คุณสมบัติและหน้าที่ของเบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ จากบี-ซีรั่มของน้ำยางพารา

Properties and Functions of Beta-1,3-glucanase Isozymes from B-serum of *Hevea* Latex

ธารทิพย์ ศรีบริรักษ์

Tantip Sribrirux

เลขหมู่ QK 898.L3 T64 2539 ฉ.2

Order Key.....

Bib Key..... 91691

..... 25 ส.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2539

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณสมบัติและหน้าที่ของเบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ จากบี-ซีรั่ม ของน้ำยางพารา

ผู้เขียน นางสาวธารทิพย์ ศรีบริรักษ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ	.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเชาว์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงชาว์)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นวลจิรา ภัทรรังรอง)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นวลจิรา ภัทรรังรอง)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....

(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณสมบัติและหน้าที่ของเบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ จากบี-ซีรั่ม ของน้ำยางพารา

ผู้เขียน นางสาวธารทิพย์ ศรีบริรักษ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2538

หอสมุดกลาง ยรรถการ สุขสรี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาเขตหาดใหญ่
ใส่ชั้นจาก
1 9 ก.ค. 2543
หมายเลข

บทคัดย่อ

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากส่วนบี-ซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 ทำบริสุทธิ์ได้ด้วย วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ในบี-ซีรั่มของน้ำยางพาราทั้งสองพันธุ์ มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์คือ GI และ GII โดยที่พบว่า GI ในยางพาราพันธุ์ RRIM600 มีปริมาณมากกว่า GII ประมาณ 2 เท่า ส่วนในยางพันธุ์ GT1 มี GII มากกว่า GI ประมาณ 7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะปริมาณของ GII ในยางทั้งสองพันธุ์ พบว่า GII ของยางพันธุ์ GT1 มีปริมาณมากกว่า GII ของยางพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 4 เท่า

ไอโซไซม์ GI และ GII ที่ทำบริสุทธิ์ได้ จากยางทั้งสองพันธุ์ เมื่อศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE พบว่า มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์เส้นเดียว โดยที่ GI และ GII มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32 และ 35 Kd ตามลำดับ ทั้งสองไอโซไซม์ จัดเป็นไกลโคโปรตีน มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 31.4 % (w/w) สำหรับ GI และ 4.3 % (w/w) สำหรับ GII จากผลการทำโครมาโทกราฟีบนชั้นบาง (thin layer chromatography) GI และ GII สามารถย่อยสลายสับสเตรต ลามินาริน ได้ผลิตภัณฑ์เริ่มต้นคือ น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มี degree of polymerization มากกว่า 4 จึงจัดเป็นเอนไซม์ชนิด เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรต แสดงให้เห็นว่า ไอโซไซม์ทั้งสอง มีความจำเพาะกับสับสเตรตที่เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสซึ่งต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,3 เป็นสายยาวพอสมควร และมีหมู่แทนที่จำนวนน้อย ๆ อย่างเช่น ลามินาริน และ ซี-เอ็ม พาไดแมน แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะทั้งที่เป็นแบบ เบต้า-1,4 ของ ไลชินิน และกลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ และพันธะเบต้า-1,6 ของ พัสทิวแลน และ กลูแคนจากยีสต์ นอกจากนี้ GI และ GII มีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่างกัน โดยที่ GI สามารถย่อยสลายลามินารินได้ดีกว่า ซีเอ็ม - พาไค

แมน แต่ GII ให้ผลในทางตรงกันข้าม แอนติบอดีต่อ GII ที่เตรียมได้จากกระต่าย สามารถจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ GI และ GII ในระดับใกล้เคียงกัน เมื่อนำแอนติบอดีดังกล่าวมาศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยวิธี Western blot พบว่า ในส่วน ซี-ซีรั่มของน้ำยาง มี 2 ไอโซไซม์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ GI และ GII แต่มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีต่ำกว่า ส่วนสารสกัดจากใบยางอ่อน พบว่า มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์อื่น ๆรวม 4 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เท่ากับ GI และ GII ที่พบในบี-ซีรั่ม ในน้ำยางของต้นแก่พันธุ์ RRIM600 และ GT1 เมื่อผสมบี-ซีรั่มกับซี-ซีรั่มให้ผลบวกโดยวิธี Western blot ตรงกับ GI และGII และแบบแผนของไอโซไซม์ดังกล่าวใช้จำแนกพันธุ์ได้ แต่ส่วนผสมของบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มจากยางต้นอ่อนทั้งสองพันธุ์ พบว่า มีแถบโปรตีนที่ไม่ตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของ GI และ GII และแถบโปรตีนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ ดังนั้น แบบแผนของไอโซไซม์ดังกล่าว จึงใช้เป็น marker ในการจำแนกพันธุ์ไม่ได้

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในยางพารา พบว่า บี-ซีรั่มจากยางพาราทั้งสองพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เชื้อรา *Curvularia sp.* และ *Corticium samonicolor* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora botryosa, P. palmivora, Colletotrichum gloeosporioides* และ *Corynespora casiicola* ซี-ซีรั่มสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* เท่านั้น สำหรับไอโซไซม์ GI และ GII ที่เตรียมให้บริสุทธิ์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ดังกล่าวมีความต้านทานจำเพาะกับเชื้อบางชนิดเท่านั้น หรือต้องทำหน้าที่ควบคู่กับ เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์อื่น ๆ อย่างไรก็ตามเชื่อว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ ที่พบในบี-ซีรั่มของน้ำยางทั้งสองพันธุ์นั้นจัดเป็น PR โปรตีน (pathogenesis-related proteins) เพราะ PR โปรตีนที่พบส่วนมากถูกกระตุ้นได้ด้วยเอทิลีน, เป็นเบสิคโปรตีน และถูกเก็บไว้ภายในแวคิวโอล GI และ GII ก็มีคุณสมบัติเป็นเบสิคโปรตีนซึ่งถูกกระตุ้นได้โดยเอทิลีนเช่นกัน และถูกเก็บไว้ในออร์แกเนลล์ลูทอยด์ ซึ่งเป็นแวคิวโอลชนิดหนึ่ง จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เทคนิค Western blot ไม่สามารถตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในน้ำยางของยางต้นอ่อนได้ ดังนั้น ในระดับ mRNA ของเอนไซม์ดังกล่าวจะถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราจริงหรือไม่ควรมีการศึกษากันต่อไปโดยอาศัยเทคนิค Northern blot

Thesis Title Properties and Functions of Beta-1,3-glucanase Isozymes from B-serum of *Hevea* Latex

Author Miss Tantip Sribrirux

Major Program Biological Sciences

Acadamic Year 1995

Abstract

Two-β-1,3-glucanase isozymes (EC 3.2.1.39), namely GI and GII, were purified from B-serum of fresh latex collected from the rubber (*Hevea*) trees of RRIM600 and GT1 clones, using ion-exchange and affinity chromatography. The ratio of GII to GI in B-serum from RRIM600 clone was 1 : 2 while that from GT1 was 7 : 1. The level of GII isozyme in GT1 clone was found to be about four times higher than in the other.

Both isozymes, as determined by SDS-PAGE, are monomeric proteins of *Mr* 32 and 35 Kd for GI and GII, respectively. They also exhibited to be glycoproteins with carbohydrate contents of 31.4 %(w/w) for GI and 4.3 % (w/w) for GII. The hydrolysis products of laminarin by the two isozymes were analysed by TLC (thin-layer chromatography) and the initial products were identified to be (1→3)-β-D-oligosaccharides with degree of polymerization more than 4. Therefore, they are classified as endoglucanases. Substrate specificity studies also indicated that the two isozymes require relatively long runs of contiguous β-1,3-D-glucosidic linkages with low degree of glycosyl substitution, such as in laminarin and CM-pachyman. Hence, they hydrolysed neither the β-1,4-D-glucosidic linkages of lichenin and barley glucan nor the β-1,6-D-glucosidic linkages of pustulan and yeast glucan. GI hydrolysed laminarin at the highest rate but GII hydrolysed CM-pachyman much faster than laminarin. The antibody raised against GII could react with both isozymes at similar specificities. When the GII antibody was employed to detect the isozymes in C-serum and rubber leave extract by Western

blot analysis, it appeared that in C-serum there were two isozymes of the same *Mr* as those of GI and GII, hybridized to the antibody, but their specificities were relatively lower than those in B-serum. In rubber leaves, at least four β-1,3-glucanase isozymes were detected in the leave extract but their molecular weights were different from those of GI and GII. Even though the mixture of B-serum and C-serum from old rubber trees gave only two isozyme bands of GI and GII and the electrophoretic pattern of these enzymes were distinguishable between the rubber clones, the same type of mixture from young rubber trees did not show the GI and GII bands and the pattern of proteins are the same in both clones. Therefore, the electrophoretic pattern of the enzymes from young rubber tree latex cannot be used as a marker for selecting high disease-resistant rubber clones.

Antifungal activity was also studied on six different fungi causing several diseases in *Hevea* tree. B-serum from both clones showed strong inhibition to *Rigidoporus lignosus* while *Curvularia sp.* and *Corticium samonicolor* were inhibited at lower level. B-serum gave no effect on growths of *Corynespora casiicola, Colletotrichum gloeosporioides, Phytophthora botryosa* and *P.palmivora*. C-serum also inhibited growth of *R. lignosus* but the purified GI and GII were not able to inhibit growth of any fungi tested. This is probably because they may need to work synergistically with chitinase and other enzymes. However, both isozymes should to be pathogenesis-related proteins (PR proteins) since they are basic proteins, can be induced by ethylene, and are localized in vacuoles. Those described characters can be found in most PR proteins. From this preliminary study, it seems that Western blot analysis was not sensitive enough to detect the increase of the β-1,3-glucanase level in young rubber tree latex. Therefore, the mRNA level of this enzyme during fungal infection should be studied further by Northern blot analysis.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเชาว์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาให้คำชี้แนะแนวทางต่างๆ ในการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งการเขียนและการตรวจแก้วิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่ง และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นวลจิรา ภัทรรังรอง กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์กับงานวิจัยและให้ความสะดวกเกี่ยวกับ สถานที่ทำงานวิจัย, เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ เป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมีและ รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความรู้คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์และให้ความอนุเคราะห์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ Professor Bruce Stone แห่งภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยลาโทรบ ประเทศออสเตรเลียที่กรุณาให้สารพัสทิวแลน และ ซีเอ็ม-พาไคแมน สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณ ประภา พัฒนกุล หัวหน้ากลุ่มอารักขาพืช ศูนย์วิจัยการยางคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ที่ให้ตัวอย่างเชื้อรา เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณ ภัทราวุธ จิวตระกูล หัวหน้ากลุ่มพืชศาสตร์ ศูนย์วิจัยการยางคอหงส์ ที่ได้ให้ความรู้เกี่ยวกับเรื่องยางพาราเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับสารเคมี และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการทำวิจัยด้วยดี

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาระหว่างปีการศึกษา 2535-2536

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณพ่อ, คุณแม่ ที่ให้กำลังใจเสมอมา และเพื่อนๆ พี่ๆและน้องๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ธารทิพย์ ศรีบริรักษ์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	27
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	28
วัสดุ	28
อุปกรณ์	30
วิธีการ	31
3. ผลการทดลอง	55
4. วิจารณ์	98
5. สรุป	115
เอกสารอ้างอิง	118
ประวัติผู้เขียน	126

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา	16
2. แสดงพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรากลุ่มต่างๆ	17
3. แสดงพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์คิดต่อน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์	18
4. แสดงตัวอย่างการศึกษา defense response กับการสร้าง PR โปรตีนในพืช	19
5. แสดงส่วนประกอบของเจล ดัดแปลงจาก Laemmli (1970)	41
6. แสดงเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา	43
7. แสดงสับสเตรตที่เป็นแหล่งเบต้า-ดี-กลูแคน (β-D-glucan)	48
8. แสดงปริมาณสุทธิของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในแต่ละขั้นตอนจากยางพันธุ์ RRIM600	64
9. แสดงปริมาณสุทธิของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในแต่ละขั้นตอนจากยางพันธุ์ GT1	65
10. แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่ม ในยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 ที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายรา	70
11. แสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม ของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1	71
12. แสดงอัตราเร็วสัมพัทธ์ (relative rate) ในการย่อยสับสเตรตที่เป็น แหล่งเบต้า-ดี-กลูแคน โดยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GI) และไอโซไซม์ที่2 (GII)	86

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

13. เปรียบเทียบค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก ยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 เมื่อเกิดบาดแผล (wounding) จากการกรีด 94

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	55
2.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวเอนไซม์จากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose	57
3.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวเอนไซม์ จากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose	59
4.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวเอนไซม์ จากน้ำยางพันธุ์ GT1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose	61
5.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวเอนไซม์ จากน้ำยางพันธุ์ GT1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose	63
6.	แสดงแถบโปรตีนในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM600 ด้วยวิธี SDS-PAGE	67
7.	แสดงแถบโปรตีนในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ GT1 ด้วยวิธี SDS-PAGE	68
8.	แสดงแถบโปรตีนของเอนไซม์ที่ย้อมด้วยวิธี silver stain	69
9,10	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม จากยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1	73
11,12	แสดงผลการไม่ยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม จากยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1	75
13.	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างซี-ซีรั่ม จากยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1	76

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14,15,16	แสดงผลการไม่ยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างซี-ซีรั่ม จากยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1	77
17,18,19	แสดงผลการไม่ยับยั้งการเจริญของสายราด้วย เอนไซม์GIและGII	80
20.	แสดงผลการทำโครมาโตกราฟฟีบนชั้นบาง (Thin-layer chromatography)	82
21.	แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	84
22	แสดงผลการทำ Ouchtherlony double immunodiffusion ของเอนไซม์ GI	88
23	แสดงผลการทำ Ouchtherlony double immunodiffusion ของเอนไซม์ GII	89
24.	เปรียบเทียบแถบโปรตีนจากบี-ซีรั่มและเอนไซม์ GI และGII ที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 และ จากการทำ Western blot	91
25.	เปรียบเทียบแถบโปรตีนจากบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 ด้วยวิธี Western blot	92
26.	เปรียบเทียบแถบโปรตีนจากสารสกัดใบยางอ่อนของยางพาราพันธุ์RRIM600 และพันธุ์ GT1 ด้วยวิธี Western blot	93
27.	เปรียบเทียบแถบโปรตีนจากบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM600 หลังเกิดบาดแผล (wounding) ด้วยวิธี Western blot	96
28.	เปรียบเทียบแถบโปรตีนจากบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ GT1 หลังเกิดบาดแผล (wounding) ด้วยวิธี Western blot	97

ตัวย่อและสัญลักษณ์

A	=	Absorbance
BSA	=	Bovine serum albumin
CM-cellulose	=	Carboxy methyl-cellulose
Con A	=	Concanavalin A
D.W.	=	Distilled water
DEAE	=	Diethylaminoethyl
DNS	=	3,5 dinitrosalicylic acid
GI	=	เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่ 1
GII	=	เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่ 2
Kd	=	Kilodalton
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
M.W, Mr	=	Molecular weight
O.D.	=	Optical density
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
PDA	=	Potato dextrose agar
pH	=	-log Hydrogen ion concentration
pI	=	Isoelectric point
ppm	=	Part per million
rpm	=	Revolution per minute
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	=	Tris-buffered saline
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethylaminomethane) hydrochloride
TTBS	=	Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20
w/w	=	weight by weight
w/v	=	weight by volume
α	=	alpha
β	=	beta
µl	=	microliter
ml	=	milliliter
µM	=	micromolar
%	=	percent
^{o}C	=	degree Celsius
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ EUPHORBIACEAE มีถิ่นกำเนิดเดิมแถบลุ่มน้ำอะเมซอน ในประเทศบราซิล ทวีปอเมริกาใต้ ได้มาเจริญงอกงามอยู่ในเอเชีย และเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของเกษตรกรในภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตยางธรรมชาติส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลก (ข่าวกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง 2537) จึงถือได้ว่า ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อการครองชีพของประชาชน ทางภาคใต้และภาคตะวันออกไม่ต่ำกว่า1ล้านครอบครัว (ณรงค์ สุจเร 2536) แต่ในด้านพันธุ์ยางยังสู้ต่างประเทศไม่ได้อย่างเช่น ประเทศมาเลเซีย ซึ่งได้เปลี่ยนพันธุ์ยางพื้นเมืองเป็นยางพันธุ์ดีไปหมดแล้ว ดังนั้นจึงเกิดการเร่งรัดปรับปรุงพันธุ์ไม่ว่าจะโดยวิธีใดเพื่อให้ได้ยางพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง รวมทั้งวิธีการปลูกและการดูแลรักษาให้ต้นยางมีความอุดมสมบูรณ์ปราศจากโรคอันเกิดจากเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชต่าง ๆ ดังนั้นในการปลูกยางพาราจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่พื้นที่ที่เหมาะสมต่อการปลูกยาง และการคัดเลือกพันธุ์ยางที่จะใช้ปลูกซึ่งจะต้องมีลักษณะเด่น เช่น มีผลผลิตเนื้อยางแห้งสูง, มีความต้านทานโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ, การเจริญเติบโตดี ทั้งระยะก่อนเปิดกรีดและระหว่างกรีด, เปลือกเดิมและเปลือกงอกใหม่หนา, มีจำนวนท่อน้ำยางมาก, ปรับตัวได้กว้างในสภาพแวดล้อมและทนต่อสภาวะบางอย่าง เช่นการขาดน้ำ เป็นต้น (สมพงศ์ สุขมาก 2536) ยางพาราเป็นพืชที่จะต้องได้รับการดูแลรักษาให้มีอายุไม่น้อยกว่า 30 ปี จึงเห็นได้ว่าต้นยางทุกสวนมักจะแสดงอาการผิดปกติ ไม่ระยะใดก็ระยะหนึ่งด้วยสาเหตุต่าง ๆ ตัวอย่าง เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารมีน้อยหรือมากเกินไป, ความชื้นในดินไม่เหมาะสม ซึ่งอาการผิดปกติของพืชที่เกิดจากสาเหตุเหล่านี้เป็นที่สังเกตเห็นได้ง่าย แต่อาการเป็นโรคเนื่องจาก เชื้อแบคทีเรีย, เชื้อรา, ไส้เดือนฝอยและแมลง มีข้อสังเกตที่สลับซับซ้อนพอสมควร อย่างไรก็ดี ความแข็งแรงตามธรรมชาติของต้นยาง จะทำให้ต้นยางสามารถรอดพ้นจากการ

เป็นโรค และมีชีวิตอยู่ต่อไปได้เป็นส่วนมาก ดังนั้น ในอดีตโรคยางพาราไม่ได้มีความสำคัญและเป็นที่สนใจของชาวสวนเท่าใดนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ชาวสวนที่ปลูกยางพื้นเมืองจากต้นกล้าอย่างระเกะระกะ แต่เมื่อมีการจัดการสวนยางที่ดี โดยปลูกอย่างมีระเบียบเรียบร้อย และคัดเลือกพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงมาติดตาปลูกกันอย่างกว้างขวาง ความสำคัญของโรคยางก็มีมากขึ้น และเนื่องจากต้นยางจะถูกกรีดที่ส่วนเปลือกของลำต้นเพื่อเก็บเอาน้ำยางสดเกือบทุกวัน ทำให้ต้นยางเกิดบาดแผลจึงมีโอกาสที่จะเกิดโรคได้มาก ไม่ว่าจะเป็นโรคที่เกิดที่ ใบ และฝัก ได้แก่ โรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อ *Oidium heveae*, โรคใบร่วงและฝักเน่า จากเชื้อ *Phytophthora*, โรคที่เกิดที่กิ่งก้านและลำต้น ได้แก่ โรคเส้นดำ , โรคเปลือกเน่า และโรคที่เกิดที่ราก ได้แก่ โรครากขาว และโรครากสีน้ำตาล เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้ทำให้ผลผลิตของยางพาราต่ำลงมาก และหากถึงขั้นร้ายแรงอาจทำให้ต้นยางตายได้ (พงษ์เทพ ชจรไชยกุล 2533)

ต้นยางพาราและพืชทั่วๆไป มีกลไกในการตอบสนองเพื่อปกป้องตนเองจากการบุกรุกของเชื้อโรค (Boller 1985 อ้างโดย Leah และคณะ 1991) โดยมีการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ เช่น มีการสร้าง wax, cork หรือ cuticle เหนือผนังเซลล์ชั้นนอกสุด (epidermal cell) หรือสร้างสารโมเลกุลเล็ก เรียกว่า phytoalexin ซึ่งเป็น antimicrobial micromolecules ที่จะไม่พบในพืชที่มีความสมบูรณ์ (healthy plants) แต่พบว่าจะมีการสร้างเพิ่มขึ้นเมื่อมีการรุกรานของเชื้อโรค (Paxton 1981 อ้างโดย Bowles 1990) PR โปรตีน (pathogenesis-related protein) เป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรค PR โปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (Mauch และ Staehelin 1989) เอนไซม์ทั้งสองมีคุณสมบัติในการย่อยไคตินและเบต้า-1,3-กลูแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราส่วนใหญ่ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (Shen และคณะ 1989) นอกจากนี้สภาวะกดดันบางอย่างเช่น ภาวะการเกิดบาดแผล (wounding) การใช้สารเคมีได้แก่ ฮอร์โมนเอทิลีน, salicylic acid, cytokinin และ fungal elicitors สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง PR โปรตีนเพิ่มมากขึ้น (Simmons และคณะ 1992 อ้างโดย David และคณะ 1993) สำหรับต้นยางพาราปัจจัยที่อาจกระตุ้นให้เกิดการสร้าง PR โปรตีนได้ก็คือ การติดเชื้อเนื่องจาก การเกิดบาดแผล จากการกรีดลำต้นเพื่อเก็บน้ำยางทุกๆวัน และการใช้สารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรลซึ่งเป็นสารเคมีเอทิลีนชนิดหนึ่ง

PR โปรตีน หลายชนิดสามารถทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งสามารถทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Skujins และคณะ (1965) พบว่า เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียชั้นสูง กลุ่ม Streptomycetes สามารถทำงานร่วมกันในการย่อยสลาย ผนังเซลล์ ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Fusarium solani* ได้ เนื่องจาก ผนังเซลล์ ของเชื้อราทั้งสองชนิดนี้มี ไคตินและเบต้า-1,3-กลูแคน เป็นองค์ประกอบ ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Mauch และคณะ (1988) พบว่า เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก ฝักถั่ว สามารถทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ถึง 15 ชนิด จากทั้งหมด 18 ชนิด แต่ก็มีเชื้อราบางชนิดที่ผนังเซลล์ถูกย่อยสลายได้ด้วย เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพียงอย่างเดียว และจากการศึกษาของ Martin (1991) พบว่า มีเอนไซม์ไคติเนส/ไลโซไซม์ อยู่ในบี-ซีรั่มประมาณ 25% ของ soluble protein ในน้ำยาง ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายส่วนของ ไคตินและ peptidoglycan ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียตามลำดับและพบว่า ในซี-ซีรั่ม ก็มี เอนไซม์ไคติเนส ที่เป็นแอซิดิกโปรตีน อยู่แต่มีจำนวนน้อยมาก จากที่กล่าวแล้วว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนส เป็น PR โปรตีนที่มักจะทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนั้น ในบี-ซีรั่มของน้ำยาง เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส น่าจะทำงานร่วมกับเอนไซม์ไคติเนส ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยเช่นกัน

จากสาเหตุดังที่กล่าวมาแล้วนี้ จึงได้ทำบริสุทธิ์และศึกษาหน้าที่บางอย่างของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม ของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 โดยสันนิษฐานว่าในยางพันธุ์ GT1 ซึ่งจัดว่าเป็นพันธุ์ยางที่มีความต้านทานต่อโรคหลายชนิด (สมพงศ์ สุขมาก 2536) จะมีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในปริมาณสูง และมีความสามารถในการต้านทานโรคจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในยางได้ ซึ่งหากเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราในส่วนที่เป็นเบต้า-กลูแคนได้ การนำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์แล้วมายับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคจะเกิดประโยชน์ ในด้านการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนั้น ๆ ในพืชได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ปริมาณและค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่วัดได้ของ เบต้า-1,3-กลูคาเนสเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี (biochemical parameter) ในการคัดเลือกพันธุ์ของต้นกล้ายางพาราที่มีความต้านทานโรคไปปลูกในพื้นที่ที่เหมาะสม เพื่อช่วยลดอัตราการตายเนื่องจากการเกิดโรคของ

ต้นยางอ่อนและต้นยางที่อยู่ในระยะที่เก็บผลผลิตได้ ทำให้สามารถเก็บผลผลิตได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้หาก เอนๆไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้นี้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหรือเชื้ออื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ก็จะมีประโยชน์ในด้านการป้องกันโรคจากเชื้อเหล่านั้นได้โดย วิธีการเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป และยังเป็นหนทางในการศึกษาต่อไปในระดับชีวโมเลกุล (molecular biology) ด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) โดยการนำยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา มาใส่ในสิ่งมีชีวิตที่เติบโตเร็ว เช่น แบคทีเรีย เพื่อที่จะเพิ่มการสร้างเอนไซม์ในปริมาณมาก ๆ ได้อย่างรวดเร็วแล้วจึงนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส[(1→3)-β-D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.39) หรือ endo-(1→3)-β-D-glucanase หรือ 1,3-β-D glucan-3-glucanohydrolase (EC 3.2.1.6)] จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolases) มีความสามารถในการย่อยสลาย พันธะเบต้า-1,3-กลูแคน ของสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ลามินาริน (*Laminaria digitata*), พาไคแมน (*Poria cocos*), กลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่พันธะไม่เป็นเบต้า-1,3 ได้เช่น พัสทิวแลน (*Umbilicaria pustulan*) ซึ่งมีพันธะเป็นเบต้า-1,6-กลูแคน หรือ ไลชินิน ที่มีพันธะเป็นเบต้า-1,4 เป็นต้น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มด้วยกันคือ endo-1,3-glucanase, exo-1,3-glucanase และ β-glucosidases บางชนิด (Reese และคณะ 1968 อ้างโดย Young และคณะ 1981)

1.2 ความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายสับสเตรตที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ น้ำตาลกลูโคส ที่ต่อกันด้วยพันธะชนิดเบต้า-1,3 ตัวอย่างการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ได้แก่ Hrmova และ Fincher (1993) พบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 3 ไอโซไซม์ คือ GI, GII และ GIII ที่

ทำบริสุทธิ์ได้จาก ใบอ่อนของข้าวบาเลย์ (*Hordeum vulgare*) มีความจำเพาะในการย่อยสลายสับสเตรต ลามินาริน (*Laminaria digitata*) ซึ่งมี พันธะเบต้า-1,3-กลูแคน ต่อกันเป็นสายยาว และมีแขนงที่ต่อด้วย พันธะเบต้า-1,6 จำนวนน้อย ๆ แต่เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่มีหมู่แทนที่หรือแขนงจำนวนมาก ๆได้ เช่น กลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Nagata และคณะ (1990) พบว่า เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์จากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Flavobacteriam dormitator* var. *glucanolytica* สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่เป็นเบต้า-ดี-กลูแคน ตัวอย่าง เช่น ลามินาริน, กลูแคนจากยีสต์ และ พาไคแมน ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลกลูโคส, ลามินาริ์ไบโอส (laminaribiose) และลามินาริ์ไตรโอส (laminaritriose) Young และคณะ (1981) พบว่า เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ GI, GII และ GIII ที่ทำบริสุทธิ์จากใบและต้นมะเขือเทศ มีความจำเพาะในการย่อยสลายสับสเตรตที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคน ได้แก่ ลามินาริน, พาไคแมน และ ซีเอ็ม-พาไคแมน แต่ไม่สามารถย่อยสลาย ลามินาริแซคคาไรด์ที่มี DP (degree of polymerization) 2-5 ได้ ซึ่งต่างจากเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสในพืชชนิด อื่น ๆ ที่สามารถย่อยสลายพันธะเบต้า-กลูแคนที่มีน้ำตาลกลูโคสต่อกัน 3-4 โมเลกุล หรือมี DP 3-4 ได้ (Manners และคณะ 1973 Moore และคณะ 1972 อ้างโดย Young และคณะ1981) นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์จาก อาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Verticillium albo-atrum* มีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคนเท่านั้น ได้แก่ ลามินาริน, พาไคแมน, ซีเอ็ม-พาไคแมน และ ลามินาริแซคคาไรด์ ที่มี DP 3-5 (Young และคณะ 1981)

1.3 คุณสมบัติความเป็นไกลโคโปรตีนของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

จากการศึกษาของ Hrmova และ Fincher (1993) ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (EC 3.2.1.39) 3 ไอโซไซม์คือ GI, GII และ GIII จากใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) พบว่า ไอโซไซม์ GIII มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน โดยที่มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 12-17% (w/v) โดยวิธี phenol/H_2SO_4 assay คิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลประมาณ 20-30 mol ต่อเอนไซม์ 1 mol ส่วนเอนไซม์ GI และ GII ไม่มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน Notario และคณะ (1976) พบว่า เอนไซม์เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำให้บริสุทธิ์จากยีสต์ *Candida utilis* มีคุณสมบัติเป็น ไกลโคโปรตีนชนิดกรด มีค่า pI เท่ากับ 4.1 โดยที่มี

ส่วนประกอบเป็นน้ำตาลแมนโนสถึง 68% จึงทำให้เอนไซม์สามารถจับแบบจำเพาะเจาะจงกับ Concanavalin A-Sepharose 4B ซึ่งเป็นเลคตินที่มีความจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาลแมนโนส ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ และจากการศึกษาของ Notario และคณะ (1986) พบว่าเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส (EC 3.2.1.58) ที่ทำบริสุทธิ์จากเชื้อชนิดเดียวกันคือ *C. utilis* ก็มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนชนิดกรดมีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบ

1.4 การจำแนกชนิดของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ตามรูปแบบการย่อย (patttern of hydrolysis)

รูปแบบการย่อยสับสเตรตโดยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส สามารถนำมาใช้ในการจำแนกเอนไซม์ออกเป็น 2 ชนิด คือ เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส และ เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งเอนไซม์ ทั้งสองชนิดจะมีลักษณะการทำงานที่แตกต่างกันดังนี้

1.4.1 เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส

1) เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส

เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะของ เบต้า-1,3-กลูแคน โดยจะเริ่มย่อยสลายพันธะของโมเลกุลของน้ำตาล ที่อยู่นอกสุดบนสายพอลิเมอร์ของกลูแคน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่าง ๆ สับสเตรตที่ตรวจสอบความเป็นเอกโซ เบต้า-1,3-กลูคาเนส ได้แก่ *p*-nitrophenyl β-D-glucoside ซึ่งหลังจากเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและสารประกอบ *p*-nitrophenol ซึ่งทำให้เกิดสีเหลืองในสารละลายเมื่ออยู่ในสารละลายด่าง เช่น ใน 0.3 M โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือ 0.3 M Na_2CO_3 และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

2) เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส

เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะของ เบต้า-1,3-กลูแคน แบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1⟶3)-β-D-oligosaccharides ที่มี DP (degree of polymerization) ต่าง ๆกัน สับสเตรตที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ได้แก่ ลามินาริน (*Laminaria digitata*) ซึ่งมีพันธะเป็น เบต้า-1,3-1,6-กลูแคน ในอัตราส่วน 7:1 หรือพาไคแมน (*Poria cocos*) ซึ่งเป็นสับสเตรตที่มีพันธะเป็น เบต้า-1,3-กลูแคน เพียงอย่างเดียว ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ เป็นต้น

สำหรับวิธีการศึกษารูปแบบการย่อยโดยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ทำได้โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อย โดยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสกับสับสเตรตที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคนซึ่งจะเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ มาทำโครมาโทกราฟีบนชั้นบาง (thin layer chromatography) โดยใช้แผ่นซิลิกา เจล หรือกระดาษ จากนั้นตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโดยใช้สารละลายที่สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับน้ำตาลชนิดนั้น ๆได้ เช่น สารละลาย orcinal ใช้ในการตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ หรือสารละลาย diphenylamine/aniline/phosphoric acid ซึ่งจะให้สีกับน้ำตาลแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยที่ จะให้สีเทาอมฟ้า (blue grey) กับ น้ำตาล aldose และจะให้สีแดง (light red) กับน้ำตาล ketose เป็นต้น จากนั้นนำรูปแบบของน้ำตาลบนแผ่น ซิลิกา เจล ที่ได้มาตรวจสอบเพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ว่าเป็นแบบ เอกโซ หรือ เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยที่หากเป็นเอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น (initial product) ที่ได้จากปฏิกิริยาจะเป็นน้ำตาลกลูโคสแต่หากเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสจะได้ น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี DP ชนิดต่าง ๆ เป็นผลิตภัณฑ์เริ่มต้น

1.4.1.1 เอนไซม์เอกโซ/เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ศึกษาในพืช

จากการศึกษาของ Keefe และคณะ (1990) พบว่า มีการสร้างเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส และ เอนไซม์เอนโดไคติเนส ที่มีความเป็นด่าง (basic form) ขึ้นภายในเซลล์ผิวใบ (epidermal cells) ของใบยาสูบ (*Nicatiana tabacum* l.cv Havana 42) และ จากการศึกษาของ Sock และคณะ (1990) พบว่า ใน intracellular washing fluid (IWF) ของใบข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) ที่ติดเชื้อจากเชื้อรา *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* จะมีการสร้างเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า หลังจากถูกกระตุ้นจากเชื้อราเป็นเวลา 4 วัน ส่วนการสร้างเอนไซม์เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น Keen และ Yoshikawa (1983) พบว่าเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์จากใบเลี้ยงของถั่วเหลือง (soybean cotyledons) ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยเศษผนังเซลล์ของเชื้อรา *Phytophthora megasperma* f.sp *glycinea* เป็นเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส (EC 3.2.1.39) จำนวน 2 ไอโซไซม์ ที่มีค่า pI เท่ากับ 8.7และ 10.5 ตามลำดับ ทั้งสองไอโซไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิวเตรชั่นและ SDS-PAGE ประมาณ 33 Kd เอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่มีพันธะเป็น เบต้า-1,3-กลูแคน ได้หลายชนิดได้แก่ ไมโคลามินาริน (mycolaminarin), ลามินาริน, คริโสลามินาริน

(chrysolaminarin) และ ซีเอ็ม-พาไคแมน (CM-pachyman) ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรต carboxymethylcellulose, yeast mannan และสับสเตรต *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside แม้ว่าจะใช้ปริมาณมากก็ตาม จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้มีคุณสมบัติเป็น เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส จากการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่า การกระตุ้นจากเศษผนังเซลล์ของเชื้อราหรือเรียกว่า elicitors นั้นเป็นสาเหตุหนึ่งในการไปกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อต่อต้าน (defense reaction) ของพืชเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อโรค ซึ่งเอนไซม์หรือโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยาตอบสนองนี้ เรียกว่า PR (pathogenesis-related) โปรตีน ดังนั้น เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสดังกล่าวจึงจัดเป็น PR โปรตีน

