



การสะสมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลีฟีนอล-
ออกซิเดสและสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราหลังติดเชื้อรา
**Accumulation of Phenylalanine Ammonia-lyase, Polyphenoloxidase and
Phenolic Compounds in *Hevea brasiliensis* after Fungal Infection**

นिसาพร มุหะมัด
Nisaporn Muhamad

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Prince of Songkla University**

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การสะสมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลีฟีนอล-
ออกซิเดสและสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราหลังติดเชื้อรา
**Accumulation of Phenylalanine ammonia-lyase, Polyphenoloxidase and
Phenolic Compounds in *Hevea brasiliensis* after Fungal Infection**

นिसาพร มุหะมัด

Nisaporn Muhamad

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Biochemistry
Prince of Songkla University**

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสะสมของเอนไซม์ฟีนอลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลี-
 ฟีนอลออกซิเดสและสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราหลังติดเชื้อรา
 ผู้เขียน นางสาวนิสาพร มุหะมัด
 สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเขียว) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์) (รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์) (ดร.เมธินี รัตตสาร)	คณะกรรมการสอบ ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์) กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเขียว) กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์) กรรมการ (ดร.เมธินี รัตตสาร)
--	---

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การสะสมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลี- ฟีนอลออกซิเดสและสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราหลังติดเชื้อรา
ผู้เขียน	นางสาวนิสาพร มุหะมัด
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase; PPO) พบในพืชชั้นสูงเกือบทุกชนิด เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสถูกกระตุ้นให้มีการสร้างในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อพืชเกิดบาดแผลหรือถูกทำลายโดยเชื้อโรค เมื่อนำสารสกัดจากใบยางพารา 2 สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อโรคต่างกัน คือ BPM-24 (ต้านทาน) และ RRIM600 (อ่อนแอ) ซึ่งผ่านการกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผล บ่มด้วยซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* และบ่มด้วย CuSO_4 แล้วนำมาแยกด้วยวิธี native-PAGE จะปรากฏแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 3 และ 4 ไอโซไซม์ในชุดควบคุมและชุดที่ถูกกระตุ้น ตามลำดับ และพบว่า แถบที่ 3 (แถบ Y) คือ ไอโซไซม์ซึ่งถูกชักนำจากการกระตุ้นด้วยวิธีต่างๆ โดยถูกกระตุ้นในพันธุ์ BPM-24 ได้มากกว่าและเร็วกว่าในพันธุ์ RRIM600 แถบที่ 1, 2 และ 4 (แถบ basic, X และ Z) เป็นไอโซไซม์ที่มีอยู่ในธรรมชาติของใบยางทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยแถบ X เป็นไอโซไซม์ที่ใช้ระบุสายพันธุ์ได้ เพราะการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ดังกล่าวในสนามไฟฟ้าของสายพันธุ์ BPM-24 ช้ากว่าของสายพันธุ์ RRIM600 และ แถบ Z ซึ่งเป็นแถบที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติจะหายไปเมื่อได้รับการติดเชื้ออย่างรุนแรง การทำให้เมล็ดอ่อนของยางพาราเกิดบาดแผลให้ผลเช่นเดียวกับในใบยางพารา ส่วนในเซลล์แขวนลอยยางพาราพันธุ์ BPM-24 พบความแตกต่างคือ ภายหลังจากกระตุ้นด้วย filtrate จาก *P. palmivora* แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะลดจาก 2 แถบ (แถบ Y และแถบ Z) เหลือเพียง 1 แถบ (แถบ Y) และแถบ Y ของชุดควบคุมพบในปริมาณที่สูงมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ถูกกระตุ้นโดยการเลี้ยงในเครื่องเขย่าตลอดเวลา และเมื่อนำเซลล์แขวนลอยมาบ่มด้วย filtrate ความเข้มข้นคิดเป็น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย แล้วนำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia lyase; PAL) และ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส รวมทั้งการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (phenolic

compounds) พบว่า ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลลานีนแอมโมเนียไลเอสในชุดทดลองสูงสุดที่ 16 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นคิดเป็น 102.41% ของชุดควบคุม ความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในชุดทดลองจะสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมคิดเป็น 244.25% (ชั่วโมงที่ 96) และการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกมีแนวโน้มที่สูงขึ้นแต่ระยะเวลาที่กระตุ้นไม่นานเพียงพอจึงยังไม่อาจสรุปผลที่ได้ อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาเห็นการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมากที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยไปทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic ใน 0.02 โมลาร์ sodium phosphate buffer pH 7 แล้วชะคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์ NaCl พบไอโซไซม์ PPO1 ส่วนไอโซไซม์ PPO2, PPO3 และ PPO4 ถูกชะออกมาด้วยเกลือ 0.07, 0.08 และ 0.09 โมลาร์ NaCl ตามลำดับ โดย PPO3 และ PPO4 เป็นแถบไอโซไซม์หลัก เมื่อนำ PPO1, PPO3 และ PPO4 มาหาความว่องไวจำเพาะพบว่า PPO4 มีค่าความว่องไวจำเพาะสูงที่สุด คือ 1,900,000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นความบริสุทธิ์ 1,266.67 เท่า และ PPO3 มีค่าความว่องไวจำเพาะ 141,665 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นความบริสุทธิ์ 94.44 เท่า ส่วน PPO1 มีค่าความว่องไวจำเพาะ 6,004.55 คิดเป็นความบริสุทธิ์ 4 เท่า ทั้ง 3 ไอโซไซม์มีความจำเพาะกับสับสเตรท 2 ชนิดคือ catechol และ dopamine โดยค่า Km ของ PPO1 เท่ากับ 33 และ 83 มิลลิโมลาร์ PPO3 เท่ากับ 83 และ 20 มิลลิโมลาร์ และ PPO4 เท่ากับ 167 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ PPO1 ทนต่อ pH 6-10 ขณะที่ PPO3 ทน pH ได้ช่วงกว้างที่สุด (pH 2-9) และ PPO4 ทนต่อ pH 5-10 ส่วนอุณหภูมิ PPO1 ทนได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส PPO3 และ PPO4 ทนได้สูงกว่า คือ 10-70 องศาเซลเซียส β -me และ DTT ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของทั้ง 3 ไอโซไซม์ ส่วน citric acid, SDS และ salicylic acid เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาที่ดีที่สุดของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ตามลำดับ

Thesis Title Accumulation of Phenylalanine Ammonia-lyase
Polyphenoloxidase and Phenolic Compounds in *Hevea
brasiliensis* after Fungal Infection.

Author Miss Nisaporn Muhamad

Major Program Biochemistry

Acedemic Year 2008

Abstract

Polyphenoloxidase (PPO) plays a key role in higher plant's defense system. It was reported to be induced by wounding or variety of pathogens. After treating *Hevea brasiliensis* leaves with different degree of resistance, BPM-24 (resistant) and RRIM600 (susceptible), with wounding, zoospores of *P. palmivora* and CuSO₄ the leaves were then extracted and assayed for PPO activity after performing native-PAGE. Since the 3rd isozyme (Y isozyme) was not detected in control leaves, it should be induced by wounding or zoospores or CuSO₄. In addition, the rate and the intensity of this isozyme was higher in the BPM-24 than that in the RRIM600 which was correlated to the resistance of tested cultivars. The 1st, 2nd and 4th isozymes (basic, X and Z isozyme) were found in control leaves of both cultivars and the X isozyme can be used to distinguish these two cultivars because its mobility on native-PAGE in the BPM-24 was slower than that detected in the RRIM600. After wounding of *Hevea* seed, similar result was obtained. Two isozymes (Y and Z) were also observed in the BPM-24 *Hevea* cell suspension however, the isozyme Z was disappeared after treating with filtrate from *P. palmivora* Even though no treatment, the Y isozyme was detected as a major band which may due to continuous shaking in the culture process. Moreover, when *Hevea* cell suspension were incubated with filtrate from *P. palmivora* at 0.3 µg (protein equivalent) per gram of cell suspension, the induction of phenylalanine ammonia lyase (PAL), polyphenoloxidase (PPO) and phenolic compounds in *Hevea* cell suspension,

was examined. The accumulation of PAL was increased and peaked after 16 h (102.41% from control). PPO activity was increased slowly and reached its highest level which was more than control for 244.25% (after 96 h.) while the phenolic compounds synthesis had a tendency to increase but period of research time was not enough to obtain a conclusive result. Since the PPO was induced strongly after the filtrate treatment, the extract from the cell suspension was further purified by ion-exchange (DEAE-sepharose) in 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7. The PPO1 isozyme was eluted with 0.05 M NaCl while the isozyme PPO2, PPO3 and PPO4 were eluted with 0.07, 0.08 and 0.09 M NaCl, respectively and PPO3 and PPO4 are the major ones. Measurement of PPO specific activity showed that PPO1, PPO3 and PPO4 had specific activities of 6,004.55, 141,665 and 1,900,000 unit/mg protein with purification fold of 4, 94.44 and of 1,266.67, respectively. All PPOs were specific to catechol and dopamine, Km values of PPO1 for catechol and dopamine were 33 and 83 mM, while those for PPO3 were 83 mM and 20 mM and PPO4 were 167 mM, 50 mM, respectively. pH stability was ranged from 6-10, 2-10 and 5-10 for PPO1, PPO3 and PPO4, respectively. The PPO1 was stable at temperature between 10-40 °C while PPO3 and PPO4 were more tolerant to heat (10-70 °C). All PPO isozymes were strongly inhibited by β -mercaptoethanol (β -me) and Dithiothreitol (DTT) at 1 mM. Whereas citric acid, Sodium dodecyl sulphate (SDS) and salicylic acid gave highest activation of PPO1, PPO3 and PPO4 activities, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเซาว์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทาร์พันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้ เสียสละเวลาให้ คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไข ข้อบกพร่องแก่ศิษย์เสมอมา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ประภาพร อุทาร์พันธุ์ รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมี และ ดร.เมธินี รัตสาร กรรมการ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความกรุณาในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาเสนอแนะแก้ไข เพิ่มเติมทำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชา ความรู้ต่างๆ และขอแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยตลอดมา รวมถึง ภาควิชาชีวเคมี คณะ วิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนการศึกษาและเงินเพื่อ วิทยานิพนธ์ในโครงการความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศ

สุดท้ายผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณกำลังใจอันยิ่งใหญ่ของคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มีได้กล่าวนามซึ่งเป็นกำลังใจ สำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมาจนสำเร็จ

นิสาพร มุหะมัด

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(11)
รายการกราฟ	(14)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(16)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	23
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
วัสดุ	24
อุปกรณ์	26
วิธีการทดลอง	27
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	43
4. สรุปผลการทดลอง	91
เอกสารอ้างอิง	94
ภาคผนวก	108
ประวัติผู้เขียน	113

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และบริษัทผู้ผลิต	24
2.2	องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพารา	33
2.3	องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้ชักนำเซลล์แขวนลอย	34
2.4	ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE)	39
2.5	ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)	40
2.6	ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) สำหรับย้อมโปรตีนด้วยซิลเวอร์ในเทรต	41
3.1	แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผล	44
3.2	แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
3.3	แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
3.4	แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CuSO_4	53
3.5	แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CuSO_4	53

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.6 แสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ	59
3.7 แสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ	61
3.8 แสดงค่าปริมาณโปรตีนของชุดควบคุมและชุดที่ป่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	66
3.9 แสดงค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ฟีนอลลานีนแอมโมเนียไลเอสชุดควบคุมและชุดที่ป่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	68
3.10 แสดงค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ชุดควบคุมและชุดที่ป่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	70
3.11 แสดงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชุดควบคุมและชุดที่ป่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	72
3.12 แสดงค่าความบริสุทธิ์ของไอโซไซม์ PPO1, PPO3 และ PPO4	77
3.13 สรุปลักษณะจำเพาะต่อสับสเตรทของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์	83
3.14 แสดงค่าความว่องไวของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ที่ pH ต่างๆ	85
3.15 แสดงค่าความว่องไวของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ที่ อุณหภูมิต่างๆ	86
3.16 แสดงค่าการยับยั้งและการกระตุ้นปฏิกิริยาของ PPO1, PPO3 และ PPO4	89

รายการรูป

รูปที่	หน้า	
1.1	แสดงส่วนประกอบของยางพารา	6
1.2	แสดงวงจรชีวิตของเชื้อรา <i>Phytophthora infestans</i>	7
1.3	แสดงลักษณะการเกิดโรคของยางพารา	8
1.4	แสดงลักษณะของซุโอสปอร์และการเจาะเข้าทำลาย	9
1.5	แสดงการตอบสนองของพืชเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภายนอก	12
1.6	แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก	19
1.7	แสดงองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืช	20
1.8	ขั้นตอนการเกิดสีน้ำตาล	22
2.1	แสดงตารางบนผิว Petroff Hausser counting	28
2.2	แสดงระยะของใบยาง	30
2.3	แสดงตำแหน่งการตัดใบยาง	30
2.4	แสดงขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัส	32
3.1	แสดงการเกิดรอยไหม้ตรงขอบใบโดยการทำให้เกิดบาดแผล	44
3.2	แสดงแถบไอโซไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ภายหลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600	45
3.3	แสดงลักษณะของใบยางเมื่อผ่านการบ่มด้วยซุโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	47

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
3.4	แสดงแถบไอโซไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสภายหลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยการบ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ	49
3.5	แสดงแถบไอโซไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสภายหลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการบ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ	50
3.6	แสดงลักษณะของใบยางพันธุ์ BPM-24 เมื่อผ่านการบ่มด้วย CuSO_4	52
3.7	แสดงแถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ภายหลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยการบ่มด้วย CuSO_4	54
3.8	แสดงแถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ภายหลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการบ่มด้วย CuSO_4	55
3.9	แสดงลักษณะแคลลัส	56
3.10	แสดงลักษณะเซลล์แขวนลอย	57
3.11	แสดงแถบเอนไซม์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จาก ใบ, เมล็ด และเซลล์แขวนลอยจากยางพาราพันธุ์ BPM-24	62
3.12	แสดงแบบแผนโปรตีนจาก filtrate ของเชื้อรา <i>P. palmivora</i>	64

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.13 แสดงไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเซลล์แขวนลอยภาย หลังผ่านคอลัมน์ conA-agarose	76
3.14 แสดงแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเซลล์แขวนลอย ที่ไม่ถูกกระตุ้นภายหลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic	80
3.15 แสดงแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเซลล์แขวนลอย ที่ถูกกระตุ้นภายหลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic	80
3.16 แสดงแถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์เปรียบเทียบระหว่างการทำ อิเล็กโตรโฟริซิสแบบไม่แปลงสภาพธรรมชาติและแบบแปลงสภาพธรรมชาติ	81
3.17 แสดงแบบแผนโปรตีนของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์หลังจาก ทำอิเล็กโตรโฟริซิสแบบแปลงสภาพและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท	81
3.18 แสดงตัวอย่างกราฟการหา Km และ Vm	83

รายการกราฟ

กราฟที่	หน้า
3.1 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผล	45
3.2 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
3.3 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	49
3.4 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CuSO_4	53
3.5 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CuSO_4	54
3.6 แสดงปริมาณโปรตีนค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ	60
3.7 แสดงปริมาณโปรตีนค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ	61
3.8 แสดงค่าปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดที่ปมด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	66

รายการกราฟ (ต่อ)

กราฟที่	หน้า
3.9 แสดงค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ฟีนอลลาซีนแอมโมเนียไลเอส เปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดที่ป้อนด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีน ต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	69
3.10 แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเปรียบเทียบระหว่าง ชุดควบคุมและชุดที่ป้อนด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	71
3.11 แสดงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุม และชุดที่ป้อนด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	73
3.12 แสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส หลังผ่านคอลัมน์ ion-exchange จากเซลล์แขวนลอยที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	78
3.13 แสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส หลังผ่านคอลัมน์ ion-exchange จากเซลล์แขวนลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย	79
3.14 เปรียบเทียบค่าความว่องไวของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ที่ pH ต่างๆ	85
3.15 เปรียบเทียบค่าความว่องไวของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ที่อุณหภูมิต่างๆ	87
3.16 แสดงค่าการยับยั้งปฏิกิริยาของ PPO1, PPO3 และ PPO4	89
3.17 แสดงค่าการกระตุ้นปฏิกิริยาของ PPO1, PPO3 และ PPO4	90

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

BSA	=	Bovine serum albumin
°C	=	Degree celsius
DEAE	=	Diethylaminoethyl
EDTA	=	Ethylenediaminetetra acetic acid
fresh wt	=	Fresh weight
g	=	Gram
kDa	=	Kilodalton
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
nmole/g	=	Nanomole per gram
µg	=	Microgram
µl	=	Microliter
µm	=	Micron
µM	=	Micromolar
O.D.	=	Optical density
pH	=	-log hydrogen ion concentration
PAL	=	Phenylalanine ammonia lyase
PDA	=	Potato dextrose agar
PDB	=	Potato dextrose broth
POD	=	Peroxidase (o-dianisidine as substrate)
PPO	=	Polyphenoloxidase
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sp/ml	=	Spore per milliliter
TEMED	=	N,N,N,N,-tetramethylenediamine
Tris-HCl	=	Tris(hydroxymethylaminomethane) hydrochloride
UV	=	Ultraviolet

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

β	=	Beta
%	=	Percent
w/v	=	Weight per volume
α	=	Alpha
h	=	hour

บทที่ 1

บทนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจ ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศและชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรกว่า 6 ล้านคน หรือร้อยละ 10 ของประชากรทั้งประเทศ ปัจจุบันประเทศไทยผลิตยางพาราธรรมชาติได้มากที่สุดในโลก เนื้อที่ปลูกประมาณ 12.38 ล้านไร่ แหล่งปลูกยางที่สำคัญอยู่ทางภาคใต้ ซึ่งปัจจุบันมีอัตราการขยายตัวต่ำ สำหรับแหล่งปลูกยางใหม่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สามารถขยายพื้นที่ปลูกได้อีกมาก

ผู้ปลูกยางมักประเมินว่าพื้นที่ที่ปลูกยางของตนมีโอกาสน้อยที่จะพบสภาพขึ้นจัดครั้งละหลายวันต่อเนื่องกัน และต้องการได้น้ำอย่างสูงสุด จึงมักเลือกพันธุ์ RRIM600 แต่ยางพันธุ์นี้ค่อนข้างอ่อนแอต่อราสีชมพู อ่อนแอปานกลางต่อราแป้งหรือใบจุดออยเตียม และโรคใบจุดคอล-เลทโตตรีคัมหรือใบจุดหนู อ่อนแอมากต่อโรคใบร่วงและโรคเส้นดำ บางครั้งยางพันธุ์นี้ใบร่วงหมดสวนเป็นพื้นที่กว้างขวางเหมือนผลัดใบในฤดูแล้ง ทำให้ผลผลิตเสียหายมาก ซึ่งสาเหตุของโรคจะเกิดจากไฟทอปทอรา (*Phytophthora*)

ไฟทอปทอรา มีบทบาทสำคัญทางด้านโรคพืชมากที่สุด นอกจากมีพืชอาศัยที่สำคัญทางเศรษฐกิจจำนวนมากแล้ว ยังเข้าทำลายระบบรากและโคนต้นของไม้ผลขนาดใหญ่ ทำให้ต้นโทรมหรือตายไป เช่น ทูเรียน ยาง เป็นต้น อาการของโรค คือ ใบยางจะร่วงทั้งที่มีสีเขียวสดหรือสีเหลือง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ โดยมีลักษณะเด่นที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน คือ มีรอยขีดดำตรงบริเวณก้านใบ และที่จุดกึ่งกลางของรอยขีดจะมีหยดน้ำยางสีขาวเกาะติดอยู่เมื่อนำใบยางที่ร่วงขึ้นมาสลัดเบา ๆ ใบย่อยจะหลุดทันที ซึ่งต่างกับใบยางที่ร่วงหล่นตามธรรมชาติ ต้นยางที่เกิดโรคใบร่วงนี้แล้ว จะไม่ผลิใบยางออกมาใหม่ในปีนั้น ๆ (ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่แตกต่างจากต้นยางที่เป็นโรคใบร่วงซึ่งเกิดจากสาเหตุอื่น) แต่จะผลิใบใหม่ตามปกติเมื่อถึงฤดูผลิใบของปีถัดไป ยกเว้นต้นยางที่เป็นโรคใบร่วงจนหมดต้น ซึ่งจะผลิใบใหม่ขึ้นมาทดแทนเพียงเล็กน้อย ประมาณ 5% ของพุ่มใบปกติเท่านั้น ถ้าเป็นผลยางที่ถูกทำลายจะเน่าดำค้างติดอยู่บนต้นเป็นเวลานาน ไม่แตกและร่วงหล่นตามธรรมชาติ ยางพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้ได้แก่ RRIM600

โรคนี้แพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกยางทั่วไปโดยเฉพาะในเขตที่เกิดโรคใบร่วง และผลเน่าระบาดเป็นประจำทุกปี เช่น ในเขตภาคใต้ฝั่งตะวันตก ได้แก่ จังหวัดระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง และ สตูล ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี และ ตราด นอกจากยางพาราแล้วเชื้อราสกุลนี้ยังสามารถแพร่ระบาดได้ในพืชชนิดอื่น เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่ง ส้ม มะละกอ ยาสูบ ทูเรียน และผลไม้เมืองร้อนบางชนิดในเอเชีย (เบ็ญจมาศ, 1999) การแยกเชื้อ

ให้บริสุทธิ์สำหรับงานวิจัยต้องใช้อาหารและวิธีการจำเพาะ การจำแนกนอกจากใช้ลักษณะที่แตกต่างกันของ sporangium แล้วบางครั้งยังต้องศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง (35 องศาเซลเซียส) ด้วย ไฟทอปทอราเก็บได้ดีในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ หรือบนอาหาร oat agar ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส

ในธรรมชาติพืชจะมีโครงสร้างและส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการป้องกันตนเองต่อเชื้อโรค ซึ่งประกอบด้วยสิ่งกีดขวางทางกายภาพ (physical barrier) และสิ่งกีดขวางทางเคมี (chemical barrier) สิ่งกีดขวางทางกายภาพที่มีอยู่ในธรรมชาติได้แก่ ขี้ผึ้งคลุมใบและผล ความหนาของคิวตินและความเหนียวของผนังเซลล์ด้านนอก ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจาะผ่านเข้าสู่พืชได้ (ธรรมศักดิ์, 1986 ประสาทพร, 1991) เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่พืชโดยการเจาะผ่านโครงสร้างของพืช พืชจะมีปฏิกิริยาโต้ตอบการเข้าทำลายของเชื้อโรคที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว (rapid active resistance) และอย่างช้าๆ (delayed active resistance) ปฏิกิริยาโต้ตอบที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ได้แก่ การสร้าง cork layers การเกิด abscission regions การสร้าง tyloses และ gum การโป่งออกของเซลล์ epidermis หรือเกิดปลอกห่อหุ้ม (sheath) เส้นใยของเชื้อ (ไฟโรจน์, 1982; ประสาทพร, 1991) การทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตายเรียกว่า hypersensitive cell death (Dufrenoy, 1936) โดยสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis) การสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ เรียกว่า ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) (Hahlblock, 1989) เกิดกระบวนการ lignification เพื่อกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามต่อไปยังเซลล์ข้างเคียง (Friend และคณะ, 1973) และเกิดการซ่อมแซมผนังเซลล์ของพืชให้แข็งแรงขึ้น ส่วนปฏิกิริยาโต้ตอบที่เกิดขึ้นได้อย่างช้าๆ ทางเคมี ได้แก่ การสร้างโปรตีนขึ้นมาทำลายเชื้อโรคที่เรียกว่า pathogenesis related-proteins (PR-proteins) ได้แก่ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β -1,3-glucanase) และไคตินเนส (kitinase) (Linthorst, 1991) และ การเกิดกลไกที่เรียกว่า Systemic Acquired Resistance (SAR) (Guest และ Brown, 1997) เป็นต้น

Hypersensitive cell death คือการตายอย่างรวดเร็วของเซลล์พืชเมื่อมีเชื้อเข้าสู่พืช ทั้งนี้เพื่อไม่ให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ hypersensitive cell จะผลิตสารประกอบพวกไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) ออกมา ซึ่งได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารเหล่านี้ไม่เพียงแต่เป็นพิษต่อเชื้อแต่เป็นอันตรายต่อเซลล์พืชด้วย การเกิด hypersensitive cell death และไฟโตอเล็กซิน เป็นปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพืชกับเชื้อโรคที่เซลล์ของพืชจะตายอย่างรวดเร็ว เซลล์ที่เกิด hypersensitive นี้จะสร้างไฟโตอเล็กซิน ซึ่งจะไม่พบในพืชที่เป็นปกติ แต่สารพิษนี้จะสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อเซลล์ของพืชถูกกระตุ้นหรือชักนำโดยอิลิซิเตอร์ (elicitor) ที่ pathogen ปล่อยออกมา

ไฟโตเล็กซิน จะถูกสร้างขึ้นทั้งในพืชที่เป็น host และ non-host ทั้งในพืชที่อ่อนแอหรือต้านทานต่อเชื้อโรคสะสมและสร้างอยู่ในพืชจนถึงระดับความเข้มข้นที่จะก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคในพืชได้ และส่วนมากจะเป็นสารพวกสารประกอบฟีนอลิกในพืชแต่ละชนิดจะมีการผลิตไฟโตเล็กซินที่แตกต่างกัน การชักนำให้พืชสร้างไฟโตเล็กซินนั้นเป็นผลดีในด้านการต้านทานโรค บทบาทสำคัญของไฟโตเล็กซินต่อการทำให้พืชเกิดความต้านทานได้นั้นพอที่จะกล่าวได้ดังต่อไปนี้ 1. ในพืชที่เชื้อเข้าทำลายหรือเกิดบาดแผล โดยมากจะมีการสะสมของสารประกอบซึ่งมีคุณสมบัติของไฟโตเล็กซิน 2. โดยทั่วไป การสะสมไฟโตเล็กซินในพืชที่ต้านทานจะเกิดเร็วและมีปริมาณมากกว่าในพืชที่อ่อนแอ 3. pathogen สามารถลดประสิทธิภาพของไฟโตเล็กซินให้เป็น nontoxic product การป้องกันโรคของพืชอาจจะเกิดจากลักษณะโครงสร้างของพืชเองหรือปฏิกิริยาทางชีวเคมีในเซลล์และวิถีสำคัญที่เกี่ยวข้องต่อระบบป้องกันของพืชคือ phenylpropanoid pathway เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia lyase; PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกของ pathway เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสจึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคของพืช โดยสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารต่างๆ เช่น สารในกลุ่ม phenylpropanoid และ pyruvic acid นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสยังสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ต่อไปนี้ด้วย : เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD) เอนไซม์แคตตาเลส (catalase; CAT) เอนไซม์ซินนามิล โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (cinnamyl CoA dehydrogenase; CAD) เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase; PPO) และ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD)

จากรายงานของ Jung และคณะ (2004) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และ เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส ในพืชอาศัยที่บ่มด้วยเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในพริกไทย (*P. capsici*) แล้วเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งบ่มด้วยเชื้อรา *P. capsici* ร่วมกับเชื้อ *Paenibacillus illinoisensis* ซึ่งเป็น antagonist พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสลดลงในช่วงแรก แล้วจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นหลังจาก 3 วันที่เชื้อราเข้าทำลาย ซึ่งตรงกันข้ามกับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส แต่สำหรับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง พืชใช้เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสเพื่อนำเข้าสู่ขบวนการ phenylpropanoid แล้วเกิดการโพลีเมอไรซ์เพื่อสร้างลิกนินโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส Hanower และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงสารประกอบฟีนอลิกในน้ำยางของยางพาราพันธุ์ PR107 และพบสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณ 160 ถึง 1100 ไมโครกรัม ซึ่งปริมาณจะแปรเปลี่ยนไปตามฤดูกาล สารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากน้ำยาง คือ vanillic, salicylic, syringic, gentisic, *p*- and *m*-hydroxybenzoic and protocatechuic acids;

scopoletin, esculetin and coumarin; ferulic, sinapic, caffeic, *o*- and *p*-coumaric acids; quercetin and kaempferol; tyrosine and dihydroxyphenylalanine flavans และ tannins

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส พบได้ในพืชชั้นสูงเกือบทุกชนิด (Hisae และ Yukio, 2006) จากรายงานที่ผ่านมาของ Cho และคณะ (2003) ได้กล่าวว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ในเซลล์พืชนั้นได้ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณบ่งบอกให้รู้ว่าพืชได้รับเชื้อโรคหรือมีบาดแผลเกิดขึ้นโดยการเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์ *o*-diphenol ไปเป็น *o*-quinones ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อโรค (Mathes, 1983) เมื่อไม่นานมานี้ Li และ Steffens (2002) ได้แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบคุ้มกันโรคของพืชโดยศึกษาจาก ผลมะเขือเทศที่ได้รับเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. พบว่า ผลมะเขือเทศที่ได้รับเชื้อจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส มากกว่าผลมะเขือเทศปกติ ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับ Hisae และ Yukio (2006) ที่ได้ศึกษาการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส บริเวณ micropylar endosperm ซึ่งเป็นบริเวณที่ได้รับบาดแผลจากการตัดและรอยแตกออกตามธรรมชาติ (เนื่องจากการเจริญเติบโต) พบว่า บริเวณที่ใกล้กับรอยแตกและตัดจะมีปริมาณเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่มากกว่าบริเวณที่ไกลออกไป และเมื่อนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพธรรมชาติ (SDS-PAGE) แล้วนั้นพบว่า บริเวณที่ใกล้กับรอยแตกจะมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เพิ่มจากบริเวณที่ไกลออกไปอีก 1 ไอโซไซม์

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้สนใจที่จะศึกษาถึง kinetics ของเอนไซม์ฟีนอลานิน-แอมโมเนียไลเอสและ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส รวมทั้งศึกษาถึงสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบป้องกันของยางพารา ตลอดจนศึกษาการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน of เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่เกิดจากระบบป้องกันของยางพาราและคุณสมบัติจำเพาะของไอโซไซม์นั้นๆ

การตรวจเอกสาร

1.1 ยางพารา

พืชในสกุลฮีเวีย (*Hevea*) หรือสกุลยางจัดอยู่ในพืชวงศ์ Euphorbiaceae พืชสกุลนี้มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปอเมริกาใต้และมีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาค่อนข้างแปรปรวนสามารถแพร่กระจายพันธุ์ได้ในระบบนิเวศวิทยาที่มีความหลากหลายรูปแบบ พืชในสกุลนี้มีประมาณ 9 ชนิดที่รู้จักกันดี คือ *Hevea benthamiana*, *Hevea brasiliensis*, *Hevea collina*, *Hevea quianensis*, *Hevea confuse*, *Hevea pauciflora*, *Hevea spruceana*, *Hevea microphylla* และ *Hevea nilida* บางพันธุ์มีคุณลักษณะพิเศษสามารถอาศัยในสภาพภูมิประเทศที่มีวงจำกัด แต่บางพันธุ์อ่อนแอต่อสภาพแวดล้อม พืชสกุลฮีเวียจะมีน้ำยางในทุกส่วน

ของต้น ใบประกอบด้วย 3 ใบย่อย ขอบใบเรียบ มีก้านใบย่อยและปลายก้านใบย่อยจะมีต่อมน้ำหวาน ปรากฏให้เห็น ดอกเพศผู้และเพศเมียจะอยู่ในช่อดอกเดียวกัน ช่อดอกเป็นแบบ panicle cyme ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 5 แฉกแต่ไม่มีกลีบดอกให้เห็น เกสรตัวผู้มี 5-10 อัน ก้านเกสรตัวผู้จะรวมเป็นแท่ง ยอดเกสรตัวเมียมี 2 แฉก ผลมีเปลือกแข็งโดยธรรมชาติสามารถแตกแยกออกได้เอง (รูปที่ 1.1) ยางพาราที่นิยมปลูกในประเทศไทย ในทางพฤกษศาสตร์ได้จัดอนุกรมวิธานของต้นยางพารา ดังนี้

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Rosidae

Order : Euphorbiales

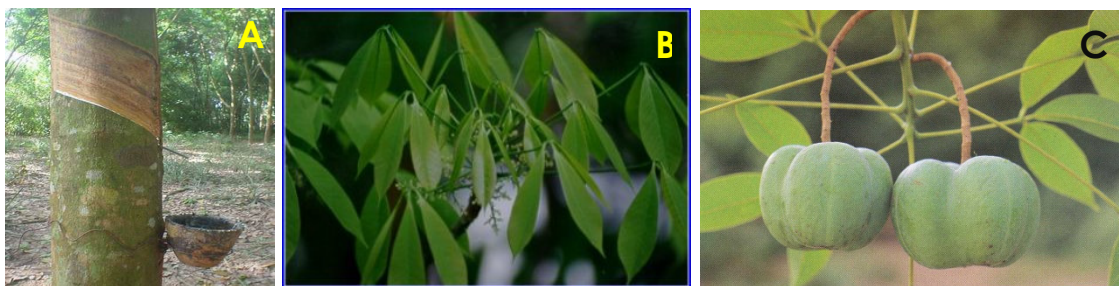
Family : Euphorbiaceae

Genus : *Hevea*

Species : *Hevea brasiliensis*

ในยางพารามีการศึกษากลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเป็นครั้งแรกโดย Tan และ Low (1975) พบว่าหลังจากใบยางติดเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* จะมีการสะสมสารเรืองแสงสีน้ำเงิน (สารเดิมไม่มีสี) ต่อมาก็ได้มีการศึกษาเพิ่มเติม โดยนำใบยางพารามาบ่มด้วยเชื้อรา *Microcyclus ulei* พบว่าสารเรืองแสงดังกล่าวคือ hydroxy coumarin และให้ชื่อว่า สคอพอลิติน (scopoletin) (Giesemann และคณะ, 1986) ซึ่งการสะสมสคอพอลิตินจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Garcia และคณะ, 1995) แต่ใบยางที่ติดเชื้อรา *Corynespora cassiicola* พบว่าความเข้มข้นของสคอพอลิตินในใบยางพันธุ์อ่อนแอมี่ปริมาณสูงกว่าในพันธุ์ต้านทาน (Breton และคณะ, 1997) ซึ่งตรงกันข้ามกับเชื้อก่อโรคนิยางพาราตัวอื่นๆ เช่น เชื้อรา *P. palmivora* ที่เหนียวนำไปผลิตสคอพอลิตินในใบยางพารา 4 พันธุ์ แล้วสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ นั่นคือ พันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ PB235 (พันธุ์อ่อนข้างต้านทาน) ผลิตสคอพอลิตินได้สูงกว่าพันธุ์ RRIT251 (พันธุ์อ่อนข้างอ่อนแอ) และพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) (Churngchow และ Rattarasarn., 2001) เช่นเดียวกับการใช้อีลิซิเตอร์ของเชื้อรา (อีลิซิติน; elicitin) สามารถกระตุ้นทั้งข้อปล้องและ

แคลลัสจากเมล็ดอ่อน ให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในพันธุ์ค่อนข้างต้านทาน (GT1) มากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) และอัตราเร็วในการสร้างสคอพอลิตินสูงกว่าการกระตุ้นด้วยซุโอสปอร์ (พันธุ์วศรี, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการบ่มใบยางด้วยเชื้อรา *P. botryosa* ที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา พบว่า การสังเคราะห์สคอพอลิติน มีปริมาณและอัตราเร็วแปรผันตามความต้านทานโรคของใบยาง คือ พันธุ์ BPM-24 สูงกว่า พันธุ์ RRIM600 (นิลุบล, 2002)



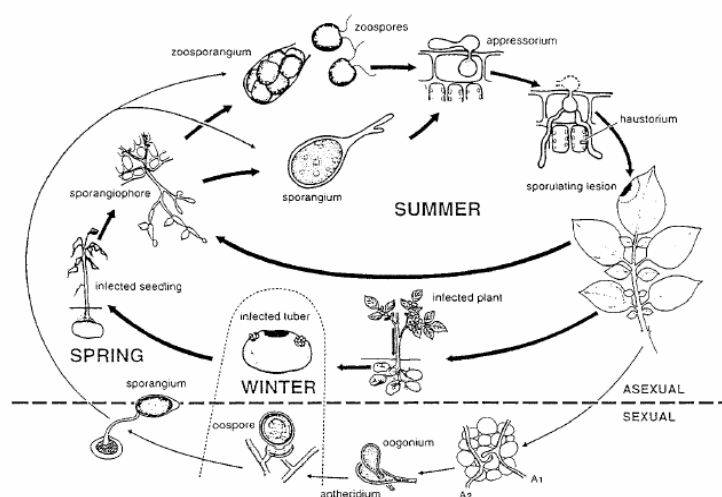
รูปที่ 1.1 แสดงส่วนประกอบของยางพารา ได้แก่ A) ต้นยางพารา B) ดอกยางพารา
C) ผลยางพารา

1.2 เชื้อไฟทอปทอรา

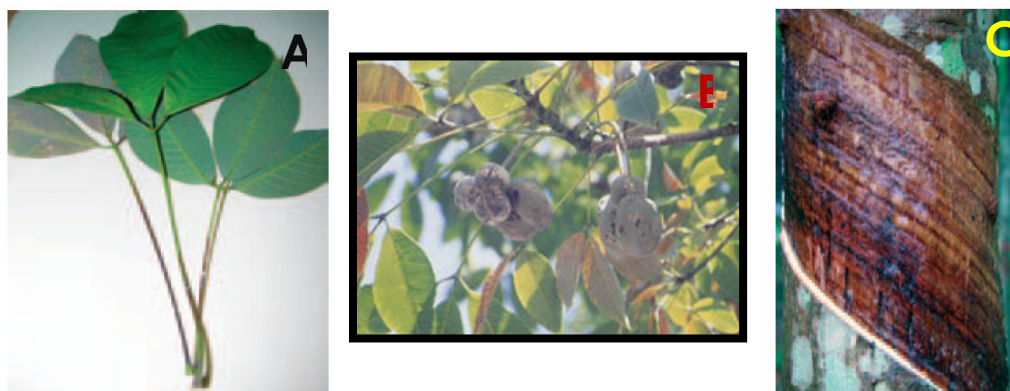
เชื้อไฟทอปทอรา จัดอยู่ใน Class Oomycetes เป็นเชื้อราในกลุ่มเดียวกันกับ Zygomycetes ลักษณะทั่วไปคล้ายกับ Zygomycetes ยกเว้น asexual spores เป็นชนิดที่ว่ายน้ำได้ (zoospore) และสร้าง sexual spores จากการผสมกันของ oogonium และ antheridium ซึ่งมีขนาดต่างกัน เรียกว่า oospores (รูปที่ 1.2) เชื้อราใน class นี้มีหลายชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ตัวอย่างเช่น โรคราสนิมขาว (white rust) ของผักชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากเชื้อ *Albugo* spp. โรคราน้ำค้าง (downy mildews) โรคกล้าเน่า (damping off) จากเชื้อ *Pythium* spp. โรคไหม้ในมันฝรั่ง (potato late blight) จากเชื้อ *Phytophthora infestans* เป็นต้น การแพร่ระบาดของโรคจะแพร่โดยน้ำจะพัดพาสปอร์ของเชื้อราไป เชื้อจะเข้าทำลายส่วนที่เป็นผล ยอด ก้านใบ และแผ่นใบทางด้านรูใบ ตามลำดับ ในกรณีที่เป็นยางอ่อนยังไม่ให้ผล เชื้อราจะเข้าทำลายยอดอ่อนก่อน แล้วจึงลุกลามไปยังก้านใบ และแผ่นใบในที่สุด (รูปที่ 1.3, 1.4) ประภา และคณะ (1997) ศึกษาความต้านทานเชื้อไฟทอปทอราของยางลูกผสมของไทยพันธุ์ KRS ชุด 200 ซึ่งผ่านการคัดเลือกขั้นต้นและอยู่ระหว่างการเปรียบเทียบพันธุ์อย่างชั้นปลาย 10 พันธุ์ รวมพันธุ์ KRS250 อีก 1 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM600 และ GT1 โดยใช้วิธีการของ Chee (1969) ในสภาพห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบพบว่า พันธุ์ยางแสดงความต้านทานต่อเชื้อไฟทอปทอราแตกต่างกันทางสถิติ และสามารถแบ่งความต้านทานเชื้อของพันธุ์ยางออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่อ่อนแอ มี 5 พันธุ์ รวมทั้งพันธุ์ RRIM600 และกลุ่มที่ต้านทานมี 8 พันธุ์ รวมทั้งพันธุ์ GT1 ประภา และคณะ (2000) ศึกษาความต้านทานโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปทอรา

ของยางพันธุ์ RRIT 250 และ RRIT 251 ซึ่งเป็นพันธุ์ยางแนะนำชั้นสอง และจะเลื่อนชั้นเป็นพันธุ์ยางชั้นหนึ่งเพื่อให้ได้ข้อมูลนำไปประกอบการพิจารณาจัดทำพันธุ์ยางแนะนำ โดยปลูกเชื้อ *Phytophthora botryosa* No. 2 กับก้านใบของยางทั้งสองพันธุ์เปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) และสงขลา 36 (ต้านทานปานกลาง) โดยแช่โคนก้านใบในสารแขวนลอยของเชื้อ *P. botryosa* No. 2 เป็นเวลา 6 วัน ผลการทดลองพบว่าพันธุ์ยางมีความต้านทานเชื้อแตกต่างกัน และสามารถจัดระดับความต้านทานได้เป็น 3 ระดับ คือ ระดับต้านทานคือ พันธุ์ RRIT251 ระดับต้านทานปานกลางคือพันธุ์ RRIT250 และสงขลา36 และระดับอ่อนแอคือ พันธุ์ RRIM600

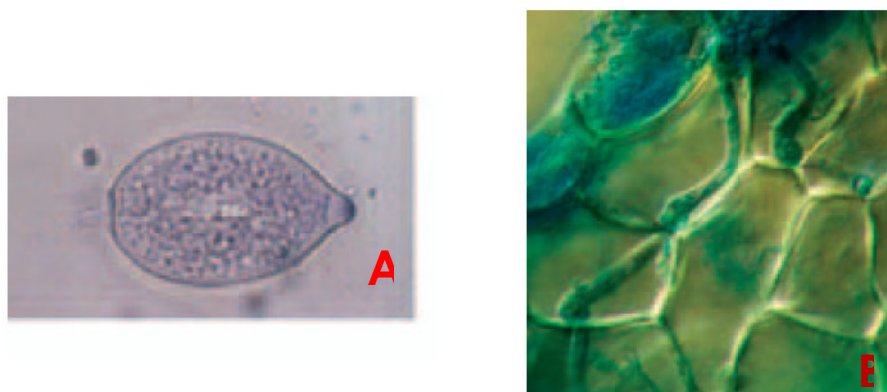
โดยทั่วไปแล้วเชื้อรากลุ่มไฟทอปทอรา เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมจะผลิตโปรตีนขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตันแล้ว ให้ชื่อรวมว่า อิลิซิดิน โดยอิลิซิดินที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ให้ชื่อว่า palmivorein (Chungchow และ Rattarasarn, 2000) และเมื่อนำโปรตีนดังกล่าวมากระตุ้นใบยางพบว่าปฏิกิริยาตอบสนองของใบยางต่ออิลิซิดิน สอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้จากการบ่มใบยางด้วยชูโอสปอร์ กล่าวคือ เกิด hypersensitive cell death ในพันธุ์ต้านทาน และเกิด disease lesion ในพันธุ์อ่อนแอ และพบว่ามีการสร้างสคอพอลิตินและ PR-proteins โดยในพันธุ์ต้านทานจะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างในอัตราที่เร็วกว่าทำให้มีปริมาณมากกว่าในพันธุ์อ่อนแอ เนื่องจากอิลิซิดินเป็นโปรตีนจึงทำให้ควบคุมปริมาณได้ง่ายกว่าการนับชูโอสปอร์ และสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาการตอบสนองของใบยางได้เร็วกว่า จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการกระตุ้นปฏิกิริยาตอบสนองในยางพารา (Rattarasarn, 2003)



รูปที่ 1.2 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อรา *Phytophthora infestans* (Drenth, 1994)



รูปที่ 1.3 แสดงลักษณะการเกิดโรคของยางพารา A) โรคใบร่วง B) โรคผลเน่า C) โรคเส้นดำ



รูปที่ 1.4 แสดงลักษณะของซุโอสปอร์และการเจาะเข้าทำลาย A) sporangium ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* B) เซลล์บริเวณใบทุเรียนภายหลังจากถูกเจาะด้วยซุโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* แล้วย้อมโดย lactophenol cotton blue (ภาพขยาย 400 เท่า)

1.3 อิลิซิทิน

เป็นชื่อเรียกโดยรวมของกลุ่มโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กพบในสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อรา หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ของเชื้อรากลุ่มไฟทอปทอรา โดยผลิตและส่งออกนอกเซลล์ (Huet และ Pernollet, 1989) อิลิซิทินจัดเป็นอิลิซิเตอร์ชนิดหนึ่งซึ่งอิลิซิเตอร์มีอยู่ 2 ชนิด คือ ไบโอดีทอโรอิลิซิเตอร์ (สารที่มาจากเชื้อรา เชลลูโลสและโปรตีนจากเชื้อรา) และ อไบโอดีทอโรอิลิซิเตอร์ (แสง รังสีอัลตราไวโอเล็ตและไอออนจากโลหะหนัก) อิลิซิทินมีชื่อเรียกเฉพาะตามชนิดของเชื้อรา เช่น cryptogin เป็นอิลิซิทินที่ผลิตจาก *P. cryptogea* (Ricci และคณะ, 1989) cinnamomin ผลิตจาก *P. cinnamomi* (Billard และคณะ, 1988) capsicien ผลิต

จาก *P. capsici* (Huet และ Pernollet, 1989) และ palmivorein ผลิตจาก *P. palmivora* (Churugchow และ Rattarasarn, 2000) เป็นต้น จากรายงานของ Devergne และคณะ (1994) พบว่าหลังบ่มเชื้อรา *P. cryptogea* บนยาสูบผ่านไป 1 และ 2 วันพบการสร้าง crypogein ขึ้นบริเวณลำต้นและใบ จากการตรวจวัดด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่า อิลิซิดินทุกชนิดเป็นโปรตีนพิษขนาดเล็กประมาณ 10 กิโลดาลตันและเป็นโปรตีนที่ยังไม่ถูกเติมน้ำตาล เมื่อมีการปลดปล่อยอิลิซิดินที่ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อราในกลุ่มไฟทอปทอรา พบว่า อิลิซิดินอยู่ในรูป hydrophobic และมีความจำเพาะกับ สเตอรอล (sterol) ที่อยู่บริเวณด้านนอกของเยื่อหุ้มพลาสมาจนเกิดเป็นรูปร่างซับซ้อนระหว่างอิลิซิดินและสเตอรอล (Boissy และคณะ, 1996, Mikes และคณะ, 1998) กระตุ้นให้พืชเกิด hypersensitive response PR-proteins ไฟโต-อเล็กซิน และ SAR (Cordelier และคณะ, 2003)

1.4 ระบบป้องกันตัวเองของพืช (plant defense)

พืชมีระบบป้องกันตัว 2 แบบ คือ 1. constitutive defense response (ระบบป้องกันที่มีอยู่แล้ว) ระบบนี้จะทำงานอยู่ตลอดเวลา ซึ่งจะมีความจำเพาะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของพืช (species-specific) และระบบจะมีการเก็บรวบรวมสาร ซึ่งอาจใช้เป็น precursor สำหรับตอบสนองได้ทันทีที่มีการโจมตีเกิดขึ้น หรือเป็นสารทุติยภูมิที่เป็นพิษต่อเชื้อ เช่น การป้องกันเชิงกายภาพ คือ บริเวณชั้นคิวติเคิลและผนังเซลล์ จะมีสารจำพวก คิวติน แวกซ์ และ ชูเบอร์ลิน เคลือบอยู่เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเข้ามารุกราน และ 2. induced defense response (ระบบป้องกันที่สร้างขึ้นหลังได้รับเชื้อ) เป็นระบบที่เกิดขึ้นเมื่อตรวจพบการติดเชื้อซึ่งมีการตอบสนอง (รูปที่ 1.5) แบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ

1.4.1 Hypersensitive cell death (การตายอย่างว่องไวของเซลล์) เมื่อมีการรุกรานของเชื้อพืชจะมีการตอบสนองโดย receptor ที่รับรู้ถึงการบุกรุก ไปกระตุ้นให้มีการสร้าง reactive oxygen species ซึ่งได้แก่ O_2 radical hydrogenperoxide และ hydroxyl radicle ที่เป็นอนุมูลอิสระซึ่งจะแตกตัวเป็นลูกโซ่กับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ (Greenberg และ Yao, 2004) และโมเลกุลของเชื้อที่รุกรานเข้ามา ส่งผลให้บริเวณที่มีการตอบสนองมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ช่วยในการทำลายแหล่งอาหาร และยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้ออีกด้วย เรียกกระบวนการนี้ว่า programmed cell death แต่กระบวนการนี้ยังต้องอาศัยสารสัญญาณอีกอย่างคือ NO (nitric oxide) จึงจะประสบความสำเร็จ เมื่อภายในเซลล์มี NO และ reactive oxygen species เกิดขึ้น จะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ในวิถีการสังเคราะห์สารปกป้อง เช่น ลิกนิน ไฟโตอเล็กซิน กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ที่จะช่วยป้องกันและทำลายเชื้อโรค และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายเชื้อโดยตรงคือกลุ่ม

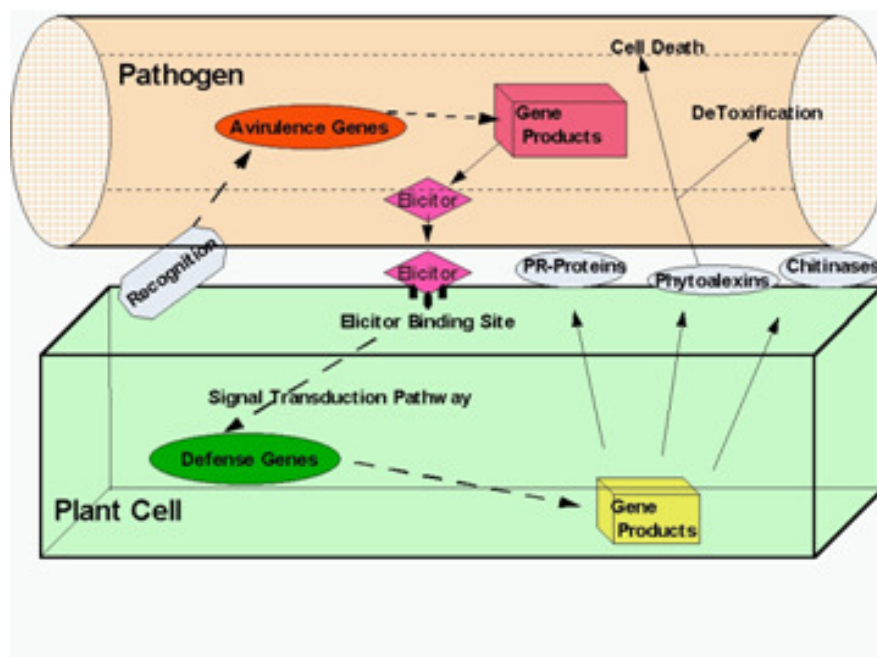
ของ hydrolytic enzyme จากการศึกษที่ผ่านมาของ Yoda และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษากการเกิด hypersensitive response ในใบยาสูบ ภายหลังกการกระตุ้นด้วย polyamines ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบการเจริญเติบโต พัฒนาการ และการตอบสนองจากการกระตุ้น (Walden และคณะ, 1997) พบว่า 2 วันภายหลังกการกระตุ้นจะมีเซลล์ตายเกิดขึ้นจากภายนอก แล้วแพร่เข้าสู่เซลล์ดี และจากรายงานของ นิลบล บุญหวังช่วย (2002) ได้ศึกษาการเกิดรอยไหม้บนใบยาง 2 สายพันธุ์ ระหว่างพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) และ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) โดยการปรบด้วยเชื้อสปอร์จากเชื้อรา *P. botryosa* พบว่า บริเวณที่วางเชื้อสปอร์ของใบยางสายพันธุ์ต้านทานจะเป็นจุดสีดำตามลักษณะของการเกิด hypersensitive cell death แต่บนใบยางสายพันธุ์อ่อนแอจะมีลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลขยายกว้างออกไป ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดโรค

1.4.1.1 ไฟโตอิเล็กซิน เป็นสารปฏิชีวนะที่พืชสร้างขึ้นและสะสมอยู่รอบๆ แผลหรือบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย ซึ่งเป็นพืชต่อเชื้อรา มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบที่พบเฉพาะในพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคหรือถูกกระตุ้นจากอิทธิพลของชนิดต่างๆ ทั้ง ไบโอติก (biotic) และอไบโอติก (abiotic) (Snyder และ Nicholson, 1990) ไฟโตอิเล็กซินส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งที่เป็น compatible และ incompatible host-pathogen combination สามารถแยกออกมาจากราก ลำต้น ใบ และผลที่เกิดจากการติดเชื้อ มีโครงสร้างที่แตกต่างกันมากกว่า 350 แบบ จากพืชมากกว่า 30 ชนิด พบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ มีชื่อเฉพาะที่แตกต่างกันออกไป เช่น ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) เฟสลิโอลิน (phaseolin) และ พิสซาติน (pisatin) ในพืชตระกูลถั่ว เทอเพินอยด์ (terpenoids) และแคปซิดิโอล (capsidiol) ในพืชตระกูลยาสูบ เป็นต้น

1.4.1.2 Pathogenesis-Related proteins (PR-proteins) เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มีขนาดโมเลกุล 10-40 กิโลดาลตัน พบในพืชทั่วไป โดยที่พืชปกติมักพบ PR-proteins น้อยมากหรือแทบจะไม่พบเลย แต่จะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเพื่อต่อต้านและยับยั้งการถูกบุกรุกจากเชื้อโรคหรือภายใต้สภาวะกดดันอื่นๆ เช่น การเกิดบาดแผลและสารเคมีบางชนิด เช่น ฮอโรโมนเอทิลีน (ethylene hormone) (Boller, 1985) PR-proteins ที่พืชสร้างขึ้นมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่มีผลโดยตรงต่อเชื้อรา เช่น เอนไซม์ไคตินเนส เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เอนไซม์ไคโตแซนเนส (chitosanase) เอนไซม์โปรตีนเนส (proteinase) เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส Mauch และคณะ, 1988 รายงานว่า เอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากถั่วลิ้นเตาที่ติดเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Fusarium phasioli* เมื่อใช้ร่วมกันจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 15 ชนิดจากทั้งหมด 18 ชนิด แต่เมื่อใช้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เพียงอย่างเดียวจะสามารถยับยั้งเชื้อราได้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น ทั้งนี้อาจสรุปได้ว่า เอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถทำงานร่วมกันแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergistic)

1.4.2 Systemic Acquired Resistance (SAR) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังจากที่ได้รับสารสัญญาณที่มาจาก hypersensitive response สารดังกล่าวคือ กรดซาลิไซลิกจะส่งสัญญาณดังกล่าวไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิหรือ secondary metabolite เช่น พวกรส anthocyanin, limonene, menthol และ curcumin (ที่ในพืชบางชนิดได้มีการนำมาใช้ในรูปแบบของยาสมุนไพร) จากผลการวิจัยที่เกี่ยวกับความสามารถของสารเหล่านี้ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็น free radical-scavenger หรือ antioxidant chemoresistance agent และ antimutative agent อย่างกว้างขวาง พบว่ากระบวนการนี้เกิดขึ้นหลังกระบวนการติดเชื้อ (Lincoln และ Eduardo, 2006) ซึ่งจากผลการทดลองของ สมใจและสุตฤดี (2004) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียจากดินปลวกมีแนวโน้มเป็น PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเข้าครอบครองรากเพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของอะคาเซียและช่วยส่งเสริมการงอกและความแข็งแรงของราก (Shishido และ Chanway, 1998) และเชื้อ PGPR อาจไปชักนำให้พืชเกิดความต้านทานแบบ ISR (induced systemic acquired) หรือ SAR (systemic acquired resistance) (Van และคณะ, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bowen และ Rovira (1976) รายงานว่ากลไกสำคัญของเชื้อ PGPR ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตโดยไปช่วยเปลี่ยนหรือลดความสามารถของการครอบครองรากของจุลินทรีย์อื่น การที่เชื้อจะประสบความสำเร็จเช่นนี้ได้ต้องมีปริมาณสูงมากพอจะต้องให้เชื้อใกล้กับเมล็ดของพืชมากที่สุด และเจริญรอบรากได้อย่างทั่วถึง

ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ก่อโรคกับการตายของเซลล์ในใบยาสูบนั้น พบว่าเมื่อเกิดการตายของเซลล์หลังจากการบ่มเชื้อ *Thielaviopsis basicola* จะต้องมีการกระตุ้นให้เกิด SAR ด้วย ในขณะที่การชักนำให้เกิด SAR จากตัวกระตุ้นภายนอก เช่น กรดซาลิไซลิก ไม่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ จากเหตุผลนี้ชี้ให้เห็นว่าสารประกอบที่กระตุ้นวิถีการเกิด SAR อยู่ต่ำกว่าวิธีที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Hunt และคณะ, 1996)



รูปที่ 1.5 แสดงการตอบสนองของพืชเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภายนอก

1.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ ที่สามารถนำชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น อวัยวะต่างๆ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือ โปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ที่ปลอดเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงอาจอยู่ในรูปอาหารวุ้น หรืออาหารเหลว ซึ่งทำการเลี้ยงโดยการเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า อาหารที่ใช้เลี้ยงมีองค์ประกอบของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง ธาตุเหล็ก วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงประกอบด้วยแสง อุณหภูมิ และความชื้นแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช หากเป็นพืชเมืองหนาวควรจะวางเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าพืชเมืองร้อน โดยห้องที่วางเลี้ยงต้องควบคุมอุณหภูมิได้ มีความเข้มแสงในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญในระยะต่างๆ ตามที่พืชต้องการ การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถให้พืชต้นใหม่ได้จำนวนมากในระยะเวลานับวัน จึงได้นำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรเพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้นมามากมาย

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลานับวันเร็ว

- เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการผลิตพืชคือ โรค ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อแบคทีเรียและราเป็นอันดับแรก

- เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA recombination) และการย้ายยีน (gene transformation)

- เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน เราสามารถที่จะชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของเชื้อโรค ต้านทานต่อแมลง ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช เป็นต้น

- เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น

- เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช

- เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและทางสรีรวิทยาของพืช ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองเราสามารถที่จะติดตามการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและอย่างใกล้ชิด เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช ต่อเชื้อโรคและสารพิษจากโรค หรือต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้การควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ในหลอดทดลองกระทำได้ง่ายกว่าในแปลงทดลอง

- เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืชและแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์

1.5.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ แคลลัสประกอบด้วย เซลล์พาเร็นไคมาเพียงอย่างเดียว มีขนาดต่างๆ กัน มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ของแวคิวโอล (vacuole) สูง แคลลัสเกาะกลุ่มกันแน่น เราเรียกว่า compact callus ถ้าแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ เรียกว่า friable callus ภายในเซลล์ของแคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ (pigment) มีเป็นส่วนน้อยที่พบว่ามีสีเขียว เพราะมีคลอโรพลาสต์ สีเหลืองเพราะมีแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ สีม่วงเพราะมีแอนโทไซยานิน ซึ่งมีปริมาณและชนิดของรงควัตถุดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชาติอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยของแสง จากการศึกษาของ Sujaree Khamparat และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของหมากจอบ (*Scaphium macropodum* Beum.) โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนของหมากจอบ (*Scaphium macropodum* Beum.) ในสูตรอาหาร Woody

Plant Medium (WPM) ที่มีการเติม thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ทุกสูตรอาหารประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร polyvinylpyrrolidone (PVP) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำ 5 กรัมต่อลิตร และมี pH 5.2 พบว่า อาหารสูตร WPM ที่มี BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่มี TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ชิ้นส่วนพืช WPM ที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสขนาดใหญ่เฉลี่ย 1.91 ตารางเซนติเมตร และแคลลัสสามารถพัฒนาจากเมล็ดอ่อนได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในทุกสูตรอาหาร WPM ที่มีการเติม BA และ TDZ

ชิ้นส่วนของพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่ สามารถที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ จากรายงานพบว่า ส่วนที่ให้เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงสุดในพืชใบเลี้ยงคู่ คือ ส่วนของเอมบริโอ ใบเลี้ยง ลำต้น ส่วนใต้ใบเลี้ยง และราก ส่วนในพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว ส่วนของเอมบริโอ ใบอ่อน ดอกอ่อน และเมล็ดที่เพิ่งเริ่มงอกดีที่สุด (ประศาสตร์, 1991) ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส คือ เพื่อการขยายพันธุ์พืช (plant propagation) เพื่อใช้ในการผลิตโปรโตพลาสต์ (protoplast production) เพื่อการผลิตสารเคมีจากพืชในหลอดทดลอง เพื่อการผลิตพืชทนทาน (tolerance plant) และ เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistance plant) เป็นต้น

Rahman และ Punja (2005) ได้ทดลองบ่มแคลลัสของโสมด้วย chitosan elicitor และ mycelial fragment ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* พบว่ามีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกและมีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนของเอนไซม์ฟีนอลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และจากการศึกษาของพันธวิศรี (2004) เมื่อบ่มแคลลัสพันธุ์ GT1 (ค่อนข้างต้านทาน) และพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) ด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินจากเชื้อรา *P. palmivora* พบว่า ซูโอสปอร์สามารถกระตุ้นแคลลัสให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในพันธุ์ GT1 มากกว่าพันธุ์ RRIM600 โดยปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินแปรผันตรงกับระดับความต้านทานโรคของยางพารา นอกจากนี้หลังถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินพบว่า แคลลัสมีอัตราเร็วในการสร้างสคอพอลิตินสูงกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ รวมทั้งทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้เร็วกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์

1.5.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย หมายถึง การนำเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซลล์เล็กๆ (aggregated cells) มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะสมแก่การนำมาเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ แคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ ซึ่งเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน (ประศาสตร์, 1991) ดังเช่นการศึกษาของ วิลาลินี

และคณะ (2003) การทำการชักนำให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอยจากส่วนต่างๆ ของบูกเนื้อทราย พบว่า การเพาะเลี้ยงก้านใบและแผ่นใบของบูกเนื้อทรายบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสาร 2,4-D 0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะไม่ได้รับแสง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน แผ่นใบเจริญเป็นแคลลัสที่เกาะกลุ่มกันแน่น ได้ดีกว่าส่วนต่างๆ ของก้านใบ และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แผ่นใบสร้างแคลลัส คืออาหาร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นตัดแยกแคลลัสที่เกาะกลุ่มกันแน่นไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี 2,4-D 0.1, 0.2, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน พบว่าอาหารทุกสูตรชักนำให้แคลลัสที่เกาะกลุ่มกันแน่นเปลี่ยนแปลงไปเป็นแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ ได้ โดยอาหาร MS ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ ในอัตราสูงที่สุดคือ 35 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้แคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ไม่ได้รับแสง เมื่อนำ แคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเปลี่ยนอาหารทุก 7 วันสามารถชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยขนาดเล็กได้ดี

มีการศึกษาผลกระทบการตอบสนองในพืชโดยใช้เซลล์แขวนลอย เช่นงานวิจัยของ Klaus และคณะ (1981) ที่บ่มเซลล์แขวนลอยของผักชีฝรั่ง ด้วยอิทธิพลจากเชื้อรา *phytophthora megasperma* var. *sojae* พบว่าเซลล์แขวนลอยดังกล่าวถูกเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนอลานีนแอมโมเนียไลเอสสูงขึ้นในช่วงต้นๆ ของการทดลอง ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Gomez และคณะ (2004) ที่บ่มเซลล์แขวนลอยของมันสำปะหลังด้วยอิทธิพลที่แยกได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ (yeast cell wall glucan elicitor) และสามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยของมันสำปะหลังมีการสะสมของเอนไซม์ฟีนอลานีนแอมโมเนียไลเอสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยที่เห็นได้ชัดเจน คือ เพื่อการศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน เพื่อการผลิตสารเคมีบางชนิดในห้องทดลอง (secondary metabolites) เพื่อการผลิตเอมบริอยด์ และ เพื่อการผลิตพันธุ์ทนทานและพันธุ์ต้านทาน

1.6 การสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส

เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส (PAL : EC 4.3.1.5) เป็นเอนไซม์ตัวแรก (entry-point enzyme) ในขบวนการสังเคราะห์ phenylpropanoid เร่งปฏิกิริยาการกำจัดแอมโมเนีย โดยจะเปลี่ยน L-phenylalanine เป็น *trans*-cinnamate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการพอลิเมอไรซ์เป็นลิกนิน เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส พบได้ในพืชชั้นสูง (Chen และ McClure, 2000) ราและยีสต์ (D' Cunha และคณะ, 1996) ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส จะเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อพืชที่กำลังเจริญเติบโต และเมื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น การได้รับเชื้อรา ทองแดง (Cu) อุณหภูมิ แสง การเกิดบาดแผล และฮอร์โมน

จากงานวิจัยของ Laura และคณะ (2000) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสและสารประกอบฟีนอลิกในใบมะยม (*Phyllanthus tenellus* Roxb.) ภายหลังจากกระตุ้นด้วย CuSO_4 พบว่า จะมีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกบริเวณแวคคิวโอล (vacuole) ของ เซลล์สฟองจี (spongy cell) เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ขณะที่เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสจะเริ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน และจะสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นนี้ของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสนี้จะอยู่ที่บริเวณพาลิเสดเซลล์ (palisade cell) ซึ่งไม่ใช่บริเวณที่มีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิก สอดคล้องกับการศึกษาในดอกทานตะวัน (sunflower) ที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) 50 ไมโครโมลาร์ ภายใน 5 วัน จะสูญเสียน้ำในราก ความยาวของรากสั้นลง ทำให้น้ำหนักลดลง หลังจาก 10 วัน ก็ส่งผลให้โปรตีนลดลง 53% เนื่องจาก Cu ทำให้เมแทบอลิซึมของโปรตีนผิดปกติโดยจะรบกวนการทำงานของสารกลุ่มไทออล ทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress เกิดสารพวก active oxygen species และ H_2O_2 พืชก็จะตอบสนองด้วยการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม antioxidant ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส เอนไซม์แคตตาลเลส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส รวมถึงเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส เพื่อกำจัดสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ (Jouilli และ Ferjani, 2003)

Benkeblia (2000) ศึกษาการเก็บหัวหอม (onion) เป็นเวลานาน 20 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิต่างกัน (4, 20 องศาเซลเซียส) จะเห็นการเปลี่ยนแปลงความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก แตกต่างกัน คือ ใน 2 สัปดาห์แรกความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส จะเพิ่มขึ้นที่ 4 องศาเซลเซียส และลดลงที่ 20 องศาเซลเซียส แต่หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ เมื่อหัวหอมเริ่มแตกหน่อ เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง (20 องศาเซลเซียส) จะมีค่าความว่องไวสูงกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) และความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะลดลงเรื่อยๆ ส่วนการสะสมของสารประกอบ

ฟีนอลิกจะสูงขึ้นเมื่อผ่านไปเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ) จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำสามารถกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ ฟีนอลาซีนแอมโมเนียไลเอสให้สูงขึ้นเฉพาะในช่วงแรกเท่านั้น และสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของต้นหัวหอมได้ทุกช่วงอุณหภูมิ

Campos และคณะ (2004) ศึกษาเกี่ยวกับการสะสมของสารประกอบฟีนอลิก และการเกิดสีน้ำตาลควบคู่ไปกับการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนอลาซีนแอมโมเนียไลเอส โดยใช้น้ำในการกระตุ้นบริเวณที่เกิดบาดแผลของก้านผักกาดแก้วพบการสะสมสารประกอบฟีนอลิก การเกิดสีน้ำตาลและการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนอลาซีนแอมโมเนียไลเอส นั้นจะเพิ่มขึ้นในช่วง 16 ชั่วโมงแรกและจะลดลงภายใน 36 ชั่วโมง (Ke และ Saltveit, 1989, Tomás และคณะ, 1997)

1.7 การสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

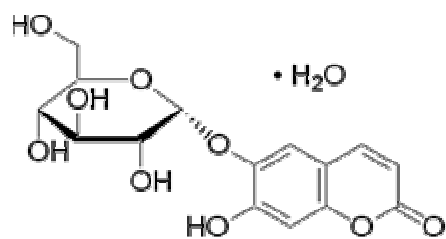
สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช เช่น กระบวนการเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate) ชิคิเมท (shikimate) และ ฟีนิล-โพรพานอยด์ (phenylpropanoid) Min และคณะ(2006) กล่าวว่าสารประกอบเหล่านี้มีความสำคัญต่อระบบสรีระ ฐานวิทยา การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ของพืช Lim และคณะ (2004) ยังพบว่า สารประกอบฟีนอลิกมีความสำคัญต่อระบบการป้องกันจากเชื้อก่อโรคของพืช เป็นสาร antioxidant รวมถึงเป็นสาร anticancer และสามารถต้านทานได้ดีต่อสภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมภายนอกได้ดี ในด้านอาหาร Macheix และคณะ (1990) ได้ศึกษาไว้ว่าในพืชแต่ละชนิดจะพบสารประกอบฟีนอลิกได้แตกต่างกันไป (รูปที่ 1.6, 1.7) ซึ่งจะเป็นสาเหตุของการทำให้เปลี่ยนสีจากสีปกติเป็นสีน้ำตาล ซึ่งในผักและผลไม้จะเป็นสาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนรสจากรสปกติให้เป็นรสขมได้

สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ แอนโทไซยานิน พบได้ทั่วไปในใบ ลำต้นและเปลือกของพืช กลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก จะอยู่ในรูปของการกำจัดอนุมูลอิสระ การให้ไฮโดรเจนอะตอม และการกำจัดออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน รวมทั้งการรวมตัวกับโลหะ Rubin และ Artsikhcoskays (1964) ได้อธิบายถึงความแตกต่างของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสะสมในพืชที่เป็นโรคว่ามีหน้าที่ให้หรือรับไฮโดรเจน ในปฏิกิริยา oxidation-reduction จะสร้าง lignin เป็น antiauxin ในการยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งสามารถแสดงปฏิกิริยาร่วมกับ auxin ในการกระตุ้นการเกิด oxidation ของ sulfhydryl group ได้

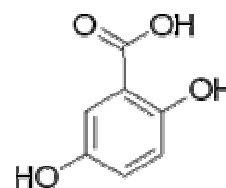
ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดเป็นสีน้ำตาลจะเกิดจากปฏิกิริยาที่เกิดจากการกระทำของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสหรือเอนไซม์ฟีนอลเอส (phenolase) เป็นต้น ปฏิกิริยาดังนี้ พบได้

ในผักผลไม้หลายชนิด เช่น กล้วยองุ่น เห็ด มันฝรั่ง แอปเปิล เมื่อเราปอกเปลือก ผัก ผลไม้นี้ทิ้งไว้จะเกิดสีน้ำตาลขึ้นที่ผิวนอก อันเป็นผลมาจากเอนไซม์ภายในเซลล์ของผลไม้สร้างสารประกอบฟีนอลิก เกิดเป็นสารประกอบพวกเมลานิน (melanin) ซึ่งมีสีน้ำตาล

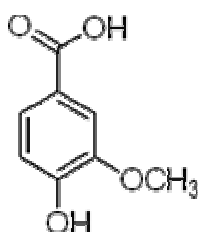
Mikal (2004) ได้ศึกษาถึงการเกิดสีน้ำตาลและการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกหลังจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีคือ 1-methylcyclopropene (1-MCP) ในปริมาณต่างๆ บริเวณของใบผักกาดแก้ว (*Lactuca sativa* L., iceberg) ที่ทำให้เกิดบาดแผลและกระตุ้นด้วยน้ำพบว่า จะมีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นหลังจากผ่านไปแล้ว 24 ชั่วโมงซึ่งส่งผลถึงการเกิดสีน้ำตาลที่มากขึ้นด้วย จากรายงานของ Luis Conceicao และคณะ (2006) ที่ได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของ สารประกอบฟีนอลิก ใน *Hypericum perforatum* ซึ่งปรากฏว่าเมื่อพืชถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, methyl-jasmonate (MeJ) และ salicylic acid (SA) จะมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้นและสะสมอยู่ในรูปของแซนโทน (xanthones) ฟลาโวนอล (flavonols) และ ฟลาโวนอน (flavonones) จะมีการสะสมมากที่สุดเมื่อผ่านไปแล้ว 5-7 วัน ซึ่งจากการศึกษาของ Hostettmann และ Hostettmann (1989) พบว่าแซนโทนสามารถแสดงถึง anti-fungal activity ได้เป็นอย่างดี รวมทั้งยังสามารถเป็นตัว antibacterial ได้อีกด้วย (Beerhues และคณะ, 2000., Braz, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Kejayasuriya และคณะ (2003) ที่ได้มีการศึกษาถึงการเกิดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำยางพารา 2 สายพันธุ์คือ PB86 (พันธุ์อ่อนแอ) และ RRIC100 (พันธุ์ต้านทาน) หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Phytophthora* (*Phytophthora meadii*) จะพบการเกิดสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราสายพันธุ์ RRIC100 (พันธุ์ต้านทาน) มากกว่า PB86 (พันธุ์อ่อนแอ) ซึ่งในยางพาราพันธุ์อ่อนแอจะมีสารประกอบฟีนอลิกสะสมอยู่ในรูปของ triterpenoids หรือ flavonoids และในยางพาราพันธุ์ต้านทานจะมีสารประกอบฟีนอลิกสะสมอยู่ในรูปของ vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) umbelliferone (7-hydroxycoumarin) ซึ่งจะสามารถยับยั้ง zoospore ของเชื้อรา *P. meadii* ได้ โดยที่ vanillin จะทำงานในการยับยั้งได้ดีกว่า umbelliferone



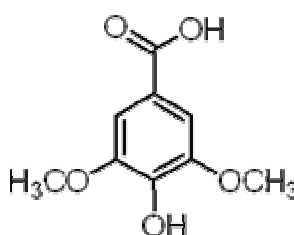
Esculetin



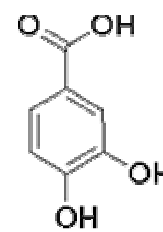
2,5-Dihydroxybenzoic acid



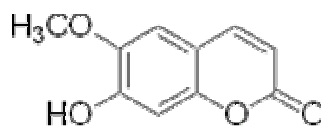
vanillic



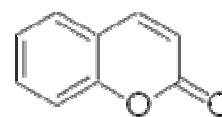
syringic acid



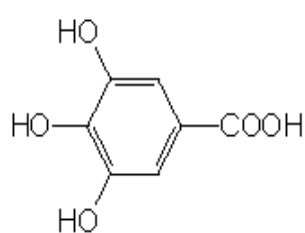
Protocatechuic acid



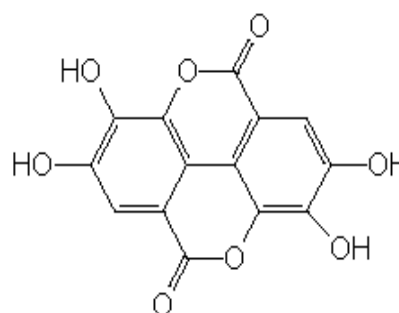
Scopoletin



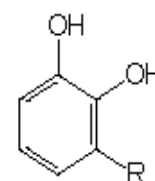
coumarin



Gallic acid

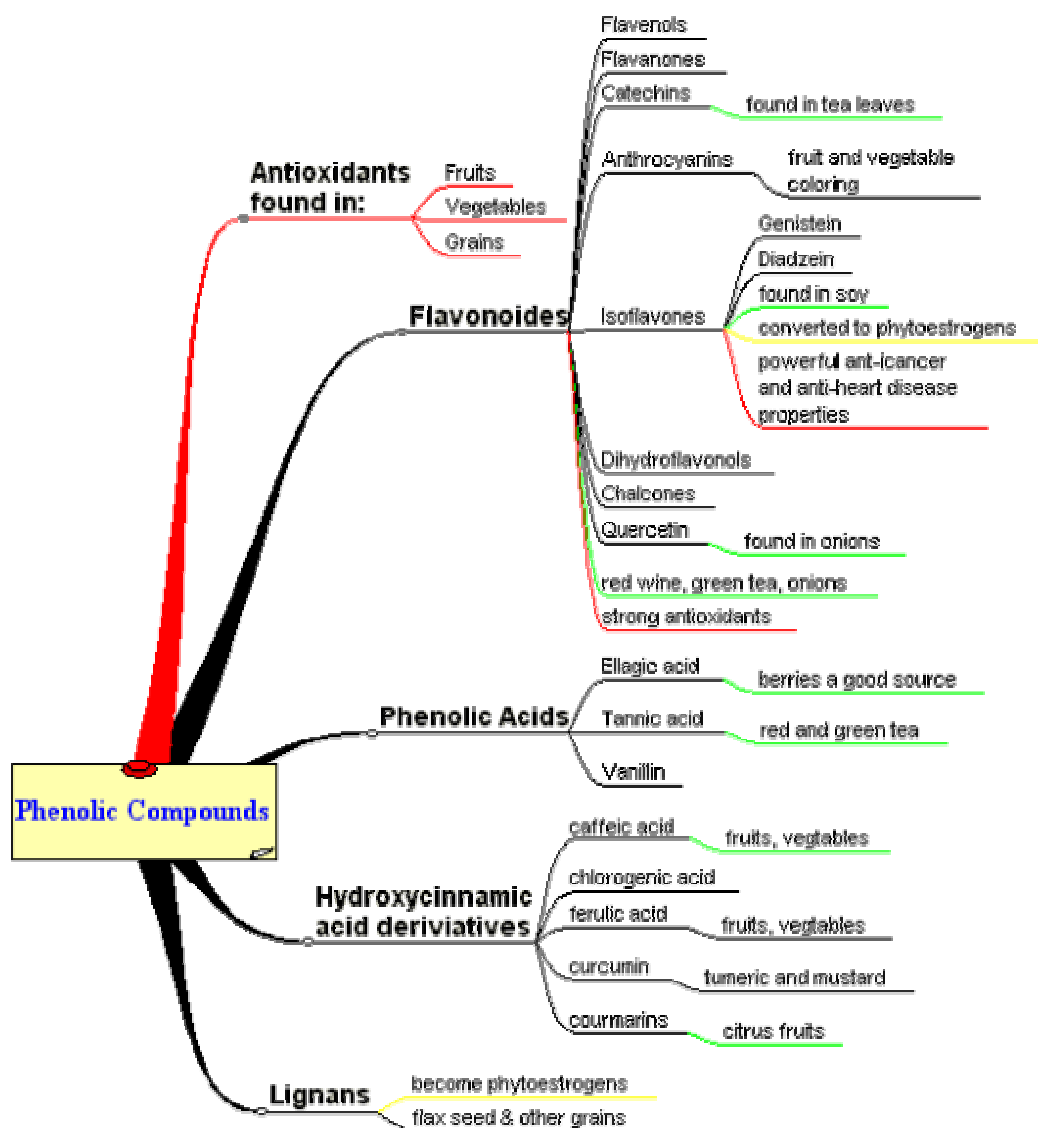


ellagic acid



urishiol

รูปที่ 1.6 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก



รูปที่ 1.7 แสดงองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืช

1.8 การสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (Polyphenoloxidase: 1,2-benzenediol: oxygen oxidoreductase; EC. 1.10.3.1) หรือที่รู้จักกันในชื่อ catechol oxidase, catecholase, diphenoloxidase, o-diphenolase, phenolase และ tyrosinase โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุล 40,680 – 58,082 กิโลดาลตัน (Whitaker, 1995) เป็นเอนไซม์ที่ต้องการโลหะทองแดงที่ active site ในการทำปฏิกิริยา พบในพืชชั้นสูงเกือบทุกชนิด เช่น ข้าวสาลี ชา แตงกวา ลูกแพร์ องุ่น แอปเปิล มะม่วง สับสเตรทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในพืชชั้นสูงส่วนใหญ่เป็น o-dihydroxyphenols เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะออกซิไดส์ที่ OH-groups และสามารถ

