บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การ purify α-Amylase จากน้ำลาย

Gel filtration (Sephadex G-50)

จากการนำ 5.0 มล. ของน้ำลายที่ผ่านการกรองด้วย glass wool แล้วไป apply บน sephadex G-50 column และ elute ด้วยน้ำกลั่น fraction ที่เก็บได้ไม่มีสีและเมื่อนำไปวัดปริมาณโปรตีนปรากฏว่าได้ 2 peak (รูปที่ 3.2)

การทดสอบ α-Amylase activity

เมื่อนำ fraction ต่าง ๆ ไปทดสอบ activity กับสารละลายแป้งในบัฟเฟอร์ปรากฏว่า peak แรกสามารถย่อยแป้งได้ดี โดยเฉพาะ fraction ที่ 5-9 ส่วน peak หลังไม่สามารถย่อยแป้งได้ (รูปที่ 3.2)

ดังนั้น peak แรกจึงเป็นส่วนของ α-Amylase ที่แยกออกมาจากส่วนผสมของโปรตีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำลาย จึงเก็บส่วนดังกล่าวไว้ใช้ในการทดลอง

ส่วนอีก column ที่ได้ทำด้วยก็ให้ผลเช่นเดียวกันคือ peak แรกเท่านั้นที่สามารถย่อยสารละลายแป้งได้

การหาปริมาณโปรตีนใน α-Amylase โดย Lowry method

จากการนำ α-Amylase ที่เก็บจาก active peak (No.5-9) มาทำให้เจือจาง 20 เท่า แล้วไปหาปริมาณโปรตีนโดยที่เทียบกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

standard curve ของสารละลาย BSA ปรากฏว่า α-Amylase มีความเข้มข้น 0.12 มก./มล.

∴ ความเข้มข้นของ α-Amylase ที่สกัดได้ = 20x0.12 มก./มล.

= 2.4 มก./มล.

3.2 การ purify α-Amylase inhibitor จากหัวเมือก

3.2.1 การสกัดด้วยน้ำ (aqueous extract)

การหาปริมาณโปรตีน

จากการนำ aqueous extract ที่ทำให้เจือจางด้วยน้ำ 15 เท่า ไปหาปริมาณโปรตีนปรากฏว่ามีความเข้มข้น = 0.235 มก./มล.

ฉะนั้น ความเข้มข้นของ aqueous extract = 15x0.235 มก./มล.

= 3.53 มก./มล.

3.2.2 แยกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate fractionation)

การหาปริมาณโปรตีน

จากการนำสารละลายของโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ไปทำให้เจือจางด้วยน้ำ 50 เท่า ได้ความเข้มข้น = 0.255 มก./มล.

ฉะนั้น ความเข้มข้นของสารละลาย = 50x0.255 มก./มล.

= 12.75 มก./มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 Dialysate's supernatant

หลังจากนำ aqueous solution of $(NH_4)_2SO_4$ precipitate (100 มล.) ไป dialyse แล้วจึงนำ dialysate's supernatant (118 มล.) ไปทดสอบได้ผลดังนี้

การหาปริมาณโปรตีน

เมื่อเจือจางด้วยน้ำ 30 เท่า แล้วนำไปหาปริมาณโปรตีน ได้ความเข้มข้น 0.27 มก./มล.

ฉะนั้นความเข้มข้นของ dialysate's supernatant = 30x0.27 มก./มล.

= 8.1 มก./มล.

3.2.4 Heat treatment

นำ dialysate's supernatant (110 มล.) มาต้มที่ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังจาก centrifuge เพื่อทำลาย trace ของ endogenous amylolytic activity จะได้ supernatant 94 มล. ผลการทดสอบคือ

การหาปริมาณโปรตีน

สารละลายที่เจือจางด้วยน้ำแล้ว 20 เท่า ไปหาปริมาณโปรตีน ได้ความเข้มข้น 0.28 มก./มล.

ฉะนั้นความเข้มข้นของ supernatant หลังจาก heat treatment

= 20x0.28 = 5.6 มก./มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2.5 Chromatography on DEAE-Cellulose

จากการ apply สารละลาย Supernatant หลังจาก heat treatment ลงไปใน DEAE-cellulose column แล้ว elute ด้วย 0.0075 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 ซึ่งเป็น starting buffer แล้วเพิ่มความเข้มข้นของ eluant เป็น 0.05, 0.5 และ 0.1 M ตามลำดับนั้น หลังจากนำ fraction ต่าง ๆ ที่เก็บได้ไปวัดปริมาณโปรตีนที่ A_{280} ปรากฏว่าโปรตีนออกมาจาก column มากเริ่มตั้งแต่ fraction ที่ 50 (รูปที่ 3.4)

และจากการ run DEAE-Cellulose เปรียบเทียบคือ dialysate's supernatant ที่ไม่ได้ heat treatment มาก่อน ปรากฏว่าโปรตีนจะออกมามากเริ่มตั้งแต่ fraction ที่ 45 (รูปที่ 3.5)

ผู้ทดลองนำเฉพาะ fraction ที่ได้จากการ heat treatment ก่อนเท่านั้นไปศึกษา

การทดสอบการยับยั้ง

เมื่อนำ fraction ต่าง ๆ ที่ได้จาก DEAE-Cellulose column ไปทดสอบการยับยั้งของ α-Amylase ปรากฏว่าการยับยั้งเกิดขึ้นได้ดีที่ fraction 65-80 ได้เก็บactive fraction (130 มล.) ส่วนนี้ไว้ทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การหาปริมาณโปรตีน