1.4.1.2 เอกโซ/เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ศึกษาในเชื้อจุลินทรีย์

Mrsa และคณะ (1993) พบว่า เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ จากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส มีน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE เท่ากับ 29 Kd จากการที่เอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรต *p*-nitrophenyl glucoside ซึ่งเป็นสับสเตรตที่ใช้ตรวจสอบการเป็นเอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ และผลจากการทำโครมาโทกราฟีบนชั้นบาง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตลามินารินด้วยเอนไซม์นี้ ได้แก่ ลามินาริเตตราโอส (laminiritetraose), ลามินาริไตรโอส, ลามินาริไบโอส และกลูโคส ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น เป็นการยืนยันได้ว่าเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้มีคุณสมบัติเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส และจากการศึกษาของ Nogi และ Horikoshi (1990) พบว่า เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย Alkalophilic *Bacillus sp.*AG-430 ที่แยกได้จากดิน เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือเป็นเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้ถึง 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 10 นาที โดยที่จะสูญเสียความว่องไวของเอนไซม์ไปเพียง 10% เท่านั้น เอนไซม์นี้มีอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 60-65 องศาเซลเซียสและ 9-10 ตามลำดับ เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE เท่ากับ 35 Kd มีค่า pI ประมาณ 3.8 และพบว่าเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินารินแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็น กลูโคส, ลามินาริไบโอส, ลามินาริไตรโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ ชนิดต่าง ๆ เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสในเชื้อบางชนิดมีความสำคัญต่อการเกิด ออโตไลซิส (autolysis) โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อเอง Fleet และ Phaff (1974) พบว่า เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์

จากผนังเซลล์ของเชื้อ *Schizosaccharomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นเอนไซม์เอกโซและเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส และพบว่า เฉพาะเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อได้ ดังนั้น เอนไซม์นี้จึงมีความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ในวงจรชีวิตของเซลล์ ที่ต้องมีการย่อยสลายผนังเซลล์ ได้แก่ การเกิดการแตกหน่อ (budding), การแบ่งเซลล์ (fission), การรวมกันของเซลล์ (conjugate), การขยายตัวหรือยืดตัวของผนังเซลล์ (wall extension) และการแตกของสปอร์ โดยที่ในบางครั้งเอนไซม์นี้อาจมีการทำงานร่วมกับเอนไซม์ตัวอื่น ๆด้วยเช่น chitin synthetase เมื่อมีการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์ เป็นต้น

1.5 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่

1.5.1 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในเชื้อราและยีสต์

1.5.1.1 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในเชื้อรา

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก สารสกัดจากเซลล์ ของเชื้อรา *Candida utilis* จัดเป็นเอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยที่สามารถย่อยสลายพันธะทั้งที่เป็น เบต้า-1,3 และเบต้า-1,6 ได้แบบไม่จำเพาะเจาะจง แต่สามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินารินได้ดีที่สุด แต่ไม่สามารถย่อยสับสเตรตที่มีพันธะแบบ α-linkages เช่น yeast mannan ที่มีพันธะแบบ (1$\rightarrow$6)-α-; (1$\rightarrow$2)-α-(1$\rightarrow$3)-α-; (mannose) ได้ เอนไซม์ดังกล่าว มีน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE เท่ากับ 36 Kd และโดยวิธี เจลฟิวเตรชั่น เท่ากับ 20 Kd และเป็นไกลโคโปรตีนชนิดกรด (acidic glycoprotein) มีค่า pI เท่ากับ 4.1 โดยมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 68% และมี กรดอะมิโนชนิดกรด ในปริมาณสูง เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส อาจถูกสร้างขึ้นมาในผนังเซลล์ ขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphogenesis) ของยีสต์และเชื้อรา โดยเอนไซม์ที่พบอาจมีทั้งชนิด เอนโดและเอกโซเบต้า-1,3- กลูคาเนส หรืออาจถูกสร้างขึ้นมาเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ อย่างเดียวก็ได้ (Notario และคณะ 1976) สำหรับการศึกษาในเชื้อรา *Penicillum italicum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จับอยู่กับเซลล์ และเอนไซม์เบต้า-1,6-กลูคาเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์นอกเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์กลูคาเนสทั้งสองอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยการให้พลังงานกับเซลล์ของเชื้อรา จากแหล่งพลังงานคือ เบต้า-กลูแคน ที่อยู่นอกเซลล์ และอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ คอนิเดีย (conidia) โดยขึ้นอยู่กับ

แหล่งคาร์บอน นอกจากนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญและการยืดยาว (extension) ของผนังเซลล์ โดยมีผลต่อกลูแคน ที่มีพันธะเป็นเบต้า-1,3- และ เบต้า-1,6- ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา *Penicillium* ส่งผลให้กำหนดรูปร่างของเซลล์ได้ และเอนไซม์อาจมีบทบาททางด้านการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ เนื่องจากพบเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ทั้งสองไอโซไซม์จำนวนมากขณะที่เซลล์กำลังมีการเจริญเติบโต (Santos และคณะ 1977)

1.5.1.2 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยีสต์

ยีสต์ *Schizosaccharomyces* หลาย species ได้แก่ *S. pombe* C-277, *S. malidevorans, S. octosporus* และ *S. versatilis* มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ทั้งแบบ เอกโซ-และเอนโด- ขึ้นที่ผนังเซลล์ (cell wall-associated β-(1,3)-glucanase) โดยที่เอนไซม์เอนโด-เบต้า-กลูคาเนส สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์เองได้ ทำให้เกิดกระบวนการ ออโตไลซิส ขึ้นในเซลล์ ส่วนเอนไซม์เอกโซเบต้า-กลูคาเนส ไม่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์ได้ เอนไซม์เอนโดเบต้า-กลูคาเนสที่พบมีน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE เท่ากับ 97 Kd ซึ่งสูงกว่าที่พบใน *Phaseolus vulgaris* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 34 Kd (Abeles 1970 อ้างโดย Fleet และ Phaff 1974) เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3กลูคาเนสที่พบสามารถย่อยสลาย ลามินาริไตรโอส ได้เร็วกว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่พบในเชื้ออื่นๆ และพบว่า ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ Maddox และHorgh (1971) อ้างโดย Fleet และ Phaff (1974) พบว่า เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นด้วยสารเคมี คลอโรฟอร์ม สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์เองได้ ซึ่งเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผลิตขึ้นโดยยีสต์ *Schizosaccharomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ นี้จัดเป็น เอนไซม์ (1→3)-β-D-glucan-3-glucanohydrolase (EC 3.2.1.39) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลูคาเนสที่สามารถย่อยสลายพันธะ 1,3-β-D-glucan ได้เช่น ลามินาริน ในยีสต์บางชนิดเช่น *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าการสร้างเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผนังเซลล์ ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นโดย ยีน BGL2 เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่พบมีน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี SDS-PAGE เท่ากับ 29 Kd และไม่ได้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์เอง เหมือนกับที่พบในยีสต์บางชนิดดังกล่าวแล้ว แต่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อเป็น โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยการจับกับไคตินที่ผนังเซลล์ (Mrsa และคณะ 1993)

1.5.2 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในพืชชั้นสูง

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่มีการศึกษาในพืชส่วนใหญ่จะเป็น PR โปรตีน ที่พืชสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองจากการถูกรุกรานของเชื้อโรค เช่น เชื้อรา, เชื้อแบคทีเรีย, เชื้อไวรัส และเชื้อไวรอยด์ (Van Loon 1985 อ้างโดย Kombrink และคณะ 1988) หรือจากสภาวะกดดันต่าง ๆ เช่น ภาวะการเกิดบาดแผล, การใช้สารเคมี และภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (David และ คณะ 1993)

1.5.2.1 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum* var. Petit Havana SR1) ซึ่ง Bulcke และคณะ (1989) ศึกษาพบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้จากต้นยาสูบหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จำนวน 2 ไอโซไซม์ ที่ถูกสร้างขึ้นในแวคิวโอล ของเซลล์ โดยที่การสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจะเพิ่มมากขึ้นจากระดับปกติหลังจากที่ได้รับเชื้อ กลุ่มที่สอง เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจำนวน 3 ไอโซไซม์ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นใน ที่ว่างนอกเซลล์ (extracellular spaces) ของพืช หลังจากได้รับเชื้อและสารเคมี salicylic acid แสดงให้เห็นว่า ยีนในการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองกลุ่มเป็นยีนคนละชนิดกัน แต่เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองกลุ่มก็มีหน้าที่อย่างเดียวกันคือเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อต่อต้าน (defense response) ต่อการบุกรุกของเชื้อโรค และจัดเป็น PR โปรตีน และจากการศึกษาของ Tuzun และคณะ (1989) พบว่า มีเอนไซม์กลุ่มglucanohydrolase ที่ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นเมื่อต้นยาสูบ (*N. tabacum* L. ky 14) ถูกกระตุ้น ด้วยการฉีด sporangiospore ของ เชื้อรา (blue mold) เข้าไปในลำต้น คือ เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไคตินและ1,3-เบต้ากลูแคน ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราหลายชนิด (Boller 1988; Bartnicki-Garcia 1968 อ้างโดย Leah และคณะ 1991)

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) ซึ่งศึกษาโดย Jutidamrongphan และคณะ (1991) พบว่า หลังจากใบข้าวบาร์เลย์ ได้รับเชื้อรา *Erysiphe graminis* f.sp *hordei* ซึ่งก่อให้เกิดโรค powdery mildew ในข้าวดังกล่าว จะมีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น และจากการสกัด cDNA จากใบข้าวบาร์เลย์มาใช้เป็น

hybridization probe เพื่อตรวจสอบ mRNAs ในข้าวบาร์เลย์, ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*), ข้าวเจ้า (*Oryza sativus*) และ ข้าวฟ่าง (sorghum) ที่ได้รับเชื้อรา *Bipolaris sovokiniana* พบว่ามีการสร้างยีน ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น จึงสรุปได้ว่า เมื่อถูกรุกรานจากเชื้อโรค พืชจะปกป้องตัวเองโดยการกระตุ้นยีนที่ควบคุมการสร้าง เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ให้มีการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อโรค Leah และคณะ (1991) ศึกษาพบว่า เอนไซม์ไคติเนส , ribosome-inactivating protein และเอนไซม์ เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก เมล็ดของข้าวบาร์เลย์ สามารถทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei* และเชื้อรา *Fusarium sporotrichioides*

1.5.2.2 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในพืชใบเลี้ยงคู่

จากการศึกษาของ Borja และคณะ (1994) พบว่า รากของ *Picia abies* หลังจากที่ได้รับ เชื้อรา *Pythium dimorphum* จะเกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่าง ๆเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรคดังกล่าว ได้แก่ การสร้างสาร lignin เพิ่มมากขึ้นในกระบวนการ lignification และมีการแพร่กระจายของสาร flavonols และ condensed tannins ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้สังเกตเห็นอาการของโรคที่แสดงออกมาได้ เช่น รากมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นเนื่องจาก มีการสะสมของ lignin มากขึ้น ซึ่งจัดเป็นการเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อสามารถเข้ามาเจริญภายในเซลล์ได้ นอกจากนี้ สามารถตรวจพบว่ามีการสร้าง PR โปรตีน ขึ้นมาภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากติดเชื้อ PR โปรตีนที่ตรวจพบคือเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส, เอนไซม์ไคติเนส และ เอนไซม์ ไคโตแซนเนส (chitosanase) มีข้อสังเกตว่า เชื้อ *Pythium dimorphum* เป็นเชื้อราที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของสายรา ดังนั้น เอนไซม์ไคติเนสที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นนั้น จึงเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อต่อต้าน ของพืชที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านการรุกรานของเชื้อโรค

จากการศึกษาของ Mauch และ Staehelin (1989) เกี่ยวกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสใน ใบถั่ว (*Phaseolus vulgaris*) พบว่าหลังจากใบถั่วได้รับ เอทิลีน ความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 2 วันพบว่า จะมีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มขึ้น 40-50 เท่าและ 30-40 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับ ใบถั่วที่ไม่ได้รับสารเคมีดังกล่าว และเอนไซม์ทั้งสองมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นอย่างคงที่นานถึง 72 ชั่วโมง หลังจาก ได้รับเอทิลีน โดยที่น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธี

SDS-PAGE เท่ากับ 36 Kd และ 33 Kd ตามลำดับ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่พบสามารถย่อยสลายสับสเตรต พาไคแมน ซึ่งเป็น เบต้า-1,3-กลูแคนที่ไม่ละลายน้ำได้ ส่วนเอนไซม์ไคติเนสก็สามารถย่อยสลายสับสเตรตไคตินได้ และโดยอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติบอดีกับสารที่ต้องการหาและใช้เทคนิคการแยกส่วนทางชีวเคมี แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้งสองมีการสร้างเพิ่มมากขึ้นมากที่สุดใน แวคิวโอล ของเซลล์ใบที่ได้รับเอทิลีน (ethylene-treated leaf cells) และ พบได้เล็กน้อยบริเวณ ผนังเซลล์ ใกล้ ๆกับ middle lamella ที่ล้อมรอบด้วยintercellular air spaces และยังพบว่า เฉพาะเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเท่านั้นที่พบใน intercellular washing fluids ของใบที่ไม่ได้รับเอทิลีน จากผลการทดลองนี้ทำให้มีการสร้างแบบจำลองบทบาทของเอนไซม์ทั้งสองในต้นถั่ว ขณะที่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อโรค ซึ่งสรุปได้ว่า เมื่อเชื้อราสามารถเข้ามาเจริญอยู่ได้ใน intercellular spaces ของพืชก็จะเป็นหน้าที่ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งอยู่ที่ middle lamella บริเวณ intercellular air spaces จะทำการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อในส่วนที่เป็น เบต้า-1,3กลูแคน จากนั้นเศษของผนังเซลล์ของเชื้อจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นหรือเรียกว่า elicitor ในการสร้างสาร phytoalexins เพื่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Keen และ Yoshikawa 1983 อ้างโดย Mauch และ Staehelin 1989) จากนั้นเบต้า-1,3-กลูแคน ก็จะไปกระตุ้น defense gene ของพืชให้มีการสร้าง PR โปรตีน ออกมา (Ryan 1987 อ้างโดย Mauch และ Staehelin 1989) ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในที่สุด

Churngchow และคณะ (1995) ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (EC 3.2.1.39) จำนวน 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII จากบี-ซีรั่มของน้ำยางพารา โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และ โครมาโทกราฟีแบบเกาะอย่างจำเพาะเจาะจง ไอโซไซม์ GI และGII มีลักษณะเป็นโปรตีนโมเลกุลเดี่ยว มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 Kd และ 35 Kd ตามลำดับ จากการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรต แสดงให้เห็นว่า ทั้งสองไอโซไซม์ มีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่มีพันธะเบต้า-1,3 ต่อกันเป็นสายยาว และมีหมู่แทนที่หรือแขนงจำนวนน้อย ๆ ได้แก่ สับสเตรต ซีเอ็มพาไคแมน และลามินาริน แต่ไอโซไซม์ทั้งสองไม่สามารถย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4 ของสับสเตรต ไลชินิน และกลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ และพันธะเบต้า-1,6 ของ กลูแคนจากยีสต์ และพัสทิวแลนได้ จากการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ โดยใช้ลามินาริน เป็นสับสเตรต พบว่า GI และ GII มีค่า Km เท่ากับ 1.25 mg/ml

และ 1.33 mg/ml มีค่า Vmax เท่ากับ 2.86 nkat และ 2.65 nkat ตามลำดับ ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ของ GI และ GII เท่ากับ 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ ทั้งสองไอโซไซม์ สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ค่อนข้างสูง ประมาณ 60 องศาเซลเซียส และอาจเป็นไปได้ว่า GII มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับกลไกการป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคในยางพารา

1.6. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส กับคุณสมบัติเป็น PR โปรตีน

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (1,3-β-D-glucan-β-glucanohydrolase:EC 3.2.1.39) จัดเป็น PR โปรตีน ซึ่งนอกจากจะเป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นมาตอบสนองต่อ การบุกรุกของเชื้อโรค และสภาวะกดดันต่าง ๆ แล้วพบว่า ยังสามารถถูกสร้างขึ้นมาตอบสนองต่อ ฮอร์โมนและการเจริญเติบโตภายในพืชที่มีความสมบูรณ์ (healty plants) ได้อีกด้วย Memelink และ คณะ (1990) พบว่า มีการสร้าง เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่มีความเป็นด่าง (basic glucanase) จำนวนมาก ในรากของต้นยาสูบ ที่มีความสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Neale และคณะ (1990) พบว่า มีการสร้างเอนไซม์กลูคาเนส ขณะที่มีการออกดอกของพืช นอกจากนี้ Simmons และ คณะ (1992) พบว่า *Gns1* β-glucanase gene ที่พบในรากข้าว จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เมื่อได้รับ ฮอร์โมน เอทิลีน, salicylic acid, cytokinin และ fungal elicitors Felix และ Meins (1986) ศึกษาพบว่า เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส (EC 3.2.1.39) ใน เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง ของ *Nicotiana tabacum* L.cv Havana 425 ถูกควบคุมการสร้างด้วยฮอร์โมน (hormonal regulation) ส่วนเอนไซม์ เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ในลำต้นจะถูกควบคุมการสร้างเมื่อมีการเจริญเติบโตของพืช PR โปรตีนที่มีความสำคัญของพืชในการต่อต้านการรุกรานของเชื้อโรค คือ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นใน vegetative tissue ของพืชหลายชนิด เพื่อตอบสนองต่อ การบุกรุกของเชื้อราชนิดต่าง ๆ (Legrand และคณะ 1987) โดยที่เอนไซม์สามารถย่อยไคตินและ เบต้า-1,3-กลูแคน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Boller 1988; Bartnicki-Garcia 1986) สำหรับ non-vegetative tissue เช่น ดอกและผล กลไกการปกป้องตัวเองจากการบุกรุกของเชื้อโรคอยู่ภายใต้การควบคุมจากการเจริญของพืชเอง Leah และคณะ (1991) ได้ทำ บริสุทธิ์เอนไซม์ 3

ชนิดจาก เมล็ดของข้าวบาเลย์ (*Hordeum vulgare*) พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 มีการทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei* และ *Fusarium sporotrichioides* โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ microtiter well assay เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว คือ 26 Kd chitinase, 30 Kd ribosome-inactivating protein และ 32 Kd (1→3)-β-D-glucanase

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จัดเป็น PRโปรตีน มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Van Loon และคณะ (1985) อ้างโดย Kombrink และคณะ 1988) จากการศึกษาของ Hoj และคณะ (1988,1989) อ้างโดย Hrmova และ Fincher (1993) พบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่แยกได้จากข้าวบาร์เลย์ที่เพิ่งงอกใหม่ (germinating barley grain) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นขณะที่ติดเชื้อ การที่ต้นข้าวบาร์เลย์เพิ่งงอกใหม่ มีการสร้างน้ำตาล,กรดอะมิโนและสารชีวโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก ชนิดต่าง ๆ มาสะสมเอาไว้ในเอนโดสเปิร์ม ทำให้ง่ายต่อการถูกบุกรุกจากเชื้อโรคมีผลทำให้ต้นข้าวอาจถูกทำลายได้ ดังนั้น การกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จึงเป็นหนทางหนึ่งในการปกป้องตัวเองจากการบุกรุกจากเชื้อโรคต่าง ๆ และการที่พบว่ามีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสอยู่หลายไอโซไซม์นั้น ทำให้เอนไซม์มีความแตกต่างกันในด้านความจำเพาะต่อสับสเตรต (substrate specificity), รูปแบบการทำงาน (action patterns) และ ความสามารถในการย่อยสลายพันธะเบต้า-1,3-1,6-กลูแคน ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราหลายชนิด ดังนั้นประโยชน์ของการที่มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หลายๆไอโซไซม์ จะช่วยให้ยับยั้งการบุกรุกของเชื้อราที่มี เบต้า-1,3-กลูแคน ชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ได้ (Wessels และ Sietsma (1981) อ้างโดย Hrmova และ Fincher 1993) และจากการศึกษาของ Hrmova และ Fincher (1993); Jooston และ Dewit (1989) ; Benhamou และคณะ (1990) อ้างโดย Lech และคณะ (1991) พบว่า เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นหลังจากได้รับเชื้อ *Cladosporium fulvum* และเชื้อ *Fusarium oxysporum* ใน มะเขือเทศพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคมากกว่าพันธุ์ที่ไม่ต้านทานโรค จากการศึกษาของ Mauch และคณะ (1988) พบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์จาก ฝักถั่ว หลังจากได้รับเชื้อรา *Fusarium solani* f.sp *phaseoli* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* f.sp *pisi* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถทำงานร่วมกัน

แบบ synergistic กับเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น PR โปรตีนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F.solani* f.sp *phaseoli* ได้ กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยเอนไซม์ทั้งสองอธิบายได้ว่า เนื่องจากเชื้อราส่วนใหญ่จะมีไคติน และ β-1,3-glucan เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ (Bartnicki-Garcia 1969) ดังตารางที่ 1 เมื่อถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคติเนส และ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เชื้อราจึงไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ดังนั้นการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ทั้งสองจึงมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อต่อต้าน (defense reaction) ในพืช Kollar และคณะ (1995) นำเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิเคราะห์ชนิดของ น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเชื่อมระหว่างไคตินกับเบต้า-1,3-กลูแคน ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยการใช้ย่อยส่วนที่เป็นไคตินและเบต้า-กลูแคนออกจากกัน

ตารางที่ 1 พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Bartnicki-Garcia 1969)

พอลิแซ็กคาไรด์	มอนอเมอร์	พันธะและโครงสร้าง
chitin	*N*-acetylglucosamine	β-1,4-long,unbranched polymer
chitosan	D-glucosamine	β-1,4-
cellulose	D-glucose	β-1,4-
β-glucan	D-glucose	β-1,3-linked backbone with β-1,6-linkages at branch points
α-glucan	D-glucose	α-1,3-and α-1,4-
mannan	D-mannose	α-1,6-linked backbone with frequent α-1,2-and α-1,3-linked branches of one to five residues each

องค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราส่วนใหญ่ จะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นประกอบประมาณ 80-90% มีพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดที่พบในเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ ดังตารางที่ 1 จะมีความแตกต่างกันในด้านปริมาณและการรวมตัวกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบตัว

อื่น ๆ จึงทำให้เชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีความเป็นเอกลักษณ์ (unique) จากการที่เชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนก เชื้อราออกเป็นกลุ่ม ๆได้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรากลุ่มต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Bartnicki-Garcia 1969)

พอลิแซ็กคาไรด์	กลุ่มของเชื้อรา	ตัวอย่างของเชื้อรา
Cellulose-glycogen	Acrasiomycetes	*Polysphondylium, Dictyostelium*
Cellulose-β-glucan	Oomycetes[a]	*Phytophthora,Pythium, Saprolegnia*
Cellulose-chitin	Hyphochytridiomycetes	*Rhizodiomyces*
Chitin-chitosan	Zygomycetes	*Mucor, Phycomyces,Zygorhynchus*
Chitin-β-glucan	Chytridiomycetes	*Allomyces, Blastocladiella Neurospora*
	Ascomycetes and	*Ajellomyces*
	Deuteromycetes	*Aspergillus*
	Basidiomycetes	*Shizophyllum, Fomes, Polyporus*
Mannan-β-glucan	Ascomycetes	*Saccharomyces*[b], *Candida*
Chitin-mannan	Basidiomycetes	*Sporobolomyces*[b], *Rhodotorula*
Galactosamine	Trichomycetes	*Amoebidium*
Galactose polymers		

[a] อาจจะพบ ไคติน เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยในผนังเซลล์ของ Oomycetes genus *Apodachyla* จากรายงานของ Lin และคณะ (1976)

[b] Hartwell (1974) พบว่า primary wall bud ของ *Saccharomyces cerevisiae* มี ไคติน เป็นองค์ประกอบด้วย

ตัวอย่าง การศึกษาชนิดและปริมาณของ พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา ชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 พอลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา คิดต่อน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ (Bartnicki-Garcia 1969)

พอลิแซ็กคาไรด์	*Allomyces* (Mastigo-)	*Phytophthora* (Mastigo-)	*Mucor* (Zygo-)	*Neurospora* (Asco-)	*Saccharomyces* (Asco-)	*Schizophillum* (Basidio-)
ไคติน	58	trace	9	11	1	5
เซลลูโลส	0	20	0	0	0	0
กลูแคน	16	68	0	89	29	81
อื่น ๆ						
แมนแนน	-	1	2	0	31	0
ไคโตแซน	-	-	33	0	-	-

1.7 PR โปรตีน ในพืช

PR โปรตีน (pathogenesis-related proteins) เริ่มแรกนั้นหมายถึง แอซิดิกโปรตีนที่อยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นโดย tabacco mosaic virus (TMV) แต่ต่อมาพบ PR โปรตีนในพืชหลายชนิดด้วยกันทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocot) และพืชใบเลี้ยงคู่ (dicot) และถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นได้เมื่อเกิดการติดเชื้อ (infection), การเกิดบาดแผล (wounding), เกิดภาวะกดดันจากสารเคมีและสิ่งแวดล้อม (David 1993) PR โปรตีน จัดเป็นกลุ่มหนึ่งของโปรตีนในพืช ที่เรียกว่า defense-related proteins ซึ่งถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยาตอบสนอง (defense reaction) และสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน ขึ้นอยู่กับบทบาท (Bowles 1990) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติโดยตรงของ extracellular matrix และ การตอบสนองของพืชต่อการบุกรุกของเชื้อโรค โดยการสร้างความแข็งแรง, การ

ซ่อมแซมหรือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผนังเซลล์ เพื่อต่อต้านการบุกรุกดังกล่าว ตัวอย่างของโปรตีนในกลุ่มนี้ได้แก่ กลุ่มของโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) เช่น hydroxyproline-rich glycoproteins และ glycine-rich proteins และ กลุ่มของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและ/หรือการปรับปรุงเปลี่ยนแปลง สารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น suberin, lignin, wall-bound phenolics และ callose

กลุ่มที่ 2 เป็นโปรตีน ที่มีหน้าที่โดยตรงเป็นตัวยับยั้ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ (antimicrobial activities) หรือ เร่งการสังเคราะห์ สารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค ตัวอย่างของโปรตีนกลุ่มนี้ได้แก่ กลุ่มของเอนไซม์ที่เป็นตัวยับยั้ง (inhibitors) เช่น amylase(s) และ proteinase inhibitors ที่เป็น toxic proteins เช่น lectins และ thionin และที่เป็น hydrolases เช่น เอนไซม์ไคติเนส, เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ proteinase นอกจากนี้ก็มีกลุ่มของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พวก oxidized phenolics, tannins, *o*-quinones และ สารโมเลกุลเล็กที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค คือ phytoalexins

กลุ่มที่ 3 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ defense response ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน โปรตีนที่สำคัญคือ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ เอนไซม์ไคติเนส หรือเรียกว่า PR โปรตีน ตัวอย่างการศึกษา การตอบสนองเพื่อต่อต้านการรุกราน ในพืช แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงตัวอย่างการศึกษาการสร้าง PR โปรตีนเพื่อต่อต้านการรุกรานในพืช

พืชที่ศึกษา	เชื้อ/สารเคมี	ผลการศึกษา	อ้างอิง
1. ต้นยาสูบ (burley Ky 14	sporangispores ของ blue mold (*Peronospore tabacina*)/ /auxin+cytokinin	เพิ่มการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส, เอนไซม์ไคติเนส (b-proteins)	(1)
2. เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง ของ *Nicotiana tabacum* L.cv. Havana		ลดและเพิ่มการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส	(2)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืชที่ศึกษา	เชื้อ/สารเคมี	ผลการศึกษา	อ้างอิง
3. ต้นยาสูบ (*Nicotina tabacum*)	*Pseudomonas syringae* infection / salicylic acid	เกิดการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 3 ไอโซไซม์	(3)
4. เซลล์เพาะเลี้ยงผักชีฝรั่ง (cultured parsley cells) (*Petroselinum crispum*)	heat-released soluble cell-wall fragments (elicitors) จาก pathogenic fungi ที่ form เป็น coumarin derivatives (phytoalexins)/	เพิ่มการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์อื่น ๆ เช่น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ phenylpropanoid metabolism	(4)
5. ฝักถั่ว	*Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*/	มี เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูง สามารถทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 15 ชนิดจากทั้งหมด 18 ชนิด เช่น *F. solani* f.sp. *phaseoli* และ *F. solani* f.sp. *pis*	(5)
6. bean seedlings	*Uromyces phaseoli*/	เพิ่มการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma viride* ได้	(6)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืชที่ศึกษา	เชื้อ/สารเคมี	ผลการศึกษา	อ้างอิง
7. suspension cultures of soybean (*Gylcine max*) cultivar Harosoy	fungal elicitor จาก *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycine max* (60 µg / glutathione(1mM), H_2O_2(1mM)glucose equivalents/ml)	มีการสร้าง cross-linking of cell-wall structural proteins 2 ชนิดคือ p33 และ p100 เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์	(7)
8. ใบถั่ว	/ฮอร์โมนเอทิลีน	เกิดการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มมากขึ้นในแวคิวโอลของ ethylene-treated leaf cells และมักมีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสขึ้นเล็กน้อยใน cell wall	(8)
9. transformed (hairy) root cultures จาก *Trichoderma kirilowii* Maxim.var.*japonicum* Kitam.(Cucurbitaceae) และอีก 4 สายพันธุ์	*Agrobacterium rhizogenes* American type culture collection strain 15834/	สร้างเอนไซม์ไคติเนส(EC 3.2.1.14) และ ribosome-inactivating protein trichosanthin (TCN)	(9)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืชที่ศึกษา	เชื้อ/สารเคมี	ผลการศึกษา	อ้างอิง
10. pea (*Pisum sativam* L.cv. Dot) pods	*Fusarium solani*/การเกิดบาดแผล/ chitosan,ethylene	มีการสร้างเอนไซม์ไคติเนส2ไอโซไซม์คือ ch1 (M.W. 33.1Kd)และch2 (M.W. 36.2 Kd) กลูคาเนส2ไอโซไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสคือ GI (M.W. 33.5)และGII (M.W.34.3 Kd) โดยที่เอนไซม์ไคติเนสทั้ง2ไอโซไซม์ถูกสร้างขึ้นมาเนื่องจากถูกกระตุ้นด้วยภาวะกดดัน(stress)ต่าง ๆ ส่วนเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส2ไอโซไซม์ถูกชักนำให้สร้างขึ้นเนื่องจากการบุกรุกโดยเชื้อโรค	(5)

อ้างอิง 1) Tuzan และคณะ (1989)
2) Felix และ Meins (1986)
3) Bulcke และคณะ (1989)
4) Kombrink และ Hahlbrock (1986)
5) Mauch และคณะ (1988)
6) Schlumbaum และคณะ (1986)
7) Brisson และคณะ (1994)
8) Mauch และ Staehelin (1989)
9) Savary และ Flores (1994)

1.8 โรคยางพาราที่เกิดจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ

โรคของยางพารา เท่าที่ปรากฏมีอยู่มากมาย ซึ่งพบเกิดขึ้นที่ทุกส่วนของต้นยาง โรคยางพารา สามารถแบ่งออกเป็นหมวดหมู่ตามส่วนต่าง ๆ ของต้นยาง ที่แสดงอาการผิดปกติ ดังนี้ คือ โรคใบและฝัก, โรคกิ่งก้านและลำต้น และโรครา โดยเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคที่สำคัญหลายชนิดในยาง คือ เชื้อรา ชนิดต่าง ๆ (พงษ์เทพ ขจรไชยกุล 2533)

1.8.1 โรคที่เกิดกับใบและฝัก

1.8.1.1 โรคใบที่เกิดจากเชื้อคอลเลโทตริกัม

เชื้อราสาเหตุ

เป็นเชื้อราใน Class Deuteromycetes (Fungi Imperfecti or Imperfect fungi) Order Melanconiales Family Melanconiaceae Genus *Colletotrichum* เชื้อราสกุลคอลเลโทตริกัม (*Colltotrichum*) มีอยู่หลายชนิด แต่เท่าที่มีรายงานไว้ว่าทำลายใบยาง คือ *Colletotricum gloeosporioides* (ชื่อเดิม: *Gloeosporium alborubrum*) และ *C.hevea* ซึ่งชนิดหลังพบเป็นสาเหตุที่ทำให้ใบยางแสดงอาการเป็นจุดและใบแห้งหรือที่เรียกว่า โรคแอนแทรคโนส (anthracnose)

ลักษณะอาการ

ใบใน 1 ถึง 2 ฉัตรบนสุด จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ยอดอ่อนตายในระยะต่อมา ต้นยางอาจแตกข้างเจริญจนถึง 1 ถึง 2 ฉัตร ก็เกิดลักษณะอาการตายยอดซ้ำขึ้นอีก

การแพร่ระบาด

เชื้อจะสร้างสปอร์สีดำมองเห็นด้วยตาเปล่า แล้วแพร่ระบาดไปได้โดยลม, คน, สัตว์และน้ำเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศเปียกมีความชื้นสูง

การป้องกัน

โรคนี้พบมากในต้นยางที่ปลูกในดินความอุดมสมบูรณ์ต่ำ วิธีป้องกันโดยปรับปรุงดินให้มีความอุดมสมบูรณ์สูงขึ้นช่วยลดการเกิดโรคได้

1.8.1.2. โรคใบร่วงและฝักเน่าเกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา

เชื้อราสาเหตุ

เป็นเชื้อสกุล *Phytophthora* สองชนิดคือ *P. palmivora* และ *P. botryosa* เชื้อราทั้งสองชนิดนี้จัดอยู่ใน Class Peronosporales Family Pythiaceae Genus *Phytophthora* สร้างสปอร์เรียกว่า zoospore หรือ sporangiospore ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยมีโครงสร้างพิเศษคล้ายหางช่วยในการเคลื่อนที่ (flagellum)

ลักษณะอาการ

ฝักที่ถูกทำลายจะเน่าดำ ค้างอยู่บนต้นไม่แตกและร่วงหล่นตามธรรมชาติ ส่วนลักษณะอาการของโรคใบร่วงใบยางจะร่วงทั้งที่มีสีเขียว ลักษณะที่เด่นชัดคือมีรอยช้ำสีดำอยู่บริเวณก้านใบและที่ตรงกลางรอยช้ำนี้มีหยดน้ำยางเกาะติดอยู่ด้วย ถ้านำใบยางที่ร่วงมาสะบัดเบา ๆ ใบย่อยจะหลุดทันทีต่างกับใบยางที่ร่วงตามธรรมชาติ โรคใบร่วงนี้มีความสัมพันธ์กับโรคหน้ากรีดที่เรียกว่า โรคเส้นดำ

การแพร่ระบาด

การเปิดรอยแผลบนต้นยางเป็นช่องทางให้เชื้อเข้าไปทำลายได้ เชื้อ *P. palmivora* ชอบอากาศเปียกมีความชื้นสูง มีลมพัดอ่อนๆ และจะงอกได้ดีต้องมีน้ำอยู่ด้วยเสมอ

การป้องกัน

ปลูกยางพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคนี้, ปรับปรุงดินให้มี ความอุดมสมบูรณ์ หรือ ฉีดพ่นด้วยยา

1.8.3 โรคกิ่งก้านและลำต้น

1.8.3.1 โรคเส้นดำ (black stripe)

เป็นโรคที่ทำให้หน้ากรีดยางเสียหาย ผลผลิตน้ำยางลดลง บางครั้งอาจทำให้กรีดเอาน้ำยางไม่ได้อีกต่อไป

เชื้อราสาเหตุ

เชื้อราสกุล *Phytophthora* สองชนิดคือ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบร่วงและฝักเน่าด้วย โดยที่เชื้อราบนฝักและใบเป็นแหล่งเชื้อที่น้ำฝนชะล้างและพัดพาลงมาที่หน้ากรีดยางด้วย เชื้อราสามารถเข้าทำลายเปลือกยางที่มีบาดแผลซึ่งเกิดจากการกรีดยาง, รอยเข็มแทง, เฉือนด้วยมีด หรือรอยแผลที่เกิดจากการ

เผาด้วยเปลวไฟ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราเพียงเล็กน้อยคือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ยางที่อ่อนแอต่อโรค จะเกิดได้อย่างรวดเร็วไม่ว่าสภาพอากาศภายนอกขณะปลูกเชื้อจะเหมาะสมต่อการเกิดโรคหรือไม่

การแพร่ระบาด

เช่นเดียวกับโรคใบร่วงและฝักเน่าจากเชื้อไฟทอปโทรา

การป้องกัน

หยุดกรีดในขณะที่มีสภาพอากาศเปียก มีความชื้นสูง

1.8.3.2. โรคราสีชมพู

เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราบนคาคบและกิ่งของต้นยาง โดยในระยะเริ่มเชื้อจะเกาะบริเวณเปลือกนอกแล้วจึงเจาะเข้าทำลายภายในเนื้อไม้

เชื้อราสาเหตุ

เกิดจากเชื้อรา *Corticium samonicolor*

ลักษณะอาการ

ลักษณะที่เห็นมีสีชมพูบริเวณเปลือกนอก แสดงว่าเชื้อรากำลังเจริญเติบโตทำลายต้นยางอยู่ อาการของต้นยางในระยะต่อมาคือ

- ใบเหี่ยวตายแล้วกลายเป็นสีน้ำตาลในยางต้นอ่อน
- เปลือกแตกมีน้ำยางไหลในต้นยางแก่
- หากส่วนยอดถูกทำลายแล้วตาข้างจะเริ่มแตกออก
- เปลือกแตกหลุดออกจากเนื้อไม้

การแพร่ระบาด

เชื้อนี้แพร่ระบาดโดยลม

การป้องกัน

การป้องกันโรคนี้ทำได้ในต้นยางอ่อน ด้วยการใช้ยาหรือกำจัดส่วนที่เป็นโรคทิ้ง สำหรับต้นยางแก่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงจึงไม่นิยมทำกัน

1.8.3.3. โรครากขาว (white root-disease)

เชื้อราสาเหตุ

เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus lignosus*

ลักษณะอาการ

โรครากขาวเมื่อปรากฏออกอาการที่ใบยางแล้วรักษาให้หายได้ยาก ใบจะร่วงหมดทั้งต้น รากจะถูกทำลายไปจนหมด ต้นยางจะตายในที่สุด

การแพร่ระบาด

เกิดจากเส้นใยของเชื้อราจากรากที่เป็นโรคไปสู่รากของต้นไม้อื่น ๆ อีกต้นหนึ่ง

การป้องกัน

ขุดทำลายแหล่งเชื้อเป็นวิธีที่ดีที่สุด

วัตถุประสงค์

1. ทำบริสุทธิ์ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากน้ำยางสดของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 โดยอาศัยเทคนิคทางชีวเคมี

2. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว

3. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยใช้สารตัวอย่างบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่ม ซึ่งเตรียมจากน้ำยางของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่บริสุทธิ์แล้ว

4. ศึกษาคุณสมบัติทางอิมมูนวิทยาของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่บริสุทธิ์แล้ว

5. เปรียบเทียบรูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และโปรตีนอื่น ๆ ในบี-ซีรั่ม, ซี-ซีรั่ม และสารสกัดจากใบยางอ่อนของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 โดยวิธี Western blot

6. เปรียบเทียบค่าความว่องไวและ รูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากส่วนผสมของบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่ม ของน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 หลังการเกิดบาดแผล

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
acrylamide	71.1	Merck
agarose		Sigma
ammonium hydroxide NH_4OH	35.05	Merck
ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	132.14	Carlo Erba
ammonium per sulfate $(NH_4)_2S_2O_8$	228.7	Merck
Anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate		Sigma
Bovine serum albumin (BSA)	67,000	Pharmacia
calcium chloride $CaCl_3$	147.02	Merck
cellotetraose $C_{24}H_{42}O_{21}$	666.6	Sigma
cellotriose $C_{18}H_{32}O_{16}$	504.4	Sigma
Con A agarose gel		Sigma
Coomassie brilliant blue R 250		Sigma
Coomassie brilliant blue G 250		Sigma
CM-cellulose		Whatman

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
3,3'-diaminobenzidine (DAB)		Sigma
3,5 dinitrosalicylic acid $(NO_2)_2C_6H_2(OH)$-COOH.H_2O		BDH
diphenylamine/aniline/phosphoric acid		Sigma
di potassium hydrogen orthophosphate anhydrous K_2HPO_4	174.18	Merck
ethyl acetate $C_4H_8O_2$	88.11	Riedel-de Haen
formaldehyde CH_2O	30.03	BDH
glycine $C_2H_5NO_2$	75.07	Merck
hydrogenperoxide H_2O_2	34.0	Fluka
laminarin (*Laminaria digitata*)		Sigma
laminaribiose	342.3	Sigma
Lima bean agar		Difco
2-mercaptoethanol	78.13	Merck
methyl-α-D-mannopyranoside $C_7H_{14}O_6$	194.2	Sigma
manganese chloride $MnCl_2$	197.91	Merck
magnesium chloride $MgCl_2$	203.31	Merck
N-N methylene bis acrylamide	154.2	Merck
N,N-N′,N′,-tetramethylene diamine (TEMED)	116.2	Sigma
phenol C_6H_5OH	94.11	Merck
phosphorylase b	94,000	Sigma
potassium sodium tartrate	282.23	M&B
potato dextrose agar		Difco
silver nitrate $AgNO_3$	169.87	Fluka

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
sodium acetate $CH_3COONa.3H_2O$	136.08	Carlo Erba
sodium dodecyl sulfate	288.4	Merck
Tris (hydroxymethylaminomethane)	121.14	Fluka
Tween-20		Fluka

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. คอลัมน์แก้ว ขนาด 2.5X10 , 2.5X25 cm
2. แผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร
3. เครื่องเจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6 มิลลิเมตร
4. ตู้ปลอดเชื้อ
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องถ่ายโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า Hoefer Scientific Instruments made in USA
7. Kieselgel 60 thin-layer plates ขนาด20X20 ซม. Merck made in Germany
8. เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ micro CENTRIFUGETTE 4241 ALC made in Italy
9. เครื่องกรอง Millipore Corporation made in U.S.A
10. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ Autoclave SS-320 Tomy made in Japan
11. เครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 Beckman made in U.S.A
12. เครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน (Fraction collector) model 2110 Biorad made in U.S.A
13. Microtube pump MP-3 EYELA made in Japan
14. UV-VIS recording spectrophotometer model UV 160 A Shimadzu made in Japan
15. Electrophoresis unit ATTO Corporation made in Japan

วิธีการ

2.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

2.1.1 การเตรียมบี-ซีรั่มจากน้ำยางพารา

2.1.1.1 การเก็บน้ำยางสด

เก็บน้ำยางสดที่กรีดจากต้นยางที่ศูนย์วิจัยการยางคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา จำนวน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 พันธุ์ละประมาณ 1 ลิตร นำมากรองด้วยผ้าก๊อซเพื่อเอาเศษสิ่งสกปรกออกแล้วบรรจุลงในขวดขนาด 250 มล

2.1.1.2 การปั่นแยกน้ำยางสด

นำน้ำยางสดในขวดบรรจุขนาด 250 มล.วางลงใน โรเตอร์ JA-14 เครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 แล้วหมุนเหวี่ยงน้ำยางด้วยอัตราเร็วต่อการหมุนเหวี่ยง 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา45นาที น้ำยางสดแต่ละหลอดถูกแยกออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนบนสุดเป็นเนื้อยาง (rubber) ส่วนที่สองถัดลงไปเป็นสารละลายขาวขุ่นซึ่งประกอบด้วยน้ำยางบางส่วนและสารละลายซี-ซีรั่ม (C-serum) ส่วนล่างสุดเป็นตะกอนชั้นก้นหลอด (bottom fraction) ซึ่งเป็นส่วนที่นำไปเตรียมเป็น บี-ซีรั่ม ต่อไป

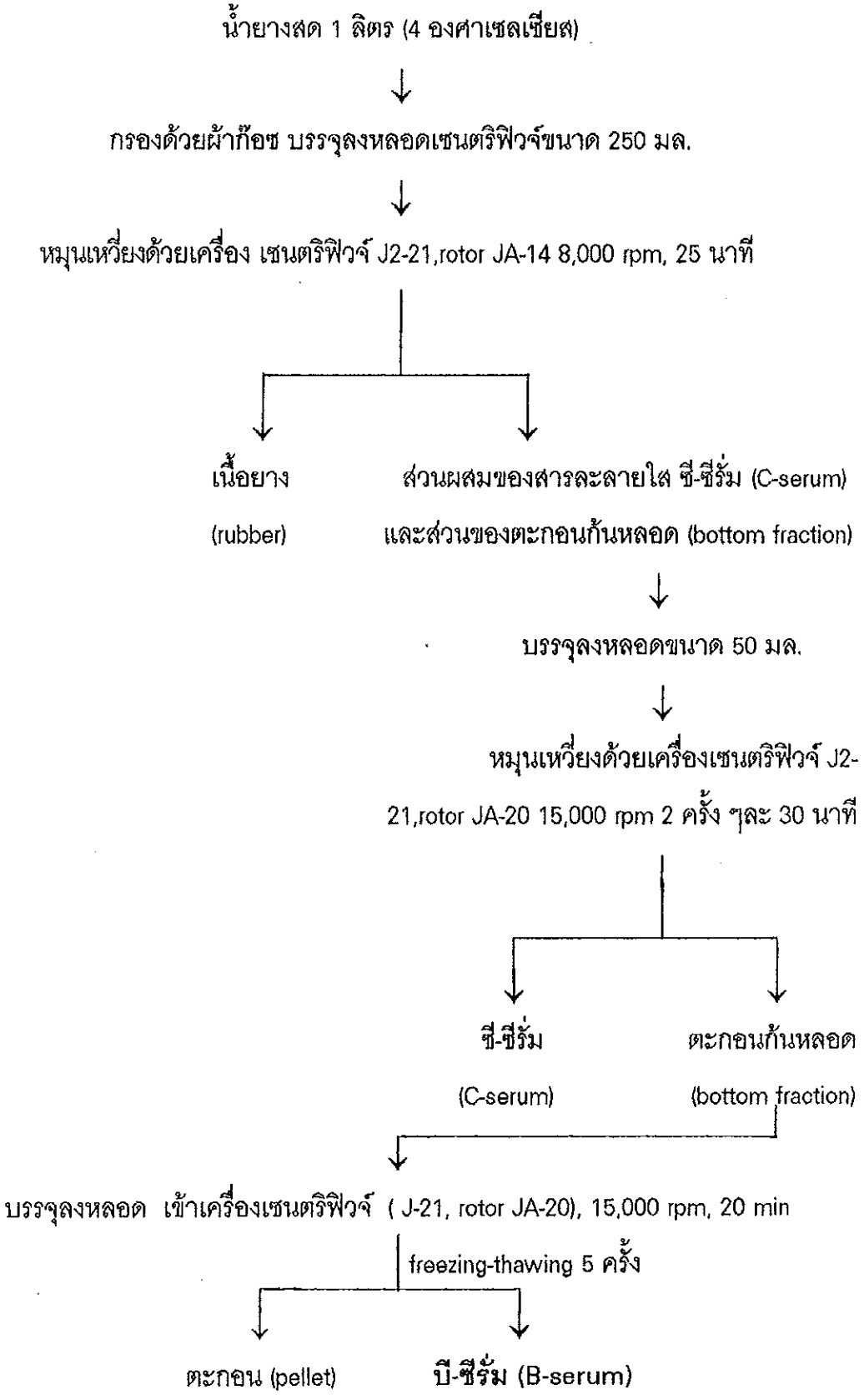
2.1.1.3 การเก็บสารตัวอย่าง (ตะกอนก้นหลอด)

แยกเอาส่วนของเนื้อยาง (rubber) ออกก่อนจากนั้นนำส่วนผสมของซี-ซีรั่มและตะกอนก้นหลอดบรรจุลงในหลอดขนาด 60 มล. วางลงใน โรเตอร์ JA-20 เครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 15,000 rpm 2 ครั้ง ๆละ 30 นาที เพื่อแยกเอาส่วนของตะกอนโปรตีน ใส่ภาชนะสำหรับแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.1.1.4 การแช่แข็งสลับกับการละลาย (freezing-thawing)

นำตะกอนก้นหลอดซึ่งแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด นำกลับไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิเดิมอีกทำสลับกัน 5 ครั้ง จะได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อนปนกับตะกอน นำไปหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 ใช้ โรเตอร์ JA 20 และอัตราเร็วหมุนเหวี่ยง 15,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จะได้สารละลายใสเรียกว่าบี-ซีรั่ม

2.1.1.5. แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมบี-ซีรั่ม



2.1.2 การเตรียมสารสกัดจากใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ GT1

นำใบยางอ่อน ใบยางแก่ จากต้นยาง 2 พันธุ์ ล้างให้สะอาดตัดเอาเส้นกลางใบออกอย่างละ 20 กรัม หั่นใบให้เป็นฝอยแล้วเติมไนโตรเจนเหลวพอท่วมใบตำให้ละเอียดพอสมควร เติมบัฟเฟอร์ 0.1 M โซเดียมอะซีเตต pH 5.0 จำนวน 20 มล. ตำให้ละเอียดอีกครั้งคั้นเอาเฉพาะน้ำ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 โรเตอร์ JA-20 อัตราเร็วในการหมุนเหวี่ยงเท่ากับ 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสเพื่อทำ Western blot ต่อไป

2.2 การตรวจสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

2.2.1 การเตรียมสารเคมี

2.2.1.1 บัฟเฟอร์

ชั่งโซเดียมอะซีเตต จำนวน 3.40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 150 มล. คนให้เข้ากันแล้วนำไปปรับ pH เป็น 5.0 โดยใช้ acetic acid เข้มข้น เติมน้ำกลั่นเพิ่มให้ครบ 250 มล. จะได้โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M pH 5.0 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.1.2 สารสับสเตรต

ชั่งลามินาริน จำนวน 0.05 กรัมละลายใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 จำนวน 25 มล. จะได้สารสับสเตรตที่มีความเข้มข้น 2 มก./มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.1.3 สารละลาย DNS

ชั่ง DNS จำนวน 5 กรัม ละลายใน 2.0 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 มล. ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายโซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต จำนวน 150 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 250 มล. ลงไปในขณะที่ยังร้อนอยู่คนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำให้ครบ 500 มล.เก็บในขวดสีชาตั้งไว้ที่อุณภูมิห้อง

2.2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ใช้น้ำตาลกลูโคส จำนวน 1.94 กรัม ละลายใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 จำนวน 100 มล. จะได้ สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.1 M หลังจากนั้น

นำมาทำให้เจือจางด้วยบัฟเฟอร์จะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเป็น 0.1, 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 ไมโครโมล นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตรเท่ากันทุกหลอด ไปเติมสารละลาย DNS จำนวน 0.2 มล. และ 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ จำนวน 0.2 มล. แล้วนำลงต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที วางไว้ให้เย็น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นหลอดละ 0.9 มล. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.2.3 วิธีตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ดัดแปลงจากวิธีของ Burner (1964)

ใช้สารตัวอย่างจำนวน 10 ไมโครลิตรผสมกับสับสเตรตลามินารินความเข้มข้น 2.0 มก./มล. จำนวน 90 ไมโครลิตรในหลอดทดสอบ เขย่าให้เข้ากันนำลงแช่และเขย่าเบา ๆ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย DNS จำนวน 0.2 มล. และบัฟเฟอร์จำนวน 0.2 มล. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น จำนวน 0.9 มล. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เป็นหน่วยยูนิต (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส กำหนดให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ 1 ยูนิต เท่ากับหนึ่งไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคสที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายลามินารินได้ในเวลา 1 นาที

2.2.4. แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม

2 มก./มล. ลามินาริน 90 ไมโครลิตร + เอนไซม์ 10 ไมโครลิตร
ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตต pH 5.0

↓

แช่และเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

↓

ต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที

↓

เติมสารละลาย DNS 0.2 มล.+ บัฟเฟอร์ 0.2 มล.

(ต่อจากหน้า 34)

↓

ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที

↓

เติมน้ำกลั่น 0.9 มล.

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976)

2.3.1 การเตรียมสารเคมี

2.3.1.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Bradford สารเคมีที่ใช้ (Bradford reagent) มีดังนี้

ชั่ง Coomassie brilliant blue G-250 100 มก. ละลายใน 95% ethanol 50 มล. เติม 85% phosphoric acid 100 มล. คนให้เข้ากันเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร แล้วกรองจะได้ สารละลายที่มีความเข้มข้นเป็น 0.01 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 4.7% (w/v) ethanol และ 8.5% (w/v) phosphoric acid

2.3.1.2. การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) 0.5 มก.ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 มล. จะได้โปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 0.5 มก./มล. นำมาเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่น ให้ได้สารละลายที่มีความเข้นข้นของ BSA เป็น 5, 10, 15, 20, 25 ไมโครกรัม ตามลำดับ

2.3.2. วิธีการหาปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA แต่ละความเข้มข้น จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ 5 หลอด และสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ Bradford reagent 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของสารตัวอย่าง นำไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA

2.4 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

2.4.1 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose

2.4.1.1 การเตรียม CM-cellulose

ใช้ CM-cellulose จำนวน 20 กรัมแช่ใน 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 500 มล. คนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเทสารละลายส่วนบนออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจน CM-cellulose มีค่า pH เป็นกลาง จากนั้นเติม 0.5 M กรดไฮโดรคลอริก จำนวน 500 มล. คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทเอาส่วนกรดออกล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่า pH เป็นกลาง จากนั้นเติม 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 บรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.5x25 cm. (ปริมาตร 60 มล.) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.1.2 หลังจากปรับสภาพสมดุล (equilibrate) ของ CM-cellulose ในบัฟเฟอร์ดังกล่าวให้มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งคอลัมน์แล้ว ใช้ บี-ซีรั่ม จำนวน 20 มล. ซึ่งตรวจสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (total activity) และหาค่าปริมาณโปรตีนแล้วค่อย ๆเติมลงในคอลัมน์ ปรับอัตราเร็วในการไหลของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มผ่านคอลัมน์ (flow rate) ประมาณ 12 มล./ชั่วโมง และเก็บสารตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน (fraction collector) หลอดละ 3 มล. จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมด้วยอัตราเร็วเท่าเดิมเพื่อแยกเอาโปรตีนส่วนที่ไม่แลกเปลี่ยนประจุกับคอลัมน์ (unbound CM) ออกจนหมด โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโมเมตร แล้วใช้ 0.4-1.4 M โซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน โดยค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้น (gradient) ของสารละลายเกลือสำหรับชะเอาโปรตีนที่แลกเปลี่ยนประจุกับคอลัมน์ (bound CM) นำโปรตีนแต่ละหลอดมาตรวจสอบค่าความว่องไวเอนไซม์ แล้วนำไปเตรียมให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose

2.4.2 โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose

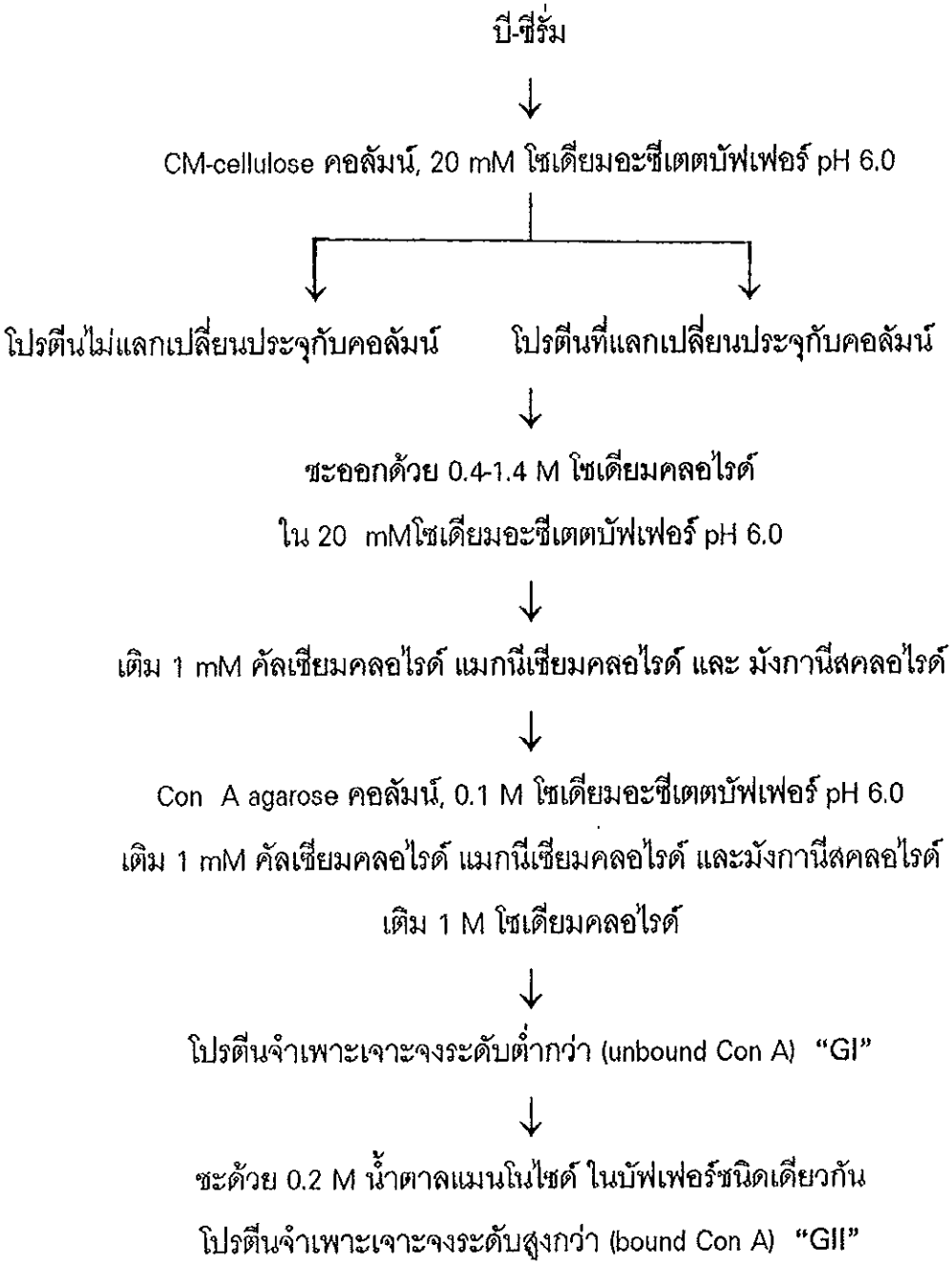
2.4.2.1 การเตรียม Con A agarose

ใช้ Con A agarose จำนวน 15 มล. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M โซเดียมอะซีเตต pH 6.0 ซึ่งเติม 1.0 M โซเดียมคลอไรด์ และเติมแมกเนเซียมคลอไรด์ มังกานีสคลอไรด์ คัลเซียมคลอไรด์ อย่างละ 1.0 mM บรรจุลงคอลัมน์ขนาด 2.5x10 cm. (ปริมาตร 15

มล.) ปรับสภาพให้สมดุล (equilibrate) ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2.2 นำสารตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ CM-cellulose (bound CM) มาเติมอย่างละ 1 mM ของแมกเนเซียมคลอไรด์ มังกานีสคลอไรด์ และคัลเซียมคลอไรด์ ทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย Con A agarose โดยใช้อัตราเร็วในการไหลของสารตัวอย่างผ่าน คอลัมน์ (flow rate) เท่ากับ 6 มล./ชั่วโมง เก็บสารตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน หลอดละ 4 มล. โปรตีนที่ไม่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับคอลัมน์จะหลุดออกเรียกว่า unbound Con A เป็น peak แรก ตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของแต่ละหลอด ล้างคอลัมน์ต่อด้วยบัฟเฟอร์เดิมประมาณ 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ โปรตีนที่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ในระดับต่ำกว่า จะถูกบัฟเฟอร์ชะออกมาเป็น unbound Con A (peak ที่สอง) เก็บสารตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน เก็บหลอดละ 2 มล. หลังจากนั้นใช้สารละลาย 0.2 M ของน้ำตาลแมนโน่ไซด์ (α-D-methylmannoside) ชะโปรตีนที่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ในระดับที่สูงกว่าออกมาเป็น bound Con A (peak ที่สาม) เก็บสารตัวอย่างที่ได้ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนหลอดละ 1 มล. หาค่าความว่องไวเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนสแต่ละหลอดของ ทั้ง peak ที่สองและสาม ซึ่งเป็นค่าความว่องไวเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่1(GI) และไอโซไซม์ที่2(GII) ตามลำดับ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ทั้ง 2 ชนิด เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสต่อไป

2.4.2.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากบี-ซีรั่ม



2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอริซิสแบบ SDS-PAGE

2.5.1 การเตรียมเจล ตามวิธีของ Laemmli (1970)

2.5.1.1 เตรียม separating gel 30 % acrylamide solution

ชั่ง acrylamide จำนวน 30 กรัม และ bis acrylamide จำนวน 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มล. คนให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรอง WHATMAN เบอร์ 1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.1.2 เตรียมบัฟเฟอร์ 1.5 M Tris-HCl pH 8.9

ชั่ง Tris จำนวน 18.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 8.9 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นและปรับปริมาตรเป็น 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.1.3 เตรียมบัฟเฟอร์ 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

ชั่ง Tris 6.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับ pH 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.1.4 เตรียม 10 % SDS

ชั่ง SDS (sodium dodecyl sulfate) จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น100 มล. เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5.1.5 เตรียม 1 % ของแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต จำนวน 0.1 กรัมละลายน้ำกลั่น 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.1.6 เตรียมอิเลคโตรฟอริซิสหรืออิเลคโตรดบัฟเฟอร์สำหรับ SDS-PAGE

ชั่ง Tris จำนวน 3.03 กรัมรวมกับ glycine จำนวน 14.4 กรัม และ SDS จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร

2.5.1.7 เตรียมบัฟเฟอร์สารตัวอย่าง (sample buffer)

ชั่ง Tris 1.42 กรัม SDS 4 กรัม glycerol 20 มล β-mercaptoethanol 10 มล. นำสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 70 มล. ปรับ pH 6.8 โดยใช้ HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.2 การเตรียมสีย้อมโปรตีน สารละลายขจัดสีส่วนเกิน และสารละลายเก็บเจล

2.5.2.1 เตรียมสีย้อมโปรตีน (staining solution)

ชั่งสีย้อม Coomassie brilliant blue R 250 จำนวน 2.5 กรัม ละลายใน acetic acid เข้มข้น 20 มล.และน้ำกลั่น 500 มล. คนให้เข้ากันเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง WHATMAN เบอร์ 1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2.5.2.2 เตรียมสารละลายขจัดสีส่วนเกิน (destaining solution)

ใช้ methanol จำนวน 400 มล. รวมกับ กรดอะซีติกเข้มข้น 70 มล. ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเป็น 40% methanol และ 7% acetic acid เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5.2.3 เตรียมสารละลายเก็บเจล (fixative solution)

ใช้ methanol จำนวน 100 มล. รวมกับ กรดอะซีติกเข้มข้น จำนวน 70 มล.ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเป็น 10% methanol และ 7% acetic acid เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของเจล ดัดแปลงจาก Laemmli (1970)

ส่วนประกอบของเจล	separating gel		stacking gel
	7%	15%	3%
30% acrylamide (ml)	0.7	1.5	0.3
1.5M.Tris-HCl pH8.9 (ml)	0.75	0.75	-
0.5M.Tris-HCl pH6.8 (ml)	-	-	0.75
10% SDS (μl)	60	60	60
1%ammoniumpersulfate (μl)	75	75	120
D.W. (ml)	1.44	0.64	1.77
TEMED (μl)	5	5	5
Total volume (ml)	3	3	3

2.5.3 การย้อมสีโปรตีนโดยใช้ ซิลเวอร์ ไนเตรต (Silver stain) ตามวิธีของ Wray และคณะ (1981)

2.5.3.1. แช่เจลใน 50% methanol เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปลี่ยนไปแช่ในน้ำ ซึ่งผ่านการกำจัดไอออนแล้ว นาน 10 นาที

2.5.3.2. แช่เจลใน 50% methanol 30 นาที ล้างด้วยน้ำ ซึ่งผ่านการกำจัดไอออนแล้ว 2 ครั้ง

2.5.3.3. เตรียมสารละลาย C สำหรับย้อมเจล ประกอบด้วยสาร 2 ชนิดผสมกัน คือ

สารละลาย A = ซิลเวอร์ ไนเตรต 0.8 กรัม ละลายในน้ำ ซึ่งผ่านการกำจัดไอออนแล้ว 4 มิลลิลิตร

สารละลาย B = 0.36% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 21 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.4 มิลลิลิตรของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

ค่อยๆ หยดสารละลาย A ลงในสารละลาย B คนให้เข้ากัน จากนั้นจึงเจือจางด้วยน้ำ ซึ่งผ่านการกำจัดไอออนแล้ว ให้ได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2.5.3.4. ย้อมเจลในสารละลาย C เป็นเวลา 15 นาที เขย่าเบา ๆ ตลอดเวลา

2.5.3.5. ล้างเจลด้วยน้ำ ซึ่งผ่านการกำจัดไอออนแล้ว พร้อมเขย่าอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 5-7 นาที

2.5.3.6. เตรียมสารละลาย D (developer) ซึ่งประกอบด้วย 2.5 มิลลิลิตร ของ 1% กรดซิตริกกับ 0.25 มิลลิลิตร ของ 38% ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) เติมน้ำ ซึ่งผ่านการกำจัดไอออนแล้ว ครบ 500 มิลลิลิตร

2.5.3.7. แช่เจลในสารละลาย D เขย่าเบา ๆ จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนเกิดขึ้น

2.5.3.8. ล้างเจลด้วยน้ำ ซึ่งผ่านการกำจัดไอออนแล้ว

2.5.3.9. เก็บเจลในสารละลาย ซึ่งประกอบด้วย 40% methanol 7% กรดอะซิติก หรือ 50% methanol

2.6 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา

2.6.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มอารักขาพืช ศูนย์วิจัยการยาง จังหวัดสงขลา ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา

เชื้อ	พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์	กลุ่มของเชื้อรา	โรคยางพารา
Corticium samonicolor	chitin-β-glucan	Basidiomycetes	โรคสีชมพู
Colletotrichum gloeosporioides	mannan-β-glucan	Ascomycetes	โรคตายยอด
Corynespora casiicola	chitin-β-glucan	Deuteromycetes	โรคใบจุด
Rigidoporus lignosus	chitin-β-glucan	Basidiomycetes	โรครากขาว
Curvularia spp.	mannan-β-glucan	Ascomycetes	โรคใบจุด
Phytophthora botryosa	β-glucan	Oomycetes	โรคใบร่วงและฝักเน่า
P. palmivora	β-glucan	Oomycetes	โรคใบร่วงและฝักเน่า

2.6.1.1. การเตรียมสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

2.6.1.1.1. การเตรียมบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่ม จากน้ำยาง 2 พันธุ์คือ พันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1

นำบี-ซีรั่มที่เตรียมได้จากส่วนของตะกอนก้นหลอด(bottom fraction) และส่วนของสารละลายใสที่เรียกว่า ซี-ซีรั่ม ทำให้ปราศจากเชื้อโดยผ่านแผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำสารตัวอย่างที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใน vial ที่ไร้เชื้อ

2.6.1.1.2. การเตรียมเอนไซม์เบต้า-1.3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) และไอโซไซม์ที่2(GII)

ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี 2 แบบคือ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และโครมาโตกราฟฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ ConA agarose นำเอนไซม์ที่เตรียมได้ทำให้ปราศจากเชื้อโดยผ่านแผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเอนไซม์ที่ได้ใน vial ไร้เชื้อ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.6.1.2. วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา (ดัดแปลงจากวิธีของ Mirelman และคณะ 1975)

2.6.1.2.1. การเตรียมวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar)

ชั่ง PDA 3.9 กรัม ละลายในน้ำจำนวน 100 มิลลิลิตร นำไปตั้งไฟคนให้ทั่วจนวุ้นละลาย จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เทวุ้นอาหาร PDA หลอมเหลวอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารไร้เชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ตั้งทิ้งให้วุ้นอาหาร PDA แข็งตัว ใช้ที่เจาะจุกคอร์กไร้เชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะวุ้นอาหาร PDA ให้เป็นแบบ 3 หลุมและ4 หลุม มีระยะห่างเท่าๆกัน ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เจาะหลุมแต่ละแบบ จำนวน 6 จานต่อการทดสอบเชื้อรา 1 ชนิด

