ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การสำรวจเลคตินในเห็ดและการศึกษาลักษณะเฉพาะของเลคดิน

ชื่อผู้เขียน

นางสาวปทุมทิพย์ บุญจูง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์: อาจารย์ คร. ดารารัตน์

ม์ ทองขาวู

ประธานกรรมการ

รศ.คร. สุรีย์ ฟูตระกูล

กรรมการ

ผศ.คร. ศิริรัตน์ สาระเวก

กรรมการ

บทคัดย่อ

เลคตินคือโปรตีนที่จับจำเพาะคาร์โบไฮเครต การตรวจหาเลคตินในเห็ดทำได้โดยการสกัด ดอกเห็ดสดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เกลือในอัตราส่วน 1:5 กรัม/มล. แล้ววิเคราะห์ความสามารถ ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม จากการสกัดเห็ดที่หาได้ง่ายในภากเหนือจำนวน 106 ชนิด ได้สิ่งสกัด ที่มีปริมาตรในช่วง 1:2.7 - 1:5 กรัม/มล. พีเอช 4.75-7.25 และความขุ่น 0.05-13.7 หน่วย เห็ด 46 ชนิดให้สิ่งสกัดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม เห็ด 41 ชนิดไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม และ เห็ด 19 ชนิดทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ความสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของเห็ด 46 ชนิด สญเสียไปเมื่อนำสิ่งสกัดไปต้มเป็นเวลา 20 นาที ยกเว้นเห็ด 2 ชนิดที่มีความสามารถเหลืออยู่ 50 และ 100% ดังนั้นสิ่งสกัดจากเห็ด 44 ชนิดจึงมีเลคติน และปริมาณเลคตินในช่วง 28-14,482 ใตเตอร์/มล. ปริมาณโปรตีน 0.125-2.26 มก./มล. หรือ Specific activity 36-20,988 ใตเตอร์/มก. นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ปริมาณเลคตินและโปรตีนในเห็ดชนิดเดียวกันแต่อายุต่างกันและพบว่า สิ่งสกัดจากเห็ดอายุมากมีปริมาณเลคตินน้อยกว่าเห็ดอายุน้อย 29-100% สิ่งสกัดจากเห็ดอายุมากมี ปริมาณโปรตีนน้อยกว่าเห็ดอายุน้อยไม่เกิน 71% และเมื่อนำดอกเห็ดมาแบ่งเป็นส่วนหมวกและ หมวกดอกมีปริมาณเลคตินและปริมาณโปรตีนมากกว่าก้านดอก ส่วนก้านแล้ววิเคราะห์พบว่า สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเลคตินโดยทั่วไปใช้เม็คเลือดแคงของคนหมู่โอ เพราะเลคตินในสิ่ง สกัดจากเห็ดส่วนใหญ่ไม่จำเพาะต่อหมู่เลือดในระบบเอบีโอ ยกเว้นเลคตินจากเห็ดบ้านปาง เ ซึ่ง จับจำเพาะเม็ดเลือดแดงหมู่โอเท่านั้น นอกจากนี้ยังได้ทดลองเปรียบเทียบกับเลือดสัตว์และ วิเคราะห์เลคตินได้ปริมาณเรียงลำดับจากมากไปน้อยคือ คน หมู วัว และแพะ