จากการชั่งสารละลายของ active fraction ซึ่งนำไป lyophilize (freeze dry) แล้วปรากฏว่าได้สารหนัก 2.32 กรัม

3.2.6 Chromatography on Sephadex G-100

ได้นำโปรตีนที่ freeze dry แล้วมาครึ่งหนึ่ง (1.16 กรัม) ละลายใน 10 มล. ของ 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 แล้วไป apply ใน Sephadex G-100 column นั้น fraction ที่เก็บได้ไม่มีสี ปรากฏว่ามี 2 peak (รูปที่ 3.6) หลังจากนำ fraction ไปวัดปริมาณโปรตีนที่ A_{280}

การทดสอบการยับยั้ง α-Amylase

Fraction ต่าง ๆ ที่ได้จาก Sephadex G-100 column และได้นำไปทดสอบการยับยั้งต่อ α-Amylase ปรากฏว่ายับยั้งได้ดีตรง peak ที่ 2 ระหว่าง fraction 15-21 Active fraction ส่วนนี้เป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) ที่ต้องการ

การหาปริมาณโปรตีน

หลังจากนำตัวยับยั้งไป dialyse แล้วมาหาปริมาณโปรตีน ได้ความเข้มข้น 0.155 มก./มล.

การศึกษา spectrum

วัด spectrum ของตัวยับยั้งได้ A_{280} = 0.145 (รูปที่ 3.7)

ผลของการ purify α-Amylase inhibitor ได้สรุปไว้ในตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 แสดงการ purify ตัวยับยั้ง α-Amylase จากหัวเผือก

Fraction	Volume (ml)	Total activity (unit)*	Total protein (mg)	specific activity (unit/mg)	Recovery (% yield)	purification
-Aqueous extract	790	589	2780	0.21	100	1
-Aqueous solution of $(NH_4)_2SO_4$ ppt.	100	309	1275	0.24	52.5	1.14
-Dialysate's supernatant	118	249	956	0.26	42.3	1.24
-Heat treatment	94	219	526	0.42	37.2	2.0
-DEAE-Cellulose Chromatography	130	316	151	2.09	53.7	9.95
-Sephadex G-100 Chromatogrphy	64	162	10	16.20	27.5	77.14

*1 Unit ของ inhibitor หมายถึง จำนวนของ inhibitor ที่ทำให้เกิด 50 % inhibition ใน 10 นาที ภายใต้ condition ที่อธิบายในการทดลอง (4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Copyright© by Chiang Mai University All rights reserved

3.3 การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของตัวยับยั้งที่สกัดได้

3.3.1 ผลของเวลา preincubation ต่อการทำงานของตัวยับยั้ง

การยับยั้งเกิดขึ้นได้ดีขึ้น เมื่อเวลาในการ preincubation ยิ่งนานขึ้น และที่อุณหภูมิ 37°ซ มีการยับยั้งได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25°ซ (รูปที่ 3.8)

3.3.2 ผลของ pH

การยับยั้งเกิดขึ้นได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 ซึ่งใกล้เคียงกับ optimum pH ของ α-Amylase (รูปที่ 3.9)

3.3.3 การทนต่อความร้อน (Temperature stability) ของตัวยับยั้ง

ตัวยับยั้งเป็นสาร Thermostable คือเป็นสารค่อนข้างจะทนต่อความร้อน เพราะแม้แต่ต้มที่อุณหภูมิสูงถึง 90°ซ เมื่อทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องแล้วไปทดสอบการยับยั้ง α-Amylase activity ปรากฏว่ายับยั้งได้น้อยลงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

3.3.4 ผลของ metal ions และ Chelating compound ต่อการยับยั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

