



เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพารา

*Peroxidase in Hevea brasiliensis leaves*

พัชรากร รัตน์ภูมิ

Patcharakorn Rattanapumee

๘

เลขที่	OK898.P24 กบ 2543 ๒.๒
Order Key	28855
Bib Key	177693
	1.1.0.0.2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biochemistry

Prince of Songkla University

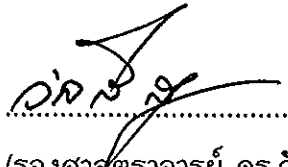
2543

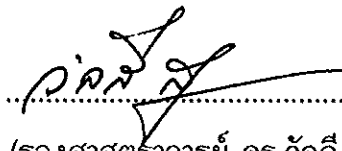
ชื่อวิทยานิพนธ์      เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพารา  
ผู้เขียน              นางสาวพัชรากร รัตนภูมิ  
สาขาวิชา              ชีวเคมี

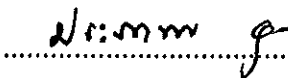
---

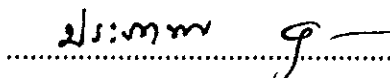
คณะกรรมการที่ปรึกษา

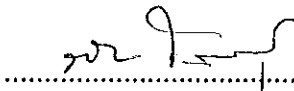
คณะกรรมการสอบ

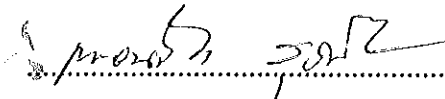
  
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์)

  
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์)

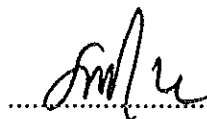
  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธ์)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธ์)

  
.....กรรมการ  
(ดร.รพีพร ไสตถิพันธ์)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ถนอมจิต สุภาวิตา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

  
.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นพรัตน์ บำรุงรักษ์)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์      เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพารา  
ผู้เขียน              นางสาวพัชรากร รัตนภูมิ  
สาขาวิชา              ชีวเคมี  
ปีการศึกษา            2542

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้แยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสลายของ  $H_2O_2$  ให้กลายเป็น  $H_2O$  พร้อมทั้งออกซิไดส์ สารที่เป็นสับสเตรท จากใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 (*Hevea brasiliensis*) ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบต่างๆโดยใช้ DEAE-Sephacel, Sephadex G-75 และ Con A-Sephrose ตามลำดับ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 122 เท่าของเอนไซม์สกัดในตอนเริ่มต้น โดยมีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 9.5 เป็น 1,163  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  protein

เมื่อนำเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในสภาพธรรมชาติพบแถบโปรตีนและความว่องไว 3 แถบ ส่วนโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส พบแถบโปรตีนของเปอร์ออกซิเดส 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 85,000 และ 120,000 ดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน มีขนาด 204,000 ดาลตัน เมื่อทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงของเปอร์ออกซิเดสที่บริสุทธิ์แล้วพบแถบโปรตีนและความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสเพียง 1 แถบ มีลักษณะเป็น acidic โดยมีค่า pI 3.6 เปอร์ออกซิเดสที่แยกได้มีลักษณะเป็นไกลโคโปรตีนซึ่งย่อยติดด้วยลีสัลเฟียน บลู และ ฟุกซิน-ซัลไฟต์ และจากการศึกษาการดูดกลืนแสงในช่วง UV และ visible พบว่ามี 1 Soret peak ที่ 403 นาโนเมตร และมีอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 ต่อ 277 เท่ากับ 0.938 แสดงว่ามีหมู่ heme อยู่ในโมเลกุลของเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา

การศึกษาสมบัติของเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากใบยางพารา พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 5.5 และเร่งได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนกระทั่งที่อุณหภูมิสูงถึง 60-70<sup>0</sup>ซ สามารถเก็บเปอร์ออกซิเดสในรูปของสารละลายไว้ที่ -20 และ 4<sup>0</sup>ซ ได้เป็นเวลา 3 เดือน โดยที่ความว่องไวไม่ลดลง เปอร์ออกซิเดสมีความจำเพาะต่อ o-dianisidine มากกว่า ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)] และ pyrogallol เพราะมีค่า K<sub>m</sub> น้อยที่สุด คือ o-dianisidine น้อยกว่า ABTS และ pyrogallol โดยมีค่าเท่ากับ 0.22 mM, 3.03 mM, 6.60 mM ตามลำดับ เมื่อศึกษาจลนศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดสพบค่า K<sub>m</sub> ต่อ o-dianisidine และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เท่ากับ 0.22 mM และ 2.56 mM ตามลำดับ สารต่างๆที่มีผลต่อความว่องไว เช่น CaCl<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 200 mM, MgCl<sub>2</sub>, EDTA ที่ความเข้มข้น 50 mM และ SDS ที่ความเข้มข้น 0.01 mM กระตุ้นความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสได้สูงสุดโดยเพิ่มขึ้น 120, 50, 25, 30 % ตามลำดับ ในขณะที่ KCN, NaN<sub>3</sub>, DTT, p-CMB ที่ความเข้มข้น 1 mM, 100 mM, 10 mM, 100 mM ตามลำดับ สามารถยับยั้งความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสได้ 100 %

ศาสตราจารย์ ดร. คุณหญิงทอง อรรถกษาศาสตร์  
ภาควิชาอณูชีววิทยา  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ได้รับทราบ  
= 8 ก.พ. 2543  
.....  
.....

**Thesis Title** Peroxidase in *Hevea brasiliensis* leaves  
**Author** Miss Patcharakorn Rattanapumee  
**Major Program** Biochemistry  
**Academic Year** 1999

### Abstract

Peroxidase, an enzyme catalysing the reaction  $H_2O_2 + 2A_2H \rightarrow 2H_2O + 2HA$ , was isolated from *Hevea brasiliensis* leaves. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation followed by DEAE-Sephacel ion exchange chromatography, gel filtration on Sephadex G-75 and Con A-Sepharose column chromatography. The enzyme was about 122 fold purified. The specific activity was increased from 9.5 to 1,163  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  protein.

The purified peroxidase showed 3 bands in polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing condition as detected by protein and activity staining. The molecular weights of the peroxidase were 85,000 and 120,000 daltons as determined by SDS-PAGE. It had a molecular weight of 204,000 daltons, as determined by gel filtration. These peroxidases are acidic with a pI of 3.6. The isolated peroxidase are glycoprotein as detected by fuchsin-sulfite and alcian blue staining. Absorption spectra showed absorbance at 403 and 277 nm with the ratio of absorbance at the two wavelengths (RZ) 0.938. The absorbance at 403 nm indicated the presence of heme part of enzyme.

The peroxidase purified from *Hevea brasiliensis* leaves had a characteristic optimum pH of 5.5. The activity increased with the increasing temperature up to 60-70°C. The enzyme is rather stable, it can be kept at -20°C and 4°C for 3 months without losing the activity. The enzyme is more specific for *o*-dianisidine than ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)] and pyrogallol because  $K_m$  of *o*-dianisidine was lowest (0.22 mM, 3.03 mM and 6.60 mM respectively).  $K_m$  values of the purified enzyme for *o*-dianisidine and  $H_2O_2$  were 0.22 mM and 2.56 mM respectively. Substances such as  $CaCl_2$  at 200 mM or  $MgCl_2$ , EDTA at 50 mM and SDS at 0.01 mM increased the activity of peroxidase up to 120, 50, 25 and 30 % respectively. The activity of the purified enzyme was 100% inhibited by KCN,  $NaN_3$ , DTT and *p*-CMB at concentrations of 1 mM, 100 mM, 10 mM and 100 mM respectively.

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ตลอดจนช่วยตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จโดยสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ได้ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.รพีพร โสทธิพันธ์ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมี และรองศาสตราจารย์ ถนอมจิต สุภาวิตา กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะและคำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แนะนำสิ่งที่มีประโยชน์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับสารเคมี และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ด้วยดีเสมอ

ขอขอบคุณสมาชิกห้อง PR 422 คุณเนาวลพรรณ ศิริบุหงศ์ คุณเคมกฤษ สินเจริญรุ่ง และ คุณแสวรัตน์ นนทสอร ที่มีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยนี้อย่างมาก

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ และคณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณกำลังใจอันยิ่งใหญ่ของ คุณพ่อ คุณแม่ และผู้มีพระคุณทุกท่าน ตลอดจนสถาบันการศึกษาทุกแห่งที่เคยให้การศึกษาและขอขอบคุณกำลังใจจากพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคน ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

พัชรากร รัตนภูมิ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(1)
Abstract.....	(3)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
รายการตาราง.....	(7)
รายการรูป.....	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์.....	(12)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	3
วัตถุประสงค์.....	34
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	35
วัสดุ.....	35
อุปกรณ์.....	37
วิธีการทดลอง.....	38
3. ผลการทดลอง.....	60
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	110
5. สรุปผลการทดลอง.....	121
เอกสารอ้างอิง.....	123
ภาคผนวก.....	143
ประวัติผู้เขียน.....	147



## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ตัวอย่างของเปอร์ออกซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ.....	5
2. ตัวอย่างเปอร์ออกซิเดสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....	6
3. ตัวอย่างเปอร์ออกซิเดสจากพืชชั้นสูง.....	7
4. ปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากสารสกัดใบยางพารา 1 กรัม เปรียบเทียบกับ หัวผักกาดหนูขาวและ หัวไชเท้า 1 กรัม.....	61
5. ผลของการไลโอไฟไลซ์ต่อความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบยางพารา .....	61
6. ผลการทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา 100 กรัม ให้บริสุทธิ์ขึ้น ในขั้นตอนต่างๆโดยวิธีที่ 1.....	63
7. ผลการทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา 100 กรัม ให้บริสุทธิ์ขึ้น ในขั้นตอนต่างๆโดยวิธีที่ 2 .....	71
8. สารที่มีอิทธิพลต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราใน ขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) .....	106
9. แสดงส่วนประกอบของเจล (4-8 %) ดัดแปลงวิธีจาก Davis (1964).....	144
10. แสดงส่วนประกอบของเจล (7-15 %)ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) .....	145
11. แสดงส่วนประกอบของเจล (7-15 %)ดัดแปลงจากวิธีของ Davis (1964).....	146

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. ไดอะแกรมการทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีการที่ 1 .....	41
2. ไดอะแกรมการทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีการที่ 2 .....	44
3. การแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ND-PAGE โดยใช้ 3 % ในเจลส่วนบน และ เกรเดียน 7-15 ในเจลส่วนล่าง .....	50
4. การแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบยางพาราที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40-80 % โดยคอลัมน์ CM-Cellulose ตามวิธีการที่ 1 .....	65
5. แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเปอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ CM-Cellulose วิธีที่ 1 .....	66
6. การแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ CM-Cellulose โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีการที่ 1 .....	67
7. แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเปอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 วิธีที่ 1 .....	68
8. แบบแผนโปรตีนที่ได้จากการตัดเจลบริเวณที่มีความว่องไวของเอนไซม์ในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ND-PAGE ตามวิธีที่ 1 .....	69
9. การแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบยางพาราที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40-80 % โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ตามวิธีการที่ 2 .....	72

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
10. แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ND-PAGE ของเปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel วิธีที่ 2 .....	73
11. แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยวิธีที่ 2 .....	74
12. การแยกเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีการที่ 2 .....	75
13. แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ND-PAGE ของเปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 วิธีที่ 2 .....	76
14. แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 วิธีที่ 2 .....	77
15. การดูตกเส้นแสงของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากใบยางพาราที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนคอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีการที่ 2.....	78
16. การแยกเปอร้ออกซิเดสจากสารละลายโปรตีนพืชที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 โดยคอลัมน์ Con A-Sepharose .....	80
17. แบบแผนการย้อมโปรตีนของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ ตามวิธีที่ 2 ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS .....	82
18. แบบแผนการย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ ตามวิธีที่ 2 ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS.....	83
19. การย้อมไกลโคโปรตีนของสารละลายเปอร้ออกซิเดสที่ได้จากขั้นตอนของคอลัมน์ Con A-Sepharose .....	85

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
20. แบบแผนการหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จากคอลัมน์ Con A-Sepharose ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิลิกโทรฟอริซิส แบบมี SDS .....	86
21. กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิลิกโทรฟอริซิสแบบ SDS.....	87
22. แบบแผนการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิลิกโทรฟอริซิสแบบ ND-PAGE .....	88
23. กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิลิกโทรฟอริซิสแบบ ND-PAGE .....	89
24. การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยคอลัมน์ Sephadex-G 150 .....	91
25. กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 .....	92
26. ผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) .....	93
27. ผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) .....	95
28. ผลของ pH ต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30 และ 60°C.....	96
29. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ และ $1/[o\text{-dianisidine}]$ .....	97
30. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ และ $1/[H_2O_2]$ .....	98
31. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ และ $1/[ABTS]$ .....	100

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
32. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ และ $1/[\text{pyrogallol}]$ .....	101
33. ผลของการเก็บเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดย คอลัมน์ Sephadex G-75 ในรูปสารละลายที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ $-20^{\circ}\text{C}$ .....	102
34. เปรียบเทียบผลการเก็บเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้แห้งโดยการไลโอไฟไลซ์ และในรูปของสารละลายเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลาต่างๆกัน.....	104
35. Isoelectric point ของเปอร์ออกซิเดสที่แยกให้บริสุทธิ์ขึ้นในชั้นตอนคอลัมน์ Con A-Sepharose .....	109
36. แบบแผนการย้อมโปรตีนและความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสในสารสกัด จากใบยางพาราในชั้นตอน $S_1$ .....	111

## ตัวย่อและสัญลักษณ์

ชม.	=	ชั่วโมง
<sup>o</sup> ซ	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
A	=	absorbance
ABTS	=	2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)
Apx	=	ascorbate peroxidase
<sup>o</sup> C	=	degree Celcius
Con A-Sepharose	=	concanavalin A Sepharose
CM-Cellulose	=	carboxymethyl Cellulose
Cys	=	cystein
BSA	=	bovine serum albumin
DAB	=	3,3'-diaminobenzidine
DEAE-Sephacel	=	diethylaminoethyl-Sephacel
DEDTC	=	<i>N,N'</i> -diethyldithiocarbamic acid
DTT	=	dithiothreitol
2,6-DMP	=	2,6-dimethoxyphenol
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA	=	ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)- <i>N-N-N''-N''</i> - tetraacetic acid
g	=	acceleration ( $\text{cm}/\text{sec}^2$ )
HAS	=	human albumin serum

## ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

HMW	=	high molecular weight
HRP	=	commercial horseradish peroxidase
IAA	=	Indole acetic acid
KTBA	=	$\alpha$ -keto- $\gamma$ -thiomethylbutyric acid
$K_m$	=	Michaelis-Constant
$K_{av}$	=	distribution coefficient
LMW	=	low molecular weight
mg	=	milligram
min	=	minute
mA	=	milliampere
mM	=	millimolar
ml	=	milliter
M	=	molar
$M_r$	=	apparent molecular weight
ND-PAGE	=	non-denaturing polyacrylamide gel eletrophoresis
nm	=	nanometer
O.D.	=	optical density
O-PDA	=	<i>o</i> -phenylenediamine
pH	=	$-\log$ hydrogen ion concentration
<i>p</i> -CMB	=	para-chloromercuri benzoic acid
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
POx	=	peroxidase

## ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

PPD-PC	=	<i>p</i> -phenyldiamine-pyrocatechol
pI	=	isoelectric point
PPE	=	partially purified enzyme
RZ	=	reinheitszahl
rpm	=	revolution per minute
R <sub>f</sub>	=	relative mobility
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SYR	=	syringaldazine
Tris-HCl	=	tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride
TEMED	=	N,N,N',N" - tetramethylethylenediamine
V <sub>max</sub>	=	maximum velocity
μmole	=	micromole
α	=	alpha
β	=	beta
ε	=	molar extinction coefficient
<i>p</i>	=	para
<i>o</i>	=	ortho
μl	=	microlitre
%	=	percent



## ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

### ตัวย่อสำหรับกรดอะมิโน

A	=	Alanine
C	=	Cysteine
D	=	Aspartic acid
F	=	Phenylalanine
G	=	Glycine
H	=	Histidine
I	=	Isoleucine
L	=	Leucine
R	=	Arginine
S	=	Serine
T	=	Tryptophan
V	=	Valine

## 1. บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชยืนต้นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย พบมีการปลูกตามภาคต่างๆ ในภาคใต้มีการปลูกมากที่สุด รองลงมาคือภาคตะวันออก (อโนทัย งานทวี, 2538) ผลผลิตยางพาราจะอยู่ในรูปของยางแผ่นและน้ำยางข้น สามารถนำมาแปรรูปในการทำผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ถุงมือยางสำหรับตรวจโรค ถุงมือยางสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการทดลอง และทำผลิตภัณฑ์เครื่องนอน ยางพาราจึงเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยอย่างหนึ่ง สถาบันวิจัยยางได้จัดยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600, GT1, PR 255, PR 261 ให้เป็นยางชั้นหนึ่งเนื่องจากให้ผลผลิตสูง จึงเป็นพันธุ์ที่แนะนำให้เกษตรกรปลูกกันอย่างแพร่หลาย แต่ที่นิยมปลูกกันมากเป็นพันธุ์ RRIM 600 เนื่องจากมีความต้านทานต่อโรคต่างๆที่เกิดกับต้นยางพารา

การสรุปว่ายางพาราพันธุ์ใดให้ผลผลิตสูงนั้นต้องเสียเวลาเป็นอย่างมากทั้งในการทดลองปลูกและติดตามผล จึงได้มีการวิจัยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำยาง เช่น เอนไซม์ 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) และ HMG-CoA synthase (Lynen, 1969) พบว่า ทั้ง HMG-CoA reductase และ HMG-CoA synthase มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณน้ำยางหรือเนื้อยางแห้งมากที่สุด (Wititsuwannakul, 1986 ; Suvachittanont and Wititsuwannakul, 1995) ความสัมพันธ์นี้อาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่ายางพันธุ์ใดที่ให้ผลผลิตสูงได้ด้วย นอกจาก HMG-CoA reductase และ HMG-CoA synthase แล้ว ยังมีการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (ซี่ยาง) ซึ่งได้จากการกรีดโดยการลอกเอาเส้นยางที่ติดกับเปลือกออก พบว่าเปลือกยางมีเปอร์ออกซิเดสในปริมาณสูง และยังพบว่าปริมาณเปอร์ออกซิเดสในเปลือกยางที่กรีดได้จากต้นยางพารา มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำยางสด และน้ำหนักยางแห้ง (Sattayasevana, 1990) จากการศึกษาไอโซไซม์ (isozyme) ของเปอร์ออกซิเดสในส่วนอื่นของยางพารา เช่น ในน้ำยางส่วน C-serum และในใบยางพารา พบเปอร์ออกซิเดสอยู่ทั้งใน

น้ำยางและใบยางพารา โดยในใบยางพาราจะมีเปอร์ออกซิเดสปริมาณสูงกว่าในส่วน C-serum (วัลลี สุวจิตตานนท์ และ คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์, 2535)

เปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติอาจถูกชักนำให้สร้างขึ้นได้ เมื่อพืชได้รับการรุกรานจากเชื้อโรค (Lagrainini and Rothstein, 1987) หรือเมื่อเกิดบาดแผล อาจกล่าวได้ว่าเปอร์ออกซิเดสมีบทบาทเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตัวของพืช นอกจากนี้เปอร์ออกซิเดสอาจเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์และเมตาบอลิซึม ของ Indole Acetic Acid (IAA), กระบวนการสังเคราะห์เอทิลีน, การออกซิไดส์คลอโรฟิลล์มีผลต่อการแก่ของพืช และยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ดและการเติบโตของพืชอีกด้วย

มีการนำเปอร์ออกซิเดสมาใช้ประโยชน์กันอย่างมากมายโดยเฉพาะเปอร์ออกซิเดสจาก Horseradish (หัวผักกาดหนูขาว) ถูกนำไปใช้ในงานวิจัยด้านชีวภาพอย่างแพร่หลาย เช่น นำเอาไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ โดยเป็นเอนไซม์ควบคุมสำหรับตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดและปัสสาวะ หรือเป็นเอนไซม์ร่วมในการติดตามเพื่อวินิจฉัยโรคจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ โดยนำไปเชื่อมกับ antibody ต่อ Immunoglobulin G (anti IgG) ของสัตว์ทดลองแล้วนำไปใช้ในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้อีกด้วย นอกจากนี้เปอร์ออกซิเดสยังช่วยกำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งบางชนิดในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม โดยเปอร์ออกซิเดสจะไปทำปฏิกิริยากับสารดังกล่าว ให้หมดสภาพเป็นพิษพร้อมตกตะกอนลงสู่ก้นบ่อ ก่อนที่จะปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (Klibanov *et al.*, 1983) สำหรับเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารามีประโยชน์ในการทำลายพิษโดยสามารถตกตะกอนสารประกอบฟีนอล(phenol) และอะนิลีน (aniline) บางชนิดได้ (ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล, 2537)

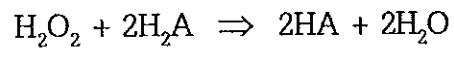
การที่เปอร์ออกซิเดสในใบยางพารามีปริมาณสูงจึงเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากมีการปลูกยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 กันมากทั้งภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย ใบยางพาราโดยทั่วไปนำมาใช้ในการทำดอกไม้ประดิษฐ์เพียงอย่างเดียว ถ้าสามารถแยกเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราได้ปริมาณมากโดยวิธีการทางชีวเคมี เช่นการตกตะกอนด้วยเกลือโครมาโทกราฟีโดยอาศัยประจุ และขนาด ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วไม่ยุ่งยากและต้นทุนในการผลิตต่ำ เป็นการเพิ่มมูลค่าของสินค้าให้สูงขึ้นกว่าเดิม วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ก็เพื่อ แยกเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราให้บริสุทธิ์ตามวิธีทางชีวเคมีเพื่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะนำไปศึกษาธรรมชาติและสมบัติของเปอร์ออกซิเดสเพื่อหาแนวทางที่จะนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

