

ชื่อวิทยานิพนธ์                      การปรับปรุงกระบวนการทำเลคตินจากเมล็ดค้ำชูชา (Crotalaria juncea) ให้บริสุทธิ์และการใช้เลคติน

ชื่อผู้เขียน                            นายธนากร บุญโพธิ์ทอง

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต        สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

อ. ดร. ดารารัตน์ ทองขาว	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. พูนศุข ศรีโยธา	กรรมการ
ผศ. ดร. ศิริรัตน์ สาระเวก	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

เลคตินคือ โปรตีนที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต ตกตะกอนสารที่มีองค์ประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรต และ/หรือทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม ค้ำชูชาเป็นพืชที่นิยมปลูกเป็นพืชพืชสดและมีเลคตินในเมล็ด จึงเหมาะสมเป็นวัตถุดิบในการผลิตเลคตินชนิดหนึ่ง แต่การสกัดเลคตินจากเมล็ดค้ำชูชาและการทำให้บริสุทธิ์มีขั้นตอนยุ่งยาก จึงไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตในปริมาณมาก งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่การปรับปรุงกระบวนการผลิตเลคตินจากเมล็ดค้ำชูชา และสำรวจแนวทางการประยุกต์ใช้เลคตินที่ได้ให้เป็นประโยชน์ต่อไป

การสกัดเลคตินจากเมล็ดค้ำชูชาด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.3 ที่มี 1.0 โมลาร์เกลือแกง ในอัตราส่วนน้ำหนักเมล็ดแห้งต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ 1 : 10 กรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นวิธีสกัดที่เหมาะสม เพราะได้เลคตินในปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นวิธีที่สะดวกเพราะมีขั้นตอนเดียว การทำเลคตินจากสิ่งสกัดให้บริสุทธิ์โดยการจับจำเพาะกับเม็ดอะกาโรสใช้เม็ดอะกาโรสที่อ่อนกับกรดเกลือแล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอัตราส่วนปริมาตรเม็ดอะกาโรสต่อปริมาตรสารที่สกัดได้ 1 : 1.25 - 1 : 1.88 และ พีเอชในช่วง 5.0 - 7.4 สำหรับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแลคโตสในการชะเลคตินออกจากเม็ดอะกาโรสคือ 50 มิลลิโมลาร์ เลคตินที่ได้จากกระบวนการที่ปรับปรุงแล้วนี้มีความบริสุทธิ์สูง โดยพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวบน SDS - PAGE

จากการศึกษาสมบัติของเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากเมล็ดค้ำบูชา พบว่า เลคตินมีน้ำหนักโมเลกุล 144,000 ดาลตัน และจับจำเพาะกับ ดี - กาแลคโตส ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มโดยเลคตินต้องการอิออนของแคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส และความสามารถนี้จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จนหมดความสามารถเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า  $70^{\circ}$  C เลคตินจากเมล็ดค้ำบูชาจับได้ทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน และจับได้ทุกหมู่เลือดจากการศึกษาการจับเม็ดเลือดแดงหมู่โอของคนปกติ 11 คน และหมู่โอที่เป็นคนไข้พาราบอมเบย์ 1 คน พบว่า เลคตินจากเมล็ดค้ำบูชาสามารถจับเซลล์เม็ดเลือดแดงของแต่ละคนได้ไม่เท่ากัน นอกจากนี้เลคตินจากเมล็ดค้ำบูชาไม่จับกับเซลล์แบคทีเรีย 5 ชนิด และเซลล์ยีสต์ 2 ชนิดที่ทำการทดสอบ แต่จากไกลโคโปรตีน 11 ชนิดที่ทดสอบ พบว่าเลคตินจากเมล็ดค้ำบูชาสามารถจับกับเคซีน และไกลโคโปรตีนบางชนิดในน้ำเลือดของคน ผลจากการทดลองที่ได้อาจใช้เป็นข้อมูลสำหรับการผลิตเลคตินต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

Thesis Title            Modification of Purification Process and  
                                  Application of Lectin from Sunn Hemp  
                                  (Crotalaria juncea) Seeds

Author                    Mr. Thanakorn Boonpothong

M.S.                        Chemistry

Examining Committee

Lecturer Dr. Dararat Tongkao	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Poonsook Sriyotha	Member
Assit. Prof. Dr. Sirirat Sarawek	Member

### Abstract

Lectins are carbohydrate-binding proteins which precipitate glycoconjugates and/or agglutinate cells. Sunn hemp is a famous plant for biofertilizer and the seeds contain lectin, hence it is a suitable source for lectin production. However, the conventional processes for seed extraction and lectin purification are too complicated to scale up the production. This thesis aims at modification of the production process for the lectin from sunn hemp seeds and survey for the lectin application.

The seeds were extracted by 50 mM acetate buffer, pH 4.3, containing 1.0 M sodium chloride with the ratio of seed dry weight to buffer volume of 1 : 10 g/ml and the extraction time was 2 hours at 4 °C. The extraction conferred with maximal quantity and purity and especially required only one step. The lectin was further purified by

affinity binding to agarose beads, which has been incubated with hydrochloric acid for 2 hours, with the ratio of bead volume to extraction volume of 1 : 1.25 - 1 : 1.88 and the pH range between 5.0-7.4. The lectin was then eluted from the beads by 50 mM lactose. The modified processes conferred the lectin with high purity considered from a single protein band in SDS-PAGE.

Some properties of the purified lectin from sunn hemp seeds were studied. Molecular weight of the lectin was 144,000 daltons and the lectin specifically bound D-galactose. Haemagglutination by the lectin required calcium, magnesium and manganese ions. The stability of lectin decreased with increasing temperature and no haemagglutination was observed at the temperature higher than 70 °C. The lectin agglutinated both human erythrocytes and lymphocytes with no blood group specificity. The haemagglutination study of group O blood from eleven panel subjects and one parabombay patient indicated individual variation of the lectin binding capacity. Besides, the lectin showed no agglutination with five species of bacteria and two of yeasts. However, from eleven types of glycoprotein tested, the lectin bound casein and some glycoproteins in human plasma. These findings might convey essential information for the lectin production in the future.