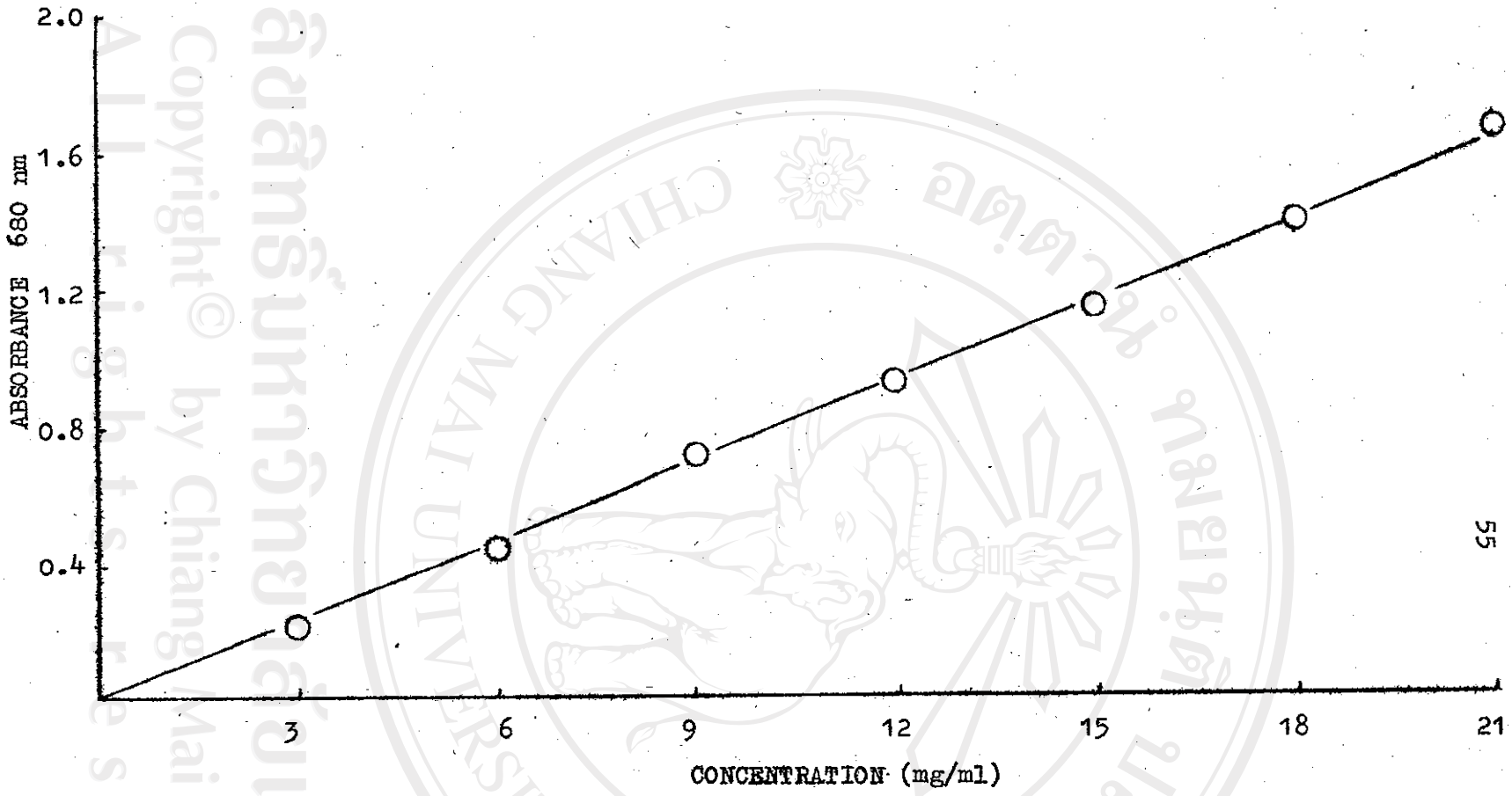
ตารางที่ 2 แสดงผลของ metal ions และ Chelating compound ต่อการยับยั้ง

Addition	Concentration (mM)	Release of inhibition (%)
$CaCl_2$	2.7	7
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	2.7	4
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.7	4
$MgSO_4$	2.7	2
$ZnCl_2$	2.7	12
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.7	11
EDTA	2.7	0
1,10-phenanthrolin	2.7	0
β-Mercaptoethanol	2.7	0

3.4 ผลการทดลองความบริสุทธิ์ของตัวยับยั้งโดย Disc polyacrylamide gel electrophoresis

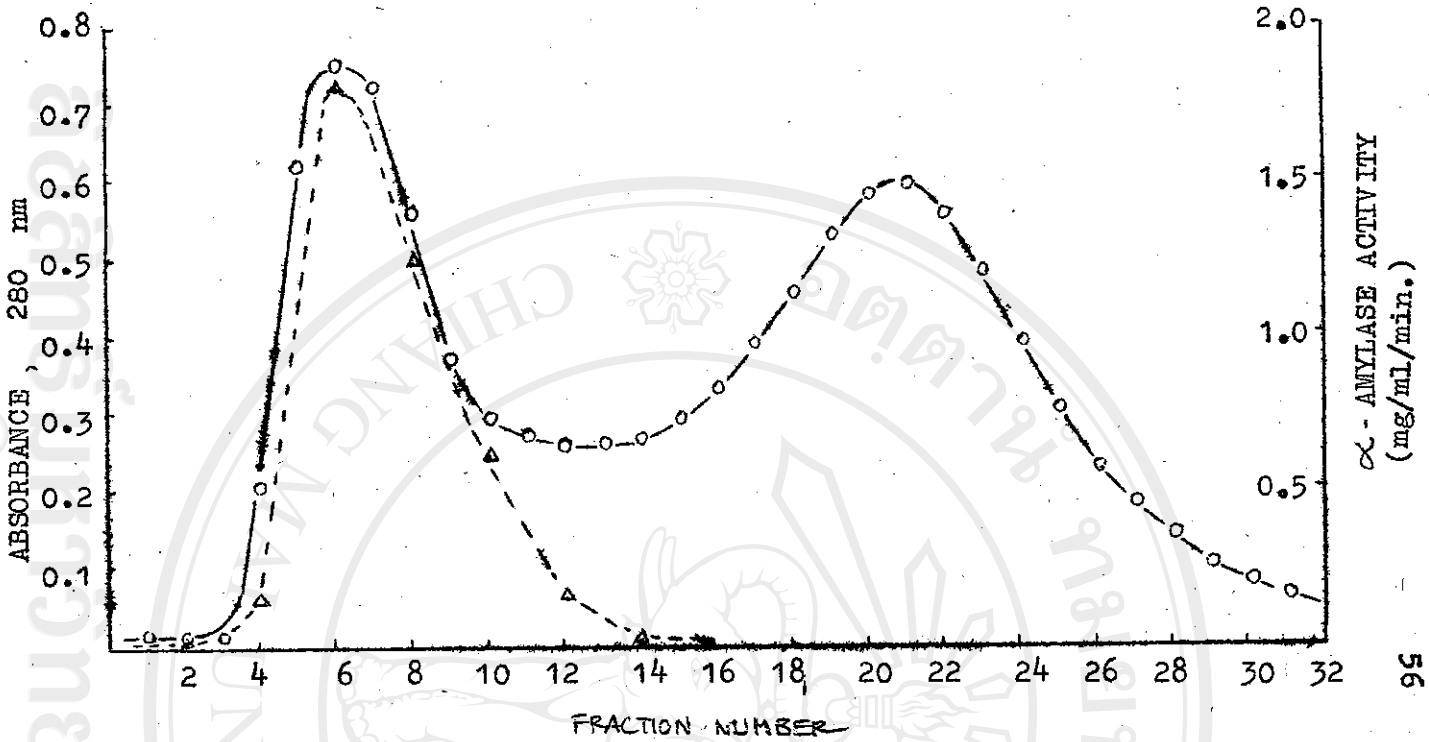
หลังจากนำเจลไป destain แล้วไม่ปรากฏเห็นแถบ (band) บนเจล เห็นแต่เฉพาะของ BSA เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.1 แสดง standard curve ของสารละลายแป้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 3 นาที ใน phosphate buffer, pH 6.9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