### การตรวจเอกสาร

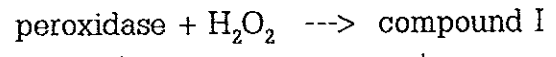
#### 1.1 ความหมายของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เปอร์ออกซิเดสมีการศึกษาเกือบหนึ่งศตวรรษมาแล้วโดยในพืชมีการศึกษาครั้งแรกใน หัวผักกาดหนูขาว (horseradish : *Armoracia rusticana*) โดย Bach และ Chodat (1903 อ้างโดย Dunford, 1963) เปอร์ออกซิเดส : Peroxidase (EC : 1.11.1.7 donor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase ) เป็นฮีโมโปรตีน (hemoprotein) ที่มีฮีโมเกาะติดอยู่ หรือเป็นหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) อาจมีคาร์โบไฮเดรต ต่ออยู่ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) จึงอาจเป็นไกลโคโปรตีน นอกจากนี้ยังจับกับแคลเซียมไอออน (Ca<sup>2+</sup>) เปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่าง peroxide กับ สับสเตรท โดยใช้ ออกซิเจนจาก peroxide มาออกซิไดส์ (oxidise) สารที่เป็นสับสเตรท และเอนไซม์นี้จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อสับสเตรทนั้นสามารถรับออกซิเจน สารที่เป็นสับสเตรทซึ่งถูกออกซิไดส์ เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มต่างๆหลากหลาย เช่น glutathione, cytochrome c ฯลฯ หากเปอร์ออกซิเดสใช้สารใดเป็นสับสเตรท อาจเรียกชื่อเอนไซม์ตามสับสเตรทนั้นเช่น glutathione peroxidase จะออกซิไดส์ reduced glutathione ให้เป็น oxidised glutathione และ cytochrome c เปอร์ออกซิเดสจะใช้ cytochrome c

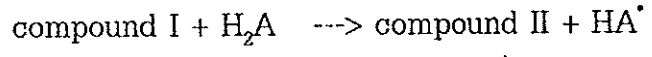
ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีทั้งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ช่วยควบคุมปริมาณของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ร่วมกับแคตาเลส (catalase) โดยเปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่ ออกซิไดส์สารที่เป็นสับสเตรท พร้อมทั้งเปลี่ยน H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ให้กลายเป็น H<sub>2</sub>O ดังสมการ



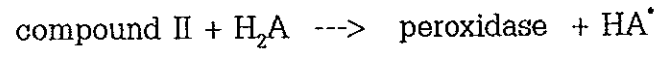
ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังนี้



และ compound I เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนเป็น compound II



ส่วน compound II เมื่อได้รับอิเล็กตรอนอิสระสามารถ เปลี่ยนกลับไปเป็นเอนไซม์ปกติได้



โดย  $H_2A$  หมายถึง สับสเตรทในสภาวะ reduced

$HA^\cdot$  หมายถึง สับสเตรทที่ถูก oxidise

สับสเตรท ซึ่งเปอร์ออกซิเดส สามารถใช้ได้ ได้แก่ สารประกอบจำพวก ฟีนอลิก สารประกอบอะโรมาติกเอมีน และสารประกอบอนินทรีย์บางชนิด นอกจากเปอร์ออกซิเดสมีความจำเพาะกับสับสเตรทแตกต่างกันแล้ว ยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 3 กลุ่มตามประจุที่เป็นองค์ประกอบคือ class I acidic peroxidase , class II neutral or slightly basic peroxidase และ class III strongly basic peroxidase จากการศึกษเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากหัวผักกาดหนูขาว ใน class II พบว่ามีทั้งหมด 7 ชนิด (Shannon *et al.*, 1965) (ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน) หรือเรียกว่ามี 7 ไอโซไซม์ โดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนี้มีสมบัติ เช่น ประจุ น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันจึงทำให้สามารถแยกไอโซไซม์ออกจากกันได้

## 1.2 แหล่งที่พบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เปอร์ออกซิเดสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น เชื้อรา โปรโตซัว สาหร่ายเซลล์เดียว จนถึงพืชชั้นสูงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่างๆ ดังตารางที่ 1-3 จากตารางจะเห็นได้ว่าในสิ่งมีชีวิตกลุ่มเชื้อราพบเอนไซม์ทั้งในผนังเซลล์และที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular) มากมายหลายชนิดที่มีความจำเพาะกับสับสเตรทต่างๆกัน สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น คน วัว หมู แกะ ไก่ และหนู มีเปอร์ออกซิเดสอยู่ในอวัยวะและเนื้อเยื่อส่วนต่างๆเช่น หัวใจ ตับ ปอด ตา สมอง และเนื้อเยื่อไขมัน โดยส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะกับ glutathione และยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่การทำงานขึ้นกับซีลีเนียมและไม่ขึ้นกับซีลีเนียม ดังตารางที่ 2 ส่วนในพืช พบเปอร์ออกซิเดสในส่วนต่างๆของต้นพืช เช่น เมล็ด ราก ลำต้น เปลือกของลำต้น ผล ใบ และอยู่ในส่วนต่างๆภายในเซลล์ เช่น ในผนังเซลล์ ไซโทซอล คลอโรพลาสต์ โดยอาจจะอยู่ในรูปของสารละลายอิสระ หรือจับอยู่กับผนังเซลล์ด้วยพันธะไอออนิก (ionic bond) หรือพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) หรือปล่อยออกมานอกเซลล์ หรืออยู่ภายในเซลล์ (intracellular) ไอโซไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะกับสับสเตรทต่างๆกัน เช่น ascorbate, pyrogallol, o-dianisidine, guaiacol นอกจากนี้ยังพบเปอร์ออกซิเดสในเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของมันเทศในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเปอร์ออกซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

แหล่งพบ peroxidase	ส่วนของเซลล์/เนื้อเยื่อ	สับสเตรท	อ้างอิง
เชื้อรา Class Basidiomycetes			
<i>Coprinus friesii</i> , <i>C. cinereus</i>	cell-wall/extracellular	ABTS, 2,6-DMP	Heinzkill <i>et al.</i> , 1998
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	"	"	"
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	"	"	"
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	cell-wall/extracellular	vanillylacetone	Urzua <i>et al.</i> , 1998
<i>Geotrichum candidum</i>	-	2,6-DMP, guaiacol	Kim and Shoda, 1999
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	Mn <sup>2+</sup>	Ralph and Catchside, 1998
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	aromatic compound	Poulos <i>et al.</i> , 1993
<i>Pleurotus eryngii</i>	-	Mn <sup>2+</sup>	Ruiz-Duenas, 1999
<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>P. ostreatus</i>	-	Mn <sup>2+</sup> , KTBA,	Caramelo <i>et al.</i> , 1999
<i>P. pulmonarius</i>	-	Veratryl alcohol	"
<i>Trametes versicolor</i>	Extracellular	aromatic compound	Jonsson <i>et al.</i> , 1998
สาหร่ายสีเขียว (green algae)	-		
<i>Selenastrum minutum</i>		O <sub>2</sub>	Weger, 1997
<i>Corallina pilulifera</i>	-	monochlorodimedone	Itoh <i>et al.</i> , 1996
โปรโตซัว ( <i>Euglena gracilis</i> )	-	lactate	Ishikawa <i>et al.</i> , 1993

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเปอร์ออกซิเดสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

แหล่งพบ peroxidase	อวัยวะ/เนื้อเยื่อ	สับสเตรท	อ้างอิง
Human	HAS, plasma	Phospholipid	Hurst <i>et al.</i> , 1999
Human	adrenal gland, pancreas, heart, erythrocytes, lymph gland, liver kidney cortex, kidney medulla, skeletal muscle, adipose tissue brain gray-matter, lung, spleen	glutathione " " " "	Marklun <i>et al.</i> , 1982 " " " "
Human, Pig, Sheep, Chicken	Liver	glutathione	Halliwell and Gutteridge, 1989
Hamster, Rabbit, Mouse	"	"	"
Bovine	eye, iris, retina, epithelium	Se-glutathione	Singh and Shichi, 1998
Mice	brain, heart, liver, lung, kidney	glutathione	de Hann <i>et al.</i> , 1998
Rat	adrenal, spleen, kidney, liver, lung, heart, testis	glutathione "	Halliwell and Gutteridge, 1989 "
Rat	Brain	glutathione	Sugimoto <i>et al.</i> , 1997

ตารางที่ 3 ตัวอย่างเปอร์ออกซิเดสจากพืชชั้นสูง

แหล่งพบ peroxidase	ส่วนของพืช/เซลล์	สับสเตรท	อ้างอิง
<i>Araucaria araucana</i>	seed, cell-wall embryo	o-phenyldiamine	Riquelme and Cardemil, 1993
<i>Arabidopsis thaliana</i>	cytosol, chloroplast	ascorbate	Jespersen <i>et al.</i> , 1997
Barley ( <i>Hordeum vulgare</i> )	leaf	o-dianisidine	Saeki <i>et al.</i> , 1986
Bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	hypocotyl	guaiacol	Xue <i>et al.</i> , 1998
Bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	leaf, pulvinus, petiole	guaiacol	McManus, 1994
Cassava tubers	cortex, parenchyma	guaiacol	Sornwatana and Chulavatanatol, 1996
Cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> )	seedlings	guaiacol	Decedue <i>et al.</i> , 1984
Cotton ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	cotyledons	ascorbate	Bunkelmann and Trelease, 1996
Flax ( <i>Linum usitatissimum</i> )	stem	tetramethylbenzidine	McDougall, 1993
Rubber tree ( <i>Hevea brasiliensis</i> )	bark	o-dianisidine	Wititsuwannakul <i>et al.</i> , 1997
Horseradish ( <i>Armoracia rusticana</i> )	root	guaiacol	Shannon <i>et al.</i> , 1966
Korean radish ( <i>Raphanus sativus</i> )	root	o-dianisidine	Lee and Kim, 1994
Litchi ( <i>Litchi chinensis</i> )	fruit, pericarp	guaiacol	Underhill and Critchley, 1995
Lupin ( <i>Lupinus albus</i> )	hypocotyl, root, petiole cotyledon, epicotyl, leaf, meristemless root, seed	guaiacol	Jackson and Ricardo, 1998



ตารางที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเปอร์ออกซิเดสจากพืชชั้นสูง

แหล่งพบ peroxidase	ส่วนของพืช/เซลล์	ลัปสเตอร์ท	อ้างอิง
Lupin ( <i>Lupinus albus</i> )	hypocotyl	coniferyl alcohol	Ferrer and Barcelo, 1994
Lupin ( <i>Lupinus albus</i> )	root	guaiacol	Jackson and Ricardo, 1992
<i>Ipomoea palmetta</i>	leaves	guaiacol	Srinivas <i>et al.</i> , 1999
Maize ( <i>Zea mays</i> )	root, cytoplasm	guaiacol, 3-amino-9-ethylcarbazole	Grisson and Pilet, 1985
Maize ( <i>Zea mays</i> )	cell-suspension, membrane	guaiacol	Myton and Fry, 1995
Maize ( <i>Zea mays</i> )	seedling, mesocotyl, coleoptile leaf, root	"	"
Mung bean ( <i>Vigna radiata</i> )	hypocotyl, phloem, cortical parenchyma, young epidermis	PPD-PC	Chabanet <i>et al.</i> , 1993
Norway spruce ( <i>Picea abies</i> )	seedling, cytosol	guaiacol	Polle and Junkermann, 1996
Opuntia ( <i>Opuntia</i> )	fruit	o-dianisidine, IAA	Padiglia <i>et al.</i> , 1995
Peanut	cell-suspension	ferulic acid	van Huystee and Zheng, 1993
<i>Petunia hybrida</i>	leaf mesophyll	-	Tournaire <i>et al.</i> , 1996

ตารางที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเปอร์ออกซิเดสจากพืชชั้นสูง

แหล่งพบ peroxidase	ส่วนของพืช/เซลล์	สับสเตรท	อ้างอิง
Pepper ( <i>Capsicum annuum</i> )	fruit, pericarp, placenta	capsaicin	Pomar <i>et al.</i> , 1997
<i>Pinus pinaster</i>	Seeding, hypocotyl	ferulic acid	Sanchez <i>et al.</i> , 1996
Potato ( <i>Solanum tuberosum</i> )	tubers	-	Decedue <i>et al.</i> , 1984
Poplar ( <i>Populus x euramericana</i> )	bark, xylem, pholem	PPD-PC	Baier <i>et al.</i> , 1993
Poplar ( <i>Populus trichocarpa</i> )	xylem	ABTS, DAB, SYR	Christensen <i>et al.</i> , 1998
Rice ( <i>Oryza sativa</i> )	leaves	guaiacol	Young <i>et al.</i> , 1995
<i>Sphagnum magellanicum</i>	apical of gametophytes	<i>o</i> -dianisidine	Tutschek, 1997
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	cell-suspension	-	Chaloupkova and Smart, 1994
Spinach ( <i>Spinacia oleracea</i> )	immature leaves, cytosol	ascorbate	Webb and Allen, 1995
Spinach ( <i>Spinacia oleracea</i> )	leaves, chloroplast	ascorbate	Yoshimura <i>et al.</i> , 1999
Soya bean ( <i>Glycine max</i> )	plasma membrane	NADH, <i>o</i> -dianisidine	Zancani <i>et al.</i> , 1995
Sweet potato ( <i>Ipomoea batatas</i> )	cell-suspension	pyrogallol	Kwak <i>et al.</i> , 1995
Tea ( <i>Camellia sinensis</i> )	leaves	ascorbate	Kvaratskhelia <i>et al.</i> , 1997
Tobacco ( <i>Nicotiana tobacum</i> )	cytosol	ascorbate	Orvar and Ellis, 1995
Tobacco ( <i>Nicotiana tobacum</i> )	leaf, mesophyll	ascorbate	de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996

### 1.3 บทบาทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

การศึกษารายละเอียดของเปอร์ออกซิเดสในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น ในราที่ย่อยไม้ (Wood-Rot-fungi) ใน class Basidiomycetes พวก *Panaeolus sphinctrinus*, *P. papilionaceus*, และ *Coprinus friesii* จะผลิตเอนไซม์ manganese peroxidase และ lignin peroxidase ในการย่อยลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อไม้ ทำให้เนื้อไม้ถูกย่อยสลายไป เอนไซม์ทั้งสองชนิดทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (Heinzkill et al., 1998) นอกจากนี้ รา *Ceriporiopsis subvermispota* ผลิต manganese peroxidase และ lignin peroxidase สามารถย่อยสลายลิกนินได้เช่นกัน โดยจะทำปฏิกิริยากับฟีนอลิก และ สารที่เป็น อะโรมาติก ที่อาจทำให้เกิด cation radicals ได้จึงจำเป็นต้องย่อยสลายสารประกอบเหล่านี้ให้มีขนาดเล็กต่อไป (Urzua et al., 1998)

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Pleurotus eryngii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วย peptone และ  $Mn^{2+}$  พบว่ามียีนส์ *mnpl* ซึ่งถอดรหัสเป็นเอนไซม์ lignin peroxidase และ manganese peroxidase สามารถลดปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Ruiz-Duenas, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่า ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มผิวหนังนอกของพลาสมา (plasma) เซลล์ของสาหร่ายสีเขียว *Selenastrum minutum* มีเปอร์ออกซิเดสอยู่ปริมาณสูง โดยสาหร่ายสีเขียวนี้ใช้ออกซิเจนโดยอาศัยเปอร์ออกซิเดสที่หลั่งออกมาออกเซลล์ (Weger, 1997)

### 1.4 บทบาทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสัตว์

เปอร์ออกซิเดสจะมีบทบาทในระบบป้องกันอันตรายของคนและสัตว์ โดยต่อต้านการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากเกิดสภาวะ oxidative stress ซึ่งมีปริมาณของอนุมูลอิสระ (free radicals) ในระดับที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกายได้ อนุมูลอิสระ อาจเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV), โอโซน, ความร้อน, ควันจากท่อไอเสียต่างๆ, ควันบุหรี่ เป็นต้น อนุมูลอิสระจะทำลายชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน, โปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, และกรดนิวคลีอิก โดยเกิดออกซิเดชัน (oxidation) ของไขมัน, คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน, และกรดนิวคลีอิก รวมทั้งการสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีน เป็นผลทำให้โปรตีนเปลี่ยนไปจากเดิม ก่อให้เกิดความเสียหายและอันตรายแก่ร่างกายอันนำไปสู่ภาวะเกิดพยาธิสภาพของโรคบางโรคได้ เช่น มะเร็ง, โรคหัวใจ, ไขมันอุดตันในเส้นเลือด, ไช้ข้ออักเสบ, ต้อกระจก, โรคตับ และโรคผิวหนังอักเสบ เป็นต้น (Halliwell et al., 1992) การป้องกันหรือควบคุม

อนุมูลอิสระทำได้โดยการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ (Jacob and Burri, 1996)

ระบบแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant defense system) สามารถแบ่งออกได้เป็น

1. กลุ่มของเอนไซม์ เช่น catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase เป็นต้น
2. กลุ่มของสารและโปรตีนบางชนิด เช่น glutathione, urate, bilirubin, ubiquinol, albumin, caeruloplasmin และ transferrin เป็นต้น
3. กลุ่มของสารอาหารบางชนิดที่สำคัญ เช่น วิตามินซี, วิตามินอี, และแคโรทีนอยด์ เป็นต้น (Niki *et al.*, 1995)

ในเนื้อเยื่อของมนุษย์มีเอนไซม์ glutathione peroxidase อยู่ในส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น เนื้อเยื่อตับ เม็ดเลือดแดง เนื้อเยื่อส่วนนอกของไต ต่อมหมวกไต ม้าม ต่อมน้ำเหลือง ตับอ่อน ปอด หัวใจ กล้ามเนื้อลาย เนื้อสมองส่วนสีเทา เนื้อสมองส่วนสีขาว เนื้อเยื่อไขมัน (Halliwell and Gutteridge, 1989) นอกจากนี้ในซีรัม (serum) ของคนพบว่า มีเอนไซม์ phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase (PHCPx) มีผลป้องกันการออกซิไดส์ ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ในพลาสมาของคน มีส่วนร่วมในการลดโคออลินอัลบูมิน (albumin) (Hurst *et al.*, 1999) นอกจากนี้เอนไซม์ phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งลดการเกิด hydroperoxide ของฟอสโฟลิปิด ซึ่งช่วยป้องกันชีวโมเลกุลจากสภาวะ oxidative ได้ พบเอนไซม์ PHGPx ได้ ใน อวัยวะของคนและหนู, หัวใจหมู และ สมองหนู เป็นต้น (Sugimoto *et al.*, 1997)

### 1.5 การศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืช

มีการศึกษาเปอร์ออกซิเดสในพืชมากกว่าในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นและมีการแยกเพื่อศึกษาคุณสมบัติและนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆมานานแล้ว หัวผักกาดหนูขาว (horseradish) เป็นพืชชนิดแรกที่น่าหวัมาสกัด พบว่าโครงสร้างของเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 3 class ตามประจุที่เป็นองค์ประกอบคือ class I acidic peroxidase, class II neutral or slightly basic peroxidase และ class III strongly basic peroxidase การศึกษาโครงสร้างของเปอร์ออกซิเดส กลุ่มที่ II neutral or slightly basic peroxidase พบว่า ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ

หมู่พรอสเตติก protoporphrin IX (heme), แคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) และคาร์โบไฮเดรต ทั้งสามส่วนนี้รวมกับโพลีเปปไทด์ มีความสำคัญเกี่ยวกับความคงตัวของเปอร์ออกซิเดส ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 308 ตัว น้ำหนักโมเลกุล 33,890 ดาลตัน มีกรดอะมิโน cysteine จับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) 4 ตำแหน่ง มี  $\text{Ca}^{2+}$  2 โมลต่อโมลของโปรตีน น้ำหนัก 80 ดาลตัน (Morishima *et al.*, 1986) ส่วนหมู่ protohemin IX มีน้ำหนัก 550.5 ดาลตัน (Ator and Ortiz de Montellano, 1987) โดยทั้งสามส่วนมีน้ำหนักรวม 34,520 ดาลตัน นอกจากนี้ยังมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ประมาณ 18 % (Ohlsson *et al.*, 1977) ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาวประมาณ 40,000 ดาลตัน เปอร์ออกซิเดสจากพืชอื่น ๆ มีองค์ประกอบในลักษณะเดียวกับที่พบในหัวผักกาดหนูขาว เช่น แคทไอออนิก เปอร์ออกซิเดสจากถั่วลิสง (Rodriguez Maranon and van Huystee, 1994) ยกเว้น แอสคอร์เบต เปอร์ออกซิเดส (APx) ที่พบในพืชบางชนิด เช่น หัวของ *Solanum* และใบชา (Asada, 1988) จะไม่มี  $\text{Ca}^{2+}$  และคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ

### 1.5.1 ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดส

ไอโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างต่างกันแต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตหนึ่ง เอนไซม์บางตัวอาจมีไอโซไซม์ต่างกันในออร์แกเนลล์ (organelle) ต่างชนิดกัน เช่น ในไซโทซอล และไมโทคอนเดรีย การศึกษาเปอร์ออกซิเดสในสิ่งมีชีวิตต่างๆ พบว่ามีเปอร์ออกซิเดสที่ทำหน้าที่เดียวกันอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ กันและสมบัติต่างกันที่เรียกว่า ไอโซไซม์ มากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตหรือพืชนั้นๆ

เปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากหัวผักกาดหนูขาว กลุ่ม neutral or slightly basic peroxidase มีทั้งหมด 7 ชนิด (7 ไอโซไซม์) เมื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี, เซนตริฟิวจ์และอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าแยกเปอร์ออกซิเดสได้ 86 % ของความม่วงไวเริ่มต้นซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่สูงมาก แต่ละไอโซไซม์มีหมู่ protohemin IX เป็นพรอสเตติก (Shannon *et al.*, 1965)

Aibara และคณะ (1981) ได้ศึกษาสมบัติของ เบสิก เปอร์ออกซิเดส จากหัวผักกาดหนูขาว ที่แยกโดยใช้คอลัมน์ CM-Sephadex พบว่ามี 6 ไอโซไซม์ โดยไอโซไซม์ E1 และ E2 มี pI ต่ำกว่า 10.6 ส่วนอีก 4 ไอโซไซม์ คือ E3 - E6 มี pI มากกว่า 12