2.6.1.2.2. การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่ได้เจาะหลุม บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อโตเกือบเต็มจานอาหาร ใช้ที่เจาะจุกคอร์กปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณรอบ ๆ โคโลนี แล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 เซนติเมตรที่เจาะหลุมไว้ทั้งแบบ 3 และ 4 หลุม แต่ละหลุมมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางและมีรัศมีเท่า ๆ กัน วางเชื้อที่จุดกึ่งกลางระหว่างหลุมที่เจาะไว้ บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.6.1.3. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายรา โดยใช้สารตัวอย่าง บี-ซีรั่ม, ซี-ซีรั่ม และเอนไซม์ GI และ GII ของน้ำยาง 2 พันธุ์คือ RRIM600 และGT1

ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเจาะหลุม 3 หลุม ที่เลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 1 คืน แล้วใช้สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากน้ำยางทั้งสองพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อใส่หลุมละ 40 ไมโครลิตร ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุม (control) ทำซ้ำ 6 จานสำหรับเชื้อแต่ละชนิด บ่มเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญ

ของสายราจะสังเกตได้จาก สายราจะไม่เจริญเข้าใกล้บริเวณเนื้อวุ้นที่มีการแพร่กระจายของสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม

2.6.1.4. เชื้อราที่ทดสอบแล้วว่าสามารถถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วย สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางทั้งสองพันธุ์ จะถูกนำมาทดสอบต่อโดยใช้สารตัวอย่างบี-ซีรั่มปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้นลดลงเป็น 2 เท่าตามลำดับ (two-folds dilution) ดังนี้ 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 และ 1024 เท่า ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเจาะ 4 หลุมเลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 1 คืน ใช้สารตัวอย่างบี-ซีรั่มความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมจำนวน 3 หลุมในทิศตามเข็มนาฬิกา ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุม (control) ทำซ้ำความเข้มข้นละ 6 จาน บ่มเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

2.6.1.5 เชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วย สารตัวอย่างบี-ซีรั่มความเข้มข้นต่าง ๆ จะถูกนำมาทดสอบการยับยั้งต่อด้วยสารตัวอย่างซี-ซีรั่มปราศจากเชื้อจากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 โดยใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเจาะ 3 หลุมเลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบเป็นเวลา 1 คืน ใช้สารตัวอย่างซี-ซีรั่มจากทั้ง 2 พันธุ์แยกใส่ในหลุมจำนวน 40 ไมโครลิตรต่อหลุม ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุม (control) ทำซ้ำ 6 จานต่อสารตัวอย่างซี-ซีรั่มแต่ละพันธุ์ บ่มเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

2.6.1.6. ใช้เชื้อราที่ทดสอบแล้วว่าถูกยับยั้งได้ทั้ง สารตัวอย่างบี-ซีรั่มและสารตัวอย่างซี-ซีรั่มมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายราต่อ ด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่1(GI)และไอโซไซม์ที่2(GII) ที่ปราศจากเชื้อ ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเจาะ 3 หลุม เลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบ 1 คืนใช้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้ง 2 ไอโซไซม์ แยกใส่ในหลุมปริมาตร 40 ไมโครลิตรต่อหลุม ใช้บัฟเฟอร์ที่ชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ ConA agarose เป็นตัวควบคุม (control) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 6 จานต่อ 1 ไอโซไซม์ บ่มเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

2.6.2 **โครมาโทกราฟีบนชั้นบาง (Thin-layer chromatography) ตามวิธีของ Farkas, V. และ Maclacnian, G. 1988)**

2.6.2.1. การเตรียมแผ่นซิลิกา เจล (silica gel)

ใช้ Kieselgel 60 thin-layer plates สำเร็จรูป ขนาด 20x20 เซนติเมตร วางใน chromatography tank ให้ปลายด้านหนึ่งของแผ่นซิลิกา เจล จุ่มในสารละลายตัวชะ

(elution solution) ซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่โพลาร์ (non-polar) ประกอบด้วย ethyl acetate/acetic acid/water (2:1:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ความสูงของสารละลายประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นปล่อยให้สารละลายตัวชะซึมขึ้นไปตามแผ่นซิลิกา เจล เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นซิลิกา เจล มาเป่าให้แห้งด้วย เครื่องเป่าผม (hair dryer)

2.6.2.2. การเตรียมสารตัวอย่าง GI และ GII

ใช้สารตัวอย่างทั้ง GI และ GII ที่มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 0.05 ยูนิต และ 0.46 ยูนิต ตามลำดับ ใส่ในหลอดทดสอบชนิดละ 4 หลอด เติมลามินาริน ความเข้มข้น 10 มก./มล. จำนวน 90 ไมโครลิตรลงในหลอดทดสอบ 3 หลอด อีก 1 หลอด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 90 ไมโครลิตรแทนเป็นหลอดควบคุม (control) แช่และเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆกัน คือ 1, 30 และ 120 นาที นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที นำเอาสารละลายที่ได้ หยด (spot) ลงบนแผ่นซิลิกา เจล ที่เตรียมไว้

2.6.2.3. ใช้ไมโครปิเปตขนาด 10 ไมโครลิตร หยด สารตัวอย่างซึ่งเป็น product ที่ได้จากการทำปฏิริยาระหว่าง เอนไซม์ GI และ GII กับสับสเตรตลามินาริน ที่เวลาต่าง ๆกัน คือ 1, 30 และ 120 นาที หยด ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 5 มม. หลังจาก หยด ทุกครั้งต้องใช้ เครื่องเป่าผม เป่าตรงบริเวณที่ หยด ให้แห้งแล้วจึง หยด ต่อจนปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร นำแผ่นซิลิกา เจล ที่ หยด สารตัวอย่างแล้วใส่ใน chromatography tank ให้ปลายด้านที่มี หยด ของสารตัวอย่างจุ่มให้ห่างจากสารละลายตัวชะ ประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝา tank ให้แน่น ปล่อยให้สารละลายตัวชะซึมผ่าน หยด ของสารตัวอย่างขึ้นไปตามแผ่นซิลิกา เจล ห่างจากปลายอีกด้านที่จุ่มอยู่ในสารละลายตัวชะประมาณ 10 เซนติเมตร ซึ่งเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นซิลิกา เจล ออกมาเป่าให้แห้งด้วย เครื่องเป่าผม สำหรับน้ำตาลที่ใช้เป็น standard marker คือ เซลโลเตตราโอส (cellotetraose), เซลโลไตรโอส (cellotriose), ลามินาริไบโอส และ กลูโคส ใช้วิธีการหยด เช่นเดียวกับสารตัวอย่างใช้ชนิดละ 4 ไมโครกรัม

2.6.2.4. การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสับสเตรต ลามินาริน โดยเอนไซม์ GI และ GII

สารเคมี ที่ใช้ตรวจหาชนิดของน้ำตาลคือ สารละลายของ diphenylamine/aniline/phosphoric acid (Sigma) สารละลายนี้จะให้สีแตกต่างกันกับน้ำตาล

ชนิดต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการแบ่งแยกชนิดของน้ำตาลได้โดยที่ น้ำตาล aldose จะให้สี เทาอมฟ้า ส่วนน้ำตาล ketose จะให้สีแดง สารเคมีนี้จะมีความไว (sensitivity) ต่อน้ำตาลตั้งแต่ 1 ไมโครกรัม ขึ้นไปนำแผ่นซิลิกา เจล ที่ หยด สารตัวอย่างแล้วนำมา spray ด้วยสารเคมีดังกล่าว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยด ของสารตัวอย่างจะเกิดสีภายในเวลา 2-4 นาที ความเข้มสีจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการอบ

2.6.3 การหาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี Phenol sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และ คณะ (1956)

2.6.3.1 เตรียม 80% phenol

ใช้ สารละลาย phenol จำนวน 80 มล. ผสมกับน้ำ 20 มล. คนให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.6.3.2. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ชั่งน้ำตาลกลูโคสจำนวน 2.5 มก. ละลายในน้ำ 5 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 0.5 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้นข้นเป็น 3, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมและใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสแต่ละความเข้นข้นจำนวน 1 มล. ใส่ในหลอดทดสอบ 6 หลอด และสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาล ตัวอย่างละ 1 มล. นำไปเติมสารละลาย 80% phenol จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่อ่านได้นำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวิธีการคำนวณหาปริมาณของน้ำตาล (neutral sugar) หน่วยที่ได้เป็น น้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w)

%ของปริมาณน้ำตาล = ไมโครกรัมของน้ำตาล/ไมโครกรัมของโปรตีน x 100

2.6.4. วิธีการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรต (Substrate specificity) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

2.6.4.1. สับสเตรตที่เป็นแหล่งเบต้า-ดี-กลูแคน (β-D-glucan) ที่ใช้ในการทดลอง แสดงใน ตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงสับสเตรตที่เป็นแหล่งเบต้า-ดี-กลูแคน

แหล่งเบต้า-1,3-กลูแคน	อัตราส่วนพันธะ	พันธะหลักและโครงสร้าง
ซี เอ็ม พาไคแมน	(1→3)-β	$[Glc1\rightarrow 3Glc]_n$
(Poria cocos)		
พัสทิวแลน	(1→6)-β	$[Glc1\rightarrow 6Glc]_n$
(Umbilicaria pusturata)		
ลามินาริน	(1→3:1→6)-β	$[Glc1\rightarrow 3Glc]_3\rightarrow 3Glc]_n$ (Glc 1→6)
(Laminaria digitata)	7:1	
กลูแคนจากยีสต์	(1→3:1→6)-β	$[Glc1\rightarrow 3Glc]_{1\text{-}2}$ (1→6) $[Glc1\rightarrow 3Glc_2]_n$
(saccharomyces cerevisiae)	4:1	
ไลชินิน	(1→4:1→3)-β	$[Glc1\rightarrow 4Glc1\rightarrow 4Glc1\rightarrow 3Glc]_n$
(Cetraria islandica)	2:1	
กลูแคนจากข้าวบาร์เลย์	(1→4:1→3)-β	$[Glc1\rightarrow 4Glc1\rightarrow 4Glc1\rightarrow 3Glc]_n$
(Hordeum vulgare)	2.3-2.7:1	

ไลซินิน, ซีเอ็มพาไคแมน และ พัสทิวแลน ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Stone ส่วน ลามินาริน กลูแคนจากยีสต์ กลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ ซื้อจากบริษัท Sigma

นำสับสเตรตที่เป็นทั้งแบบ soluble และ insoluble β-D-glucan ที่ ทราบชนิดของพันธะและอัตราส่วนของพันธะแล้วจากตาราง มาเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 2 มก./มล. ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0

2.6.4.2. ใช้สารตัวอย่างทั้ง GI และ GII ที่มีความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 0.7 ยูนิตต่อมล. และ 6.62 ยูนิตต่อมล. ตามลำดับ แยกใส่ในหลอดทดสอบ 2 หลอดนำแต่ละหลอดตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์ โดยเติมสับสเตรตแต่ละชนิด ความเข้มข้น 2 มก./มล. จำนวน 90 ไมโครลิตร แช่และเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำลงต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที เติมสารละลาย DNS 0.2 มล. และบัฟเฟอร์ 0.2 มล. นำลงต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 0.9 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสองกับสับสเตรตทุกชนิด

2.7. วิธีการศึกษาสมบัติทางอิมมูนวิทยาของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา

2.7.1. การเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2(GII) ในกระต่าย

2.7.1.1. การกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่าย

กระต่ายที่ใช้ในการสังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาวตาแดง พันธุ์ New Zealand White เพศผู้ เอนไซม์ที่ฉีดกระต่ายคือ ไอโซไซม์ GII ประกอบด้วยเอนไซม์ 462.5 ไมโครกรัม และ complete Freund's adjuvant จำนวน 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างดีได้สารละลายมีลักษณะ ข้นขาวและหนืด นำไปฉีดกระต่าย โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอกับสะโพก 4-5 จุด ระยะเวลาฉีด 7 วันต่อครั้ง จนครบ 4 ครั้ง

2.7.1..2. การเก็บเลือดและการเตรียมซีรั่ม (serum)

เจาะเลือดกระต่ายจากหลอดเลือดแดงกลางใบหู (central ear artery) 5 มิลลิลิตร ทุกครั้งก่อนฉีดสารละลายเอนไซม์แต่ละครั้งและหลังการฉีดสารละลายเอนไซม์

ครั้งสุดท้าย 1 อาทิตย์ นำเลือดที่ได้วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วนำไปปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนของน้ำเลือดหรือซีรั่ม ด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บซีรั่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.7.1.3. การตรวจสอบการมีแอนติบอดี

นำซีรั่มของกระต่ายที่ฉีดกระตุ้นด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2(GII) ครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 1 อาทิตย์แล้ว มาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีด้วย วิธี ring test in capillary tube โดยนำ capillary tube อันที่ 1 ดูดซีรั่มปริมาตร 1/3ของ tube และใช้ capillary tube อีกอันหนึ่ง ดูดสารละลายแอนติเจนหรือGII แล้วนำ tube ทั้งสองอันมาจ่อกันให้ส่วนของซีรั่มไหลไปในส่วน tube ของแอนติเจนนำ tube ไปปักลงดินน้ำมันในลักษณะตั้งตรง วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนสังเกตเห็นตะกอนสีขาวเกิดขึ้นใน tube ซึ่งเป็นตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากันอย่างจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี จากนั้นทำการเก็บเลือดจากกระต่ายจำนวนมาก(เป็นเวลาประมาณ 3 อาทิตย์) วางทิ้งให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ ความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนน้ำเลือดหรือซีรั่มไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 50% ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (J2-21,rotor JA20) ความเร็ว 15,000 rpm นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปไดอะไลซ์ (dialyse) ในน้ำกลั่นข้ามคืน เก็บสารละลายที่ได้ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เป็นแอนติบอดีตัวที่1 ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.7.2. การตรวจสอบการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) และไอโซไซม์ที่2(GII) ต่อแอนติ บอดี

2.7.2.1 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1949)

2.7.2.1.1. การเตรียม agarose slide

ชั่ง agarose 1 กรัม ละลายใน normal saline solution (0.85% โซเดียมคลอไรด์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ละลาย นาน 5 นาที เท 1% agarose หลอมเหลวอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์สะอาด ทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จาก

นั้นเทสารละลาย agarose หลอมเหลวอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์แผ่นเดิม วางทิ้งให้เย็นแล้วนำไปเจาะ agarose ให้เป็นหลุม

2.7.2.1.2. ตรวจสอบการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะ ต่อแอนติเจนหรือ เอนไซม์ GII โดยหยอดซีรัมของกระต่ายที่มีการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อ GII ลงในหลุมกลางแล้วหยอดเอนไซม์ GI และ GII หรือแอนติเจนที่มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กัน ในหลุมข้างรอบ ๆ แล้วเก็บสไลด์ไว้ใน moisture chamber ที่ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน ถ้าแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบมีการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีในซีรัมกระต่าย ก็จะเห็นแถบการตกตะกอน (precipitin band) ของแอนติเจนและแอนติบอดีระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมและหลุมที่ใส่แอนติเจน

2.7.2.2. การทำ Western blot ตามวิธีของ Wray และคณะ (1979)

2.7.2.2.1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ (reagent)

ก. การเตรียม Towbin buffer หรือ transfer buffer

ชั่ง Tris จำนวน 15.14 กรัม glycine จำนวน 72.05 กรัม ละลายในน้ำ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 20% methanol ปริมาตร 1 ลิตร เติมน้ำให้ครบ 5 ลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 25 mM Tris 192 mM glycine pH 8.3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ข. การเตรียม Tris-buffered saline (TBS)

ชั่ง Tris จำนวน 3.03 กรัม โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 29.22 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ให้ได้ pH 7.5 เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตรจะได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 25 mM Tris และ 0.5 M โซเดียมคลอไรด์ pH 7.5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ค. การเตรียม TTBS (TBS ผสมกับ 0.05% Tween 20)

ใช้ Tween-20 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายใน TBS จำนวน 1 ลิตร คนให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ง. การเตรียม Blocking reagent

ชั่ง Bovine serum albumin (BSA) จำนวน 1.5 กรัมละลาย

ใน TTBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จ. การเตรียมสารละลายแอนติบอดีตัวที่1 (first antibody) และสารละลายแอนติบอดีตัวที่ 2 (second antibody)

ใช้แอนติบอดีตัวที่ 1 ที่ได้จากซีรัมกระต่ายหลังจากฉีดกระตุ้นด้วยเอนไซม์ GII ปริมาตร 40 ไมโครลิตรผสมกับ TTBS 60 มิลลิลิตร เติม BSA จำนวน 0.6 กรัม คนให้เข้ากันจะได้สารละลายแอนติบอดีตัวที่1 ที่ถูกเจือจางลงเป็น 1,500 เท่า ใช้แอนติบอดีตัวที่2 ซึ่งเป็น anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ TTBS ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติม BSA 0.6 กรัมคนให้เข้ากัน จะได้สารละลายแอนติบอดีตัวที่2 ที่ถูกเจือจางลงเป็น 3,000 เท่า

ฉ. การเตรียมสารละลายสับสเตรตที่ใช้ย้อมโปรตีน บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane)

ชั่ง diaminobenzidine (DAB) จำนวน 50 มิลลิกรัม ละลายใน TBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร คนให้เข้ากัน เติม TBS ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง WHATMAN เบอร์ 1 ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.7.2.2. ขั้นตอนการทำ Western blot

ก. การเตรียมเจล

เตรียมเจลแผ่น (slab gel) แบบ SDS-PAGE 7-15% ตามส่วนประกอบในตารางที่ 1 ใช้สารตัวอย่างคือ บี-ซีรั่มและซี-ซีรั่ม จากน้ำยางพันธุ์RRIM600 และ พันธุ์ GT1 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) และไอโซไซม์ที่2(GII) สารสกัดจากใบยางอ่อนทั้งสองพันธุ์ ส่วนผสมของบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่ม จากน้ำยางต้นอ่อนและน้ำยางต้นแก่ทั้งสองพันธุ์

ข. การถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

(1) แยกแถบโปรตีนโดยใช้ 7-15% SDS-PAGE ใช้สารตัวอย่าง 2 ซ้ำเพื่อย้อมดูแถบโปรตีนหลังจากถ่ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส นำแผ่นเจลที่แยกเอาส่วน stacking gel ออกแล้วแ ''er นาน 10 นาที

(2) นำแผ่นเจลที่ได้มาทำการถ่ายโปรตีน โดยใช้เครื่องถ่ายโปรตีนแบบใช้กระแสไฟฟ้า วางกระดาษกรองลงบนแผ่นฟองน้ำที่วางอยู่บนถาดของเครื่องถ่ายโปรตีน จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีขนาดเท่ากับแผ่นเจลซึ่งแช่ให้เปียกชุ่มแล้วด้วย transfer buffer วางทับบนกระดาษกรองแล้วนำแผ่นเจลที่ล้างด้วย transfer buffer แล้ววางทับลงแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นวางกระดาษกรองและแผ่นฟองน้ำทับตามลำดับ นำไปใส่ในเครื่องถ่ายโปรตีนทำการผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยให้แผ่นเจลอยู่ทางด้านขั้วลบและแผ่นไนโตรเซลลูโลสอยู่ทางด้านขั้วบวก ใช้กระแสไฟฟ้า 500 มิลลิแอมแปร์ นาน 1 ชั่วโมง นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ถูกถ่ายโปรตีนแล้วไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

(3) ตรวจสอบการถ่ายโปรตีนบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยการย้อมด้วยสีย้อม Coomassie brilliant blue R250 เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย destaining solution ประกอบด้วย 7% glacial acetic acid และ 40% methanol

(4) การตรวจหาปฏิกิริยาอิมมูนวิทยา

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสอีกแผ่นที่ถูกถ่ายโปรตีนแล้วล้างใน TBS เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน TBS ที่มี 3% BSA ผสมอยู่ นาน 30 นาที-1ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลส 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีด้วยสารละลาย TTBS (blocking buffer) แล้วแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายแอนติบอดีตัวที่ 1 ที่ถูกเจือจางลง 1,500 เท่า ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมเขย่าเบา ๆ ตลอดเวลา จากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลส 2 ครั้ง ๆละ 5 นาที ด้วย TTBS แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายแอนติบอดีตัวที่ 2 (ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อ IgG ของกระต่าย) ที่ถูกเจือจางลง 3,000 เท่า จำนวน 60 มล.เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลส 2 ครั้ง ๆละ 5 นาทีด้วย TTBS และล้างต่อด้วย TBS จากนั้นแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายสับสเตรต ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที จนเห็นแถบโปรตีนเป็นสีน้ำตาล ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น ถ่ายภาพเก็บไว้

2.9. วิธีการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในส่วนต่าง ๆของยางพารา พันธุ์ RRIM600และ พันธุ์ GT1 โดยวิธี Western blot

2.9.1. ใช้น้ำยางสดจากต้นยาง 2 พันธุ์ มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง เซนตริฟิวจ์ J2-21 แยกเอาส่วนของซี-ซีรั่มและส่วนของตะกอนก้นหลอด เตรียมเป็น บี-ซีรั่ม นำมาทำ Western blot

2.9. 2. ใช้ใบยางอ่อน อายุ 4-5 เดือน จากยางสองพันธุ์ ๆละ 20 กรัม นำมาล้างให้สะอาดเช็ดให้แห้งหมาดแล้วกรีดเอาเส้นกลางใบออก หั่นเป็นฝอยจากนั้นเติมไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ท่วมตำให้ละเอียดแล้วใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แยกกันอย่างละบีกเกอร์ แต่ละบีกเกอร์เติมบัฟเฟอร์ 0.1 M โซเดียมอะซีเตต pH 5.0 จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปใส่ในครก (motar) ตำให้ละเอียดอีกครั้ง คั้นเอาเฉพาะน้ำนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 โรเตอร์ JA-20 อัตราเร็วในการหมุนเหวี่ยงเท่ากับ 15,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสมาทำ Western blot ตามวิธีในข้อ 2.8.2

2.10. การศึกษาผลของการเกิดบาดแผล (Wounding) โดยการกรีด (tapping) ต่อความว่องไวของเอนไซม์และรูปแบบ (pattern)ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยางพันธุ์ RRIM600และพันธุ์ GT1

ใช้ต้นยางพาราพันธุ์ RRIM600และพันธุ์ GT1 อายุประมาณ 4-5 เดือน และอายุประมาณ 20 ปี จากศูนย์วิจัยยาง คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา กำหนดไว้พันธุ์ละ 10 ต้น สำหรับต้นยางอ่อน ทำการกรีดทุกวันเป็นเวลา 3 วัน และเก็บน้ำยางแบบรวมกันทั้ง 10 ต้น เริ่มกรีดและเก็บน้ำยางเวลา 06.15-07.15 น. น้ำยางสดที่เก็บได้จะผสมกับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 แล้วผสมน้ำยางให้เข้ากับน้ำกลั่นแช่น้ำแข็งไว้ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ ที่ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ของยางทั้ง 2 พันธุ์ และทำ Western blot ส่วนต้นยางแก่จะทำการเก็บน้ำยางแบบรวมกันจำนวน 10 ต้น เช่นกัน แล้วนำมาผสมกับน้ำอัตราส่วน 1:1 แช่น้ำแข็งไว้แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บส่วนใสนำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์และทำ Western blot เปรียบเทียบกับน้ำยางต้นอ่อนทั้ง 2 พันธุ์

3. ผลการทดลอง

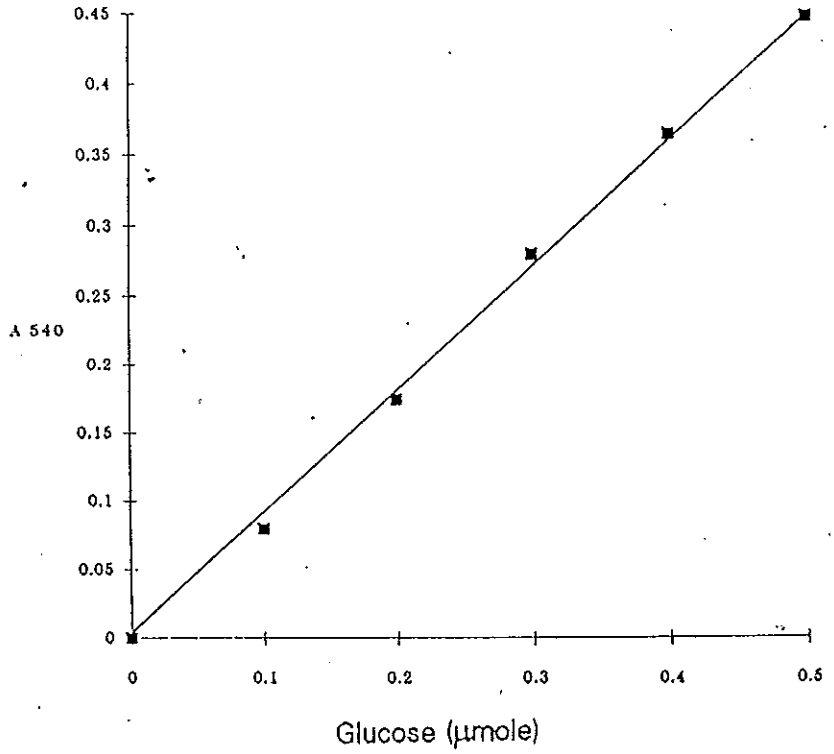
3.1. ผลการเตรียมสารตัวอย่างบี-ซีรั่มในขั้นตอนการปั่นน้ำยางสด

เมื่อเปรียบเทียบ bottom fraction ของยางต่างพันธุ์กัน คือ พันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 พบว่า มีลักษณะต่างกันทั้งในแง่ของ ปริมาณและสี โดยในปริมาตรน้ำยางสด 1 ลิตร เท่ากัน พันธุ์ RRIM600 ให้ bottom fraction ได้มากกว่าและมีสีเหลืองอ่อนกว่าเล็กน้อย ส่วนพันธุ์ GT1 ให้ปริมาณ bottom fraction น้อยกว่าแต่มีสีเหลืองเข้มกว่า (อาภรณ์ สันตะโร 2538)

3.2. การคำนวณหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีค่า slope เท่ากับ 0.8920 สามารถคำนวนหาปริมาณน้ำตาลของ unknown ได้จากสูตร

ปริมาณน้ำตาล = A_{540}/slope



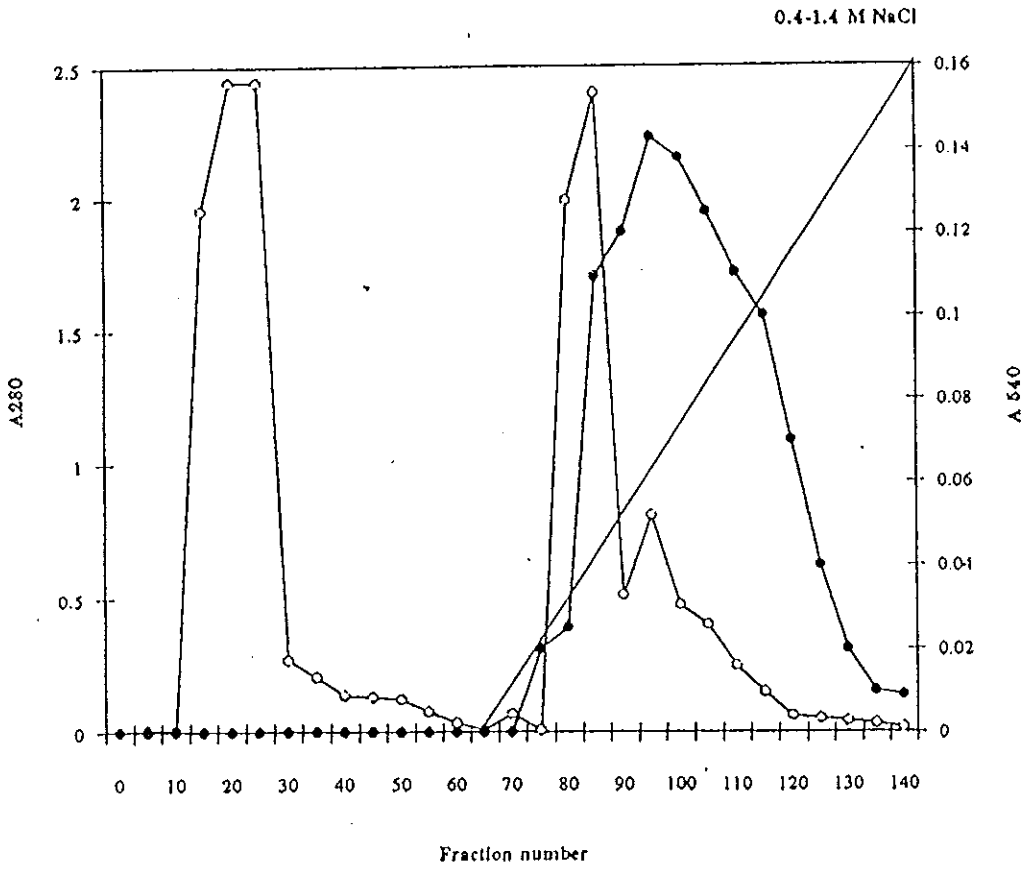
รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยมีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเป็น 0.1, 0.2, 0.3,0.4 และ 0.5 ไมโครโมล อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

3.3 ผลการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากยางพันธุ์ RRIM600 โดยวิธีโครมาโทกราฟีจากบี-ซีรั่ม

3.3.1 ผลของโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose

ใช้บี-ซีรั่ม ที่ได้จากน้ำยางสดพันธุ์ RRIM600 จำนวน 20 มล. มีค่าความว่องไวของเอนไซม์ 206.26 ยูนิต มีปริมาณโปรตีน 239.58 มก. ทำให้บริสุทธิ์โดยแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose ขนาด ของคอลัมน์เท่ากับ 2.5x25 เซนติเมตร หรือปริมาตร 60 มล.ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ปรับอัตราเร็วในการไหลของสารตัวอย่างและบัฟเฟอร์เท่ากับ 12 มล./ชั่วโมง เก็บสารตัวอย่างโดยใช้เครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน หลอดละ 3 มล. หลังจากนั้นใช้บัฟเฟอร์ล้างเอาส่วนที่ไม่แลกเปลี่ยนประจุกับ CM (unbound CM) ออก ชะเอาสารตัวอย่างที่แลกเปลี่ยนประจุกับ CM (bound CM) โดยใช้ โซเดียมคลอไรด์ ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือขึ้นเรื่อยๆ (gradient) จาก 0.4-1.4 M สารตัวอย่างจะถูกชะออกในช่วงที่โซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้น 0.6-1.4 M นำสารตัวอย่างที่ได้แต่ละหลอด มาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 540 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังกราฟรูปที่ 2

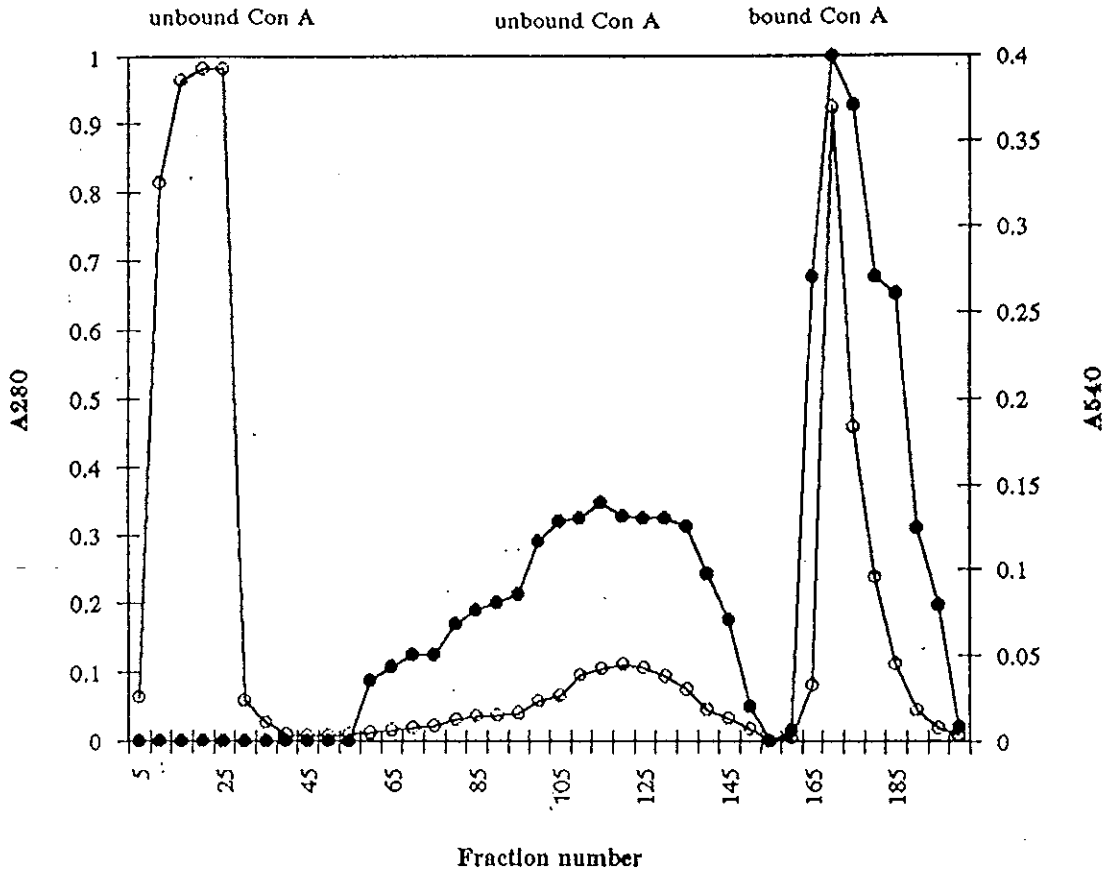
หลังจากรวมสารตัวอย่างจากหลอดที่ 90-140 ได้ปริมาตรสารตัวอย่างทั้งหมด 153 มล. มีค่าความว่องไวรวม (total activity) ของเอนไซม์เท่ากับ 181.30 ยูนิต มีปริมาณโปรตีน 41.2 มก. คิดเป็นค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) 4.56 ยูนิต/มก.โปรตีน และได้ปริมาณสุทธิ (yeild) ของเอนไซม์ 91.10 % ค่าความบริสุทธิ์ (purification fold) ของ เอนไซม์เป็น 5.3 เท่า



รูปที่ 2 แสดงผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose ขนาดคอลัมน์ 2.5 X 25 cm ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0, (O—O) แสดงปริมาณโปรตีนที่ A_{280} nm peak 1 เป็น unbound CM, peak 2 เป็น bound CM, (●—●) แสดง ค่าการวัดความว่องไวเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ A_{540} nm ถูกชะออกด้วย 0.4-1.4.M NaCl

3.3.2 ผลของโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะจะจงกับ Con A agarose