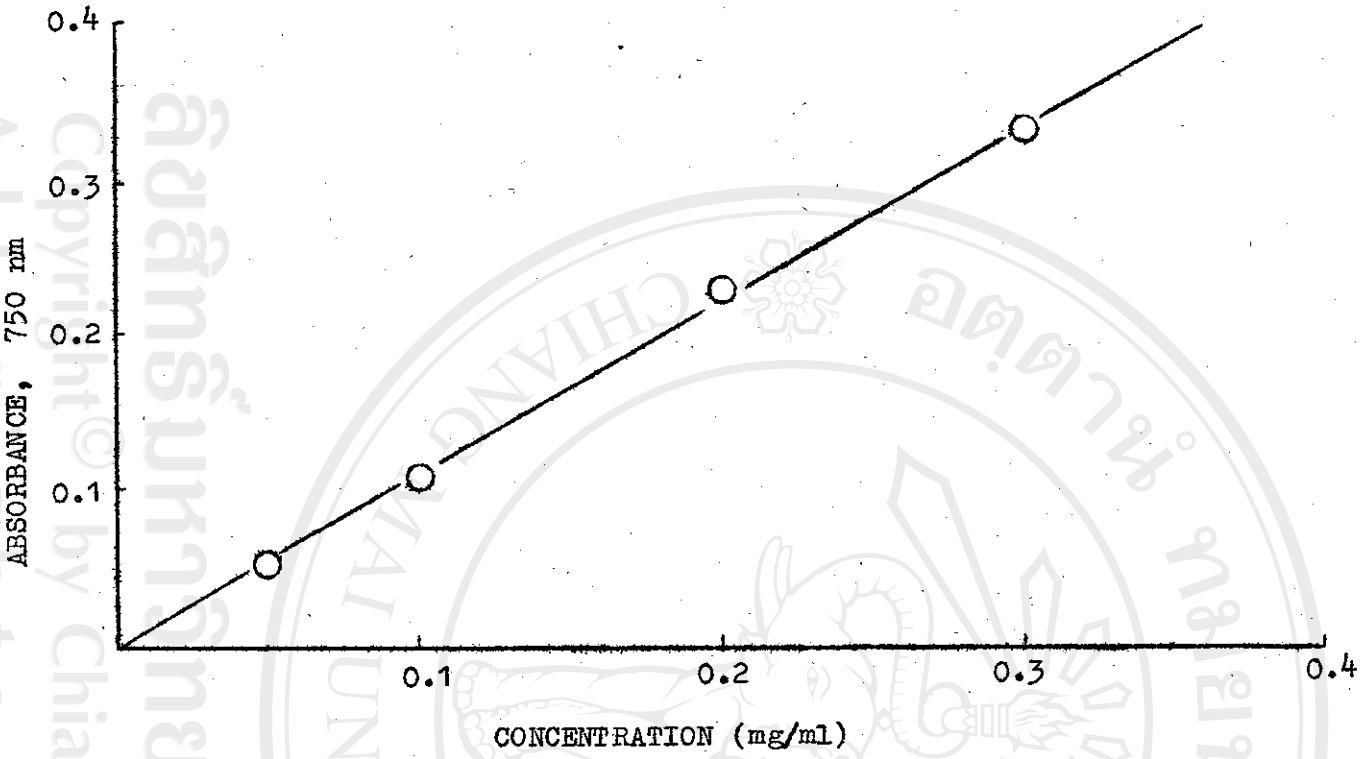


รูปที่ 3.2 แสดงการ purify ∝ - Amylase จากน้ำลายด้วย Sephadex G-50 column (2.5x20 ซม.), flow rate 145 มล./ชั่วโมง, elute ด้วยน้ำกลั่น