การศึกษาไอโซเปอร์ออกซิเดส 6 ตัวจากหัวผักกาดขาว (ไช้เท้า) (korean radish) ประกอบด้วย แคทไอออนิก 2 ตัว และแอนไอออนิก 4 ตัว เปอร์ออกซิเดส ทั้ง 6 ตัว เป็น

ไกลโคโปรตีนโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว (Lee and Kim, 1994) เปอร้ออกซิเดสจากใบของข้าวบาร์เลย์ (Barley leaf) สามารถแยกได้ 7 ชนิด ตามค่า pI ที่แตกต่างกัน การที่เอนไซม์ทั้ง 7 มี pI แตกต่างกันนั้นเนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลต่างกัน (Saeki *et al.*, 1986) เปลือกหุ้มเมล็ด *Araucaria araucana* มี แคทไอออนิก เปอร้ออกซิเดส 2 ตัว ซึ่งมีค่า pI 10.5 ทั้งคู่ (Riquelme and Cardemil, 1993)

ในส่วนต่างๆของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) พบเปอร้ออกซิเดสมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน จากการศึกษาด้วย isoelectric focusing พบว่าในใบยาสูบมี 5 ไอโซไซม์ ในพืท (pith) 4 ไอโซไซม์ และในแคลลัส 8 ไอโซไซม์ แต่ในรากมีเปอร้ออกซิเดสทุกไอโซไซม์ ที่พบในส่วนอื่นๆทั้งหมด 12 ไอโซไซม์ (Lagrimini และ Rothstein, 1987)

### 1.5.2 น้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากพืชต่างชนิดกัน มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันตั้งแต่ 30,100 ดาลตัน ในหัวผักกาดขาว (ไช้เท้า) (Lee and Kim, 1994) จนถึงขนาด 170,000 ดาลตัน ในหัวมันเทศ (Decedue *et al.*, 1984) นอกจากนี้เปอร้ออกซิเดสบางตัวประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวหรือประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย การเลี้ยงเซลล์ถั่วลิสงในอาหารเหลวพบเปอร้ออกซิเดส มีน้ำหนักโมเลกุล 40,000 ดาลตัน (Maldonado and van Huystee, 1980) และ อะซิดิก เปอร้ออกซิเดส 3 ไอโซไซม์ ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์มันเทศ (sweet potato) ในอาหารเหลว มีน้ำหนักโมเลกุลของ 43,000, 40,000 และ 40,000 ดาลตัน (Kwak *et al.*, 1995) ส่วนเปอร้ออกซิเดส 7 ชนิด จากใบข้าวบาร์เลย์ มี pI ต่างกัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุล 44,000 ดาลตัน เท่ากัน (Saeki *et al.*, 1986) ส่วน แคทไอออนิก เปอร้ออกซิเดส ที่แยกได้จากเปลือกหุ้มเมล็ด *Araucaria araucana* 2 ชนิด น้ำหนักโมเลกุล 83,000 และ 145,000 ดาลตัน (Riquelme and Cardemil, 1993)

เปอร้ออกซิเดสจากผนังเซลล์ hypocotyl ของถั่วเขียวมี แคทไอออนิก เปอร้ออกซิเดส 3 กลุ่ม คือ C<sub>1</sub> มีน้ำหนักโมเลกุล 64,000 ดาลตัน, C<sub>2</sub> มีน้ำหนักโมเลกุล 2 ค่า คือ 52,000 และ 85,000 ดาลตัน ส่วน C<sub>3</sub> มีน้ำหนักโมเลกุล 152,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 สาย ซึ่งแต่ละสายมีน้ำหนักโมเลกุล 48,000 ดาลตัน (Chabanet *et al.*, 1993) ส่วนหัวผักกาดขาว (ไช้เท้า) ประกอบด้วย 2 แคทไอออนิก และ 4 แอนไอออนิก เปอร้ออกซิเดส ทั้ง 6 ตัว เป็นไกลโคโปรตีนโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของ C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> มีค่าเป็น 44,000 เท่ากัน ขณะที่ แอนไอออนิก A<sub>3n</sub>, A<sub>3</sub> มีน้ำหนักโมเลกุล

เป็น 31,000 และ 50,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Lee and Kim, 1994) เปอร้ออกซิเดสจากพืชจำพวกตะบองเพชร มีน้ำหนักโมเลกุล  $58,000 \pm 2,000$  ดาลตัน (Padiglia *et al.*, 1995) ในจมูกข้าวสาลีมี แคทไอออนิก เปอร้ออกซิเดส 3 ไอโซไซม์ เป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันประมาณ 35,000 ดาลตัน (Converso and Fernande, 1995) เปอร้ออกซิเดสจากใบชา (*Camellia sinensis*) มีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ  $34,660 \pm 10$  ดาลตัน (Kvaratskhelia *et al.*, 1997)

Decedue และคณะ (1984) ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดส 5 ไอโซไซม์ ของมันฝรั่งโดยวิธีเจลอิเล็กโตรเฟอริส พบว่า ไอโซไซม์ A<sub>5</sub> และ C<sub>3</sub> มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 105,000 และ 94,000 ดาลตัน ตามลำดับ อีก 2 ไอโซไซม์ คือ C<sub>4</sub> และ C<sub>5</sub> มีน้ำหนักเท่ากันคือ 56,500 ดาลตัน ส่วนไอโซไซม์ที่มีน้ำหนักต่ำสุดคือ C<sub>6</sub> 48,500 ดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลที่ได้นี้แตกต่างจากวิธี SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) โดย A5 และ C3 มีน้ำหนักโมเลกุล 125,000 ดาลตัน ส่วน C<sub>4</sub> มีน้ำหนักโมเลกุลถึง 3 ค่า คือ 170,000 125,000, 48,000 ดาลตัน ในขณะที่ C<sub>5</sub> มีน้ำหนักโมเลกุล 3 ค่าเช่นกัน คือ 170,000 125,000 48,500 ดาลตัน มีเพียงเปอร้ออกซิเดส C<sub>6</sub> ที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากันทั้งสองวิธีคือ 48,500 ดาลตัน ความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลอาจเนื่องจากเปอร้ออกซิเดสเป็นไกลโคโปรตีน มีคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลมากมีการเคลื่อนที่ในอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากมีอัตราส่วนของ SDS ที่จับกับโมเลกุลของโปรตีนต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตรวมอยู่ด้วย

### 1.5.3 จลนศาสตร์

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาและการจับกับสับสเตรทของเปอร้ออกซิเดสจากแหล่งต่างกันจะแตกต่างกันออกไป เช่น แคทไอออนิก เปอร้ออกซิเดส 2 ตัว ที่แยกได้จากเปลือกหุ้มเมล็ด *Araucaria araucana* มี pH 5.0 เหมาะสมในการทำงาน และเปอร้ออกซิเดสนี้มีค่า K<sub>m</sub> 13.6 mM สำหรับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ 3.4 mM สำหรับ phenylenediamine (o-PDA) ส่วนค่า V<sub>max</sub> ของ o-PDA เป็น 525 μmole/min (Riquelme and Cardemil, 1993) เปอร้ออกซิเดสในใบของ *Ipomoea palmetta* ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท มีค่า K<sub>m</sub> และค่า V<sub>max</sub> 18.15 mM และ 21.1 μmole/min ตามลำดับ เปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพารามีค่า K<sub>m</sub> 20 mM สำหรับ o-dianisidine (Wititsuwanakul *et al.*, 1997)

#### 1.5.4 สับสเตรท

เปอร์ออกซิเดสจากแหล่งต่างๆสามารถใช้สับสเตรทต่างๆกันได้ เช่น เปอร์ออกซิเดสในผนังเซลล์ของ hypocotyl ถั่วเขียว สามารถใช้ *p*-phenylenediamine-pyrocatechol (PDA-PC) เป็นสับสเตรทในสภาวะที่ไม่มี  $H_2O_2$  และมี  $H_2O_2$  ได้ (Chabanet *et al.*, 1993) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจากผลของพืชจำพวกตะบองเพชรใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท (Padiglia *et al.*, 1995) นอกจากนี้ แคทไอออนิก เปอร์ออกซิเดสจากเมล็ดข้าวสาลี  $C_1$  และ  $C_2$  สามารถออกซิไดส์สับสเตรทที่เป็น pyrogallol, ascorbic acid และ indole acetic acid ส่วนเปอร์ออกซิเดส  $C_3$  สามารถเร่งปฏิกิริยาเฉพาะการออกซิเดชัน ascorbic acid และ indole acetic acid เท่านั้นโดยเอนไซม์  $C_3$  ไม่ต้องใช้โคสับสเตรทพวก  $Mn^{2+}$  หรือ resocinol ในปฏิกิริยา (Converso and Fernandez, 1995) ความสามารถในการจับกับสับสเตรทต่างๆของเปอร์ออกซิเดสจากแหล่งต่างๆ ดังตัวอย่างในตารางที่ 1-3

เปอร์ออกซิเดสจากใบชาใช้ ascorbate เป็นสับสเตรทได้ดี เรียกว่าเป็น แอสคอร์เบต เปอร์ออกซิเดส (ascorbate peroxidase) (APx) โดยทั่วไป แอสคอร์เบต เปอร์ออกซิเดสจะไม่มี cys-disulfide,  $Ca^{2+}$ , และคาร์โบไฮเดรตอยู่ในโมเลกุล และไม่พบเอนไซม์นี้ใน endoplasmic reticulum (ER) ในขณะที่ guaiacol-type-peroxidase จากพืชชนิดอื่นๆเช่น หัวผักกาดหนูและถั่ว จะออกซิไดส์ guaiacol และสารประกอบฟีนอลอื่นๆ โมเลกุลของเอนไซม์จะมีทั้ง cys-disulfide bridge ถึง 4 ตำแหน่ง, มี  $Ca^{2+}$  2 โมเลกุล, และเอนไซม์จะถูกหลั่งออกมาจาก endoplasmic reticulum ในลักษณะของไกลโคโปรตีนที่มี signal peptide สำหรับ ascorbate เปอร์ออกซิเดสที่แยกจากใบชาเป็นฮีมเปอร์ออกซิเดสที่มีความจำเพาะต่อ ascorbate มากกว่า guaiacol แต่มีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในเอนไซม์เหมือนกับ guaiacol-type-peroxidase (Kvaratskhelia *et al.*, 1997)

#### 1.5.5 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ

การศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบและการเรียงตัวของกรดอะมิโนของเปอร์ออกซิเดส พบว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่คงตัว (conserved) ในแบปไทด์ช่วงสั้นๆที่เป็นลักษณะเฉพาะของเปอร์ออกซิเดสคือ RLHFHDCFV, VSCADILA และ VALSGHT (Tyson, 1992) แม้ว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนของเปอร์ออกซิเดสจะเปลี่ยนไปตามชนิดของพืช เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาว class II ทั้ง 7 ไอโซไซม์คือ A-1, A-2, A-3, B, C, D, E พบว่ากลุ่มของไอโซไซม์ A-1, A-2, A-3 มีปริมาณกรดอะมิโน



threonine, serine, glycine และ alanine สูงกว่าไอโซไซม์ B, C โดยไอโซไซม์ B, C มีกรดอะมิโน arginine, methionine, tyrosine และ phenylalanine สูงกว่ากลุ่มแรก (Shannon *et al.*, 1966) ส่วน เบสิค เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาวทั้ง 6 ไอโซไซม์คือ E1-E6 นั้น E1, E2, E5 มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนคล้ายกับเปอร์ออกซิเดสในหัวผักกาดหนูขาว class II ประมาณ 10.1, 11.8 และ 9.8 % ตามลำดับ ส่วนไอโซไซม์ E3 และ E4 มีองค์ประกอบกรดอะมิโนเหมือนกับหัวผักกาดญี่ปุ่นประมาณ 14.1 และ 16.2 %ตามลำดับ ในขณะที่ E6 จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนคล้ายกับหัวผักกาดก้านขาว (turnip) 42.4% (Aibara *et al.*, 1981)

หัวผักกาดขาว (ไช้เท้า) มี แอนไอออนิก เปอร์ออกซิเดส 4 ตัว คือ  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_{3n}$ ,  $A_3$  และ แคทไอออนิก เปอร์ออกซิเดส 1 ตัว คือ  $C_3$  พบว่า  $A_3$  มีกรดอะมิโน threonine และ alanine อยู่สูง แต่มี isoleucine, phenylalanine และ tryptophan ต่ำ ส่วน  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  มี histidine อยู่ 0.5 mol % เท่ากันและมีสูงกว่า  $A_{3n}$  ถึง 0.3 % ส่วน แคทไอออนิก เปอร์ออกซิเดสแตกต่างจาก แอนไอออนิก เปอร์ออกซิเดส คือมี histidine และ arginine อยู่มากกว่า ส่วนการเรียงลำดับกรดอะมิโนจากปลาย  $NH_2$  ต่างต่างกัน และพบว่าปลายด้าน  $NH_2$  ของ anionic เปอร์ออกซิเดส  $A_2$  ถูก block ด้วย pyroglutamate (Lee and Kim, 1994)

การเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบที่แยกได้ทางปลายด้าน  $NH_2$  ของ เอนไซม์ แคทไอออนิก เปอร์ออกซิเดส 2 ตัว จากเปลือกหุ้มเมล็ดของ *Araucaria araucana* (Riquelme and Cardemil, 1995) คล้ายคลึงกันทั้งสองตัว ทั้งคู่มีกรดอะมิโน glycine อยู่สูงประมาณ 30 % ของกรดอะมิโนทั้งหมด รองลงมาคือ serine อยู่สูงประมาณ 17 % แต่เปอร์ออกซิเดสทั้งสองนี้แตกต่างกันในส่วนของ กรดอะมิโนพวก arginine, alanine, valine, phenylalanine และ threonine การมี glycine อยู่สูงนี้จึงเรียกว่า glycine-rich protein (GRPs) (Condit and Meagher, 1986 ; Varner and Cassab, 1986) บทบาทของ glycine ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ glycine ส่วนนี้อยู่ในโครงสร้างของโปรตีนที่เป็นแผ่นพับที่ตา ( $\beta$ -pleated sheet) ในส่วน protoxylem ซึ่งเกี่ยวข้องกับลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของผนัง เซลล์พืช (Fry, 1980)

การเรียงตัวของกรดอะมิโนทางด้านปลาย  $NH_2$  ของเปอร์ออกซิเดสจากใบชา มีลักษณะคล้ายคลึงเปอร์ออกซิเดสในหัวผักกาดหนูขาวและยาสูบประมาณ 75 % (Kvaratskhelia *et al.*, 1997) และการเรียงตัวของกรดอะมิโนปลายด้าน  $NH_2$  ของ แคทไอออนิกเปอร์ออกซิเดส

จากข้าว (Xoo.) มีการศึกษาเพียง 3 fragment เมื่อเปรียบเทียบการเรียงลำดับของกรดอะมิโนของ ข้าว(Pss.)(Reimann *et al.*, 1992), ข้าวบาร์เลย์ (Thordal-Christensen *et al.*, 1991), ข้าวสาลี (Dudler *et al.*, 1991), *Arabidopsis* (Intapruk *et al.*, 1991) และหัวผักกาดหนูขาว (Fujiyama *et al.*, 1990) พบว่า fragment ที่ 1 จากข้าว (Xoo.) มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับในข้าว (Pss.) 79 %, ข้าวบาร์เลย์ 88 %, ข้าวสาลี 79 %, *Arabidopsis* 54 % และ หัวผักกาดหนูขาว 63 % ส่วน fragment ที่ 2 คล้ายคลึงข้าว (Pss) 61 %, ข้าวบาร์เลย์ 52 %, ข้าวสาลี 52%, *Arabidopsis* 30 % และหัวผักกาดหนูขาว 39 % ส่วนการเรียงตัวของ fragment ที่ 3 คล้ายคลึงกับข้าว(Pss.)80 %, ข้าวบาร์เลย์ 87 %, ข้าวสาลี 87 %, *Arabidopsis* 69 % และ หัวผักกาดหนูขาว 50% โดยสรุป fragment ที่ 1 และ 3 จากข้าว (Xoo.) มีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับพืชชนิดอื่นมากกว่า fragment ที่ 2 (Young *et al.*, 1995)

#### 1.5.6 ปริมาณของคาร์โบไฮเดรต

เปอร์ออกซิเดสในพืชส่วนใหญ่เป็นไกลโคโปรตีนมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตมากน้อยต่างกัน แต่เปอร์ออกซิเดสบางตัวไม่พบคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุล เช่น แอสคอร์เบต เปอร์ออกซิเดส (APx) ที่พบในใบชา (*Camellia*) หรือ ในไซโทพลาสซึมของสาหร่ายพวก *Chlamydomonas* (Asada, 1988)

คาร์โบไฮเดรตของเปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาว class II 7 ไอโซไซม์ พบว่า A-1, B, C แต่ละตัวมีปริมาณน้ำตาลอิสระและน้ำตาลอะมิโนอยู่ประมาณ 18 % (Shannon *et al.*, 1966) ของน้ำหนักเอนไซม์ ส่วน เบสิก เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาว 4 ไอโซไซม์ คือ E3 - E6 มีคาร์โบไฮเดรตต่ำ (0.8-4.2 %) ในขณะที่ไอโซไซม์ E1 และ E2 มีคาร์โบไฮเดรตสูง 12.8 - 14.1 % ตามลำดับ (Aibara *et al.*, 1981) เปอร์ออกซิเดสจากใบของข้าวบาร์เลย์ 7 ชนิด ที่มี pI แตกต่างกัน มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบประมาณ 15-26 % (w/w) ค่า pI ที่แตกต่างกันนั้นเนื่องมาจากความแตกต่างของส่วนของคาร์โบไฮเดรต (Saeki *et al.*, 1986) ส่วนเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ถั่วลิสงในอาหารเหลวมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 15 % ของเอนไซม์ (Maldonado and van Huystee, 1980)

แคทไอออนิก เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกหุ้มเมล็ด *Araucaria araucana* 2 ตัวที่มีคาร์โบไฮเดรตเชื่อมอยู่กับโปรตีน 10-12 % และมีน้ำตาลกาแลคโตสมากกว่า 60 % ของน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ในเอนไซม์ทั้งสอง (Riquelme and Cardemil, 1993) ส่วนเปอร์ออกซิเดส

จากหัวผักกาดขาว (ใช้ทำ) ไอโซไซม์  $A_2$  และ  $C_3$  มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ 14 และ 9 % ตามลำดับ เมื่อกำจัดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ น้ำหนักโมเลกุลจะลดลงจาก 44,000 ดาลตัน เป็น 37,000 และ 40,000 ดาลตัน (Lee and Kim, 1994)

### 1.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีโดยเอนไซม์นั้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา pH, อุณหภูมิ, สารยับยั้งเอนไซม์หรือสารที่ทำให้เอนไซม์ดำเนินปฏิกิริยาช้าลง, สารที่มีผลในการกระตุ้น นอกจากนี้สภาพแวดล้อม เช่น ฤดูกาล ไอโซน สารเคมีต่างๆ รวมทั้งฮอร์โมนของพืช ยังมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ในพืชและสิ่งมีชีวิตต่างๆ

#### 1.6.1 อุณหภูมิและ pH

เปอร์ออกซิเดสจากแหล่งต่างๆสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิและ pH แตกต่างกันไป เช่น เปอร์ออกซิเดสในผนังเซลล์ของ hypocotyl ถั่วเขียว ทำงานได้ดีที่ pH 6.8 และความว่องไวจะค่อยๆลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น (Chabanet *et al.*, 1993) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจากผลของพืชจำพวกตะบองเพชรทำงานได้ดีที่ pH 5.75 (Padiglia *et al.*, 1995) เปอร์ออกซิเดสจากใบชา มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 4.5-5.0 (Kvaratskhelia *et al.*, 1997) เปอร์ออกซิเดสในใบ *Ipomoea palmetta* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  ที่ pH 6.0 (Srinivas *et al.*, 1999) ส่วน manganese peroxidase และ lignin peroxidase จากเชื้อ *Coprinus friesii* และ *P. papilionaceus* ทำงานได้ดีที่ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  (Heinzkill *et al.*, 1998)

#### 1.6.2 สารที่มีผลยับยั้ง

Bhattacharyya และคณะ (1994) พบว่า ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) หรือสารที่มีโครงสร้างคล้าย EDTA เช่น N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine (TEMED) 1 mM ที่ pH 6 ยับยั้งเปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาว (horseradish) ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิไดส์หมู่ไอโอดด์ (iodide) ได้ 100 % และ 80% ตามลำดับ การยับยั้งขึ้นอยู่กับ pH และความเข้มข้น ในขณะที่ EDTA- $\text{Zn}^{2+}$  และ ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N-N'-N'- tetraacetic acid (EGTA) ที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่ยับยั้งปฏิกิริยา จากการศึกษาจลนศาสตร์ชี้ว่า EDTA เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของปฏิกิริยาออกซิเดชันของไอโอดด์

เพราะมีตำแหน่งจับที่เหมือนกันโดย EDTA ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ไม่ใช่เพราะ EDTA จับไดวาเลนซ์แคทไอออนพวก  $Ca^{2+}$  ที่เป็นองค์ประกอบของเปอร์ออกซิเดส

desferal ซึ่งสกัดได้จาก *Streptomyces pilosus* สามารถยับยั้งเปอร์ออกซิเดส ในพืชได้โดยจับกับเหล็กที่เป็นองค์ประกอบ (Kahn, 1985) พบว่า desferal 10 mM ยับยั้ง เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาวที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน guaiacol ได้ 100 %, dihydrocapsaicin 84-98 %, coniferyl alcohol 17-23 % และ resveratol 31-42 % การยับยั้งการออกซิเดชันไม่เกี่ยวกับการเป็น chelating ของ desferal การยับยั้งของ desferal ขึ้นอยู่กับลักษณะสับสเตรทพวกฟีนอลิก ไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของหมู่พรอสเตติกที่เป็น องค์ประกอบของเอนไซม์ ( De Pinto and Ros Barcelo, 1996) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจาก เชื้อราที่อยู่ในเนื้อไม้ที่เน่าเปื่อยถูกยับยั้งโดย  $NaN_3$  และ EGTA (Heinzkill *et al.*, 1998)

