

ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในยางพาราให้บริสุทธิ์
ผู้เขียน	นายคมกฤช สินเจริญรุ่ง
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase; SOD) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยา $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ ช่วยลด reactive oxygen species ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตได้ ในใบยางพารา (*Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg.) สายพันธุ์ RRIM 600 พบว่ามี SOD $1,125 \pm 414$ หน่วยต่อกรัม ปริมาณ SOD จะเปลี่ยนแปลงตามความอ่อนแก่ของใบ โดยใบแก่มีปริมาณ SOD สูงสุด ส่วนในก้านใบมี SOD เช่นกัน แต่น้อยกว่าในใบ การเก็บ SOD ในสารสกัดจากใบยางพารา ที่อุณหภูมิ 4, -10, -20 และ $-70^\circ C$ ความว่องไวจะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 30 วันแต่ยังคงมีความว่องไวอยู่ในระยะเวลาสามเดือน

KCN, NaCN, β -mercaptoethanol, H_2O_2 และ SDS ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ SOD จากใบยางจะทนต่อความร้อน $100^\circ C$ ได้นานถึง 2 ชั่วโมงโดยค่า activity ของ SOD ยังเหลืออยู่ถึง 45% SOD และเปอร์ออกซิเดสในใบยาง กับปริมาณเนื้อยางแห้ง (Total Dried Rubber Content; DRC) ที่ได้จากการกรีดยางแต่ละครั้ง พบว่ามีค่าสหสัมพันธ์ เป็น 0.572 และ 0.554 ตามลำดับ

เมื่อทำ SOD จากใบยางให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย 40-80% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยคอลัมน์ DEAE Sephacel และ Sephadex G-100 ตามลำดับ SOD ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.1 เท่าของเอนไซม์ซึ่งสกัดได้ในตอนเริ่มต้น โดยมีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 18.3 เป็น 57.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำ SOD ที่ได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบแถบโปรตีนและความว่องไว 3 แถบ เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานพบว่า SOD ส่วน

ใหญ่มีขนาด 56,104 และ 47,643 ดาลตัน โดยวิธี ND-PAGE และ SDS-PAGE ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า SOD เป็นเอนไซม์ที่ทนต่อ CN^- เมื่อศึกษาโดย ND-PAGE

Thesis Title Purification of Superoxide Dismutase in *Hevea brasiliensis*
Author Mr. Komgrit Sincharoenrung
Major Program Biochemistry
Academic Year 2001

Abstract

Superoxide Dismutase (SOD) catalyzes the dismutation reaction of $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$. This reaction reduces the reactive oxygen which is harmful to all organisms. When SOD in rubber tree leaves, clone RRIM 600, was extracted the SOD activity was $1,125 \pm 414$ units/g. The activity varies with the age of the leaves. Mature and very young leaf extracts have a higher activity than yellow leaf extract. SOD is also found in the petiole but with less activity. SOD in leaf extract decreased rapidly within 30 days when kept at 4, -10, -20 and -70°C, however activity remains in 3 months.

KCN, NaCN, β -mercaptoethanol, H_2O_2 and SDS inhibit the activity of SOD. When the leaf extract was boiled at 100°C for 2 hours, 45% of the SOD activity remained. SOD and Peroxidase (POx) in leaf extract and total Dried Rubber Content (DRC) in rubber latex showed correlation coefficient of 0.572 and 0.554, respectively.

SOD was purified from leaf extract using 40-80% ammonium sulphate precipitation. SOD was further purified by DEAE-Sephacel ion exchange chromatography and gel filtration on Sephadex G-100, rendering is a 3.1-fold purification. The purified SOD showed 3 bands in polyacrylamide gel electrophoresis. The major SOD is 56,104 and 47,643 daltons as determined

by ND-PAGE and SDS-PAGE respectively. The enzyme is CN^- resistant, when studied using ND-PAGE.