o—o, A_{280}, Protein content

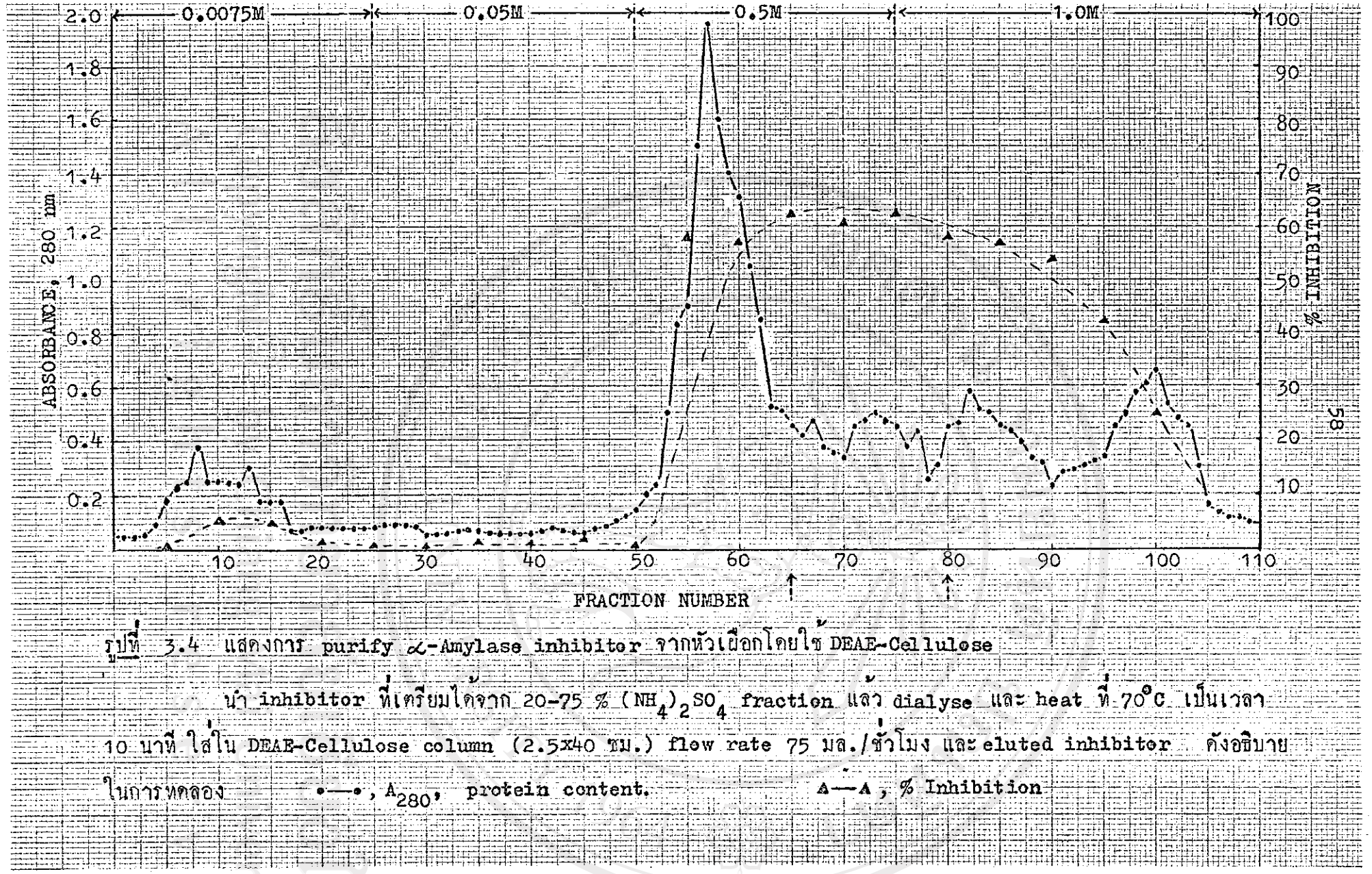
Δ—Δ, ∝-Amylase activity

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



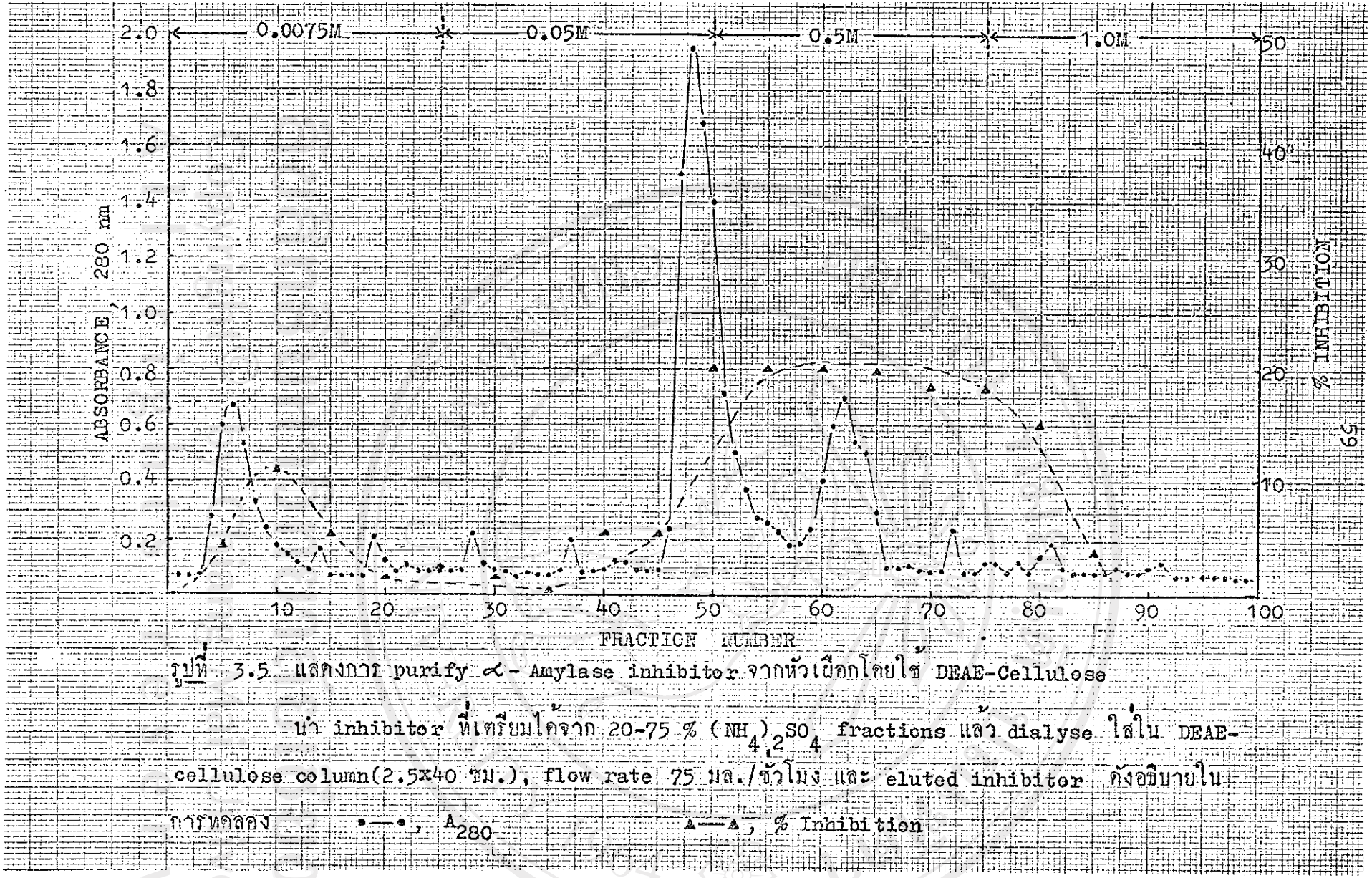
รูปที่ 3.3 แสดง standard curve ของสารละลาย Bovine serume albumin (BSA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