### 1.6.3 ฮอร์โมนพืช

รูปแบบไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่พบบริเวณ abscission zone ของใบถั่ว แขนก (bean, *Phaseolus vulgaris*) หลังจากการอบด้วยเอทิลีนเป็นเวลา 36 ชม. พบว่ามีความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงสุด เป็นไปได้ที่เอทิลีนสามารถชักนำให้พืชสร้างเปอร์ ออกซิเดสเพื่อเป็นตัวกลางในการประสานเซลล์บริเวณที่มีการตัด (McManus, 1994 )

การเลี้ยงเซลล์มันเทศ (*Ipomoea batatas*) สายพันธุ์ SP-47 ซึ่งผลิตเปอร์ออกซิเดส ในปริมาณสูง ในอาหารเหลวให้เติบโตในสภาวะที่มีความเครียดสูง (Kwak *et al.*, 1995) โดยใช้ฮอร์โมนพืชความเข้มข้นต่างๆเติมลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาต่างๆกัน พบว่า abscisic acid (ABA) ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ) และ ethephon ( $0.5 \text{ ml l}^{-1}$ ) มีส่วนเสริมให้เซลล์ผลิต เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ABA สูงกว่า  $1 \text{ mg l}^{-1}$  และ ethephon เป็น  $1 \text{ ml l}^{-1}$  การผลิตเปอร์ออกซิเดสกลับถูกยับยั้ง ในขณะที่  $CaCl_2$  ความเข้มข้น 50 mM เพิ่มความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสได้ 20 % ส่วน paraquat ความเข้มข้น  $1 \text{ mg l}^{-1}$  กระตุ้นความว่องไวทันทีที่ใส่เข้าไปแต่จะมีผลยับยั้งหลังจาก 13 วันแล้ว เปอร์ออกซิเดสที่ผลิต ได้หลังออกมานอกเซลล์อยู่ในอาหารเหลว เพียง 5-10 % ดังนั้นปริมาณเปอร์ออกซิเดสถูก ควบคุมโดยสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับความเครียดที่เพิ่มเข้าไปในอาหารเหลวโดย ABA มีประ สิทธิภาพกระตุ้นให้เซลล์ผลิตเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นแต่ ABA เองจะไม่มีผลต่อระดับเปอร์ ออกซิเดสที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ อาจเป็นไปได้ที่ ABA มีประสิทธิภาพเป็น elicitor ใน การผลิตเปอร์ออกซิเดสในอาหารเหลว (Kwak. *et al.*, 1996)

### 1.7 การศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในระดับโมเลกุลและยีนส์

ในช่วงเวลาที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนส์โดยมีการแยก cDNA, genomic DNA หรือยีนของสเปอร์ออกซิเดสและการควบคุมการแสดงออกของยีนส์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ทั้งใน ไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ ทั้งส่วนที่เป็นรหัสและส่วนที่ไม่เป็นรหัสของเปอร์ออกซิเดส (non-coding region) โดยศึกษาจากเซลล์ของพืช, จุลินทรีย์และสัตว์บางชนิด (Fujiyama *et al.*, 1990) เช่น lucerne (*Medicago sativa*) พบว่ามี cDNA ของ เปอร์ออกซิเดส 3 ชนิด โดยการใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ 18 ตัวซึ่งเป็นรหัสสำหรับเปปไทด์ FHDCFV (Tyson, 1992) ที่เป็นเอกลักษณ์ของเปอร์ออกซิเดส ในการตรวจสอบยีนส์ของ เปอร์ออกซิเดส คือ *pxdA*, *pxdC*, *pxdD* พบว่าการแสดงออกของยีนส์ทั้งสามจะจำเพาะใน เนื้อเยื่อ ใบ, ราก, และ กิ่ง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ายีนส์ *pxdD* จำเพาะกับท่อลำเลียงอาหาร และเซลล์ collenchyma ในก้านของ lucerne อีกด้วย (Abrahams *et al.*, 1996)

สำหรับพืชมี แอสคอร์เบต เปอร์ออกซิเดส (APx) ทั้งใน ไชโทซอล และคลอโรพลาสต์ ที่แตกต่างกัน (Miyake *et al.*, 1993) cDNA ของ APx ใน ไชโทซอล ของพืชที่รู้ลำดับเบส แล้วหลายชนิด เช่น cDNA ในยาสูบ ประกอบด้วยเบสทั้งหมด 1,040 คู่เบส ทางปลายด้าน 5' ไม่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 83 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 750 คู่เบส ส่วนปลายทางด้าน 3' มีเบสที่ไม่สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 207 คู่เบส cDNA นี้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 250 ตัว น้ำหนักโมเลกุล 27,388 ดาลตัน (Orvar and Ellis, 1995) ซึ่งมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับ APx ในไชโทซอล ของใบข้าวโพด (Breusegem *et al.*, 1995), ใบอ่อนของผักขม (Webb and Allen, 1995) และ *Arabidopsis thaliana* (Kubo *et al.*, 1992) ถึง 83 % โดยมีการแสดงออกของยีนส์ APx สูงในใบและยอดอ่อน นอกจากพบ APx ใน ไชโทซอล แล้ว *Arabidopsis thaliana* ยังมี APx อีก 2 ชนิดอยู่ใน คลอโรพลาสต์ ลักษณะยีนส์ของ APx ยังคงอยู่เหมือนยีนส์ APx ใน ไชโทซอล แต่เปลี่ยนรหัสของกรดอะมิโน Phe-175 ของเปอร์ออกซิเดสใน ไชโทซอล เป็น กรดอะมิโน Trp ที่ตำแหน่งเดียวกันใน คลอโรพลาสต์ (Jespersen *et al.*, 1997)

การแสดงออกของยีนส์ APx ในไชโทซอลของ *Arabidopsis* จะเปลี่ยนแปลงตอบสนอง ต่อโอโซน (O<sub>3</sub>) หรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO<sub>2</sub>) สารทั้งสองทำให้ระดับ mRNA ของ APx ใน ใบเพิ่มขึ้น โดยโอโซนมีประสิทธิภาพชักนำระดับ mRNA ของ APx เพิ่มขึ้น 3.4 - 4.1 เท่า ส่วนซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ชักนำระดับ mRNA ของ APx เพิ่มขึ้นเพียง 1.6 - 2.6 เท่า

นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของเปอร์ออกซิเดสจะเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาของวันโดยจะเพิ่มขึ้นในตอนกลางวันและลดลงในตอนกลางคืน (Kubo *et al.*, 1995)

แอนไอออนิก เปอร์ออกซิเดสของ *Populus kitakamiensis* แสดงออกจำเพาะในส่วนต่างๆของลำต้น (Osakabe *et al.*, 1994) เมื่อแยก genomic DNA ของ ลำต้น *P. kitakamiensis* แล้วใช้ cDNA ของยีนส์ แอนไอออนิก เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวคัดเลือก ยีนส์ พบว่า genomic DNA มียีนส์ แอนไอออนิก เปอร์ออกซิเดส คือ *prxA3a* และ *prxA4a* เรียงต่อกัน ยีนส์ทั้งสองประกอบด้วย สี่ exons และ สาม intron เมื่อถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนจะได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 347 และ 343 ตัวตามลำดับ แต่การแสดงออกของยีนส์ *prxA3a* และ *prxA4a* จะแตกต่างกันในส่วนลำต้นของ *P. kitakamiensis* (Osakaba *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ยังศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ แคทไอออนิก เปอร์ออกซิเดส จากพืชวงศ์ถั่ว (*Stylosanthes humilis*) (Curtis *et al.*, 1995) พบว่าประกอบด้วย 1,848 คู่เบส ซึ่งมี 300 นิวคลีโอไทด์ด้าน upstream ของยีนส์นี้ มี สอง intron อยู่ตรงตำแหน่ง 212 ถึง 670 และ 868 ถึง 1,293 ส่วนที่เหลือเป็นรหัสของกรดอะมิโน 318 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 26,000 ดาลตัน โปรตีนที่ได้มี signal peptide ของกรดอะมิโน 25 ตัวที่เป็นเอกลักษณ์ของ เปอร์ออกซิเดส อยู่ 3 ตำแหน่ง คือ ในช่วงตำแหน่งที่ 56 ถึง 73 , 114 ถึง 151 และ 184 ถึง 194 เปอร์ออกซิเดสนี้ประกอบด้วย cystein 8 ตัว เกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ และ histidine 2 ตัว เกี่ยวข้องกับหมู่ฮีม ของเปอร์ออกซิเดส (Morgens *et al.*, 1990) .

นอกจากนี้ยังศึกษา promoter ของยีนส์สำหรับ แอนไอออนิก เปอร์ออกซิเดสในต้นยาสูบ พบว่าเมื่อนำ promoter ของเปอร์ออกซิเดสขนาด 3 kb ไปเชื่อมต่อกับยีนส์ *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase (GUS) สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนส์ได้ใน mesophyll protoplasts ของยาสูบ พบว่าสารต่างๆที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น benzyladenine, ethylene, และ gibberellic acid ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ promoter นี้ ในทางตรงกันข้ามกรด abscisic (ABA) , Indole acetic acid (IAA) และ กรด naphthaleneacetic ความเข้มข้นต่ำๆจะยับยั้งการแสดงออกของ promoter เปอร์ออกซิเดส ได้ถึง 50 % ส่วนสารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิน (auxin) เช่น *p*-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB) กระตุ้นการแสดงออกของ promoter ให้สูงขึ้นได้ด้วย (Klotz and Lagrimini, 1996)

ในสัตว์ชั้นสูง เช่น เนื้อเยื่อตาของวัวมีเอ็นส์ กลูตาไทโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) (GPx) ที่ไม่มีซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบ น้ำหนักโมเลกุล 100 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย เมื่อแยก cDNA แล้วหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ พบว่ามี 672 คู่เบส ถอดรหัสเป็นโพลีเปปไทด์มีน้ำหนักโมเลกุล 25,064 ดาลตัน (Singh and Shichi, 1998)

ในอวัยวะส่วนต่างๆของวัวมีระดับ mRNA ของ GPx อยู่สูงใน ciliary body โดยเฉพาะใน retina และ iris นอกจากนี้ระดับ mRNA ยังมีอยู่สูงในปอด และลดลงมากในกล้ามเนื้อ, ตับ, ตา, หัวใจ, อัณฑะ, ต่อมไทมัส, ไต และนม ส่วนในสมองจะพบ mRNA ของ GPx ในระดับต่ำ (Singh and Shichi, 1998)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และในพืชมีเอ็นส์ phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) เร่งปฏิกิริยาการลด hydroperoxide ของ ฟอสโฟลิปิด ป้องกันซีลีเนียมจากสภาวะเครียด มีการแยก cDNA ที่มีรหัสของเอ็นส์ PHGPx จากผักขม และเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของเอ็นส์ PHGPx กับยาสูบ, *Arabidopsis* และเซลล์ส้ม พบว่าคล้ายกัน 77 % ส่วนเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ในอัณฑะของคน และหนู, หัวใจหมู, สมองหนู พบว่ามีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับผักขม 50 % (Sugimoto et al., 1997)

### 1.8 บทบาททางชีวภาพของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืช

การศึกษาเกี่ยวกับเปอร์ออกซิเดสและไอโซเปอร์ออกซิเดสในพืชพบว่า พืชส่วนใหญ่มีเปอร์ออกซิเดส เป็นโกลโคโปรตีนที่ไม่มีสีร่วมกับ ferriporphyrin เป็นสีน้ำตาลมีการศึกษาบทบาททางชีวภาพของเปอร์ออกซิเดส ทั้งในระบบสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) ทำให้ทราบว่าเปอร์ออกซิเดสมีส่วนเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ มากมายเพราะเปอร์ออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาจำเพาะกับสับสเตรทที่เป็นสารประกอบในหลอดทดลองได้หลายชนิด แม้ว่ามีการพบเปอร์ออกซิเดสในพืชหลากหลายชนิด และศึกษาเรื่องราวเปอร์ออกซิเดสจากพืชเป็นเวลานานแล้วก็ตาม แต่บทบาทและหน้าที่ของเปอร์ออกซิเดสเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าเปอร์ออกซิเดสมีบทบาทและหน้าที่สำคัญต่อพืชอย่างแน่นอน เนื่องจากพบว่ามีเปอร์ออกซิเดสอยู่ในต้นพืชและส่วนต่างๆของพืช ทั้งใน ราก, ต้นอ่อน, ลำต้น, เปลือกของลำต้น, ใบ, เมล็ดและยางของพืช เปอร์ออกซิเดสจากพืชต้นเดียวกัน อาจมีได้มากกว่า 1 ชนิด และกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อต่างกันและมีปริมาณมากน้อยต่างกัน อาจมีบทบาทคล้ายกันหรือต่างกันก็ได้

เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติ หรือถูกชักนำให้สร้างขึ้นเมื่อพืชถูกรุกรานจากเชื้อโรค หรือเมื่อพืชเกิดบาดแผล และมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ หลายรูปแบบ เช่น การซ่อมแซมผนังเซลล์ พบเปอร์ออกซิเดสในรูปของสารละลายอิสระ หรือจับอยู่กับส่วนประกอบต่างๆของผนังเซลล์ด้วยพันธะไอออนิกหรือพันธะโควาเลนต์ (Ros *et al.*, 1988) ทำให้เกิดสารประกอบพวกอะลิฟาติก (aliphatic) หรืออะโรมาติก (aromatic) บริเวณที่เกิดบาดแผล (Espelie and Franceschi, 1986) และเปอร์ออกซิเดสจะเป็นตัวเร่งกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน (lignin) ซูเบอร์ิน (suberin) เพื่อเสริมความแข็งแรงให้กับเนื้อไม้ (van Huystee and Zheng, 1993)

นอกจากนี้เปอร์ออกซิเดสในพืชยังมีบทบาทเกี่ยวกับการควบคุมการเจริญเติบโตและการขยายตัวของเซลล์, เมตาบอลิซึมของ ออกซิน ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช, การเปลี่ยนสีผิวของผลไม้, การเกิด diphenyl bridge, เกี่ยวกับความแข็งแรงของผนังเซลล์ พืชโดยสร้างไกลโคโปรตีนที่มี hydroxyproline ปริมาณสูง (hydroxyproline-rich glycoprotein, HRGP)

### 1.8.1 บทบาทในการสร้างผนังเซลล์ (Role in cell wall biosynthesis)

ซีโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชและเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อไม้คือ โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เช่น เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส, เพคติน และ ลิกนิน โดยมีเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวกลางผลิต hydrodiferulic acid ซึ่งเป็นสารที่เชื่อมโยงโพลีแซคคาไรด์ (Fry, 1982) ส่วน แคทไอออนิก เปอร์ออกซิเดสจากถั่วลิสง สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ferulic acid ได้และอาจเกิดการรวมตัวเป็น diferulic acid ทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง (van Huystee and Zheng, 1993) ยังพบเปอร์ออกซิเดสละลายอยู่ใน apoplastic และจับอยู่กับผนังเซลล์ด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะโควาเลนต์ โดยเกี่ยวข้องกับออกซิไดส์ ferulic acid ในผนังเซลล์ส่วน hypocotyl ของต้นสน เพื่อเกิดเป็น hydroxycinnamic acids เสริมความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ ( Sanchez *et al.*, 1996) นอกจากนี้พบ อะซิติก เปอร์ออกซิเดสในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป มีบทบาทเกี่ยวกับการสร้างลิกนิน (Chabenet *et al.*, 1993) ที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อไม้เพิ่มความแข็งแรงให้ผนังเซลล์พืชโดยสร้างไกลโคโปรตีนที่มี hydroxyproline ปริมาณสูง (Fry, 1982) และเชื่อมโยงโพลีเมอร์ของ biphenyl (Fry, 1986) และจากการศึกษาที่ลำเลียงน้ำของต้นอ่อน lupin โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) พบว่า อะซิติก เปอร์ออกซิเดสจะอยู่ในผนัง



เซลล์ชั้นแรกและมีมากขึ้นในชั้นที่สองของ vascular xylem ที่จะกลายเป็นเนื้อไม้ และความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสจะค่อยๆลดลงในระหว่างการสร้างเนื้อไม้ เปอร์ออกซิเดสที่ผนังเซลล์ของท่อลำเลียงน้ำของต้นถั่ว Lupin เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนินของผนังเซลล์ในช่วงแรกเพราะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ coniferyl alcohol ซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นในกระบวนการสร้างลิกนินของผนังเซลล์ของท่อลำเลียงน้ำของต้นถั่ว Lupin แต่ช่วงหลังความว่องไวเปอร์ออกซิเดสเริ่มลดลง (Ferrer and Barcelo, 1994)

Jackson และ Ricardo (1992) ศึกษาเปอร์ออกซิเดสของถั่ว Lupin ในระยะต้นอ่อน ติดตามการพัฒนาการเปลี่ยนแปลง 2 ช่วง คือ skotomorphogenic ในที่มืด และ photomorphogenic ในที่ได้รับแสง พบว่าหน้าที่ของ อะซิติก เปอร์ออกซิเดส A2, pI 5.2 เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนิน

### 1.8.2 บทบาทในการป้องกันตัวเองของพืช (Plant defense)

เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อของพืชนั้นอาจตอบสนองต่อความเครียดหลายอย่างรวมถึงการได้รับเชื้อโรค เช่น เชื้อไวรัส, เชื้อจุลินทรีย์, และเชื้อรา ภาวะความเครียดที่เกิดจากความเค็ม การเกิดบาดแผล หรือมลภาวะจากอากาศ และโดนรังสีแกมมาบ่อยๆมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบของไอโซเปอร์ออกซิเดส

เปอร์ออกซิเดสอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวของพืช สมมุติฐานนี้ได้จากการศึกษาของ Lagrimini และ Rothstein (1987) ที่พบว่าเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นยาสูบ เช่น ใบ, ราก, พืช (pith) ของลำต้น, และแคลลัส พบเปอร์ออกซิเดสที่มีลักษณะเฉพาะตัวที่แตกต่างกันจากการทำ isoelectric focusing พบว่าในรากมีเปอร์ออกซิเดสทุกไอโซไซม์ที่พบในส่วนอื่น ๆ มีทั้งหมด 12 ไอโซไซม์, แคลลัสพบ 8 ไอโซไซม์, ใบพบ 5 ไอโซไซม์ และในพืชพบ 4 ไอโซไซม์

ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่ต่างกันในตัวยาสูบอาจทำหน้าที่แตกต่างกันไป เช่น การนำใบและพืชมมาทำให้เกิดบาดแผลก่อนไปแช่ในน้ำกลั่น หรือสารละลาย cyclohexamide เป็นเวลาต่างๆกันในที่มืด พบว่า สารสกัดจากใบและพืชรากทำให้เกิดบาดแผลและแช่ในน้ำกลั่น 72 ชม. จะมีปริมาณเปอร์ออกซิเดสสูงสุด และจะไม่พบไอโซไซม์เหล่านี้ในสารที่สกัดจากใบและพืชรากที่ไม่มีบาดแผล ดังนั้นไอโซไซม์เหล่านี้อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมผนังเซลล์ แต่ข้อเท็จจริงยังไม่ทราบแน่ชัด เพราะในรากที่สมบูรณ์พบว่ามีไอโซไซม์ด้วย ส่วนสารสกัดจากใบและพืชรากที่พบในสารละลาย cyclohexamide จะยับยั้งไม่ให้สร้าง

เปอร์ออกซิเดส และยังพบว่า tobacco mosaic virus (TMV) สามารถชักนำใบยาสูบให้มีการสร้างเปอร์ออกซิเดสขึ้นมาอีกหนึ่งไอโซไซม์ ซึ่งไม่พบเอนไซม์นี้ในเซลล์ปกติ

Biles และคณะ (1990) ศึกษาบทบาทของเอทิลีนในการต่อต้านโรค โดยนำใบเลี้ยงแตงกวามาทำให้เกิดแผลประมาณ 21 % เทียบกับแตงกวาชุดควบคุม เมื่อนำมาอบด้วยเอทิลีน ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/ลิตร นาน 24 ชม. แล้วปมด้วยเชื้อ *Colletotrichum lagenarium* พบว่าขนาดของรอยแผลเพิ่มขึ้นประมาณ 36 % เอทิลีนไม่สามารถเหนี่ยวนำให้พืชต้านทานเชื้อโรคแต่เอทิลีนชักนำให้สร้างเปอร์ออกซิเดส และ HRGP ได้ โปรตีนเหล่านี้ อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของพืช

เปอร์ออกซิเดสอาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ด ในขณะที่เดียวกันก็อาจมีหน้าที่ในการซ่อมแซมผนังเซลล์ที่เกิดบาดแผล สมมุติฐานนี้ได้จากการศึกษาของ Riquelme และ Cardemil (1993) ที่พบว่า การทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดของ *Araucaria araucana* เกิดบาดแผล และแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลาต่างกันคือ 24 48 72 และ 96 ชม. เมื่อนำเปลือกหุ้มเมล็ดปกติที่แช่น้ำ 24 ชม. มาสกัดพบว่ามีเปอร์ออกซิเดสน้ำหนักโมเลกุล 145,000 ดาลตัน แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการแช่น้ำเป็น 72 ชม. มาสกัด พบว่ามีเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น แต่เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นมีน้ำหนักโมเลกุล 83,000 ดาลตัน เช่นเดียวกับกรณีที่ทำให้เมล็ดเกิดบาดแผล แล้วนำไปแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชม. สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมีเปอร์ออกซิเดสขนาด 83,000 ดาลตัน เพิ่มขึ้นคิดเป็น 20 % ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่ไม่ได้แช่น้ำและเปอร์ออกซิเดสจะคงที่อยู่นาน 96 ชม. ในขณะที่สารสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกหุ้มเมล็ดปกติที่ได้จากการแช่น้ำ 72 ชม. จะมีเปอร์ออกซิเดสขนาด 145,000 ดาลตัน ลดลงคิดเป็น 27 % ของเปอร์ออกซิเดสที่ไม่ได้แช่น้ำเช่นกัน เปอร์ออกซิเดสขนาด 83,000 ดาลตัน เพิ่มขึ้นทั้งในส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดปกติและเปลือกหุ้มเมล็ดที่ทำให้เกิดบาดแผลที่แช่น้ำ 72 ชม. น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ดและอาจมีหน้าที่ในการซ่อมแซมผนังเซลล์ที่เกิดบาดแผล