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ CM-cellulose (bound CM) จำนวน 155 มล. เติมสารละลายคัลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ และมังกานีสคลอไรด์ อย่างละ 1 mM เพื่อเพิ่มไอออนในการจับเกาะกับคอลัมน์ ผ่านสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ Con A agarose ปริมาตร 15 มล. เก็บสารตัวอย่างในเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วนโดยเก็บหลอดละ 4 มล. โปรตีนที่ไม่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose (unbound Con A) จะถูกล้างออกมาด้วยบัฟเฟอร์ หลังจากผ่านสารตัวอย่างลงคอลัมน์หมดแล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 1 M โซเดียมคลอไรด์และอย่างละ 1 mM ของ คัลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ และมังกานีสคลอไรด์ โปรตีนที่ไม่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose (unbound Con A) จะถูกล้างออกมาด้วยบัฟเฟอร์จนหมด ล้างคอลัมน์ต่อไปอีกประมาณ 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จะมีโปรตีนซึ่งสามารถจับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับคอลัมน์ในระดับที่น้อยกว่า ซึ่งเป็นสารตัวอย่างของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) ถูกล้างออกมาใน peak ที่สอง เก็บสารตัวอย่างหลอดละ 2 มล.ได้ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ 130.87 ยูนิต โปรตีนสุทธิ 12.05 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะ 10.86 ยูนิต/มก ได้ปริมาณสุทธิ (yield) 63.44 % ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 12.63 เท่า จากนั้น ชะคอลัมน์ด้วย 0.2 M ของน้ำตาลแมนโนไซด์ และเก็บสารตัวอย่างหลอดละ 1 มล. จะได้โปรตีนที่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับคอลัมน์ในระดับสูงกว่า เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่ 2 (GII) ถูกชะออกมาใน peak ที่สาม มีค่าความว่องไวเอนไซม์รวมเท่ากับ 43.35 ยูนิต มีโปรตีนสุทธิเท่ากับ 5.76 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 7.52 ยูนิต/มก. ได้ปริมาณสุทธิ (yield) 21.02% ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 8.74 เท่า ดังกราฟรูปที่ 3 และแสดงปริมาณสุทธิทุกขั้นตอนการทำให้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ จากบี-ซีรั่ม ดังตารางที่ 8



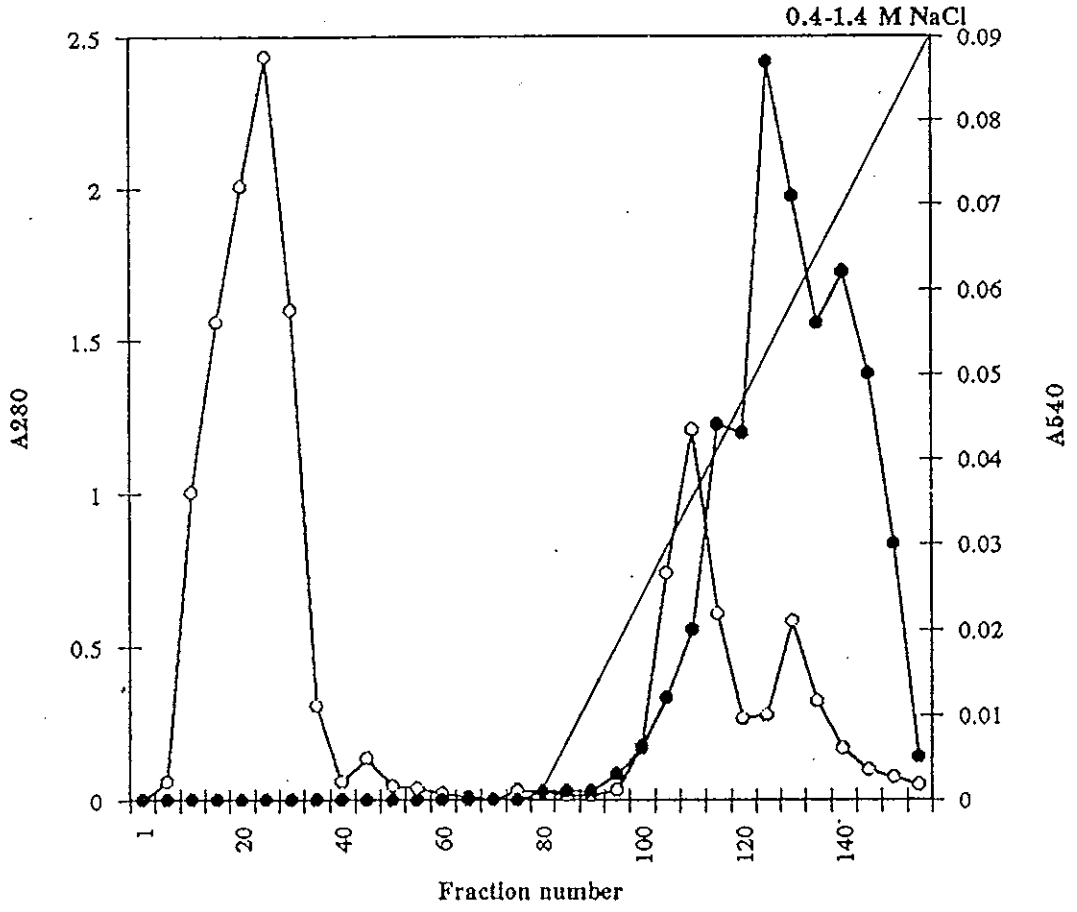
รูปที่ 3 แสดงการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ จำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose โดยใช้คอลัมน์ขนาด 2.5X10 cm ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย 1 M NaCl และ 1 mM $CaCl_2$, $MgCl_2$ $MnCl_2$ pH 6.0, (O—O) แสดงปริมาณโปรตีนที่ A_{280} nm peak 1 และ 2 เป็น unbound Con A, peak 3 เป็น bound Con A (●—●) เป็นความว่องไวเอนไซม์ที่ A_{540} nm peak 2 แสดงความว่องไวเอนไซม์ (GI) และ peak 3 เป็น ความว่องไวเอนไซม์ (GII) ซึ่งชะออกด้วย 0.2 M แมนโนไซด์

3.4 ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากยางพันธุ์ GT1 โดยวิธีโครมาโทกราฟีจากบี-ซีรั่ม

3.4.1 ผลของโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose

ใช้บี-ซีรั่ม ที่ได้จากน้ำยางสดพันธุ์ GT1 จำนวน 20 มล. มีค่าความว่องไวของเอนไซม์ 240 ยูนิต มีปริมาณโปรตีน 300 มก. ทำให้บริสุทธิ์โดยแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose ขนาด ของคอลัมน์เท่ากับ 2.5x25 เซนติเมตร หรือปริมาตร 60 มล.ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ปรับอัตราเร็วในการไหลของสารตัวอย่างและบัฟเฟอร์เท่ากับ 12 มล./ชั่วโมง เก็บสารตัวอย่างโดยใช้เครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน หลอดละ 3 มล. หลังจากนั้นใช้บัฟเฟอร์ล้างเอาส่วนที่ไม่แลกเปลี่ยนประจุกับ CM (unbound CM) ออก ชะเอาสารตัวอย่างที่แลกเปลี่ยนประจุกับ CM (bound CM) โดยใช้ โซเดียมคลอไรด์ ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือขึ้นเรื่อย ๆ (gradient) จาก 0.4-1.4 M สารตัวอย่างจะถูกชะออกในช่วงที่โซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้น 0.6-1.4M นำสารตัวอย่างที่ได้แต่ละหลอด มาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังกราฟรูปที่ 4

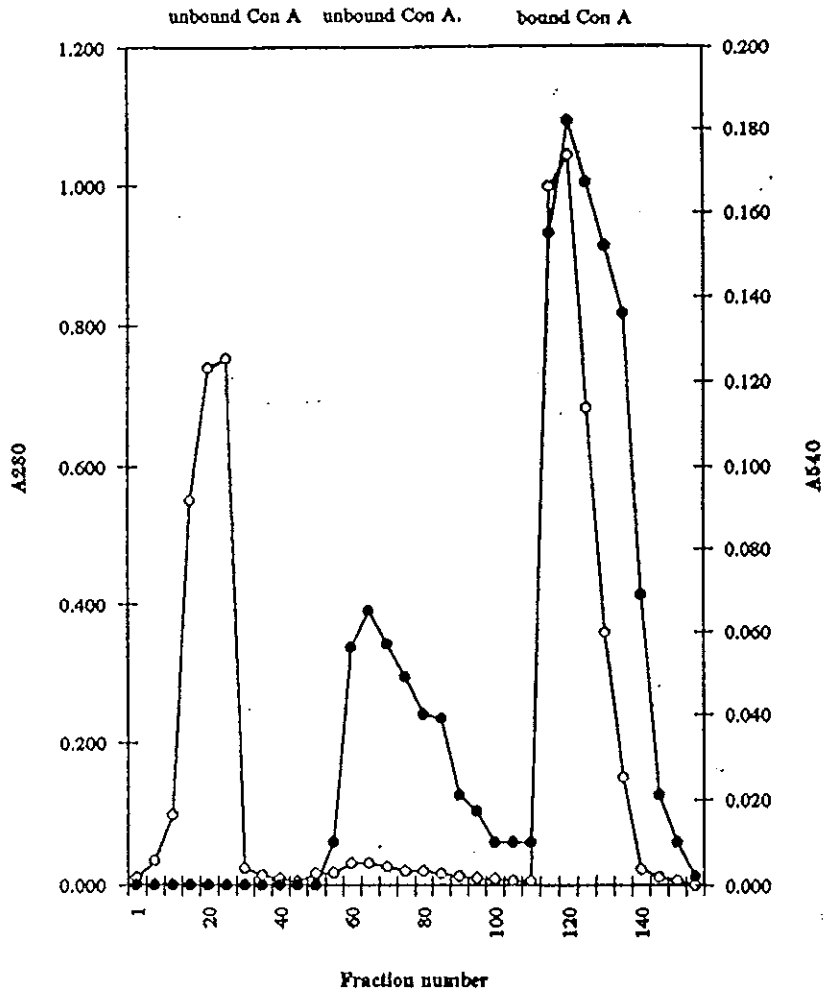
หลังจากรวมสารตัวอย่างจากหลอดที่ 115-150 ได้จำนวนสารตัวอย่างทั้งหมด 108 มล. มีค่าความว่องไวรวม (total activity) ของเอนไซม์เท่ากับ 211.97 ยูนิต มีปริมาณโปรตีน 51.7 มก. คิดเป็นค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) 4.1 ยูนิต/มก.โปรตีน และได้ปริมาณสุทธิ (yeild) ของเอนไซม์ 88.3% ค่าความบริสุทธิ์ (purification fold) ของเอนไซม์เป็น 5.1 เท่า



รูปที่ 4 แสดงผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากน้ำยางพันธุ์ GT1 โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟี แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose ขนาดคอลัมน์ 2.5 X 25 cm ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0, (O—O) แสดงปริมาณโปรตีนที่ A_{280} nm peak 1 เป็น unbound CM, peak 2 เป็น bound CM, (●—●) แสดง ค่าการวัดความว่องไวเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ A_{540} nm ซึ่งถูกชะออกด้วย 0.4-1.4 M NaCl

3.4.2 ผลของโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะจะจงกับ Con A agarose

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ CM-cellulose (bound CM) จำนวน 148 มล. เติมสารละลายคัลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ และมังกานีสคลอไรด์ อย่างละ 1 mM เพื่อเพิ่มไอออนในการจับเกาะกับคอลัมน์ ผ่านสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ Con A agarose ปริมาตร 15 มล. เก็บสารตัวอย่างในเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วนโดยเก็บหลอดละ 4 มล. โปรตีนที่ไม่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose (unbound Con A) จะถูกล้างออกมาด้วยบัฟเฟอร์ หลังจากผ่านสารตัวอย่างลงคอลัมน์หมดแล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 1 M โซเดียมคลอไรด์และอย่างละ 1 mM ของคัลเซียมคลอไรด์ แมกเนเซียมคลอไรด์ และมังกานีสคลอไรด์ โปรตีนที่ไม่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose (unbound Con A) จะถูกล้างออกมาด้วยบัฟเฟอร์จนหมด ล้างคอลัมน์ต่อไปอีกประมาณ 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จะมีโปรตีนซึ่งสามารถจับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับคอลัมน์ในระดับที่น้อยกว่า ซึ่งเป็นสารตัวอย่างของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) ถูกล้างออกมาใน peak ที่สอง เก็บสารตัวอย่างหลอดละ 2 มล.ได้ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ 30.32 ยูนิต โปรตีนสุทธิ 2.7 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะ 11.23 ยูนิต/มก ได้ปริมาณสุทธิ (yield) 12.6% ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 14.0 เท่า จากนั้น ชะคอลัมน์ด้วย 0.2 M ของน้ำตาลแมนโนไซด์ และเก็บสารตัวอย่างหลอดละ 1 มล. จะได้โปรตีนที่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับคอลัมน์ในระดับสูงกว่า เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่ 2 (GII) มีค่าความว่องไวเอนไซม์รวมเท่ากับ 172.125 ยูนิต มีโปรตีนสุทธิเท่ากับ 22.5 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 7.65 ยูนิต/มก. ได้ปริมาณสุทธิ (yield) 71.2% ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 9.56 เท่า ดังกราฟรูปที่ 5 และแสดงปริมาณสุทธิทุกขั้นตอนการทำให้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ จากบี-ซีรั่ม ดังตารางที่ 9



รูปที่ 5 แสดงการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากน้ำยางพันธุ์ GT1 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ จำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose โดยใช้คอลัมน์ขนาด 2.5X10 cm ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย 1 M NaCl และ 1 mM $CaCl_2$, $MgCl_2$ $MnCl_2$ pH 6.0, (O—O) แสดงปริมาณโปรตีนที่ A_{280} nm peak 1 และ 2 เป็น unbound Con A, peak 3 เป็น bound Con A (●—●) แสดงความว่องไวเอนไซม์ที่ A_{540} nm peak 2 เป็นความว่องไวเอนไซม์ (GI), peak 3 เป็น ความว่องไวเอนไซม์ (GII) ซึ่งชะออกด้วย 0.2 M แมนโนไซด์

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณสุทธิของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในแต่ละขั้นตอน จากยางพันธุ์ RRIM600

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์		โปรตีน (มก.)	ความว่องไว (ยูนิต)	ความว่องไวจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)	ปริมาณสุทธิ (%)	ค่าบริสุทธิ์ (เท่า)
B-serum		239.58	206.26	0.86	100.0	-
CM-cellulose		41.2	181.30	4.56	91.1	5.30
Con A agarose	GI	12.05	130.87	10.86	63.44	12.63
	GII	5.76	43.35	7.52	21.02	8.74

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณสุทธิของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในแต่ละขั้นตอน จากยางพันธุ์ GT1

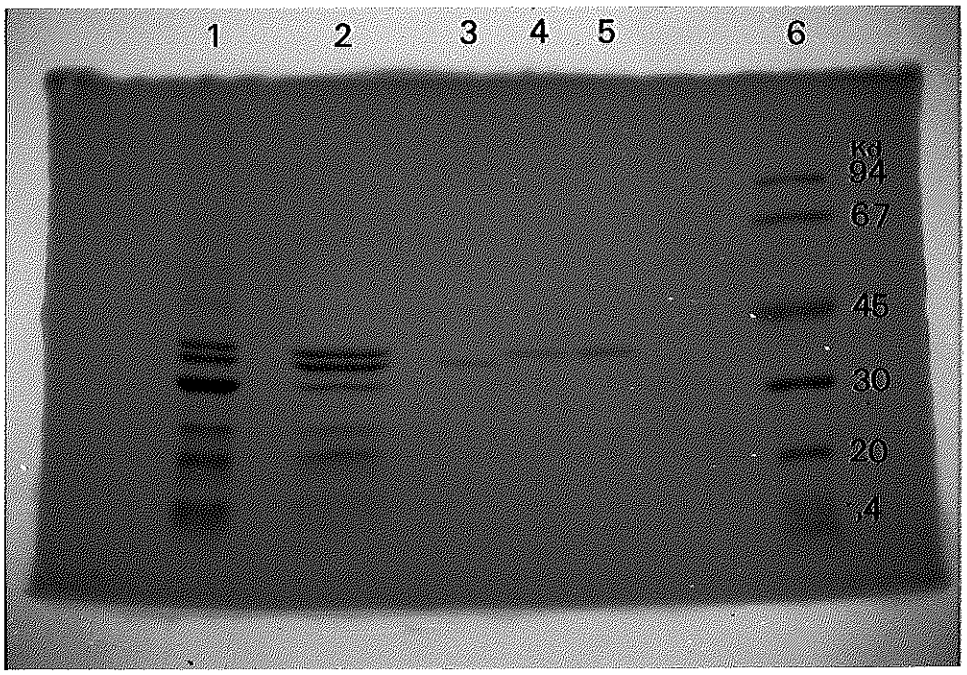
ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์		โปรตีน (มก.)	ความว่องไว (ยูนิต)	ความว่องไวจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)	ปริมาณสุทธิ (%)	ค่าบริสุทธิ์ (เท่า)
B-serum		300	240	0.8	100.0	-
CM-cellulose		51.7	211.97	4.1	88.3	5.1
Con A agarose	GI	2.7	30.32	11.23	12.6	14.0
	GII	22.5	172.125	7.65	71.2	9.56

3.5 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี SDS-PAGE

จากวิธีการเตรียมเจล 7-15 % ตามส่วนประกอบเจลแบบ SDS-PAGE ในตารางที่ 5 ใช้โปรตีนมาตรฐานดังนี้ คือ phosphorylase M.W.94,000, BSA M.W.67,000, ovalbumin M.W. 45,000, carbonic anhydrase M.W. 30,000, soybean tripsin inhibitor M.W. 20,100 และ α-lactalbumin M.W. 14,400

3.5.1 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยใช้วิธี SDS-PAGE ย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue G 250 เปรียบเทียบแถบโปรตีนตั้งแต่ บี-ซีรั่ม จากยาง 2 พันธุ์ คือ RRIM600 และ GT1 ผ่านวิธีการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่าง ๆ จนได้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII ซึ่งได้เป็นโปรตีนแถบเดียว ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7

3.5.2. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยใช้วิธี SDS-PAGE ย้อมสีโปรตีนโดยใช้ ซิลเวอร์ไนเตรต (Silver stain) เปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่าง บี-ซีรั่ม ที่ได้จากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 กับเอนไซม์ ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว คือ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) และไอโซไซม์ที่2(GII) พบว่า ในบี-ซีรั่ม ของยางพันธุ์ RRIM600 มีแถบโปรตีนเป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์เป็น 2 แถบชัดเจน คือ GI และ GII ส่วนบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 มีแถบปรตีนที่เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ชัดเจนเพียงแถบเดียว คือ ตรงตำแหน่งของ GII ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 6 เจลอิเลคโตรฟอริซิส แบบ SDS-PAGE

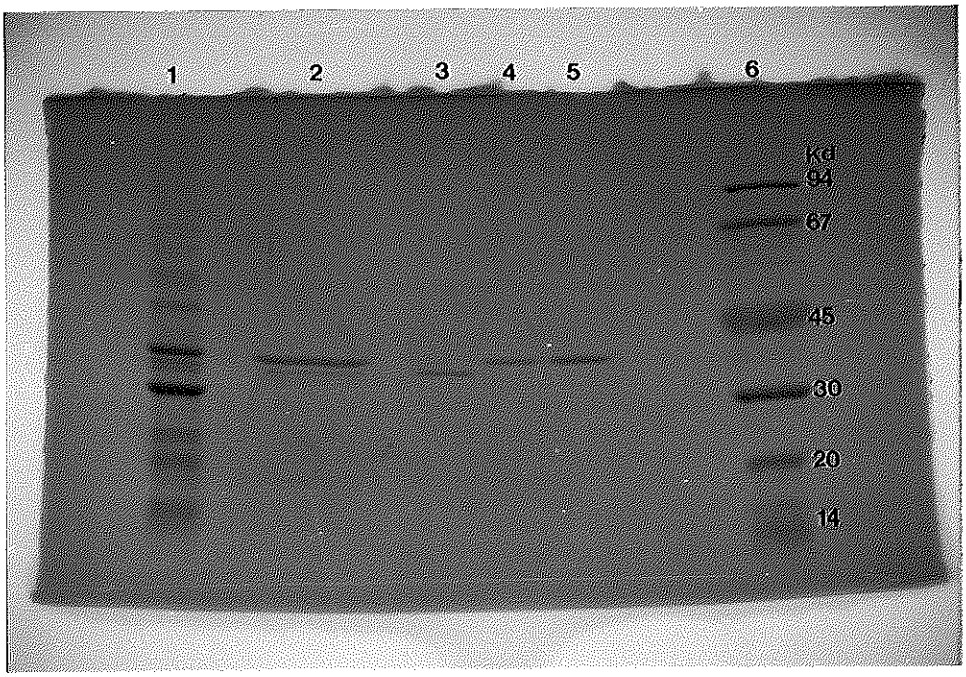
ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนจากบี-ซีรั่ม ของยางพันธุ์ RRIM600

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีนจาก bound CM

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนของ GI

ช่องที่ 4 และ 5 เป็นแถบโปรตีนของ GII

ช่องที่ 6 เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 7 เจลอิเลคโตรฟอริซิส แบบ SDS-PAGE

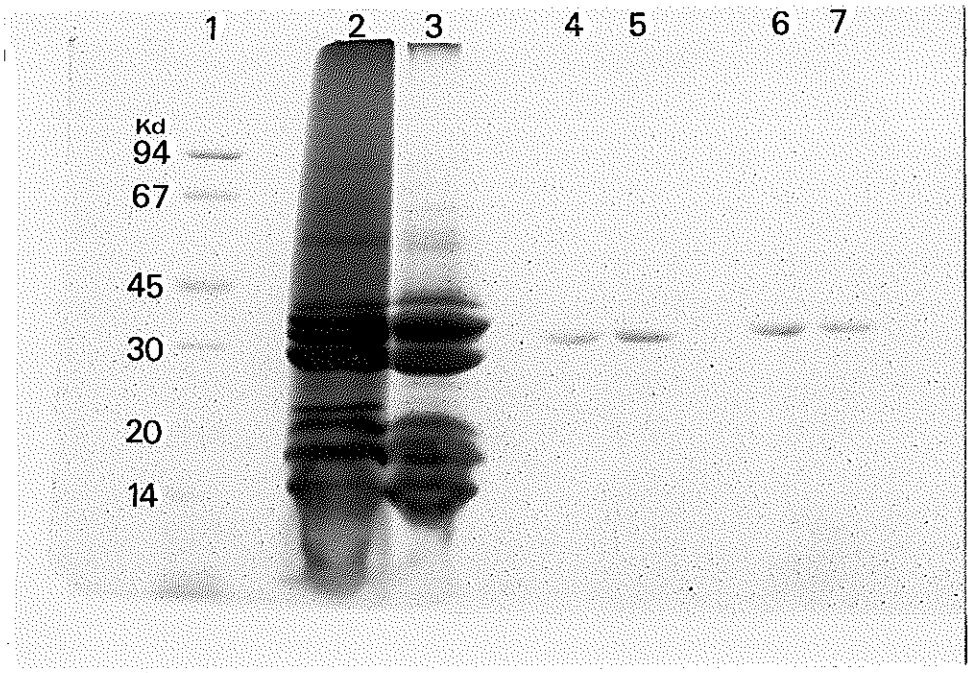
ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนจากบี-ซีรั่ม ของยางพันธุ์ GT1

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีนจาก bound CM

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนของ GI

ช่องที่ 4 และ 5 เป็นแถบโปรตีน ของ GII

ช่องที่ 6 เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 8 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI)และไอโซไซม์ที่2(GII) จากน้ำยางพารา โดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอริซิสแบบ SDS-PAGE ย้อมโปรตีนด้วยวิธี Silver stain

ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีน บี-ซีรั่ม ของน้ำยางพันธุ์ RRIM600

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีน บี-ซีรั่ม ของน้ำยางพันธุ์ GT1

ช่องที่ 4 และ 5 เป็นแถบโปรตีนจาก GI 0.8 ไมโครกรัม และ 2.9 ไมโครกรัม ตามลำดับ

ช่องที่ 6 และ 7 เป็นแถบโปรตีนจาก GII 2.69 ไมโครกรัม และ 0.9 ไมโครกรัม ตามลำดับ

3.6 ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

3.6.1. ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา

3.6.1.1 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่ม ที่ใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายรามีความว่องไวของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรัมและซี-ซีรั่มที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายรา ในยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1

สารตัวอย่าง	ความว่องไวของเอนไซม์ ยูนิต/มล.	ปริมาณโปรตีน มก./มล.
น้ำยางพันธุ์ RRIM600		
บี-ซีรั่ม	10.3	12
ซี-ซีรั่ม	3.52	10.58
น้ำยางพันธุ์ GT1		
บี-ซีรั่ม	12	15
ซี-ซีรั่ม	3.43	10.0
GI	0.76	0.07
GII	6.62	0.87

3.6.1.2. ผลของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 และ GT1 ต่อการยับยั้งการเจริญของสายรา ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1

เชื้อ	สารตัวอย่างบี-ซีรั่ม พันธุ์ RRIM600 ปริมาณโปรตีน 480 ไมโครกรัม(0.412 ยูนิต)	สารตัวอย่างบี-ซีรั่ม พันธุ์ GT1 ปริมาณโปรตีน 600 ไมโครกรัม (0.48 ยูนิต)
Corticium samonicolor	+	+
Colletotrichum gloeosporioides	-	-
Corynespora casiicola	-	-
Rigidoporus lignosus	++++	++++
Curvularia sp.	++	++
Phytophthora botryosa	-	-
P. palmivora	-	-

++++ = ถูกยับยั้งการเจริญได้ดีมาก

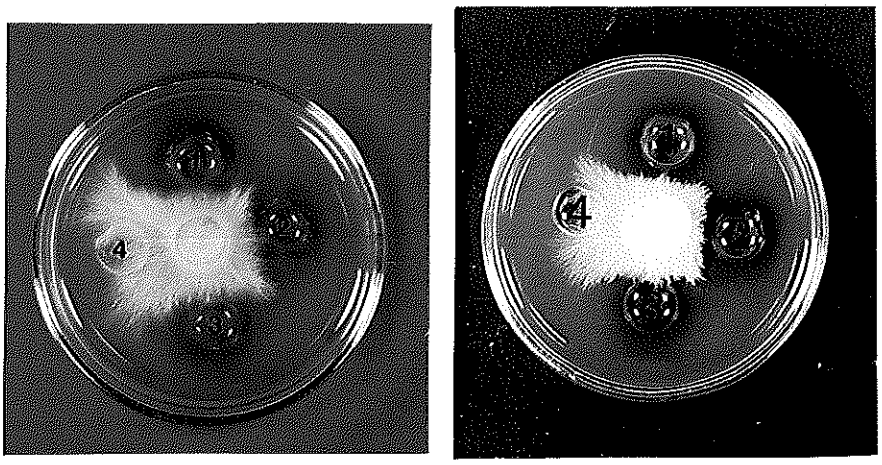
++ = ถูกยับยั้งการเจริญได้ดีปานกลาง

\+ = ถูกยับยั้งการเจริญได้น้อย

\- = ไม่ถูกยับยั้งการเจริญ

จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่มได้ดีที่สุดคือ เชื้อรา *Rigidoporus lignosus* และรองลงมาคือเชื้อรา *Curvularia sp.* ส่วนเชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญได้น้อยคือ *Corticium samonicolor* และเชื้อราที่ไม่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราเลยคือ *Colletotrichum gloeosporioides* , *Corynespora casiicola* , *Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora* แสดงรูปเปรียบเทียบของเชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญ ดังรูปที่ 9, 10 และเชื้อราที่ไม่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยสารตัวอย่าง บี-ซีรั่ม ดังรูปที่ 11และ12 และจากผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างซี-ซีรั่ม พบว่า เชื้อ *Rigidoporus*

lignosus ถูกยับยั้งการเจริญได้ดีพอสมควร ดังรูปที่ 13 และแสดงรูปเปรียบเทียบของเชื้อราที่ไม่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างซี-ซีรั่ม ดังรูปที่ 14, 15 และ 16



a b

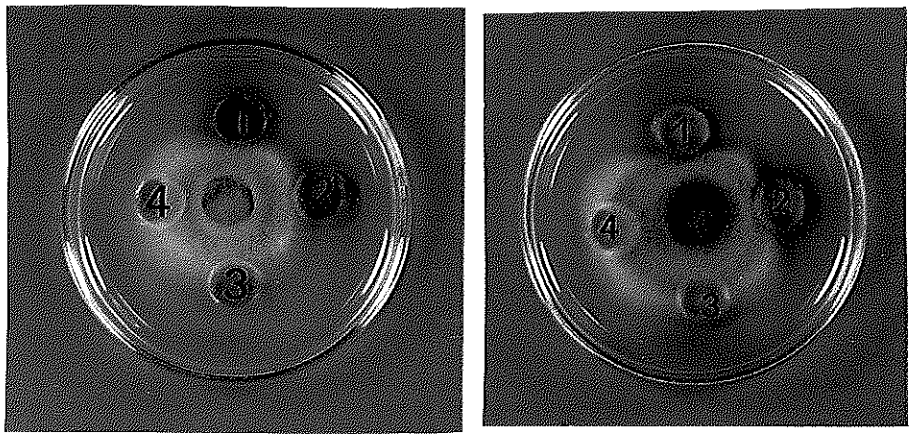
รูปที่ 9 แสดงรูปของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้ด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม จากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 (a) และพันธุ์ GT1 (b)

หลุมที่ 1 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 (a) และพันธุ์ GT1(b) ที่ไม่ถูกเจือจาง ปริมาณโปรตีน 480 ไมโครกรัม (0.412 ยูนิต)และ 600 ไมโครกรัม (0.48 ยูนิต) ตามลำดับ

หลุมที่ 2 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 (a) และพันธุ์ GT1(b) ที่ถูกเจือจางลง 1:2 เท่า ปริมาณโปรตีน 240 ไมโครกรัม (0.206 ยูนิต) และ 300 ไมโครกรัม (0.24 ยูนิต) ตามลำดับ

หลุมที่ 3 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 (a) และพันธุ์ GT1(b) ที่ถูกเจือจางลง 1:4 เท่าปริมาณโปรตีน 120 ไมโครกรัม (0.103 ยูนิต) และ 150 ไมโครกรัม (0.12 ยูนิต) ตามลำดับ

หลุมที่ 4 น้ำกลั่นปริมาตร 40 ไมโครลิตร เป็นหลุมควบคุม(control)



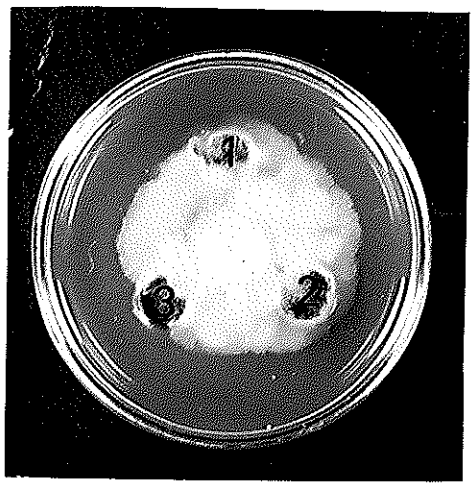
รูปที่ 10 แสดงรูปของเชื้อรา *Cuvularia sp.* ที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายรา ได้ด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม จากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 (a) และพันธุ์ GT1 (b)

หลุมที่ 1 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 (a) และพันธุ์ GT1(b) ที่ไม่ถูกเจือจาง ปริมาณโปรตีน 480 ไมโครกรัม (0.412 ยูนิต)และ 600 ไมโครกรัม (0.48ยูนิต) ตามลำดับ

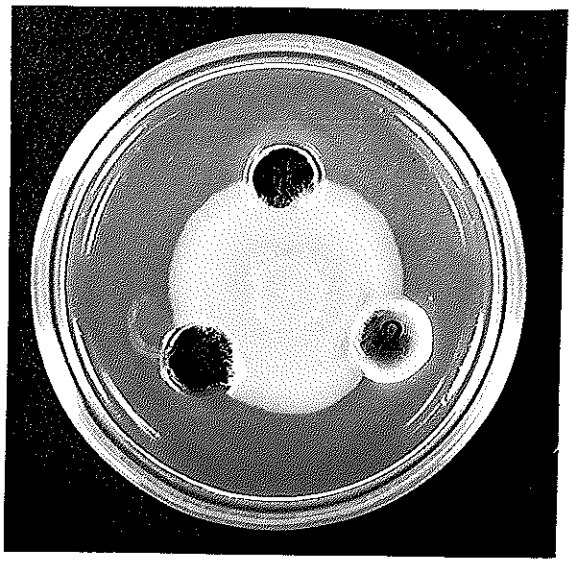
หลุมที่ 2 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 (a) และพันธุ์ GT1(b) ที่ถูกเจือจางลง 1:2 เท่า ปริมาณโปรตีน 240 ไมโครกรัม (0.206 ยูนิต) และ 300 ไมโครกรัม (0.24 ยูนิต) ตามลำดับ

หลุมที่ 3 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 (a) และพันธุ์ GT1(b) ที่ถูกเจือจางลง 1:4 เท่าปริมาณโปรตีน 120 ไมโครกรัม (0.103 ยูนิต) และ 150 ไมโครกรัม (0.12 ยูนิต) ตามลำดับ

หลุมที่ 4 น้ำกลั่นปริมาตร 40 ไมโครลิตร เป็นหลุมควบคุม(control)



รูปที่ 11



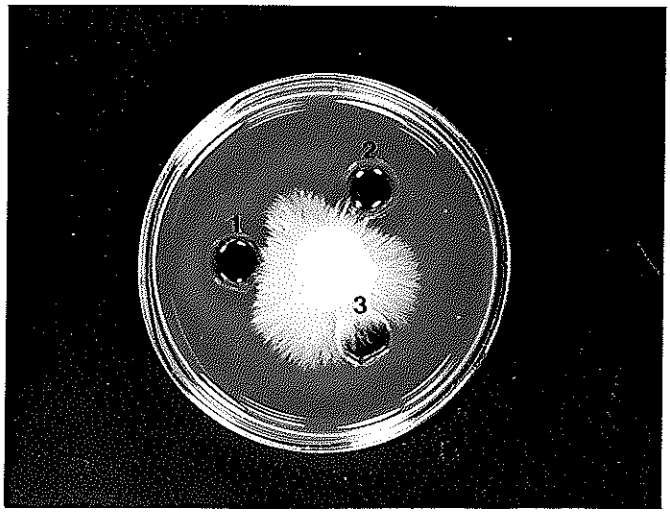
รูปที่ 12

รูปที่ 11 และ 12 แสดงรูปของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* และ *Colletotrichum gloeosporioides*ที่ไม่ถูกยับยั้งการเจริญของสายรา ด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม จากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1

หลุมที่ 1 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 ที่ไม่ถูกเจือจาง ปริมาณโปรตีน 480 ไมโครกรัม (0.412 ยูนิต)