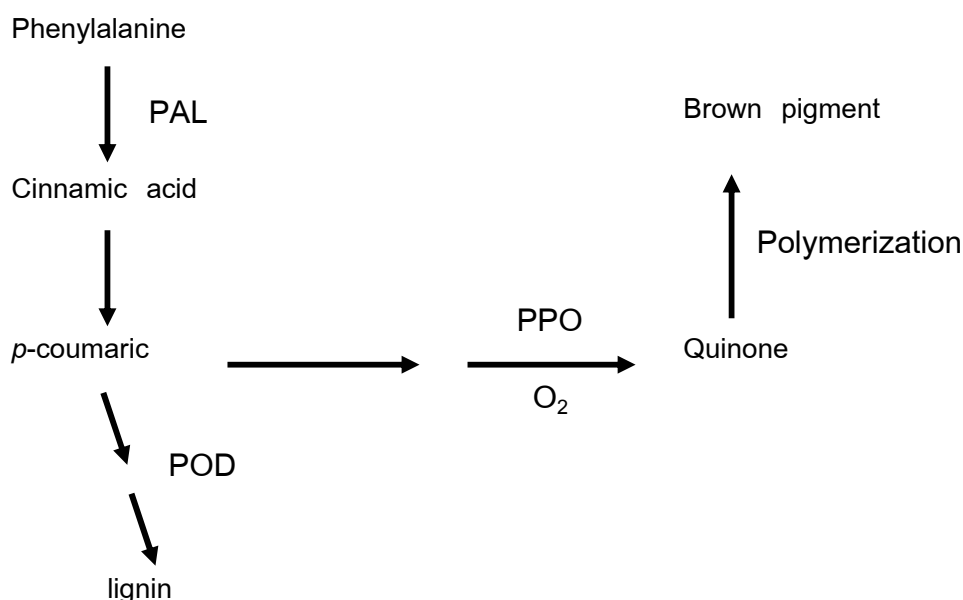
เปลี่ยน *o*-dihydroxyphenols ไปเป็น *o*-benzoquinones ได้โดยใช้ออกซิเจนเป็นสับสเตรทที่สอง (Martinez and Whitaker, 1995) และสามารถออกซิไดส์ได้ทั้ง monophenol และ diphenol สารออกโทควิโนนที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนแปลงและทำปฏิกิริยาต่อไปกับสารประกอบฟีนอล กรดอะมิโนและสารอื่น ๆ แล้วเกิดเป็นสารที่มีสีที่มีโครงสร้างซับซ้อน

จิตรรา และสายชล (1998) พบว่า การเกิดตกกระของกล้วยไข่มีความสัมพันธ์กับ สารประกอบฟีนอลิก เอนไซม์ฟีนอลลาซีนแอมโมเนียไลเอส และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการเกิดสีน้ำตาลในผัก ผลไม้ เมื่อกระทบกระเทือนหรือเกิดบาดแผลขึ้น และทิ้งไว้สักกระยะหนึ่งเนื้อของผักผลไม้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสซึ่งจะเปลี่ยนโมเลกุลของฟีนอลไปเป็น quinone แล้วรวมตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่ (polymerization) ขึ้น และมีสีน้ำตาล (รูปที่ 1.8) การยับยั้งไม่ให้สีน้ำตาลนี้เกิดขึ้นทำได้หลายวิธี เช่น เก็บรักษาภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนน้อยหรืออาจใช้กรด ascorbic ซึ่งจะปรีดิทซ์ quinone ไม่ให้เกิดการรวมตัวเป็นโมเลกุลใหญ่ ผักและผลไม้ที่มักพบปัญหาการเกิดสีน้ำตาล คือ แอปเปิล ลูกแพร์ มันฝรั่ง เห็ด ผักกาด และผลไม้เขตร้อนอีกหลายชนิด (Sapers, 1998 และ Whithaker, 1995)

ในการใช้ความร้อนเป็นวิธีทางกายภาพที่ช่วยยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้ Guyer และ Erickson (1954) ทำการผ่ากล้วยหอมขนาดกลางที่ปอกเปลือก โดยใช้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส พบว่าต้องใช้เวลา 6–8 นาที จึงจะทำให้อุณหภูมิที่จุดกึ่งกลางสูงถึง 85.6 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สามารถทำลายปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้ สำหรับเวลาที่ใช้ในการลวกกล้วยเพื่อให้จุดกึ่งกลางผลเป็น 85 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับขนาดของผลกล้วย อุณหภูมิของน้ำร้อนที่ใช้ลวก และปริมาณของกล้วยที่ลวกแต่ละครั้ง หรือใช้โซเดียมคลอไรด์ซึ่งเป็นเกลือที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริเวณผิวที่สัมผัสกับอากาศ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน เมื่อมีสภาพที่ไม่เหมาะสมกับการทำงาน กล่าวคือ เกลือจะไปดึงน้ำออกจากเอนไซม์ ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง การเกิดสีน้ำตาลก็ช้าลงด้วย

กล้วยเป็นผลไม้ที่สามารถเกิดสีน้ำตาลได้ง่ายเมื่อถูกหั่นหรือตัดเป็นชิ้น ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในการนำไปใช้ในการบริโภคสด เช่น ในสลัด (Moline และคณะ, 1999) เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในกล้วยจะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น Musa (AAA group) “GROS MICHEL” พบว่ามีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสอย่างน้อย 3 ไอโซไซม์ มี optimum pH 7.0 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่สูงมาก (Chaisakdanugull, 2000) และใน Musa sapientum L. มีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มี น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41,000 - 42,000 มี optimum pH 5.5 มีความคงตัวที่ pH 5-11 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มี optimum temperature ที่ 30 องศา-

เซลล์พืช มีความคงตัวแม่ได้รับความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สับสเตรทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สำคัญในกล้วยคือ dopamine โดยมีอัตราของการออกซิเดชันสูงกว่า catechol และ D-chatechin 2 และ 3 เท่าตามลำดับ (Yang และคณะ, 2000)



รูปที่ 1.8 แสดงขั้นตอนการเกิดสีน้ำตาล (จริงแท้, 1991)

จากรายงานข้างต้นที่ว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันของพืชนั้นยืนยันได้จากรายงานของ Mohammadi และ Kazemi (2002) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเมล็ดข้าวสาลีสายพันธุ์อ่อนแอและสายพันธุ์ต้านทานที่ได้รับเชื้อ *Fusarium graminearum* ปรากฏว่า ข้าวสาลีสายพันธุ์ต้านทานมีปริมาณเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ และข้าวสาลีที่ติดโรคปริมาณเอนไซม์ก็จะเพิ่มสูงขึ้นกว่าข้าวสาลีที่ไม่ติดโรค เมื่อนำสารสกัดจากข้าวสาลีไปตรวจหาความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยวิธีอิมมูโนโพรบแบบไม่แปลงสภาพ จะพบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสอย่างน้อย 7 ไอโซไซม์ โดยข้าวสาลีที่ติดโรคจะพบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เข้มกว่าข้าวสาลีที่ไม่ติดโรคอย่างเห็นได้ชัด

Witisuwannakul และคณะ (2002) ได้ศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจาก B-serum ของน้ำยางพาราโดยการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตน และผ่านคอลัมน์ CM-Sepharose จะได้ PPO-I และ PPO-II มีค่าน้ำหนักโมเลกุล ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 32 และ 34 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และมีค่า pI เท่ากันคือ 9.3 ไอโซไซม์ทั้งสองทำงานได้ดีในช่วง pH 5-8 โดยมีอุณหภูมิในการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส และทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส เมื่อใช้ dopamine,

L-dopa และ catechol เป็นสับสเตรท PPO-I ให้ค่า Km เท่ากับ 2.08, 8.33 และ 9.09 มิลลิโมลาร์ ส่วน PPO-II ให้ค่า Km เท่ากับ 2.12, 4.76 และ 7.14 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสภายหลังการกระตุ้นด้วยวิธีต่างๆ
2. ศึกษาการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ฟีนอลลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและการสะสมสารประกอบฟีนอลิก ในเซลล์แขวนลอยของยางพาราหลังจากถูกกระตุ้นด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora*
3. เตรียมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเองจากเซลล์แขวนลอยของยางพาราที่ถูกกระตุ้นจากน้ำเลี้ยงเชื้อราให้บริสุทธิ์บางส่วน
4. ศึกษาคุณสมบัติของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ที่เตรียมให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์ ion-exchange

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

ตารางที่ 2.1 ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และบริษัทผู้ผลิต

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	60.05	Merck
Acetic anhydride	102.09	Merck
Acrylamide	71.10	Merck
Agar	-	วิทยาธรรม
Ammonium sulfate	132.14	Merck
Ammonium persulfate	228.70	Merck
6-Benzyladenine (BA)	225.30	Sigma
Bovine serum albumin	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Catechin anhydrate	290.30	Sigma
Calcium carbonate	100.09	Fluka
Commassie brilliant blue G-250	854.00	Sigma
ConA-agarose	-	Sigma
DEAE-Sepharose CL-6B	-	GE Healthcare
2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	221.04	Sigma
3,4-dihydroxy-L-phenylalanine	197.19	Sigma
Di-sodium hydrogen phosphate-2-hydrate	177.99	Riedel-de Haen
Dopamine hydrochloride	189.64	Sigma
Ethanol	46.07	Merck
EDTA	372.24	Fisher chemical
Hydrophobic interaction column (HIC)	-	GE Healthcare
Methanol	-	Carlo Erba
Folin-ciocalteu's phenol reagent	-	Merck

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Murashige and Skoog basal salt mixture (MS)	-	Sigma
Myo-inositol	180.16	Sigma
Nicotinic acid	123.11	Sigma
N, N-methylene bisacrylamide	154.20	Merck
N, N, N, N-tetramethylethylenediamine (TEMED)	116.20	Merck
pH buffer	-	Fluka
Polyvinylpyrrolidone (PVPP)	-	Sigma
Polyvinylpyrrolidone (PVP)		
Potato dextrose agar	-	Difco
Phosphoric acid	98.00	Baker Analyzed
Phytigel	-	Sigma
Pyridoxine hydrochloride	205.60	Sigma
Pyrocatechol, approx.99%	110.11	Sigma
Sodium chloride (NaCl)	58.44	BDH
Sodium dihydrogen phosphate	156.01	Riedel-de Haen
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	288.40	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	40.00	BDH
Tricine	179.18	Fluka
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121.10	Merck
TritonX-100	-	J.T.Breaker
V ₈	-	Campbell Soup
Glycine	960.90	Sigma

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ Olympus CH 40 (Japan)
2. กล้องถ่ายรูป Sony cybershot W5 7.2 ล้านพิกเซล digital (Japan)
3. ขวด Duran ขนาด 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, และ 1 ลิตร
4. ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 6 ออนซ์
5. คอลัมน์ PD-10 (Pharmacia)
6. เครื่องชั่งสองตำแหน่ง Diethelm model 12909657 (Japan)
7. เครื่องชั่งตำแหน่ง
8. ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับตักสาร
9. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 และ 11 เซนติเมตร
10. ด้ามมีดผ่าตัด
11. ตู้ปลอดเชื้อ Ehret (Germany)
12. ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 23
13. ปากคีบปลายแหลมความยาว 120 -150 มิลลิเมตร
14. ปีกเกอร์ ขนาด 0.05, 0.1, 0.25, 1 และ 2 ลิตร
15. ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 2, 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร
16. ปิเปตแก้วตัดปลาย ขนาด 10 มิลลิลิตร
17. ไมโครออโตปิเปต พร้อมทิป ขนาด 50, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
18. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave SS-320 Tomy Japan)
19. Orbital shaker incubator, Paton scientific model 013422 (South Australia)
20. Centrifuge J2-21 operation, Beckamn (USA)
21. Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)
22. pH meter Cyberscan 1000 (Singapore)
23. Power supply model 1000/500, Biorad (USA)
24. Electroporesis appartatus, ATTA Cooperation (Japan)
25. Shimazu UV-Vis recording spectrophotometer model UV160A (Japan)
26. Spectrofluorophotometer RF-1501 Shimadzu (Japan)
27. UV box, Vilber Lourmat (France)
28. Petroff Hausser counting chamber

วิธีการทดลอง

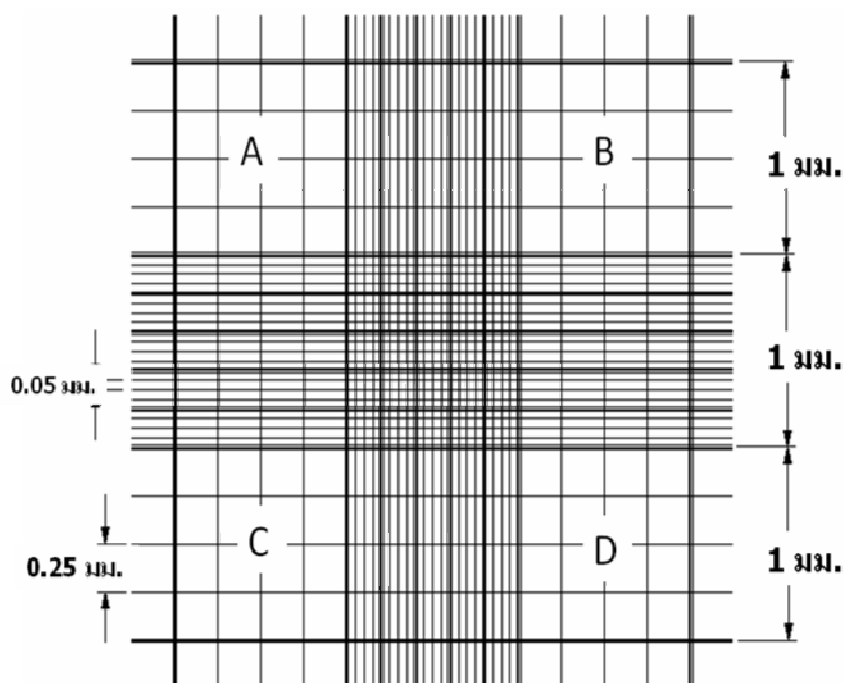
2.1 การเตรียมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (*P. palmivora*)

2.1.1 การเตรียมเชื้อรา *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์

เชื้อรา *P. palmivora* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางสงขลา ทางศูนย์วิจัยยางสงขลาได้ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรคใบร่วง จากนั้นผู้วิจัยได้นำเชื้อรา *P. palmivora* ดังกล่าวมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ (isolate) อีกครั้ง โดยการกระตุ้นการสร้างซุสเปอร์ออกมา เพื่อให้ได้สปอร์เดี่ยว (monospore) แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA (Potato Dextrose Agar) ย้ายโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงบนอาหาร PDA อีกครั้ง หลังจากนั้นเลี้ยงต่อไปอีก 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จึงจะสามารถนำไปใช้งานได้

2.1.2 การเตรียมซุสเปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

จากการเลี้ยงเชื้อราในข้อ 2.1.1 (บนอาหาร PDA) เมื่อต้องการซุสเปอร์สามารถกระตุ้นได้โดยการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V₈ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นสามารถเตรียมซุสเปอร์ได้โดยเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงบนสายรา แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที สปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* จะแตกออก และปล่อยให้ซุสเปอร์ซึ่งอยู่ข้างในหลุดออกมาได้ จากนั้นนำซุสเปอร์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 4×10^3 , 1×10^4 และ 2.5×10^4 ซุสเปอร์ต่อมิลลิลิตร วิธีการหาความเข้มข้นของซุสเปอร์ทำได้โดยการหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซุสเปอร์ผสมอยู่บน Petroff Hausser counting chamber และนับจำนวนซุสเปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 แสดงตารางบนผิว Petroff Hausser counting chamber โดยที่ ช่อง A, B, C และ D มีความกว้าง ความยาวช่องละ 1 มิลลิเมตร และมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร

วิธีการนับซูโอสปอร์

ช่อง A, B, C และ D มีความกว้าง ความยาวช่องละ 1 มิลลิเมตรและมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร

ปริมาตรของช่อง A, B, C และ D ช่องใดช่องหนึ่งมีค่าเท่ากับ ความกว้าง x ความยาว x ความลึก ซึ่งจะ เท่ากับ 1 มม. x 1 มม. x 0.1 มม. หรือ 10^{-4} มิลลิลิตร

ดังนั้น หากนับซูโอสปอร์ช่อง A, B, C และ D จะมีความเข้มข้นของซูโอสปอร์เท่ากับ

$$\begin{array}{c} \longrightarrow \\ \hline \text{ค่าเฉลี่ยของช่อง A, B, C และ D} \\ \hline \text{ปริมาตรบน Petroff Hausser counting chamber} \end{array}$$

(ปริมาตร Petroff Hausser counting chamber คือ 1×10^{-4} มิลลิลิตร)

2.1.3 การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีแบรดฟอร์ด

สารละลาย Bradford : ละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 100 มิลลิกรัม ใน ethanol 50 มิลลิลิตร และ 85% phosphoric acid 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร กรองก่อนนำไปใช้

โปรตีนมาตรฐาน : ละลาย Bovine serum albumin (BSA) จำนวน 0.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะได้โปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายที่มีปริมาณของ BSA เท่ากับ 10, 20, 30, 40, 60, 80 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ

วิธีวัดปริมาณโปรตีน : ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร และสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณ ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร (ที่เจือจางให้เหมาะสม) ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

2.1.4 การเตรียม filtrate จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora*

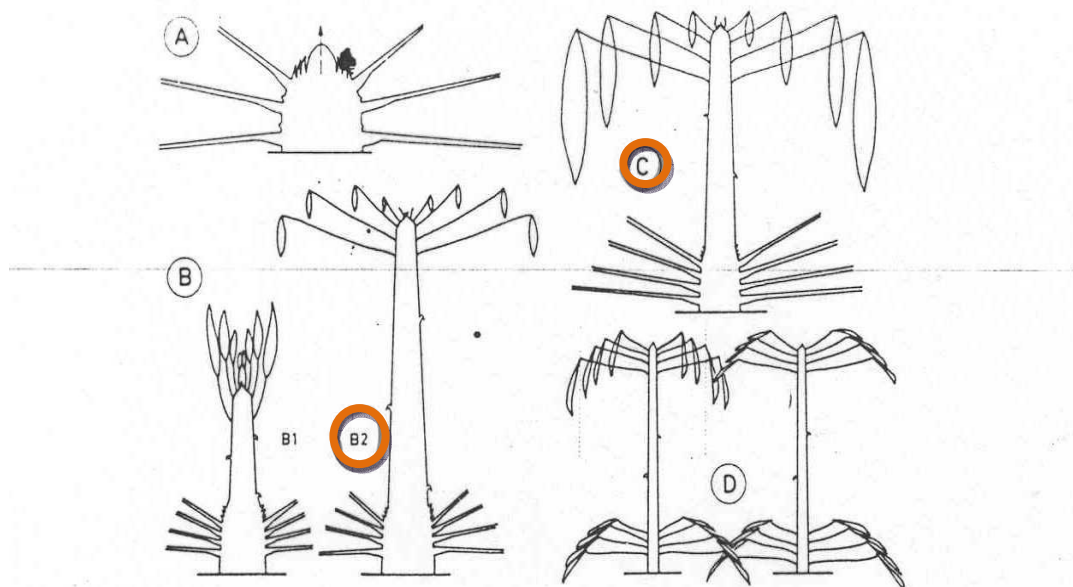
ตัดเชื้อรา *P. palmivora* จากจานอาหาร PDA บริเวณที่กำลังเจริญเติบโตดี (บริเวณขอบทางด้านนอกของเชื้อราที่มีอายุ 5 วัน ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) จำนวน 25 ชิ้น ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Henninger ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งจะประกอบไปด้วย 0.05% KH_2PO_4 , 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% asparagine, 0.0001% thiamine, 0.05% yeast extract และ 2.5% D-glucose จากนั้นนำไปเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน เมื่อครบกำหนดนำมากรองเส้นใยออก ด้วย vacuum เก็บเฉพาะน้ำเลี้ยงเชื้อ (filtrate) ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด ตามวิธีข้อ 2.1.3 จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การเตรียมตัวอย่างใบ

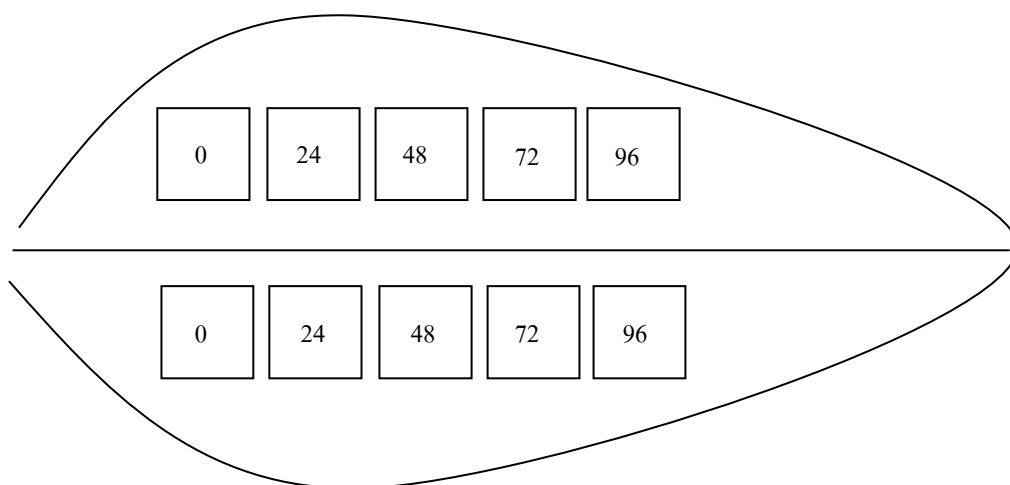
2.2.1 การกระตุ้นใบยางโดยการทำให้เกิดบาดแผล

นำใบยางอ่อนพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 อายุประมาณ 8-10 วัน หรือช่วง stage B₂-C และ C-stage (รูปที่ 2.2) มาเลือกใบที่มีน้ำหนักประมาณ 0.5-1.0 กรัม จำนวน 30 ชิ้น ลักษณะใบต้องไม่มีรอยแมลงกัด การฉีกขาดของใบหรือแม้แต่น้ำยางใหม่ซึ่งอาจมาจากการติดเชื้อมาก่อน รวมทั้งใบจะต้องมีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน เพื่อลดการแปรปรวนของผลการทดลอง นอกจากนี้ก่อนใช้ใบยางในการทดลองทุกครั้งต้องล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และซับ

ให้แห้งเพื่อล้างสิ่งสกปรกที่ติดมากับใบยาง จากนั้นตัดใบยางให้ได้ 10 ชั้นต่อ 1 ใบ (รูปที่ 2.3) นำมาแช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 20 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำขึ้นมาวางบนจานที่มีกระดาษกรองที่ชุ่มน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72 และ 96



รูปที่ 2.2 แสดงระยะของใบยางตั้งแต่ระยะ A, B, B₁, B₂, C และ D (Breton และคณะ, 1997)



รูปที่ 2.3 แสดงตำแหน่งการตัดใบยาง โดยชั้นที่ตัดจากทางด้านบนทั้งหมดเป็นชุดควบคุม และชั้นที่ตัดจากทางด้านล่างทั้งหมดเป็นชุดทดลอง

2.2.2 การกระตุ้นโบบียงพาราโดยใช้ซูโอสปอร์ตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เลือกโบบียงและตัดโบบียงตามวิธีข้างต้น ใส่จานแก้วขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร) แล้วนำมาแช่ซูโอสปอร์ตความเข้มข้น 4×10^3 , 1×10^4 และ 2.5×10^4 ซูโอสปอร์ตต่อมิลลิลิตร ปริมาตรจานละ 20 มิลลิลิตร โดยคว่ำทางด้านปากโบบียงให้สัมผัสกับซูโอสปอร์ตตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง ก่อนวางบนจานที่มีกระดาษกรองที่ชุ่มน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (โดยชุดควบคุมให้แช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซูโอสปอร์ต) เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 นำโบบียงที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดต่อไป

2.2.3 การกระตุ้นโบบียงพาราโดยใช้ CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เลือกโบบียงและตัดโบบียงตามวิธีข้างต้น ใส่จานแก้วขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 11 ซม.) แล้วนำมาแช่ใน CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 2, 4 และ 8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรจานละ 20 มิลลิลิตร โดยคว่ำทางด้านปากโบบียงให้สัมผัสกับ CuSO_4 ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาให้หยิบขึ้นโบบียงมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง จากนั้นนำขึ้นมาวางบนจานที่มีกระดาษกรองที่ชุ่มน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (โดยชุดควบคุมให้แช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทน CuSO_4) เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 นำโบบียงที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดต่อไป

2.2.4 การเตรียมสารสกัดโบบียงพารา

นำโบบียงชุดควบคุมและชุดทดลองที่กระตุ้นด้วยวิธีในข้อ 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 ใส่ในครกขนาดเล็ก เติมน้ำโตรเจนเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดจากนั้นเติม 0.2 โมลาร์ phosphate buffer, pH 6.5 ซึ่งมี 3% PVPP และ 0.25% TritonX-100 โดยใช้ปริมาตรบัฟเฟอร์เท่ากับน้ำหนักโบบียงสด บดให้เข้ากัน ตักสารตัวอย่างที่บดได้ทั้งหมดใส่กระบอกฉีดขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งภายในมีสำลีบรรจุอยู่ คั้นเฉพาะน้ำ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นกากวัดปริมาตรส่วนใส แล้วนำสารสกัดจากโบบียงไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเบรดฟอร์ด ตามวิธีข้อ 2.1.3 และหาไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO) โดยวิธีอิลคโตรโพรสิสแบบไม่แปลงสภาพต่อไป เมล็ดอ่อนและแคลลัสพาราใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกัน

2.3 การเตรียมเซลล์แขวนลอย

2.3.1 การชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา

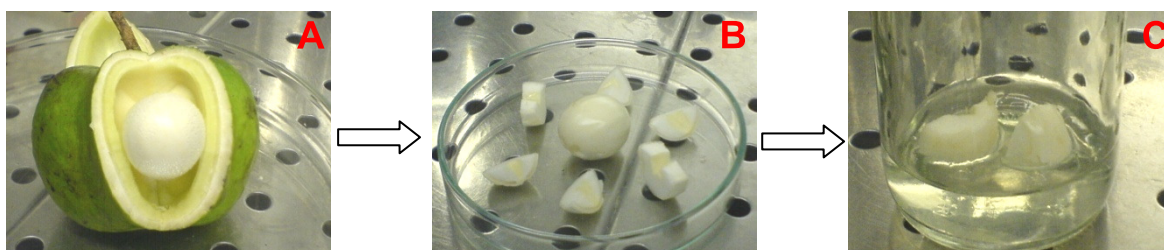
เลือกผลยางพาราที่มีอายุประมาณ 6-8 สัปดาห์หลังจากผสมเกสรแล้ว (ที่ยังไม่หลุดออกจากกรก) ประมาณ 10 ผล ไปชักนำให้เกิดแคลลัสโดย (รูปที่ 2.4)

1. เลือกผลยางพารา มาทำความสะอาดภายนอก ผึ่งให้แห้งก่อนนำเข้าตู้เลี้ยงเนื้อเยื่อ แช่ผลในแอลกอฮอล์เข้มข้น 90 % แล้วลนไฟ ทำเช่นนี้ 1-2 ครั้งจนแน่ใจว่าผิวภายนอกสะอาด ปราศจากเชื้อ ใช้ปากคีบตรึงผลให้แน่นแล้วกรีดพูของผลออกเป็นรอยขนานกัน 2 แนวในแนวตั้ง และกรีดอีกแนวซึ่งขวางกับรอยตัดเดิม

2. เปิดเปลือกออกจะเห็นเมล็ดอ่อนที่ยังติดอยู่กับกรก ใช้มีดที่สะอาดตัดแยกเมล็ดอ่อนออกจากผล ระวังอย่าให้เมล็ดอ่อนสัมผัสกับยางของเปลือก

3. ผ่าเมล็ดอ่อนออกเป็น 2 ส่วนตามยาวและผ่าอีก 3 ส่วนตามขวาง นั่นคือ 1 เมล็ดจะแบ่งออกได้เป็น 6 ส่วน

4. นำเมล็ดอ่อนทั้ง 6 ส่วนที่ตัดแยกแล้วไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 2.2)



รูปที่ 2.4 แสดงขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัส (A) เมล็ดอ่อนที่ยังติดอยู่กับกรก (B) ผ่าเมล็ดอ่อนเป็น 6 ส่วน (C) นำส่วนที่ตัดไปเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัส

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน
ยางพารา

องค์ประกอบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ชักนำแคลลัส (MS-1)	เพิ่มปริมาณ (MS-2)
KNO ₃	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650
CaCl ₂	322.2	322.2
MgSO ₄	180.7	180.7
KH ₂ PO ₄	170	170
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
KI	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ EDTA	37.25	37.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85
Thiamine.HCl	0.02	0.02
Pyridoxine.HCl	0.10	0.10
Nicotinic acid	0.10	0.10
Glycine	0.4	0.4
Myo-inositol	100	100
BA	2.0	2.0
2,4-D	2.0	2.0
Sucrose (%)	5.0	3.0
Phytigel agar (%)	0.23	0.23
pH	5.7	5.7

(ที่มา : ดัดแปลงจากประศาสน์, 2538)

2.3.2 การชักนำเซลล์แขวนลอยจากแคลลัส

ย้ายแคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำเซลล์แขวนลอย (ตารางที่ 2.3) วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26 ± 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ทำการย้ายเลี้ยงเซลล์ไปในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 10 วัน ในการย้ายเลี้ยงปรับความหนาแน่นของเซลล์แขวนลอยให้ได้ประมาณ 0.3 กรัม แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเลี้ยงด้วยวิธีการข้างต้น

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้ชักนำเซลล์แขวนลอย

องค์ประกอบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ชักนำเซลล์แขวนลอย
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂	322.2
MgSO ₄	180.7
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85
Thiamine.HCl	0.02
Pyridoxine.HCl	0.10
Nicotinic acid	0.10
Glycine	0.4
Myo-inositol	100
2,4-D	1.0
TDZ	0.3
Sucrose (%)	3.0
pH	5.7

2.4 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง filtrate กับ เซลล์แขวนลอย

2.4.1 การสกัดและการตกตะกอนของเซลล์แขวนลอยในสภาวะที่เหมาะสม

นำเซลล์แขวนลอย มาสกัดใน 0.2 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3% PVP, 3% PVP+0.25% TritonX-100, 3% PVPP หรือ 3% PVPP+0.25% TritonX-100 ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนที่เป็นกากทิ้งไปวัดปริมาตรส่วนใส นำสารสกัดที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีแบรดฟอร์ด ตามวิธีข้อ 2.1.3 และหาความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เมื่อได้วิธีการสกัดที่เหมาะสมแล้วนั้นนำสารสกัดที่ได้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60%, 70%, 80% และ 90% (อย่างละ 1 มิลลิลิตร) นำสารละลายไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีน และหาความว่องไวของเอนไซม์ PPO ตามวิธีในข้อ 2.4.3

2.4.2 เปรียบเทียบแถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ จากใบ เมล็ด และเซลล์แขวนลอยของยางพาราพันธุ์ BPM-24

นำใบ, เมล็ด และเซลล์แขวนลอยของยางพาราพันธุ์ BPM-24 มาทำให้เกิดบาดแผลและเก็บที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วย 0.2 M phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 0.25% TritonX-100 และ 3% PVPP ในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำสารสกัดที่ได้มาตรวจหาเอนไซม์ PPO โดยการทำให้เลคโตรโฟรีซิส แบบสภาพธรรมชาติ ซึ่งแยกเอนไซม์ด้วย 7% polyacrylamide gel กระแสไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมหาเอนไซม์ PPO ใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 M cathechol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแถบสีสัมปรากฏขึ้น

2.4.3 การบ่มเซลล์แขวนลอยในซูโอสปอร์ CuSO₄ และ filtrate เพื่อศึกษากลไกการป้องกันตัวเองของพืช

นำเซลล์แขวนลอยอายุ 14 วันมาเทรวมกัน แต่ละชุดการทดลองใช้เซลล์ 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ใน MES buffer ที่ประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ MES buffer, 5% MS และ 3% sucrose บ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate 17 ไมโครลิตร ลงในเซลล์แขวนลอย 0.5 กรัม ซึ่งคิดเป็นโปรตีนรวมเท่ากับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แขวนลอย สังเกตผลการเรืองแสงของสคอพอลิตินด้วยตาเปล่าทุก 8 ชั่วโมง โดยนำมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น

366 นาโนเมตร) เพื่อดูว่าเซลล์แขวนลอยได้รับการกระตุ้นจาก filtrate แล้วหรือไม่ (เซลล์ที่เริ่มเรืองแสงแสดงว่าเริ่มมีการติดเชื้อ) โดยจะเก็บทั้งเซลล์แขวนลอยและ MES buffer เมื่อถึงเวลาที่กำหนด คือ 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลีฟีนิลออกซิเดส และสารประกอบฟีนอลิก

2.4.4 ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส

ทำการทดลองโดยใช้ปฏิกริยารวม 3 มิลลิลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ปริมาตร 2.850 มิลลิลิตรที่ใช้จะประกอบด้วย 0.1 โมลาร์ Tris-HCl pH 8.5 ที่มี 0.001 โมลาร์ β -mercaptoethanol และ 0.1 โมลาร์ L-phenylalanine เติมสารตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอุ่นพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกริยาด้วยการเติม 6 นอร์มอล HCl ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส โดยให้ 1 หน่วยของความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส หมายถึง ปริมาณ 1 ไมโครโมลของกรดซินิกนามิกที่เกิดขึ้นต่อหนึ่งชั่วโมง

2.4.5 ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนิลออกซิเดส

ใช้ 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ปริมาตร 2.360 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 โมลาร์ catechol ซึ่งเป็นสับสเตรท ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และ สารตัวอย่าง 0.04 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองในคิวเวท (cuvette) ขนาด 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดย 1 หน่วยความว่องไวของเอนไซม์ PPO หมายถึง การดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 OD. ต่อ 1 นาที

2.4.6 ศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

จะทำการทดลองโดยหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมตามวิธีของ Folin-Ciocalteu method (Torres และคณะ, 1987) คือ ใส่สารตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับ 1 นอร์มอล Folin-Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที จากนั้นเติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid (0-0.12 กรัมต่อลิตร)

2.5 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

2.5.1 แยกโปรตีนที่ได้จากเซลล์แขวนลอยโดยผ่าน คอลัมน์ hydrophobic interaction column (HIC)

นำเซลล์แขวนลอยของยีสต์ *Pichia pastoris* BPM-24 อายุ 5-7 วัน น้ำหนัก 3.5 กรัม ที่สกัดด้วย 0.2 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3% PVPP และ 0.25% TritonX-100 ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปลงคอลัมน์ hydrophobic interaction column (HIC) ปริมาตรคอลัมน์ 5 มิลลิลิตร ซึ่งปรับสมดุลด้วย 0.02 โมลาร์ sodium phosphate buffer pH 7 แล้วชะคอลัมน์ด้วยความบัฟเฟอร์ที่มีเกลือความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ 0.5 โมลาร์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อ 1 ชั่วโมง เก็บ fraction ละ 1 มิลลิลิตร นำ fraction ที่ผ่านคอลัมน์ HIC มาตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยการทำอิเล็กโตรโพรซิส แบบไม่แปลงสภาพต่อไป

2.5.2 แยกโปรตีนที่ได้จากเซลล์แขวนลอยโดยผ่าน คอลัมน์ con-A agarose

นำเซลล์แขวนลอยของยีสต์ *Pichia pastoris* BPM-24 อายุ 5-7 วัน น้ำหนัก 3.5 กรัม ที่สกัดด้วย 0.2 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3% PVPP และ 0.25% TritonX-100 ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปลงคอลัมน์ con-A agarose ซึ่งเป็นโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะ (affinity chromatography) ปริมาตรคอลัมน์ 3 มิลลิลิตร โดยปรับสมดุลด้วย TC บัฟเฟอร์ (0.01 โมลาร์ tris-HCl ที่มี 0.14 โมลาร์ NaCl และ 0.01 โมลาร์ CaCl_2) TE บัฟเฟอร์ (0.01 โมลาร์ tris-HCl ที่มี 0.14 โมลาร์ NaCl และ 0.01 โมลาร์ EDTA) และบัฟเฟอร์ที่มีน้ำตาล (methyl-mannoside) ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อ 1 ชั่วโมง เก็บ fraction ละ 1 มิลลิลิตร นำ fraction ที่ผ่านคอลัมน์ con-A agarose มาตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยการทำอิเล็กโตรโพรซิส แบบไม่แปลงสภาพต่อไป

2.5.3 แยกโปรตีนที่ได้จากเซลล์แขวนลอยโดยผ่าน คอลัมน์ Ion exchange แบบ anionic ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นและผ่านการกระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมต่อกรัม เซลล์แขวนลอย

นำสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยของยีสต์ *Pichia pastoris* BPM-24 อายุ 14 วัน น้ำหนัก 43 กรัม (เก็บไว้ในปริมาณที่เท่ากันเพื่อเป็นชุดควบคุม) มากระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 80 ชั่วโมง จากนั้นนำทั้ง 2 ชุด มาสกัดด้วย 0.2 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3% PVPP และ 0.25% TritonX-100 ในอัตราส่วน 1:1 แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 80% ละลายกลับด้วย 0.02 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ 3 มิลลิลิตร ไป

ผ่านคอลัมน์ PD-10 (ซึ่งจะกำจัดเกลือออกไป) หลังจาก Pool หลอดที่มีโปรตีนสูงจะได้สารตัวอย่าง 6 มิลลิลิตร นำไปลง DEAE-sepharose CL-6B (Ion exchange) ปริมาตรคอลัมน์ 20 มิลลิลิตร ชะด้วยเกลือความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ NaCl - 0.09 โมลาร์ NaCl ใน 0.02 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 อัตราการไหล 30 มิลลิลิตร ต่อ 1 ชั่วโมง เก็บ fraction ละ 3 มิลลิลิตร นำ fraction ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B มาตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบไม่แปลงสภาพต่อไป