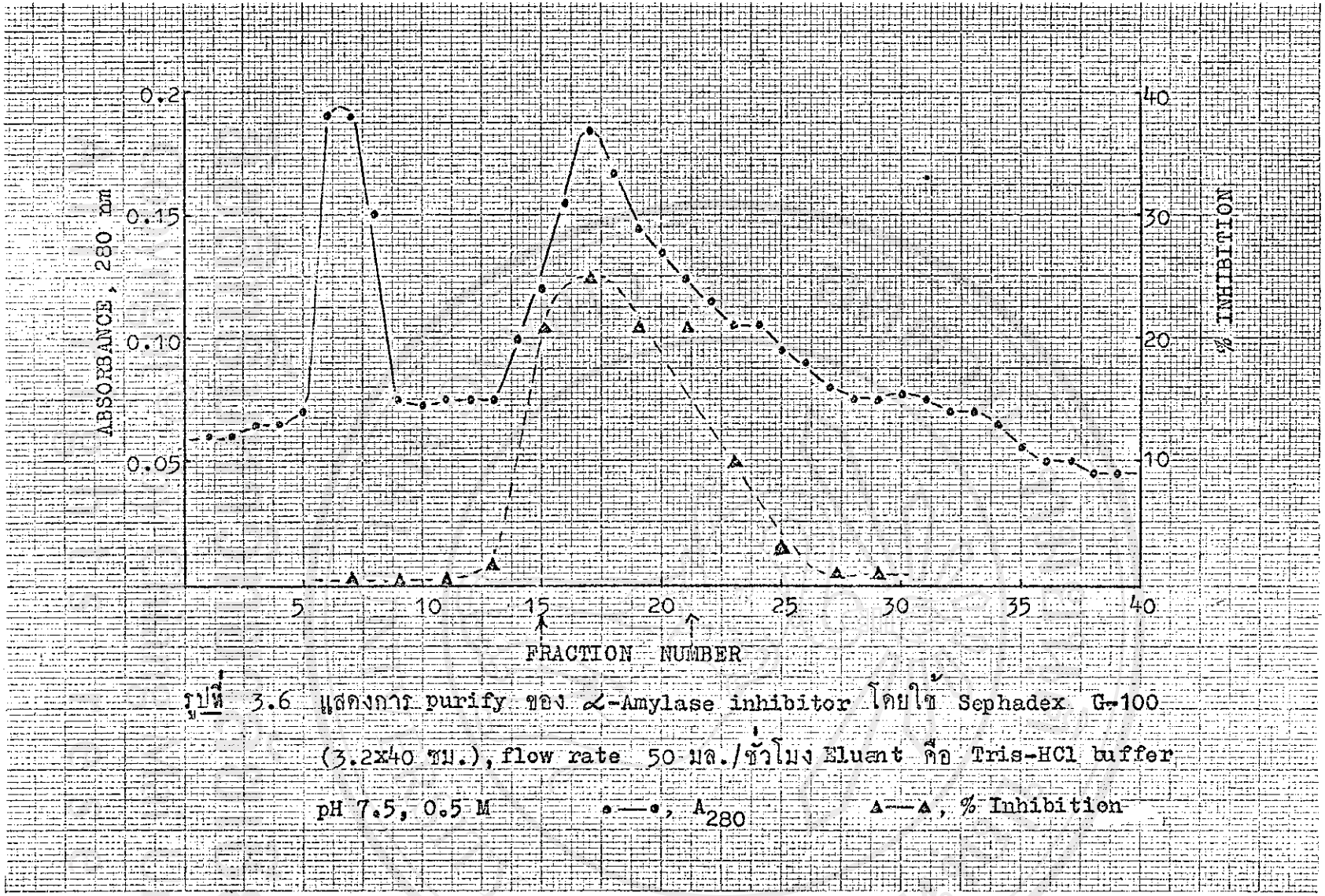


รูปที่ 3.4 แสดงการ purify α-Amylase inhibitor จากหัวเผือกโดยใช้ DEAE-Cellulose

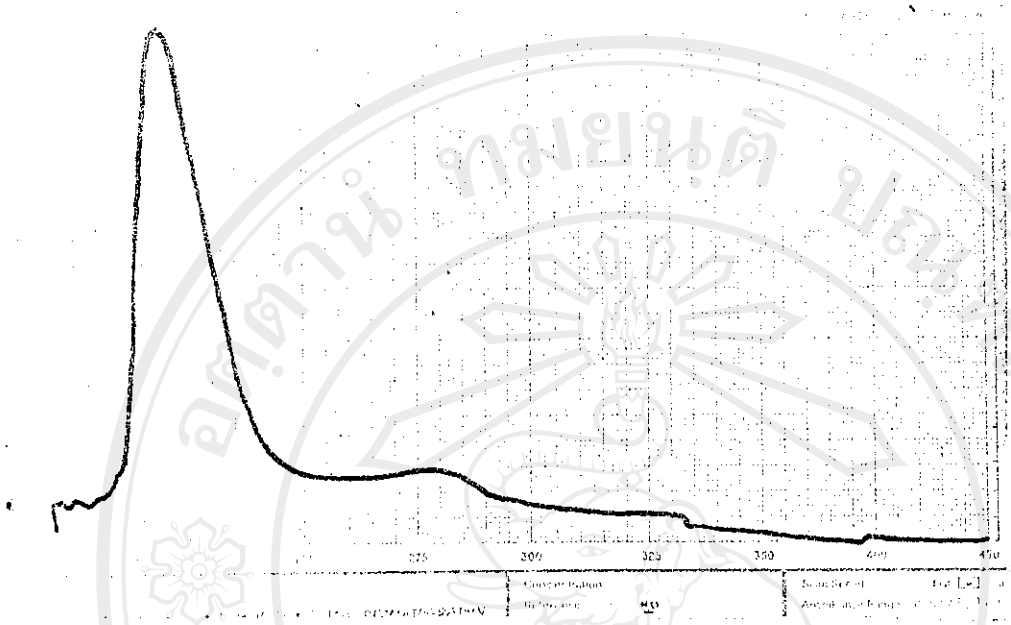
นำ inhibitor ที่เตรียมได้จาก 20-75 % $(NH_4)_2SO_4$ fraction แล้ว dialyse และ heat ที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาที ใส่ใน DEAE-Cellulose column (2.5x40 ซม.) flow rate 75 มล./ชั่วโมง และ eluted inhibitor ดังอธิบายในการทดลอง •—•, A_{280}, protein content. ▲—▲, % Inhibition



รูปที่ 3.5 แสดงการ purify α- Amylase inhibitor จากหัวเมล็ดโดยใช้ DEAE-Cellulose น่า inhibitor ที่เตรียมได้จาก 20-75 % $(NH_4)_2SO_4$ fractions แล้ว dialyse ใส่ใน DEAE-cellulose column(2.5x40 ซม.), flow rate 75 มล./ชั่วโมง และ eluted inhibitor ดังอธิบายในการทดลอง •—•, A_{280} ▲—▲, % Inhibition

