

**ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ANTI-OXIDATIVE  
PROPERTIES OF PARTIAL PURIFIED PROTEINS FROM  
CAJANUS CAJAN (L.) MILL SP. CULTIVATED IN THAILAND**



**THANCHANOK MUANGMAN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2011**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ANTI-OXIDATIVE PROPERTIES OF PARTIAL PURIFIED PROTEINS FROM *CAJANUS CAJAN* (L.) MILL SP. CULTIVATED IN THAILAND

THANCHANOK MUANGMAN 5038366 PYBS/ D

Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: WICHET LEELAMANIT, Ph.D., PRAPAIPAT KLUNGSUPYA, Ph.D., JIRAPHAN JITTIKOON, Ph.D.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are continuously generated as part of both our normal process of cellular metabolism and by environmental factors. The ROS induces cell damage by modifying molecules including proteins, lipids, and DNA and leads to oxidative stress that is associated with tissue damage, accelerated aging, and degenerative diseases. In addition, malfunction of epithelium barriers by ROS is attributed to the disruption of tight junction functions. The aim of this study was to investigate the protective effect of natural proteins isolated from *Cajanus cajan* (pigeon pea) seeds cultivated in Thailand against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative cellular damage. The crude pigeon pea proteins were obtained using ammonium sulfate precipitation in various extraction solutions. Eight protein fractions (PBS (P); I, II, III), (NaCl (N); I, II) and (water (W); I, II, III) were obtained. The molecular weight distributions were found to be in the range of 1-100 kDa. Protein fractions were observed for their antioxidant activities including enzymatic antioxidant activities (SOD, CAT and GPx), cell membranes, mitochondrial membranes, DNA damage on human lymphoblast cells (TK6), and TJ disruption on human intestinal epithelial cells (Caco-2). The data revealed a potent superoxide dismutase-like activity in three protein fractions including P-II, N-II, and W-III. The highest inhibitory effect on mitochondrial and cell membrane damage was detected in the W-III fraction. In addition, there was no significant difference among protein fractions on the anti-oxidative DNA damage in TK6 cells. The protective effects on TJ defects induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Caco-2 cells, indicated by the preservation of TER values and TJ proteins (claudin-4 and occludin) expression, were found in all three protein fractions. According to our results, we conclude that proteins isolated from pigeon pea seeds possess potent anti-oxidative effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cellular damage.

KEY WORDS: *Cajanus cajan* / PIGEON PEA / ANTI-OXIDATIVE / TIGHT JUNCTION / DNA DAMAGE

128 pages

การแยก การตรวจสอบคุณลักษณะ และ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่แยกได้จากถั่วมะแฮะพื้นเมืองไทย

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ANTI-OXIDATIVE PROPERTIES OF PARTIAL PURIFIED PROTEINS FROM *CAJANUS CAJAN* (L.) MILL SP. CULTIVATED IN THAILAND

รัชชนก เมืองมัน 5038366 PYBS/ D

ปร.ด. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: วิเชษฐ์ ลีลามานิต, Ph.D., ประไพภัทร คลังทรัพย์, Ph.D., จิระพรรณ จิตติคุณ, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

โมเลกุลที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (reactive oxygen species; ROS) จะก่อให้เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ซึ่งจะส่งผลเสียต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เนื่องจาก ROS สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยากับหน่วยพันธุกรรม (DNA) โปรตีนคาร์โบไฮเดรต และเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์และนำไปสู่การเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือด โรคสมองเสื่อม และ โรคมะเร็ง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ การตรวจสอบคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ของโปรตีนธรรมชาติที่แยกได้จากถั่วมะแฮะ (*Cajanus cajan*) พันธุ์พื้นเมืองของไทย โดยทำการศึกษาทั้งคุณสมบัติการเป็นเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ และ DNA ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (TK 6) เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังทำการศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ  $H_2O_2$  ที่ก่อให้เกิดความเสียหายบริเวณ tight junction ในเซลล์ลำไส้ใหญ่มนุษย์ (Caco-2) เพาะเลี้ยง จากผลการศึกษาพบว่า โปรตีนทั้ง 8 ตัวอย่าง จากถั่วมะแฮะ ที่สกัดด้วย 3 ตัวทำละลายที่ต่างกันและตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว 0-30 (I) 30-60 (II) และ 60-90 (III) คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS (P); I, II, III), โซเดียมคลอไรด์ (NaCl (N); I, II) และ น้ำ (water (W); I, II, III) ได้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 1 ถึง 100 กิโลดัลตัน และพบว่าโปรตีน P-II N-II และ W-III มีฤทธิ์คล้ายเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีนที่ได้จากตัวทำละลายเดียวกัน จากนั้นนำมาทำการศึกษาต่อในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า โปรตีนที่สกัดด้วย น้ำและตกตะกอนที่ 60-90 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ของเซลล์ TK 6 มากที่สุด แต่ไม่พบความแตกต่างในฤทธิ์ต้านต่อความเสียหายของ DNA ในขณะที่โปรตีนทั้ง 3 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มค่า transepithelial electrical resistance (TER) ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ tight junction นอกจากนี้สามารถป้องกันการทำลายการสร้างโปรตีน claudin-4 และ occludin ในเซลล์ Caco-2 ด้วย จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า โปรตีนที่แยกได้จากถั่วมะแฮะพื้นเมืองของไทย มีฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูล  $H_2O_2$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ และเซลล์ลำไส้ใหญ่มนุษย์เพาะเลี้ยงได้