2.5.4 การตรวจหาโปรตีนใน fraction

ใช้ปริมาตรสารใน fraction 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

2.5.5 การตรวจหาโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) จากการผ่านคอลัมน์ Ion exchange แบบ anionic

การตรวจหาโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ตารางที่ 2.4) ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ Davis (1964) ซึ่งใช้เจลความเข้มข้น 3% ใน 0.063 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน (stacking gel) ใช้โพลีอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 7% ใน 0.075 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง (separating gel) เตรียมสารละลายโปรตีนที่ได้จากสารสกัดและโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ native PAGE 1 ส่วน บัฟเฟอร์ตัวอย่างประกอบด้วย 0.2 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8, 8 มิลลิโมลาร์ EDTA, 40% glycerol และ 0.4% bromophenol blue สำหรับบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสคือ 0.025 โมลาร์ Tris-HCl ที่มี 0.2 โมลาร์ glycine, pH 8.3 กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ต่อเจล 1 แผ่น รอนสี bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนถึงขอบล่างของแผ่นเจล ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ปิดกระแสไฟฟ้า ย้อมแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ในสารละลายที่มี 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และ 0.1 โมลาร์ catechol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนแถบสีสัมปรากฏขึ้น

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (3%)	Separating gel (7%)
30%Acrylamide-0.8%bisacrylamide	0.50 ml	3.00 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.25 ml
10% Ammonium persulfate	50 μ l	200 μ l
TEMED	10 μ l	13 μ l
Distilled water	3 ml	6 ml
Total volume	5 ml	13 ml

2.5.6 การตรวจหาโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) จากการผ่านคอลัมน์ Ion exchange แบบ anionic

การตรวจหาโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนด้วยวิธี SDS-PAGE (ตารางที่ 2.5) โดยใช้ โพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 3% ใน 0.125 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน ใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7% ใน 0.375 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง เตรียมสารละลายโปรตีนจากสารสกัด โดยการผสมสารละลายตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE 1 ส่วน บัฟเฟอร์ตัวอย่างประกอบด้วย 0.2 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8, 8 มิลลิโมลาร์ EDTA, 4% glycerol, 40% SDS, 4% β -mercaptoethanol และ 0.4% bromophenol blue ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.025 โมลาร์ Tris-HCl, 0.2 โมลาร์ glycine, 1% SDS, pH 8.3 หลังจากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับใน native PAGE

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (3%)	Separating gel (7%)
30%Acrylamide-0.8%bisacrylamide	0.50 ml	3.00 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.25 ml
10% Ammonium persulfate	50 μ l	200 μ l
0.2 M EDTA	50 μ l	200 μ l
10% SDS	50 μ l	200 μ l
TEMED	10 μ l	13 μ l
Distilled water	3 ml	6 ml
Total volume	5 ml	13 ml

2.5.7 การตรวจหาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) จากการผ่านคอลัมน์ Ion exchange แบบ anionic แล้วย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

การตรวจหาปริมาณโปรตีนที่ได้จากแต่ละขั้นตอนด้วยวิธี SDS-PAGE (ตารางที่ 2.5) โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 4% ใน 3.0 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.45 ซึ่งมี 0.3% SDS เป็นเจลชั้นบน ใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 16.5% ใน 3.0 โมลาร์ Tris-HCl, pH 8.45 ซึ่งมี 0.3% SDS เป็นเจลชั้นล่าง เตรียมสารละลายโปรตีนจากสารสกัด โดยการผสมสารละลายตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับการย้อมซิลเวอร์ 1 ส่วน บัฟเฟอร์ตัวอย่างประกอบด้วย 0.2 โมลาร์ Tris-HCl, pH 6.8, 8 มิลลิโมลาร์ EDTA, 4% glycerol, 40% SDS, 4% β -mercaptoethanol และ 0.4% bromophenol blue โดยทุกๆขั้นตอนจะต้องใช้น้ำที่ปราศจากอิออน (DI) เท่านั้น เพราะอิออนจะทำให้พื้นหลังของเจลมีสีเข้ม ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.1 โมลาร์ Tris-HCl, 0.1 โมลาร์ Tricine, 1% SDS, pH 8.25 เปิดกระแสไฟคงที่ 60 โวลต์ ใช้ระยะเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง สีของ bromophenol blue จะเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบล่างของแผ่นเจล จากนั้นนำไปย้อมย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรตตามโปรโตคอลของชุด Kit

ตารางที่ 2.6 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) สำหรับย้อมโปรตีนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (16.5%)
48%Acrylamide-1.5%bisacrylamide	0.40 ml	4.33 ml
3.0 M Tris-HCl, pH 8.45+0.3%SDS	1.25 ml	4.33 ml
10% Ammonium persulfate	50 μ l	200 μ l
TEMED	10 μ l	13 μ l
Deionized water	3.31 ml	4.20 ml
Total volume	5 ml	13 ml

2.6 ศึกษาคุณลักษณะของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

2.6.1 ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) ของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำสารละลายที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic ที่ชะด้วยเกลือความเข้มข้น 0.05 โมลาร์, 0.08 โมลาร์, 0.09 โมลาร์ มาตรวจหาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เมื่อใช้สับสเตรทที่แตกต่างกัน ได้แก่ catechol (420 นาโนเมตร), L-dopa (475 นาโนเมตร), dopamine (470 นาโนเมตร) และ catechin (380 นาโนเมตร) สำหรับ catechol จะใช้ปฏิกิริยาเดียวกับการหาค่าความว่องไวในข้อ 2.4.4 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ catechol เป็น 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ ส่วน L-dopa, dopamine และ catechin จะใช้ 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ผสมกับของสับสเตรทแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0075, 0.015, 0.03, 0.05, 0.07 และ 0.1 โมลาร์ โดยที่ปฏิกิริยารวมจะเท่ากับ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาค่า Km และ Vm ต่อไป

2.6.2 ศึกษาความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง (pH stability) ของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ Ion exchange แบบ anionic

นำสารละลายที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic ที่ชะด้วยเกลือความเข้มข้น 0.05 โมลาร์, 0.08 โมลาร์, 0.09 โมลาร์ มาตรวจหาความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ โดยบ่มสารละลายใน pH buffer 2-10 (สารมาตรฐานจากบริษัท Fluka) ในอัตราส่วน 1:1 (โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ 40 ไมโครลิตร : pH buffer 40 ไมโครลิตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์

โพลีฟีนอลออกซิเดส ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, pH 6.5 ปริมาตร 0.86 มิลลิลิตร โดยใช้ 0.5 โมลาร์ dopamine ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท

2.6.3 ศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิ (temperature stability) ของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำสารละลายที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic ที่ชะด้วยเกลือความเข้มข้น 0.05 โมลาร์, 0.08 โมลาร์, 0.09 โมลาร์ มาตรวจหาความเสถียรต่ออุณหภูมิของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ โดยปมสารละลายที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นนำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ PPO ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, pH 6.5 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร โดยใช้ 0.5 โมลาร์ dopamine ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท

2.6.4 ศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำสารละลายที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic ที่ชะด้วยเกลือความเข้มข้น 0.05 โมลาร์, 0.08 โมลาร์, 0.09 โมลาร์ มาตรวจหาการยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยใช้ ascorbic acid, EDTA, β -mercaptoethanol, NaN_3 , citric acid, CuSO_4 , NaCl, DTT, salicylic acid และ SDS ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เป็นตัวยับยั้ง ปมสารละลายด้วยตัวยับยั้งต่างๆในอัตราส่วน 1:1 (โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ 40 ไมโครลิตร : pH buffer 40 ไมโครลิตร) เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, pH 6.5 ปริมาตร 0.086 มิลลิลิตร โดยใช้ 0.5 โมลาร์ dopamine ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

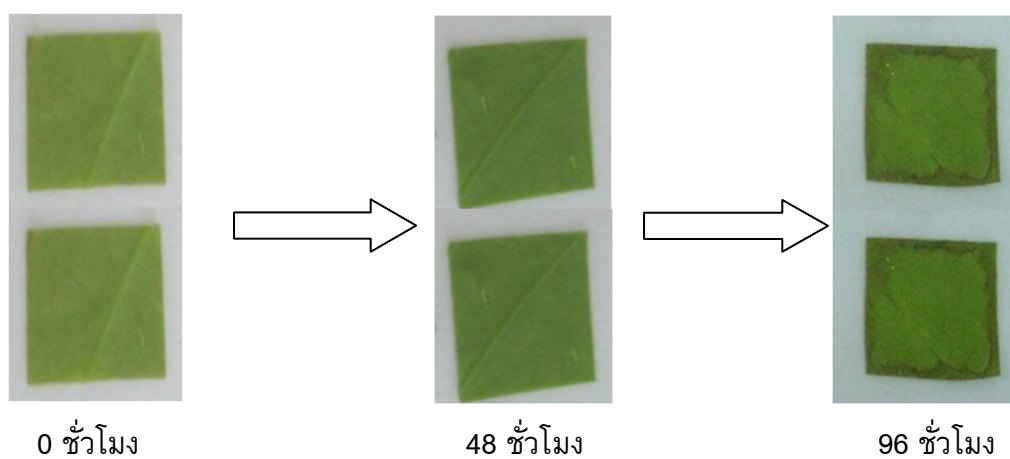
3.1 ผลของการกระตุ้นใบยางพารา

3.1.1 การกระตุ้นใบยางพาราโดยการทำให้เกิดบาดแผล

หลังจากนำใบยางทั้ง 2 สายพันธุ์มาทำให้เกิดบาดแผลโดยการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1x1 นิ้ว จำนวน 30 ชิ้น แล้ววางบนกระดาษกรองขึ้น เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส กับชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง ซึ่งตัดเก็บใบที่ -20 องศาเซลเซียสทันที โดยใบยางที่ใช้ในการทดลองที่ 0 และ 96 ชั่วโมง มาจากก้านเดียวกัน ทั้งนี้เพื่อลดความแตกต่างระหว่างใบและใช้ใบยางที่อยู่ในช่วงอายุ B₂-C เท่านั้น (Breton และคณะ, 1997) เมื่อพิจารณาจากค่าโปรตีนของทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน โดยชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง เท่ากับ 7.613 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง (ในสายพันธุ์ BPM-24) และ 7.051 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง (ในสายพันธุ์ RRIM600) ส่วนในใบยางชุดทดลองที่เกิดบาดแผลจากการตัดใบ มีค่าโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 8.134 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ในชั่วโมงที่ 48 และลดลงเป็น 6.390 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งจะสังเกตเห็นว่า ใบยางมีลักษณะขอบใบช้ำ เนื่องจากเกิดเซลล์ตายไปบางส่วนแล้ว (ในสายพันธุ์ BPM-24) และมีค่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 8.852 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ในชั่วโมงที่ 48 และลดลงเป็น 6.454 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ในชั่วโมงที่ 96 (ในสายพันธุ์ RRIM600) (ตารางที่ 3.1, รูปที่ 3.1)

เนื่องจากใบยางที่ทำให้เกิดบาดแผลจะมีค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้น เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีหลายไอโซไซม์และทำหน้าที่ทางชีวภาพต่างๆ กัน ใบยางแต่ละพันธุ์ก็มีจำนวนโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ต่างกัน ดังนั้นเพื่อศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค จึงนำไปตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ โดยมี 0.1 โมลาร์ catechol เป็นสับสเตรท ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 บริเวณที่มีเอนไซม์จะปรากฏแถบสีส้มขึ้น ซึ่งในใบยางทั้ง 2 สายพันธุ์จะปรากฏแถบไอโซไซม์ 3 และ 4 แถบในชุดควบคุมและชุดที่ทำให้เกิดบาดแผลตามลำดับ (รูปที่ 3.2) พบว่า แถบที่มีการเคลื่อนที่น้อยมากเรียกว่า basic เพราะเป็นแถบที่อาจไม่มีประจุ (เนื่องจากในส่วนของ separating gel มีค่า pH เท่ากับ 8.8) (Mohammadi และ Kazemi, 2002) ทั้งแถบ basic X และ Z เป็นไอโซไซม์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ โดยแถบ X เป็นไอโซไซม์ที่จับกับสายพันธุ์ได้ เพราะแถบดังกล่าวในสายพันธุ์ BPM-24 เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าในสายพันธุ์ RRIM600 และแถบ Y เป็นไอโซไซม์ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นให้เกิดบาดแผล โดยในสายพันธุ์ BPM-24 ถูกกระตุ้นได้มากกว่าและเร็วกว่าในสาย

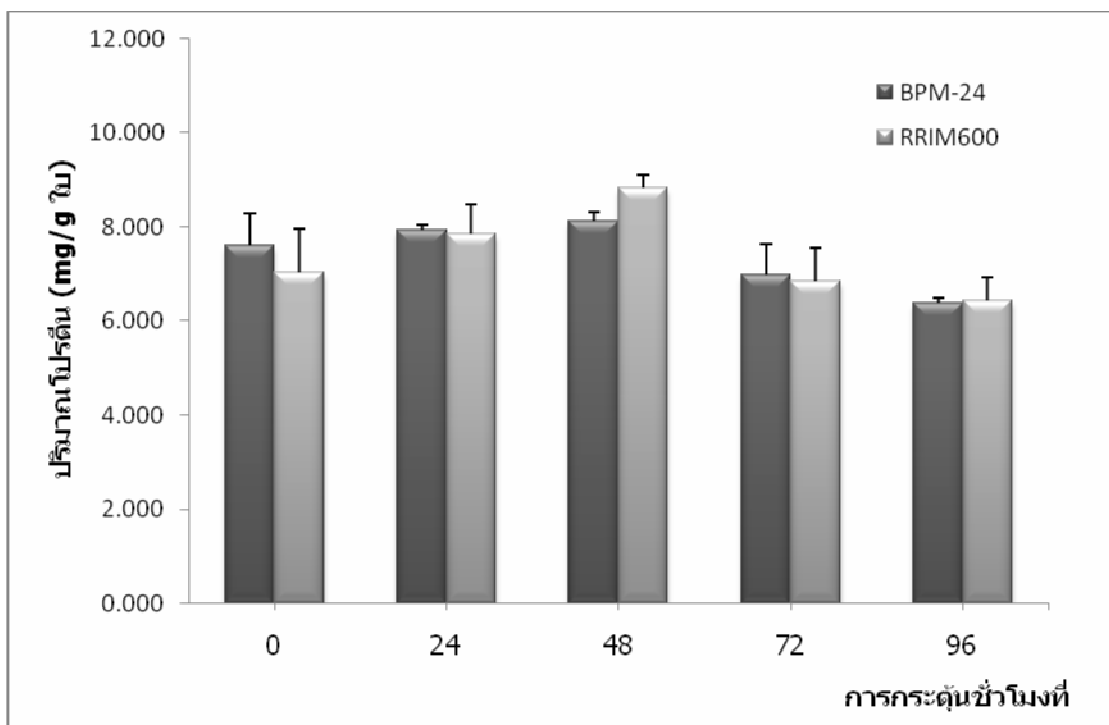
พันธุ์ RRIM600 ในการศึกษารั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาแถบ Y ของสายพันธุ์ BPM-24 ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับระบบป้องกันของพืช การที่ถูกกระตุ้นได้มากกว่าและเร็วกว่า แสดงว่าพันธุ์ BPM-24 สามารถตอบสนองเมื่อถูกกระตุ้นด้วยบาดแผลได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM600 นอกจากนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาผลของตัวกระตุ้นที่มาจาก biotic และ abiotic ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยเฉพาะไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาต่อโดยอาศัยซูเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆเป็นตัวแทนตัวกระตุ้นที่มาจาก biotic และ CuSO_4 เป็นตัวแทนตัวกระตุ้นที่มาจาก abiotic (Corbin และคณะ, 1987 และ Farmer และ Ryan, 1992)



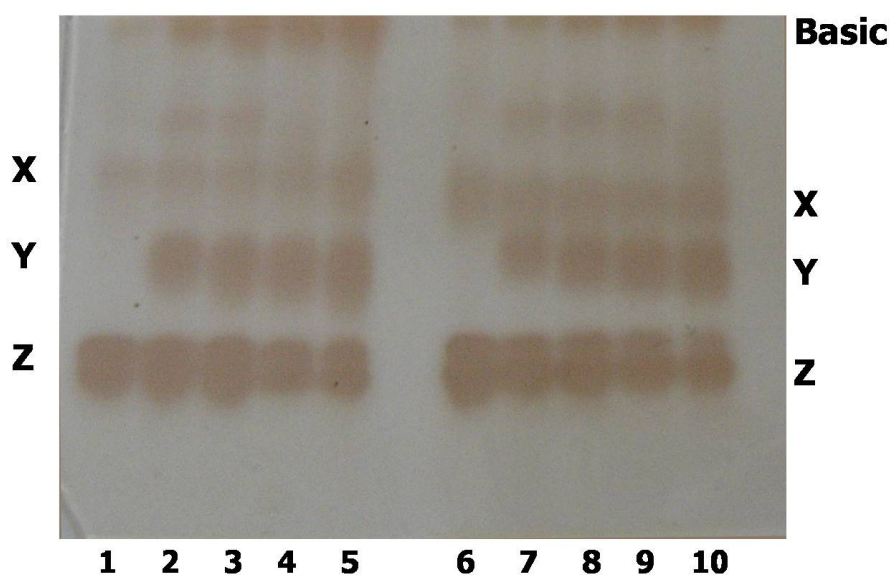
รูปที่ 3.1 แสดงการเกิดรอยไหม้ตรงขอบใบโดยการทำให้เกิดบาดแผล เมื่อเวลาผ่านไป 48 และ 96 ชั่วโมงของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผล

ชม.ที่	BPM-24 (mg/g)	RRIM600 (mg/g)
0	7.613±0.684	7.051±0.906
24	7.940±0.110	7.868±0.608
48	8.134±0.197	8.852±0.257
72	6.978±0.656	6.845±0.714
96	6.390±0.118	6.454±0.468



กราฟที่ 3.1 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของไ보ยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผล



รูปที่ 3.2 แสดงแถบไอโซไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ภายหลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติของสารสกัดจากไ보ยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผลที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง lane 1-5 ; ไบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 lane 6-10 ; ไบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600

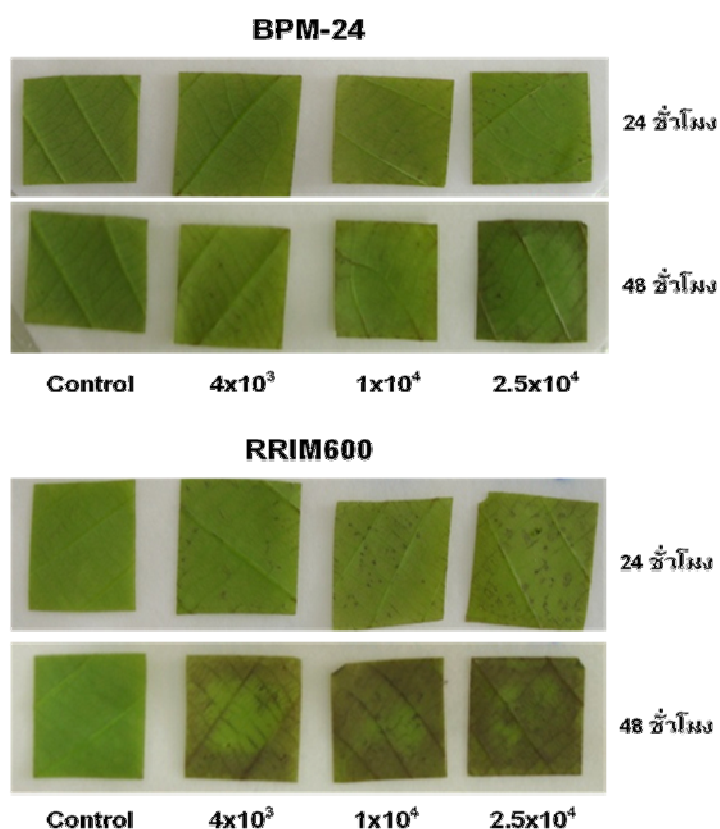
3.1.2 การกระตุ้นไบบางพาราโดยใช้ซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ภายหลังการกระตุ้นโดยการตัดไบบางเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1x1 นิ้ว แล้วแช่ในซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น 4×10^3 , 1×10^4 และ 2.5×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยคว่ำทางด้านปากใบให้สัมผัสกับซูโอสปอร์ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นไบบางมาวางบนกระดาษกรองชั้น เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 (เนื่องจากในการทดลองนี้ เมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 48 ชั่วโมง ทำให้ไบบางพาราทั้ง 2 สายพันธุ์มีสภาพเสียหายมาก เพราะเหตุนี้ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเพียง 48 ชั่วโมงเท่านั้น) พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ไบบางพันธุ์ BPM-24 ที่ความเข้มข้น 2.5×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร มีรอยเจาะของซูโอสปอร์เพียงเล็กน้อยเท่านั้นและเมื่อถึงเวลา 48 ชั่วโมง ใบจะเริ่มช้ำและเห็นรอยเจาะของซูโอสปอร์ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซูโอสปอร์ (สภาพของใบไม่ได้เสียหายมากเท่ากับไบบางพันธุ์ RRIM600 (รูปที่ 3.3)) แต่พบว่าปริมาณโปรตีนโดยรวมนั้นไม่ได้แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 3.2, กราฟที่ 3.2) ส่วนในไบบางพันธุ์ RRIM600 เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ใบจะเริ่มช้ำตั้งแต่ความเข้มข้น 4×10^3 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่พันธุ์ BPM-24 จะเริ่มเห็นรอยเจาะที่ความเข้มข้น 2.5×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อถึง 48 ชั่วโมง ใบสีเขียวเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเข้มข้นจนเป็นสีน้ำตาลที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณโปรตีนโดยรวมนั้นไม่ได้แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 3.3, กราฟที่ 3.3) นำไปตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยวิธีอิลคโตรโฟรีซิส แบบสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 พบแถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ 3 และ 4 แถบในชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ ตามลำดับ โดยในชุดที่กระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะพบแถบ Y ซึ่งเป็นแถบซึ่งเกิดจากการกระตุ้นชัดขึ้นตามลำดับ ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ผล เช่นเดียวกับการกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผล แต่เมื่อเวลาผ่านไปจนครบ 48 ชั่วโมงปรากฏว่า แถบ Z ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่พบในธรรมชาติมีปริมาณลดลงเล็กน้อยในสายพันธุ์ BPM-24 และหายไปในสายพันธุ์ RRIM600 (รูปที่ 3.4, รูปที่ 3.5)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปและที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่มากขึ้นจะส่งผลให้การสังเคราะห์แถบ Y ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเพิ่มมากขึ้นทั้ง 2 สายพันธุ์ และแถบ Z ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในไบบาง ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่พบอยู่ในธรรมชาติและน่าจะเกี่ยวข้องกับการมีชีวิตของไบบาง เพราะในไบบางพันธุ์ BPM-24 จะมีปริมาณลดลงเล็กน้อย แต่ในไบบางพันธุ์ RRIM600 จะหายไป พร้อมกับการเกิดโรคอย่างรุนแรงและถ้าสังเกตลักษณะภายนอกของไบบางพาราทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วยตาเปล่านั้นพบว่าไบบางพันธุ์ RRIM600 จะเห็นรอยเจาะที่ชัดเจนกว่า ไบบางพันธุ์ BPM-24 ที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เท่ากันและชั่วโมงเดียวกัน เนื่องจากไบบางพันธุ์ RRIM600 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอกว่า เมื่อสังเกตผลหลังจาก 48 ชั่วโมง จะเห็นรอยไหม้ลามทั้งชิ้นใบ ลักษณะรอยไหม้ที่มีขนาดใหญ่และแผ่กว้าง

ออกไปเรื่อยๆ เช่นนี้แสดงถึงการเกิดโรค ซึ่งปฏิกริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์อ่อนแอคือ ปฏิกริยา compatible แต่ถ้าเป็นใบยางพันธุ์ต้านทานสามารถกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ทำให้เห็นขนาดรอยไหม้เล็กและมีขอบเขตที่ชัดเจน เรียกว่า ปฏิกริยา incompatible จากการศึกษาของ นารธิตา (2003) พบว่า การศึกษารอยไหม้ ในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) เมื่อบ่มด้วยซุโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ที่ความเข้มข้นมากเกินไปก็จะทำให้ใบยางมีลักษณะรอยไหม้ที่มีขนาดใหญ่ และแผ่กว้างออกไปเรื่อยๆ เช่นกัน แสดงให้เห็นถึงลักษณะการเกิดโรค ทำนองเดียวกันเมื่อใช้ความเข้มข้นของซุโอสปอร์ ความเข้มข้นน้อยๆ กับใบยางพันธุ์ RRIM600 ก็จะสามารถเห็นรอยไหม้ที่มีขนาดเล็ก แสดงถึงความสามารถในการกักเชื้อไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ นุรฮามาลี (2004) ที่พบว่า ใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 ที่เป็นตัวแทนของพันธุ์ต้านทาน ต้องใช้ความเข้มข้นของซุโอสปอร์ที่มากกว่าพันธุ์ RRIM600 ที่เป็นตัวแทนของพันธุ์อ่อนแอเพื่อให้ได้ผลการทดลองใกล้เคียงกันที่เรียกว่า การเกิดไฮเปอร์เซนซิทีฟ (hypersensitive cell death)

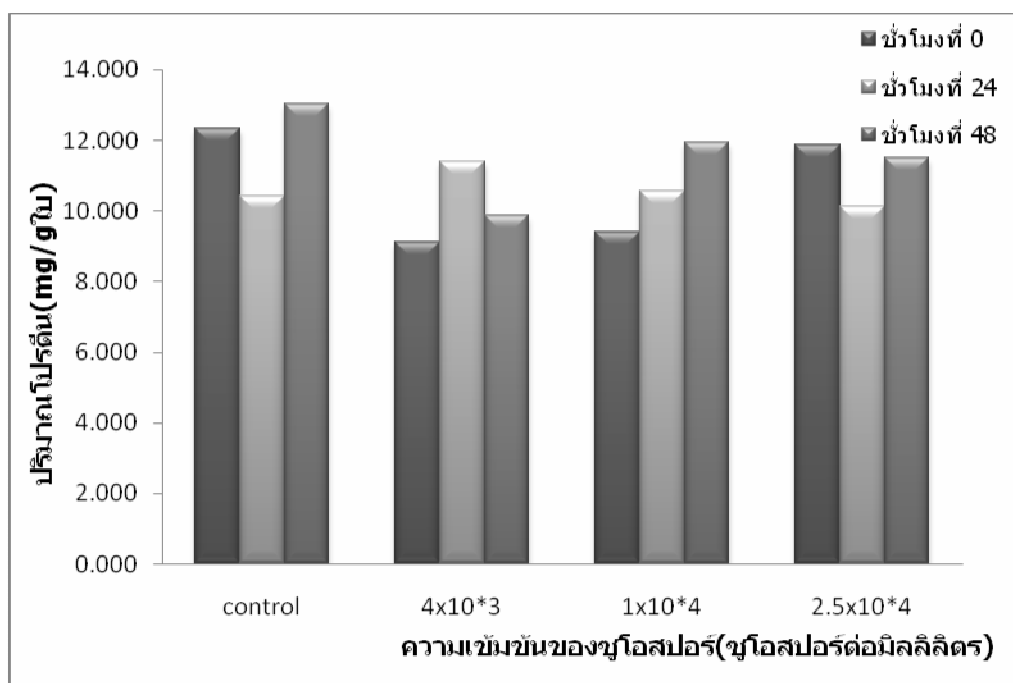
แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของซุโอสปอร์ที่ 1×10^4 ซุโอสปอร์ต่อ มิลลิลิตร จะให้ค่าของปริมาณโปรตีนและการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสได้ดีที่สุดทั้ง 2 สายพันธุ์



รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะของใบยางเมื่อผ่านการบ่มด้วยซุโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้เชื้อโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

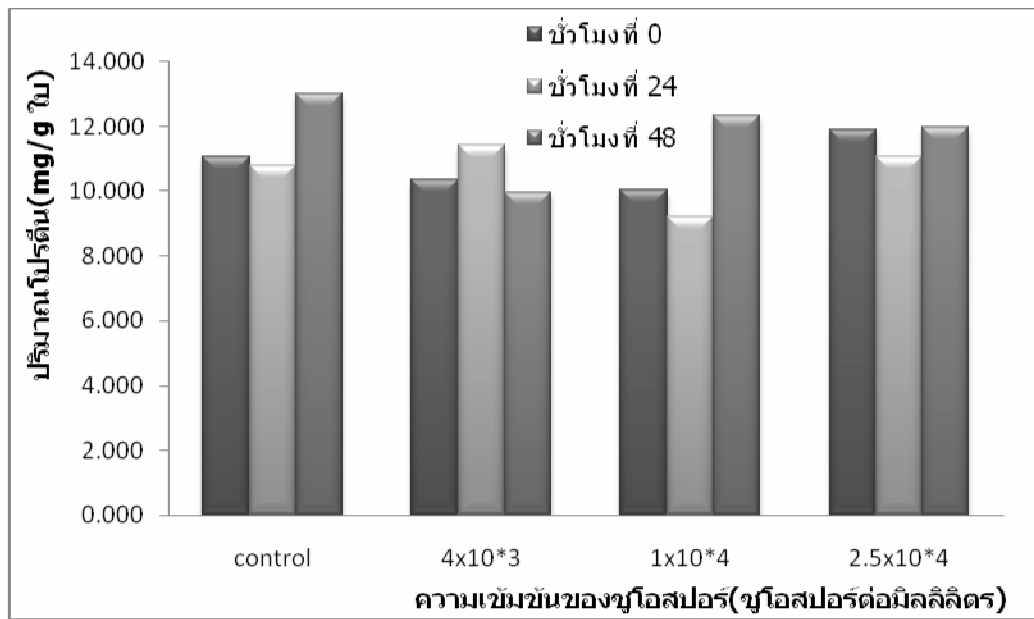
ความเข้มข้นของเชื้อโอสปอร์	ชั่วโมงที่ 0 (mg/g)	ชั่วโมงที่ 24 (mg/g)	ชั่วโมงที่ 48 (mg/g)
control	12.333	10.433	13.017
4×10^3	9.117	11.383	9.883
1×10^4	9.417	10.550	11.933
2.5×10^4	11.867	10.117	11.512



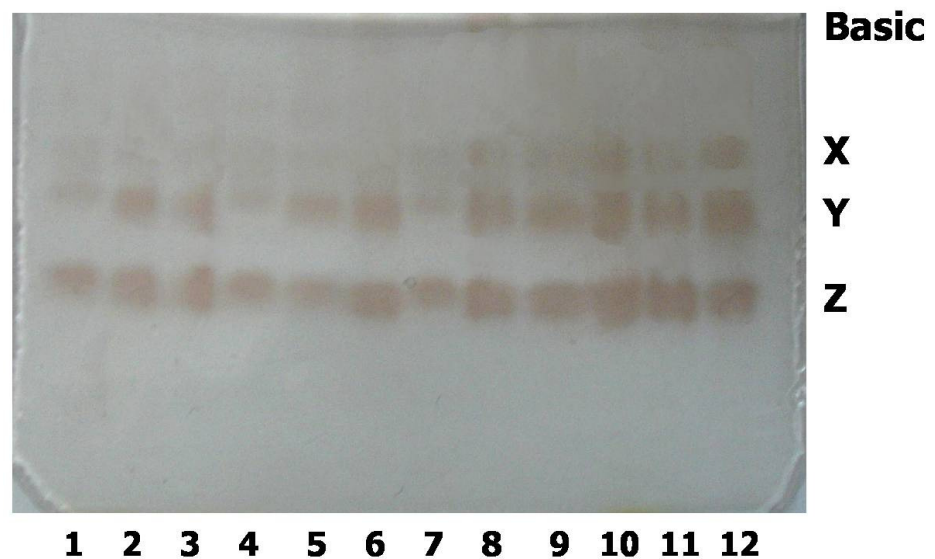
กราฟที่ 3.2 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้เชื้อโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้เชื้อโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

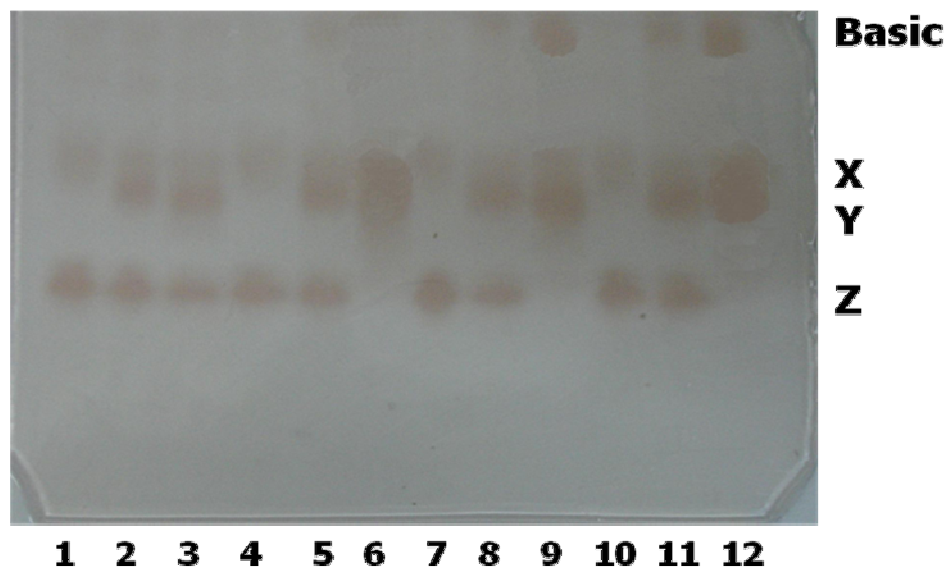
ความเข้มข้นของเชื้อโอสปอร์	ชั่วโมงที่ 0 (mg/g)	ชั่วโมงที่ 24 (mg/g)	ชั่วโมงที่ 48 (mg/g)
control	11.050	10.800	12.983
4×10^3	10.367	11.417	9.967
1×10^4	10.050	9.200	12.317
2.5×10^4	11.900	11.083	11.967



กราฟที่ 3.3 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของไบบางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48



รูปที่ 3.4 แสดงแถบไอโซไซม์โพลีเฟนอลออกซิเดสภายหลังจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากไบบางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยการบ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง lane 1-3 ; ไบบางชุดควบคุม lane 4-6 ; ไบบางที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 4×10^3 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร lane 7-9 ; ไบบางที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 1×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร lane 10-12 ; ไบบางที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 2.5×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.5 แสดงแถบไอโซไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสภายหลังจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการบ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง lane 1-3 ; ใบยางชุดควบคุม lane 4-6 ; ใบยางที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 4×10^3 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร lane 7-9 ; ใบยางที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 1×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร lane 10-12 ; ใบยางที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 2.5×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.1.3 การกระตุ้นใบยางพาราโดยใช้ CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ภายหลังจากการกระตุ้นโดยการตัดใบยางเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 นิ้ว แล้วแช่ใน CuSO_4 ความเข้มข้นต่างๆคือ 2, 4 และ 8 มิลลิโมลาร์ โดยคว่ำทางด้านปากใบให้สัมผัสกับ CuSO_4 ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นใบยางมาวางบนกระดาษกรองขึ้น เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 พบว่า ใบยางพันธุ์ BPM-24 เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ใบจะเริ่มขำที่ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ โดยเห็นรอยขำบริเวณขอบใบเพียงเล็กน้อย เมื่อถึงเวลา 48 ชั่วโมง ใบสีเขียวเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเข้มข้นจนเป็นสีน้ำตาลในความเข้มข้นของ CuSO_4 ที่เพิ่มขึ้น และสภาพของใบไม่ได้เสียหายมากเท่ากับใบยางพันธุ์ RRIM600 (รูปที่ 3.6) ส่วนปริมาณโปรตีนโดยรวมนั้นจะลดลงตามความเข้มข้นของ CuSO_4 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4, กราฟที่ 3.4) เมื่อนำไปตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 พบแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ PPO 3 และ 4 แถบในชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นด้วย CuSO_4 โดยในชุดที่กระตุ้นด้วย

CuSO_4 ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะพบแถบ Y ซึ่งเป็นแถบซึ่งเกิดจากการกระตุ้นชนิดขึ้น และแถบ Z ซึ่งเป็นแถบที่พบในธรรมชาติไม่ได้จางหายไป (รูปที่ 3.7)

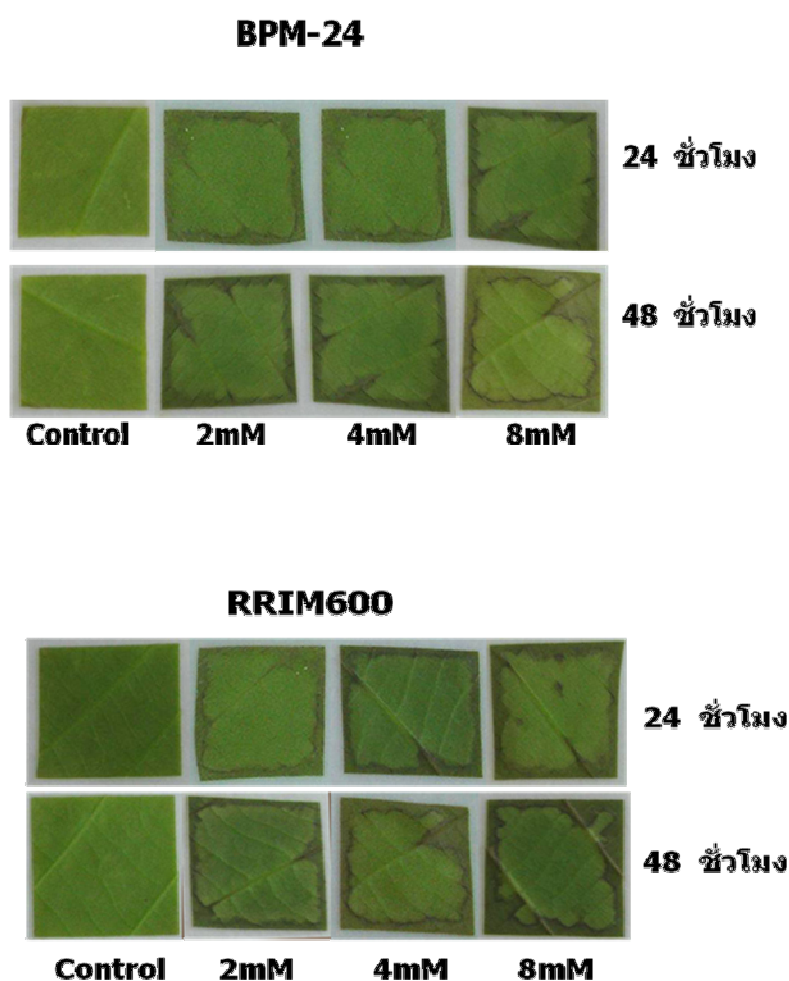
ในชั่วโมงที่ 24 ของใบยางพันธุ์ RRIM600 ขอบใบเริ่มซ้ำที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 มิลลิโมลาร์ โดยเห็นรอยซ้ำเพิ่มขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของ CuSO_4 เมื่อถึง 48 ชั่วโมง ใบสีเขียวเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเข้มข้นจนเป็นสีน้ำตาลตามความเข้มข้นของ CuSO_4 ที่เพิ่มขึ้น ปริมาณโปรตีนโดยรวมจะลดลงตามความเข้มข้นของ CuSO_4 และเวลาที่ผ่านไป (ตารางที่ 3.5, กราฟที่ 3.5) นำไปตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยวิธีอิมมูโนโพรบิซิสแบบสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 พบว่าแถบ Y จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ CuSO_4 ตามลำดับ ส่วนแถบ Z ค่อยๆ จางหายไปเช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ (รูปที่ 3.8)