หลุมที่ 2 สารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ GT1 ที่ไม่ถูกเจือจาง ปริมาณโปรตีน 600 ไมโครกรัม (0.48 ยูนิต)

หลุมที่ 3 น้ำกลั่นปริมาตร 40 ไมโครลิตร เป็นหลุมควบคุม(control)

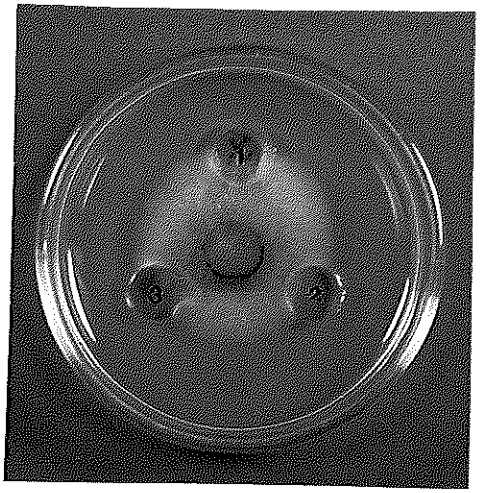


รูปที่ 13 แสดงรูปของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้ด้วยสารตัวอย่าง ซี-ซีรั่มจากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1

หลุมที่ 1 สารตัวอย่างซี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 ปริมาณโปรตีน 423.2 ไมโครกรัม (0.14 ยูนิต)

หลุมที่ 2 สารตัวอย่างซี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ GT1 ปริมาณโปรตีน 400 ไมโครกรัม (0.13 ยูนิต)

หลุมที่ 3 น้ำกลั่นปริมาตร 40 ไมโครลิตร เป็นหลุมควบคุม(control)



รูปที่ 14

รูปที่ 15

รูปที่ 16

รูปที่ 14, 15 และ 16 **แสดงรูปของเชื้อรา** *Curvularia sp.* , *Phytophthora botryosa* **และ** *Colletotrichum gloeosporioides* **ที่ไม่ถูกยับยั้งการเจริญของสายรา ด้วยสารตัวอย่าง ซี-ซีรั่มจาก ยางพันธุ์** RRIM600 **และพันธุ์** GT1

หลุมที่ 1 สารตัวอย่างซี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 ปริมาณโปรตีน 423.2 ไมโครกรัม (0.14 ยูนิต)

หลุมที่ 2 สารตัวอย่างซี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ GT1 ปริมาณโปรตีน 400 ไมโครกรัม (0.13 ยูนิต)

หลุมที่ 3 น้ำกลั่นปริมาตร 40 ไมโครลิตร เป็นหลุมควบคุม(control)

3.6.1.3. ผลของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มที่ความเข้มข้นลดลงเป็น 2 เท่าตามลำดับ (two-folds dilution) ต่อการยับยั้งการเจริญของสายรา

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา โดยใช้สารตัวอย่างบี-ซีรั่มที่ไม่ถูกเจือจางจากยางทั้งสองพันธุ์ ที่มีปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์ดังตารางในหัวข้อ 3.7.1.1 พบว่า เชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้คือ เชื้อรา *Rigidoporus lignosus* และ *Curvularia sp.* ดังนั้นจึงเลือกเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้มาทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเจือจางสารตัวอย่างแบบลดลงเป็น 2 เท่าตามลำดับ (two-folds dilution) โดยใช้สารตัวอย่างบี-ซีรั่ม จากยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนตั้งแต่ 0.47-240 ไมโครกรัม และความเข้มข้นตั้งแต่ 0.6-300 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมทดสอบ พบว่า เชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้ด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยางทั้งสองพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นลดลงเป็น 128 เท่า คิดเป็นปริมาณโปรตีน จากสารตัวอย่างบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 เท่ากับ 3.75 (0.0032 ยูนิต) และ 4.69 (0.0037 ยูนิต) ไมโครกรัมตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้นลดลงตั้งแต่ 256-1024 เท่า ไม่มีผลการยับยั้งการเจริญของสายราเลย ส่วนเชื้อรา *Curvularia sp.* จะถูกยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม ที่ระดับความเข้มข้นลดลงเป็น 4 เท่า คิดเป็นปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 เป็น 120 (0.103 ยูนิต) และ 150 (0.12 ยูนิต) ไมโครกรัม ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นลดลงตั้งแต่ 8-1024 เท่า ไม่มีผลการยับยั้งการเจริญของสายรา ของเชื้อรา *Curvularia sp.*

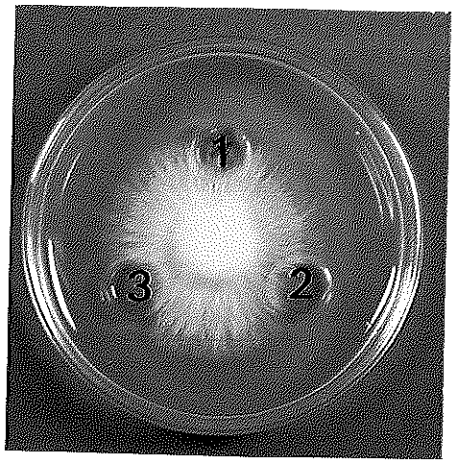
3.6.1.4 ผลของสารตัวอย่างซี-ซีรั่มต่อการยับยั้งการเจริญของสายรา

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา พบว่า สารตัวอย่างซี-ซีรั่ม จากยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 423.2 ไมโครกรัม (0.14 ยูนิต) และ 400 ไมโครกรัม (0.13 ยูนิต) ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของสายราของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ได้เพียงชนิดเดียว จากทั้งหมด 7 เชื้อ

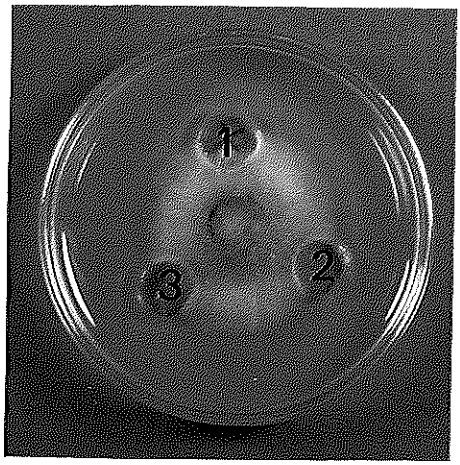
3.6.1.5. ผลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI)และไอโซไซม์ที่2(GII) ต่อการยับยั้งการเจริญของสายรา

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา พบว่าเชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้ด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่มที่ไม่ถูกเจือจางและสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม

ที่มีความเข้มข้นลดลง แบบ two-folds dilution ได้มีจำนวน 2 เชื้อ จากทั้งหมด 7 เชื้อคือ เชื้อรา *Rigidiporus lignosus* และ *Curvularia sp.* ซึ่งเชื้อราทั้งสองชนิดนี้จะถูกนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายราต่อด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ เนื่องจากว่าเชื้อราทั้งสองชนิดนี้มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ส่วนใหญ่เป็นไคติน และ เบต้า-กลูแคน ซึ่งเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสน่าจะสามารถย่อยสลายพันธะในส่วนที่เป็นเบต้า-กลูแคนที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราทั้งสองชนิดนี้ได้ สำหรับเชื้อราที่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราด้วยสารตัวอย่างบี-ซีรั่มแล้ว พบว่าไม่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราเลย แต่เนื่องจากมี เบต้า-กลูแคนเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์จึงได้นำมาทำการทดสอบด้วย คือ เชื้อรา *Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora* โดยที่เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ ที่นำมาทดสอบมีปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 2.8 (0.03 ยูนิต) และ 34.6 (0.26 ยูนิต) ไมโครกรัม ตามลำดับ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อราทั้ง 4 ชนิด ไม่สามารถถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้ ดังแสดงในรูปที่ 17, 18 และ 19



รูปที่ 17



รูปที่ 18

รูปที่ 19

รูปที่ 17, 18 และ 19 แสดงรูปของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus, Curvularia sp. และ Phytophthora botryosa* ที่ไม่ถูกยับยั้งการเจริญของสายรา ด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) และไอโซไซม์ที่2(GII)

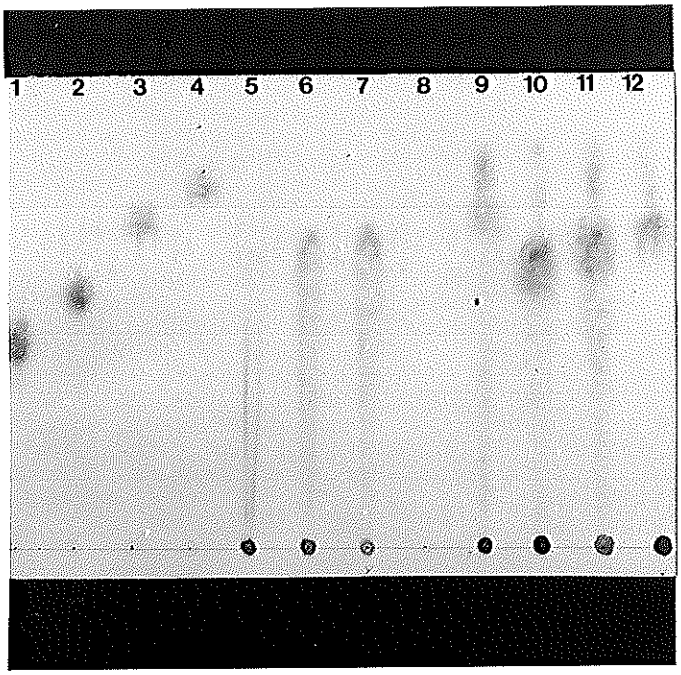
หลุมที่ 1 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) มีปริมาณโปรตีน 2.8 ไมโครกรัม (0.03 ยูนิต)

หลุมที่ 2 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2(GII) มีปริมาณโปรตีน 34.6 ไมโครกรัม (0.26 ยูนิต)

หลุมที่ 3 บัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์ Con A agarose ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

3.7. ผลการทำโครมาโทกราฟีบนชั้นบาง (Thin-layer chromatography)

ผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตลามินาริน โดยไอโซไซม์ GI และ GII ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กันคือ 1, 30 และ 120 นาที ดังแสดงในรูปที่ 20 พบว่า ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น (initial product) หลังจากที่ ไอโซไซม์ GI และ GII ทำปฏิริยากับลามินารินเป็นเวลา 1 นาที คือ (1→3)-β-D-oligosaccharides ที่มี degree of polymerization (DP) มากกว่า 4 และหลังจากทำปฏิกิริยานาน 30 นาที และ 120 นาที ไอโซไซม์ GI จะย่อยได้ ผลิตภัณฑ์ คือ ลามินาริไบโอส ส่วนไอโซไซม์ GII จะได้ ผลิตภัณฑ์ คือ ลามินาริไบโอส เช่นกัน เนื่องจากไอโซไซม์ GII ที่ใช้ทดลองเป็นเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการไดอะไลซ์ (dialyse) เอาเกลือและน้ำตาลแมนโนสในบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างและชะคอลัมน์ Con A agarose ออก ทำให้สารตัวอย่างที่เป็นหลอดควบคุม (control) เกิดแถบสีด้วย แต่จากรูปแถบสีของหลอดควบคุมนั้นไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ ที่ได้มาจากการย่อยสับสเตรตลามินารินโดยเอนไซม์



รูปที่ 20 โครมาโทกราฟีบนชั้นบาง (Thin-layer chromatography) ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตลามินารินโดยไอโซไซม์ GI และ GII

ช่องที่ 1 cellotetraose 4 ไมโครกรัม

ช่องที่ 2 cellotriose 4 ไมโครกรัม

ช่องที่ 3 laminaribiose 4 ไมโครกรัม

ช่องที่ 4 glucose 4 ไมโครกรัม

ช่องที่ 5,6 และ 7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตลามินาริน โดยไอโซไซม์ GI ที่เวลา 1 30 และ 120 นาที

ช่องที่ 8 ไอโซไซม์ GI ในหลอดควบคุม (control)

ช่องที่ 9,10 และ 11 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตลามินาริน โดยไอโซไซม์ GII ที่เวลา 1 30 และ 120 นาที

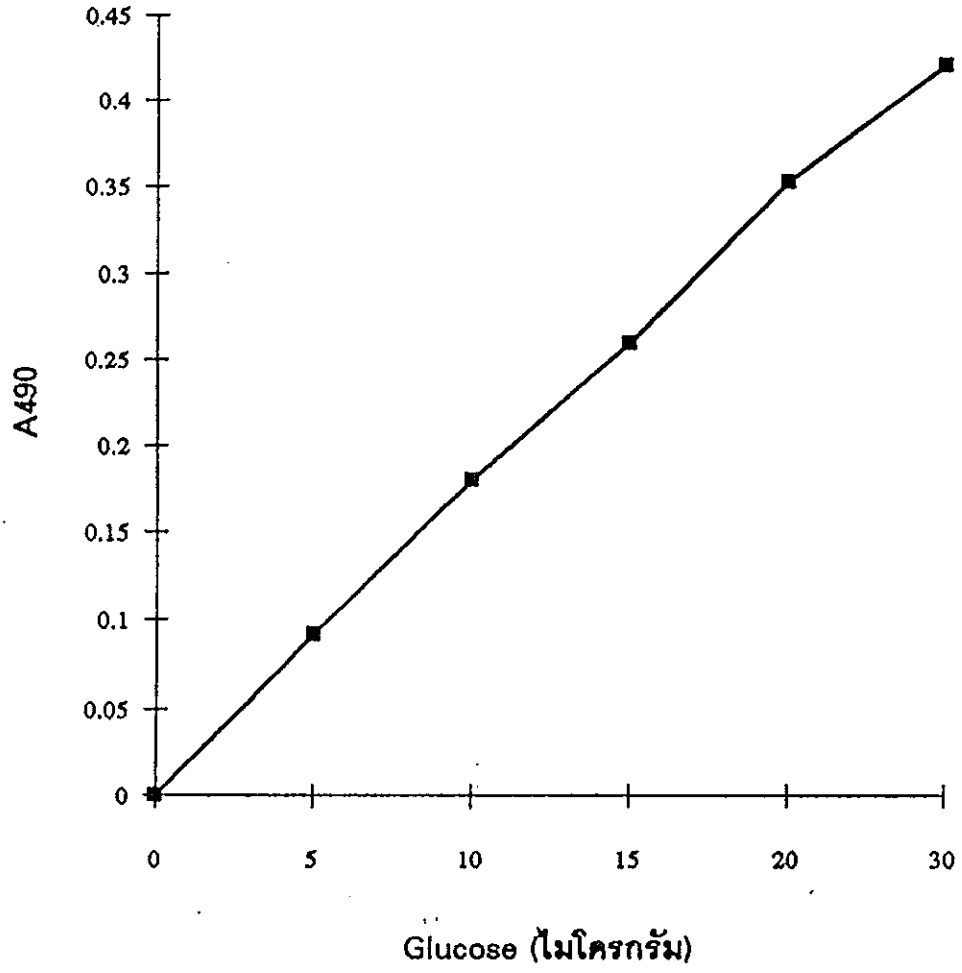
ช่องที่ 12 ไอโซไซม์ GII ในหลอดควบคุม (control)

3.8. ผลการหาค่าปริมาณน้ำตาลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) และไอโซไซม์ที่2(GII)

จากการใช้สารตัวอย่างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) มีปริมาณโปรตีน 10.9 ไมโครกรัม และไอโซไซม์ที่2(GII) มีปริมาณโปรตีน 64.67 ไมโครกรัม มาหาปริมาณน้ำตาล ตามวิธีของ Dubois และคณะ(1956) เทียบจากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส พบว่า GI และ GII มีปริมาณน้ำตาล (neutral sugar) คิดเป็น 31.45% และ 4.43% ตามลำดับ

ผลการทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส มีค่า slope เท่ากับ 0.016 สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำตาล ได้จากสูตร

ปริมาณน้ำตาล = A_{490}/slope



รูปที่ 21 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เป็น 3, 5, 10, 15 20 และ 30 ไมโครกรัม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

3.9. ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากน้ำยางพารา

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI)และไอโซไซม์ที่2(GII) สามารถสลายพันธะได้ดีกับสับสเตรต ลามาริน และ ซีเอ็ม-พาไคแมน แต่ไม่สามารถสลายพันธะของสับสเตรต ไลชินิน, พัสทิวแลน, กลูแคนจากยีสต์ และ กลูแคนจากบาร์เลย์ ได้ พบว่าความสามารถในการย่อยสับสเตรตระหว่าง GI และ GII มีความแตกต่างกัน โดยที่ไอโซไซม์ GI สามารถย่อยสลายพันธะของสับสเตรต ลามินาริน ได้ดีกว่า ซีเอ็ม-พาไคแมน ประมาณ 82% (เมื่อเทียบให้อัตราเร็วสัมพัทธ์ในการย่อย ลามินารินเป็น 100%) ส่วนไอโซไซม์ GII สามารถย่อยสลายพันธะของสับสเตรต ซีเอ็มพาไคแมน ได้ดีกว่า ลามินาริน ประมาณ 71.47% (เมื่อเทียบให้อัตราเร็วสัมพัทธ์ในการย่อย ซีเอ็ม-พาไคแมน เป็น 100%) ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 **อัตราเร็วสัมพัทธ์** (relative rate) **ในการย่อยสับสเตรตที่เป็นแหล่งเบต้า-ดี-กลูแคน โดยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) และ ไอโซไซม์ที่2(GII)**

เมื่อกำหนดให้อัตราเร็วสัมพัทธ์ในการย่อยสับสเตรตลามินารินเป็น 100%

สับสเตรต	อัตราเร็วสัมพัทธ์ (%)
	GI
ลามินาริน (*Laminaria digitata*)	100
ซีเอ็ม-พาไคแมน (*Poria cocos*)	18

กำหนดให้อัตราเร็วสัมพัทธ์ในการย่อยสับสเตรต ซี-เอ็มพาไคแมน เป็น 100%

สับเตรต	อัตราเร็วสัมพัทธ์ (%)
	GII
ซีเอ็ม-พาไคแมน (*Poria cocos*)	100
ลามินาริน (*Laminaria digitata*)	28.53

หมายเหตุ GI และ GII ที่ใช้ในการทดสอบ มีค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 3.76 และ 3.50 ยูนิตต่อมก.ตามลำดับ (สับสเตรตที่ใช้ในการหาความว่องไวจำเพาะ คือ ลามินาริน ความเข้มข้น 2 มก.ต่อมล.)

3.10. ผลการศึกษาสมบัติทางอิมมูนวิทยาของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากน้ำยางพารา

3.10.1. การสังเคราะห์แอนติบอดีในกระต่าย

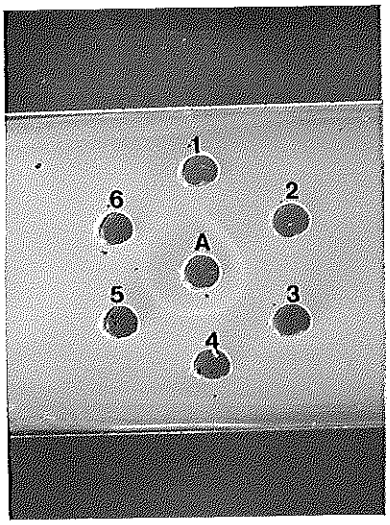
จากการฉีดกระต่ายด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2(GII) บริสุทธิ์ (ชะออกมาจากคอลัมน์ Con A agarose) ปริมาณครั้งละ 450 ไมโครกรัม พบว่า จากการทดสอบด้วยวิธี ring test in capillary tube กระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อเอนไซม์ได้โดยจะเริ่มสังเคราะห์แอนติบอดีหลังจากฉีดเอนไซม์ครั้งที่ 4 ได้ 1 อาทิตย์และสังเคราะห์มากขึ้นเป็นเวลาประมาณ 2 อาทิตย์จึงค่อยๆ ลดลง ทั้งนี้จะไม่พบแอนติบอดีต่อเอนไซม์ในซีรั่มกระต่ายก่อนการฉีดแอนติเจนและหลังการฉีดแอนติเจนครั้งที่1 ถึงครั้งที่ 3

3.10.2. การแยกแอนติบอดีจากซีรั่ม

ในการแยกแอนติบอดี ต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2(GII) บริสุทธิ์ จากซีรั่มจำนวน 22 มิลลิลิตร โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50% ได้ปริมาณโปรตีน IgG จำนวน 70.28 มิลลิกรัม และนำไปทดสอบด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1949)

3.10.3 การตรวจสอบการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะ ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1(GI) และไอโซไซม์ที่2(GII) ต่อแอนติบอดี โดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion

จากการตรวจสอบการตอบสนองทางอิมมูนวิทยา พบว่า ทั้งไอโซไซม์ GI และ GII สามารถเกิดปฏิกิริยาทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะต่อแอนติบอดี ได้ดี ดังรูปที่ 22 และรูปที่ 23



รูปที่ 22 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GI) จากน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM600

A = แอนติบอดี ต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2(GII)

1 = น้ำกลั่น

2 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GI) 8.32 ไมโครกรัม

3 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GI) 6 ไมโครกรัม

4 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GI) 3 ไมโครกรัม

5 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GI) 1.5 ไมโครกรัม

6 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GI) 0.75 ไมโครกรัม

รูปที่ 23 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2 (GII) จากน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM600

A = แอนติบอดี ต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2(GII)

1 = น้ำกลั่น

2 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GII) 9.95 ไมโครกรัม

3 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GII) 6 ไมโครกรัม

4 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GII) 3 ไมโครกรัม

5 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GII) 1.5 ไมโครกรัม

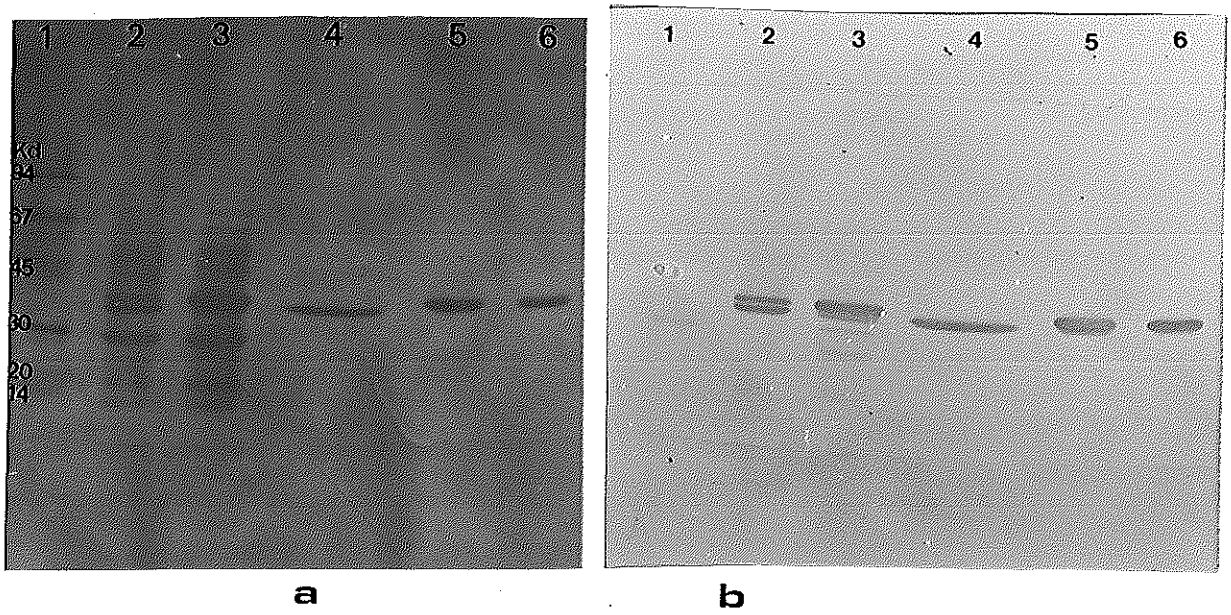
6 = เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่1 (GII) 0.75 ไมโครกรัม

3.10.4. การตรวจสอบการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยวิธี Western blot

3.10.4.1. การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในส่วนต่าง ๆของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1

เปรียบเทียบลักษณะที่ต่างกันของรูปแบบ (pattern) โปรตีนที่ได้จากสารตัวอย่างบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์ โดยวิธี Western blot จากแถบโปรตีนในรูปที่ 25 พบว่าในบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 มีแถบโปรตีนที่มีการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี ซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่2 (GII) ชัดเจนเพียงแถบเดียวคือ ตรงตำแหน่งของ GII ส่วนแถบโปรตีนตรงตำแหน่งของ GI มองเห็นไม่ชัดเจน ส่วนในบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 มีแถบโปรตีนที่มีการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี GII ชัดเจน 2 แถบคือ ตรงตำแหน่งของ GI และ GII นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ GI มีการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี GII ได้ดีพอๆกับเอนไซม์ GII หรือแอนติเจน ดังรูปที่ 24

เปรียบเทียบลักษณะที่ต่างกันของรูปแบบ (patten) โปรตีนที่ได้จากสารสกัดจากใบยางอ่อนของยางทั้งสองพันธุ์ โดยวิธี Western blot โดยใช้แถบโปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรั่ม เป็นตัวเปรียบเทียบ จากรูปที่ 26 พบว่า แถบโปรตีนของสารสกัดใบยางอ่อนของยางทั้งสองพันธุ์ มีการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี GII จำนวน 4 แถบ



รูปที่ 24 เปรียบเทียบแถบโปรตีนจากสารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยาง 2 พันธุ์ และไอโซไซม์ GI และGII บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 (a) และ จากการทำ Western blot (b)

ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน

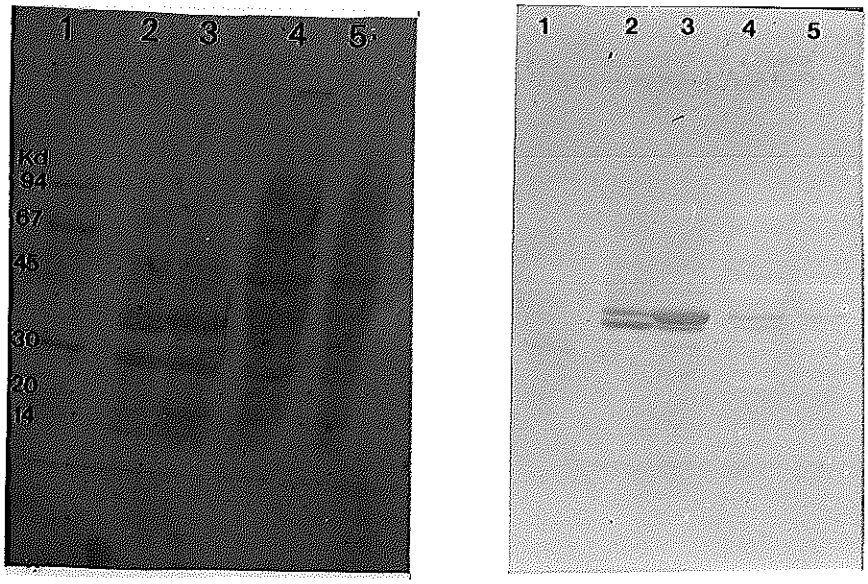
ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มของพันธุ์ RRIM600 มีปริมาณโปรตีน 26 ไมโครกรัม

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มของพันธุ์ GT1 มีปริมาณโปรตีน 33.2 ไมโครกรัม

ช่องที่ 4 เป็นแถบโปรตีนของไอโซไซม์ GI มีปริมาณโปรตีน 16 ไมโครกรัม

ช่องที่ 5 เป็นแถบโปรตีนของไอโซไซม์ GII ที่มี GI ผสมอยู่เล็กน้อย มีปริมาณโปรตีน 8.5 ไมโครกรัม

ช่องที่ 6 เป็นแถบโปรตีนของไอโซไซม์ GII หรือแอนติเจน มีปริมาณโปรตีน 7.4 ไมโครกรัม



รูปที่ 25 **เปรียบเทียบแถบโปรตีนจากสารตัวอย่างบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์ โดยวิธี** Western blot **ย้อมด้วยสี** Coomassie brilliant blue R250 (a), ตรวจสอบด้วย peroxidase conjugated with goat anti-rabbit IgG (b)

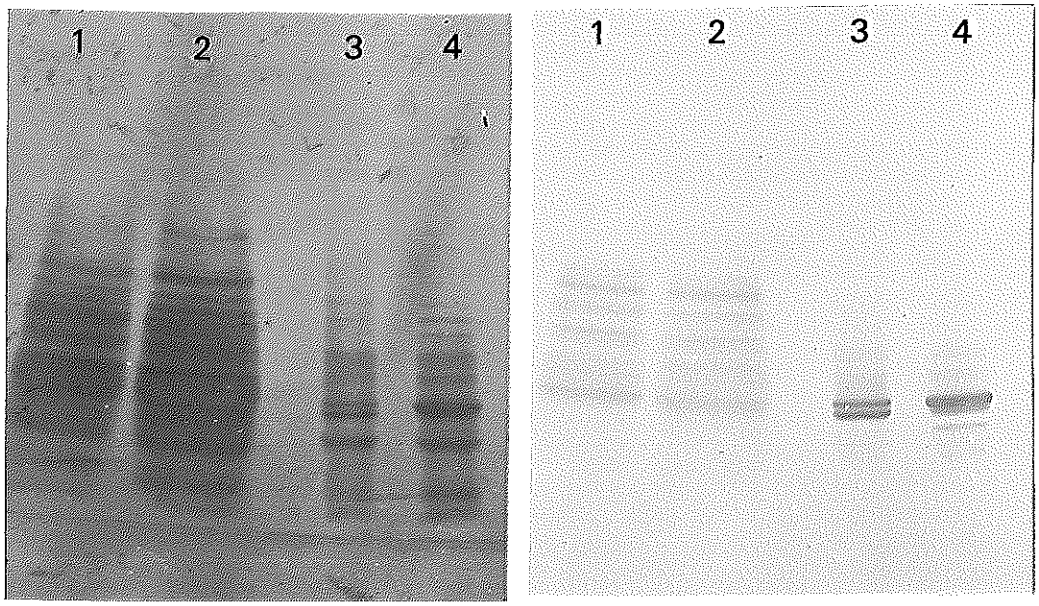
ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 มีปริมาณโปรตีน 26 ไมโครกรัม (0.015 ยูนิต)

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 มีปริมาณโปรตีน 33.2 ไมโครกรัม (0.02 ยูนิต)

ช่องที่ 4 เป็นแถบโปรตีนซี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 มีปริมาณโปรตีน 47.61 ไมโครกรัม (0.03 ยูนิต)

ช่องที่ 5 เป็นแถบโปรตีนซี-ซีรั่มของพันธุ์ GT1 มีปริมาณโปรตีน 45 ไมโครกรัม (0.03 ยูนิต)



รูปที่ 26 เปรียบเทียบแถบโปรตีนจากสารสกัดใบยางอ่อนของยางทั้งสองพันธุ์ โดยวิธี Western blot ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R250 (a), ตรวจสอบด้วย peroxidase conjugated with goat anti-rabbit IgG (b)

ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนของสารสกัดใบยางอ่อนของพันธุ์ RRIM600

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีนของสารสกัดใบยางอ่อนของพันธุ์ GT1

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนบี-ซีรั่มของพันธุ์ RRIM600

ช่องที่ 4 เป็นแถบโปรตีนบี-ซีรั่มของพันธุ์ GT1

3.11. ผลของการเกิดบาดแผล (wounding) ต่อความว่องไวของเอนไซม์และรูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1

3.11.1. ศึกษาในยางต้นอ่อนทั้งสองพันธุ์

3.11.1.1 ค่าความว่องไวรวม (total activity) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 เมื่อเกิดบาดแผล (wounding) จากการกรีด

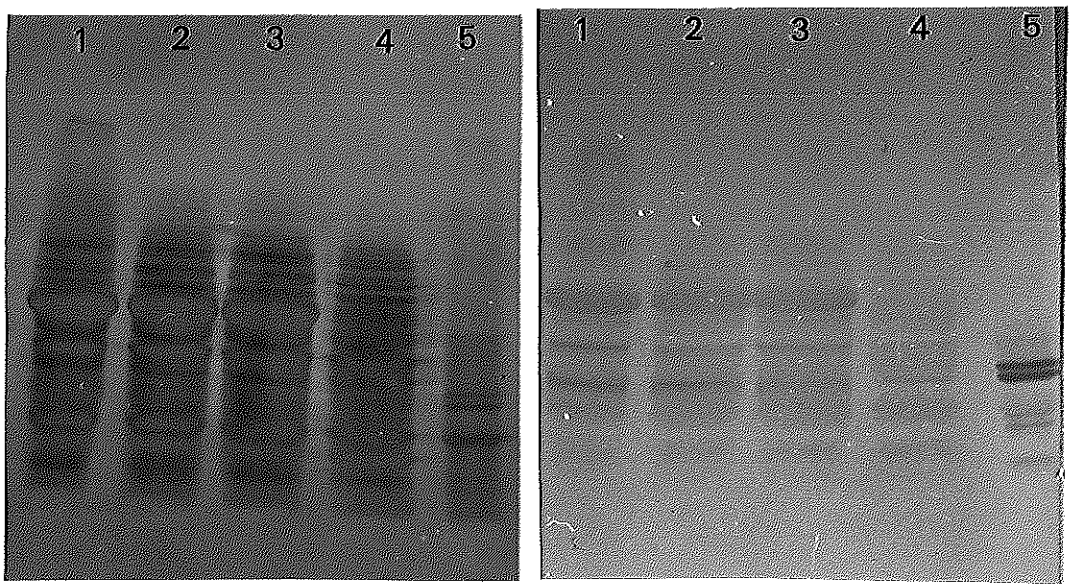
พันธุ์ยาง RRIM600	ความว่องไวรวม (ยูนิต/มล.)
กรีดครั้งที่ 1	2.78
กรีดครั้งที่ 2	2.69
กรีดครั้งที่ 3	2.24

พันธุ์ยาง GT1	ความว่องไวรวม (ยูนิต/มล.)
กรีดครั้งที่ 1	3.09
กรีดครั้งที่ 2	3.67
กรีดครั้งที่ 3	3.27

เมื่อเปรียบเทียบค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 หลังจากการกรีด ผลการเปรียบเทียบพบว่า ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์หลังการกรีดทั้ง 3 ครั้งในยางทั้ง 2 พันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์หลังการกรีดเมื่อเทียบกันระหว่างพันธุ์พบว่า ในยางต้นอ่อนพันธุ์ GT1 นั้นค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์จากการกรีดรวม 3 ครั้งจะมากกว่าในยางต้นอ่อนพันธุ์ RRIM600 แต่ก็ไม่ชัดเจนนักเมื่อเทียบจากปริมาณน้ำยางเพียง 1 มิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากสามารถเก็บน้ำยางจากต้นยางอ่อนได้เพียงเล็กน้อย ประมาณ 200 ไมโครลิตรต่อต้น จึงต้องเก็บน้ำยางแบบรวมกันทั้ง 10 ต้น แล้วนำมาหาค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถหาค่าความเบี่ยงเบนของค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ จากยางแต่ละต้นได้