จากเห็ดจำนวน 44 ชนิดที่ตรวจพบเลกติน เลกตินจากเห็ด 15 ชนิดวิเคราะห์พบชนิดของ แซกกาไรด์ที่จับจำเพาะ แต่เห็ดอีก 29 ชนิดวิเคราะห์ไม่พบ สำหรับเลกตินจากเห็ดเกมี 2/40 เห็ด สาลาอ่างแก้ว 1 เห็ดกระคุม เห็ดไทยพาณิชย์ 1 เห็ดลม เห็ดเกมี 7 และเห็ดตีนตุ๊กแกจับจำเพาะ Nacetylgalactosamine/galactose เลกตินจากเห็ดนางนวล เห็ดพุงหมู เห็ดน้ำผึ้ง เห็ด กองบิน 1 และเห็ดบุษยา 1 จับจำเพาะแลกโตส เลกตินจากเห็ดน้ำแป้งจับจำเพาะแมนโนส/กลูโคส เลกตินจากเห็ดหลินจือจับจำเพาะ Nacetylglucosamine และเลกตินจากเห็ดบ้านปาง 1 จับจำเพาะ แอล-ฟิวโกส จากความจำเพาะต่อแซกกาไรด์ของเลกตินทำให้สามารถทำเลกตินจากเห็ดหลินจือให้ บริสุทธิ์ได้โดยโครมาโทกราฟิสัมพรรกภาพกับไกติน และซะเลกตินออกโดย Nacetylglucosamine ที่มี 10% กลีเซอรอล จาก PAGE และ SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่าเลกตินที่แยกได้อยู่ใน สภาพกึ่งบริสุทธิ์ มีน้ำหนักโมเลกุล 23,500 ดาลตัน และไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างหน่วยย่อย การสึกษาสภาวะในการเก็บรักษาพบว่าเลกตินในสิ่งสกัดมีความเสถียรมากกว่าเลกตินกึ้งบริสุทธิ์ และการเก็บโดยแช่เย็นที่ 4 ซ ดีกว่าแช่แข็งที่ -20 ซ

Thesis Title

Survey of Lectins in Mushrooms and Lectin Characterization

Author

Miss Patoomthip Boonchoong

M.S.

Biotechnology

Examining Committee: Lecturer Dr. Dararat Tongkao

Chairman

Associate Professor Dr.Suree Phutrakul

Member

Assistant Professor Dr.Sirirat Sarawek

Member

Abstract

Lectins are specific carbohydrate-binding proteins. Survey of the lectins in mushrooms was carried out by extraction of the fresh fruiting bodies by PBS in the ratio of 1:5 g/ml and then haemagglutination assay. The extracts from 106 types of the mushroom available in Northern Thailand had the volumes in the range of 1:2.7-1:5 g/ml, pH 4.75-7.25 and turbidity 0.05-13.7 units. The extracts of 46, 41 and 19 types of the mushroom agglutinated, did not agglutinate, and lyzed human red blood cells, respectively. Of the 46 haemagglutinating activities, 44 were destroyed after boiling the extracts for 20 minutes but the other 2 still remained of 50 and 100%. So the extracts from 44 types of the mushroom contained lectins and the content were in the range of 28-14,482 titers/ml, the protein content 0.125-2.26 mg/ml, or the specific activity 36-20,988 titers/mg. In addition, the lectin and protein content of the same type of mushroom at different stages of growth were determined. The extracts from the older contained 29-100% less content of the lectin and up to 71% less content of the protein than the younger. Besides, the cap of mushroom contained more content of the lectin and protein than the stalk. In general the lectin content was determined by haemagglutination of the human red blood cell group O, for the mushroom lectins were mostly not blood group specific in the ABO system with the except of only the Banpang 1 mushroom lectin specificity of blood group O. Haemagglutination of animal cells was determined in comparison with the human cells and the lectin content decreased in the order of using human, swine, bovine and goat cells.

From 44 types of the mushroom that containing lectins, the lectins of 15 types showed structural specificity of saccharide binding but the other 29 types could not be investigated by the simple saccharides. The lectins from Agaricus bisporus, Lentinus polychrous, Schizophyllum commune, and the mushroom named Chemi 2/40, Sala-angkeaw 1, Thaipanit 1, Chemi 7 specifically bound N-acetylgalactosamine/galactosamine/galactose. The lectins from Pleurotus flabellatus, Russula foetens, Boletus rectus, Kongbin 1 and Busaya 1 specifically bound lactose. The lectins from Russula alboareolata, Ganoderma lucidum and Banpang 1 specifically bound mannose/glucose, N-acetylglucosamine and L-fucose respectively. The saccharide specificity was applied to purify the lectin from Ganoderma lucidum by affinity chromatography with chitin and the lectin elution by N-acetylglucosamine containing 10% glycerol. PAGE and SDS-PAGE showed the lectin obtained in partially purifier form, possessed the molecular weight of 23,500 daltons and no disulphide bridge between any subunit. For storage conditions, the lectin in crude extract was more stable than partially purified lectin, and cooling stage at 4 °C was better than forzen at -20 °C.