล้วทำการสกัดในวันที่จะวิเคราะห์ จึงควรเก็บสารยับยั้งอะไมเลสในรูปเมล็ด สารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนกสามารถทำบริสุทธิ์ได้โดย ทำการตกตะกอนด้วยสารละลายอิมมัลชันร้อยละ 80 ของแอมโมเนียมซัลเฟต มีความบริสุทธิ์ 1.53 เท่า ผ่านคอลัมน์ CM-cellulose มีความบริสุทธิ์ 4.10 เท่า ผ่าน Sephadex G-75 มีความบริสุทธิ์ 41.04 เท่า และผ่านคอลัมน์ Hydroxyapatite มีความบริสุทธิ์ 101.69 เท่า ของสารสกัดหยาบเริ่ม

ต้น แยกสารยับยั้งอะไมเลสได้บริสุทธิ์คิดเป็น 18.05% สารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์มีขนาดมวลโมเลกุล 68,400 ดาลตัน (จาก SDS-PAGE) และ 70,800 ดาลตัน (จาก Native-PAGE) และเมื่อตรวจสอบด้วยเจลฟิเดรชัน Sephadex G-75 มีขนาดมวลโมเลกุล 70,000 ดาลตัน การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีพบว่าในช่วงระยะเวลา 7 วัน สารยับยั้งอะไมเลสมีความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ดีกว่าเมื่อเก็บที่  $4^{\circ}\text{C}$  และ  $37^{\circ}\text{C}$  สารยับยั้งอะไมเลสมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด ที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  pH 7.0 มีการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) เนื่องจากมีค่า  $K_m$  เท่าเดิม และค่า  $V_{max}$  ลดลง สารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์และสารสกัดเนียงนก ไม่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์เพราะไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน, กระจ่าง, หนู รวมทั้งไม่เกาะกลุ่มอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์และไม่เจริญพันธุ์ การทดสอบสารยับยั้งอะไมเลส ในการยับยั้งอะไมเลสของแมลงทำลายธัญพืช 2 ชนิดคือ มอดแป้งสาธิตและด้วงถั่วเขียว พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่บริสุทธิ์สามารถยับยั้งสารสกัดอะไมเลสของมอดแป้งสาธิตได้ 100% แต่ไม่ยับยั้งสารสกัดอะไมเลสของด้วงถั่วเขียว ในขณะที่สารสกัดเมล็ดเนียงนกมีค่าการยับยั้ง 99.69% และ 27.06% ตามลำดับ



Purification of AI from the seed was successful by using partial purification with 80% ammonium sulphate (1.53 purification fold, PF), CM-cellulose column chromatography with 4.10 PF, Sephadex G-75 column chromatography with 41.04 PF, and Hydroxyapatite column chromatography with 101.69 PF yield at 18.05%. The purified AI was found to exist in 1 form of protein band with molecular weight of 68,400 daltons by SDS-PAGE, and 1 form of protein band with molecular weight of 70,800 daltons by Native-PAGE, and its molecular weight by gel filtration Sephadex G-75 chromatography was 70,000 daltons. A study on biochemical properties of the purified AI found that keeping condition at  $-20^{\circ}\text{C}$  could better preserve inhibitory activity than at 4 and  $37^{\circ}\text{C}$  for 7 days. The optimum temperature for inhibitory activity of AI was at  $40^{\circ}\text{C}$  and the optimum pH of AI was at 7.0. Kinetic study revealed the kind of AI inhibition was non-competitive 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 AI, AI thus had no lectin property. The purified AI showed 100% inhibition of amylase activity extracting from wheat flour beetle, but did not show any inhibition (0%) of amylase activity extracting from green bean weevil while the crude extract showed 99.69% and 27.06% inhibition, accordingly.