จากปริมาณโปรตีนที่ 0 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้นด้วย CuSO_4 ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ของใบยางทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีปริมาณโปรตีนลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากในขั้นตอนของการทดลองตามข้อ 2.2.3 ผู้วิจัยได้ทำการกระตุ้นโดยแช่ใบยางใน CuSO_4 ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาล้างและเก็บใบแช่แข็งทันที ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ปริมาณโปรตีนที่ลดลงไปมากนั้นเกิดจากภาวะการกระตุ้นที่รุนแรงทำให้เกิดเซลล์ตายจำนวนมาก กล่าวคือ การกระตุ้นด้วย CuSO_4 ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ เป็นสภาวะที่รุนแรงเกินไปไม่เหมาะสมกับการนำมาทดลอง

จากการกระตุ้นทั้ง 3 แบบคือ การทำให้เกิดบาดแผล การกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ และ CuSO_4 นั้น มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสไปในทำนองเดียวกันคือ จะปรากฏแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 3 และ 4 แถบในชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้น ตามลำดับ โดยในชุดที่ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและเวลามากขึ้นจะพบแถบ Y ซึ่งเป็นแถบที่เกิดจากการกระตุ้นชนิดขึ้นตามลำดับ ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของซูโอสปอร์และ CuSO_4 ที่สูงเกินไปจะทำให้ แถบ Z ซึ่งเป็นแถบที่มีอยู่ในธรรมชาติของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ค่อยๆ หายไป

เนื่องจากการทดลองในตัวอย่างใบเป็นตัวอย่างที่มีความแปรปรวนสูงโดยสังเกตจากค่าโปรตีนโดยรวมจากผลการกระตุ้นใบยางทั้ง 3 แบบโดยค่าโปรตีนโดยรวมของชุดควบคุมทั้ง 3 แบบมีค่าต่างกันมาก คือ ในการกระตุ้นใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 โดยการทำให้เกิดบาดแผล มีค่าปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 7.613 มิลลิกรัมต่อกรัม ขณะที่การกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์นั้น ผลของค่าปริมาณโปรตีนโดยรวมในชั่วโมงที่ 0 ของชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 12.33 มิลลิกรัมต่อกรัม และชุดการทดลองที่กระตุ้นด้วย CuSO_4 มีปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 7.883 มิลลิกรัมต่อกรัม ทั้งนี้ค่าปริมาณโปรตีนที่ได้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อายุใบที่นำมาใช้

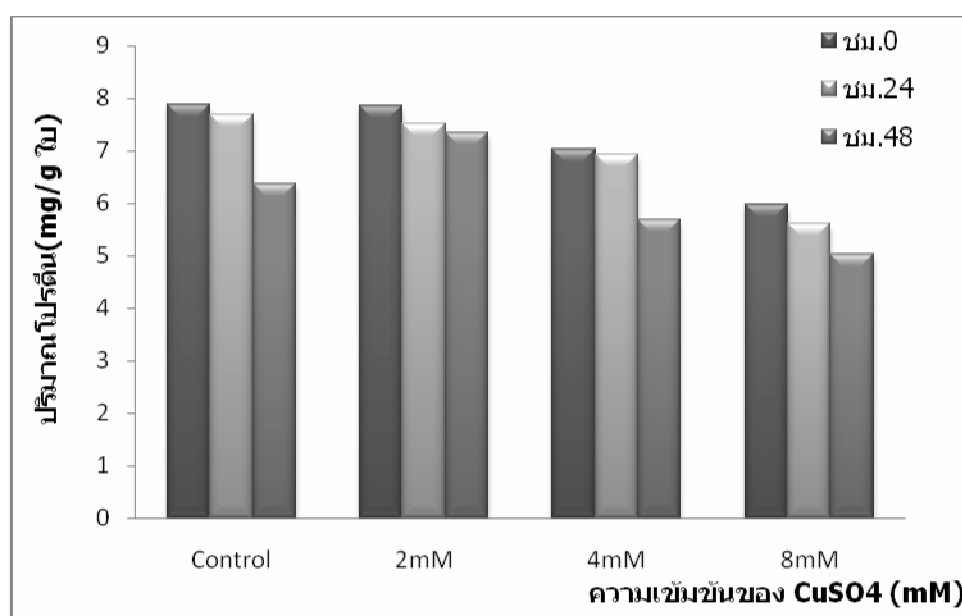
ช่วงเวลาที่ทดลอง ซึ่งหมายถึงลักษณะอาการและการติดเชื้อในธรรมชาติ โดยทั่วไปผู้วิจัยจึงเลือกใช้ใบที่ไม่มีรอยฉีกขาดและมีลักษณะอาการของโรค ดังนั้นค่าปริมาณโปรตีนที่สูงมากในบางช่วงอาจเป็นเพราะใบยางอยู่ในสภาวะ SAR คือผ่านการกระตุ้นมาแล้ว ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ PR-proteins และยังไม่ลดลงสู่สภาวะปกติ จากผลการทดลองข้างต้นเพื่อลดความแปรปรวนของตัวอย่างผู้วิจัยจึงสนใจแหล่งอื่นของยางพารา นั่นคือ เซลล์แขวนลอยที่ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนมาเป็นตัวอย่างสำคัญในการทดลองต่อไป ผู้วิจัยจึงศึกษาเปรียบเทียบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสใน 3 แหล่งเปรียบเทียบกัน คือ ใบ, เมล็ดอ่อน และเซลล์แขวนลอย ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.4



รูปที่ 3.6 แสดงลักษณะของใบยางพันธุ์ BPM-24 เมื่อผ่านการบ่มด้วย CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 2, 4 และ 8 มิลลิโมลาร์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.4 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

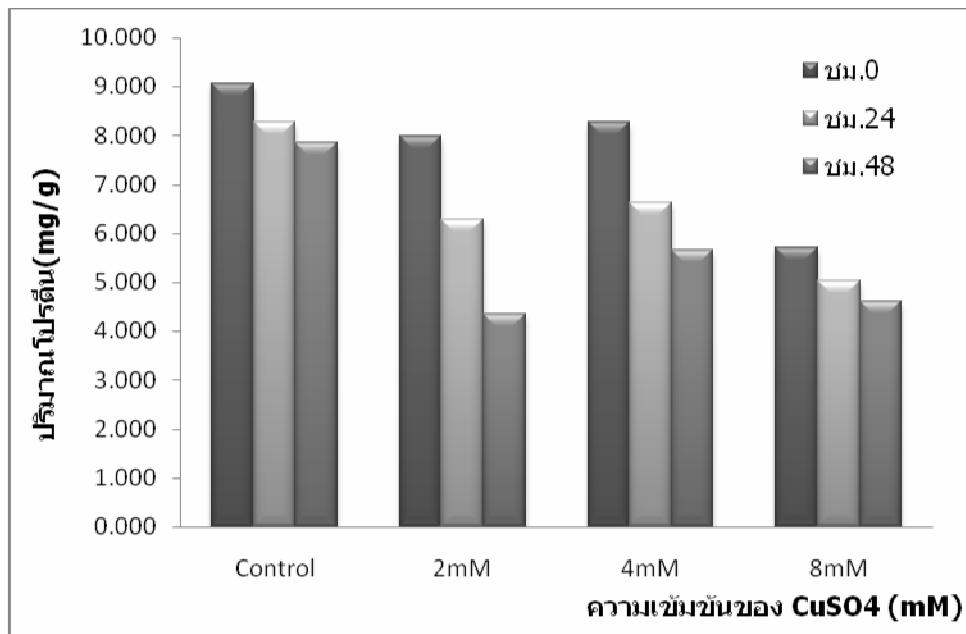
ความเข้มข้น CuSO_4	ชั่วโมงที่ 0 (mg/g)	ชั่วโมงที่ 24 (mg/g)	ชั่วโมงที่ 48 (mg/g)
Control	7.883	7.683	6.358
2mM	7.867	7.525	7.342
4mM	7.039	6.933	5.683
8mM	5.967	5.617	5.033



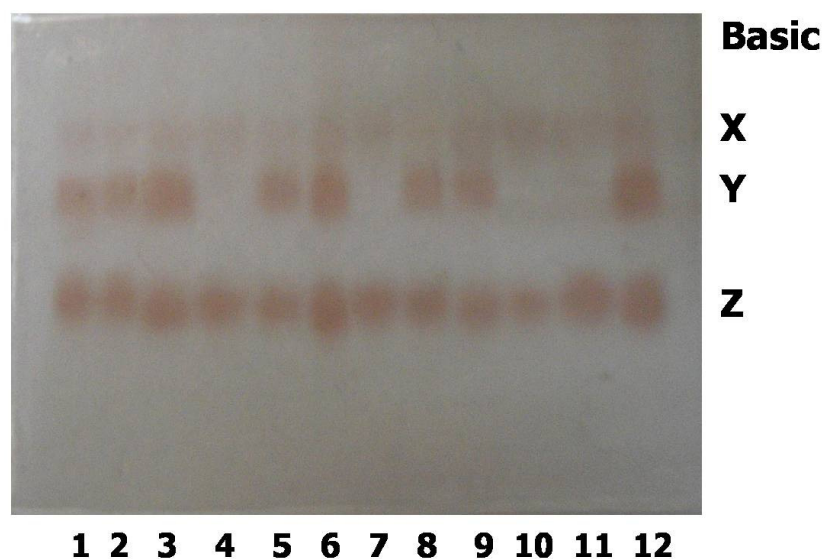
กราฟที่ 3.4 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณโปรตีนทั้งหมดของใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

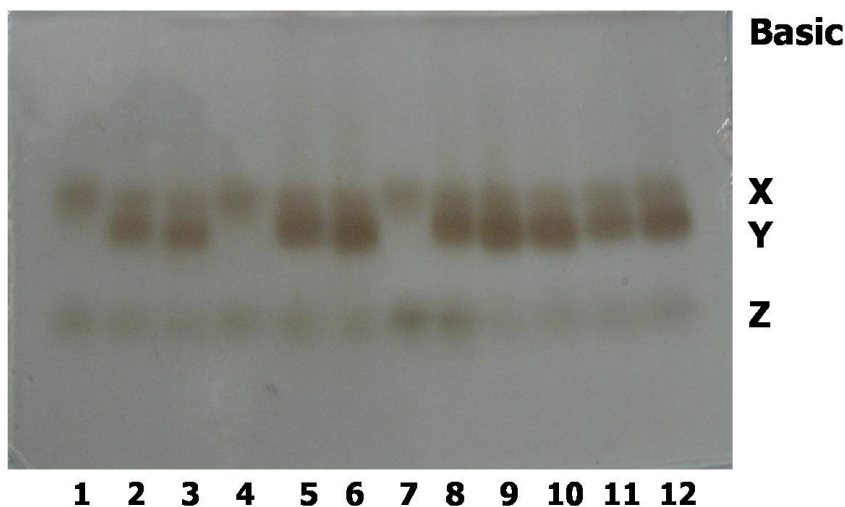
ความเข้มข้น CuSO_4	ชั่วโมงที่ 0 (mg/g)	ชั่วโมงที่ 24 (mg/g)	ชั่วโมงที่ 48 (mg/g)
Control	9.050	8.267	7.850
2mM	7.983	6.283	4.342
4mM	8.283	6.617	5.658
8mM	5.700	5.025	4.608



กราฟที่ 3.5 แสดงค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของไบบางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ CuSO₄ ที่ความเข้มข้นต่างๆในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48



รูปที่ 3.7 แสดงแถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ภายหลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากไบบางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นโดยการบ่มด้วย CuSO₄ ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง lane 1-3 ; ไบบางชุดควบคุม lane 4-6 ; ไบบางที่ถูกกระตุ้นด้วย CuSO₄ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ lane 7-9 ; ไบบางที่ถูกกระตุ้นด้วย CuSO₄ ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ lane 10-12 ; ไบบางที่ถูกกระตุ้นด้วย CuSO₄ ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์



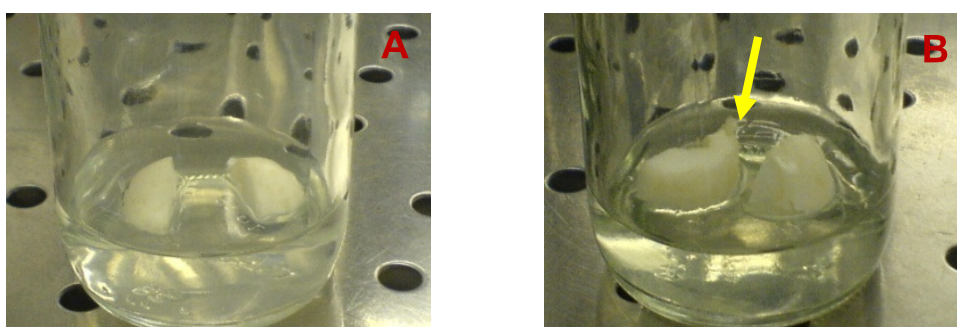
รูปที่ 3.8 แสดงแถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ภายหลังการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ ของสารสกัดจากใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นโดยการบ่มด้วย CuSO_4 ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง lane 1-3 ; ใบยางชุดควบคุม lane 4-6 ; ใบยางที่ถูกกระตุ้นด้วย CuSO_4 ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ lane 7-9 ; ใบยางที่ถูกกระตุ้นด้วย CuSO_4 ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ lane 10-12 ; ใบยางที่ถูกกระตุ้นด้วย CuSO_4 ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์

3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอย

3.2.1 การชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา

เมล็ดอ่อนที่มีอายุประมาณ 6–8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยการนำมาวางเลี้ยงบนอาหาร MS-1 ที่มี 2,4-D และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมซูโครสให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5% ปรับ pH ในอาหารเท่ากับ 5.7 หลังจากนั้นเติมวุ้น phytagel ให้ความเข้มข้นเป็น 0.23% หลอมวุ้นจนละลาย ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันสูง เมื่อนำไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้ในการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 มีลักษณะฟู สีเหลืองอ่อน เกาะกันหลวมๆ (friable callus) มีน้ำหนักก่อนละประมาณ 0.3 กรัม (รูปที่ 3.9) จากการศึกษาของ พันธุ์ศรี (2003) ซึ่งรายงานว่าการชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ด จะได้แคลลัสขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากกว่าแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากอับละอองเกสร หรือข้อปล้องยางพารา รวมถึงปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งช่วยให้มีการเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นไปได้ดีคือความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เลี้ยง ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการแตกตัวของไฮโดรเจนไอออนและไฮดรอกซีไอออนตามลำดับ ไอออนทั้งสองเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของแคลลัส ความเป็นกรดต่ำกว่า 5.6 และสูงกว่า 5.8 ทำให้ปริมาณการสร้างแคลลัสลดลง อย่างไรก็ตามผลอันนี้ไม่มีความรุนแรงเมื่อเลี้ยงแคลลัสในที่มืด

แต่การเลี้ยงแคลลัสในที่มีแสงในสภาพความเป็นกรด-ด่างสูงเกินไปไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้เลยเพราะปฏิกิริยาการแตกตัวของอิออนรุนแรงมาก (สมปอง, 1996) เช่นเดียวกับการศึกษาของ เพ็ญมาศ (2006) ซึ่งสามารถชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดได้โดยพบว่า แคลลัสมีลักษณะฟู มีสีเหลืองอ่อนและเกาะกันหลวมๆ ในขณะที่แคลลัสที่ชักนำจาก endosperm จะมีลักษณะเกาะกันแน่นกว่าแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด นอกจากนี้ฮอร์โมนที่ใช้ก็เป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งในการเจริญเติบโตของแคลลัส ดังเช่นงานวิจัยของ มนทิรา (2002) ที่ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 ไมโครโมลาร์นาน 16 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้ส่วนเนื้อใบเลี้ยงเกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ โดยแคลลัสจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ ฉ่ำน้ำสีขาวใส และมีขนาดใหญ่กว่า 0.5 x 0.5 เซนติเมตร Michaux และ Carron (1989) ได้รายงานว่าช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในช่วงแรกและระยะเวลาของการย้ายเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอ และจากการศึกษานี้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดพบว่าหากนำเมล็ดอ่อนที่มีอายุระหว่าง 45-75 วัน หลังการผสมเกสร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่หากนำเมล็ดอ่อนที่มีอายุมากกว่าช่วงระยะเวลาดังกล่าว ก็จะมีผลต่อความสามารถในการเจริญเป็นแคลลัสหรือหากสามารถเกิดเป็นแคลลัสได้ก็จะใช้ระยะเวลาในการชักนำที่นานกว่า ดังนั้นจึงต้องพิถีพิถันในการคัดเลือกเมล็ดที่นำมาใช้ให้อยู่ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว

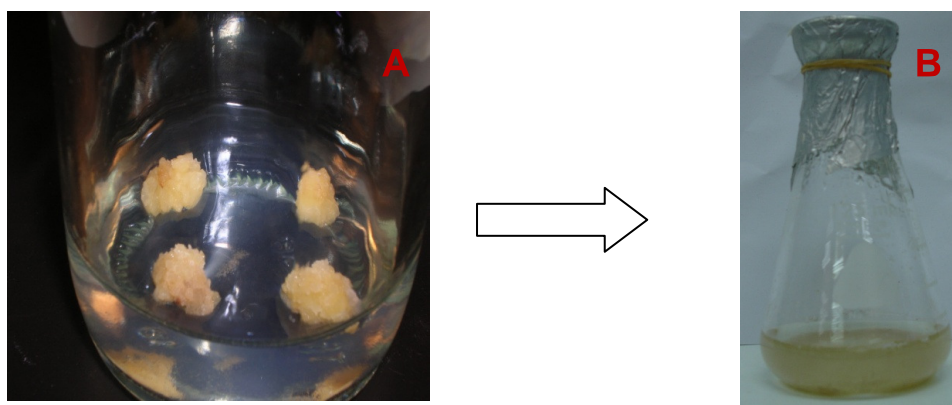


รูปที่ 3.9 แสดงลักษณะแคลลัส (A) เมล็ดอ่อนที่นำมาชักนำให้เป็นแคลลัส (B) แคลลัสที่เกิดขึ้นหลังผ่านไป 4 สัปดาห์

3.2.2 ผลการชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยจากแคลลัส

แคลลัสที่ผ่านการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ นำไปเตรียมเซลล์แขวนลอยโดยนำแคลลัสแต่ละก้อนน้ำหนักประมาณ 0.3 กรัม ไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำเซลล์

แขวนลอยร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 3% ปรับ pH ในอาหารเท่ากับ 5.7 วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เซลล์แขวนลอยที่ได้มีลักษณะกลมและเกาะกลุ่มกันหลังผ่านการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 หลังจากนั้นจึงทำการย้ายเลี้ยงทุกๆ 7 วัน โดยขังมา 0.3 กรัมในอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ส่งผลให้เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตเป็น 3 ระยะอย่างชัดเจน คือ ระยะ lag phase, log phase และ stationary phase ในขณะที่การใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเจริญได้ดี แต่หากใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นมากเกินไปอาจมีผลทำให้เกิดการสะสมสารชีวเคมีและอนุพันธ์ของน้ำยาที่ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงขุ่น (ชวนพิศ, 2001) ลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ย้ายเลี้ยงทุก 7 วันจะมีสีเหลืองอ่อนตลอดการเพาะเลี้ยงและอาหารเพาะเลี้ยงมีลักษณะใส ไม่ขุ่น (รูปที่ 3.10) พจมาลย์ และ สมปอง (1999) ได้ศึกษาว่าเซลล์แขวนลอยบางพาราสามารถชักนำได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนต่างๆ เช่น แคลลัสจากอับละอองเกสร และ จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน (Te-chato และ Chartikul, 1993; Sushamakumari และคณะ, 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อที่มีศักยภาพสูงและประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง คือ เปลือกหุ้มเมล็ด (สมปอง, 1996) นอกจากนี้ การเลือกใช้ออร์โมนยังมีผลต่อลักษณะและการแบ่งตัวของเซลล์แขวนลอย คือ การที่เลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารที่เติม BA ทำให้เซลล์ที่ได้มีลักษณะเกาะกลุ่มกันและมีการเพิ่มขนาดของกลุ่มเซลล์ เนื่องจากเซลล์ที่แบ่งไม่มีการกระจายตัว ยังคงเกาะกันแน่นทำให้เห็นเป็นก้อนขนาดใหญ่ (พจมาลย์ และสมปอง, 1999) ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเติม kinetin จะได้เซลล์ส่วนใหญ่ที่มีลักษณะแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (Santos-Gomes และคณะ, 2003) เช่นเดียวกับการเติม TDZ ซึ่งเป็นฮอร์โมนพื้นฐานที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเซลล์พืช มีคุณสมบัติพิเศษในการทำให้เซลล์ที่เกาะกลุ่มกันแน่นแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆได้ดีกว่าฮอร์โมนตัวอื่นๆ (Ellis และคณะ, 1991)



รูปที่ 10 แสดงลักษณะเซลล์แขวนลอย (A) แคลลัสที่เกิดขึ้น (B) แคลลัสที่นำไปเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย

3.2.3 ผลของการสกัดและการตกตะกอนโปรตีนของเซลล์แขวนลอยในสภาวะที่เหมาะสม

การสกัด

ในการสกัดสารจากเนื้อเยื่อพืชมักพบสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูง (S.M. Aljanabi และคณะ, 1999., S.C. Carpentier และคณะ, 2005., D.G. Peterson และ K.S. Boehm, 1997) ซึ่งรบกวนการหาปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทดลองหาวิธีการสกัดด้วยวิธีต่างๆ เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนและเอนไซม์ที่สูงขึ้น

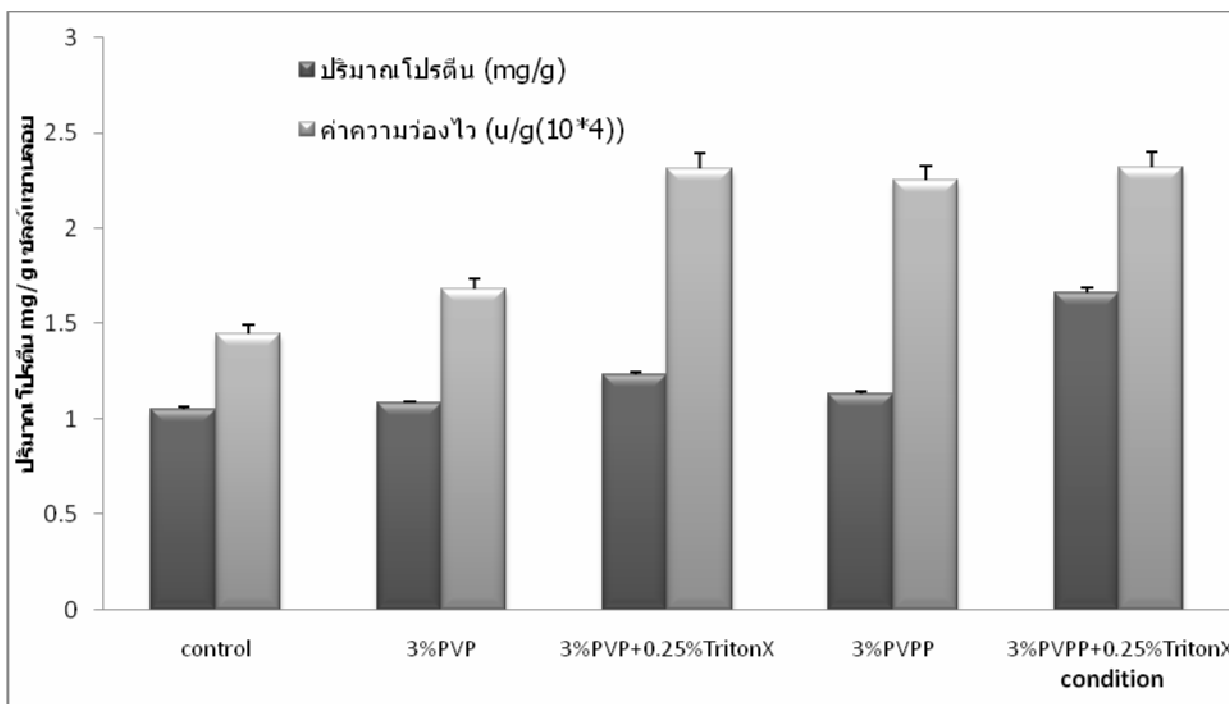
หลังจากนำเซลล์แขวนลอยมาสกัดใน 0.2 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3%PVP, 3%PVP+0.25%TritonX-100, 3%PVPP, 3%PVPP+0.25%TritonX-100 ในอัตราส่วน 1:1 (extraction buffer : น้ำหนักเซลล์แขวนลอย) พบว่าการสกัดที่ให้ปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุดคือการใช้ 0.2 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3%PVPP และ 0.25%TritonX-100 (ตารางที่ 3.6, กราฟที่ 3.6) จากรายงานของ นุระอามาลี (2004) ได้ศึกษาการกำจัดสีในใบยางพาราโดยใช้ PVP ที่ 5%, 10% และ 15% พบว่า สามารถป้องกันการเกิดสีได้เพียงบางส่วนเท่านั้น และเมื่อวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท พบว่า ค่าความว่องไวเพิ่มขึ้นตามเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ PVP ที่ผสมในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด คือ มีค่าความว่องไวสูงสุดที่ 10%PVP เท่ากับ 193,805.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจาก PVP ใช้กำจัดสารฟีนอลิก แต่เมื่อเพิ่มเป็น 15% กลับทำให้ค่าความว่องไวลดลงเหลือ 132,743.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจาก PVP เป็นสารที่ละลายน้ำดังนั้นจึงไม่สามารถเอา PVP ออกจากสารสกัดก่อนวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ดังนั้น PVP ที่ 15% อาจมากเกินไปจนไปจับกับสับสเตรท (*o*-dianisidine) ซึ่งเป็นสารฟีนอลิกชนิดหนึ่ง ส่วน PVPP เป็นตัวจับกับสารตั้งต้น ที่ทำให้เกิดสารประกอบฟีนอลิก และป้องกันกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ระหว่างขั้นตอนการสกัด ดังนั้นเมื่อนำสารสกัดมาวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จึงให้ผลที่ดีกว่าการใช้ PVP และเนื่องจาก PVPP เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อทำการปั่นแยกกากทิ้งก็จะไม่รบกวนการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (A.M. Mayer,1979) นอกจากนี้ การสกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จากการศึกษาของ E.M. GonZalez และคณะ พบว่า ในผล Raspberry และ Blackberry มีสารฟีนอลิกอยู่เป็นจำนวนมากส่งผลให้เกิดสีน้ำตาลได้ง่าย และเลือกใช้ 4%PVPP : น้ำหนัก ในการกำจัดสีที่เกิดขึ้นเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ คือ สกัดด้วย 3%PVPP

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสพบอยู่บริเวณทั่วๆ ไปในเซลล์พืช เช่น plastid cytoplasm และ membrane เป็นต้น Marques และคณะ(1994) รายงานว่า PPO เป็นโปรตีนประเภท hydrophilic ซึ่งจะมีหางสั้นๆ ที่เป็น hydrophobic เกาะติดอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นในการสกัดเพื่อให้ได้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ทุกชนิดจึงจำเป็นต้องใช้สารที่ลดแรงตึงผิวซึ่งจะทำให้เกิดการแตกของผนังเซลล์และพลาสติก เช่น TritonX-100, TritonX-114 หรือ SDS (Nicolas และคณะ, 1994) ร่วมในการสกัดจึงจะสามารถช่วยเพิ่มค่าความว่องไวของเอนไซม์ได้ (A.M. Mayer, 1979) ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า TritonX-100 (เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด nonionic) มีผลให้ค่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นมากแต่ให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย อาจเป็นเพราะว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยอย่างพาราที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เซลล์นั้นมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

โดยสรุป ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีการสกัดใน 0.2 M phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3%PVPP และ 0.25%TritonX-100 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ (ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SD)

condition	ปริมาณโปรตีน (mg/g)	ค่าความว่องไว (u/g)
control	1.055 \pm 0.012	14,520.55 \pm 412.43
3%PVP	1.083 \pm 0.012	16,816.77 \pm 532.33
3%PVP+0.25%TritonX	1.231 \pm 0.013	23,062.50 \pm 848.53
3%PVPP	1.131 \pm 0.013	22,580.65 \pm 742.46
3%PVPP+0.25%TritonX	1.662 \pm 0.026	23,216.56 \pm 795.49



กราฟที่ 3.6 แสดงปริมาณโปรตีนค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ (บาร์ คือค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

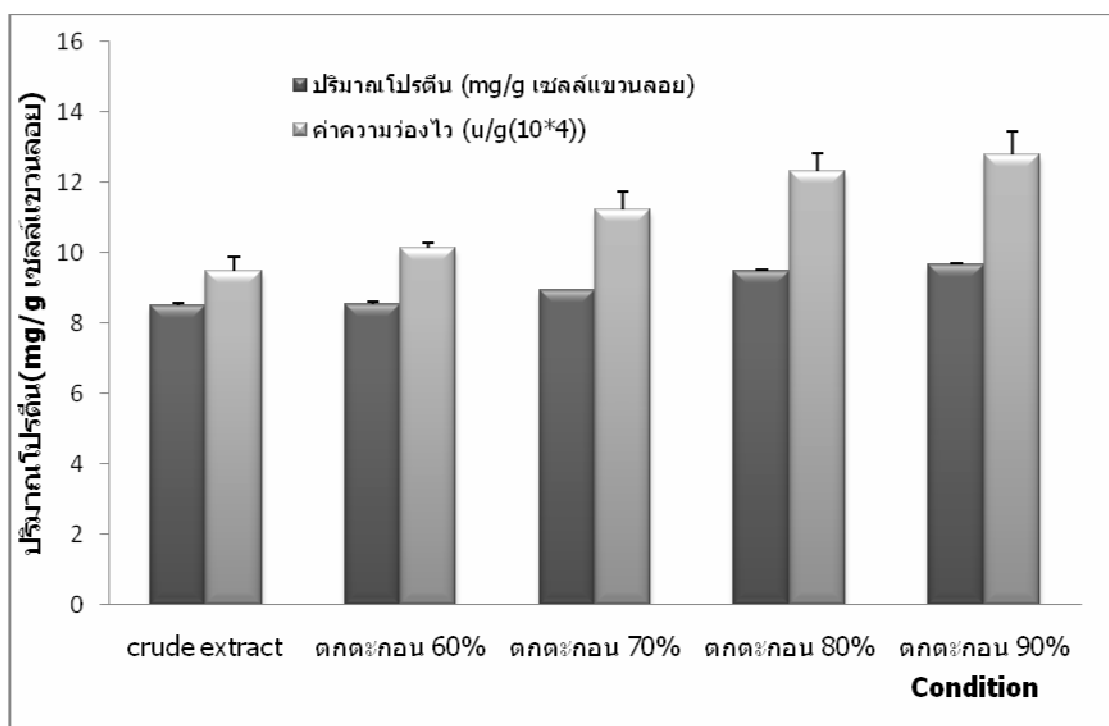
การตกตะกอนโปรตีน

ในการศึกษาผลของการตกตะกอนโปรตีนพบว่า หลังจากการสกัดโดยใช้ 0.2 M phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3%PVPP และ 0.25%TritonX-100 แล้วนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60%, 70%, 80% และ 90% จะให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ โดยการตกตะกอนโปรตีนที่ความอิ่มตัว 80% และ 90% จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันมากนักและในแง่ของความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส นั้น พบว่าการตกตะกอนโปรตีนที่ความอิ่มตัว 80% และ 90% จะให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส คือ 123,200 ยูนิตต่อกรัม และ 127,900 ยูนิตต่อกรัม ซึ่งสูงกว่าสารสกัดเริ่มต้นคือ 94,600 ยูนิตต่อกรัม คิดเป็น 30.23% และ 35.02% ตามลำดับ โดยทั่วไปการตกตะกอนโปรตีนจะสูญเสียค่าความว่องไวไปบางส่วนแต่ในการทดลองนี้ทำให้ค่าความว่องไวสูงขึ้นประมาณ 30-35% เนื่องจาก การตกตะกอนโปรตีนเปรียบเสมือนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ไปบางส่วน กล่าวคือสารฟีนอลิกที่มีผลต่อค่าความว่องไวตกตะกอนได้น้อยกว่าโปรตีน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3.7, กราฟที่ 3.7) Mustafa และคณะ (2005) ได้ศึกษาวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ในต้นมหาหิงค์ โดยทำการตกตะกอน

โปรตีนที่ ความอิมัตว์ 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-70% และ 70-80% พบว่า การตกตะกอนโปรตีนที่ความอิมัตว์ 0-70% ให้ค่าความว่องไวสูงที่สุด

ตารางที่ 3.7 แสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิมัตว์ต่างๆ (ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

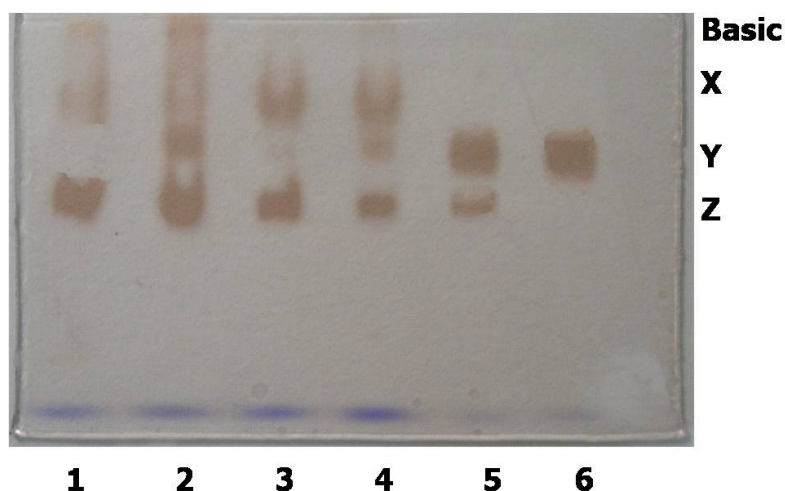
condition	ปริมาณโปรตีน (mg/g)	ค่าความว่องไว (u/g)
crude extract	8.507 \pm 0.075	94600 \pm 424.26
ตกตะกอน 60%	8.534 \pm 0.059	101200 \pm 141.42
ตกตะกอน 70%	8.919 \pm 0.007	112200 \pm 494.97
ตกตะกอน 80%	9.469 \pm 0.049	123200 \pm 494.97
ตกตะกอน 90%	9.653 \pm 0.033	127900 \pm 636.39



กราฟที่ 3.7 แสดงปริมาณโปรตีนค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิมัตว์ต่างๆ (บาร์ คือค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

3.2.4 ผลการเปรียบเทียบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จากใบ, เมล็ด และ เซลล์แขวนลอยของยางพาราพันธุ์ BPM-24

หลังจากนำใบ, เมล็ด และเซลล์แขวนลอยของยางพาราพันธุ์ BPM-24 มาทำให้เกิดบาดแผลและเก็บที่เวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาสกัดและตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยการใช้อิเล็กโตรโฟรีซิส แบบสภาวะธรรมชาติ ในใบและเมล็ดที่ไม่ผ่านการกระตุ้นจะพบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 3 แถบ หลังการกระตุ้นจะพบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เพิ่มขึ้นเป็น 4 แถบ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้นคือ แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันของยางพารา ส่วนในเซลล์แขวนลอยนั้น จะพบความแตกต่างคือ ภายหลังการกระตุ้น แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จะลดจาก 2 แถบ เหลือเพียง 1 แถบซึ่งตรงกับแถบที่มีอยู่เดิมแต่แถบดังกล่าวจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนแถบที่หายไปเป็นแถบที่มีอยู่ในธรรมชาติเมื่อได้รับการกระตุ้นอย่างรุนแรงแถบดังกล่าวจะหายไปดังรูปที่ 3.11 จากผลการทดลองนี้พบว่า แถบที่เพิ่มขึ้นภายหลังการถูกกระตุ้น (แถบ Y) จากทั้ง 3 แหล่งของยางพารานั้นอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้นเพื่อลดความแปรปรวนของการทดลองและง่ายต่อการเตรียมตัวอย่างผู้วิจัยจึงเลือกเซลล์แขวนลอยเป็นแหล่งตัวอย่างเพื่อนำไปศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสภายหลังการถูกกระตุ้นด้วยวิธีต่างๆ และการทำเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อไป

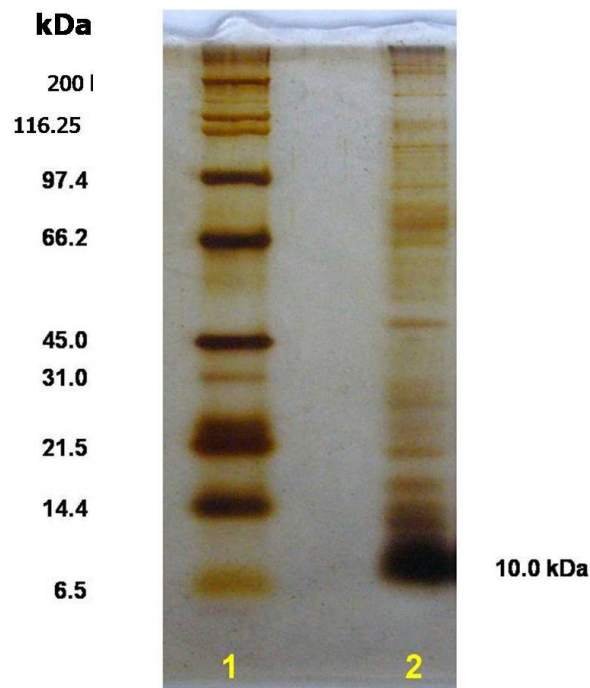


รูปที่ 3.11 แสดงแถบเอนไซม์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จาก ใบ, เมล็ด และเซลล์แขวนลอย จากยางพาราพันธุ์ BPM-24 lane 1 ; ใบยางชุดควบคุม lane 2 ; ใบยางทดลอง lane 3 ; เมล็ดอ่อนชุดควบคุม lane 4 ; เมล็ดอ่อนชุดทดลอง lane 5 ; เซลล์แขวนลอยชุดควบคุม lane 6 ; เซลล์แขวนลอยชุดทดลอง

3.3 ผลของการบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate เพื่อศึกษากลไกการป้องกันตัวเองของพืช

3.3.1 ผลการเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ (filtrate) จากเชื้อรา *P. palmivora*