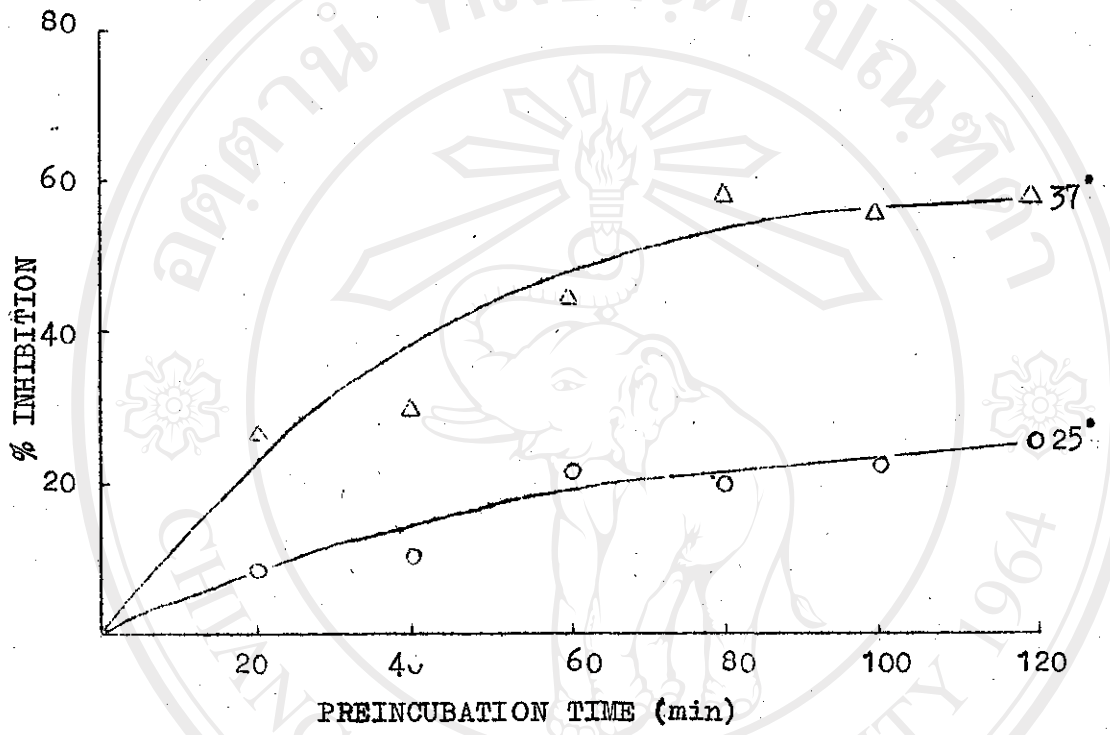


รูปที่ 3.6 แสดงการ purify ของ α-Amylase inhibitor โดยใช้ Sephadex G-100 (3.2x40 ซม.), flow rate 50 มล./ชั่วโมง Eluant คือ Tris-HCl buffer pH 7.5, 0.5 M ●—●, A_{280} ▲—▲, % Inhibition



รูปที่ 3.7 แสดง UV spectrum ของ active fraction (No.15-21) จาก Sephadex G-100 column chromatography ของหัวเผือก

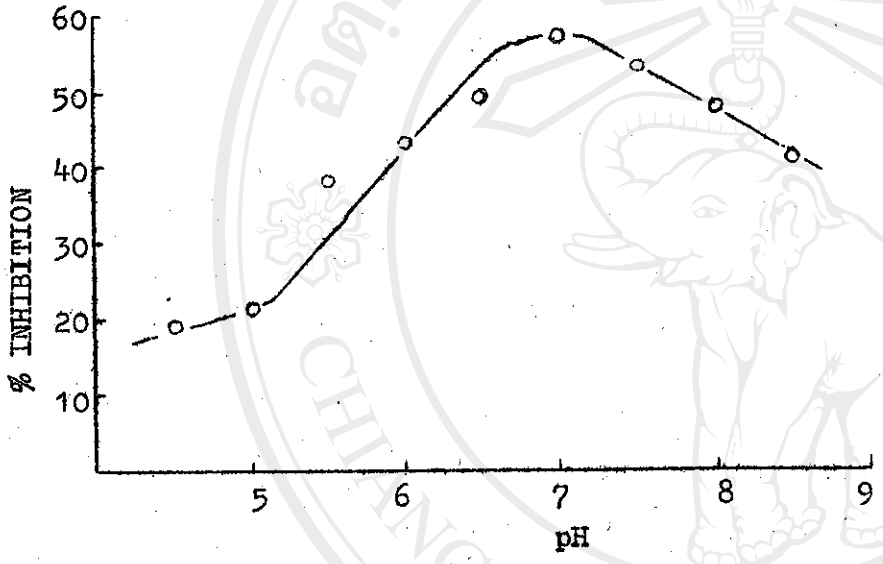
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.8 แสดงผลของอุณหภูมิและเวลาของการ incubate ต่อการทำงานของ α-Amylase inhibitor

Incubate α-Amylase กับ inhibitor ที่อุณหภูมิ 25°ซ (o—o) หรือ 37°ซ (△—△) ที่เวลาต่าง ๆ กัน แล้ววัด activity ที่เหลือของ α-Amylase

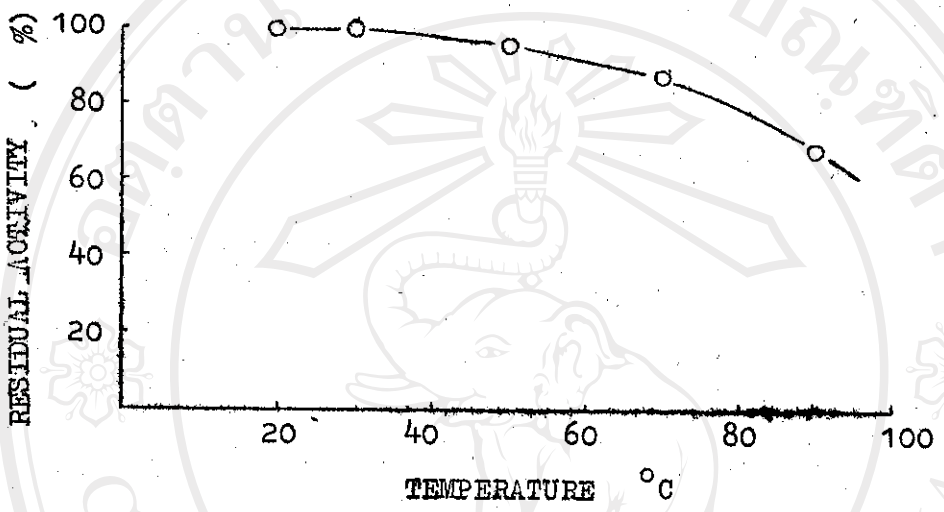
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.9 แสดงผลของ pH ต่อการทำงานของ ∝-Amylase inhibitor

Incubate ∝-Amylase กับ inhibitor โดยอัตราส่วน 1:2 (V/V) ที่ pH ต่าง ๆ กันที่ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาที วัด activity ที่เหลือของ ∝-Amylase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.10 แสดงผลของ heat treatment ต่อการทำงานของ α-Amylase inhibitor

Treat inhibitor ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 10 นาที หลังจากทำให้เย็น วัด activity ที่เหลือของ inhibitor

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved