ชื่อวิทยานิพนธ์ สมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก

ผู้เขียน นางสาวจุฬา วิริยะบุบผา

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

สารยับยั้งอะไมเลส (Amylase Inhibitor, AI) ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ย่อย
คาร์โบไฮเดรท เป็นสารประเภทไกลโคโปรตีน ซึ่งพบกระจายอยู่ทั่วไปในพืช เช่น ข้าว,
ข้าวไร และพืชตระกูลถั่ว สารยับยั้งอะไมเลสเหล่านี้สามารถจับกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากต่อมน้ำลายและตับอ่อนของคนและสัตว์ ทำให้มีการย่อยแป้งลดลง
จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งอะไมเลส ตรวจ
หาระดับของสารยับยั้งอะไมเลส ทำบริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้ง
อะไมเลสที่สกัดและทำบริสุทธิ์แล้วจากเมล็ดเนียงนก (Archidendron clypearia)

ผลการศึกษาพบว่า วิธีของ Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) เป็นวิธี ที่ดีในการสกัดสารยับยั้งอะไมเลสจากเมล็ดเนียงนก วิธีนี้ใช้สารยับยั้งโปรตีน (PMSF) และไม่ใช้ความร้อนในการสกัด มีค่าเฉลี่ยปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสที่การยับยั้งร้อยละ 50 ของเมล็ดเนียงนกเก็บในปี 2541 และ 2544 ใกล้เคียงกันคือ 0.26 ± 0.01 และ 0.27 ± 0.01 หน่วยกิจกรรมการยับยั้ง/มก.ตัวอย่าง ตามลำดับ (P< 0.05) การศึกษาความ คงตัวของสารยับยั้งอะไมเลส ขณะเก็บที่ -20 ° ขนาน 3 เดือนพบว่า กิจกรรมการยับยั้ง ของสารยับยั้งอะไมเลส ขณะเก็บที่ -20 ° ขนาน 3 เดือนพบว่า กิจกรรมการยับยั้ง ของสารยับยั้งอะไมเลสในรูปของสารสกัด ลดลงเร็วกว่าเมื่อเก็บในรูปเมล็ดแล้วทำการ สกัดในวันที่จะวิเคราะห์ จึงควรเก็บสารยับยั้งอะไมเลสในรูปเมล็ด สารยับยั้งอะไมเลส จากเมล็ดเนียงนกสามารถทำบริสุทธิ์ได้โดย ทำการตกตะกอนด้วยสารละลายอิ่มตัว ร้อยละ 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

ด้น แยกสารยับยั้งอะไมเลสได้บริสุทธิ์คิดเป็น 18.05% สารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์มี ขนาดมวลโมเลกุล 68,400 ดาลตัน (จาก SDS-PAGE) และ 70,800 ดาลตัน (จาก Native-PAGE) และเมื่อตรวจสอบด้วยเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-75 มีขนาดมวล โมเลกุล 70,000 ดาลตัน การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีพบว่าในช่วงระยะเวลา 7 วัน สารยับยั้งอะไมเลสมีความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่ -20 °ซ ดีกว่าเมื่อเก็บที่ 4 และ 37 °ซ สารยับยั้งอะไมเลสมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด ที่อุณหภูมิ 40 °ซ pH 7.0 มีการยับยั้ง แบบไม่แข่งขัน (non-competitive) เนื่องจากมีค่า K_m เท่าเดิม และค่า V_{max} ลดลง สารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์และสารสกัดเนียงนก ไม่มีคุณสมบัติเป็นเลคตินเพราะไม่ทำ ให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน, กระต่าย, หนู รวมทั้งไม่เกาะกลุ่มอสุจิหนูที่ เจริญพันธุ์และไม่เจริญพันธุ์ การทดสอบสารยับยั้งอะไมเลส ในการยับยั้งอะไมเลสของ แมลงทำลายธัญพืช 2 ชนิดคือ มอดแป้งสาลีและด้วงถั่วเขียว พบว่าสารยับยั้งอะไมเลส ที่บริสุทธิ์สามารถยับยั้งสารสกัดอะไมเลสของมอดแป้งสาลีได้ 100% แต่ไม่ยับยั้งสาร สกัดอะไมเลสของด้วงถั่วเขียว ในขณะที่สารสกัดเมล็ดเนียงนกมีค่าการยับยั้ง 99.69% และ 27.06% ตามลำดับ

Thesis Title Biochemical Properties of Amylase Inhibitor from Seeds of

Archidendron clypearia

Author Miss Chula Viriyabubpa

Major Program Biochemistry

Academic Year 2002

Abstract

Amylase inhibitor (AI), carbohydrate digestive enzyme inhibitor is a glycoprotein found in plant especially wheat, rye and legumes. This AI can form complex with carbohydrate digestive enzyme α -amylase, produced from salivary gland and pancreas of human and animals. This complex causes a decrease in starch digestion and results in lowering blood glucose level. This study aim to find a suitable method in extracting AI, determine level of AI, purify and characterize for its biochemical properties from seeds of Nieng Nok (*Archidendron clypearia*).

The study found that Pueyo and Delgado-Salinas 1997 was the best method in extracting AI from the seed. It provided the highest inhibitory activity to amylase (represented high level of AI). This method used PMSF, protease inhibitor and did not use heat in the process. An average level of AI in two lot of seed samples (sampling in year 1998 and 2000) at 50% inhibition of amylase activity were 0.26 ± 0.01 and 0.27 ± 0.01 units of inhibitory activity/milligram sample accordingly (P< 0.05). In stability study under keeping condition at -20° C for 3 months, AI in the form of extract showed gradually decreasing of inhibitory activity faster than kept as seed and extracted on the day of analysis. Keeping as seed thus was recommended.

Purification of AI from the seed was sucessful 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 Al found that keeping condition at -20°C could better preserve inhibitory activity than at 4 and 37 °C for 7 days. The optimum temperature for inhibitory activity of AI was at 40 °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 $K_{\scriptscriptstyle m}$ 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 Al 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.