ภายหลังการเตรียม filtrate โดยตัดเชื้อรา *P. palmivora* จากจานอาหาร PDA แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Henninger เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน เมื่อครบกำหนดนำมากรองเส้นใยออก เก็บเฉพาะน้ำเลี้ยงเชื้อ (filtrate) ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) เนื่องจาก filtrate ที่ได้มีปริมาณโปรตีนน้อยมาก หลังจากทำอิมมูโนโพรบิซิสแบบแปลงสภาพจึงต้องนำมาเจลย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบโปรตีนหลักมีขนาด 10 กิโลดาลตัน (kDa) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ Myosin 200 กิโลดาลตัน β -galactosidase 116.25 กิโลดาลตัน Phosphorylase b 97.4 กิโลดาลตัน Bovine serum albumin 66.2 กิโลดาลตัน Ovalbumin 45.0 กิโลดาลตัน Carbonic anhydrase 31.0 กิโลดาลตัน Soybean trypsin inhibitor 21.5 กิโลดาลตัน Lysozyme 14.4 กิโลดาลตัน และ Aprotinin 6.5 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.12) ผลการทดลองของ Rattarasarn (2003) ที่พบว่าอิลิซิดินบริสุทธิ์สามารถใช้ในการบอกระดับความต้านทานได้ เพราะอิลิซิดินทำให้เกิดการสร้างสคอพอลิตินในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) ได้มากกว่าที่พบในใบยางพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) จากการศึกษาของนารธิตา (2003) ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ในอาหารสูตร PDB แล้วทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและการผ่านคอลัมน์ PD-10 เมื่อนำไปทดสอบ พบว่าอิลิซิดินบริสุทธิ์และอิลิซิดินที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ เพ็ญมาศ (2006) ซึ่งได้เลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ในอาหารสูตร PDB และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนไปทดสอบกับแคลลัสของยางพารา พบว่า แคลลัสของพันธุ์ BPM-24 สามารถกระตุ้นการสร้างสคอพอลิตินได้มากกว่าแคลลัสของพันธุ์ RRIM600 ส่วน filtrate ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ เป็นการเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร Henninger หลังจากตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโพรบิซิสและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบอิลิซิดินขนาด 10 กิโลดาลตัน คล้ายคลึงกับที่เลี้ยงในอาหารสูตร PDB แต่มีข้อดีคือ ใช้เวลาในการเลี้ยงเพียง 15 วัน ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหาร PDB และ Henninger มีราคาถูกกว่าด้วย จากเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงเลือกใช้อิลิซิดินที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร Henninger ในการทดสอบกับเซลล์แขวนลอย เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อไป



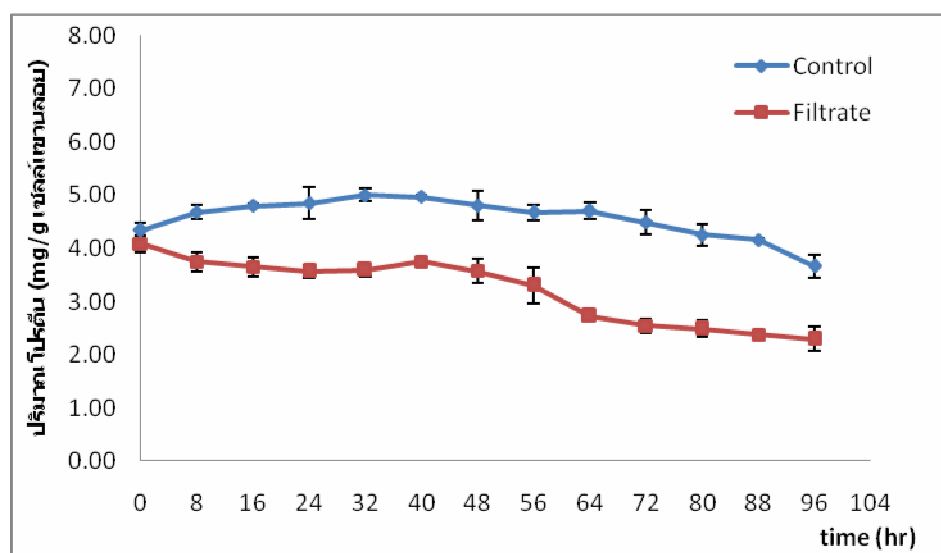
รูปที่ 3.12 แสดงแบบแผนโปรตีนจาก filtrate ของเชื้อรา *P. palmivora* หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท lane 1: แถบโปรตีนมาตรฐาน lane 2: แถบโปรตีนจาก filtrate

จากการทดลองที่ผ่านมาผู้วิจัยได้นำเซลล์แขวนลอยของพาราพันธุ BPM-24 บ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 1×10^3 และ 1×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีข้อ 2.4.3 พบว่า 10 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้น ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 10.12% และ 4.69% ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณโปรตีนจะลดลง 26.85% และ 53.89% ตามลำดับ เมื่อสังเกตลักษณะเซลล์จะเห็นว่าซูโอสปอร์ได้สร้างเส้นใยเกาะอยู่กับกลุ่มเซลล์ ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่ได้จากการทดลองครั้งนี้จึงมีโปรตีนมาจากซูโอสปอร์ปะปนมาด้วย นอกจากนี้เซลล์แขวนลอยมีการตายและโปรตีนลดลงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองในใบ ดังนั้นความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่ใช้ยังสูงเกินไป ผู้วิจัยจึงได้นำเซลล์แขวนลอยมาบ่มด้วย CuSO_4 ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ ตามวิธีข้อ 2.4.3 พบว่า ปริมาณโปรตีนของเซลล์แขวนลอยลดลงประมาณครึ่งหนึ่งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 คือ จาก 7.867 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แขวนลอย เหลือเพียง 5.754 และ 3.627 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แขวนลอย ตามลำดับ และสังเกตลักษณะเซลล์จะมีสีดำขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อผ่านไป 20 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณโปรตีนที่วัดได้เหลือเพียง 2.068 และ 1.725 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แขวนลอยลดลง 73.71% และ 78.07% ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการบ่มเซลล์แขวนลอยจากทั้ง 2 วิธี เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมเพราะทำให้เซลล์เกิดการตายมากเกินไปจนไม่ก่อให้เกิด defense response ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำเซลล์แขวนลอยมาทดลอง

โดยการบ่มด้วย filtrate อ้างอิงจากผลการศึกษาของจิระภา ชัยวงศ์ ที่ได้ศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ filtrate ที่มีผลต่อเซลล์แขวนลอย เพื่อศึกษากลไกการป้องกันตัวเองของพีชนั้น พบว่า filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย จะให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นสูงที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาถึงเอนไซม์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันคือ เอนไซม์ฟีนอลลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส รวมถึงการสะสมสารประกอบฟีนอลิกด้วย โดยเลือกใช้ filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย เป็นตัวกระตุ้น หลังจากนำเซลล์แขวนลอยอายุ 14 วันมาเทรวมกัน แล้วบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย สังเกตผลการเรืองแสงด้วยตาเปล่าทุก 8 ชั่วโมง โดยนำมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) เพื่อดูว่าเซลล์แขวนลอยได้รับการกระตุ้นจาก filtrate แล้วหรือไม่ โดยเซลล์ที่เริ่มเรืองแสงแสดงว่ามีการตอบสนอง ซึ่งสารเรืองแสงนี้คือ สคอพอลิตินซึ่งเป็นไฟโตอิเล็กซินในยางพารา จากผลการทดลองของ จิระภา ชัยวงศ์ นั้น พบว่าเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ filtrate ต่อการสังเคราะห์สคอพอลิตินในเซลล์แขวนลอยยางพารา ปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ filtrate ที่ทดสอบ โดยความเข้มข้นของ filtrate ที่สูงขึ้น จะมีการสังเคราะห์สคอพอลิตินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ filtrate ที่สูงเกินไปมีผลให้การสังเคราะห์สคอพอลิตินลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากการตายของเซลล์ เมื่อเกิดโรคแล้วเซลล์ไม่สามารถผลิตไฟโตอิเล็กซินได้อีกต่อไปและนอกจากนี้เซลล์มีการปลดปล่อยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกมาจำนวนมาก ซึ่งสามารถใช้สคอพอลิตินเป็นสับสเตรท ทำให้ปริมาณของสคอพอลิตินลดลง จากผลการทดลองครั้งนี้ ปรากฏว่าเซลล์จะเริ่มเรืองแสงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 และเรืองแสงมากที่สุดที่ ชั่วโมงที่ 80 หลังจากนั้นการเรืองแสงจะค่อยๆ ลดลง เมื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนพบว่า ในชุดควบคุมปริมาณโปรตีนค่อนข้างจะคงที่และในชุดทดลองปริมาณโปรตีนหลังจากชั่วโมงที่ 56 จะลดลงเรื่อยๆ คือ ที่ 0 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนประมาณ 4.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แขวนลอย เมื่อเวลาผ่านไป 56 ชั่วโมง ลดลงเหลือประมาณ 3.31 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แขวนลอย และ ที่ 96 ชั่วโมง มีโปรตีนเท่ากับ 2.29 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (ตารางที่ 3.8, กราฟที่ 3.8) จากการทดลองของ นุรอามาลี (2004) ที่ทำการตัดใบยางให้มีขนาด 1x1 ตารางนิ้ว แล้วบ่มด้วยซูโอสปอร์ที่มีความเข้มข้น 1×10^7 วิเคราะห์ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ระยะเวลาการบ่มด้วยเชื้อราต่างๆ กัน คือ 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง พบว่าปริมาณโปรตีนในชุดทดลองลดลงเรื่อยๆ ตามเวลาที่ทำการทดลอง คือ ที่ 0 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนประมาณ 5.15 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ลดลงเหลือประมาณ 5 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ที่ 120 ชั่วโมง มีโปรตีนเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง จนสุดท้ายที่ 144 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือครึ่งหนึ่งจากค่าเริ่มต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีเซลล์ตายเกิดขึ้นจำนวนมากจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์

ตารางที่ 3.8 แสดงค่าปริมาณโปรตีนของชุดควบคุมและชุดที่ป้อนด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัม โปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm SD)

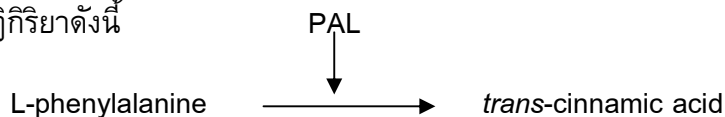
ชั่วโมงที่	ชุดควบคุม(mg/g)	ชุดที่ป้อนด้วย filtrate (mg/g)
0	4.34 \pm 0.13	4.09 \pm 0.15
8	4.68 \pm 0.13	3.75 \pm 0.19
16	4.80 \pm 0.04	3.65 \pm 0.18
24	4.85 \pm 0.31	3.56 \pm 0.13
32	5.00 \pm 0.12	3.59 \pm 0.12
40	4.97 \pm 0.04	3.75 \pm 0.08
48	4.80 \pm 0.28	3.57 \pm 0.22
56	4.68 \pm 0.15	3.31 \pm 0.33
64	4.70 \pm 0.16	2.72 \pm 0.01
72	4.49 \pm 0.22	2.54 \pm 0.12
80	4.25 \pm 0.20	2.48 \pm 0.16
88	4.16 \pm 0.02	2.38 \pm 0.02
96	3.66 \pm 0.21	2.29 \pm 0.22



กราฟที่ 3.8 แสดงค่าปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดที่ป้อนด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (บาร์ คือค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

3.3.2 ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส หลังบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยมาสกัดหลังจากบ่มด้วย filtrate ตามวิธีในข้อ 2.3.4 เพื่อติดตามการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส พบว่า การสังเคราะห์ของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส ที่ผ่านการบ่มด้วย filtrate จะมีปริมาณมากขึ้นจากชุดควบคุมและจะสังเคราะห์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 16 ซึ่งเป็นชั่วโมงแรกๆของการทดลอง คิดเป็น 102.41 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสเป็นเอนไซม์ตัวแรกในกระบวนการสังเคราะห์ phenylpropanoid เร่งปฏิกิริยาการกำจัดแอมโมเนีย โดยจะเปลี่ยน L-phenylalanine เป็น *trans*-cinnamate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการโพลิเมอไรซ์เป็นลิกนิน เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสพบได้ในพืชชั้นสูง (Chen และ McClure, 2000) ราและยีสต์ (D' Cunha และคณะ, 1996) ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส จะเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อพืชที่กำลังเจริญเติบโต และเมื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ (ตารางที่ 3.9, กราฟที่ 3.9) Peng-Fei และคณะ (2005) ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ ภายหลังจากการกระตุ้นด้วย salicylic acid ในผล grape berry พบว่า มีการสร้างเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 0.5 ชั่วโมงเท่านั้นและมีการสร้างสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 1 ก่อนที่จะลดลงในชั่วโมงที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ นุระอามาลี (2004) ที่ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส ในใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 โดยการตัดใบเป็นชิ้นขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร บ่มด้วยซุสเปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* แล้ววางใบบนกระดาษกรองขึ้นเก็บผลทุก 1 ชั่วโมงในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และหลังจากนั้นจะเก็บผลทุกๆ 4 ชั่วโมงจนถึง 16 ชั่วโมง นำสารสกัด ไปวัดความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส โดยวิเคราะห์ผลจากปริมาณของ L-phenylalanine ที่ถูกออกซิไดซ์ต่อชั่วโมง ซึ่ง *trans*-cinnamic acid เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาดังนี้

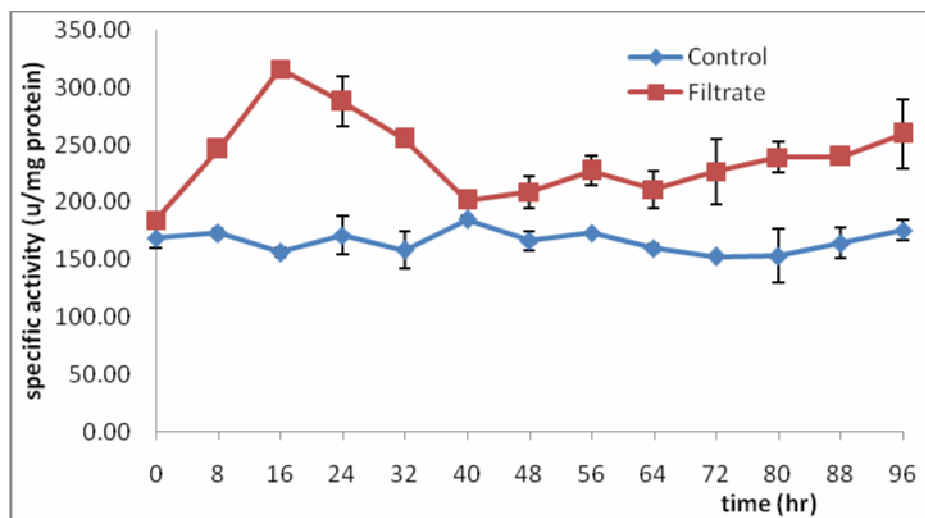


พบว่า การเปลี่ยนแปลงใน 4 ชั่วโมงแรกที่บ่มใบยางด้วยซุสเปอร์ คือความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส เท่ากับ 0.017 ไมโครโมลของกรดซินนามิกต่อชั่วโมง และจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 4 เท่ากับ 0.013 ไมโครโมลของกรดซินนามิกต่อชั่วโมง หลังจากนั้นก็จะสูงขึ้นแล้วค่อนข้างคงที่ แสดงว่า การทำงานของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส ในใบยางเกิดเร็วมากสังเกตได้ยาก ในการทดลองอื่นๆ ที่เคยรายงานมา มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เวลานานหลายสัปดาห์ แต่ก็เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนในช่วงแรกของการทดลองเช่นกัน เพราะการทำงานของเอนไซม์ฟีนิลอลานีน-

แอมโมเนียไลเอสเกิดขึ้นในช่วงแรกและเกิดก่อนเอนไซม์อื่นๆ จากรายงานของ Whetten และ Sederoff (1995) พบว่าเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ สารประกอบฟีโนลิกในขบวนการฟีนิลโพรพานอยด์ รวมถึงลิกนินด้วย และจากการศึกษาของ Gomez และคณะ (2004) ที่ได้ศึกษาการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอสใน เซลล์แขวนลอยของมันสำปะหลังอายุ 5 วัน ภายหลังจากกระตุ้นด้วยอิลิซิเตอร์ที่ได้จากผนัง เซลล์ของยีสต์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง เอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดที่ 15 ชั่วโมง และจะลดลงจนถึง 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาเป็นไปในทาง เดียวกับการศึกษาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้จาก *arabidopsis* ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Phytophthora infestans*. (Fritzmeier และคณะ, 1987., Davis และ Ausubel, 1989)

ตารางที่ 3.9 แสดงค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ฟีนิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส ชุดควบคุม และชุดที่บ่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (ตัวเลขที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm SD)

ชั่วโมงที่	Control (u/mg protein)	Filtrate (u/mg protein)
0	168.93 \pm 9.02	184.17 \pm 2.86
8	172.99 \pm 4.22	246.15 \pm 3.26
16	156.23 \pm 4.08	316.23 \pm 6.37
24	170.90 \pm 16.80	287.78 \pm 21.65
32	158.10 \pm 16.41	255.42 \pm 2.11
40	184.78 \pm 3.73	201.69 \pm 3.60
48	166.33 \pm 7.95	208.97 \pm 13.98
56	173.21 \pm 0.10	227.30 \pm 12.73
64	159.68 \pm 3.50	210.97 \pm 16.03
72	152.45 \pm 0.00	226.70 \pm 28.26
80	153.11 \pm 23.36	239.04 \pm 13.53
88	164.51 \pm 13.23	239.50 \pm 1.44
96	175.32 \pm 8.89	259.53 \pm 29.95



กราฟที่ 3.9 แสดงค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดที่บ่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (บาร์ คือค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

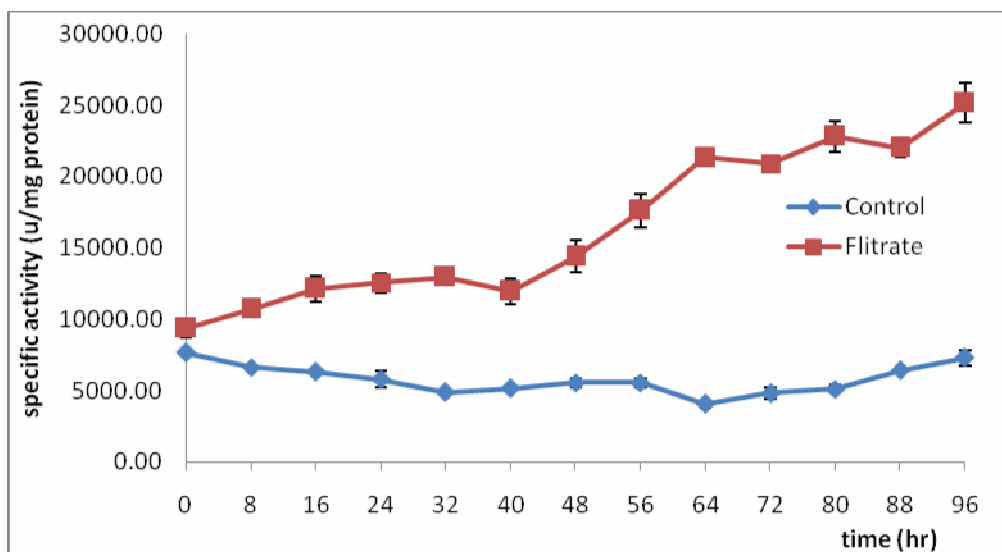
3.3.3 ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส หลังบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย

หลังจากบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ตามวิธีในข้อ 2.3.4 นำเซลล์แขวนลอย มาสกัดเพื่อหาปริมาณของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส พบว่า ในชุดควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ PPO ค่อนข้างจะคงที่คือในชั่วโมงที่ 0 จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 11,100 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็นค่าความว่องไวจำเพาะเท่ากับ 7,680.56 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และจะลดลงเรื่อยๆจนผ่านไป 64 ชั่วโมง (4,058.54 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) หลังจากนั้นจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 96 คือ 7,309.86 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่กระตุ้นโดยการบ่มด้วย filtrate พบว่า มีการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส มากกว่าชุดควบคุมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 คือ 10737.75 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 61.92% และมีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งมีการสังเคราะห์มากที่สุดในชั่วโมงที่ 96 คือ 25158.36 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 244.25% (เมื่อเทียบกับชุดควบคุม) เนื่องจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส มีหน้าที่เปลี่ยนโมเลกุลของฟีนอลไปเป็น quinone แล้วรวมตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่ (polymerization) ขึ้น และมีสีน้ำตาล (Mayer, 1982., sididiq และคณะ, 1992) ดังนั้นเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า เซลล์แขวนลอยที่บ่มด้วย filtrate นั้นจะมีสีที่เข้มกว่าในชุดควบคุมและเริ่มที่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลที่เข้มขึ้นเรื่อยๆ ในชั่วโมงที่ 64 เป็นต้นไปซึ่งจะสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (ตารางที่ 3.10, กราฟที่ 3.10) ในการศึกษาของ Hisae Maki และ คณะ

(2005) จากสภาวะที่กำลังพัฒนาบริเวณ micropylar endosperm ของเมล็ดมะเขือเทศ พบว่า เริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเมื่อเวลาผ่านไป 1 วันและเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่าในวันที่ 3 คิดเป็น 3.96 ยูนิตต่อส่วนที่ตัด เนื่องจากบริเวณดังกล่าวได้มีบาดแผลเกิดขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Piyada Thipyapong (2004) ซึ่งศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ PPO ของมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดโดยการแช่ผลมะเขือเทศในน้ำเป็นเวลา 10 วัน สังเกตผล พบว่า เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 3 วันปริมาณเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะเพิ่มสูงขึ้นและเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 5 ของการทดลอง

ตารางที่ 3.10 แสดงค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ชุดควบคุมและชุดที่บ่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm SD)

ชั่วโมงที่	Control (u/mg protein)	Filtrate (u/mg protein)
0	7680.56 \pm 134.22	9367.64 \pm 612.08
8	6631.52 \pm 131.61	10737.75 \pm 202.74
16	6312.69 \pm 49.23	12150.32 \pm 893.26
24	5803.69 \pm 584.71	12556.98 \pm 685.21
32	4886.00 \pm 90.14	12943.56 \pm 331.34
40	5133.68 \pm 124.09	11969.21 \pm 874.50
48	5566.90 \pm 325.32	14391.45 \pm 1142.01
56	5554.08 \pm 313.93	17622.89 \pm 1158.85
64	4058.94 \pm 270.19	21325.56 \pm 184.91
72	4824.78 \pm 428.41	20904.64 \pm 358.69
80	5127.47 \pm 297.22	22820.36 \pm 1089.29
88	6420.81 \pm 242.56	22033.99 \pm 698.08
96	7309.86 \pm 535.40	25158.36 \pm 1370.71



กราฟที่ 3.10 แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดที่ป่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (บาร์ท คือค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

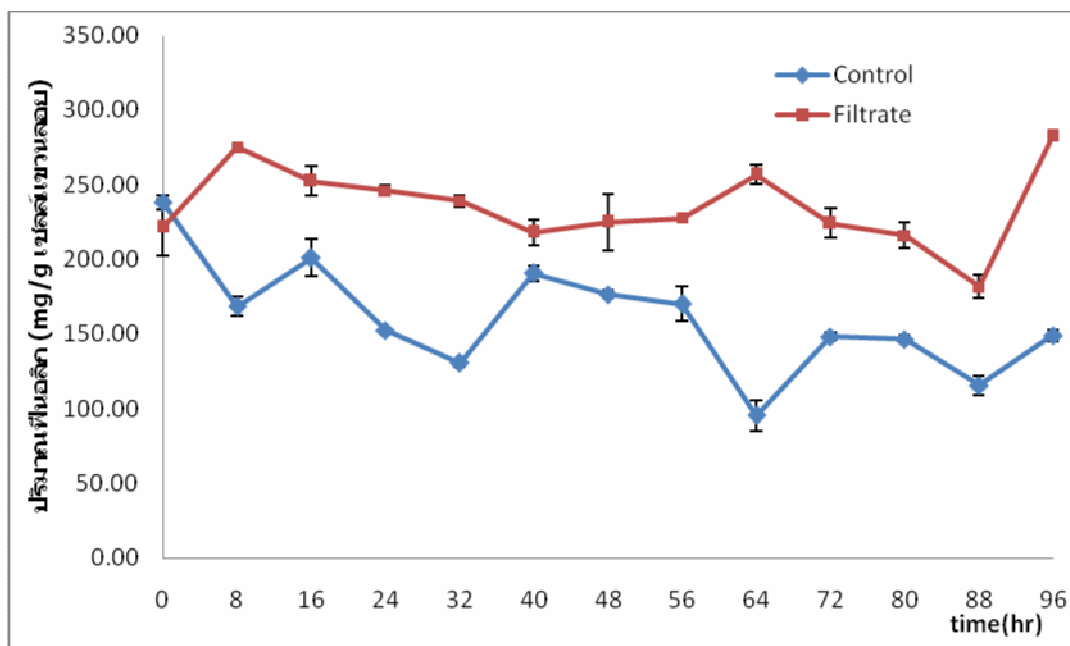
3.3.4 ผลการศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกหลังบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย

สารประกอบฟีนอลิก เป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช Min Chung และคณะ (2006) รายงานว่าสารประกอบเหล่านี้มีความสำคัญต่อระบบสรีระ ฐานวิทยา การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ของพืช Lim และคณะ (2004) ยังพบว่า สารประกอบฟีนอลิก มีความสำคัญต่อระบบการป้องกันจากเชื้อก่อโรคของพืช เป็นสาร antioxidant รวมถึงเป็นสาร anticancer และสามารถต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมภายนอกได้ดี ดังนั้นในการศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในเซลล์แขวนลอยหลังจากบ่มด้วย filtrate ตามวิธี 2.3.4 แล้วนำเซลล์แขวนลอยมาสกัดเพื่อหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก พบว่า ในชุดควบคุมจะมีการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกที่น้อยกว่าชุดที่ได้รับการกระตุ้นและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกของทั้ง 2 ชุด ค่อนข้างจะคงที่ เนื่องจากการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกต้องอาศัยระยะเวลาที่ค่อนข้างนานในการสังเคราะห์ ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเพียง 96 ชั่วโมงเท่านั้นซึ่งอาจจะยังไม่เพียงพอต่อการสังเคราะห์ (ในชั่วโมงที่ 96 มีแนวโน้มของการสะสมสารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้น) (ตารางที่ 3.11, กราฟที่ 3.11) จากงานวิจัยของ Meeta และคณะ (2006) ศึกษาถึงการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกใน ราก และ ใบ ของ betelvine (*piper betle* L.) พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในใบมากกว่าในราก คิดเป็น 105.9 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 35 มิลลิกรัมต่อกรัม จะเริ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 40 วัน และพบมากที่สุดในช่วง 45 วัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Luis Conceicao และคณะ (2006) ได้ศึกษา

ถึงการเปลี่ยนแปลงของ สารฟีนอลิก ใน *Hypericum perforatum* ซึ่งปรากฏว่าเมื่อพืชถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, methyl-jasmonate (MeJ) หรือ salicylic acid (SA) จะมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้นและจะสะสมอยู่ในรูปของ xanthones, flavonols และ flavonones โดยมีการสะสมมากที่สุดเมื่อผ่านไปแล้ว 5-7 วัน และจากการศึกษาของ Kejayasuriya และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษาถึงการเกิดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำยางพารา 2 สายพันธุ์คือ PB86 (พันธุ์อ่อนแอ) และ RRIC100 (พันธุ์ต้านทาน) หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Phytophthora meadii* พบสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราสายพันธุ์ RRIC100 (พันธุ์ต้านทาน) มากกว่า PB86 (พันธุ์อ่อนแอ) ซึ่งในยางพาราพันธุ์อ่อนแอจะมีสารประกอบฟีนอลิกสะสมอยู่ในรูปของ triterpenoids หรือ flavonoids และในยางพาราพันธุ์ต้านทานจะมีสารประกอบฟีนอลิกสะสมอยู่ในรูปของ vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) และ umbelliferone (7-hydroxycoumarin) ซึ่งจะสามารถยับยั้ง zoospore ของเชื้อรา *P. meadii* ได้โดยที่ vanillin จะทำงานในการยับยั้งได้ดีกว่า umbelliferone

ตารางที่ 3.11 แสดงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกชุดควบคุมและชุดที่ป่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm SD)

ชั่วโมงที่	ชุดควบคุม (mg/g)	ชุดที่ป่มด้วย filtrate (mg/g)
0	238.24 \pm 4.99	221.47 \pm 18.72
8	168.53 \pm 6.24	275.29 \pm 0.00
16	201.18 \pm 12.48	252.35 \pm 9.98
24	152.65 \pm 1.25	246.18 \pm 3.74
32	130.59 \pm 2.50	239.12 \pm 3.74
40	190.59 \pm 4,99	217.94 \pm 8.73
48	176.47 \pm 2.50	225.00 \pm 18.72
56	170.29 \pm 11.23	227.65 \pm 0.00
64	95.29 \pm 9.98	256.76 \pm 6.24
72	148.24 \pm 2.50	224.12 \pm 9.98
80	146.47 \pm 2.50	216.18 \pm 8.73
88	115.59 \pm 6.24	181.76 \pm 7.49
96	149.12 \pm 3.74	282.35 \pm 0.00



กราฟที่ 3.11 แสดงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดที่ป่มด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย (บาร์ คือค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

3.4 ผลการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

3.4.1 แยกโปรตีนที่ได้จากเซลล์แขวนลอยโดยผ่าน คอลัมน์ ion exchange แบบ anionic ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นและผ่านการกระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย

จากการป่มเซลล์แขวนลอยยารพาราพังก์ BPM-24 ด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย ผู้วิจัยได้เห็นถึงความแตกต่างของการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ระหว่างชุดควบคุมและชุดที่ป่มด้วย filtrate มากที่สุด ส่วนเอนไซม์ฟีนอลานีนแอมโมเนียไลเอสเห็นความแตกต่างเพียงเล็กน้อย และสารประกอบฟีนอลิกยังไม่สามารถหาสถานะที่เหมาะสมได้ กล่าวคือ ยังไม่เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนด้วยความเข้มข้นของ filtrate ที่ใช้ในการศึกษา รวมทั้งเวลาที่ใช้ศึกษา ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ด้วยวิธีต่างๆ เพื่อศึกษาถึงไอโซไซม์ที่เกิดจากการป้องกันตัวเองของพืช

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสพบได้ในพืชชั้นสูงเกือบทุกชนิด (Hisae and Yukio, 2006) จากรายงานที่ผ่านมาได้เห็นการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนในพืชต่างๆ เช่น องุ่น (Estrella และคณะ, 2005), พลัม (Siddiq และคณะ, 1996), ส่วนต่างๆของกล้วย (Chang-Peng Yang และคณะ, 2001), ราสเบอร์รี่ (Eva M. และคณะ, 1999), ยาสูบ (Chunhua Shi และ

คณะ, 2002) และ มะเขือเทศ (Casado J. และคณะ, 2004) เป็นต้น จากงานวิจัยของ Wititsuwannakul และคณะ (2002) ซึ่งได้ทำการศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่มีอยู่ใน B-serum ที่ได้เอนไซม์พาราซายพันธุ์ RRIM600 โดยการผ่านคอลัมน์ CM-sepharose CL-6B พบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสชนิดเบสิก 2 แถบ คือ PPO-I เป็นไอโซไซม์หลัก และ PPO-II เป็นไอโซไซม์รอง ที่ชะออกมาด้วยเกลือความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ NaCl และ 0.2 โมลาร์ NaCl ตามลำดับ

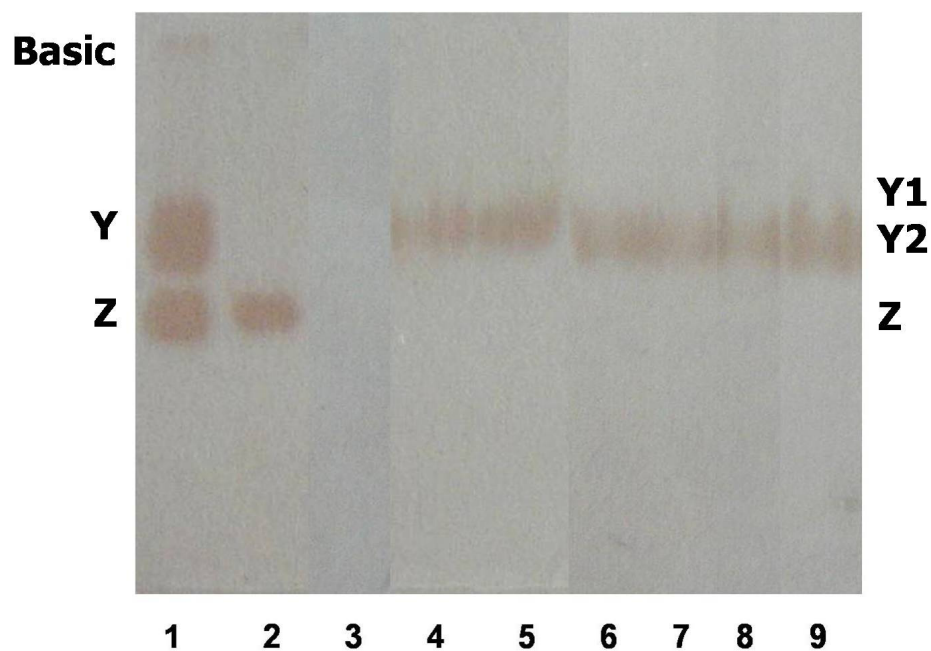
ผู้วิจัยมีความสนใจจะศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่เกิดจากการป้องกันตัวเองของพืชโดยการทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ให้บริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาคุณสมบัติของ โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ จากเซลล์แขวนลอยของพาราซายพันธุ์ BPM-24 ผู้วิจัยได้นำเซลล์แขวนลอยที่สกัดด้วย 0.2 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3% PVPP + 0.25% TritonX-100 ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% ละลายกลับด้วย 0.02 โมลาร์ sodium phosphate buffer pH 7 มาทำให้บริสุทธิ์หลายวิธีด้วยกันโดยวิธีแรกนำมาผ่านคอลัมน์ hydrophobic interaction column (HIC) ซึ่งปรับสมดุลด้วย 0.02 โมลาร์ sodium phosphate buffer pH 7 ที่มีเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 โมลาร์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ที่มีเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 โมลาร์ พบว่า หลังจากการตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ตามข้อ 3.1.1 จะพบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เพียง 2 แถบเท่านั้น (ดังเช่นหลังตกตะกอนโปรตีน) ซึ่งไม่สามารถแยก โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ ได้ตามต้องการ (ข้อมูลไม่แสดง) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้คอลัมน์ con-A agarose ซึ่งเป็นโครมาโทกราฟีแบบจับจำเพาะ (affinity chromatography) เพื่อให้บริสุทธิ์ โดยปรับสมดุลในคอลัมน์ด้วย TC บัฟเฟอร์ (0.01 โมลาร์ tris-HCl + 0.14 โมลาร์ NaCl + 0.01 โมลาร์ CaCl_2) แล้วชะคอลัมน์ด้วย TE บัฟเฟอร์ (0.01 โมลาร์ tris-HCl + 0.14 โมลาร์ NaCl + 0.01 โมลาร์ EDTA) และบัฟเฟอร์ที่มีน้ำตาล methyl-mannoside ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แล้วนำไปตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบสภาพธรรมชาติตามข้อ 3.1.1 พบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 3 แถบ คือ ที่ TC บัฟเฟอร์ (unbound) พบ 1 แถบ (แถบ Z) ที่ 5-10 มิลลิโมลาร์ methyl-mannoside พบอีก 1 แถบ (แถบ Y1) และที่ 20-100 มิลลิโมลาร์ methyl-mannoside พบอีก 1 แถบ (แถบ Y2) แต่แถบ Y2 มีลักษณะกระจายไม่คมชัดและมีแถบ Y1 ปะปนมาด้วย (รูปที่ 3.13) แม้ว่าจะยังแยกแถบ Y1 และแถบ Y2 ออกจากกันไม่ได้ทั้งหมด แต่พอสรุปได้ว่า แถบ Y1 และแถบ Y2 เป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งมีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบและแถบ Y2 มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลสูงกว่าแถบ Y1 ส่วนแถบ Z ไม่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบเป็นไอโซไซม์ที่สลายตัวได้เร็ว และระยะทางการเคลื่อนที่คล้ายแถบ Z ที่พบในใบซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่ไม่เสถียรเช่นกัน คือ จะหายไปเมื่อเกิดการกระตุ้น ได้แก่ การทำให้เกิดบาดแผล, การกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์หรือ CuSO_4 ดังนั้น

ผู้วิจัยจึงได้นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยที่ไม่ผ่านการกระตุ้นและผ่านการกระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย มาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B ซึ่งปรับสมดุลด้วย 0.02 โมลาร์ sodium phosphate buffer pH 7 แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีเกลือความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ NaCl - 0.09 โมลาร์ NaCl หลังจากการตรวจหาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยวิธีอิลคโตรโพรซีส แบบสภาพธรรมชาติ ตามข้อ 3.1.1 อีกครั้ง ปรากฏว่า ในชุดที่ไม่ผ่านการกระตุ้น จะพบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส อย่างน้อย 5 แถบที่ unbound (basic), 0.05 โมลาร์ NaCl (PPO1), 0.07 โมลาร์ NaCl (PPO2), 0.08 โมลาร์ NaCl (PPO3) และ 0.09 โมลาร์ NaCl (PPO4) (รูปที่ 3.14) โดยแถบ PPO1 เคลื่อนที่ตรงกับแถบ Z ที่กล่าวแล้วข้างต้น ส่วน PPO2 อาจตรงกับที่ชะด้วย TE บัฟเฟอร์ แต่มีปริมาณน้อยมากจึงย้อมไม่ติด PPO3 และ PPO4 เคลื่อนที่ได้ใกล้เคียงกับแถบ Y1 และแถบ Y2 ส่วนในชุดที่ผ่านการกระตุ้นจะพบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เพียง 3 แถบ คือ แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่ชะด้วยความเข้มข้นเกลือ 0.07 โมลาร์ NaCl, 0.08 โมลาร์ NaCl และ 0.09 โมลาร์ NaCl และพบว่าปริมาณสูงกว่าในชุดที่ไม่ผ่านการกระตุ้น (รูปที่ 3.15) ดังนั้นแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ดังกล่าวอาจเป็นแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่เกิดขึ้นเนื่องจากระบบป้องกันของยางพารา (กราฟที่ 3.12, กราฟที่ 3.13)

เนื่องจากผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันของยางพาราดังนั้นจึงเลือก PPO3 และ PPO4 ซึ่งเป็นไอโซไซม์หลัก (major isozyme) มาศึกษาคุณสมบัติจำเพาะต่างๆ ส่วน PPO1 เป็น ไอโซไซม์ที่มีความพิเศษคือ เป็นแถบที่มีอยู่ในธรรมชาติแต่จะสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกแถบนี้มาศึกษาเพิ่มเติมเพื่อศึกษาถึงความแตกต่างที่มีต่อ ไอโซไซม์ PPO3 และ PPO4 ด้วย เมื่อนำทั้ง 3 ไอโซไซม์ มาหาความว่องไวจำเพาะพบว่า พบว่า PPO1 มีค่าความว่องไวจำเพาะ 6,004.55 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นความบริสุทธิ์ 4 เท่า ส่วน PPO3 และ PPO4 จะมีค่าความว่องไวจำเพาะ 141,665 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 1,900,000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นความบริสุทธิ์ 94.44 เท่า และ 1,266.67 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 3.12) จากรายงานที่ผ่านมาในส่วนของ B-serum จากน้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้น พบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 2 ไอโซไซม์ (PPO-I และ PPO-II) ซึ่ง PPO-II จะมีค่าความว่องไวจำเพาะ 509.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัม สูงกว่า PPO-I ที่มีค่าความว่องไวจำเพาะ 233.99 ยูนิตต่อมิลลิกรัม หรือประมาณ 2.5 เท่า (Wititsuwannakul และคณะ, 2002) เช่นเดียวกับรายงานของ Chunhua shi (2001) พบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 2 ไอโซไซม์ ในยาสูบ ซึ่ง PPO-I จะมีค่าความว่องไว 3,700 ยูนิตต่อมิลลิกรัม คิดเป็น 72 เท่าจากสารสกัดตั้งต้น