การเกิดสภาวะ oxidative stress กับพืชทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเกิดการเชื่อมของ HRGP และ proline-rich ที่ผนังเซลล์ของมทโมเลกุลโดยอาศัยเปอร์ออกซิเดส (van Huystee and Zheng, 1993) ส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย, เชื้อรา หรือสิ่งเร้าจากภายนอก จะหลั่ง extensin ชนิด HRGP ผ่านเนื้อเยื่อของพลาสมา (plasma membrane) ออกมาในสารละลายและจับอยู่กับโพลีแซคคาไรด์ ที่เป็นกรดของผนังเซลล์ด้วยพันธะไฮออนิก เชื่อว่าเปอร์ออกซิเดสมีหน้าที่เชื่อมโยง HRGP ทำให้ผนังเซลล์พืชมีความแข็งแรง

พืชโดยทั่วไปจะไม่มีระบบภูมิคุ้มกันป้องกันการติดเชื้อ แต่สามารถปรับตัวเพื่อต่อต้านโรคได้ โดยทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตาย ซึ่งจะสังเกตเห็นรอยไหม้สีน้ำตาลที่เรียกว่า necrosis, สร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เรียกว่า phytoalexin, เกิดกระบวนการสร้างลิกนิน เพื่อกักเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามต่อไปยังเซลล์ข้างเคียง และเกิดการซ่อมแซมผนังเซลล์ให้แข็งแรงขึ้น หรือสร้างโปรตีนทำลายเชื้อโรคเรียกว่า pathogenesis related protein ได้แก่ 1,3 บีต้ากลูคาเนส (1,3-β-glucanase), ไคตินเนส (chitinase) และเปอร้ออกซิเดส ดังนั้นเปอร้ออกซิเดสจึงจัดได้ว่ามีส่วนในการป้องกันตัวเองของพืช Breton และคณะ (1997) พบว่าปฏิกิริยาการต่อต้าน *Microcyclus ulei* ในใบยางพาราสัมพันธ์กับความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส และกระบวนการสร้างลิกนิน นอกจากนี้ยังพบว่า *Corynespora cassiicola* เป็นเชื้อราซึ่งก่อให้เกิดโรคใบจุด และใบร่วงในยางพารา ทำให้มีการสะสม scopoletin (Scp) และความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสในใบยาง เมื่อวิเคราะห์เปอร้ออกซิเดสในใบยางที่ถูกเชื้อราตัวนี้รุกราน โดยวิธี isoelectric focusing พบว่ามีปริมาณของ อะซิติก และ เบลิก เปอร้ออกซิเดสเพิ่มขึ้น โดยที่เปอร้ออกซิเดสจะเพิ่มในใบยางพันธุ์ต้านทานมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ การสะสมของ scopoletin จะสมดุลกับเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส นอกจากในยางพาราแล้ว ถั่วสามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำลายเชื้อโรคเช่น ไคตินเนส, 1,3 บีต้ากลูคาเนส, และเปอร้ออกซิเดส เมื่อพืชได้รับเชื้อโรค เอนไซม์ทั้ง 3 จะถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้น เพื่อต้านทานโรค (Xue et al., 1998)

### 1.8.3 บทบาทเกี่ยวกับฮอร์โมนพืชในการเกิด IAA oxidation และการสังเคราะห์

#### เอทิลีน

เปอร้ออกซิเดสในพืชอาจเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึม ของ IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติมีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช โดยมีเปอร้ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน IAA ได้ (Hinman and Lang, 1965) และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ IAA สองทางที่ตรงข้ามกันคือ หนึ่งการควบคุมระดับของ IAA ซึ่งเกิดขึ้นภายในโดยการสร้างสารในรูปแบบที่ไม่ว่องไว สองเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสารตัวกลางของ IAA ที่ว่องไว (Cohen and Bandurski, 1978) นอกจากนี้กระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนในพืชต้องอาศัย IAA oxidase และ เปอร้ออกซิเดส ในการสร้างเอทิลีน จาก 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) (Vioque et al., 1981)

#### 1.8.4 บทบาทเกี่ยวกับแคตตาบอไลสมของคลอโรฟิลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแก่ของพืช

เปอร์ออกซิเดสมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของคลอโรฟิลล์และการเกิด lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อของพืช โดยความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสชนิดแอนไอออนิก จะเพิ่มขึ้นในระหว่างการแก่ของพืชโดยทั่วไป (Hazell and Murray, 1982) นอกจากนี้เปอร์ออกซิเดสยังเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ในสารประกอบอะโรมาติกและสารประกอบอะลิฟาติก (Klibanov *et al.*, 1981) รูปแบบการเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ของสารประกอบอะโรมาติกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในขณะที่การเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ของ proline โดยเปอร์ออกซิเดสที่ผนังเซลล์ทำให้เกิด hydroxy proline ขึ้นในผนังเซลล์ (Ridge and Osborne, 1970)

#### 1.8.5 บทบาทอื่นๆ

##### 1.8.5.1 การเน่าเสียของพืช

เปอร์ออกซิเดสอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของมันสำปะหลัง (cassava) อย่างรวดเร็วหลังจากเก็บเกี่ยว พบว่าลักษณะของเปอร์ออกซิเดสที่บริเวณเปลือกแตกต่างจากเปอร์ออกซิเดสในส่วนเนื้อเยื่อของมันสำปะหลัง (ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล และมนตรี จุฬาววัฒนทล, 2535) นอกจากนี้พบว่าหลังจากเก็บหัวมันสำปะหลังไว้จะมีการเปลี่ยนแปลงไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสในส่วนเปลือก (cortex) และเนื้อเยื่อพื้นฐาน (parenchyma) ของหัวมันสำปะหลัง และความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสจะเพิ่มขึ้นในทุกส่วนของหัวมันที่เสื่อมสภาพแล้ว (Sornwatana and Chulavatnatol, 1996) เปอร์ออกซิเดสจากหัวมันสำปะหลังสกัดจากเนื้อเยื่อสดที่เก็บใหม่ๆ สามารถแยกเอนไซม์ได้ 3 กลุ่ม คือ ประจุบวก, ประจุลบ และกลุ่มที่เป็นกลาง โดยการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในสภาพธรรมชาติ แต่หากเก็บรากไว้ 7 วันหลังจากเก็บเกี่ยว ความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสในกลุ่มของประจุบวกเพิ่มขึ้น ทั้งในส่วนเปลือกและเนื้อเยื่อพื้นฐานของหัวมันสำปะหลัง ในทางตรงข้ามกลุ่มที่มีประจุลบและกลุ่มที่เป็นกลางในเนื้อเยื่อทั้งสองส่วนกลับลดลง สารสกัดจากทั้งในส่วนเปลือกและเนื้อเยื่อพื้นฐานของหัวมันสำปะหลังที่เก็บไว้ถึง 7 วัน มี pH 4 เหมาะสมในการทำงาน แต่สารสกัดนี้มีความเสถียรที่ pH 5-11 ทำให้คิดว่าการเปลี่ยนแปลงของเปอร์ออกซิเดสในหัวมันสำปะหลังจะมีผลต่อการเสื่อมสภาพของหัวมันสำปะหลังในช่วงหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้ว (Sornwatana and Chulavatnatol, 1997)

### 1.8.5.2 การเปลี่ยนสีผิวของผลไม้

เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส มีบทบาทเกี่ยวกับการเปลี่ยนสีผิวผลไม้ เช่น ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn) ซึ่งเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญ จะพบเอนไซม์ทั้งสองในส่วนของเปลือกหุ้มรังไข่ ที่โตเต็มที่โดยพบทั้ง 3 ชั้น คือ epicarp, mesocarp, endocarp แสดงว่าเอนไซม์นี้น่าจะมีความสำคัญในการเปลี่ยนสีผิวทำให้ผลมีสีน้ำตาล ดังนั้นการควบคุมสีน้ำตาลของผลไม้ให้ช้าลงหลังจากเก็บแล้วจึงอาจทำได้โดยยับยั้งการทำงานของเปอร์ออกซิเดส (Underhill and Critchley, 1995)

### 1.8.5.3 เมตาบอลิซึมของอัลคาลอยด์ (alkaloid)

Pomar และคณะ (1997) พบว่า อะซิติค และ เบสิก เปอร์ออกซิเดส มีบทบาทเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มักพบในพืชและบางชนิดมีประโยชน์ในทางยา เช่น capsaicinoids เป็นอัลคาลอยด์ที่พบในพริกทำให้พริกมีกลิ่นฉุน เปอร์ออกซิเดสอาจเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ และการเสื่อมลงของ capsaicinoids ในระหว่างการพัฒนาของผล โดยพบว่า เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกผล (pericarp) ของพริกหยวก (*Capsicum annuum*) สามารถออกซิไดซ์ capsaicin ได้ดีมากดังนั้น เปอร์ออกซิเดสน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของอัลคาลอยด์ในพริก

### 1.8.5.4 การพัฒนาเจริญเติบโตของพืช

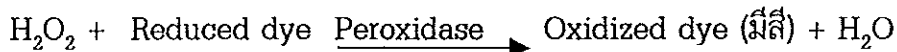
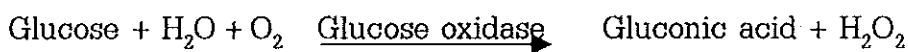
Jackson และ Ricardo (1992) พบกลุ่มเปอร์ออกซิเดส 6 ตัว คือ  $A_0$ ,  $A_2$ ,  $B_2$ ,  $B_5$ ,  $B_6$  และ  $B_8$  ในเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระยะแรกของการพัฒนาการเจริญเติบโตเป็นลำต้นและใบ (vegetative) ของ Lupin พบว่าเปอร์ออกซิเดสกลุ่ม  $B_5$ ,  $B_6$ ,  $B_8$  จะทำงานร่วมกันเกิดรูปแบบใหม่ของสารเชิงซ้อนเปอร์ออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส  $B_2$  โดยทั้งสองกลุ่มมีหน้าที่พัฒนาเจริญเติบโตของถั่ว Lupin เพราะพบเปอร์ออกซิเดสทั้งส่วนที่จับอยู่กับผนังเซลล์ด้วยพันธะไอออนิกและส่วนที่ละลายได้ ในเนื้อเยื่อทุกส่วนที่ทดสอบ (Jackson and Ricardo, 1998)

## 1.9 การนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปประยุกต์ใช้

เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ โดยนำไปช่วยตรวจวัดระดับสารต่างๆ ในเลือดและปัสสาวะ ตลอดจนเป็นเอนไซม์ร่วมในการติดฉลากเพื่อวินิจฉัยโรคจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่ผิดปกติของคนไข้ และใช้ในการวิเคราะห์ด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน เพราะมีความไวในการตรวจสอบสูง นอกจากนี้ยังนำเปอร์ออกซิเดสไปประยุกต์ใช้เกี่ยวกับยาในการบำบัดโรค, ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงการกำจัดสารพิษพวกฟีนอลิกและอะโรมาติกในน้ำเสีย (Klibanov, 1983) และสารก่อมะเร็งบางชนิดในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม โดยเปอร์ออกซิเดสทำปฏิกิริยากับสารดังกล่าวให้หมดสภาพเป็นพิษ ตกตะกอนลงสู่ก้นบ่อก่อนที่จะถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

### 1.9.1 ทางด้านการแพทย์

เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์โดยเฉพาะเปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาวถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร เช่น ในการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด ซึ่งจะอาศัยปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี ดังตัวอย่างที่แสดงในสมการ



เมื่อใช้เอนไซม์ glucose oxidase ร่วมกับเปอร์ออกซิเดส สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้ โดยวัดปริมาณของสีที่เกิดขึ้น นอกจากการหาปริมาณของกลูโคสแล้วยังมีวิธีการที่อาศัยเปอร์ออกซิเดสช่วยตรวจวัดปริมาณของสารอื่นๆ ซึ่งมีความสำคัญทางด้านการแพทย์อีก เช่น กรดยูริก ไตรกลีเซอไรด์ และคลอเรสเตอรอล

นอกจากนี้เปอร์ออกซิเดสยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในวิธี Enzyme linked immuno sorbent assay หรือ ELISA สามารถนำมาวิเคราะห์สารได้หลายประเภท ถ้าหากมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารนั้นๆ วิธี ELISA แตกต่างจากวิธี Radio-immunoassay (RIA) เพราะไม่ใช้สารกัมมันตรังสี แต่แอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณจะติดอยู่กับกระดาษกั้นหลอดหรือก้นหลุมของ microtiter plate เมื่อเติมแอนติบอดีตัวแรก จะเกิด แอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ จะหาปริมาณสารนี้ได้ โดยการใช้แอนติบอดีตัวที่สอง (developing antibody) ที่เชื่อมต่อกับ เปอร์ออกซิเดส หรือ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase)

เป็นต้น ปริมาณแอนติบอดีตัวที่สองที่จับจะสัมพันธ์กับปริมาณของสารเชิงซ้อนหรือคอมเพล็กซ์ที่ติดอยู่บนเพลต วัดได้โดยการเติมสับสเตรทของเอนไซม์นั้นและตรวจสีของผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา เช่นสับสเตรทของเปอร์ออกซิเดส ที่ให้ผลผลิตที่ไม่ละลายน้ำ คือ 3,3'-diaminobenzidine (DAB) ซึ่งจะให้ผลสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังตรวจหาปริมาณสาร โดยการให้สารเรืองแสง เช่น เมื่อใส่ luminol ให้เป็นสับสเตรทของเปอร์ออกซิเดสที่จะเรืองแสงขึ้นหลังทำปฏิกิริยา ซึ่งตรวจจับได้ด้วยฟิล์มเอกซเรย์ เช่นเดียวกับการใช้สารกัมมันตรังสี

เปอร์ออกซิเดสยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการออกฤทธิ์ของยา isoniazid (IHN) ซึ่งเป็นยารักษาวัณโรค ก่อนที่ยาตัวนี้จะออกฤทธิ์รักษาวัณโรคได้นั้นต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีหมู่ฮีมเป็นองค์ประกอบ คือ แคตาเลสและเปอร์ออกซิเดสเพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ได้ (Saint-Joanis *et al.*, 1999)

### 1.9.2 ทางด้านอุตสาหกรรม

เปอร์ออกซิเดสอาจถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์โดยยีสต์ เมื่อเติมเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากเชื้อราที่ย่อยไม้กลุ่ม *Trametes versicolor* ลงไปในกระบวนการหมักโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะช่วยให้มีการหมักดีขึ้น โดยเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวกำจัดสารประกอบพวกฟีนอลิกซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของยีสต์ในระหว่างการหมัก (Jonsson *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีการนำ manganese peroxidase และ lignin peroxidase จากเชื้อราที่ย่อยไม้กลุ่ม *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งย่อยลิกนินมาใช้ในเชิงประยุกต์ การย่อยสลายลิกนินก่อให้เกิดประโยชน์หลายประการ คือ ได้หน่วยย่อยของลิกนินซึ่งเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีคุณค่าทางอุตสาหกรรม และจะเปิดโอกาสให้เซลลูโลสถูกย่อยสลายได้มากขึ้น ได้หน่วยย่อยกลูโคสมาใช้ประโยชน์ต่อไปได้ ส่วน manganese peroxidase สามารถเปลี่ยนสารประกอบมหโมเลกุลพวก humus ในถ่านหินให้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง (depolymerize) ทำให้ได้สารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งมีความสำคัญเป็นแหล่งทรัพยากรด้านพลังงานที่มีศักยภาพ (Ralph and Catchside, 1999)

นอกจากนี้ยังนำเปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาว มาประยุกต์ใช้โดยการตรึงเอนไซม์ให้เชื่อมกับเยื่อ (membrane) ไฟโบรอินซึ่งเป็นโปรตีนของเส้นไหม ร่วมกับ polyvinyl alcohol นำมาประกอบเป็นอิเล็กโทรด (electrode) สำหรับการวัดปริมาณ  $H_2O_2$  ในปฏิกิริยา oxidation - reduction โดยอาจประยุกต์ใช้ในด้านคลินิกและใช้ในการตรวจ

หา glucose, lactate, choline, และ cholesterol โดยอาศัย methylene blue เป็นตัวกลางส่งสัญญาณ โดยประสิทธิภาพของตัวรับสัญญาณ (sensor) ใช้เวลาสั้นมากและสามารถตรวจสอบสารที่มีความเข้มข้นต่ำได้ถึง  $5 \mu\text{M}$  (Liu *et al.*, 1997) แต่ Qian และคณะ (1996) ได้ตรึงเปอร์ออกซิเดสกับเยื่อของไฟโบรอินเช่นเดียวกันสามารถวัด  $\text{H}_2\text{O}_2$  ความเข้มข้น  $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$  ได้ในเวลาน้อยกว่า 40 วินาที (Qian *et al.*, 1996)

### 1.9.3 ทางด้านการจัดการสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดสารพิษพวกสารประกอบฟีนอล และสารประกอบอะโรมาติก จากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น โรงงานแปรรูปถ่านหิน, ทำพลาสติกและเรซิน, ปิโตรเลียม, สิ่งทอและทำสีย้อม, ผลิตสารเคมี, ผลิตสบู่และสารทำความสะอาด, เสื้อผ้าสำเร็จรูป, ทำเหล็กกล้า, ผลิตอาหารของที่เหลือทิ้งจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตอาหาร, ทำผ้าเปดาน และโรงงานฟอกสีกระดาษ (Agostini *et al.*, 1997) การกำจัดสารที่เป็นอันตรายพวกฟีนอลิกออกจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม ก่อนที่จะปล่อยน้ำทิ้งเหล่านี้ลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อจะไม่ให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นโดยมนุษย์ที่ใช้สัตว์น้ำเป็นอาหารจะไม่ได้รับอันตราย

เปอร์ออกซิเดสกำจัดสารพิษเหล่านี้ได้ เพราะสามารถโพลีเมอร์ไรซ์สารประกอบฟีนอล โดยเปอร์ออกซิเดสเกิดปฏิกิริยาออกซิไดส์สารประกอบพวกฟีนอล และสารประกอบอะโรมาติกเอมีนต่างๆร่วมกับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  เกิดเป็น phenoxy radical และอนุภาคอิสระของสารประกอบอะโรมาติกเอมีน อนุภาคเหล่านี้แพร่กระจายจากบริเวณเร่งของเอนไซม์เข้าสู่สารละลายและทำให้เกิดการโพลีเมอร์ไรซ์ ได้ผลผลิตเป็นโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายมีลักษณะเป็นตะกอน ทำให้แยกมลพิษออกจากน้ำได้ง่าย โดยการกรอง หรือทิ้งให้ตกตะกอน (Klibanov *et al.*, 1981)

Alberti และ Klibanov (1981) ตกตะกอนสารประกอบฟีนอล ความเข้มข้น 105 ppm pH 7 ที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เติม HRP (commercial horseradish peroxidase) 100 unit และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  2.5 mM นาน 40 ชม. พบว่าสารประกอบฟีนอลเหลือเพียง 3.3 ppm หรือกำจัดฟีนอลได้สูงถึง 96.5 % นอกจากนี้ยังได้ทดลองนำเอาหัวผักกาดหนูขาวสดมาบั่นให้ละเอียดแล้วนำสารสกัดมาทดสอบความสามารถในการกำจัดสารประกอบฟีนอลต่างๆ เปรียบเทียบกับเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตขาย พบว่าประสิทธิภาพในการตกตะกอนไม่แตกต่างกันมาก



Klibanov และ Scoott (1983) ได้นำเปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาวไปกำจัดสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นสารพิษที่ปล่อยลงน้ำจากโรงงานแปรรูปถ่านหิน สามารถตกตะกอนฟีนอลความเข้มข้นเดียวกันได้เพิ่มขึ้นถึง 99 % แต่การเพิ่มความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  ไม่สามารถทำให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนเพิ่มขึ้น จากการศึกษาความเข้มข้นของฟีนอล, HRP และ  $H_2O_2$  รวมทั้ง pH ของสารละลายที่ปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรม พบว่า pH ที่เหมาะสมตกตะกอนได้มากที่สุด คือ pH 9 และความเข้มข้นของ HRP ในระดับต่ำไม่สามารถตกตะกอนสารประกอบได้หมดเนื่องจาก HRP ถูกทำให้เสื่อมสภาพในระหว่างเกิดปฏิกิริยา จากการทดลองสามารถคำนวณได้ว่า 1 โมเลกุลของเอนไซม์ สามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ประมาณ 1,000 โมเลกุล ที่ pH 9

นอกจากนี้ยังพบว่า HRP กับ  $H_2O_2$  ไม่ทำให้สารละลายที่มี polychlorinated biphenyls (PCB's) ซึ่งประกอบด้วย 4,4' -dichlorobiphenyl 100 ppm และ 2,4,5,-trichlorobiphenyl 3 ppm ที่ pH 9 มีตะกอนเกิดขึ้น แต่ HRP และ  $H_2O_2$  สามารถตกตะกอนสารพิษในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปถ่านหินซึ่งประกอบไปด้วย ammonia, chloride, cyanide, thiocyanate และ phenol ปนกับสารพวก PCB' s ได้ 91 % และสามารถตกตะกอนฟีนอลในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปถ่านหินได้ 86 % แสดงว่า สารพิษไม่เกิดปฏิกิริยากับ HRP ได้โดยตรง แต่ตกตะกอนได้หากมีสารอื่นที่เกิดปฏิกิริยากับ HRP รวมอยู่ในปฏิกิริยาด้วย หรือ HRP ทำให้เกิดการรวมกันกับสารตัวอื่นๆตกตะกอนร่วมกันได้

ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล (2537) ได้ทดลองเปรียบเทียบการใช้เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) และ HRP ในการตกตะกอน สารประกอบฟีนอล และสารประกอบอะนีนีลีนและศึกษาการตกตะกอนร่วมของสารประกอบฟีนอล และอะนีนีลีน ร่วมกับยาปราบแมลงและศัตรูพืช พบว่า ทั้ง HBP กับ HRP สามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลและสารประกอบอะนีนีลีนได้และสามารถตกตะกอนฟีนอลได้ดีเท่ากันแต่มีรายละเอียดในการตกตะกอนต่างกันเล็กน้อย

