Thesis Title : Determination and Biochemical Study of Amylase Inhibitor from Local Plant Tubers.

Author : Miss Somchit Jiaviriyaboonya

M.S. : Biochemistry

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr. Viboon Rattanapanone ,Chairman

Prof. Dr. Boriboon Phornphibul ,Member

Assist. Prof. Dr. Vichai Wongchai ,Member

Assist. Prof. Dr. Sirirat Sarawek ,Member

ABSTRACT

The amylase activities in 18 kinds of local plant tubers were determined by colourimetric method. The highest level was found in taro; 14,287.65 U/g dry weight for human saliva and 1,040.17 U/g dry weight for hog pancreas. The inhibitory activities in cassava, galangal and turmeric were found slightly, 13.52-56.20 U/g dry weight for both amylases.

Amylase inhibitors from taro and wheat flour were purified by using alcohol precipitation(50-90%), ion exchange and affinity chromatography on DE-52 and amylase-Sepharose 4B columns, respectively. Molecular weights of wheat AI were 60,000 and 25,500 daltons and molecular weight of taro AI was less than 10,000 by gel filtration method. From SDS-PAGE, wheat AI was found to be subunits with molecular weights 14,200 and 14,800 daltons whereas taro was found to be a single protein

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

band with molecular weight about 13,000 daltons. Both wheat AI and taro AI were heterogeneous proteins when using naitve-PAGE and staining for their inhibitory activities by amylase-starch-iodine method.

The same properties of taro AI and wheat AI were demonstrated as glycoprotein substance, heat stable(70°C,1 Hr),acid stable(1 M HCl), alkaline sensitive (25 mM NaOH), specificity on human salivary and hog pancreatic amylases but no effect on amylases from bacteria and fungus, and their abilities to inhibit α-amylase in albino rats under starch loading test. Moreover, the inhibition of wheat AI and taro AI on salivary amylase were non-competitive type with Ki values of 9.52×10^{-5} M and 4.39×10^{-4} M, respectively. An optimum condition of wheat AI was in pH range 5-7 at 37°C while taro AI was in pH range 6-9 at 37°C, too. Wheat AI was sensitive to pepsin but resist to trypsin whereas taro AI was resist to both proteolytic enzymes. From the chemical treatment, CNBr could reduce their inhibitory activities in similar pattern but EDTA could not. 2-Mercaptoethanol caused completely loss of wheat AI activity while SDS could reduce 22.22%. For taro AI, SDS and 2-mercaptoethanol could reduce 9.96% and 38.50%, respectively. The combination of both chemicals caused about 50% loss of its inhibitory activity. These results demonstrated that taro AI was higher tolerate to proteotytic enzymes and some chemicals than wheat AI.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจวัดและการศึกษาเชิงชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสจากพืชหัวในท้องถิ่น

ชื่อผู้เขียน น.ส. สมจิต เจียวิริยบุญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ.ดร.วิบูลย์ รัตนาปนนท์ ประธานกรรมการ
ศจ.นพ.บริบูรณ์ พรพิบูลย์ กรรมการ
ผศ.ดร.วิชัย วงค์ไชย กรรมการ
ผศ.ดร.ศิริรัตน์ สาระเวก กรรมการ

บทคัดย่อ

การตรวจวัดปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสโดยวิธี colourimetric ในพืชหัวท้องถิ่น 18 ชนิด พบว่าเผือกมีระดับสารยับยั้งอะไมเลสสูงสุดคือ 14,287.65 หน่วย/น้ำหนักแห้ง 1 กรัมเมื่อใช้อะไมเลสจากน้ำลายคน และ 1,040.17 หน่วย/น้ำหนักแห้ง 1 กรัมเมื่อใช้อะไมเลสจากตับอ่อนหมู นอกจากนี้ยังพบสารยับยั้งอะไมเลสได้ในมันสำปะหลัง ข่า และขมิ้น แต่มีปริมาณเล็กน้อย คือ 13.52-56.20 หน่วย/น้ำหนักแห้ง 1 กรัมเมื่อใช้อะไมเลสจากน้ำลายคนหรือตับอ่อนหมู

ได้ทำการเตรียมสารยับยั้งอะไมเลสจากเผือกและแป้งสาลีให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (50-90%) ion exchange chromatography (DE-52 column)และ affinity chromatography (amylase-Sepharose 4B column) พบว่า สารยับยั้งอะไมเลสจากแป้งสาลีเป็นโปรตีนที่อยู่เป็นกลุ่มมีน้ำหนักโมเลกุล 60,000 และ 25,500 ดาลตัน ส่วนเผือกเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตันทั้งนี้หาโดยวิธี gel filtration จากการทำ SDS-PAGE พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากแป้งสาลีประกอบด้วย หน่วยย่อยที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 14,200 และ 14,800 ดาลตัน ส่วนเผือกเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 13,000 ดาลตัน เมื่อทำการศึกษา native-PAGE พบว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากแป้งสาลีและเผือกเป็นโปรตีนหลายชนิดรวมกัน (heterogeneous proteins) ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดที่แยกได้ แสดงคุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งอะไมเลส โดยให้ผลบวกเมื่อย้อมโดยวิธี amylase-starch-iodine

คุณสมบัติของสารยับยั้งอะไมเลสจากแป้งสาลีและเผือก มีความเหมือนกันหลายอย่าง ได้แก่ การเป็นสารกลัยโคโปรตีน การทนต่อความร้อน (70 °C, 1 ชั่วโมง) การทนกรด (1 M HCl) การไม่ทนต่อด่าง (25 mM NaOH) การเลือกที่จะยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลายคนและจากตับอ่อนหมู แต่ไม่ยับยั้งอะไมเลสจากแบคทีเรียและเชื้อรา และรวมถึงการยับยั้งการทำงานของอะไมเลสในหนูขาวใหญ่ภายใต้ starch loading test การยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลสจากแป้งสาลีและเผือกต่ออะไมเลสจากน้ำลายคนเป็นแบบ non-competitive และมีค่า Ki เป็น 9.52×10^{-5} M และ 4.39×10^{-4} M ตามลำดับ ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารยับยั้งอะไมเลสจากแป้งสาลีต้องการ pH 5-7 ที่ 37 °C ส่วนของเผือกต้องการ pH 6-9 ที่อุณหภูมิเดียวกัน สารยับยั้งจากแป้งสาลีไม่ทนต่อเปปซินแต่ทนต่อทริพซินในขณะที่สารยับยั้งจากเผือกทนต่อเอนซัยม์ทั้งสอง ในการศึกษาอิทธิพลของสารเคมี พบว่า CNBr สามารถลดการทำงานของสารยับยั้งอะไมเลสจากทั้งสองแหล่งในลักษณะเดียวกัน แต่ EDTA ไม่มีผลดังกล่าว SDS สามารถลดการทำงานของสารยับยั้งจากแป้งสาลีได้ 22.22% ส่วน 2-mercaptoethanol สามารถหยุดการทำงานของสารยับยั้งดังกล่าว สำหรับสารยับยั้งอะไมเลสจากเผือกนั้น SDS และ 2-mercaptoethanol สามารถลดการทำงานลงได้ 9.96% และ 38.47% ตามลำดับ เมื่อใช้สารเคมีทั้งสองชนิดร่วมกันจะสามารถลดการทำงานลงได้มากขึ้นเป็น 50.27 % จากข้อมูลเหล่านี้ แสดงว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากเผือกทนต่อเอนซัยม์และสารเคมีบางอย่างได้มากกว่าสารยับยั้งอะไมเลสจากแป้งสาลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved