ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณลักษณะทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสจากถั่วแดงหลวงและผลการลดระดับน้ำตาล

ผู้เขียน นางสาวฤทัยวรรณ บุญครองชีพ

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) มีสารยับยั้งอะไมเลสทั้งชนิดที่เป็นโปรตีนและไม่เป็นโปรตีน สารยับยั้งที่เป็นโปรตีนเมื่อสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.9 และทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีซึ่งประกอบด้วย DEAE-cellulose, Sephadex G-100 และ hydroxyaptile พบว่าสารยับยั้งที่ได้เป็นโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ มีขนาดโมเลกุล 36.3 กิโลดาลตันจาก 14-17% native PAGE 47.7 กิโลดาลตันจากเจลฟิลเตรชั่น Sephadex G-100 ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ขนาดโมเลกุล 15.5, 17 และ 18.2 กิโลดาลตันจาก 14-17% SDS-PAGE สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนจำแนกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่าสารยับยั้ง อะไมเลสมีระยะทางการแยก (R_f) อยู่ระหว่างน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส และมอลโตส ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 180 และ 360.3 ดาลตันตามลำดับ

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน พบว่าสารนี้มีอุณหภูมิเหมาะสมกับการทำงานสูงสุดในการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสจากน้ำลายที่ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 มีความคงตัวที่ 4-50 องศาเซลเซียส มีความคงตัวอยู่ที่พีเอช 6.0 เกลือซัลเฟตและคลอไรด์มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการจับของเอนไซม์กับตัวยับยั้งส่งผลให้ค่าการยับยั้งดีขึ้น สารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีนมีจลนศาสตร์การยับยั้งอะไมเลสจากน้ำลาย เป็นแบบ mixed noncompetitive นั่นคือ ตัวยับยั้งชอบที่จะจับกับเอนไซม์ที่จับกับสับสเตรตมากกว่าเอนไซม์อิสระ

ผลของสารยับยั้งที่ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ที่ทดสอบได้ 50% พบว่าสารสกัดยับยั้ง อะไมเลสจากน้ำลาย > อะไมเลสจากตับอ่อน > มอลเตส ตามลำดับ แต่ไม่ยับยั้งซูเครสจากยีสต์ สารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนยับยั้ง อะไมเลสจากน้ำลาย เท่ากับอะไมเลสจากตับอ่อนหมู แต่ไม่ยับยั้งซูเครส และมอลเตสจากยีสต์ สารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนยับยั้งอะไมเลสจากตับอ่อน > อะไมเลสจากน้ำลาย แต่ไม่สามารถยับยั้งซูเครส และมอลเตสจากยีสต์ได้ และยังพบยังว่าสารยับยั้งอะไมเลสที่เป็นโปรตีนยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลายและตับ

อ่อนหมูดีกว่า สารสกัดและสารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีนเนื่องจากเมื่อเทียบเป็นปริมาณกรัมถั่วใช้น้อยกว่า

ผลการทดสอบศักยภาพในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลอง พบว่าสารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีน สารสกัด สารสกัดเจือจางที่ยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส 50% สารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีนเจือจางที่ยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส 50% สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูทดลองได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังการให้สารนาน 15 วัน โดยสารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีนลดได้ 21.43%, สารสกัดลดได้ 20.05%, สารสกัดเจือจางที่ยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส 50% ลดได้ 19.37% และสารยับยั้งที่ไม่เป็นโปรตีนเจือจางที่ยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส 50%ลดได้ 11.97% ตามลำดับ โดยการเจริญเติบโต (ค่าน้ำหนัก) ทุกกลุ่มทดสอบไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาการต้านทานคาร์โบไฮเดรต มอลโตส ซูโครส และแป้ง ด้วยกราฟระหว่างเวลาที่ 0 ถึง 120 นาทีกับระดับน้ำตาลในเลือด ระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุด พื้นที่ใต้กราฟ และอัตราเร็วในการดูดซึมกลูโคสที่เวลา 30 นาที ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มให้สารทดสอบ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกของสารยับยั้งต่อเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตในทางเดินอาหารได้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ศึกษา และสารยับยั้งที่ทดสอบต่อไป

Thesis Title	Biochemical Characteristic of Amylase Inhibitor from Royal Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*) and Its Hypoglycemic Effect
Author	Miss Ruthaiwan Bunkrongcheap
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2007

ABSTRACT

Royal red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) contains both proteinaceous and nonproteinaceous inhibitors of α-amylase. The proteinaceous α-amylase inhibitor was extracted by phosphate buffer pH 6.9 and purified by conventional chromatography, namely DEAE-cellulose, Sephadex G-100 and hydroxyapatile columns which purified inhibitor had its native molecular weight 36.3 kDa by 14-17% native-PAGE and 47.7 kDa by gel filtration through Sephadex G-100 with 3 subunits of 15.5, 17 and 18.2 kDa by 14-17% SDS-PAGE. The nonproteinaceous α-amylase inhibitor identified by thin layer chromatography, showed relative mobility (R_f) between standard sugar glucose (G1) and maltose (G2) of molecular weight 180 Da and 360.3 Da, respectively.

Results of biochemical characterization revealed optimum temperature at 50 °C with pH optimum at 7.0 for the inhibition of α-amylase from saliva by the nonproteinaceous α-amylase inhibitor. Keeping the nonproteinaceous α-amylase inhibitor 30 min at 4-50 °C did not affect its inhibitory activity against α-amylase from saliva. Salts including sulfate ion and chloride ion increased inhibitory activity of the inhibitor through the better binding of enzyme and inhibitor. Its kinetic study revealed a mixed noncompetitive type of inhibition against salivary α-amylase activity.

Potential application of α-amylase inhibitor at 50% inhibition against various enzyme *in vitro* showed that the crude extract had a power in inhibiting the activity of human salivary α-amylase more than porcine pancreatic α-amylase, yeast maltase but did not inhibit yeast sucrase. The proteinaceous amylase inhibitor had a power in inhibiting the activity of human α-salivary more than porcine pancreatic α-amylase,

but had no effect on yeast maltase and sucrase. The nonproteinaceous amylase inhibitor had the power in inhibiting the activity of porcine pancreatic α-amylase more than human α-salivary, but had no effect on yeast maltase and sucrase. It is also found that the proteinaceous inhibitor is more powerful in inhibiting salivary amylase than crude extract and the nonproteinaceous inhibitor because when converted theirs inhibited values to gram bean, they required less amount.

Potential application of the inhibitor on blood glucose reduction *via* luminal enzymes *in vivo* study showed that the fed substances *i.e*. nonproteinaceous α-amylase inhibitor, crude extract, crude extract at IC_{50}, and nonproteinaceous α-amylase inhibitor at IC_{50} could significantly reduce fasting blood glucose level (mean ± S.E. in mg/dl) at *p*-values < 0.05 when compared with the control group after prolong feeding to the rats for 15 days; 56.83 ± 3.58, 57.83 ± 2.77, 58.33 ± 2.43, 63.67 ± 2.46, respectively.

Results of maltose, sucrose and starch tolerance tests *i.e.* the plots between time from 0 to 120 and blood glucose level, their zenith blood glucose concentration (ZBG), area under the curve (AUC) or the rate of glucose adsorption (RGA) at 30 min values did not give any positive results in supporting the effect of the test inhibitors on enzymes involved in liberation of glucose for the absorption from the fed substrates. More studies involve with varying doses of the inhibitor and fed carbohydrate substrates are required.