เมื่อนำ PPO1, PPO3 และ PPO4 ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพธรรมชาติตามวิธีข้อ 2.5.6 ปรากฏว่าการเคลื่อนที่ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสทั้ง 3 ไอโซไซม์กลับมายู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน สรุปได้ว่า PPO1, PPO3 และ PPO4 อาจจะมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน ส่วนในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติแล้ว PPO1 เคลื่อนที่ได้ไกลที่สุดนั้น อาจเป็นเพราะ PPO1 มีประจุมากกว่าซึ่งการเคลื่อนที่ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาตินั้นจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและประจุ ดังนั้นเมื่อ PPO1 เคลื่อนที่ได้ไกลกว่า PPO3 และ PPO4 จึงสรุปได้ว่า PPO1 มีประจุมากกว่า PPO3 และ PPO4 (รูปที่ 3.16)

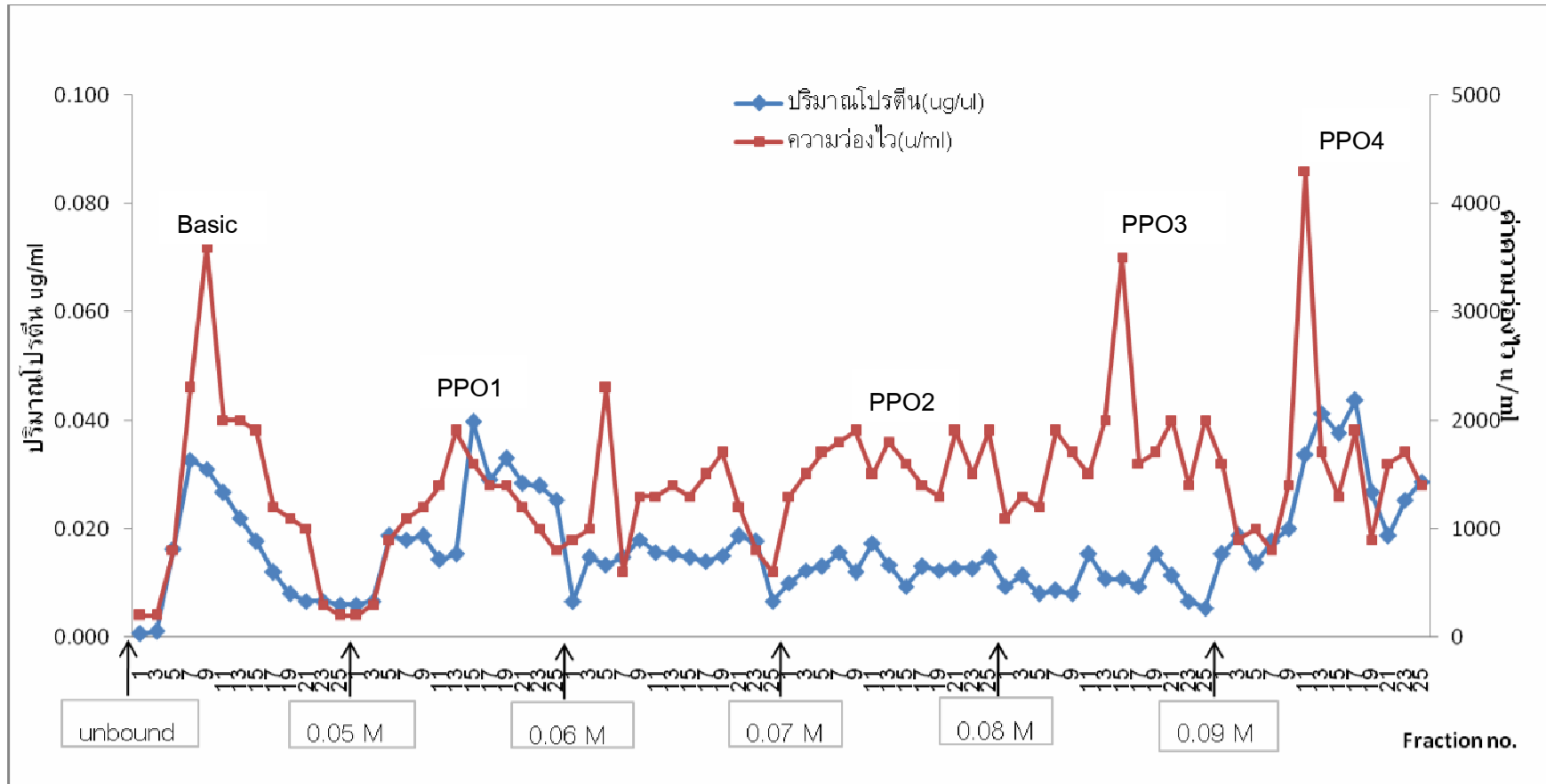
หลังจากนั้นจึงนำ PPO1, PPO3 และ PPO4 ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพธรรมชาติตามวิธีข้อ 2.5.7 แล้วย้อมโปรตีนด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบว่าไม่สามารถสรุปน้ำหนักโมเลกุลของโพลีฟีนอลออกซิเดสทั้ง 3 ไอโซไซม์ได้ เนื่องจากยังมีโปรตีนตัวอื่นปนอยู่แต่ไม่มากนัก (รูปที่ 3.17) อย่างไรก็ตาม ความบริสุทธิ์ของไอโซไซม์ที่เตรียมได้มีค่าสูงมาก ประมาณ 100 และ 1,000 เท่า สำหรับ PPO3 และ PPO4



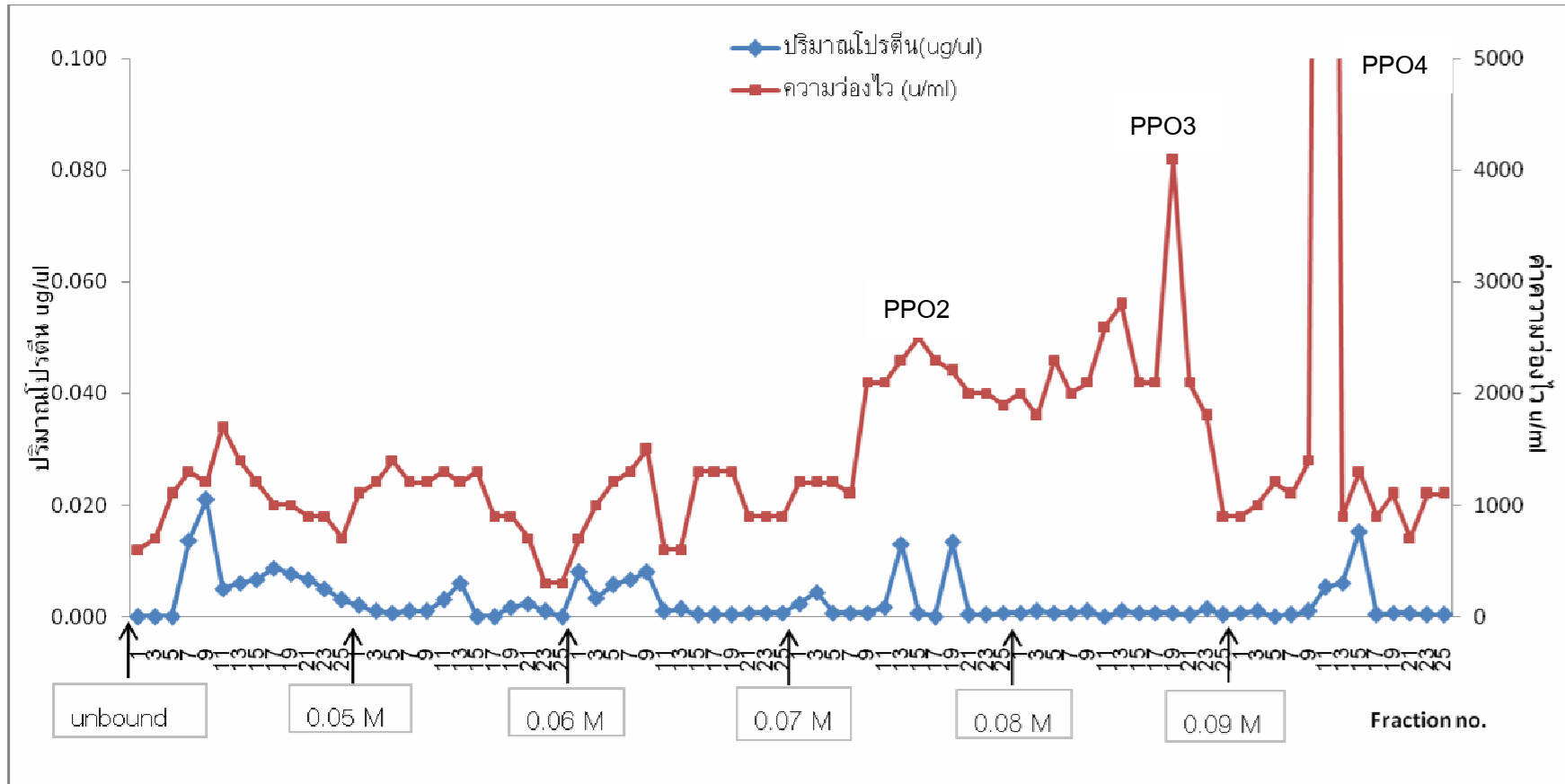
รูปที่ 3.13 แสดงไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเซลล์แขวนลอยภายหลังผ่านคอลัมน์ conA-agarose lane1 : แถบเอนไซม์ก่อนลงคอลัมน์ lane2 : แถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ที่ชะด้วย TC บัฟเฟอร์ lane3 : แถบ โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ที่ชะด้วย TE บัฟเฟอร์ lane 4-9 : แถบ โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ที่ชะด้วย บัฟเฟอร์ที่มีน้ำตาล methyl-mannoside ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ตารางที่ 3.12 แสดงค่าความบริสุทธิ์ของไอโซไซม์ PPO1, PPO3 และ PPO4

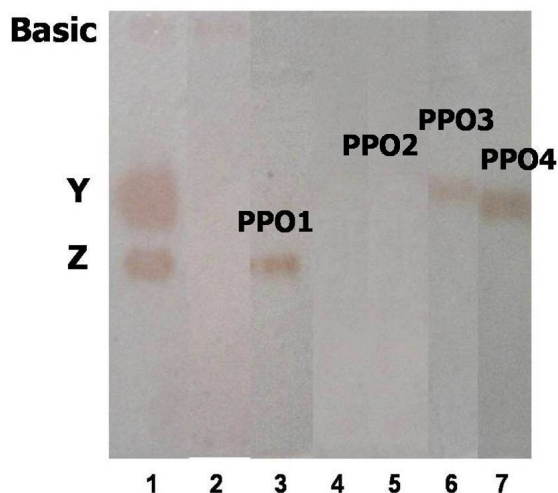
step	total protein(mg)	total activity (u)	specific activity (u/mg)	purification fold
crude	82.00	123,000.00	1,500.00	1.00
PD-10	39.44	255,600.00	6,480.07	4.32
DEAE-Sepharose CL-6B				
PPO1	6.16	37,000.02	6,004.55	4.00
PPO3	0.04	5,099.94	141,665.00	94.44
PPO4	0.02	34,200.00	1,900,000.00	1,266.67



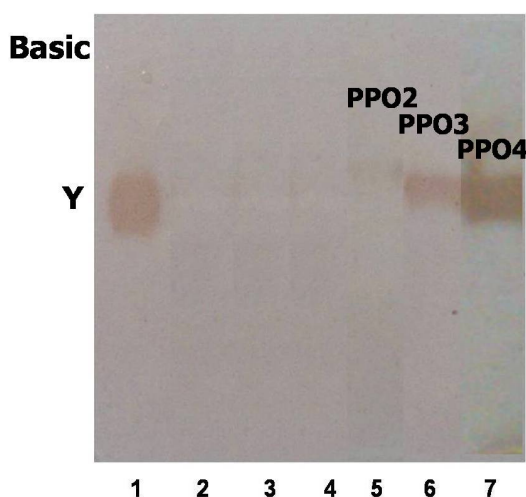
กราฟที่ 3.12 แสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสหลังจากคอลัมน์ ion-exchange จากเซลล์แขวนลอยที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย



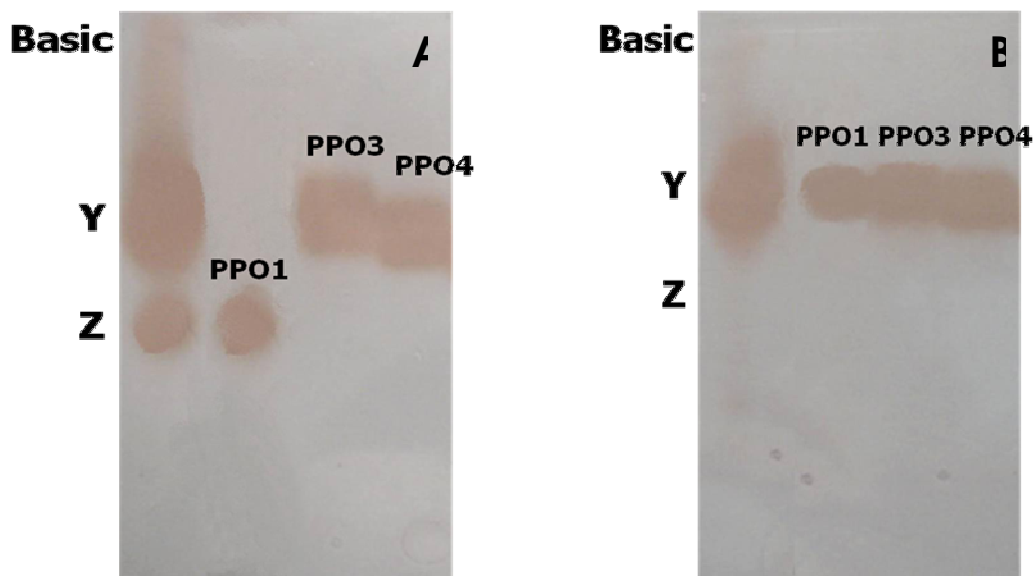
กราฟที่ 3.13 แสดงปริมาณโปรตีนและค่าความขุ่นของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสหลังจากคอลัมน์ ion-exchange จากเซลล์แขวนลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย



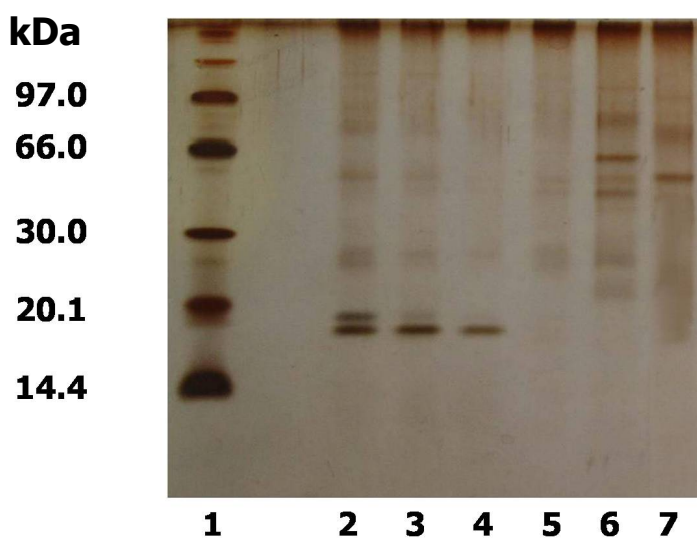
รูปที่ 3.14 แสดงแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเซลล์แขวนลอยที่ไม่ถูกกระตุ้นภายหลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic lane 1 : แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสก่อนผ่านคอลัมน์ lane 2 : แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ชะด้วย 0.02 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 lane 3-7 : แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสหลังผ่านคอลัมน์ที่ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีเกลือความเข้มข้น 0.05, 0.06, 0.07, 0.08 และ 0.09 โมลาร์ NaCl ตามลำดับ



รูปที่ 3.15 แสดงแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเซลล์แขวนลอยที่ถูกกระตุ้นภายหลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic lane 1 : แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสก่อนผ่านคอลัมน์ lane 2 : แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ชะด้วย 0.02 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 lane 3-7 : แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสหลังผ่านคอลัมน์ที่ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีเกลือความเข้มข้น 0.05, 0.06, 0.07, 0.08 และ 0.09 โมลาร์ NaCl ตามลำดับ



รูปที่ 3.16 แสดงแถบโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์เปรียบเทียบระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพธรรมชาติและแบบแปลงสภาพธรรมชาติ A) native-PAGE B) SDS-PAGE

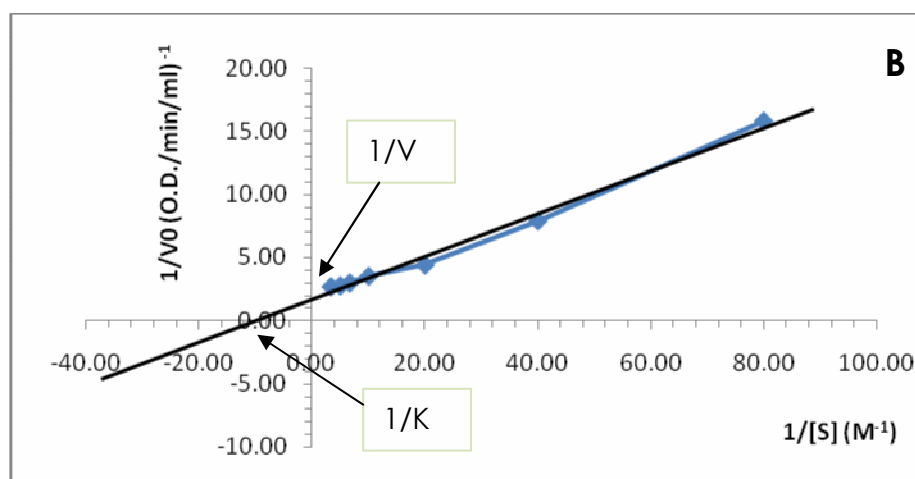
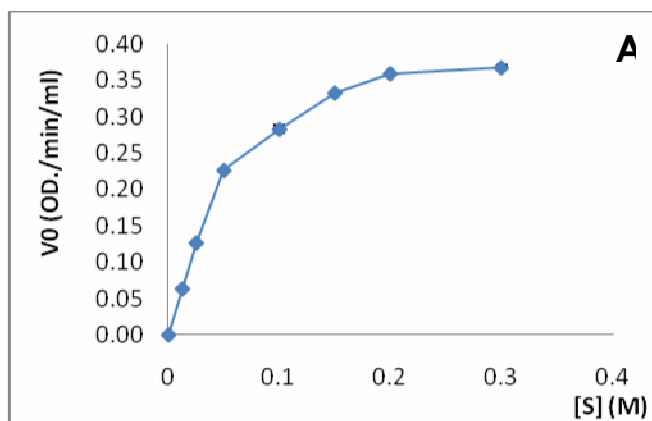


รูปที่ 3.17 แสดงแบบแผนโปรตีนของ โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท lane1: แถบโปรตีนมาตรฐาน lane 2: แถบโปรตีนก่อนตกตะกอนโปรตีน lane3 : แถบโปรตีนหลังตกตะกอนโปรตีน lane 4: แถบโปรตีนหลังผ่านคอลัมน์ PD-10 lane 5-7: แถบโปรตีนหลังผ่านคอลัมน์ ion-exchange โดยที่ lane 5: PPO1 lane 6: PPO3 lane 7: PPO4

3.5 ผลการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสหลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

3.5.1 ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำสารละลายที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic ที่ชะด้วยเกลือความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (PPO1), 0.08 โมลาร์ (PPO3), 0.09 โมลาร์ (PPO4) มาตรวจหาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เมื่อใช้สับสเตรทที่แตกต่างกัน ได้แก่ catechol, L-dopa, dopamine และ catechin สำหรับ catechol จะใช้ปฏิกิริยาเดียวกับการหาค่าความว่องไวในข้อ 2.4.4 โดยที่ PPO3 และ PPO4 ใช้ความเข้มข้นของ catechol คือ 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ สำหรับ PPO1 ใช้ความเข้มข้น 0.003, 0.006, 0.0125, 0.025, 0.05 และ 0.1 โมลาร์ ส่วน L-dopa, dopamine และ catechin จะใช้ 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 ผสมกับความเข้มข้นของสับสเตรทที่แตกต่างกัน คือ 0.0075, 0.015, 0.03, 0.05, 0.07 และ 0.1 โมลาร์ พบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ทั้ง 3 ไอโซไซม์ มีความจำเพาะต่อสับสเตรท 2 ชนิดคือ catechol และ dopamine ส่วน L-dopa และ catechin ไม่พบความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยที่ PPO1 จะจำเพาะกับสับสเตรททั้ง 2 ชนิดแต่จะมีความจำเพาะกับ catechol มากกว่า dopamine ซึ่งมีค่า Km เท่ากับ 33 มิลลิโมลาร์ และ 83 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ PPO3 จะมีความจำเพาะกับ catechol ซึ่งมีค่า Km เท่ากับ 83 มิลลิโมลาร์ ส่วน PPO4 จะมีความจำเพาะกับ dopamine ซึ่งมีค่า Km เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 3.18, ตารางที่ 3.13) จากรายงานของ Wititsuwannakul และคณะ (2002) ที่ศึกษาค่า Km ของเอนไซม์ PPO-I และ PPO-II โดยมี dopamine, L-dopa และ catechol เป็นสับสเตรท พบว่า Km ของ PPO-I มีค่าเท่ากับ 2.08, 8.33 และ 9.09 มิลลิโมลาร์ ขณะที่ PPO-II มีค่าเท่ากับ 2.12, 4.76 และ 7.14 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับของสับสเตรทข้างต้น โดยที่ PPO-I และ PPO-II จะมีความจำเพาะกับ dopamine มากกว่า catechol ประมาณ 4 เท่า ซึ่งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่ได้จากส่วน B-serum ของน้ำยางนั้นจะมีความจำเพาะกับสับสเตรทจำพวก diphenol มากกว่า monophenol



รูปที่ 3.18 แสดงตัวอย่างกราฟการหา K_m และ V_m (A) ตัวอย่างกราฟ Michaelis-Menten (B) ตัวอย่างกราฟ Lineweaver-Burk plot (บารี คือค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

ตารางที่ 3.13 สรุปค่าความจำเพาะต่อสับสเตรทของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์

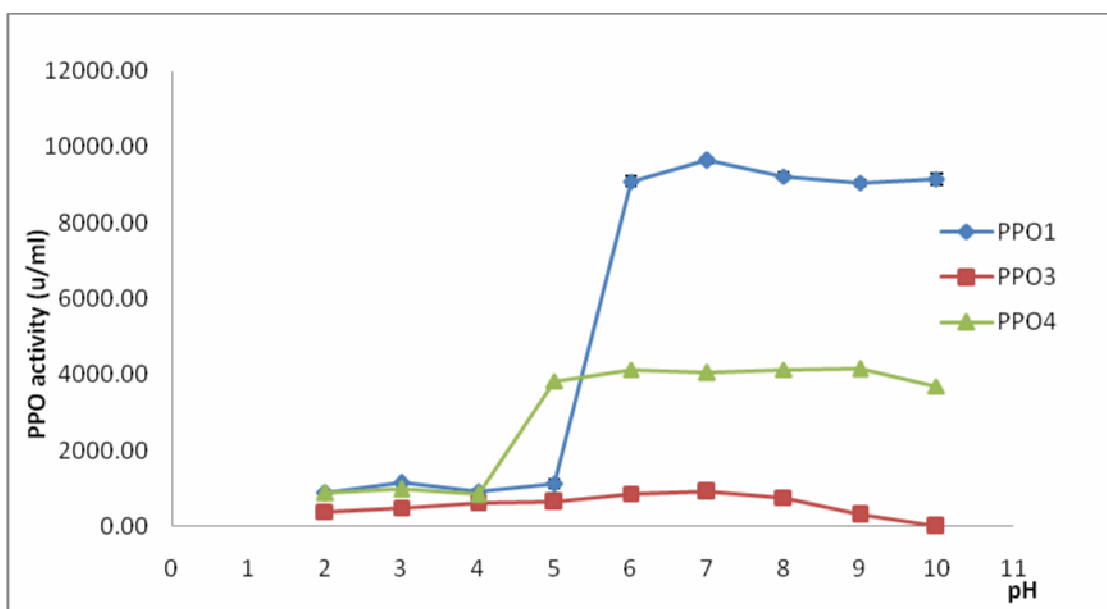
Substrate	K_m (M)			V_m (O.D./min/ml)		
	PPO1	PPO3	PPO4	PPO1	PPO3	PPO4
dopamine	0.083	0.2	0.05	25	2.5	10
catechol	0.033	0.083	0.167	10	0.5	5
L-dopa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
catechin	ND	ND	ND	ND	ND	ND

3.5.2 ศึกษาความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำสารละลายที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic ที่ชะด้วยเกลือความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (PPO1), 0.08 โมลาร์ (PPO3), 0.09 โมลาร์ (PPO4) มาตรวจหาความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยบ่มสารละลายใน pH buffer 2-10 ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, pH 6.5 ปริมาตร 0.86 มิลลิลิตรโดยใช้ 0.5 โมลาร์ dopamine ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท (เนื่องจาก dopamine เป็นสับสเตรทที่จำเพาะต่อทั้ง 3 ไอโซไซม์ และเป็นวิธีที่ง่ายต่อการทดลอง) พบว่า PPO1 ไม่สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดหรือช่วง pH 2-5 แต่จะสามารถทนได้ดีที่สภาวะเป็นกลางถึงด่างหรือช่วง pH 6-10 PPO3 จะมีความทนต่อสภาวะกรดและด่าง หรือทุกช่วง pH ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่จะไม่สามารถทนได้เลยในช่วง pH 9 และ 10 ส่วน PPO4 จะสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกลางถึงด่างหรือช่วง pH 5-10 ได้เป็นอย่างดี (ตารางที่ 3.14, กราฟที่ 3.14) ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกันกับในน้ำยาง (Wititsuwannakul และคณะ, 2002) และ ส่วนต่างๆของกล้วย (Chang, 2001) ที่ทนได้ดีในช่วง pH 4-10 โดยใช้ 10 มิลลิโมลาร์ dopamine เป็นสับสเตรท ซึ่งจะแตกต่างจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่ได้จากมะเขือเทศ (Casado-vela.J, 2004) และ เกาลัด (Jinsen, 2004) ที่มีความทนต่อช่วง pH 4-6 หรือในสภาวะที่เป็นกรดเท่านั้น โดยมี tert-butylcatechol (TBC) และ catechol เป็นสับสเตรท อย่างไรก็ตาม ความทนต่อสภาวะ pH ที่ต่างกันของพืชจะขึ้นอยู่กับ ขั้นตอนในการสกัด, ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์, ชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้, สับสเตรทที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ และ ตำแหน่งที่พบของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเซลล์พืช (Alyward และ Haisman, 1969)

ตารางที่ 3.14 แสดงค่าความว่องไวของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ที่ pH ต่างๆ (ค่า \pm คือ ค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

pH	PPO1 (unit/ml)	PPO3 (unit/ml)	PPO4 (unit/ml)
2	875 \pm 35.36	400 \pm 35.36	875 \pm 35.36
3	1150 \pm 70.71	487.5 \pm 17.67	975 \pm 35.36
4	925 \pm 35.36	612.5 \pm 17.67	850 \pm 70.71
5	1125 \pm 106.07	650 \pm 35.36	3825 \pm 35.36
6	9100 \pm 141.42	862.5 \pm 53.03	4125 \pm 106.07
7	9650 \pm 70.71	912.5 \pm 17.67	4050 \pm 70.71
8	9225 \pm 106.07	762.5 \pm 17.67	4125 \pm 35.36
9	9050 \pm 70.71	300 \pm 0.00	4150 \pm 70.71
10	9150 \pm 141.42	0	3700 \pm 70.71



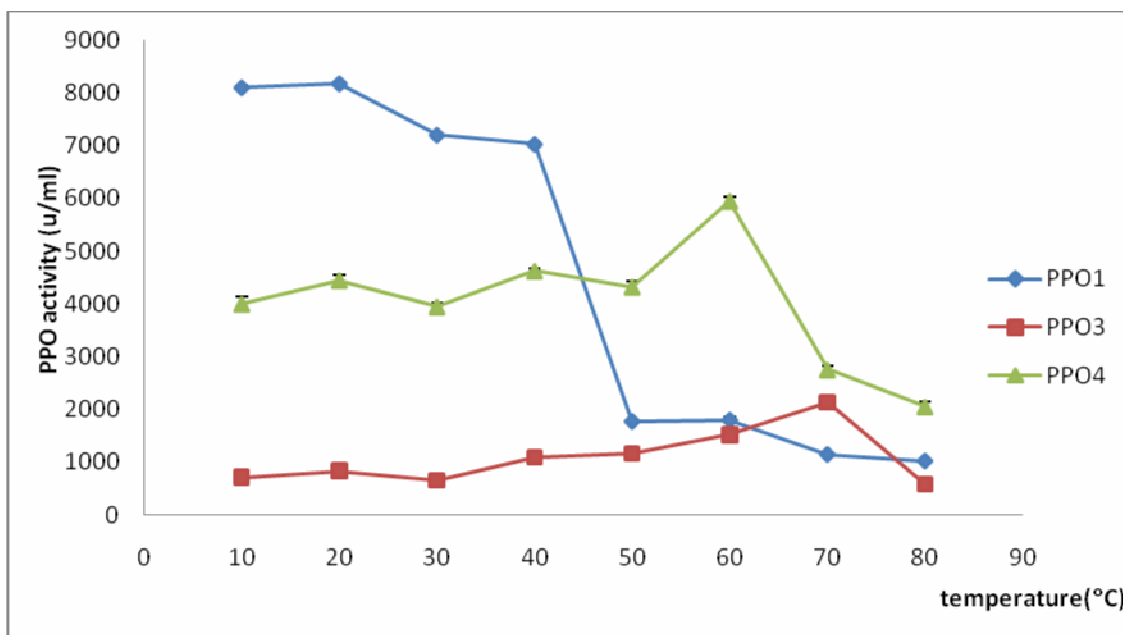
กราฟที่ 3.14 เปรียบเทียบค่าความว่องไวของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ที่ pH ต่างๆ (บาร์ คือ ค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

3.5.3 ศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำไอโซไซม์ PPO1, PPO3 และ PPO4 มาหาค่าความเสถียรต่ออุณหภูมิ โดยปมสารละลายที่อุณหภูมิ 0-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นนำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, pH 6.5 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตรโดยใช้ 0.5 โมลาร์ dopamine ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท พบว่า ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส จะเป็นช่วงที่ PPO1 ทนได้เช่นเดียวกับในผักกาดขาว (Takeshi และคณะ, 2001) และ ผลมะเขือเทศ (Casado และคณะ, 2004) PPO3 จะทนได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 10 องศาเซลเซียส และจะทนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งจะแตกต่างจาก PPO4 คือ PPO4 จะสามารถทนได้ดีตั้งแต่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสและสามารถทนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3.15, กราฟที่ 3.15) ผลการศึกษาเป็นไปในทางเดียวกันกับ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสทั้ง 2 ไอโซไซม์ ในส่วนของปี-ซีรัมจากน้ำยางพารา (Wititsuwannakul และคณะ, 2002), ผลองุ่น (Estrella และคณะ, 2007) และส่วนต่างๆของกล้วย (Chang-Peng, 2001)

ตารางที่ 3.15 แสดงค่าความว่องไวของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ที่ อุณหภูมิต่างๆ (ค่า \pm คือ ค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

Temperature($^{\circ}$ C)	PPO1 (unit/ml)	PPO3 (unit/ml)	PPO4 (unit/ml)
10	8100 \pm 35.36	700 \pm 70.71	4000 \pm 141.42
20	8175 \pm 35.36	825 \pm 70.71	4450 \pm 106.07
30	7200 \pm 17.68	638 \pm 70.71	3950 \pm 70.71
40	7025 \pm 35.36	1075 \pm 106.07	4625 \pm 35.36
50	1775 \pm 35.36	1151 \pm 35.36	4325 \pm 106.07
60	1800 \pm 53.03	1513 \pm 70.71	5950 \pm 70.71
70	1150 \pm 35.36	2125 \pm 70.71	2750 \pm 70.71
80	1025 \pm 35.36	575 \pm 70.71	2050 \pm 106.07



กราฟที่ 3.15 เปรียบเทียบค่าความว่องไวของ PPO1, PPO3 และ PPO4 ที่ อุณหภูมิต่างๆ (บาร์ คือค่าเฉลี่ย 3 การทดลอง \pm SE)

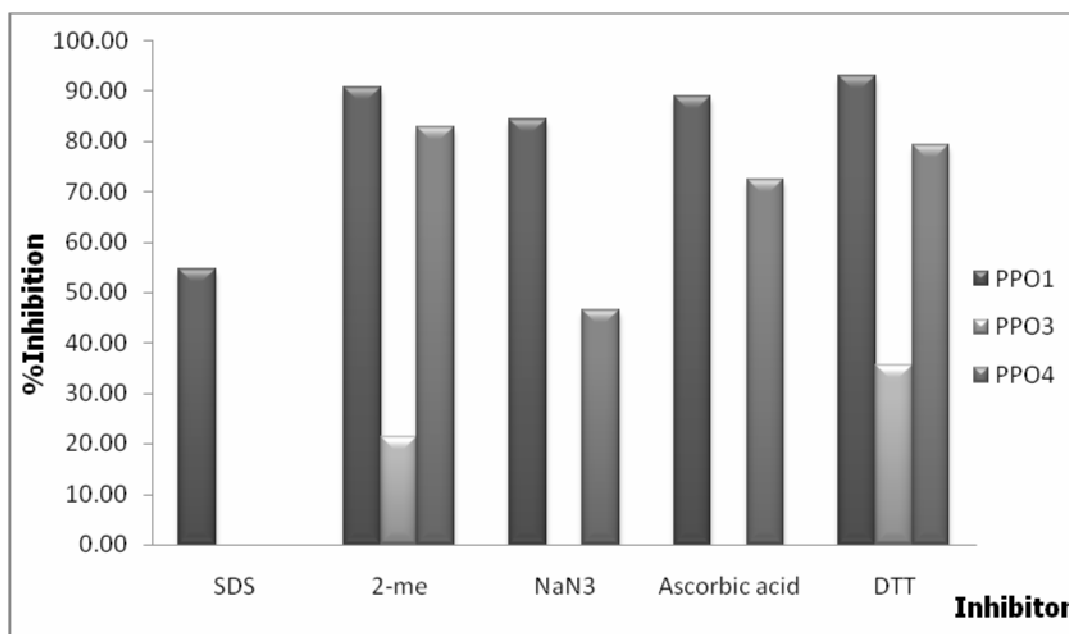
3.5.4 ศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ หลังผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

สารเคมีในการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส มีหลายจำพวก เช่น กลุ่มของ reducing agent, copper-chelating compounds และ antioxidants เป็นต้น ซึ่งทำหน้าที่ในการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลของผลไม้และพืชอื่นๆ (Vamos-Vigyazo, 1981) ผู้วิจัยได้นำไอโซไซม์ PPO1, PPO3 และ PPO5 มาตรวจหาปฏิกิริยาการยับยั้งของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยใช้ ascorbic acid ตามการทดลองของ Augustin และคณะ (1985), Lee และคณะ (1983) ใช้ EDTA, CuSO_4 และ NaCl ตามการทดลองของ Chang-Peng Yang และคณะ (2001) ใช้ 2-mercaptoethanol, NaN_3 และ citric acid ตามการทดลองของ Takeshi Nagai และคณะ (2001), Sakiroglu และคณะ (1996), Nathalie และคณะ (2006) ใช้ DTT, Salicylic acid และ SDS ตามการทดลองของ Dogan และคณะ (2002-2005), Wititsuwannakul และคณะ (2002) โดยใช้ความเข้มข้นในปฏิกิริยาเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ปมสารละลายด้วยตัวยับยั้งต่างๆในอัตราส่วน 1:1 (สารเคมี : โพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์) เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ใน 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, pH 6.5 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตรโดยใช้ 0.5 โมลาร์ dopamine ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร เป็นสับสเตรท พบว่า SDS, NaN_3 , ascorbic acid, β -me และ DTT สามารถยับยั้ง PPO1 คิดเป็น 54.59%, 84.48%, 89.08%, 90.80% และ 93.10% ตามลำดับ ส่วน CuSO_4 ,

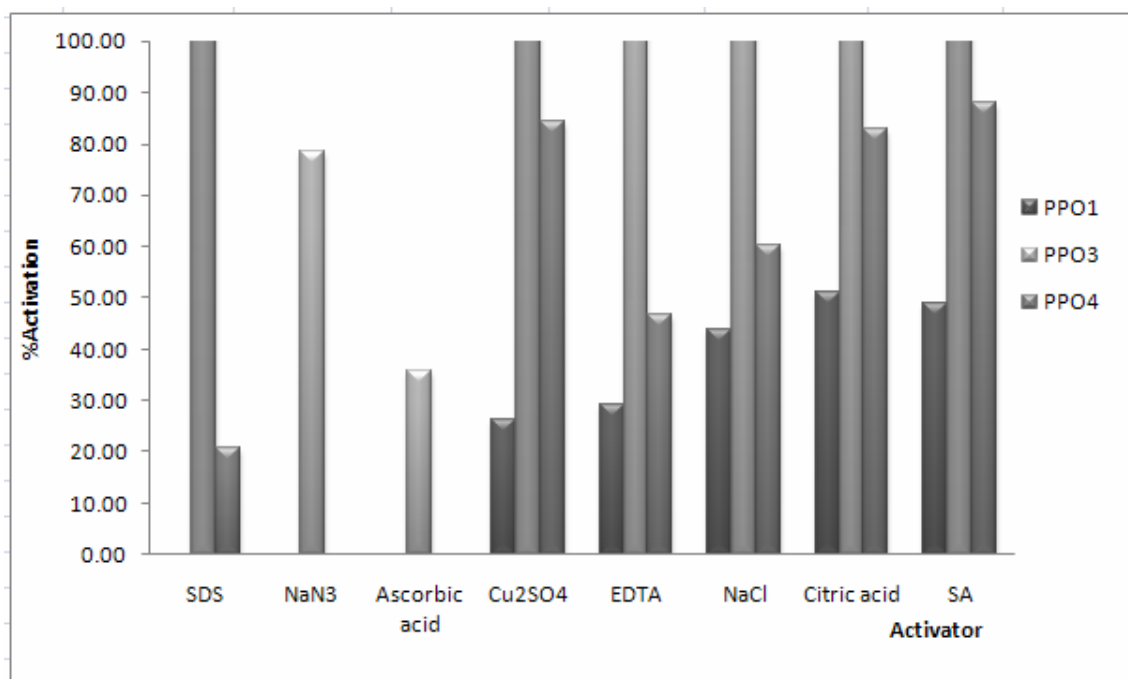
EDTA, NaCl, salicylic acid และ citric acid สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาคิดเป็น 26.43%, 29.31%, 43.67%, 48.85% และ 51.14% ตามลำดับ สำหรับ PPO3 จะมี β -me และ DTT เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาคิดเป็น 21.43% และ 35.71% ตามลำดับ และมี SDS เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาที่ดีที่สุดคือ 528.57% ส่วน ascorbic acid จะเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาที่น้อยที่สุดคือ 35.71% และเมื่อนำ PPO4 มาตรวจหาการยับยั้งปฏิกิริยานั้น พบว่า NaN_3 , ascorbic acid, β -me และ DTT เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาคิดเป็น 46.55%, 72.41%, 82.76% และ 79.31 ตามลำดับ และมี SDS, Cu_2SO_4 , EDTA, NaCl, salicylic acid และ citric acid เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา ซึ่ง salicylic acid จะเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาที่ดีที่สุดคิดเป็น 87.93% (ตารางที่ 3.16, กราฟที่ 3.16, กราฟที่ 3.17) จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า β -me และ DTT เป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งได้ดีทั้ง 3 ไอโซไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่า β -me และ DTT มีหมู่ sulfhydryl ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งกระบวนการพอลิเมอไรซ์ของ o-diphenol ไปเป็น o-quinones โดยรีดิวซ์ quinones ให้กลับไปเป็นสารฟีนอลิก ขณะที่สับสเตอร์ยังคงทำงานต่อไปจนหมด (Sanada และคณะ, 1972., Golan-Goldhirsh และ Whitaker, 1984) ทั้งนี้การทำงานของหมู่ sulfhydryl จะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโมเลกุลและตำแหน่งของ หมู่ sulfhydryl ในโมเลกุล (Friedman, 1994) ขณะที่คุณสมบัติของสารเคมีประเภทโลหะหนัก (copper) สามารถเพิ่มค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ได้ทุกไอโซไซม์เนื่องจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ (copper-containing) (Matheis, 1983) ascorbic acid เป็นสารกลุ่ม reducing agent หรือสาร antioxidant ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของคอปเปอร์ และยับยั้งการรวมตัวกันของ diphenol ที่นำไปสู่การเกิดสีน้ำตาล (Valero และคณะ, 1992) นอกจากนี้ กลุ่มของ halide salts คือ NaCl สามารถยับยั้งการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ได้พอประมาณในเนื้อเยื่อพืช (J.Casado-vela และคณะ, 2004., Yang และคณะ, 2000., Halim และ Montgomery, 1978) แต่ในการทดลองนี้ NaCl ไม่สามารถยับยั้งการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ได้เลยทั้ง 3 ไอโซไซม์ เช่นเดียวกับ EDTA และ citric acid ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ในการเอาอออนและโลหะหนักออกจากสารสกัด โดยการดูดซับสารฟีนอลิกไว้ ซึ่งจากการทดลองของ Nathalie และคณะ (2006) พบว่า EDTA และ citric acid สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ในช่วง pH ต่างๆ แต่สำหรับการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาที่ดีได้ สำหรับ SDS เป็นสาร detergent จำพวก anionic สามารถเพิ่มค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ความสามารถของ SDS เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างของเอนไซม์ (Moore และ Flurkey, 1990)

ตารางที่ 3.16 แสดงค่าการยับยั้งและการกระตุ้นปฏิกิริยาของ PPO1, PPO3 และ PPO4

สาร	PPO1		PPO3		PPO4	
	%inhibition	%activation	%inhibition	%activation	%inhibition	%activation
SDS	54.60	-	-	528.57	-	20.69
β -me	90.80	-	21.43	-	82.76	-
NaN ₃	84.48	-	-	78.57	46.55	-
Ascorbic acid	89.08	-	-	35.71	72.41	-
DTT	93.10	-	35.71	-	79.31	-
CuSO ₄	-	26.44	-	371.43	-	84.48
EDTA	-	29.31	-	150.00	-	46.55
NaCl	-	43.68	-	171.43	-	60.34
Citric acid	-	51.15	-	192.86	-	82.76
SA	-	48.85	-	435.71	-	87.93



กราฟที่ 3.16 แสดงค่าการยับยั้งปฏิกิริยาของ PPO1, PPO3 และ PPO4



กราฟที่ 3.17 แสดงค่าการกระตุ้นปฏิกิริยาของ PPO1, PPO3 และ PPO4

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

4.1 จากการกระตุ้นทั้ง 3 แบบ คือ การทำให้เกิดบาดแผล การกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ และ CuSO_4 นั้น มีผลต่อของการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสไปในทำนองเดียวกัน คือ จะปรากฏแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 3 และ 4 แถบในชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้น ตามลำดับ โดยในชุดที่ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและเวลามากขึ้นจะพบแถบ Y ซึ่งเป็นแถบที่เกิดจากการกระตุ้นชัดขึ้น และเมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์และ CuSO_4 ที่สูงเกินไปนั้นจะทำให้ แถบ Z ซึ่งเป็นแถบที่มีอยู่ในธรรมชาติของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ค่อยๆหายไป

4.2 วิธีการสกัดที่ให้ผลของความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด คือ 0.2 โมลาร์ phosphate buffer pH 6.5 ที่มี 3% PVPP และ 0.25% Triton X-100 และการตกตะกอนโปรตีนที่ 80% จะให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด

4.3 ผลการเปรียบเทียบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จากใบ, เมล็ด และเซลล์แขวนลอยของยางพาราพันธุ์ BPM-24 พบว่า ใบใบและเมล็ดอ่อนจะปรากฏแถบไอโซไซม์ 3 และ 4 แถบ โดยแถบ basic และ แถบ Z เป็นไอโซไซม์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ แถบ X เป็นไอโซไซม์ที่บ่งบอกสายพันธุ์ (ในพันธุ์ BPM-24 เคลื่อนที่ช้ากว่าใน RRIM600) แถบ Y เป็นไอโซไซม์ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นให้เกิดบาดแผล ส่วนในเซลล์แขวนลอยจะพบความแตกต่างคือพบแถบ Y ในปริมาณสูงก่อนและหลังการกระตุ้น เมื่อมีการกระตุ้นอย่างรุนแรงแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส จะลดลงจาก 2 แถบ (แถบ Y และ Z) เหลือเพียง 1 แถบ (แถบ Y) โดยแถบ Y ของเซลล์แขวนลอยเคลื่อนที่ได้ใกล้เคียงกับแถบ Y ที่พบในใบยาง

4.4 ผลการบ่มเซลล์แขวนลอยด้วยซูโอสปอร์และ CuSO_4 เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมเพราะทำให้เซลล์เกิดการตายมากเกินไป

4.5 ผลการบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้นคิดเป็น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย พบว่า เซลล์จะเริ่มเรืองแสงคือมีการสร้างสคอพอลิตินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 และเรืองแสงมากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 80 หลังจากนั้นการเรืองแสงจะค่อยๆลดลง เมื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนพบว่า ในชุดควบคุมปริมาณโปรตีนค่อนข้างจะคงที่และในชุดทดลองปริมาณโปรตีนหลังจากชั่วโมงที่ 56 จะลดลงเรื่อยๆ

4.6 ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนอลอะลานินแอมโมเนียไลเอส หลังบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย มีการ

สังเคราะห์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 16 คิดเป็น 102.41 % ซึ่งเป็นชั่วโมงแรกๆ ของการทดลอง และค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งคงที่ในชั่วโมงที่ 40

4.7 ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส หลังบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย พบว่า ในชุดควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ PPO ก่อนข้างจะคงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ถูกกระตุ้น พบว่า มีการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส มากกว่าชุดควบคุมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 คือ 10,737.75 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 61.92% และมีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมีการสังเคราะห์มากที่สุดในชั่วโมงที่ 96 คือ 25,158.36 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็น 244.25% (เมื่อเทียบกับชุดควบคุม)

4.8 ผลการศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกหลังบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย ในชุดควบคุมจะมีการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกที่น้อยกว่าชุดที่ได้รับการกระตุ้นและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกของทั้ง 2 ชุด ก่อนข้างจะคงที่ อย่างไรก็ตาม ในชั่วโมงที่ 96 มีแนวโน้มของการสะสมสารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้น

4.9 เมื่อนำสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยพันธุ์ BPM-24 ผ่านคอลัมน์ hydrophobic interaction column (HIC) โดยใช้ 0.02 โมลาร์ sodium phosphate buffer pH 7 พบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เพียง 2 แถบเหมือนกับสารสกัดเริ่มต้น ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้คอลัมน์ con-A agarose พบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 3 แถบ คือ ที่ TC บัฟเฟอร์ (unbound) พบ 1 แถบ (แถบ Z) ที่ 5-10 มิลลิโมลาร์ methyl-mannoside พบอีก 1 แถบ (แถบ Y1) และที่ 20-100 มิลลิโมลาร์ methyl-mannoside พบอีก 1 แถบ (แถบ Y2) แต่แถบ Y2 มีลักษณะกระจายไม่คมชัดและมักมีแถบ Y1 ปะปนมาด้วย

4.11 เมื่อนำสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยพันธุ์ BPM-24 ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นและผ่านการกระตุ้นด้วย filtrate 0.3 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แขวนลอย มาผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic โดยใช้ 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7 ในชุดที่ไม่ผ่านการกระตุ้น พบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส อย่างน้อย 5 แถบที่ unbound (basic), 0.05 โมลาร์ NaCl (PPO1), 0.07 โมลาร์ NaCl (PPO2), 0.08 โมลาร์ NaCl (PPO3) และ 0.09 โมลาร์ NaCl (PPO4) ในชุดที่ผ่านการกระตุ้นจะพบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสลดลงเหลือเพียง 3 แถบ คือ แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่ชะด้วยความเข้มข้นเกลือ 0.07 โมลาร์ NaCl (PPO2), 0.08 โมลาร์ NaCl (PPO3) และ 0.09 โมลาร์ NaCl (PPO4) และพบในปริมาณที่สูงกว่าในชุดที่ไม่ผ่านการกระตุ้น เมื่อนำมาหาความว่องไวจำเพาะ พบว่า PPO1 มีค่าความว่องไวจำเพาะ 6,004.55 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นความบริสุทธิ์ 4 เท่า ส่วน

PPO3 และ PPO4 จะมีค่าความว่องไวจำเพาะ 141,665 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 1,900,000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นความบริสุทธิ์ 94.44 เท่า และ 1,266.67 เท่า ตามลำดับ

4.12 ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของโพลีฟีนอลออกซิเดสไอโซไซม์ พบว่า เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ทั้ง 3 ไอโซไซม์ มีความจำเพาะต่อสับสเตรท 2 ชนิดคือ catechol และ dopamine ส่วน L-dopa และ catechin ไม่พบความว่องไวของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยที่ PPO1 จะจำเพาะกับสับสเตรททั้ง 2 ชนิดแต่จะมีความจำเพาะกับ catechol มากกว่า dopamine ซึ่งมีค่า Km เท่ากับ 33 มิลลิโมลาร์ และ 83 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ PPO3 จะมีความจำเพาะกับ catechol ซึ่งมีค่า Km เท่ากับ 83 มิลลิโมลาร์ ส่วน PPO4 จะมีความจำเพาะกับ dopamine ซึ่งมีค่า Km เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

4.13 ผลการศึกษาความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของ PPO1, PPO3 และ PPO4 พบว่า PPO1 ไม่สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดหรือช่วง pH 2-5 แต่จะสามารถทนได้ดีที่สภาวะเป็นกลางถึงด่างหรือช่วง pH 6-10 PPO3 จะมีความทนต่อสภาวะกรดและด่าง หรือ ทุกช่วง pH ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่จะไม่สามารถทนได้เลยในช่วง pH 9-10 ส่วน PPO4 จะสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกลางถึงด่างหรือช่วง pH 5-10 ได้เป็นอย่างดี

4.14 ผลการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของ PPO1, PPO3 และ PPO4 พบว่า ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส จะเป็นช่วงที่ PPO1 ไม่สูญเสียความว่องไว PPO3 จะทนได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 10-70 องศาเซลเซียส ซึ่งจะแตกต่างจาก PPO4 คือ PPO4 จะสามารถทนได้ดีตั้งแต่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสและสามารถทนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

4.15 ผลการศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของ PPO1, PPO3 และ PPO4 พบว่า SDS, NaN_3 , ascorbic acid, β -me และ DTT สามารถยับยั้ง PPO1 ส่วน CuSO_4 , EDTA, NaCl, salicylic acid และ citric acid สามารถกระตุ้นปฏิกิริยา สำหรับ PPO3 จะมี β -me และ DTT เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา และมี SDS เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาที่ดีที่สุด เมื่อนำ PPO4 มาตรวจหาการยับยั้งปฏิกิริยานั้น พบว่า NaN_3 , ascorbic acid, β -me และ DTT เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา และมี SDS, Cu_2SO_4 , EDTA, NaCl, salicylic acid และ citric acid เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา ซึ่ง salicylic acid จะเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาที่ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- จริงแท้ ศิริพานิช. 1995. สรีระวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 396 หน้า.
- จิตรา ตระกูลนำเสื่อมใส และ สายชล เกตุษา. 1998. ผลของอุณหภูมิต่อการตกกระของผลกล้วยไข่. สารระไม้ผล3, 5-6.
- ชวนพิศ นิยะกิจ. 2001. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพาราและการปลูกถ่ายยีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 1986. โรคพืช : กลไกและพันธุกรรมการเกิดโรค. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ. 186 หน้า.
- นารธิตา รอดโพธิ์ทอง. 2003. การคัดเลือกยางพันธุ์ต้านทานจากเชื้อพันธุ์ (germplasm) โดยใช้ซูโอสปอร์และท็อกซินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นันทา เชิงเขาวี ธารทิพย์ ศรีบริรักษ์ นวลจิรา ภัทรรังรอง. 1995. คุณสมบัติและหน้าที่ของเบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ จากบี-ซีรัมของน้ำยางพารา. รายงานการวิจัยภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นุรอามาลี ดีนามอ. 2005. ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิลุบล บุญหวังช่วย. 2002. ผลของอิลิซิดินและซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ต่อใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์. 2542. การคัดเลือกสายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองภาคใต้ของประเทศไทยที่ต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora*(Bolt)Bult. ด้วยการทดสอบโรคและไอโซไซม์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- ประภา พัฒนกุล บัญญัติ สิทธิผล อุไร จันทรประทีน และ นริสา จันทรเรือง. 1997. การทดสอบความต้านทานเชื้อไฟทอปโทราของยาง. รายงานการวิจัยเรื่องเต็ม, รหัส 38 17300 011.
- ประภา พัฒนกุล อุไร จันทรประทีน บัญญัติ สิทธิผล และ นริสา จันทรเรือง. 2000. ความต้านทานโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* ของยางพันธุ์ RRIT 250 และ RRIT 251 ใน สภาพห้องปฏิบัติการ. รายงานการวิจัยเรื่องเต็ม, กิจกรรมในทะเบียนเลขที่ 42 17300 019.
- ประศาสตร์ เกี่ยมณี. 1995. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, 158 หน้า. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประสาทพร สมิตะมาน. 1991. โรคพืชวิทยา. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. กรุงเทพฯ. 337 หน้า.
- พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และสมปอง เตชะโต. 1999. ผลของไซโตไคนินต่อการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันการแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 21: 169-177.
- พันธ์วัศรี แสงสุวรรณ. 2004. ปฏิกริยาตอบสนองของแคลลัสยางพาราต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เพ็ญมาศ นาคอุดม. 2006. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเมล็ดอ่อน แคลลัส และเซลล์แขวนลอยยางพารา กับซูโอสปอร์และอิลิซิทินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ไพโรจน์ จ้วงพานิช. 1982. หลักวิชาโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 386 หน้า.
- มนทิรา ไชยตะถาฎกูร. 2002. การชักนำให้เกิดแคลลัสและไซมาติคเอ็มบริโอจีนีซิสของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เลขา มาโนช. 1989. เอกสารประกอบการสอนวิชาเทคนิคการศึกษาทางโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 79 หน้า.

วิลาสินี กวีกิจธรรมกุล ยุพา มงคลสุข วราลักษณ์ รัชต์แดง พนิดา วงษ์แหวน และเจษฎา วงศ์พรหม. 2003. การชักนำให้เกิดแคลลัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของบุกเนื้อทราย. ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ พิริยะประสาธน์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2545. Effect of Termite Mound Bacteria on Disease Suppression and Growth of Acacia. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมปอง เตชะโต. 1996. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ, ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 126 หน้า.

Augustin, M. A., Ghazali, H. M. and Hashim, H. 1985. Polyphenol oxidase from Guava (*Psidium guajava* L.). J. Agric. Food Chem. 36: 1259-1265.

Beena, P. and Lalitha, R. G. 2000. Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean (*Dolichos lablab*). J. Agric. Food Chem. 48(9): 3839 -3846.

Beerhues, L., Werner, S. and Stefan, P. 2000. Xanthone 6-hydroxylase from cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. Phytochemistry 2: 427-431.

Benkeblia, N. 2000. Phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, pyruvic acid and total phenolics variations in onion bulbs during long-term storage. Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie Academic Press. 33: 112-116.

Boller, T. 1985. Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. In cellular and Molecular Biology of plant stress. J.L. and kosuge. 247-262.

Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J. P., Ricci, P. 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. J. Plant Pathol. 102: 181-192.

Bowen, G.D. and Rovira, A.D. 1976. Microbial colonization of plant roots. J. Phytopathol. 14: 121-144.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Braz-Filho, R. 1999. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. *Pure Appl. Chem.* 71(9): 1663-1672.
- Breton, F., Gacia, D., Sanier, C., Eschbach, J.M. and d' Auzac, J. 1997. The interaction between *Corynespora cassiicola* and *Hevea brasiliensis*. *Plantation, Research, Development.* 4: 322-335.
- Brillard, V., Bruneteau, M., Bonnet, P., Ricci, P., Pernollet, J.C., Huet, J.C., Vergne, A., Richard, G. and Michel, G. 1988. Chromatographic purification and characterization of elicitors of necrosis on tobacco produced by incompatible *Phytophthora* species. *J. Chromatogr.* 44: 87-94.
- Campos, V.R., Nonogaki, H., Suslow, T. and Saltveit, M.E. 2004. Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves. *Physiol Plant.* 121: 429-438.
- Casado, V. J., Susana, S. and Roque, B. M. 2004. Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein. *Food Chem.* 6: 196–206.
- Chang, P. Y., Shuji, F., Koei, K., Akiko, K., Ashrafuzzaman, M.D. and Nobuyuki, H. 2001. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel. *J. Agric. Food Chem.* 49(3): 1446 -1449.
- Chee, K. H. 1969. Variability of *Phytophthora* species from *Hevea brasiliensis*. *J. Mycological Society of America.* 52: 425-236.
- Chen, M., McClure, J. W. 2000. Altered lignin composition in phenylalanine ammonia-lyase inhibited radish seedlings: Implication for seed-derived sinapoyl esters as lignin precursors. *Phytochemistry* 53: 365-370.

- Chitsuda, C. 2000. Enzymatic Browning Inhibition of Banana [~iMUSA~i (AAA GROUP) Gros Michel] By Pineapple Juice. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Cho, M. H., Syed, G. A. M., Gregory, L. H., Shojiro, H., Dietmar, E., Laurence B. D., and Norman, G. L. 2003. (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantio-specific polyphenol oxidase from the creosote bush (*Larrea tridentata*). National Academic Science. 100(19): 10641–10646.
- Chunhua, S., Ya, Dai., Xiaolong, X., Yongshu, X. and Qingliang, L. 2002. The purification of polyphenol oxidase from tobacco. Protein Expr. Purif. 24: 51-55.
- Churngchow, N. and Rattarasarn, M. 2000. The elicitor secreted by *phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. Phytochemistry 54: 33-38.
- Churngchow, N. and Rattarasarn, M. 2001. Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *phytophthora palmivora*. J. Plant Physiol. 158: 875-882.
- Corbin, D. R., Sauer, N. and Lamb, C. J. 1987. Differential regulation of a hydroxyproline rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. Mol. Cell. Biol. 7(12): 4337–4344.
- Cordelier, S., Ruffray, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. 2003. Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. Plant Mol. Biol. 51: 109–118.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II: method and application to human serum protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 404-427.
- Davis, K.R. and Ausubel, F. 1989. Characterization of elicitor-induced defense responses in suspension-cultured cells of Arabidopsis. Mol. Plant Microbe Interact. 2: 363–368.

- D'Cunha, G.B., Satyanaraan, V. and Nair, P.M. 1996. Stabilization of phenylalanine ammonia-lyase containing *Rhodotorula glutinis* cells for the continuous synthesis of phenylalanine methyl ester. *Enzyme Microb. Technol.* 19: 421-427.
- Dean, P.D.G., W.S. Johnson and F.A. Middle. 1991. Affinity Chromatography ; A practical approach. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26: 1056–1057.
- Devergne, J.C., Fort, M.A., Bonnet, P., Ricci, P., Vergnet C., Delaunay T. and Grosclaude, J. 1994. Immunodetection elicitors from *Phytophthora* spp. Using monoclonal antibodies. *Plant Pathol.* 43: 885-896.
- Dhingra, O.D. and J.b. Sinclair. 1985. *Basic Plant Pathology Methods* 3 rd ed. CRC. Press Inc. Florida, USA. 355 pp.
- Drenth, A. 1994. Molecular genetic evidence for a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in Europe. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Dufrenoy, J. 1936. Cellular immunity. *Am. J. Bot.* 23: 70-79.
- Ellis, D. D. , Barczynska, H. , McCown, B. H. and Nelson, N. 1991. A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 27(3): 281-287.
- Estrella, N. D., Marta, S. M., Antonio, J. P. L., Jose, M. L. N. 2006. Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape. *Food Chem* 100: 108–114.
- Eva, M. G., Begoña, d. A., and Pilar, C. M. 1999. Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47 (10): 4068-4072.
- Farmer, E. E. and Ryan, C.A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129–134.
- Friedman, M. 1994. Improvement in the Safety of Foods by SH-Containing Amino Acids and Peptides. A Review. *J. Agric. Food Chem.* 1084(42): 3-20.

- Friend, J., Reynolds, S. B. and Aveyard, M. A. 1973. Phenylalanine ammonia-lyase, chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol* 3: 495-507.
- Fritzmeier, K. H., Cretin, C., Kombrink, E., Rohwer, F., Taylor, J., Schel, D. and Hahlbrook, K. 1987. Transient induction of phenylalanine ammonia lyase and 4-coumarate: CoA ligase mRNAs in potato leaves infected with virulent or avirulent races of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 8: 34-41.
- Garcia, D., Sanier, C., Machiex, J.J. and d'Auzac, J. 1995. Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* infected by *Microcyclus ulei* (P. Henn.) V. ARX and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber tree. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47: 213-223.
- Gieseemann, A., Biehland, B. and Lieberei, R. 1986. Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Phytopathology* 117: 373- 376.
- Golan, G. A., Whitaker, J.R. and Kahn, V. 1984. Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. *Adv. Exp. Med. Biol.* 177: 437-456.
- Gómez-Vásquez, R., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J.R. and Cooper, R.M. 2004. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Ann. Bot.* 94: 87-97.
- González, E.M., de Ancos, B., Cano, M.P. 1999. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits, *J. Agric. Food Chem.* 47: 4068–4072.
- Greenberg, J.T. and Yao, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6(3): 201-211.
- Guest, D. and Brown, J. 1997. Infection processes, epidemiology and crop loss assessment. *Plant Pathogens and Plant Diseases*, 246-286.
- Guyer, R. B., and Erickson, F. B. 1954. Canning of acidified banana puree. *Food Technol* 8: 165-167.

- Halim, D. H. and Montgomery, M. W. 1978. Polyphenoloxidase of d'Anjou Pears (*Pyrus communis* L.). *J. Food Sci.* 43(2): 603–608.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Physiol Mol Biol Plants* 40: 347-369.
- Hanower, P., Brzozowska-Hanower, J., Cretin, H. and Chezeau, R. 2001. Composés phenoliques du latex d' *Hevea brasiliensis*: aglycones. *Phytochemistry* 18: 686-687.
- Haris, E.L.V. and Angal, S. 1990. Protein Purification; Application a practical approach. Oxford University Press, USA; New Ed edition. 196.
- Hiroshi, Y., Yube, Y., and Hiroshi, S. 2003. Induction of Hypersensitive Cell Death by Hydrogen Peroxide Produced through Polyamine Degradation in Tobacco Plants. *Plant Physiol* 132: 1973–1981.
- Hisae, M. and Yukio, M. 2006. Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds. *Plant Physiology* 163(1): 1-10 .
- Hostettmann, K., Hostettmann, M. 1989. Xanthones. In: Harborne, J.B.(Ed.), *Methods in Plant Biochemistry, Plant Phenolics*, 1: 493–508.
- Huet, J. C., and Pernollet, J. C. 1989. Amino acid sequence of cinnamomin, a new member of the elicitin family, and its comparison to cryptogein and capsicein. Elsevier Science B.V., *FEBS Lett*, 257: 302-306.
- Hunt, M.D., Neuenschwander, U.H., Delaney, T.P., Weymann, K.B., Friedrich, L.B., Lawton, K.A., Steiner, H.-Y., and Ryals, J.A. 1996. Recent advance in systemic acquired resistance research-a review. *Gene* 179: 89-95.
- Jinsen, X., Tianling, Z., Sadatoshi, M. and Shinsaku, K. 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). *Wood Sci. Technol.* 50(3): 260-265.

- Jose'-Ramo'n, M., Maria-Paz, R., Toma's Ramo, Maria-Jose', M. 2005, Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Sci* 168: 65–72.
- Jouili, H. and Ferjani, E.E. 2003. Change in antioxidant and signifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper express. *Plant Biology and Pathology*, 326: 639-644.
- Jung, W. J., Jin, Y. L., Kim, Y. C., Kim, K. Y., Park, R. D. and Kim, T. H. 2004. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. *Biol. Control* 30: 645-652.
- Ke, D. and Saltveit, M. E. 1989. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiol Plant* 76: 412–418.
- Ke, j., Wijesundera, R. I. C. and Deraniyagala, S. A. 2003, Isolation of anti-fungal phenolic compounds from petioles of two *Hevea brasiliensis* (rubber) genotypes and their effect on *Phytophthora meadii*. *Ann. Appl. Biol.* 142: 63-69.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laura, J. S. M., Ricardo, L. P. and Dulce, E. de O. 2000. Compartmentation of Phenolic Compounds and Phenylalanine Ammonia- Lyase in Leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their Induction by Copper Sulphate. *Ann. Bot.* 86: 1023-1032
- Lee, C. Y., Smith, N. L. and Pennesi, A. P. 1983. Polyphenol oxidase from DeChaunac grapes. *J. Agric. Food Chem.* 34: 987-991.
- Li, L., and John C. S. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239-247.

- Lim, J. D., Yu, C. Y., Kim, M. J., Yun, S. J., Lee, S. J., Kim, N. Y. and Chung, L. M. 2004. Comparison of SOD activity and Phenolic compounds contents in various Korean medicinal plant. *Kor. Medical Crop Science* 12: 191-202.
- Lincoln, T. and Eduardo, Z. 2006. *Plant Physiology Fourth Edition*.
- Linthorst, H. I. M. 1991. Pathogenesis related - proteins of plant. *Plant diseases; Plant physiology and biochemistry, Critical reviews in plant sciences* 10: 123-150.
- Luis, F.R., Conceição, A., Federico, F. B., Rui, M., Tavares, A. and Alberto, C.P. Dias, A. 2006. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry* 67: 149–155.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. and Lerner, A.B., 1990. Metabolism of phenylalanine and tyrosine. *J. Advance of Enzymologie* 14: 73-128.
- Marques, L., Fraignier, M. P., Fleuriet, A. and Macheix, J. J. 1994. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2375–2380.
- Matheis G. 1983. Enzymatic browning of foods Quantitative relationships between browning and food constituents. *J. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 176: 454-462.
- Martinez, M.V. and Whitaker, J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends of Food Science and Technology* 6: 195-200,
- Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanase. *Plant Physiol* 87: 325-333.
- Mayer, A.M. and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193–215.
- Meeta, L., Puneet, S. C., Chauhan, S.V.S., Harikesh, B. S. and Chandra, S. N. 2006. Induction of Plant Defense Enzymes and Phenolics by Treatment With Plant

- Growth-Promoting Rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Curr. Microbiol.* 5: 363-368.
- Michaux, F. N. and Carron, M. P. 1989. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculturing. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 19: 243-256.
- Mikal, E. S. 2004. Effect of 1-methylcyclopropene on phenylpropanoid metabolism, the accumulation of phenolic compounds, and browning of whole and fresh-cut 'iceberg' lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 34: 75–80.
- Mikes, V., Milat, M. L., Ponchet, M., Panabie`res, F., Ricci, P. and Blein, J. P. 1998. Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 133–139.
- Min, C., Jong, J. K., Jung, D. L., Chang, Y. Y., Seung, H. K. and Sang, J. H. 2006. Comparison of resveratrol, SOD activity, Phenolic compounds, and free amino acid in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress, *Environ. Exp. Bot.* 56: 44-53.
- Mohammadi, M. and Kazemi, H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *J. Plant Sci.* 162(4): 491-498.
- Moline, H. E., Buta, J. G. and Newman, I. M. 1999. Prevention of browning of banana slices using natural products and their derivatives. *J Food Qual* 22: 499-511.
- Moore, B. M. and Flurkey, W. H. 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *Biol. Chem.* 265(9): 4982-4988.
- Mustafa, E., Halis, S. and Irfan, K. O. 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. *Food Chem.* 95: 503–508.

- Nathalie, W., Dirk, de W. and Rony, S. 2006. Extraction and partial characterization of polyphenoloxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 308-316.
- Nicolas, J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J. and Aubert, S. Y. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 34: 109–157.
- Peng-Fei, W., Jian-Ye, C., Wei-Fu, K., Qiu-Hong, P., Si-Bao, W. and Wei-Dong, H. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Sci* 169(5): 928-934.
- Rahman, M. and Punja, Z.K. 2005. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 1103-1114.
- Rattarasarn, M. 2003. Defense response of *Hevea brasiliensis* leaves against zoospores and elicitor from *Phytophthora palmivora*. Ph. D. of Science Thesis. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet J. C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Brneteau, M., Billard, V., Michel. G. and Pernollet, J. C. 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. Biochemistry* 183: 555-563.
- Rubin, B.A. and Artsikhovaskaya, Y.V., 1964. Biochemistry of pathological darkening of plant tissues. *Annu Rev Phytopathol* 2: 157-178.
- Sakiroglu, H., Kufrevioglu, I. O., Kocacaliskan, I., Oktay, M., & Onganer, Y. 1996. Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2982-2986.
- Sanada, H., Suzue, R., Nakashima, Y. and Kawada, S. 1972. Effect of thiol compounds on melanin formation by tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* 261(1): 258-66.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. and Fernandes-Ferreira, M. 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produce by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Physiol* 160: 1025-1032.

- Sapers, G. M. and Miller, R. L. 1998. Browning inhibition in fresh-cut pears. *Food Sci.* 63: 342-346.
- Serap D. A., Oktay, A. B. and Fazil, O. A. 2005. Polyphenol oxidase activity of oregano at different stages. *Food Chem.* 91: 341–345.
- Shishido, M. and C. P. Chanway. 1998. Forest soil community responses to plant growth-promoting rhizobacteria and spruce seedlings. *Biol. Fertil. Soils* 26: 179-186.
- Siddiq, M., Sinha, N. K., and Cash, J. N. 1992. Characterization of polyphenoloxidase from stanley plums. *Food Sci* 57: 1177–1179.
- Snyder, B.A. and Nicholson, R.L. 1990. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *J. Sci.* 248: 1637-1638.
- Sujaree, K., Nicharat, S., Warinee, P., Pannanee, R. and Aranya, P. 2005. Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubonratchathani University. Warinchamrab, Ubon Ratchathani 34190, Thailand. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology.
- Sushamakumari, S., Asokan, M. P., Anthony, P., Lowe, J. B. and Davey, M. R. 2000. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2: 253-261.
- Takeshi, N. and Nobutaka, S. 2001. Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3922-3926.
- Tan, A. M. and Low, F. C. 1975. Phytoalexin production by *Hevea brasiliensis* in response to infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on other fungi. In : Proceeding International Rubber Conference. Kuala Lumpur, Malaysia: 217-227.
- Te-chato, S. and Chartikul, M., 1993. Tissue culture of rubber: somatic embryogenesis induction from integument subsequent to plantlet regeneration. *Warasan Songkhla Nakharin* 15: 235-241.

- Thipyapong, P., Jeffrey, M., David, W. W. and John, C. S. 2004. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci.* 167(4): 693- 703.
- Torres, A.M., Mau-Lastovicka, T., Rezaaiyan, R. 1987. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *J. Agric. Food Chem.* 35: 921-925.
- Valero, E., Ramon, V., and Garcia-Carmona'J, F. 1992. Kinetic Study of the Effect of Metabisulfite on Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 40: 904-908.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A .H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36: 453-83.
- Walden, R., Cordeiro, A., Tiburcio, A. F. 1997. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* 113: 1009–1013.
- Webb, F. C. 1964. *Biochemical Engineering*. J.W. Arrowsmith Ltd., Bristol. Pp. 441-456.
- Whetten, R. and Sederoff, R. 1995. Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013.
- Whitaker, J. O. Jr. 1995. Food of the big brown bat *Eptesicus fuscus* from maternity colonies in Indiana and Illinois. *Am. Midl. Nat.* 134: 346–360.
- Witisuwannakul, D., Chareonthipakorn, N., Pace, M. and Wititsuwannakul, R. 2002. Polyphenol Oxidase from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry* 61: 115-121.
- Yang, C. P., Shuji, F., Koei, K., Akiko, K., Ashrafuzzaman, M.D. and Nobuyuki, H. 2000. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel. *J. Agric. Food Chem.* 49(3): 1446-1449.
- Yang, Y. M., Li, Y., Zhu, D., Hurd, J. N., Mitchell, T. N., Silva, E. D., Maumenee, I.H. and Sudin, O. H. 2000. Genetic bases of total colour blindness among the Pingelapese islanders. *Am. J. Ophthalmol.* 130(6): 865.

ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA)

ละลาย PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50-60 °C ก่อนเทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา V₈

นำ V₈ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 3 กรัม เติมน้ำ 20 กรัม ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลานาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 °C และเทใส่จานปราศจากเชื้อเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ใน 95 % เอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 85% phosphoric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร กรองก่อนนำไปใช้

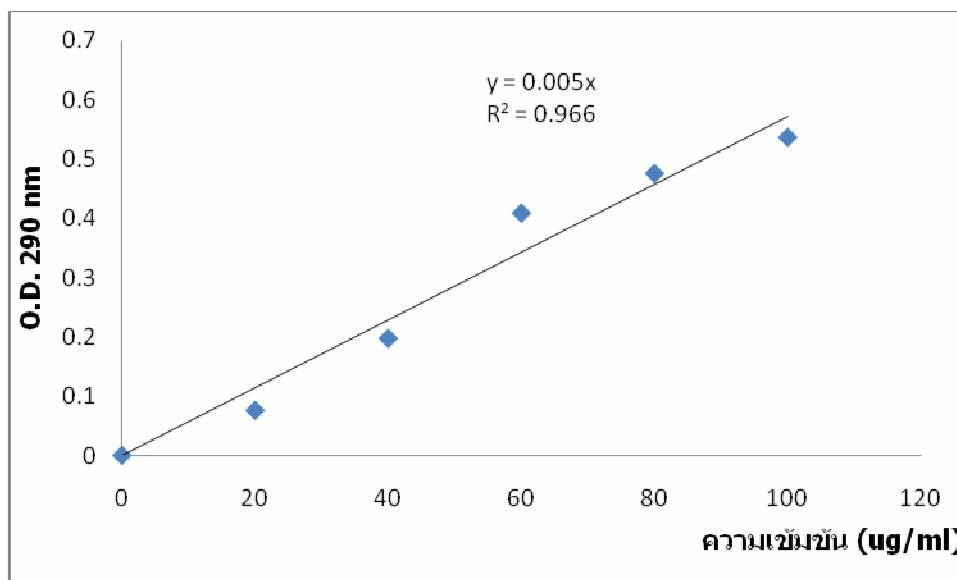
4. การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

ละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) จำนวน 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร

5. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้สารตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

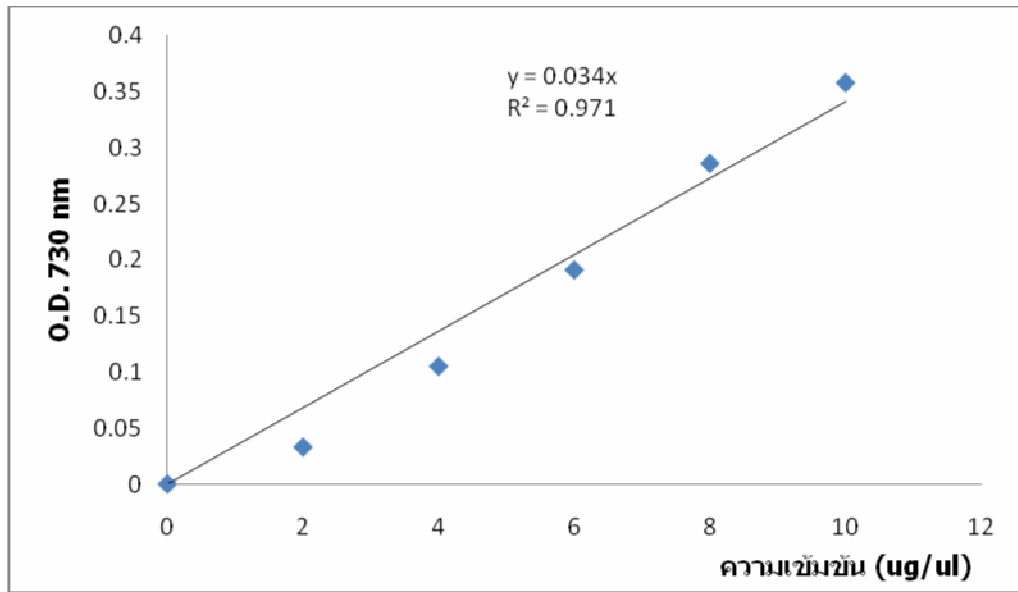
ผสมให้เข้ากันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น Blank นำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความยาวคลื่น 290 นาโนเมตรกับไมโครโมลของ *trans*-cinnamic acid



กราฟมาตรฐาน *trans*-cinnamic acid โดยใช้ปริมาณของ *trans*-cinnamic acid เป็น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตร

7. การหาสารประกอบฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐาน

ใส่สารมาตรฐาน gallic acid (0-0.12 กรัมต่อลิตร) ผสมกับ 1 นอร์มอล Folin-Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที จากนั้นเติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร



กราฟมาตรฐาน gallic acid โดยใช้ปริมาณของ gallic acid เป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวนิตาพร มุหะมัด
 รหัสนักศึกษา 4822127
 วุฒิการศึกษา
 วุฒิ ชื่อสถาบัน ปีที่สำเร็จการศึกษา
 วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2547
 (วิทยาศาสตร์ทั่วไป เคมี-ชีวะ)

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษ)

ทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประเภททุนอุดหนุนโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2548

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์

นิตาพร มุหะมัด และนันทา เชิงเชาว์. 2550. โพลีฟีนอลออกซิเดส ไอโซไซม์ ในใบยางพารา. การประชุมงานวิชาการอนุรักษ์พืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 20-22 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ 2550, โรงแรม อัมรินทร์ลากูน อำเภอเมือง จังหวัด พิษณุโลก.