การทำบริสุทธิ์และการจำแนกคุณลักษณะสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียว

Purification and characterization of proteinase inhibitor from mung bean seed

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย

จากงบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2553

มหาวิทยาลัยทักษิณ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยทักษิณ สำหรับเงินอุดหนุนโครงการวิจัยเรื่อง “การทำบริสุทธิ์และการจำแนกคุณลักษณะสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียว” จำนวน 300,000 บาท ขอขอบพระคุณ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ สำหรับการวิจัยครั้งนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย การทำบริสุทธิ์และการจำแนกคุณลักษณะสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียว

Purification and characterization of proteinase inhibitor from mung bean seed

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ

อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

โทรศัพท์/โทรสาร 074-693996

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท การวิจัยประยุกต์ ประจำปี พ.ศ. 2553 จำนวนเงิน 300,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ วันที่ 1 มกราคม 2553 ถึง วันที่ 31 ธันวาคม 2553

จากการศึกษาการสกัดและการจำแนกคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วเขียวที่เจริญในประเทศไทย พบว่า น้ำกลั่นเป็นตัวสกัดที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วเขียวที่ผ่านการกำจัดไขมัน ($P<0.05$) เวลาในการสกัดมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการสกัดสารยับยั้ง ($P<0.05$) โดยพบว่าเวลาในการสกัด 2 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วเขียว สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วเขียวสามารถทำบริสุทธิ์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว ร้อยละ 30-65 และการใช้เจลฟิลเตรชัน ชนิด Sephadex G-50 โดยสารยับยั้งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.51 เท่าและได้ผลผลิตร้อยละ 30.25 สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14 กิโลดาลตัน เมื่อทำการตรวจสอบโดย SDS-PAGE และ inhibitory activity staining อย่างไรก็ตามสารยับยั้งที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไม่มีกิจกรรมภายใต้สภาวะรีดิวซิง (สภาวะที่มี βME) สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีความตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 50 นาที และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0-3 ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วเขียว

Trypsin inhibitor from mung bean (*Vigna radiata (*L.)R. Wilczek) seeds grown in Thailand was extracted and characterized. Optimal extraction was attained by shaking the defatted mung been seed powder in distilled water ($P<0.05$). The extraction time affected the inhibitor recovery significantly ($P<0.05$). The extraction time of 2 h was optimum for recovery of trypsin inhibitor from mung bean seeds. Trypsin inhibitor from mung bean seeds was purified by heat-treatment at 90°C for 10 min, followed by ammonium sulfate precipitation with 30-65% saturation and gel filtration on Sephadex G-50. It was purified to 13.51-fold with a yield of 30.25%. Molecular weight distribution and inhibitory activity staining showed that the purified trypsin inhibitor had the molecular weight of 14 kDa. However, the purified inhibitor had no activity under reducing condition (βME). The purified inhibitor was heat stable up to 50 min at 90°C. The inhibitory activity was retained over a wide pH range. NaCl, at 0-3% concentration, did not influence the inhibitory activity of purified trypsin inhibitor from mung bean seeds.

คำสำคัญ: โปรตีเนส สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน การจำแนกคุณลักษณะ การทำบริสุทธิ์

Keywords: Proteinase, Trypsin inhibitor, Characterization, Purification

CONTENTS

	Page
Contents	v
List of Tables	vi
List of Figures	vii
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Literature review	3
Protease inhibitor	3
Natural protease inhibitor	4
Classification of protease inhibitor	4
Isolation and characterization of protease inhibitor from plants	8
Chapter 3 Materials and Methods	12
Chapter 4 Results and Discussion	18
Extraction of trypsin inhibitor from mung bean seeds	18
Purification of trypsin inhibitor from mung bean	22
Protein pattern and activity staining of trypsin inhibitor from mung bean	26
Thermal stability of purified trypsin inhibitor	30
pH stability of purified trypsin inhibitor	32
Effect of salt on the stability of purified trypsin inhibitor	34
Chapter 5 Conclusion	35
References	36

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Effect of different extraction media on the recovery of trypsin inhbitor from mung bean seeds	20
2	Purification of trypsin inhibitors from mung bean seeds	25

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Effect of extraction time on specific trypsin inhibitory activity and trypsin inhibitory activity of mung bean seed extract	21
2	Effect of heat treatment at different temperatures on trypsin inhibitory activity and specific trypsin inhibitory activity of mung bean seed extract	24
3	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and inhibitory activity staining for trypsin of crude trypsin inhibitor from mung bean seed and different fractions under reducing and nonreducing condition	29
4	Thermal stability of Sephadex G-50 trypsin inhibitor fraction from mung bean seed	31
5	pH stability of Sephadex G-50 trypsin inhibitor fraction from mung bean seed	33
6	Effect of salt concentration on the stability of Sephadex G-50 trypsin inhibitor fraction from mung bean seed	34