### 1.10 เอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในยางพารา

Sattayasevana (1990) ทำการศึกษาเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในเปลือกยางพาราที่ได้จากการกรีดหรือทำให้เกิดบาดแผลบริเวณต้น พบว่ามีปริมาณเปอร้ออกซิเดสสูงมากและสูงกว่าในน้ำยางพาราหลายร้อยเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยน้ำหนักที่เท่ากัน และเมื่อทำการย้อมความม่วงไวของเปอร้ออกซิเดสที่ได้จากเปลือกยางพารา เทียบกับ C-serum ของน้ำยางด้วย *o*-dianisidine พบว่าเป็นไอโซไซม์คนละชนิดกัน โดยมีตำแหน่งของโปรตีนที่แตกต่างกัน

ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล (2537) ทำการศึกษาเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในเปลือกยางพารา พบว่าปริมาณเปอร้ออกซิเดสของเปลือกยางพารา (HBP) จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณน้ำยางสดและปริมาณเนื้อยางแห้งต่อการกรีดแต่ละครั้ง และพบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์คือ pH 5.4 และสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง 50°C ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา สามารถตกตะกอนสารประกอบฟีนอล และสารประกอบอะนีนีลีน ความสามารถของ HBP ในการตกตะกอนสารประกอบดังกล่าวนี้ยังสามารถชักนำให้ยาปราบแมลงศัตรูพืชบางตัวตกตะกอนร่วมได้ด้วย

Breton และคณะ (1997) พบว่า ปริมาณเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในใบยางพาราจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปฏิกิริยาต่อต้านต่อเชื้อรา *Microcyclus ulei* นอกจากนี้พบว่าใบยางพาราที่ถูกรุกรานด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดและใบร่วงในใบยางพารา เมื่อนำใบยางพารามาวิเคราะห์ด้วย isoelectric focusing พบว่ามีปริมาณของ อะซิติก และ เบสิก เปอร้ออกซิเดสเพิ่มขึ้น โดยที่เปอร้ออกซิเดสจะเพิ่มในใบยางพาราพันธุ์ต้านทานมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ

จากการศึกษาไอโซไซม์เปอร้ออกซิเดสในใบยางพาราและใน C-serum ของน้ำยางพารา โดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าความม่วงไวของเอนไซม์ที่สูงในใบจะสูงกว่าใน C-serum (วัลลี สุวจิตตานนท์ และ คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์, 2535) เป็นที่น่าสนใจว่าเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในใบยางพารามีบทบาทอย่างไรในต้นยางพารา และจะนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ได้หรือไม่ แต่ในขั้นต้นจำเป็นต้องศึกษาธรรมชาติของเปอร้ออกซิเดสในใบยางพาราโดยการแยกให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปศึกษาสมบัติต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดเปอร้ออกซิเดสจากใบยางพารา
2. เพื่อศึกษาการทำให้เปอร้ออกซิเดสบริสุทธิ์จากใบยางพาราโดยวิธีการทางชีวเคมี
3. เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเปอร้ออกซิเดสบริสุทธิ์ที่แยกได้

## 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### วัสดุ

#### สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อมาจากบริษัทต่างๆดังนี้

ชื่อสารเคมี	น้ำหนัก โมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)]	548.7	Sigma
Acetic acid	60.05	Merck
Acrylamide	71.1	Merck
Ammonium persulfate $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	228.7	Merck
Ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132.14	Merck
Blue dextran	$2 \times 10^6$	Merck
Bovine serum albumin (BSA)	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Calcium chloride $(\text{CaCl}_2)$	110.99	Merck
Carbonic anhydrase	30,000	Sigma
Carboxymethyl Cellulose (CM-Cellulose)	-	Sigma
Chymotrypsinogen A	25,000	Sigma
Con A- Sepharose	-	Sigma
Coomassie brilliant Blue R-250	-	Sigma
Cupric sulphate $(\text{CuSO}_4)$	249.68	Sigma
DEAE-Sephacel	-	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	154.2	Sigma

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	292.2	Fluka chemika
Ethanol	46.07	Merck
Folin-Ciocalteu 's phenol reagent	70.07	Sigma
Glycine	75.07	Fluka chemika
Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )	34.02	Fluka chemika
Hydrochloric acid (HCl)	36.46	Riedel-de-Haen
Isopropanol	60.097	Carlo Erba
Magnesium chloride ( $MgCl_2$ )	203.30	BDH
Mannose	180.2	Sigma
2-Mercaptoethanol	78.13	Merck
Methanol	32.04	Carlo Erba
N, N-Methylene bisacrylamide	154.2	Merck
N,N,N,N- Tetramethylenediamine	116.2	Sigma
o-Dianisidine	244.3	Sigma
Ovalbumin	45,000	Sigma
p-Chloromercuri benzoic acid (p-CMB)	357.2	Sigma
Phosphorylase b	94,000	Sigma
Potassium cyanide (KCN )	65.12	Riedel-de-Haen
Potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ )	294	Sigma
Pyrogallol	126.1	Sigma
Potassium sodium tartrate	282.22	Sigma
Riboflavin	376.37	BDH
Sephadex G-75	-	Pharmacia
Sephadex G-150	-	Sigma
Sodium azide ( $NaN_3$ )	65.01	Merck
Sodium acetate anhydrous	82.03	BDH

Soybean trypsin inhibitor	20,100	Sigma
Sodium bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84.01	Merck
Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	105.99	Merck
Sodium chloride (NaCl)	58.44	Univar
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	288.4	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	40	BDH
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	121.1	Sigma

### อุปกรณ์

- 1 UV-VIS Spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น 160A
2. Refrigerated superspeed centrifuge ของ Beckman รุ่น JA-21
- 3 Micropipette ของ Eppendoff
4. Slab gel electrophoresis apparatus ของ Atto และของ Hoefer Scientific Instruments
5. Automatic fraction collector ของ Biorad
6. Peristaltic pump MP-3 ของ Eyla
7. Centrifuge ของ Beckman รุ่น TJ-6
8. pH meter รุ่น PHM b 1 ของ Radiometer Copenhagen
9. Vortex mixer ของ Scientific Industries
10. Power supply ของ Biorad รุ่น 1000/500
11. Freeze dryer และ Deep-freeze refrigerator ของ Sanyo
12. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น P1210 ของ Mettler
13. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น H-10 ของ Mettler

## วิธีการทดลอง

### 2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบยางพาราสด

ใบยางพาราสดพันธุ์ RRIM 600 ไม่แก่หรืออ่อนเกินไปได้มาจาก อ. รัตภูมิ จ. สงขลา ใบยางพาราสดที่นำมาทดลองจะเก็บในตอนเช้าของวันที่ทำการทดลองจากต้นยางที่โตพร้อมที่จะกรีดแต่ยังไม่ได้กรีดเอาน้ำยาง นำใบยางพาราสดมาล้างด้วยน้ำจนสะอาด ตัดส่วนที่เป็นก้านใบทิ้ง ซึ่งน้ำหนักประมาณ 100 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เติมน้ำบัฟเฟอร์ (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5) แช่เย็น ปริมาตร 500 มล. แล้วปั่นในโถปั่น (blender) เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้กรองผ่านผ้ากอซ 4 ชั้น จากนั้นเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) สารละลายด้วยความเร็ว  $12,000 \times g$  นาน 20 นาที ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ส่วนที่เป็นกากทิ้งไป วัดปริมาตรส่วนใส ( $S_1$ ) แล้วนำสารสกัดหยาบใบยางพาราไปหาโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์ เพื่อศึกษาว่าใบยางพารามีปริมาณเปอร็อกซิเดสเล็กน้อยเพียงใด จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้นี้ไปแยกเปอร็อกซิเดสให้บริสุทธิ์ขึ้น

นอกจากนี้ยังมีการสกัดหัวผักกาดหนูขาว (horseradish) และหัวไชเท้า เพื่อเปรียบเทียบว่ามีเปอร็อกซิเดส มากน้อยกว่าใบยางพาราอย่างไร เมื่อคำนวณจากน้ำหนักเริ่มต้น 1 กรัม เท่ากัน โดยมีวิธีการสกัดและหาความว่องไวของเอนไซม์วิธีเดียวกัน

### 2.2 การศึกษาผลของการไลโอไฟล์ซ์ต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในสารสกัด

การที่จะทำเปอร็อกซิเดสให้บริสุทธิ์และหาแนวทางไปประยุกต์ใช้จำเป็นต้องศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อเปอร็อกซิเดสที่สกัดได้ในขั้นตอนที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เช่น การนำสารสกัดไประเหิดให้แห้งเพื่อทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นก่อนที่จะทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ทำโดยนำสารสกัดเปอร็อกซิเดส ( $S_1$ ) ที่เตรียมได้จากสารสกัดหยาบในข้อ 2.1 ปริมาตร 100 มล. ที่ทราบความว่องไวของเปอร็อกซิเดส นำไปทำการไลโอไฟล์ซ์ (lyophilization) จนแห้ง จากนั้นนำไปละลายใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดแล้วหาปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเปอร็อกซิเดส เปรียบเทียบกับความว่องไวของเปอร็อกซิเดสในสารสกัดก่อนการไลโอไฟล์ซ์

### 2.3 การวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

การหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสโดยใช้ *o*-dianisidine ตามวิธีของ Shannon และคณะ (1966) ทำโดยนำสารสกัดจากใบยางพาราในขั้นตอนต่างๆ ที่ต้องการหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส มาปริมาตร 0.01 มล. (เจือจางให้เหมาะสมก่อนนำมาทดสอบ) ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติม 0.05 M sodium acetate, pH 5.4 ปริมาตร 2.79 มล. และ 0.25% *o*-dianisidine ปริมาตร 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นเติม 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันอีกครั้งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ด้วย UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu รุ่น 160A) บันทึกค่าทุกๆ 15 วินาที จนครบ 3 นาที ที่อุณหภูมิ 30°C นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสโดยให้ 1 หน่วย ของความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส หมายถึง เปอร์ออกซิเดสที่ออกซิไดส์ 1  $\mu$ mole ของ *o*-dianisidine ในเวลา 1 นาที ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ 11.3 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Saeki *et al.*, 1986)

### 2.4 การหาปริมาณโปรตีน

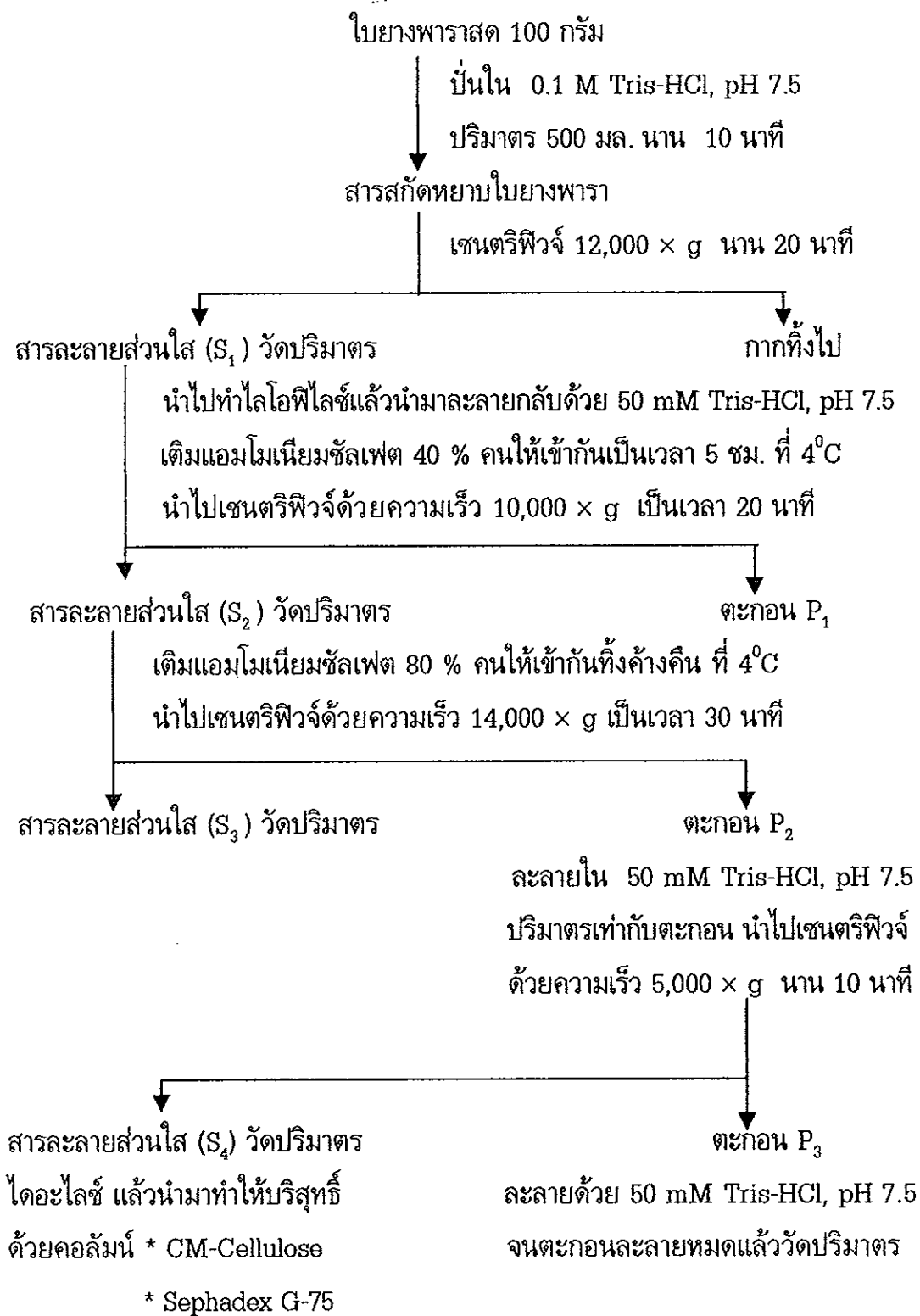
หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry และ คณะ (1951) โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ใน 0.1 M NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5 % CuSO<sub>4</sub> อัตราส่วน 100 : 1 : 1 ) ปริมาตร 3 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จึงเติมสารละลายฟอลิน-ฟีนอล (Folin - phenol reagent, ใช้ Folin : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 1 ) ปริมาตร 0.3 มล. ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างโดยนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ



## 2.5 การทำให้เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดใบยางบริสุทธิ์ขึ้น

### วิธีที่ 1

นำสารสกัดส่วนใส  $S_1$  ไปทำให้ปริมาตรลดลงโดยการไลโอไฟไลซ์ ตามวิธีในข้อ 2.2 โดยใช้ไลโอไฟไลเซอร์ ที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ แล้วนำสารสกัดที่ได้หลังจากการไลโอไฟไลซ์ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 40% ของความอิ่มตัว คนที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 ชม. เซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว  $10,000 \times g$  เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอน  $P_1$  และวัดปริมาตรส่วนใส  $S_2$  ที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ แบ่งมาหาโปรตีนและความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส แล้วนำไปตกตะกอนโปรตีนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 80 % ของความอิ่มตัว คนให้เข้ากันทั้งค้างคืนที่  $4^{\circ}\text{C}$  เก็บตะกอน ( $P_2$ ) ที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว  $14,000 \times g$  เป็นเวลา 30 นาที ไปละลายด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 1 เท่าของตะกอน หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งด้วยความเร็ว  $5,000 \times g$  นาน 10 นาที แยกตะกอน ( $P_3$ ) ที่อาจเกิดขึ้นได้จากสารละลายส่วนใส  $S_4$  นำทั้งสองส่วนไปหาปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์ เพื่อที่จะทราบว่าส่วนใดมีความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสอยู่มากกว่า ก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ CM-Cellulose และ Sephadex G-75 ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ไดอะแกรมการทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีน  
ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีการที่ 1

## 2.6 การทำให้เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดโอยางพาราบริสุทธ์โดยคอลล์มน์ CM-cellulose

จากการหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตทำให้ทราบว่าเปอร์ออกซิเดสส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของ  $S_4$  จึงนำสารละลายส่วนใส  $S_4$  มาโดยะไลซ์ แล้วใช้ CM-Cellulose ทำให้เข้มข้นขึ้น ก่อนที่จะนำ  $S_4$  มาแยกเปอร์ออกซิเดสออกจากโปรตีนอื่นๆ โดยผ่านลงบน คอลล์มน์ CM-Cellulose เตรียมโดยใช้ CM-Cellulose 10 กรัม ทำให้อิ่มตัวด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน 0.1 M HCl เป็นเวลา 4 ชม. แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นจนมี pH เป็น 7 จากนั้นแช่ CM-Cellulose ใน 0.5 M NaOH เป็นเวลา 4 ชม. แล้วล้างด่างออกด้วยน้ำกลั่นจนมี pH เป็น 7 หลังจากนั้นนำ CM-Cellulose มาแช่ใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 บรรจุ CM-Cellulose ในคอลล์มน์ขนาด  $2 \times 25$  ซม. มีปริมาตรเรซิน 78 มล. ปรับให้คอลล์มน์สมดุล (equilibrate) โดยการชะคอลล์มน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่า ของปริมาตรเรซินในอัตราการไหลคงที่ ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  จากนั้นใส่สารสกัด  $S_4$  ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 80 % ซึ่งมีโปรตีนประมาณ 16.4 มก./มล. ปริมาตร 15 มล. ที่เตรียมได้จากข้อ 2.5 ตามวิธีที่ 1 ผ่านลงในคอลล์มน์ ทิ้งไว้สัก 20 นาทีแล้วชะคอลล์มน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมา หลอดละ 4 มล.

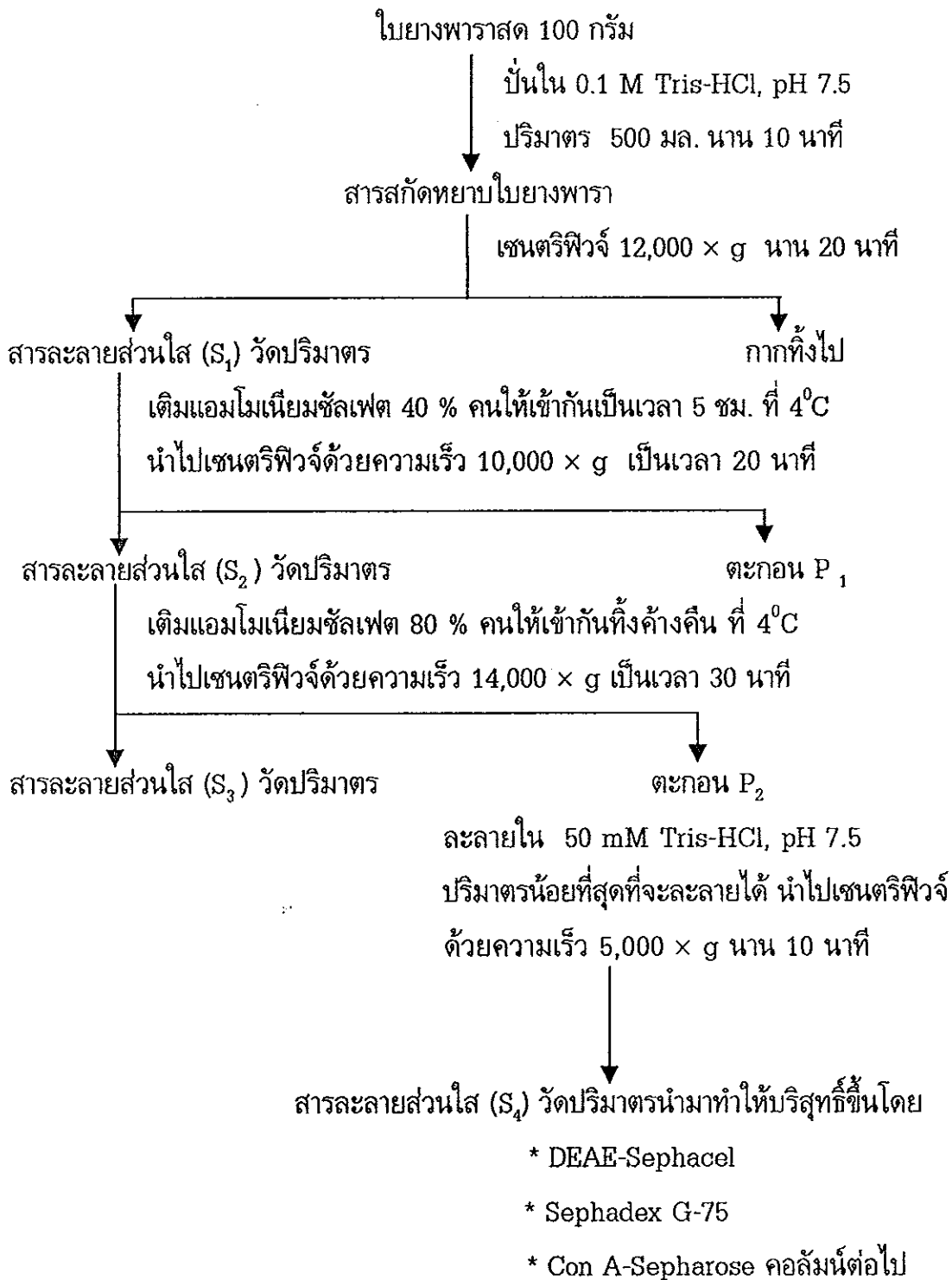
ติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ถูกชะออกมาที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นชะคอลล์มน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 0.3 M อยู่ด้วย ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิมและเก็บสารที่ถูกชะออกมาในหลอดหลอดละ 4 มล. เท่าเดิม ติดตามการแยกโปรตีนโดยนำสารละลายแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ นำสารละลายที่เก็บได้ไปหาความว่องไวของเอนไซม์ทุกๆ 2 หลอด รวมสารละลายที่มีความว่องไวสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นโดยใช้ Centriflo membrane cone CF-25 ที่สามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 25,000 ดาลตัน ออกได้โดยเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว  $5,000 \times g$  จนเหลือปริมาณที่เหมาะสม จึงนำไปหาปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์เพื่อนำไปทำให้เปอร์ออกซิเดสบริสุทธ์มากขึ้นโดยใช้คอลล์มน์ Sephadex G-75

## 2.7 การทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75

นำสารละลายส่วนที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงที่รวมได้จากคอลัมน์ CM-Cellulose (หรือ DEAE-Sephacel ในกรณีของวิธีที่ 2) มาทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ที่มี Sephadex G-75 บรรจุอยู่ ซึ่งเตรียมได้โดยนำ Sephadex G-75 มา 10 กรัม แช่ให้พองตัวในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 ชม. แล้วแช่ใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 อีก 5 ชม. ก่อนที่จะบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด  $1.2 \times 70$  ซม. มีปริมาตรเจล 80 มล. แล้วปรับให้คอลัมน์สมดุลโดยการชะด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล แล้วนำสารละลายส่วนที่มีความว่องไวสูงของแต่ละคอลัมน์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วโดยใช้ Centriflo membrane cone CF-25 ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-75 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันโดยการชะด้วยอัตราการใช้ 15 มล./ชม. เก็บสารละลายในหลอดทดลองหลอดละ 2 มล. ติดตามค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายแต่ละหลอดจนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ นำสารละลายที่เก็บได้ไปหาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทุกๆ 2 หลอด รวมสารละลายที่มีความว่องไวสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Centriflo membrane cone CF-25 โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว  $5,000 \times g$  ที่  $4^{\circ}\text{C}$  จนมีปริมาตรเหมาะสมแล้วแบ่งไปหาปริมาณโปรตีน และความว่องไวของเอนไซม์

### วิธีที่ 2

เมื่อวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ที่แยกได้จากการตกตะกอนโดยวิธีที่ 1 พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ในส่วน  $S_4$  มีเพียง 33.2 % ของความว่องไวเริ่มต้น และเมื่อนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดย CM-Cellulose และ Sephadex G-75 พบว่าเหลือเอนไซม์ 20 และ 14 % ของความว่องไวเริ่มต้น เอนไซม์ส่วนหนึ่งหายไปจากช่วง  $S_4$  เป็น  $P_3$  ดังในไดอะแกรมที่ 1 จึงได้ปรับปรุงวิธีการโดยการละลายตะกอน  $P_2$  ด้วยบัฟเฟอร์ปริมาณน้อยที่สุดจนตะกอนละลายหมด แล้วนำสารละลายที่ได้ไปนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งด้วยความเร็ว  $5,000 \times g$  นาน 10 นาที ไม่มีตะกอนเกิดขึ้น นำเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดย DEAE-Sephacel, Sephadex G-75 และ Con A-Sepharose ดังในรูปที่ 2



รูปที่ 2 โดอะแกรมการทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีน  
 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีการที่ 2

## 2.8 การทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้คอลัมน์ DEAE-Sephacel

จากการหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ทราบว่าเปอร์ออกซิเดสส่วนใหญ่อยู่ในส่วน  $S_4$  ในการทดลองวิธีที่ 2 ได้แยกเปอร์ออกซิเดสออกจากโปรตีนอื่นใน  $S_4$  ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ที่มี DEAE-Sephacel ซึ่งเตรียมได้โดยนำ DEAE-Sephacel มาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วล้างต่อด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 บรรจุลงในคอลัมน์ขนาด  $3.0 \times 13$  ซม. มีปริมาตรของเรซินในคอลัมน์เป็น 90 มล. แล้วชะคอลัมน์อีกครั้งด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 5 เท่าของเรซิน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากใบยางพาราในส่วน  $S_4$  ที่เตรียมได้จากวิธีการที่ 2 ในรูปที่ 2 ปริมาตร 16 มล. มีโปรตีน 24 มก./มล. ผ่านลงในคอลัมน์ปล่อยให้สารสกัดใบยางพาราจับกับเนื้อ DEAE-Sephacel ล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 15 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 4 มล. และติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนไม่มีโปรตีนถูกชะออกมา หรือมี A 280 มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย 0.3 M NaCl ใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิมและเก็บปริมาตรสารที่ถูกชะออกมาในหลอดทดลองหลอดละ 4 มล. จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีกแล้ว

นำสารละลายที่เก็บได้ไปหาความว่องไวของเอนไซม์ทุกๆ 2 หลอด รวมสารละลายหลอดที่มีความว่องไวสูงเข้าด้วยกัน ทำสารละลายรวมให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Centriflo membrane cone CF-25 แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว  $5,000 \times g$  จนเหลือปริมาณที่เหมาะสมจึงนำไปหาปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์ รวมส่วนที่มีความว่องไวสูงไว้เพื่อนำไปทำให้เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75 ต่อไป ตามวิธีการในข้อ 2.7 ก่อนที่จะนำเปอร์ออกซิเดสไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ Con A-Sepharose ได้นำเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้ในขั้นตอน Sephadex G-75 ตามวิธีการที่ 2 มาศึกษาแถบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 ถึง 600 นาโนเมตร เพื่อวัดค่า RZ (Reinheitzahl) คือ อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403/275 เป็นค่าที่ใช้บอกถึงการมีหมู่ฮีม (heme group) อยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Araiso and Dunford, 1981)

## 2.9 การทำแอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยคอลัมน์ Con A-Sepharose

นำสารละลายส่วนที่มีความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสสูงที่รวมได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 มาทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ Con A-Sepharose ขนาด  $1.2 \times 5$  ซม. มี Con A-Sepharose บรรจุอยู่ 5.5 มล. แล้วปรับให้คอลัมน์สมดุลโดยการชะคอลัมน์ด้วย  $0.1$  M potassium phosphate, pH 7.5 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล จากนั้นนำเปอร์ออกซิเดสจากคอลัมน์ Sephadex G-75 ที่ได้จากข้อ 2.7 ซึ่งมีปริมาณโปรตีน  $8.4$  มก./มล. ปริมาตร  $1$  มล. ผ่านลงในคอลัมน์ Con A-Sepharose ชะคอลัมน์ด้วย  $0.1$  M potassium phosphate ด้วยอัตราการไหล  $9$  มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ  $1.5$  มล. ติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $280$  นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมา โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่  $280$  นาโนเมตร มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย  $0.3$  M mannose ใน  $0.1$  M potassium phosphate, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิมและเก็บสารที่ถูกชะออกมาในหลอดทดลองหลอดละ  $1.5$  มล. เท่าเดิม ติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $280$  นาโนเมตร จนกระทั่งมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ นำสารละลายที่เก็บได้ไปหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสทุกหลอด รวมสารละลายในหลอดที่มีความว่องไวสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นขึ้นโดย Centriflo membrane cone CF-25 โดยนำไปเซนตริฟิวซ์ที่ความเร็ว  $5,000 \times g$  จนเหลือปริมาตรที่เหมาะสม นำไปหาปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส พร้อมทั้งนำเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงขั้นที่ผ่านคอลัมน์ Con A-Sepharose มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ต่อไป

## 2.10 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในขั้นตอนต่างๆ

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเปอร์ออกซิเดสทำได้โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) ที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแบบแผ่น (slab gel) ขนาด  $10 \times 12$  ซม.หนา  $1$  มม. เจลแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ เจลส่วนล่างที่ทำหน้าที่แยกสาร (separating gel) มีความสูง  $7$  ซม. และเจลส่วนบน ทำหน้าที่รวมสารตัวอย่างไม่ให้กระจาย (stacking gel) มีความสูงประมาณ  $3$  ซม.ในการศึกษาความบริสุทธิ์ ของเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้ในขั้นตอนต่างๆ อาจใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (ND-PAGE) หรือการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS อยู่ด้วย

### 2.10.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพในเจล ความเข้มข้นต่างกัน (Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, ND-PAGE Gradient)

การศึกษาเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส ทำได้โดยนำตัวอย่างเปอร้ออกซิเดสในชั้นตอนต่างๆ คือ 1) เปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จาก DEAE-Sephacel 2) เปอร้ออกซิเดสที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 นำเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้แต่ละส่วน (fraction) ที่มีความไวสูงจากคอลัมน์ดังกล่าวในข้างต้น ไปทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในสภาพธรรมชาติโดยดัดแปลงวิธีของ Davis (1964) ซึ่งใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 3 % ใน 0.063 M Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน และโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 4-8 % ใน 0.75 M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง ซึ่งมีองค์ประกอบดังตารางที่ 10 (ภาคผนวก) สำหรับการเตรียมตัวอย่างสารละลายเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จากชั้นตอนต่างๆและโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลทำโดยผสมสารละลายตัวอย่าง 3 ส่วน กับ บัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) สำหรับ ND-PAGE 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมเฟีนอลบลู (bromophenol blue) หลังจากนั้นใส่สารละลายโปรตีนตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 50-80 ไมโครกรัม/เจล 1 ช่อง สำหรับบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส คือ 0.025 M Tris -0.2 M glycine, pH 8.3 กระแสไฟฟ้าที่ใช้แยกขนาด 18 mA /เจล 1 แผ่น ปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านเพื่อแยกโปรตีนเป็นเวลา 2 ชม. รอจนสีโบรโมเฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟฟ้าย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจลด้วยสีค้อมาซีบิลเลียนบลู (Coomassie brilliant blue R-250) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ 0.02 % สีค้อมาซีบิล -50% เมทานอล (methanol) -7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 12 ชม. แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลายผสมของ เมทานอล : กรดน้ำส้ม : น้ำในอัตราส่วน 5 : 7 : 88 จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

จากการทำให้เปอร้ออกซิเดสบริสุทธิ์ขึ้นตามวิธีการที่ 1 นอกจากจะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแล้วยังมีการนำตัวอย่างในชั้นตอนหลังจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 มาทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ ND-PAGE โดยใช้ 3 % ในเจลส่วนบนและใช้ 7-15 % ในเจล



ส่วนล่างดังมีรายละเอียดการเตรียมในตารางที่ 11 (ภาคผนวก) การหาแถบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสในโพลีอะครีลาไมด์เพื่อสกัดเจลทำได้โดยตัดแบ่งเจลเป็นแถบกว้างประมาณ 1 ซม. ตามแนวยาวตลอดแผ่นเจล ดังรูปที่ 3 จากนั้นนำมาย้อมหาความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส แล้วทำการสกัดเอนไซม์ออกจากเจล

### 2.10.2 การทำโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS แปลงสภาพใน เจลความเข้มข้นต่างกัน ( Sodium docecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS- PAGE gradient)

การศึกษาเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้ในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS ทำได้โดยนำตัวอย่างเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในขั้นตอนต่างๆ 1) ขั้นตอนการเตรียมสารสกัด (S<sub>1</sub>) 2) โปรตีนที่เหลือจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40 % 3) โปรตีนที่ตกตะกอนได้ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80 % 4) เปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จาก DEAE-Sephacel 5) เปอร้ออกซิเดสที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephadex G-75 6) เปอร้ออกซิเดสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ Con A-Sepharose นอกจากนี้ยังนำเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้แต่ละส่วนจากคอลัมน์ต่างๆดังกล่าวในข้างต้น ทำโพลีอะครีลาไมด์เจลแบบมี SDS โดยดัดแปลงตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยให้โพลีอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้น 3 % ใน 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน และโพลีอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้น 7-15 % ใน 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง ดังมีรายละเอียดการเตรียมในตารางที่ 11 (ภาคผนวก) สำหรับการเตรียมสารละลายเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จากขั้นตอนต่างๆ โดยการผสมสารละลายตัวอย่าง 3 ส่วน กับ บัฟเฟอร์ตัวอย่าง สำหรับ SDS-PAGE 1 ส่วน บัฟเฟอร์นี้ประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล, 4% SDS, 4% β-mercaptoethanol และ 0.4% ลีโบรโมฟินอลบลู หลังจากนั้นใส่สารละลายโปรตีนตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 50-80 ไมโครกรัม/เจล 1 ช่อง ทำอิเล็กโทรฟอรีซิส ใน 0.025 M Tris - 0.2 M glycine - 1% SDS pH 8.3 ใช้กระแสไฟฟ้า 18 mA /เจล 1 แผ่น เป็นเวลา 2 ชม. รอจนลีโบรโมฟินอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟฟ้า และนำเจลไปย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู 0.02 % ใน 50% เมทานอล

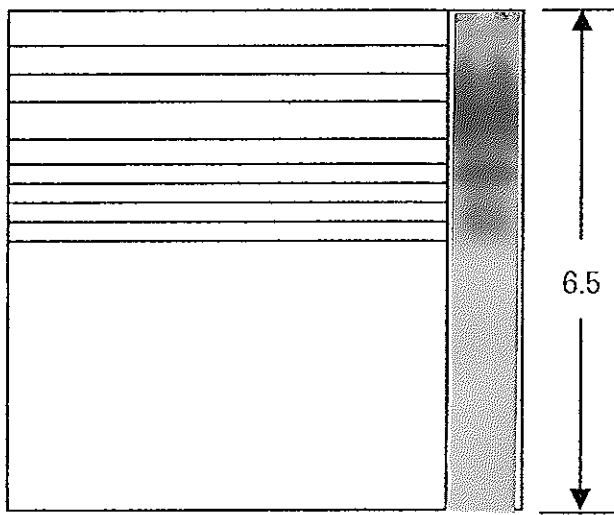
-7.5% กรดน้ำส้ม นาน 12 ชม. แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลายผสมของ เมทานอล : กรดน้ำส้ม : น้ำ ในอัตราส่วน 5 : 7 : 88 จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

### 2.10.3 การย้อมความม่วงไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในแผ่นเจลภายหลังการ แยกโปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส

ในกรณีที่เป็นการแยกโดย SDS-PAGE จะต้องนำแผ่นเจลไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M sodium acetate, pH 5.4 เพื่อขจัด SDS ออกแล้วจึงนำไปย้อมความม่วงไวของ เปอร็อกซิเดส ทำได้โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.05 M sodium acetate, pH 5.4 ปริมาตร 80 มล., 0.25 % *o*-dianisidine ปริมาตร 3 มล. และ 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตร 3 มล. โดยแช่แผ่นเจลไว้ในสารละลายนี้เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำแผ่น เจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แถบโปรตีนที่มีเปอร็อกซิเดสอยู่จะมีสีน้ำตาลแดง-ส้ม

### 2.10.4 การหาแถบความม่วงไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสเพื่อสกัดเจล

ทำได้โดยนำแผ่นเจลที่ได้จาก ND-PAGE มาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.05 M sodium acetate, pH 5.4 ปริมาตร 10 มล., 0.25 % *o*-dianisidine ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยแช่แผ่นเจลไว้ในสาร ละลายนี้เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด จากนั้นนำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แถบ โปรตีนที่มีเปอร็อกซิเดสอยู่จะมีสีน้ำตาลแดง-ส้ม เมื่อเห็นแถบความม่วงไวของเปอร็อกซิ เดสบนแผ่นเจลนำไปเทียบตำแหน่งกับแผ่นเจลส่วนที่เหลือ ตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมความม่วงไว ของเอนไซม์ตามขวางออกเป็นชิ้นๆ ให้ตรงกับแถบความม่วงไวของเอนไซม์ ดังรูปที่ 3 นำเจล แต่ละชิ้นไปบดให้ละเอียดในหลอดทดลองที่มี 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ ความเร็ว 5,000 × g นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดเจลแต่ละชิ้นไปหา ความม่วงไวและโปรตีนตามวิธีการในหัวข้อ 2.3 และ 2.4 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำสาร ละลายที่ได้จากการสกัดเจลมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี ND-PAGE และ SDS-PAGE อยู่ ด้วย เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์



รูปที่ 3 การแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ND-PAGE โดยใช้ 3 % ในเจลส่วนบน และ เกรเดียน 7-15 % ในเจลส่วนล่าง การตัดเจลเพื่อย้อมความว่องไวและสกัดเอนไซม์จากเจล

### 2.10.5 การย้อมไกลโคโปรตีน

ทำได้โดยนำเปอร้ออกซิเดสที่บริสุทธิ์แล้วจากชั้นตอนของคอลัมน์ Con A-Sepharose มาย้อมไกลโคโปรตีนโดยวิธี พีเอเอส ตามวิธีของ Zacharius และ Zell (1969) นั้น ต้องแช่เจลในกรดไตรคลอโรอะซิติก 12.5 % 30 นาที เพื่อตรึงโปรตีนให้อยู่กับที่และป้องกันการแพร่กระจายของโปรตีน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 15 วินาที นำไปแช่ในสารละลายกรดเปอร์ไอโอดิก (periodic acid) 1 % ในกรดน้ำส้ม 3.0 % 50 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนไอโอดेट ( $\text{IO}_3^-$ ) ที่มากเกินไปหมดไปทดสอบไอโอดेटโดยใช้สารละลายเงินไนเตรต ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.1 M ถ้ามีไอโอดेटหลงเหลืออยู่จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลของเงินไอโอดेट แล้วจึงนำเจลไปย้อมในสารละลายฟุกซิน-ซัลไฟต์ (fuchsin-sulfite stain หรือ Schiff ' s reagent ) ในที่มีด นาน 50 นาที ล้างสีที่ไม่ได้จับกับไกลโคโปรตีนออกด้วยสารละลายเมตาไบซัลไฟต์ (metabisulfite) 0.5 % 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ล้างต่อด้วยน้ำกลั่นจนสีที่ไม่ใช่แถบของไกลโคโปรตีนหมดไป เก็บเจลไว้ในสารละลายกรดน้ำส้ม 7.5 % นอกจากนี้ยังย้อมไกลโคโปรตีนด้วยวิธี อัลเซียน บลู ต้องแช่เจลในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 12.5 % 30 นาที เพื่อตรึงโปรตีนเช่นเดียวกับการย้อมด้วยวิธี พีเอเอส ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 15 วินาที แล้วแช่ในสารละลายกรดเปอร์ไอโอดิก 1 % ในกรดน้ำส้ม 3 % 50 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจนไม่มีสีไอโอดेटเหลืออยู่เช่นเดียวกับการย้อมด้วยวิธี พีเอเอส แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย จึงย้อมเจลที่ได้ด้วยสารละลายอัลเซียน บลู 0.5 % ในกรดน้ำส้ม 3 % อย่างน้อย 4 ชม. ล้างสีอัลเซียน บลู ที่ไม่ได้จับกับไกลโคโปรตีนออกด้วยกรดน้ำส้ม 7 % เก็บเจลไว้ในกรดน้ำส้ม 7 % (Wardi and Michos, 1972)

## 2.11 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส

### 2.11.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร้ออกซิเดส

น้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร้ออกซิเดสทำได้จากการทำ SDS-PAGE ซึ่งใช้ slab gel โดยการเตรียมโพลีอะคริลามิเดเจลที่มีความเข้มข้น 7-15 % เป็นเจลชั้นล่าง และ 3 % สำหรับเจลชั้นบน ตามวิธีในข้อ 2.10.2 ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่แยกได้และโปรตีนมาตรฐานในแผ่นเจลโดยแบ่งเจลเป็นสองส่วนเจลส่วนหนึ่งย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู เพื่อติดตามแถบโปรตีนบนแผ่นเจล เจลอีกส่วนย้อมความม่วงไวของเปอร้ออกซิเดส เทียบดูแถบโปรตีนกับแถบความม่วงไวของเปอร้ออกซิเดส วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน

หรือแถบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสในสารตัวอย่าง แถบโปรตีนมาตรฐานและแถบสีโบรโมเฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, Rf) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมเฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง  $\log$  น้ำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ที่ใช้ได้แก่ ฟอสฟอรีเลสบี (phosphorylase b,  $M_r$  94,000 ดาลตัน), โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (BSA,  $M_r$  67,000 ดาลตัน), โอวัลบูมิน (ovalbumin,  $M_r$  43,000 ดาลตัน), คาร์โบนิคแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase,  $M_r$  30,000 ดาลตัน), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor,  $M_r$  20,000 ดาลตัน), แอลฟาแลคตัลบูมิน ( $\alpha$ -lactalbumin,  $M_r$  14,000 ดาลตัน) นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแต่ละแถบและแถบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส เทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของสารละลายเปอร้ออกซิเดสได้ นอกจากนี้จะหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร้ออกซิเดสแบบ SDS-PAGE แล้วอาจหาน้ำหนักโมเลกุลของเปอร้ออกซิเดสโดย ND-PAGE ซึ่งจะใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมได้อีกด้วย

### 2.11.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสโดยการใช้วิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส

แบบไม่แปลงสภาพ (Native polyacrylamidegel electrophoresis,

ND-PAGE)

การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดส โดยการทำให้ ND-PAGE โดยการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 4 - 8 % เป็นเจลชั้นล่าง และ 3 % สำหรับเจลชั้นบน เช่นเดียวกับข้อ 2.10.1 ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่แยกได้และโปรตีนมาตรฐานในแผ่นเจลโดยแบ่งเจลเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบิลเลี่ยนบลู เจลอีกส่วนย้อมความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสเทียบดูแถบโปรตีนกับแถบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนหรือแถบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสในสารตัวอย่าง

แถบโปรตีนมาตรฐาน และแถบสีโบรโมเฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมเฟีนอลบลู}}$$

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง  $\log$  น้ำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด ที่ใช้ได้แก่ ไทรโกลบูลิน (thyroglobulin,  $M_r$  669,000 ดาลตัน), เฟอร์ริติน (ferritin,  $M_r$  440,000 ดาลตัน), แคตาเลส (catalase,  $M_r$  232,000 ดาลตัน), แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase,  $M_r$  140,000 ดาลตัน) และ อัลบูมิน (albumin,  $M_r$  67,000 ดาลตัน) นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแต่ละแถบและแถบความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส เทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส นอกจากการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมด้วย ND-PAGE แล้วยังสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลรวมโดยวิธี เจลฟิลเตรชัน

### 2.11.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

#### โครมาโทกราฟี

ในการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร์ออกซิเดสโดยเจลฟิลเตรชันใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephadex G-150 นำเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการแยกโปรตีนอื่นออกไปจนบริสุทธิ์ในขั้นตอนคอลัมน์ Con A-Sepharose ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-150 ขนาด  $1.3 \times 62$  ซม. แล้วชะคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ในอัตราเร็ว 8 มล./ชม. เก็บสารละลายที่ชะออกมาเป็นส่วนๆ ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มล. โดยอาศัยเครื่องเก็บสารแยกส่วนอัตโนมัติ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสในหลอดที่มีโปรตีน โดยวิธีในข้อ 2.3 แล้ววัดปริมาตรชะหรือปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะเอนไซม์ตัวนี้ออกมา (elution volume,  $V_e$ ) เปรียบเทียบกับปริมาตรชะที่ใช้ในการชะโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่มีขนาดต่างๆกัน 4 ตัว คือ แคตาเลส (catalase  $M_r$  232,000 ดาลตัน) อัลโดเลส (aldolase,  $M_r$  158,000 ดาลตัน) โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (BSA,  $M_r$  67,000 ดาลตัน) และ ไคโมทริปซินโนเจน เอ (chymotrypsinogen A,  $M_r$  25,000 ดาลตัน)