3.11.1.2. ผลการศึกษารูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หลังการเกิดบาดแผล (wounding) ในยางต้นอ่อนทั้ง 2 พันธุ์ โดยวิธี Western blot

เปรียบเทียบลักษณะที่ต่างกันของรูปแบบ (pattern) โปรตีนที่ได้จากการผสมกันของซี-ซีรั่มและบี-ซีรั่ม ของยางทั้ง 2 พันธุ์ โดยวิธี Western blot โดยใช้โปรตีนของสารตัวอย่างบี-ซีรั่มจากยาง 2 พันธุ์ เป็นตัวเปรียบเทียบ จากแถบโปรตีนในรูปที่ 27 และ28 พบว่า โปรตีนในบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 มีแถบโปรตีนที่มีการตอบสนองทางอิมมูนวิทยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่ 2 (GII) เป็น 2 แถบ ชัดเจนคือ ตรงตำแหน่งของ GI และ GII เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 มีแถบโปรตีนชัดเจนเพียงแถบเดียวคือ ตรงตำแหน่งของ GII ส่วนแถบโปรตีนที่ตรงตำแหน่งของ GI มีน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของส่วนผสมของซี-ซีรั่มและบี-ซีรั่มในยางต้นอ่อนพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์GT1 พบว่ามีแถบโปรตีนที่ตอบสนองอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี จำนวน 3 แถบ ซึ่งไม่ ตรงกับตำแหน่งของทั้ง GI และ GII



รูปที่ 27 เปรียบเทียบแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มในยางพันธุ์ RRIM600 หลังการเกิดบาดแผล (wounding) โดยวิธี Western blot ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R250 (a), ตรวจสอบด้วย peroxidase conjugated with goat anti-rabbit IgG (b)

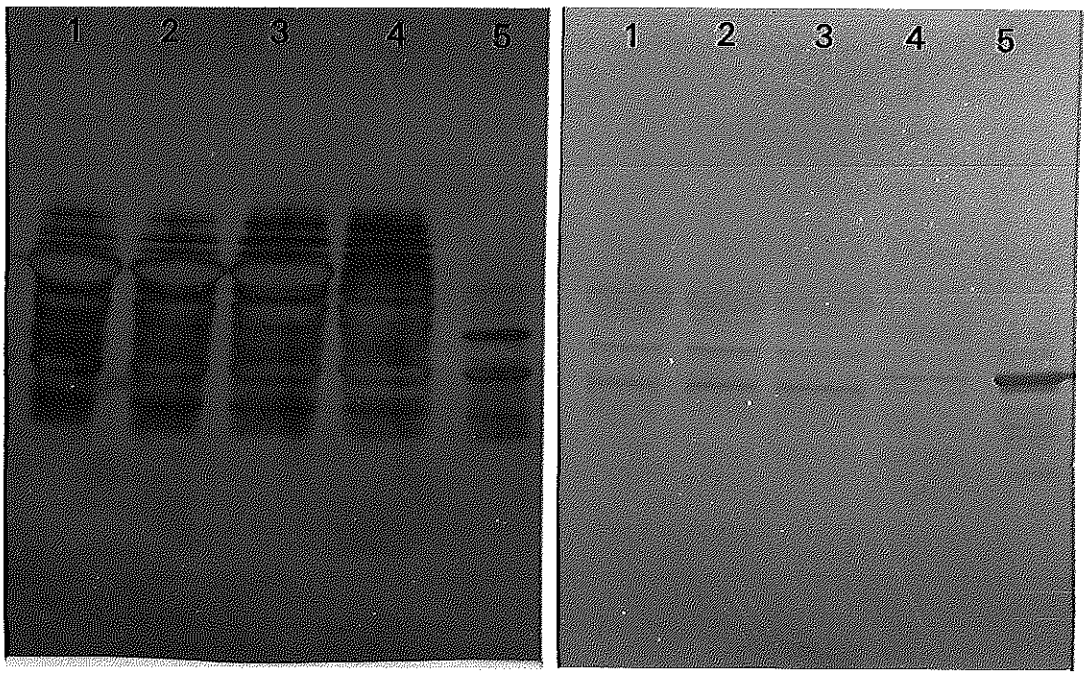
ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มของยางต้นอ่อนพันธุ์ RRIM600 จากการกรีดครั้งที่1

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มของยางต้นอ่อนพันธุ์ RRIM600 จากการกรีดครั้งที่2

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มของยางต้นอ่อนพันธุ์ RRIM600 จากการกรีดครั้งที่3

ช่องที่ 4 เป็นแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มของยางต้นแก่พันธุ์ RRIM600

ช่องที่ 5 เป็นแถบโปรตีนบี-ซีรั่มของพันธุ์ RRIM600



รูปที่ 28 เปรียบเทียบแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มในยางพันธุ์ GT1 หลังการเกิดบาดแผล (wounding) โดยวิธี Western blot ,ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R250 (a), ตรวจสอบด้วย peroxidase conjugated with goat anti-rabbit IgG (b)

ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มของยางต้นอ่อนพันธุ์ GT1 จากการกรีดครั้งที่1

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มของยางต้นอ่อนพันธุ์ GT1 จากการกรีดครั้งที่2

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มของยางต้นอ่อนพันธุ์ GT1 จากการกรีดครั้งที่3

ช่องที่ 4 เป็นแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มผสมกับซี-ซีรั่มของยางต้นแก่พันธุ์ GT1

ช่องที่ 5 เป็นแถบโปรตีนบี-ซีรั่มของพันธุ์ GT1

4. วิจารณ์

4.1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากส่วนของบี-ซีรั่มในน้ำยางพารา พันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1

จากผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ แลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose (กราฟรูปที่ 2) และ โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ Concanavalin A agarose (กราฟรูปที่ 3) พบว่ามีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์คือ GI และ GII ซึ่งจากการศึกษาของ อาภรณ์ สันตะโร (2538) ทั้งสองไอโซไซม์มีความว่องไวในปฏิกิริยาเดียวกัน แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพต่างกันเล็กน้อย เช่น มีความว่องไวสูงที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส และมีความทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส เหมือนกัน แต่มีความว่องไวใน pH ที่ต่างกันเล็กน้อย คือ pH 5.0 สำหรับ GI และ pH 5.5 สำหรับ GII ส่วน ค่า Km และค่า Vmax นั้นใกล้เคียงกัน และทั้งสองไอโซไซม์สามารถแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose (bound CM) ที่ pH 6.0 ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ และผลจากการทำเจลอิเลคโตรฟอริซิสแบบ SDS-PAGE เพื่อเปรียบเทียบลักษณะที่ต่างกันของโปรตีนในบี-ซีรั่ม ของยาง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ RRIM600 (รูปที่ 6) และพันธุ์ GT1 (รูปที่ 7) พบว่า ในบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 มีแถบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ชัดเจนอยู่ 2 แถบคือ ตรงตำแหน่ง GI และ GII ส่วนในบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 มีแถบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ชัดเจนเพียงแถบเดียว คือ ตรงตำแหน่งของ GII ส่วนแถบโปรตีนตรงตำแหน่งของ GI มีน้อยมากหรือไม่มีเลยในบางการทดลอง จากการศึกษาของ อาภรณ์ สันตะโร (2538) พบว่า บี-ซีรั่มในยางพาราพันธุ์ RRIM600 เมื่อนำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จะมีค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสอยู่ในช่วงเกลือมีความเข้มข้น 40-50% และหลังจากไดอะไลซ์โปรตีนที่ตกตะกอนด้วยถุงไดอะไลซิส ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์แล้ว ค่าความว่องไวของเอนไซม์จะเหลือเพียง 5-10% เท่านั้น อาจเนื่องมาจากโปรตีนเกาะติดถุงไดอะไลซิสมากเกินไป ดังนั้นในการทำบริสุทธิ์ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่มของน้ำยางพันธุ์ GT1 จึงตัดขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตออกไป

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากส่วนของบี-ซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ GT1 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose (กราฟรูปที่ 4) และโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose (กราฟรูปที่ 5) ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 พบว่า มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII โดยที่ทั้งสองไอโซไซม์ สามารถจับเกาะกับ CM-cellulose ได้ดีใกล้เคียงกัน และถูกชะออกได้ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.6-1.4 M ซึ่งความเข้มข้นของเกลือที่ใช้จะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ อาภรณ์ สันตะโร (2538) ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากส่วนบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM600 โดยที่ทั้งสองไอโซไซม์จะถูกชะออกมาด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 0.6-1.0 M เนื่องจากพบว่า ที่ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 1.0 M ไม่สามารถชะเอนไซม์ทั้งสองไอโซไซม์ออกมาได้หมด จึงต้องเพิ่มความเข้มข้นของเกลือและเมื่อนำโปรตีนในส่วนที่เป็น bound CM ซึ่งถูกชะออกมาด้วยความเข้มข้นของเกลือสูงๆ มาทำเจลอิเลคโตรฟอริซิสแบบ SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีน 2 แถบที่อยู่ตรงตำแหน่งของ GI และGII ส่วนแถบโปรตีนอื่น ๆ มีปนมาเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าไอโซไซม์ทั้งสองนั้นต้องมีค่า pI ที่สูงมากจึงจับเกาะกับ CM-cellulose ที่pH 6.0 ได้แน่นมากเมื่อเทียบกับโปรตีนอื่น ๆ ที่ปนอยู่ในบี-ซีรั่มซึ่งจะมีค่า pI ต่ำกว่าจึงถูกชะออกมารวมอยู่ใน peak ที่เป็น unbound CM ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0-0.5 M ดังนั้น การชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ทำให้มีความเข้มข้นขึ้นเรื่อย ๆ (gradient) ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของเกลือ ที่สามารถชะเอนไซม์ทั้งสองไอโซไซม์ออกมาได้ จะเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ โดยทำให้แยกเอาโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกไปให้มากที่สุด เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ทั้งสองไอโซไซม์ คือ GI และ GII ที่ทำบริสุทธิ์จากบี-ซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 มีความแตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและอัตราส่วน (ratio) โดยจะพบว่า ในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM600 มีปริมาณของ GI มากกว่า GII ประมาณ 2 เท่า ต่างจากที่ศึกษาโดย อาภรณ์ สันตะโร (2538) ซึ่ง GI จะมากกว่า GII ประมาณ 3-4 เท่า ส่วนบี-ซีรั่ม ของยางพาราพันธุ์ GT1 พบว่า GII จะมีปริมาณมากกว่า GI ประมาณ 7 เท่า มีข้อสังเกตว่า อัตราส่วนของ GI:GII ในยางทั้งสองพันธุ์จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ในยางพาราพันธุ์ RRIM600 อัตราส่วนของ GI:GII ไม่ค่อยจะคงที่ พบว่า ในช่วงฤดูแล้งถึงช่วงฤดูฝน ปริมาณของ GII จะเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณใกล้เคียงกับ GI อาจเนื่อง

มาจากว่า ในช่วงหน้าแล้งมีการกรีดยางมากกว่าหน้าฝน ซึ่งการกรีดยางเป็นภาวะที่ทำให้ต้นยางเกิดบาดแผล ส่วนช่วงหน้าฝนต้นยางมีโอกาสติดเชื้อราได้ง่าย จึงชักนำให้เกิดการสร้าง GII มากขึ้น ส่วน GII ในยางพาราพันธุ์ GT1 ปกติจะมีการสร้างในปริมาณมากกว่าพันธุ์ RRIM600 อยู่แล้ว เมื่อมีการสร้างเพิ่มมากขึ้นจึงเห็นได้ไม่ชัดเจนเท่ากับในยางพาราพันธุ์ RRIM600 แต่อัตราส่วนของ GI:GII ในยางพันธุ์ GT1 จะมีลักษณะเดียวกันตลอด คือ ปริมาณของ GII จะมากกว่า GI เสมอ อาจจะอธิบายได้ว่า เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จัดเป็น PR โปรตีนที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อปกป้องตนเองจากการรุกรานของเชื้อโรค (infection), การเกิดบาดแผล (wounding), ภาวะกดดันจากสารเคมี (chemical stresses) และ สิ่งแวดล้อม (environmental stresses) ดังนั้น GII จากบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 จึงอาจถูกสร้างเพิ่มมากขึ้นในปฏิกิริยาตอบสนองต่อภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อม คือ ความแห้งแล้ง, การเกิดบาดแผลจากการกรีด และการติดโรคจากเชื้อรา นอกจากนี้ เอนไซม์ GII จากบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 ซึ่งเป็นยางพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคมากกว่ายางพันธุ์ RRIM600 จึงน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรค เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราในส่วนที่เป็น เบต้า-1,3-กลูแคนได้ (Mauch และคณะ 1989) เอนไซม์เบต้า-1,3กลูคาเนส ที่พบในยางพาราทั้งสองพันธุ์ อาจถูกสร้างขึ้นเนื่องจากอิทธิพลของเอทิลีนและจากการเจริญเติบโตตามปกติของพืชเอง ซึ่งจากการศึกษาของ Memelink และคณะ (1990) พบว่า มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสชนิดด่าง (basic glucanase) มากภายในเซลล์รากต้นยาสูบที่มีการเจริญตามปกติ ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Neale และคณะ (1990) ซึ่งพบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ถูกสร้างเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการออกดอกตามปกติของต้นยาสูบ นอกจากนี้การศึกษาของ Simmons และคณะ (1992) พบว่า ยีน*Gns1* β-glucanase ที่พบมากตามปกติในรากข้าว ก็อาจถูกชักนำให้สร้างมากขึ้นอีกเมื่อถูกกระตุ้นด้วย ฮอร์โมนเอทิลีน, salicylic acid, cytokinin และ fungal elicitors

4.2 คุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากยางพารา

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส สองไอโซไซม์ ที่พบในบี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์ จัดเป็น (1→3)-β-D-glucanohydrolase (EC 3.2.1.39) หรือ endohydrolase โดยที่สามารถย่อยสับสเตรตลามินารินแบบเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ จากผลการทำโครมาโทกราฟีบนชั้นบาง

(thin-layer chromatography), TLC พบว่า ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น (initial product) ที่ได้จากการย่อยลามินาริน ด้วยไอโซไซม์ GI และ GII เป็นเวลา 1 นาที คือ (1→3)-β-D-oligosaccharides ที่มี degree of polymerization (DP) มากกว่า 4 จากรูปที่ 20 และเมื่อทำปฏิกิริยานานขึ้นเป็น 30 และ 120 นาที ทั้งสองไอโซไซม์ สามารถย่อยลามินารินได้ ผลิตภัณฑ์ ส่วนใหญ่เป็น ลามินาริไบโอส จากรูปมีข้อสังเกตุว่าในช่องที่ 8 ที่เป็น หลอดควบคุม ของเอนไซม์ GI จะไม่พบแถบสีใดๆเลยแสดงให้เห็นว่า แถบสีของผลิตภัณฑ์ บนแผ่น TLC นั้นได้จากการย่อยสับสเตรตลามินารินโดยไอโซไซม์ GI จริงแต่เมื่อเปรียบเทียบกับช่องที่ 9 ซึ่งเป็น หลอดควบคุม ของไอโซไซม์ GII พบว่า จะเกิดแถบสีที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับแถบสีของน้ำตาลมาตรฐาน ลามินาริไบโอส และ แถบสีของผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากการย่อยลามินารินโดยเอนไซม์ GII สำหรับแถบสีที่เกิดขึ้นใน หลอดควบคุม ของ GII นั้นอธิบายได้ว่า เนื่องจาก GII เป็นเอนไซม์ที่ถูกชะออกจาก Con A agarose คอลัมน์ด้วย 0.2 M น้ำตาลแมนโนโซด์ หลังจากนั้นนำเอนไซม์ GII ที่ได้มาไดอะไลซ์ในถุงไดอะไลซิส เพื่อกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์และน้ำตาลแมนโนไซด์ออกในขั้นตอนการไดอะไลซ์ดังกล่าว อาภรณ์ สันตะโร (2538) พบว่า หลังจากไดอะไลซ์โปรตีนในบี-ซีรั่มที่ตกตะกอนด้วยแอมโมโนเนียมซัลเฟตให้อิ่มตัว 40-50% ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์แล้ว ค่าความว่องไวของเอนไซม์เหลือเพียง 5-10%เท่านั้น เนื่องจากโปรตีนเกาะถุงไดอะไลซิสมากเกินไป ดังนั้นในการไดอะไลซ์ GII จึงทำได้ในระยะเวลาเพียงสั้นๆ ซึ่งอาจมีผลทำให้ไม่สามารถกำจัดเอาน้ำตาลแมนโนไซด์ออกไปได้หมดแต่เนื่องจากว่า น้ำตาลแมนโนไซด์ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ แต่เป็นอนุพันธ์ไกลโคไซด์ (glycosides) ซึ่งไม่สามารถที่จะเกิดสีกับ spray reagent ที่ใช้ย้อม หยดของน้ำตาล aldose ที่เป็น ผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยลามินารินด้วยเอนไซม์ GII ได้ ดังนั้นแถบสีที่เกิดขึ้นใน หลอดควบคุมของ GII จึงไม่ใช่มาจากน้ำตาลแมนโนไซด์ เหตุผลหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ เป็นที่ทราบแล้วว่าบี-ซีรั่มเตรียมได้จากตะกอนก้นหลอดซึ่งมีลูทอยด์ เป็นออร์แกเนลล์สำคัญ ซึ่งจากการศึกษาของ Auzac และคณะ (1989) พบว่า ในลูทอยด์มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นประมาณ 5.8 mM และมีน้ำตาลอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบ ดังนั้น ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก บี-ซีรั่ม ก็จะมีน้ำตาลปนอยู่ด้วยในทุกขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยผ่าน Con A agarose คอลัมน์ น้ำตาลกลูโคส ที่ปนมาก็มีโอกาสที่จะจับเกาะกับ Con A agarose ได้ดังนั้นเอนไซม์ GII เมื่อถูกชะออกมาด้วย 0.2 M ของน้ำตาล แมโนไซด์ ก็ย่อมจะ

มีน้ำตาลกลูโคสปนออกมาด้วย ทำให้เกิดสีบน TLC plate ได้ การศึกษารูปแบบการย่อย สับสเตรตลามินารินด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่คล้ายคลึงกัน โดย Hrmova และ Fincher (1993) พบว่า ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตลามินาริน (*Laminaria digitata*) ด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GII และ GIII เป็นเวลา 1 นาทีและการย่อยด้วยไอโซไซม์ GI เป็นเวลา 10 นาที คือ (1→3)-β-D-oligosaccharides ที่มี DP 3-8 และเมื่อทำปฏิกิริยานานขึ้นเป็น 30 นาที ทั้งไอโซไซม์ GII และ GIII ก็สามารถย่อยลามินารินต่อได้เป็นลามินาริโบโอส สำหรับไอโซไซม์ GIII หลังจากทำปฏิกิริยานาน 2 ชั่วโมง ได้ ผลิตภัณฑ์ เป็นน้ำตาลกลูโคส และพบว่าหลังจากเกิดปฏิกิริยานาน 48 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ ที่ได้ส่วนใหญ่จากการย่อยของไอโซไซม์ GII และ GIII คือ ลามินาริโบโอส และ ลามินาริโตรโอส ในขณะที่ไอโซไซม์ GI ผลิตภัณฑ์สุดท้าย ที่ได้จากการย่อยลามินารินคือ (1→3)-β-D-oligosaccharides ที่มี DP มากกว่า 4 และจาก ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น ที่ได้จากการย่อยลามินารินนั้นเป็น (1→3)-β-D-oligosaccharides ที่มี DP ระหว่าง 3-8 ดังนั้น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสามไอโซไซม์ จึงถูกจัดเป็น เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส นอกจากนี้ Fleet และ Phaff (1974) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในเชื้อยีสต์ *Schizosaccharomyces japonicus var. versatilis 60-225* พบว่า สามารถแยกเอนไซม์ เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ด้วย ethylaminoethyl-chromatography และเอนไซม์ที่แยกได้สามารถย่อย (1→3)-linked glucan หรือสับสเตรตลามินารินความเข้มข้น 10 มก.ต่อมล. ได้โดยใช้เอนไซม์ 0.5 ยูนิตต่อมล. ทำปฏิกิริยากับลามินาริน เป็นเวลา 10 นาทีได้ ผลิตภัณฑ์เริ่มต้นเป็น ลามินาริโบโอส, ลามินาริโตรโอส และ ลามินาริเตตราโอส เมื่อทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะพบ ลามินาริโบโอส เพิ่มมากขึ้น และสุดท้ายหลังจากทำปฏิกิริยานาน 17 ชั่วโมงพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่คือ ลามินาริโบโอส และกลูโคส แต่ไม่พบ ลามินาริเตตราโอส เลยเนื่องจากว่าถูกย่อยเป็น ลามินาริโบโอส และกลูโคส จนหมด จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้เป็น เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่มีความจำเพาะในการจับกับ ลามินาริโตรโอส และจากการศึกษาของ อาภรณ์ สันตะโร (2538) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสอง ไอโซไซม์คือ GI และ GII มีคุณสมบัติเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส เนื่องจากให้ผลลบกับ สับสเตรต *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside ซึ่งเป็น *p*-nitrophenol ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็น สารอนุพันธ์ ผลการทดลองพบว่า ทั้งสองไอโซไซม์ไม่สามารถย่อยสับสเตรต *p*-nitrophenyl-β-D-glucoside แม้ว่าจะใช้ปริมาณ

เอนไซม์เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ลามินารินเป็นสับสเตรต และยังพบว่า ไอโซไซม์ทั้งสองเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์เส้นเดียว (monomeric protein) โดยที่เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่นแล้ว GI และ GII มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันเล็กน้อยคือ เท่ากับ 29.5 และ 33.1 Kd ตามลำดับ และจากการตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE ค่าน้ำหนักโมเลกุลของ GI และ GII เท่ากับ 31.6 และ 34.7 Kd ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลจากการตรวจสอบด้วย 2 วิธีใกล้เคียงกัน สำหรับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์จากบี-ซีรั่ม ของยางพันธุ์ GT1 พบว่าทั้งสองไอโซไซม์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE มีค่าน้ำหนักโมเลกุลของ GI และ GII เท่ากับ ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600

จากการที่ไอโซไซม์ GII สามารถจับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ซึ่งเป็น agarose ที่มีเลคติน Concanavalin A (Con A) เป็น ligand ที่สามารถจับจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาล α-D-mannose และ α-D-glucose ได้ (Reeke และ คณะ (1974) อ้างโดย สุปรีดี ไทยนุกูล (2534) แสดงให้เห็นว่า GII จากบี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์ มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนที่มี polysaccharide binding site เป็นน้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลแมนโนส เมื่อนำ GII มาหาปริมาณน้ำตาลโดยวิธี Phenol-sulfuric method ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) พบว่า GII มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ 4.43 % (w/v) ส่วน GI ถึงแม้จะไม่สามารถจับแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ได้แต่ก็จัดเป็นไกลโคโปรตีนเนื่องจากพบว่า GI มีปริมาณน้ำตาลอยู่ถึง 31.45% แต่ polysaccharide binding site อาจเป็นน้ำตาลชนิดอื่น ๆที่ไม่ใช่น้ำตาลกลูโคสและหรือน้ำตาลแมนโนสจึงไม่สามารถที่จะจับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose จากการศึกษาของ Hrmova และ Fincher (1993) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่3(GIII) ในข้าวบาร์เลย์ มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนที่มีปริมาณน้ำตาลเฮกโซส 20-30 โมล ต่อเอนไซม์1 โมล แต่เอนไซม์ GI และ GII ในข้าวบาร์เลย์ไม่มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน

ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GI และ GII โดยใช้สับสเตรต เบต้า-ดี-กลูแคน ชนิดที่มีโครงสร้างเป็น เส้นตรง, มีหมู่แทนที่ และมีแขนง ทั้งที่เป็นแบบ ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้ ดังตารางที่ 6 พบว่า ไอโซไซม์ GI สามารถย่อยสลายพันธะของลามินารินได้ดีที่สุด ส่วนไอโซไซม์ GII สามารถย่อยสลายพันธะของ ซีเอ็ม-พาไดแมน ได้ดีที่สุด Hrmova และ Fincher (1993) ได้ทำการศึกษาความจำเพาะ

ต่อสับสเตรตของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GI, GII และ GIII ในข้าวบาร์เลย์ พบว่า ทั้งสามไอโซไซม์สามารถย่อยสลายพันธะลามินารินซึ่งเป็น linear, soluble, (1→3)-β-D-glucan ที่มี degree of glycosyl substitution ที่ 0-6 (Bull และ Chesters 1963 อ้างโดย Hrmova และ Fincher 1993) แต่ทั้งสองไอโซไซม์ไม่สามารถย่อยสลายพันธะของ ไลชินิน, พัสทิวแลน, กลูแคนจากยีสต์ และ กลูแคนจากบาร์เลย์ จากผลการทดลองแสดงว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ GI และGII ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากบี-ซีรั่มของยางพาราชอบที่จะสลายพันธะของสับสเตรต ชนิดที่ละลายน้ำได้ ซึ่งประกอบด้วย พอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-1,3 เป็นสายยาวพอสมควร โดยที่ สายพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส อาจถูกแทนที่หรือมีแขนงก็ได้ และไม่สลายพันธะเบต้า-1,4 และเบต้า-1,6 Suzuki และคณะ (1992) ได้ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของ เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส จาก Antarctic Krill (*Euphausia superba)* พบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ สามารถย่อยสลายพันธะของ laminarioligosaccharides ได้ยกเว้น ลามินาริไบโอส แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะของ (1→3)-β-;(1→4)-β-D-glucan เช่น กลูแคนจากบาร์เลย์ และ ไลชินิน Nagata และคณะ (1990) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของ เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส จาก *Flavobacterium dormitator var. glucanolyticae* พบว่า เอนไซม์สามารถย่อยสลายพันธะของ ลามินาริน, กลูแคนจากยีสต์, และ พาไคแมน ได้ผลิตภัณฑ์ ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส, ลามินาริไบโอส และ ลามินาริไตรโอส นอกจากนี้ Copa และคณะ (1989) ก็ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก เชื้อรา *Penicillium oxalicum* พบว่า เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายพันธะแบบเบต้า-1,6 ของสับสเตรต พัสทิวแลน แต่สามารถย่อยสลายพันธะของ ซี-เอ็มพาไคแมนได้ คิดเป็น 50% ของการย่อยสลายลามินาริน

4.3 การศึกษาสมบัติทางอิมมูนวิทยาของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากส่วนบี-ซีรั่ม ของยางพารา

4.3.1 การศึกษาความจำเพาะต่อแอนติบอดีหรือเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ GII

4.3.1.1 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion

พบว่า แอนติบอดีต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GII สามารถเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับไอโซไซม์ GI และ GII ได้ ดังรูปที่ 22 และ 23 แสดงว่าไอโซไซม์ทั้งสองเป็นโปรตีนที่มี antigenic stie คล้ายคลึงกันจึงเกิด cross-reaction กันได้

4.3.1.2 การทำ Western blot

การศึกษาเปรียบเทียบแถบโปรตีนของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในส่วนต่าง ๆ ของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 โดยวิธี Western blot พบว่า แอนติบอดีต่อไอโซไซม์ GII สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะได้ดีกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์ โดยที่แถบโปรตีนที่มีปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี คือ ตรงตำแหน่งของไอโซไซม์ GI และ GII ดังรูปที่ 24 ส่วนแถบโปรตีนที่ปรากฏในซี-ซีรั่ม ดังรูปที่ 25 ก็พบว่ามีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จำนวน 2 ไอโซไซม์เหมือนกับในบี-ซีรั่ม แต่จากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส แบบ partial purify พบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้ง 2 ไอโซไซม์มีคุณสมบัติแตกต่างจากที่พบในบี-ซีรั่มคือ ไม่สามารถจับเกาะแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose แต่สามารถจับกับ DEAE cellulose ได้ ดังนั้นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในซี-ซีรั่มจัดเป็น แอซิดิกโปรตีน และมีค่า pI ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบในบี-ซีรั่มซึ่งเป็น เบสิคโปรตีน มีค่า pI สูง นอกจากนี้จากผลการทำ Western blot พบว่า แถบโปรตีนของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ใน ซี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 จะมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีต่ำกว่าแถบโปรตีนของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ในบี-ซีรั่ม โดยที่แถบโปรตีนของทั้งสองไอโซไซม์ในซี-ซีรั่ม บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ติดสีจางกว่าแถบโปรตีนของทั้งสองไอโซไซม์ในบี-ซีรั่ม แม้ว่าจะใช้ปริมาณโปรตีนในซี-ซีรั่มมากกว่าปริมาณโปรตีนในบี-ซีรั่มก็ตาม ส่วนแถบโปรตีนที่ได้จากสารสกัดของใบยางอ่อนของยางทั้งสองพันธุ์ พบว่ามีการตอบสนองอย่างจำเพาะต่อแอนติบอดี GII จำนวน 4 แถบนั่นคือ ในสารสกัดของใบยางอ่อนของยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสประมาณ 4 ไอโซไซม์ ดังรูปที่ 26

4.4 ผลของการเกิดบาดแผล (wounding) ต่อค่าความว่องไวและรูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากส่วนผสมของบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มในยางต้นอ่อนพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1

พงษ์เทพ ขจรไชยกุล (2525) อ้างโดย อาภรณ์ สันตะโร (2538) กล่าวไว้ว่า การทำให้ต้นยางเกิดบาดแผลนี้เองเป็นการเปิดโอกาสให้เชื้อโรค โดยเฉพาะเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย เข้าบุกรุกได้ เช่น ทำให้เกิดโรคเส้นดำ (black stripe) ที่หน้ากรีดยาง โรคใบร่วง โรคฝักเน่า จากเชื้อราพวก *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* โรคหน้ายางเน่า เปลือกเน่า หรือใบเน่า จากเชื้อราพวก *Caratosistic fimbriata* ดังนั้น เมื่อต้นยางถูกบุกรุกจากเชื้อโรคดังกล่าวแล้ว ย่อมต้องมีการตอบสนองโดยมีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มมากขึ้น เพื่อที่จะป้องกันตัวเองจากการทำลายของเชื้อราเหล่านี้ จากการศึกษาของ Boller (1985) อ้างโดย Mauch และ Staehelin (1989) พบว่า เอนไซม์ไคติเนส (EC3.2.1.14) และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส(EC 3.2.1.39) ที่พบในพืชชั้นสูงหลายชนิดมีความเกี่ยวข้องกับ ปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อต่อต้าน (defense reactions) ของพืชต่อการบุกรุกของเชื้อโรค Abeles และคณะ (1971); Boller และคณะ (1983) อ้างโดย Mauch และ Staehelin (1989) พบว่าในพืชหลายชนิดเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อมีการบุกรุกของเชื้อโรค, หลังจากได้รับการกระตุ้นจากเศษผนังเซลล์ของเชื้อ (elicitor treatment) และมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนพืช เอทิลีน และจากการศึกษาของ Boller และคณะ (1983); Schlumbaum และคณะ (1986); Mauch และคณะ (1988b); อ้างโดย Mauch และคณะ (1989) กล่าวไว้ว่า เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถย่อยผนังเซลล์ของ เชื้อราได้และการมี lysozyme activity ของเอนไซม์ไคติเนสก็สามารถย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ physiological concentration ของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถที่จะยับยั้งการเจริญของ pathogenic fungi ได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษาผลของการเกิดบาดแผลในต้นยางอ่อนพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 ต่อค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์และรูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในน้ำยางของต้นยางอ่อนหลังจากถูกกรีดทั้งสองพันธุ์ พบว่า ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในน้ำยางจากต้นยางอ่อนทั้งสองพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัย

สำคัญ และรูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์ดังกล่าวก็ไม่มีความแตกต่างกันในยางทั้งสองพันธุ์ ซึ่งอาจมีสาเหตุสำคัญ 2 ประการคือ 1) เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไม่สามารถถูกชักนำให้สร้างเพิ่มขึ้นได้ด้วยการเกิดบาดแผล (wounding) และ 2) เทคนิค Western blot ไม่สามารถตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ มีการศึกษาของ Broekaert และคณะ (1990) พบว่า ในใบ, ลำต้น และน้ำยาง ของต้นยางอ่อนพันธุ์ RRIM600 อายุประมาณ 4 เดือน ถูกชักนำให้มีการสร้าง hevein mRNA ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง hevein ซึ่งเป็น PR โปรตีนชนิดหนึ่ง เพิ่มมากขึ้นภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากถูกกระตุ้นด้วยการกรีดให้เกิดบาดแผล และการให้เอทิลีน โดยการตรวจสอบด้วยวิธี Northern blot ดังนั้น การที่จะศึกษาว่า การกระตุ้นด้วยการเกิดบาดแผล, การให้เอทิลีน หรือ การทำให้เกิดการติดเชื้อ (infection) จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสหรือมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์ดังกล่าว หรือไม่นั้นควรจะมีการศึกษาในระดับยีน ด้วยการดูการเพิ่มขึ้นของ mRNA และใช้เทคนิคในการตรวจสอบที่มีความว่องไว (sensitive) มากพอสมควร ตัวอย่างเช่น เทคนิคการทำ Northern blot เป็นต้น แต่ในพืชบางชนิด เช่น ถั่ว และต้นยาสูบ เทคนิคการตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา หรือ การให้เอทิลีน สามารถใช้เทคนิค Western blot ตรวจวัดการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ดังกล่าวได้โดยตรง เช่นจากการศึกษาของ Mauch และคณะ (1989) โดยใช้เมล็ดของ *Phaseolus vulgaris L.cv Greensleeves* และ *cv Kentucky Wonder* (Burpee Seed Co.) อายุ 12-14 วัน ที่เพิ่งจะผลิใบออกเป็นชุดแรกนำมาให้เอทิลีนเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 2 วัน แล้วสกัดเอนไซม์จากใบอ่อน นำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและทำเจลอิเลคโตรฟอริซิสแบบ SDS-PAGE พบว่า หลังจาก ให้เอทิลีนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เพิ่มขึ้นเป็น 30-40 เท่า และ 40-50 เท่าตามลำดับ และค่าความว่องไวของเอนไซม์เพิ่มขึ้นคงที่เป็นเวลาถึง 72 ชั่วโมง หลังจาก ให้เอทิลีนและจากการทำเจลอิเลคโตรฟอริซิส เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบมีค่า M.W ประมาณ 33 และ 36 Kd ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Tuzun และคณะ (1989) พบว่า เมื่อนำต้นยาสูบ (burley ky 14) มา กระตุ้นด้วยการฉีด sporangispores ของ *Peronospora tabacina* ซึ่งเป็น blue mold pathogen เข้าไปในลำต้นยาสูบ หลังจากนั้น 2-6 วัน นำมาตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์และทำ Western blot

พบว่า มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เพิ่มมากขึ้นในขณะที่ลำต้นที่ไม่ได้รับการกระตุ้นไม่พบว่ามีการสร้างเอนไซม์เลยและมีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เพิ่มขึ้นเป็นเวลานาน 2-6 วัน หลังจากติดเชื้อ

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา

จากการใช้สารตัวอย่างบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มจากยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายรา โดยใช้เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในยางพาราทั้งหมด 7 ชนิด จากการทดลอง พบว่า สารตัวอย่างบี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของสายราของ เชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เชื้อรา *Curvularia sp.* ส่วนเชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้เล็กน้อย คือ เชื้อรา *Corticium samonicolor* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides, Corynespora casiicola, Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora* ส่วนเชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้ด้วยสารตัวอย่าง ซี-ซีรั่ม จากยางทั้งสองพันธุ์ มีเพียงชนิดเดียว คือ เชื้อรา *Rigidoporus lignosus* มีข้อสังเกตุว่า เชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้นั้นจะมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ส่วนใหญ่เป็น ไคติน และ เบต้า-กลูแคน (ดังตารางที่ 5) แสดงว่า เอนไซม์สำคัญที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของสายรา ที่พบในบี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์ คือ เอนไซม์ไคติเนส และ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะของ ไคติน และ เบต้า-กลูแคนได้ นอกจากนี้มีการศึกษาของ Coupa และคณะ (1972) อ้างโดย Auzac และคณะ (1989) พบว่า ในลูทอยด์ ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ เบต้า-กลูโคไซเดส (β-glucosidase) ซึ่งเป็นกลูคาเนสชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ก็มี เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ซึ่งจากการศึกษาของ Geiger และคณะ (1989) พบว่า รากของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ที่เป็นโรครากขาว เนื่องจากเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* และ *Phellinus noxius* จะมีการเพิ่มการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นไปได้ว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในยางพารา ดังนั้น การที่สารตัวอย่างบี-ซีรั่มสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ได้อาจเนื่องมาจาก การทำงานร่วมกันของ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส, เอนไซม์ไคติเนสและ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Martin (1991) พบว่า เมื่อนำน้ำยางสด

(latex) มาปั่นด้วยเครื่องอัลตร้าเซ็นตริฟิวจ์ โดยวิธีของ Moir (1959) จะแยกน้ำยางได้เป็น 3 ส่วนคือ ส่วนบนสุดเป็น อนุภาคยาง ส่วนกลางเป็น ไซโตพลาซึม ที่มีลักษณะใส และส่วนล่างสุดเป็น แวคิวโอล พิเศษเรียกว่า ลูทอยด์ (lutoids) ซึ่งพบว่าในส่วนของตะกอนและไซโตพลาซึมจะประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด โดยที่ 75% ของ โปรตีนที่ละลายอยู่ในน้ำยางสดจะพบในส่วนของตะกอน ที่ประกอบด้วยลูทอยด์เป็นส่วนใหญ่ และพบว่า 25% ของโปรตีนที่พบใน ลูทอยด์เป็น เอนไซม์ chitinase/lysozymes ซึ่งสามารถย่อยสลายส่วนของไคติน และ peptidoglycan ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียได้ตามลำดับ นอกจากนี้มีการศึกษาของ Parijis และคณะ (1991) พบว่ามี chitin-binding protein หลายชนิดที่แยกได้จาก bottom fraction ของน้ำยางจากต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) แต่มีอยู่ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) มีชื่อว่า Hevein ซึ่งเป็น โปรตีนโมเลกุลเดี่ยวขนาดเล็ก ที่มีความคล้ายคลึงกับเลค ตินที่แยกได้จาก พืชที่มีขนคัน (stinging nettle) (*Urtica dioica* L.) ดังนั้น Hevein จึงเป็นโปรตีนตัวหนึ่งที่อาจจะยับยั้งการเจริญของเชื้อราในต้นยางได้ และจากการที่สารตัวอย่างซี-ซีรั่ม ของยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 สามารถยับยั้งการเจริญของสายราของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ดังแสดงในรูปที่ 13 นั้นอาจเนื่องมาจากถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งจากการศึกษาของ Martin (1991) พบว่า ในส่วนของไซโตพลาซึมหรือซี-ซีรั่ม มีเอนไซม์ไคติเนสอยู่น้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อตัวนี้จะสามารถถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่มีอยู่ในซี-ซีรั่ม สำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ GI และ GII ได้เลือก เชื้อรา *Rigidoporus lignosus* และเชื้อรา *Curvularia sp.* ซึ่งมี ไคติน และ เบต้า-กลูแคน เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ และเชื้อรา *Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora* ที่มี เบต้า-กลูแคน เท่านั้นเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ จากคุณสมบัติของไอโซไซม์ทั้งสองน่าที่จะย่อยสลายผนังเซลล์ของรา 2 ชนิดนี้ได้ แต่จากผลการทดลองพบว่า ไม่มีเชื้อราชนิดใดเลยที่สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยไอโซไซม์ GI และ GII อาจอธิบายได้ว่า จากการที่เชื้อราสามารถถูกยับยั้งการเจริญของสายราได้ด้วย crude protein จากบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์นั้น เนื่องมาจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์อย่างน้อย 2 ตัวคือ เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ดังนั้น เมื่อแยกทดสอบด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลู

คาเนสเพียงตัวเดียวจึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของสายราได้ แต่เนื่องจากว่าไม่ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไคติเนส จากบี-ซีรั่มของยางทั้งสองพันธุ์ จึงไม่สามารถทดสอบให้เห็นการยับยั้งการเจริญของสายรา อันเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันแบบ synergistic ของทั้งสองเอนไซม์ได้ แต่จากการศึกษาของ Mauch และคณะ (1988) แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราในส่วนที่เป็น เบต้า-กลูแคน ได้ และสามารถทำงานร่วมกันเอนไซม์ไคติเนสแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยที่เอนไซม์ไคติเนสตัวเดียวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma viride* ได้ ส่วนเชื้อรา *Fusarium solani* f.sp. *pisi* ก็ถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพียงตัวเดียว แต่เชื้อราที่ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันแบบ synergistic ของเอนไซม์ทั้งสอง ได้แก่ *F.solani* f.sp. *phaseoli* และ *T.basicola* และเชื้อราอื่น ๆ รวม 18 ชนิด ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Leah และคณะ (1991) ที่ได้ทำบริสุทธิ์โปรตีน 3 ชนิดที่ได้จากเมล็ดข้าวบาเลย์ (*Hordeum vulgare*) คือ ไคติเนส, ribosome-inactivating protein และ (1→3)-β-glucanase พบว่าเอนไซม์ทั้งสามชนิดสามารถทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei* และ *Fusarium sporotrichioides* ได้โดยใช้วิธี microtiter well assay ซึ่งเป็นวิธีที่ มีความว่องไวและแม่นยำกว่า วิธี disc-plate diffusion assay

4.6 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากบี-ซีรั่มของน้ำยางพารา กับความเป็นไปได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

จากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 พบว่า มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจำนวน 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII โดยที่ GII มีปริมาณมากกว่า GI ประมาณ 7เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์จากยางพันธุ์ RRIM600 พบว่า GI มีปริมาณมากกว่า GII ประมาณ 2 เท่า ข้อแตกต่างของ GII ในยางทั้งสองพันธุ์ ทำให้สันนิษฐานได้ว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ GII ที่พบมากในยางพันธุ์ GT1 ซึ่งเป็นพันธุ์ยางที่ต้านทานต่อโรคสูงโดยเฉพาะโรคใบร่วงไฟทอปโทรา ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora botryosa* และโรคเส้นดำหรือโรคหน้ากรีด ที่เกิดจากเชื้อรา *P.palmivora* น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของต้นยาง จากการศึกษาของ Keen และ

Yoshikava (1983) อ้างโดย Gladys และคณะ (1988) พบว่าเศษผนังเซลล์ของเชื้อ *Phytophthora* สามารถกระตุ้น ปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อต่อต้านของต้นถั่วเหลืองให้มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ Young และ Pegg (1982) อ้างโดย Gladys และคณะ (1988) พบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์ จากมะเขือเทศ สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้ มีข้อสังเกตุว่า การที่ GI และ GII ในยางทั้งสองพันธุ์ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นด้วยปริมาณที่แตกต่างกันนั้นอาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของหน้าที่ของไอโซไซม์แต่ละชนิด โดยที่ในยางพันธุ์ GT1 เห็นค่อนข้างชัดเจนว่า GII น่าจะถูกสร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านการถูกรุกรานจากเชื้อมากกว่า GI ส่วนกลไกการต้านเชื้อนั้นต้องอาศัยปัจจัยอื่นๆ หรือต้องทำงานร่วมกับเอนไซม์ตัวอื่นๆ ด้วยหรือไม่นั้นต้องมีการศึกษากันต่อไป แต่ในยางพันธุ์ RRIM600 การบ่งชี้ว่า GI หรือ GII จะเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านเชื้อโรคนั้นยังไม่ชัดเจนนักเพราะแม้ว่ายางพันธุ์ RRIM600 จะถูกจัดเป็นยางที่อ่อนแอต่อโรค โดยเฉพาะ โรคใบร่วงไฟทอปโทราและโรคเส้นดำ แต่ก็พบว่ายางพันธุ์ RRIM600 สามารถต้านทานต่อโรคใบจุดออยเดียม และโรคใบจุดคอลเลโทตริกัม ได้ดีปานกลางเมื่อเทียบกับยางพันธุ์ GT1 ที่อ่อนแอต่อโรคทั้งสองชนิดนี้มาก นอกจากนี้พบว่ายางพันธุ์ RRIM600 ก็มีความต้านทานต่อโรคบางโรคได้ดีเช่น โรคเปลือกแห้ง เป็นต้น แต่เนื่องจากว่า โรคใบร่วงไฟทอปโทราและโรคเส้นดำ เป็นโรคที่ร้ายแรงต่อต้นยางและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมาก ยางพันธุ์ใดที่ต้านทานต่อโรคทั้งสองชนิดนี้ได้ดีจึงจัดว่าเป็นยางพันธุ์ต้านทานต่อโรค ดังนั้นการสร้าง เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ในยางพันธุ์ RRIM600 ก็น่าจะส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในต้นยางด้วย สำหรับยางพันธุ์ GT1 ซึ่งเห็นชัดเจนว่ามีการสร้าง GII ในปริมาณที่มากกว่า GI แต่ก็ไม่อาจจะสรุปได้ว่า GI นั้นไม่เกี่ยวข้องกับ ปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อต่อต้าน เพียงแต่ว่าการกระตุ้นการสร้าง GI นั้นไม่มากเท่า GII

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายรา โดยใช้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GI และ GII พบว่า ไม่มีเชื้อราตัวใดเลยที่ถูกยับยั้งได้ด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ อาจจะอธิบายได้ด้วยเหตุผลหลายประการด้วยกันได้แก่ เนื่องจากความแรงในการยับยั้งการเจริญของสายราของทั้งสองไอโซไซม์ยังไม่มากพอที่จะทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ หรือ ลักษณะของพันธะหลัก,โครงสร้างและอัตราส่วนพันธะที่เป็นเบต้า-กลูแคนหรือเบต้า-ดี-กลูแคน อาจไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

ทั้งสองไอโซไซม์ ซึ่งจากการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส พบว่า ไอโซไซม์ GI สามารถย่อยสลายสับสเตรตซีเอ็ม พาไคแมน ซึ่งมีพันธะหลักเป็นสายของ (1→3-β-glucan ส่วน GII สามารถย่อยสับสเตรตลามินาริน ซึ่งมีพันธะหลักเป็น (1→3:1→6)-β ในอัตราส่วน 7:1 และมีแขนง (branch) เป็น (1→6)-β-glucan จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองชอบที่จะย่อยสลายพันธะของสับสเตรตที่มีพันธะ (1→3)-β-glucan ยาวมากพอและมีหรือไม่มีแขนงก็ได้ ซึ่งลักษณะของผนังเซลล์ของเชื้อราที่นำมาทดสอบอาจเป็นไปได้ว่ามีชนิดของพันธะที่ต่างกันออกไปทำให้ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไม่สามารถทำงานได้หรือทำงานได้เมื่อมีเอนไซม์อื่นช่วยย่อยสลายพันธะที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานออกไปก่อน กลุ่มของเชื้อราได้แก่ Basidiomycetes, Ascomycetes และ Oomycetes มีผนังเซลล์ประกอบด้วยพันธะ เบต้า-1,3 และเบต้า-1,6-ดี-กลูแคน ผสมกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และวงจรชีวิตของเชื้อราแต่ละชนิด โดยที่จำนวนเบต้า-กลูแคนและแขนง จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับ สภาพแวดล้อม และ อายุ (Bartnicki 1969 และ Bartnicki 1973) พันธะกลูแคนอาจพบได้ 3 ตำแหน่งด้วยกันคือ (1) พบในส่วนของ ผนังเซลล์ (2) พบอยู่ใน culture medium และ (3) เกาะอยู่กับ chitin อย่างแน่นหนาด้วยพันธะโควาเลนต์ (Sietsma และคณะ 1981) โครงสร้างที่หลากหลายของเบต้า-กลูแคนทำให้เกิดหน้าที่แตกต่างกัน เช่น antitumor activity (Whistler และคณะ 1976, Bruneteau และคณะ 1988;) หรือเป็น elicitors ในปฏิกิริยาระหว่างพืชกับ เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค (Anderson และคณะ 1975) ความผันแปร (variations) ทางเคมีโครงสร้างปฐมภูมิ ของเบต้า-กลูแคน มีผลต่อ โครงสร้างทุติยภูมิ และ โครงสร้างตติยภูมิของแต่ละสายของเบต้า-กลูแคน, molecular assembly, หรือ aggregation ทำให้เกิดคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกัน เช่น ความสามารถในการละลาย (solubility) และ ความสามารถในการสร้างเจล (gel-forming ability) ซึ่งจะกลับไปมีผลต่อ หน้าที่ทางชีวภาพ ของกลูแคนของเชื้อราได้ (Saito และคณะ 1989) อ้างโดย Ruel และคณะ (1991) ดังนั้นเชื้อรา *Phytophthora botryosa* และ *P.palmivora* ที่นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสายราด้วยไอโซไซม์ทั้งสองถึงแม้ว่าจะมีพอลิเมอร์ของกลูโคส เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์อยู่ถึง 90% (Bartnicki 1966) แล้วก็ตาม ก็ยังไม่สามารถถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยไอโซไซม์ทั้งสอง Roberts และ Selitrennikoff (1986) อ้างโดย Brett (1994) พบว่า เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ไอโซไซม์ GI และ GII ที่ได้จากบี-ซีรั่มของยางพาราทั้งสองพันธุ์ อาจจะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันแบบ synergistic จากเอนไซม์ไคติเนสที่อยู่ในบี-ซีรั่มของยางเช่นเดียวกันก็ได้ อย่างไรก็ตามเชื่อว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่พบในยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 มีคุณสมบัติเป็น PR โปรตีน เนื่องจากสามารถถูกกระตุ้นให้สร้างด้วยเอทิลีน จากการศึกษาของ อาภรณ์ สันตะโร (2538) พบว่า ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หลังจากทาหน้ายางด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ในยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 จะเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 2.5 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ ก็มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ PR โปรตีนที่พบในพืชชนิดอื่น เช่น ยาสูบ (tobacco) และ มันฝรั่ง (potato) โดยที่จะมีคุณสมบัติเป็น เบสิคโปรตีน และถูกเก็บไว้ในแวคิวโอล ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาของ Sela-Buurlage และคณะ (1993) ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ต่าง ๆ จากใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv Samsun NN) พบว่า ไอโซไซม์ที่เป็นเบสิคโปรตีนและถูกเก็บไว้ในแวคิวโอลของเซลล์ใบ มีคุณสมบัติเป็น PR โปรตีน ส่วนไอโซไซม์ที่เป็น แอซิดิกโปรตีนจะพบอยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular) เช่นเดียวกับในยางพารา เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ GI และ GII ที่พบอยู่ในลูทอยด์ ซึ่งเป็นแวคิวโอลชนิดหนึ่งที่พบในน้ำยางพารา ก็มีคุณสมบัติเป็นเบสิคโปรตีน ส่วนเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่พบในซี-ซีรั่มจัดเป็น แอซิดิกโปรตีน

4.7 แนวทางของการใช้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในการคัดเลือกพันธุ์ยางพารา

แม้ว่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในยางพันธุ์ GT1 จะมีปริมาณสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 2-3 เท่า (อาภรณ์ สันตะโร 2538) และมีแถบโปรตีนของไอโซไซม์ GII สูงกว่า GI ซึ่งให้ผลกลับกันกับแถบโปรตีนที่ได้จากพันธุ์ RRIM600 แต่จากการศึกษาแถบโปรตีนของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยวิธี Western blot พบว่าส่วนผสมของซี-ซีรั่ม และบี-ซีรั่ม จากยางต้นอ่อน ไม่พบแถบโปรตีนที่ต่างกัน ระหว่างพันธุ์ยางทั้งสองพันธุ์ และค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ ก็ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ชนิดนี้ไม่ได้ถูกสร้างขึ้นให้มีอยู่ก่อน แต่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นตามสภาพแวดล้อมเท่านั้น ดังนั้นการศึกษา เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ระดับโปรตีนไม่สามารถนำไปใช้เป็น ตัวบ่งชี้ (marker) ในการคัดเลือกพันธุ์ได้ จึงควรมีการศึกษาลึกลงไปในระดับ ยีน เพื่อดู

Polymorphism ระหว่างยางพาราแต่ละพันธุ์ โดยใช้ DNA เป็นตัวบ่งชี้ ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) หรือ อาจใช้วิธีที่เร็วกว่าและถูกกว่า ได้แก่ RADP (Random Amplified Polymorphic DNA) และเพื่อให้แน่ชัดลงไปควรมีการโคลน (clone) ยีน ของ GII ในยางพาราทั้งสองพันธุ์ เพื่อศึกษาโครงสร้างของยีนว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร ทำไมจึงมีการควบคุมในการแสดงออกของยีนต่างกัน ในยางพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคต่างกัน

5. สรุป

1. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์GT1 ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธี โครมาโทกราฟีแบบ แลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และแบบจับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Concanavalin A agarose.

2. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GI และ GII มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน โดยที่ GI มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 31.45 % (w/w) ส่วน GII มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 4.43 % (w/w) สามารถจำแนกชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของ GII ได้ว่าเป็นน้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลแมนโนส เนื่องจาก GII มีความจำเพาะในการจับกับ Concanavalin A ซึ่งเป็น ligand ที่จับอยู่กับ agarose ใน Con A agarose column ได้แน่นกว่า GI

3. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากบี-ซีรั่ม ของยางพาราพันธุ์ GT1 มี 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII โดยที่พบว่า ปริมาณของ GII จะมากกว่า GI อยู่ประมาณ 7 เท่า ส่วน เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ GI และ GII ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM600 พบว่า ปริมาณของ GI จะมากกว่า GII อยู่ประมาณ 2 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ GII ในยางทั้งสองพันธุ์ พบว่า GII ของยางพันธุ์ GT1 มีปริมาณมากกว่า GII ของยางพันธุ์ RRIM600 อยู่ประมาณ 4 เท่า

4. GI และ GII ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากบี-ซีรั่ม ของยางทั้งสองพันธุ์ เมื่อศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์เส้นเดียว (monomeric protein) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32 และ 35 Kd ตามลำดับ

5. GI และ GII มีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่างกันโดยที่ GI สามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินารินได้ดีที่สุด ส่วน GII สามารถย่อยสลายสับสเตรต ซีเอ็ม-พาไคแมนได้ดีที่สุดและมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ชนิด เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส จากการทำ โครมาโทกราฟีบนชั้นบาง (Thin-layer chromatography ,TLC) พบว่า ผลิตภัณฑ์เริ่มต้นที่ได้จากการย่อยสับสเตรตลามินาริน ด้วย GI และ GII คือ น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มี DP (degree of polymerization) มากกว่า 4

6. จากการทำ Ouchterlony double immunodiffusion และการทำ Western blot พบว่า แอนติบอดีต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GII สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับ GI และ GII ได้ แสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองเป็นโปรตีนที่มี antigenic site คล้ายคลึงกันมากจึงเกิด cross-reaction กันได้

7. การเกิดบาดแผล (wounding) ในต้นอ่อน ไม่มีผลต่อค่าความว่องไวรวมและรูปแบบ (pattern) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ในยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์GT1

8. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในซี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 มีสองไอโซไซม์ คือ G1 และ G2 จากการศึกษาโดยวิธี Western blot เช่นเดียวกับที่พบในบี-ซีรั่ม แต่คุณสมบัติทางกายภาพและทางอิมมูนวิทยา ที่แตกต่างออกไปคือ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ทั้งสองไอโซไซม์ที่พบในซี-ซีรั่ม จัดเป็น แอซิดิกโปรตีน และ มีค่า pI ต่ำกว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบในบี-ซีรั่ม จึงไม่สามารถจับเกาะกับ CM-cellulose แต่สามารถจับกับ DEAE-cellulose ได้ G1 และ G2 ใน ซี-ซีรั่ม มีความจำเพาะต่อแอนติบอดีต่ำกว่าแถบโปรตีนของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ในบี-ซีรั่ม

9. ในสารสกัดของใบยางอ่อนของยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ประมาณ 4 ไอโซไซม์ จากการศึกษาโดยวิธี Western blot

10. crude protein ของบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ได้ดีที่สุดที่ปริมาณโปรตีนต่ำสุดเท่ากับ 3.75 ไมโครกรัม (0.003 ยูนิต) และ 4.7 ไมโครกรัม (0.004 ยูนิต)ตามลำดับ รองลงมาคือเชื้อรา *Curvularia sp.* ซึ่งถูกยับยั้งได้ดีที่สุดที่ปริมาณโปรตีนต่ำสุดเท่ากับ 120 ไมโครกรัม (0.103 ยูนิต) และ 300 ไมโครกรัม (0.24 ยูนิต) ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Corticium samonicolor* ได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides, Corynespora casiicola, Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora*

11. crude protein ของซี-ซีรั่มของยางพันธุ์ RRIM600 และ พันธุ์ GT1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ได้เพียงชนิดเดียวจากเชื้อทั้งหมด 7 ชนิด ปริมาณโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เท่ากับ 420 ไมโครกรัม (0.14 ยูนิต) และ 400 ไมโครกรัม (0.13 ยูนิต) ตามลำดับ

12. GI และ GII ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 2.8 ไมโครกรัม (0.03 ยูนิต) และ 34.6 ไมโครกรัม (0.26 ยูนิต) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่นำมาทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

ข่าวกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง 2537 ฉบับที่ 128 ปีที่ 32 หน้า 29-33, 55.

ณรงค์ สุจเร 2536 "การพัฒนาสวนยางพาราในประเทศไทย" เอกสารวิชาการเรื่อง ยาง สำนักงานกองทุนสวนยาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 7.

พงษ์เทพ ขจรไชยกุล 2533 "โรคและศัตรูยาง" รวบรวมโดยกลุ่มโรงเรียนการยาง ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตรและสหกรณ์ หน้า 1-49.

สมพงศ์ สุขมาก 2536 "พันธุ์ยางสงขลา 36" เอกสารวิชาการเรื่อง ยาง" สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 15,38.

สุปรีดี ไทยนุกูล 2534 "วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์

อรุณ เวชกิจ 2529 "ข่าวกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง" ฉบับที่ 96 ปีที่ 24 หน้า 15-17.

อาภรณ์ สันตะโร 2538 "วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์

Auzac, J., Jacob, J.L. and Chrestin, H. 1989. "Physiology of rubber tree latex." CRC' Florida U.S.A. pp. 28-32.

Bartnicki-Garcia, S. 1966. "Chemistry of hyphal walls of Phytophthora." J. Gen.Microbiol. 42 : 57-69.

---------- .1969. "Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi." Ann. Rev. Microbiol. 22 : 87-108.

Beerhues, L., Kombrink, E. 1994. "Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3-beta-glucanase in potato." Plant-Mol.-Biol. 24 : 353-367.

Borja, I., Sharma, P., Krekling, T. and Lonneborg, A. 1994. "Cytopathological response in roots of *Picia abies* seedlings infected with *Pythium dimorphum*."

Phytopathology. 85 : 495-501.

Bowles, D. J. 1990. "Defense-related proteins in higher plants." Ann. Rev. Biochem. 59 : 873-907.

Braford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding." Anal.Biochem. 72 : 248-254.

Broekaert, W.F., Lee,H., Kush, A., Chua, N. and Raikhel, N. 1990 "Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*)." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 : 7633-7637.

Brisson, L. F., Tenhaken, R. and Lamb, C. 1994. "Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance." The Plant Cell 6 : 1703-1712.

Bulcke, V. D., Bauw, G., Castresana, C., Montagu, M. V. and Vandekerckhove,J. 1989. "Characterization of vacuolar and extracellular β(1,3)-glucanases of tobacco : Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 : 2673-2677.

Bull, A.T, and Chester, C.G.C. 1963. "Advances in Enzymology : The Biochemistry of laminarin and the nature of laminarinase." (Novol, F.F. ed.) pp. 325-364. Interscience publisher / John Wiley and Sons. New York, London and Sydney.

Burner, R.L. 1964. "Determination of reducing sugar value 3,5-dinitrosalicylic acid method." Method in Carbohydrate Chemistry. 4 : 67-71.

Churngchow, N., Suntaro, A. and Witisuwanakul, R. 1995. "β-1,3-glucanase isozymes from the latex of *Hevea brasiliensis*." Phytochemistry. 39 : 505-509.

Copa, P., J. L., Reyes, F., Perez, L., M.I. 1989. "Purification and properties of a 1,3- beta - glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates." Fems-Microbiol.Lett. 65(3) : 285-292.

David E. M., Kenneth, J. S. and Dilip, M. S. 1993. "Structure and expression of a barley acidic β-1,3-glucanase gene." Plant Molecular Biology. 22 : 347-360.

Dubois, M.K., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "A colorimetric method for the determination of sugars and related substances." Anal. Biochem. 28 : 350-356.

Ecker, J. R. and Davis, R. W. 1987. "Plant defense genes are regulated by ethylene." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 : 5202-5206.

Felix, G. and Meins, F. Jr. 1986. "Developmental and hormonal regulation of β-1,3-glucanase in tobacco." Planta. 167 : 206-211.

Fincher, G.B. 1989. "Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains." Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1989. 40 : 305-346.

Fleet, G.H. and Phaff, H.J. 1974. "Glucanases in *Schizosaccharomyces* : Isolation and properties of the cell wall-associated β-(1,3)-glucanases." J. Biol. Chem. 149 : 1717-1728.

Gladys, I. C. and Joseph E. V. 1988. "Cell wall proteins." Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39 : 321-53.

Hrmova, M. and Fincher, G. B. 1993. "Purification and properties of three (1→3)-β-D-glucanase isoenzymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*)." Biochem. J. 289 : 453-461.

Jutidamrongphan, W., Andersen, J.B., Mackinnon, G., Manners, J.M., Simpson, R.S. and Scott, K.J. 1991. "Induction of β-1,3-glucanase in barley in response to infection by fungal pathogens." Molecular Plant-Microbe International. 4 : 234-238.

Keefe, D. Hinz, U. and Meins, F. Jr 1990. "The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of beta-1,3-glucanase and chitinase in tobacco

leaves." Planta 182 : 43-51.

Keen, N.T. and Yoshikawa, M. 1983 "β-1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls." Plant Physiol. 71 : 460-465.

Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins,P. W. and Cabib, E. 1995. "Architecture of yeast cell wall:The linkage between chitin and β-1,3-glucan." J. Biol.Chem. 270 : 1170-1178.

Kombrink , E. and Hahlbrock, K. 1986. "Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi." Plant Physiol. 81 : 216-221.

----------. 1988. "Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1,3-β-D-glucanases and chitinases." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 782-786.

Kurosaki, F. Tokitoh, Y. and Nishi, A. 1992. "Interaction of extracellular β-1,3-glucanase and pectic substances in cell wall matrix of cultured carrot." Plant Sci. 84 : 75-82.

Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I. and Mundy, J. 1991. "Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties."J. Biol. Chem. 266 : 1564-1573.

Legrand, M. Kauffmann, S. Geoffroy, P. and Fritig, B. 1987. "Biological function of pathogenesis-related proteins:Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 : 6750-6754.

Martin, M. N. 1991. "The latex of *Hevea brasiliensis* contains High levels of both chitinases and chitinase/lysozymes." Plant Physiol. 95 : 469-476.

Mauch, F. and Staehelin, L.A. 1989. "Function implications of the Subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β-1,3-glucanase in bean leaves." Plant Cell.1 : 447-457.

Mauch, F. Hadwiger, L. A. and Boller, T. 1988. "Antifungal hydrolases in pea tissue : I

Purification and characterization of two chitinases and two β-1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection."Plant Physiol. 87 : 325-333.

Mauch, F. Mauch-Mani, B. and Boller, T. 1988. "Antifungal hydrolases in pea tissue : II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β-1,3-glucanase." Plant Physiol. 88 : 936-942.

Memelink, J., Linthorst, H. J. M., Schilperoort, R. A., Hoge, J. H.C. 1990. "Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns." Plant. Mol. Biol. 14 : 119-126.

Mirelman, D., Galun, E., Sharon, N. & Lotan, R. 1975. "Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin." Nature. 256 : 414-416.

Mrsa, V., Klebl, F. and Tanner, W. 1993. "Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae BGL2* Gene Product, a cell wall Endo-β-1,3-Glucanase." Journal of Bacteriology. 175 : 2102-2106.

Nagata, S., Sawatani, M., Kuriyama, M., Misuno, H., Nagasaki, S 1990. "Purification and characterization of nonlytic endo-beta-1,3-glucanase I from *Flavobacterium* dormitator var. glucanolyticae." Agric.Biol.Chem. 54 : 2107-2114.

Neale, AD., Wahleithner, JA., Lund, M., Bonnett, HT., Kelly, A., Meekswagner, DR., Peacock, WJ., Dennis, ES. 1990. "Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extension are expressed in tobacco explants during flower formation." Plant Cell. 2 : 673-684.

Nogi, Y., Horikoshi, K. 1990. "A thermostable alkaline beta-1,3-glucanase produced by alkalophilic *Bacillus sp.* AG-430." Appl. Micrbiol. Biotechnol. 32 : 704-707.

Notario, V., Villa, T. G. and Villanueva, J. R. 1986. "Purification of an exo-β-glucanase from cell-free extracts of *Candida utilis*." Biochem. J. 159 : 555-562.

----------.1982. "β-glucanases from *Candida albicans*. : Purification, characterizatin and the nature of their attachment to cell wall components." Journal of General Microbiology. 128 : 747-759.

Ouchtherlony, O. 1949. "Antigen-antibody reactions in gels." Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 26 : 507.

Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kuc, J. 1989. "Direct detection of (1→3)-β-D-glucanase isozymes on polyarylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels." Anal. Biochem. 182 : 136-140.

----------.1991. "A technique for detection of chitinase, (1→3)-β-D-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyarylamide gel electrophoresis or isoelectricfocusing." Phytopathology. 81 970-974.

Parijs, J. V. Broekaert, W. F. Goldstein, I. J. and Peumans, W. J. . 1991. "Hevein : an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex." Planta. 183 : 258-264.

Romaniec, M. P.M., Fauth, U., Kobayashi, T., Huskisson, N. S., Barker, P.J. and Demain, A. L.. 1992. "Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*." Biochem.J. 283 : 69- 73.

Ruel, K. and Joseleau, J.P. 1991. "Involvement of an extracellular glucan sheath during degradation of *Populus* wood by *Phanerochaete chrysosporium*." Applied and Environ. Microbiology. 57 : 374-384.

Santos, T., Villanueva, J. R. and Nombela, C. 1977. "Production and catabolite repression of *Penicillum italicum* β-glucanases." Journal of Bacteriology. 129 : 52-58.

Savary, B. J. and Flores, H. E. 1994. "Biosynthesis of defense-related proteins in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. var *japonicum* (Kitam.)." Plant physiol. 106 : 1195-1204.

Schlumbaum,A., Mauch,F., Vogeli, U. & Boller, T. 1986. "Plant chitinase are potent

inhibitors of fungal growth." Nature. 324 : 365-367.

Sela-Buurlage,M.B., Ponstein,A.S., Bres-Vloemans,S.A., Melchers,L.S., van den Elzen,P.J.M. and Cornelissen,L.S., 1993 "Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β-1,3-glucanases exhibit antifungal activity." Plant Physiol. 101 : 857-863.

Simmons, CR., Litts, JC., Huang, N., Rodriguez, RL. 1992. "Structure of a rice beta-glucanase gene regulated by ethylene, cytokinin, wounding, salicylic acid and fungal elicitors." Plant. Mol. Biol. 18 : 33-45.

Skriver, K., Olsen, F.L., Rogers, J.C.and Mundy, J. 1991. "Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist acid." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88 : 7266-7270.

Skujins, J.J, Potgieter, H.J. and Alexander, M. 1965. "Dissolution of fungal cell walls by a Streptomycete chitinase and β-(1→3) glucanase." Archives of Biochemistry and Biophysics. 111 : 358-364.

Sock, J., Rohringer, R., Kang, Z. 1990. "Extracellular beta-1,3-glucanases in stem rust-affected and abiotically stressed wheat leaves. Immunocytochemical localization of the enzyme and detection of multiple forms in gels by activity staining with dye-labeled laminarin." Plant. Physiol. 94 : 1376-1389.

Suzuki,M.; Yoshida,K.; Hamano,K.; Ashida,K. 1992. "Substrate specificity on endo-1,3-beta-glucanase from Antarctic krill *Euphausia superba*." Nippon-Suisan-Gakkaishi-Bull. Jap.-Soc.-Sci.-Fish. 58 : 1693-1698.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet : Procedure and some applications." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 : 4350-4354.

Tuzan,S., Nageswara, R. M., Vogeli, U., Schardl, C.L.., Kuc, J. 1989. "Induced systemic

resistance to blue mold : Early induction and accumulation of β-1,3-glucanases, chitinases, and other pathogenesis-related proteins (b-Proteins) in immunized tobacco." Phytopathology 79 : 979-983.

Vogeli, U., Meins, F, Jr., and Boller, B. 1988. "Co-ordinated regulation of chitinase and (1→3)-β-D-glucanase in bean leaves." Planta 174 : 364-372.

Young, D,H. and Pegg, G.F. 1981. "Purification and characterization of 1,3-β-glucan hydrolases from healthy and *Verticillum albo-atrum* infected tomato plants." Physiological Plant Pathology. 19 ; 391-417.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว ธารทิพย์ ศรีบริรักษ์

วัน เดือน ปี เกิด 24 มกราคม 2513

วุฒิทางการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ศึกษาศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2534