บรรจุลงในคอลัมน์อันเดียวกันที่ละตัวโดยโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัวมีความเข้มข้น 5 มก./มล. แล้วชะด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการชะเช่นเดียวกับการชะเปอร์ออกซิเดส ออกจากคอลัมน์ ปริมาตรชะของโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ ทำได้โดยติดตามการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ส่วนกรณีของ บลูเด็กซ์แทรน (blue dextran,  $M_r$  2,000,000 ดาลตัน) ที่ใช้ในการหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจลหรือปริมาตรรอยด์ (void volume,  $V_o$ ) ของคอลัมน์ ทำโดยการนำบลูเด็กซ์แทรน ผ่านคอลัมน์และ ชะคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 บัฟเฟอร์ ด้วยอัตราเร็วเดียวกัน วัดค่าการดูดกลืนของบลูเด็กซ์แทรน ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ส่วนปริมาตรทั้งหมด (total volume,  $V_t$ ) ของคอลัมน์ได้จาก ปริมาตรชะของ  $K_2Cr_2O_7$  ซึ่งได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร หรือจากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงของคอลัมน์ จากนั้นคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (distribution coefficient,  $K_{av}$ ) ของโปรตีนแต่ละชนิดได้จากสมการ

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$$

แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า  $\log$  น้ำหนักโมเลกุลกับค่า  $K_{av}$  ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเปอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้วได้ ในการทดลองนี้ใช้คอลัมน์เดียวกันตลอด แต่นำสารผ่านคอลัมน์ทีละชนิดและปรับอัตราการไหลให้คงที่เพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของ Sephadex ในคอลัมน์

## 2.12 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (partially purified enzyme, PPE) ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกโดยคอลัมน์ Sephadex G-75

### 2.12.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ทดสอบความทนของเปอร์ออกซิเดสต่ออุณหภูมิ โดยนำเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนของ Sephadex G-75 (PPE) มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. เจือจางมีความว่องไว 2,960 หน่วย/มล. แล้วอุ่นเปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่งอยู่ในสารละลาย 50 mM sodium-acetate, pH 5.4 ปริมาตร 2.79 มล. ในอ่างน้ำอุ่นควบคุมความร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80°C เป็นระยะเวลาต่างๆกัน

ตามลำดับ แล้วนำมาทดสอบความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสโดยเติม 0.25% *o*-dianisidine และ 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร ทุกๆ 30 นาที ในช่วงแรก และทุก 6 ชม. ในช่วงหลัง เป็นเวลา 24 ชม. โดยนำเอนไซม์มาทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในกรณีที่อุณหภูมิสูงก่อนที่จะนำมาทดสอบความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30°C เปรียบเทียบความคงทนที่อุณหภูมิต่างๆ กับเปอร์ออกซิเดสที่ไม่ได้อุ่นในอ่างควบคุมความร้อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30°C)

### 2.12.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

นำเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. เจือจางให้มีความว่องไว 2,960 หน่วย/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทดสอบความว่องไวของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 2.3 ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70°C โดยผสมสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร กับ 50 mM sodium-acetate, pH 5.4 ปริมาตร 2.79 มล. และ 0.25% *o*-dianisidine ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการปรับตัวควบคุมอุณหภูมิของเครื่อง spectrophotometry ให้ได้อุณหภูมิตามที่กำหนดไว้ ใส่ cuvette ที่มีสารผสมทั้งสามอยู่ในช่องที่จะวัดเพื่อปรับให้อุณหภูมิสมดุลกันใช้เวลาประมาณ 1 นาทีของแต่ละอุณหภูมิ จากนั้นนำมาเติม 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร ทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 3 นาที เปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ที่ศึกษา ณ อุณหภูมิต่างๆ

### 2.12.3 การหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ

30 และ 60°C

นำเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. เจือจางให้มีความว่องไวอยู่ในช่วง 2,900 หน่วย/มล. ที่ pH 5.4 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาทดสอบความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสใน 50 mM sodium acetate, pH 3.5 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 6.9, 7.6 ปริมาตร 2.79 มล. จากนั้นนำมาเติม 0.25% *o*-dianisidine และ 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทดสอบความว่องไวตามวิธีในข้อ 2.3 ติดตามการเกิดปฏิกิริยา ทุกๆ 15 วินาทีเป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 30 และ 60°C เปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ในแต่ละค่า pH ของทั้งสองอุณหภูมิ



#### 2.12.4 การศึกษาจลนศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดส

นำเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) มีความเข้มข้นของโปรตีน 8.4 มก./มล. เจือจางมีความว่องไว 2,900 หน่วย/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในการทดสอบหาค่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine โดยใช้ *o*-dianisidine ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆกันดังนี้  $2.08 \times 10^{-5}$ ,  $4.16 \times 10^{-5}$ ,  $8.33 \times 10^{-4}$ ,  $1.66 \times 10^{-4}$  และ  $3.33 \times 10^{-4}$  M ใช้  $H_2O_2$  ที่ระดับความเข้มข้น  $8.33 \times 10^{-4}$  ส่วนการทดสอบหาค่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  ใช้  $H_2O_2$  ความเข้มข้นต่างๆกันดังนี้  $2.08 \times 10^{-4}$ ,  $4.16 \times 10^{-3}$ ,  $8.33 \times 10^{-3}$ ,  $1.66 \times 10^{-3}$  และ  $3.33 \times 10^{-3}$  M ใช้ *o*-dianisidine ที่ระดับความเข้มข้น  $8.33 \times 10^{-3}$  จากนั้นทดสอบความว่องไวตามวิธีการข้อ 2.3 ค่า  $K_m$  และ ค่า  $V_{max}$  หาได้จากการเขียนกราฟระหว่าง  $1/\text{ความว่องไวหรือความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดส } [1/V]$  กับ  $1/\text{ความเข้มข้นของสับสเตรท } [1/S]$  เช่น  $H_2O_2$  และ *o*-dianisidine

#### 2.12.5 การเปรียบเทียบความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา โดยใช้

สับสเตรท เป็น *o*-dianisidine, ABTS, pyrogallol และ ascorbate

นำเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์จากใบยางพารา ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) มีความเข้มข้นของโปรตีน 8.4 มก./มล. ทำการเจือจางอย่างเหมาะสม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาทดสอบหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยของ 0.25 % (w/v) *o*-dianisidine, 0.1 M  $H_2O_2$  ใน 50 mM sodium acetate, pH 5.4 แล้วเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่มี ABTS ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง เท่ากับ  $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Collins *et al.*, 1998) และ pyrogallol ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง เท่ากับ  $2.47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ส่วน ascorbate วัดการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสง เท่ากับ  $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Converso and Fernandez, 1995) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นสับสเตรท โดยใช้  $H_2O_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 M ใน 50 mM sodium acetate, pH 5.4 ทดสอบความว่องไวตามวิธีในข้อ 2.3 คำนวณหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส เปรียบเทียบ ค่า  $K_m$  ระหว่างสารตั้งต้นแต่ละชนิด

### 2.12.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในรูปของสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ $-20^{\circ}\text{C}$

นำเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในชั้นตอน Sephadex G-75 (PPE) มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. ที่เจือจางให้มีความว่องไวอยู่ในช่วง 4,200 หน่วย/มล. ในสารละลาย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ในหลอดทดลองหลอดละ 10 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกันคือ อุณหภูมิห้อง, 4 และ  $-20^{\circ}\text{C}$  นำเปอร้ออกซิเดสแต่ละหลอดมาทดสอบหาความว่องไว ทุกๆ สัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 เดือน ตามวิธีในข้อ 2.3 ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เปรียบเทียบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสต่อการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ  $-20^{\circ}\text{C}$  กับความว่องไวตอนเริ่มต้น

### 2.12.7 เปรียบเทียบวิธีการเก็บเปอร้ออกซิเดสในรูปแบบของการทำไลโอไฟไลซ์ และอยู่ในรูปของสารละลายเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ $4^{\circ}\text{C}$

นำเปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. เจือจางให้มีความว่องไวอยู่ในช่วง 4,000 หน่วย/มล. ในหลอดทดลองหลอดละ 10 ไมโครลิตร แบ่งหลอดเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกนำไปทำให้แห้งโดยการไลโอไฟไลซ์ กลุ่มที่สองอยู่ในรูปของสารละลายใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 หลังจากนั้นนำทั้งสองส่วนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  ทดสอบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 3 เดือน หรือจนกระทั่งความว่องไวลดลงเป็นศูนย์ ตามวิธีในข้อ 2.3 เปรียบเทียบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสในการเก็บแต่ละรูปแบบ

## 2.13 การศึกษาสารที่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส

### 2.13.1 ผลของไดวาเลนต์แคทไอออนและ EDTA ต่อความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส

ศึกษาความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในชั้นตอน Sephadex G-75 (PPE) โดยใช้เอนไซม์ที่เจือจางให้มีความว่องไว 2,368 หน่วย/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของไอออนต่างๆคือ  $\text{Mg}^{2+}$  หรือ  $\text{Ca}^{2+}$  และ EDTA ตั้งแต่ 0- 400 mM อยู่ด้วย ทดสอบความว่องไวตามวิธีในหัวข้อ 2.3 เปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ในกรณีที่ไม่มีและมีแคทไอออนและ EDTA ความเข้มข้นต่างๆ อยู่ในปฏิกิริยา

### 2.13.2 ผลของไดไธโอทรีทอล(DTT)และ *p*-CMB ต่อความว่องไวของเปอร์ดอกซีเลส

ศึกษาความว่องไวของเปอร์ดอกซีเลสที่ผ่านการแยกโปรตีนออกจันเกือบจะบริสุทธิ์ในชั้นตอน Sephadex G-75 (PPE) โดยเจือจางให้มีความว่องไว 2,368 หน่วย/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของไดไธโอทรีทอล ตั้งแต่ 0-10 mM และ *p*-CMB ตั้งแต่ 0-100 mM ผสมอยู่ด้วย ทดสอบความว่องไวตามวิธีในข้อ 2.3 เปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ในกรณีที่ไม่มีและมี DTT และ *p*-CMB ที่ความเข้มข้นต่างๆ อยู่ในปฏิกิริยา

### 2.13.3 ผลของ $\text{NaN}_3$ และ KCN ต่อความว่องไวของเปอร์ดอกซีเลส

ศึกษาความว่องไวของเปอร์ดอกซีเลสที่ผ่านการแยกโปรตีนออกจันเกือบจะบริสุทธิ์ในชั้นตอน Sephadex G-75 (PPE) โดยเจือจางให้มีความว่องไว 2,368 หน่วย/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ  $\text{NaN}_3$  ตั้งแต่ 0-100 mM ผสมอยู่ด้วย และ KCN ตั้งแต่ 0-1 mM ทดสอบความว่องไวตามวิธีในข้อ 2.3 เปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ในกรณีที่ไม่มีและมี  $\text{NaN}_3$  และ KCN ที่ความเข้มข้นต่างๆ อยู่ในปฏิกิริยา

### 2.13.4 ผลของ SDS ต่อความว่องไวของเปอร์ดอกซีเลส

ศึกษาความว่องไวของเปอร์ดอกซีเลสที่ผ่านการแยกโปรตีนออกจันเกือบจะบริสุทธิ์ในชั้นตอน Sephadex G-75 (PPE) โดยที่เจือจางให้มีความว่องไว 2,368 หน่วย/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ SDS ตั้งแต่ 0-200 mM ผสมอยู่ด้วย ทดสอบความว่องไวตามวิธีในข้อ 2.3 เปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ในกรณีที่ไม่มีและมี SDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ อยู่ในปฏิกิริยา

## 2.14 การหาค่า pI ของเอนไซม์เปอร์ดอกซีเลส

ในการศึกษาหาค่า pH ที่โปรตีนหรือเอนไซม์มีประจุรวมเป็นศูนย์หรือค่า pI (isoelectric point) ของเปอร์ดอกซีเลสที่บริสุทธิ์หลังจากผ่านคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยวิธี Isoelectric Focusing (IEF) ตามคู่มือของ BIO-RAD ซึ่งใช้สารประกอบของ 24.25 % อะคริลาไมด์, 0.75 % บีสอะคริลาไมด์, 0.1 % ไโรโบฟลาวิน, 10 % แอมโมเนียมเปอร์ดัลเฟต, 25 % กลีเซอรอล, TEMED และ carrier ampholytes isoelectric focusing ที่มีค่า pH ระหว่าง 3-10 นำแผ่นเจลที่มีส่วนผสมดังกล่าวไปวางไว้ภายใต้แสงให้

เกิด photopolymerization เป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นใส่สารละลาย ตัวอย่าง 2 ไมโครลิตร มีปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม และโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งมีค่า pI ตั้ง แต่ 3.6-9.3 โปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI (Sigma : IEF standard) เช่น อะไมโลกลูโคซิเลส pI 3.6, ซอยบีนทริบซินอินฮิบิเตอร์ pI 4.6, บีตา-แลคโทโกลบูลิน pI 5.1, คาร์บอนิก แอนไฮเดรส pI 5.9, คาร์บอนิกแอนไฮเดรส pI 6.6, ไมโอโกลบิน pI 6.8, ไมโอโกลบิน pI 7.2, เลนทิลเลคติน pI 8.2, เลนทิลเลคติน pI 8.6, เลนทิลเลคติน pI 8.8, และ ทริปซิโนเจน pI 9.3 ลงบนแผ่นเจลทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้สารละลายตัวอย่างซึมเข้าไปใน แผ่นเจล แล้วทำการแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าซึ่งโปรตีนจะแยกจากกันตามค่า pI โดยเริ่ม ต้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเพิ่มกระแสไฟฟ้าขึ้นเป็น 200 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที และในครั้งสุดท้ายเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น 450 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบตามเวลา นำแผ่นเจลมาตัดแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปย้อมโปรตีนในสาร ละลายที่ประกอบด้วย สีคูมาซีบลู : ไอโซโพรพานอล : กรดน้ำส้ม ในอัตราส่วน 1 : 7 : 3 โดยปริมาตรที่มีคอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ ) 0.5 % ย้อมเป็นเวลา 2 ชม. ต่อมานำเจลไปแช่ ในสารละลายที่มี คอปเปอร์ซัลเฟต : ไอโซโพรพานอล : กรดน้ำส้ม ในอัตราส่วน 1 : 5 : 12 โดยปริมาตร 2-3 ครั้งๆละ ประมาณ 30 นาที จนสามารถมองเห็นแถบโปรตีนและแช่ต่อใน สารละลายที่มี ไอโซโพรพานอล : กรดน้ำส้ม ในอัตราส่วน 11 : 1 โดยปริมาตร ประมาณ 20 นาที เพื่อล้างสีส่วนที่ไม่จับกับโปรตีนออกจนมองเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้กับแถบ โปรตีนมาตรฐานที่มีค่า pI ต่างๆกันของ Sigma ส่วนที่สองนำมาย้อมความม่วงไวของ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามวิธีในหัวข้อ 2.10.3 นำแผ่นเจลทั้งสองส่วนเปรียบเทียบแถบ ของโปรตีนและแถบของความม่วงไว กับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI

### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในใบยางพารา

ในการสกัดเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 100 กรัม จากการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากใบยางพารา 1 กรัม พบว่ามีปริมาณโปรตีน  $23 \pm 1.6$  มก. และมีความว่องไวของเอนไซม์  $215 \pm 15$  หน่วย โดยความว่องไว 1 หน่วย หมายถึง ความสามารถในการเปลี่ยน 1  $\mu\text{mole}$  ของ *o*-dianisidine ที่ไม่มีสีให้มีสีน้ำตาลแดงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ในเวลา 1 นาที และเมื่อคำนวณความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ พบว่ามีค่าเท่ากับ  $9.4 \pm 0.7$  หน่วย/มก.โปรตีนในใบยางพาราสกัด เปรียบเทียบกับปริมาณเปอร์ออกซิเดสในหัวผักกาดหนูขาว (horseradish) และหัวไชเท้า จะเห็นว่าใบยางพารามีปริมาณเปอร์ออกซิเดสน้อยกว่าในหัวผักกาดหนูขาวและหัวไชเท้าดังตารางที่ 4

#### 3.2 ผลการไลโอฟีไลซ์ต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดใบยางพารา

ก่อนที่จะนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางสกัดไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้น ได้ศึกษาผลของการไลโอฟีไลซ์ต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางสกัด และการที่นำสารสกัดไปทำให้แห้งนั้นยังทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นสูงขึ้น เพื่อเหมาะต่อการไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ทำโดยนำสารสกัดเปอร์ออกซิเดสในขั้นตอน ( $S_1$ ) ที่เตรียมได้จากสารสกัดหยาบในข้อ 2.1 ปริมาตร 100 มล. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง มีปริมาณโปรตีน  $527 \pm 30$  มก. และความว่องไวของเอนไซม์  $5,073 \pm 259$  หน่วย เมื่อคำนวณความว่องไวจำเพาะมีค่าเป็น  $9.6 \pm 0.25$  หน่วย/มก.โปรตีน นำไปทำการไลโอฟีไลซ์จนแห้งใช้เวลาประมาณ 1 วัน นำไปละลายกลับในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl pH, 7.5 ปริมาตรน้อยที่สุดจนสารสกัดละลายหมด วัดปริมาตรที่เหลือหลังจากนั้นนำมาหาปริมาณโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์ พบว่ามีปริมาณโปรตีน  $509 \pm 36$  มก. และความว่องไวเอนไซม์  $4,558 \pm 120$  หน่วย ความว่องไวจำเพาะเหลือ  $8.9 \pm 0.45$  หน่วย/มก.โปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเปอร์ออกซิเดสที่ไม่ผ่านการไลโอฟีไลซ์ หรือความว่องไวลดลงเหลือ  $89.9 \% \pm 2.6$  ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการสกัดใบยางพารา 1 กรัม เปรียบเทียบกับ หัวผักกาดหนูขาว และหัวไชเท้า 1 กรัม

Sample	Activity (Unit)	Protein (mg)	Specific activity Unit/mg protein
ใบยางพารา ( <i>Hevea brasiliensis</i> leaves)	215 ± 15	23 ± 1.6	9.4 ± 0.7
หัวผักกาดหนูขาว (horseradish)	557 ± 11	1.2 ± 0.29	464 ± 38
หัวไชเท้า	677 ± 12	1.4 ± 0.21	483 ± 57

ตัวเลขของใบยางพาราเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 7 ครั้ง โดยคำนวณจากตัวอย่าง 1 กรัม  
ตัวเลขของหัวผักกาดหนูขาวและหัวไชเท้าเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ครั้ง โดย  
คำนวณจากตัวอย่าง 1 กรัม

ตารางที่ 5 ผลของการไลโอไฟไลซ์ต่อความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบยางพารา

Sample	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity Unit/mg protein	Yield (%)
Non-lyophilized Peroxidase extract	5,073 ± 259	527 ± 30	9.6 ± 0.25	100
Lyophilized Peroxidase extract	4,558 ± 120	509 ± 36	8.9 ± 0.45	89.9 ± 2.6

ตัวเลขที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ± SD ก่อนและหลังการนำไปไลโอไฟไลซ์

### 3.3 ผลการทำให้เอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากใบยางสั๊กมีความบริสุทธิ์ขึ้น

#### 3.3.1 ผลการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีที่ 1

หลังการทำไลโอไฟไลซ์ในส่วนของสารสกัดเปอร็อกซิเดสจากใบยางพารา 3 ครั้ง พบว่าความว่องไวของเปอร็อกซิเดส ลดลงประมาณ 10 % ดังนั้น การทำเปอร็อกซิเดสให้บริสุทธิ์โดยวิธีที่ 1 จึงได้นำสารสกัดเปอร็อกซิเดสไประเหิดให้แห้งเพื่อที่จะลดปริมาณของเกล็ดแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอน พบว่าก่อนการไลโอไฟไลซ์ สารสกัดเปอร็อกซิเดสจากใบยางพารามีความว่องไวเริ่มต้น 20,810 หน่วย มีปริมาณโปรตีน 2,376 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะ 8.8 หน่วย/มก.โปรตีน หลังการทำไลโอไฟไลซ์ สารสกัดเปอร็อกซิเดสมีความว่องไวลดลงเหลือ 18,275 หน่วย มีปริมาณโปรตีน 2,300 มก. และความว่องไวจำเพาะลดลงเหลือ 7.9 หน่วย/มก.โปรตีน เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยเกล็ดแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 40 % พบว่าเปอร็อกซิเดสอยู่ในส่วนที่ละลายจึงนำไปตกตะกอนต่อด้วยเกล็ดแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 80 % พบว่าเปอร็อกซิเดสอยู่ในส่วนตะกอน จึงนำตะกอนไปละลายด้วย 50 mM Tris-HCl pH, 7.5 ปริมาตรเท่ากับปริมาตรตะกอน ตะกอนควรจะละลายได้หมดแต่เมื่อนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งก็จะได้ส่วนที่เป็นตะกอน  $P_3$  เมื่อทดสอบความว่องไวของเปอร็อกซิเดสตั้งแต่เริ่มต้นการสกัดถึงขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีน พบว่า ความว่องไวของเปอร็อกซิเดสกระจายอยู่ทั้งใน  $S_4$  หรือ ( $P_2$ ) และใน  $P_3$  โดยที่  $S_4$  และ  $P_3$  มีความว่องไว 8,439 หน่วย และ 4,415 หน่วย ตามลำดับ ความว่องไวจำเพาะในส่วนของสารละลาย  $S_4$  จะมีค่าสูงกว่าในส่วน  $P_3$  เพียงเล็กน้อย คือ 26 และ 16.7 หน่วย/มก.โปรตีน ดังตารางที่ 6 ดังนั้นการทำให้เปอร็อกซิเดสบริสุทธิ์ขึ้น จึงนำ  $S_4$  มาไดอะไลซ์ใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 หลังการไดอะไลซ์ ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ CM-Cellulose ดูดน้ำ พบว่าความว่องไวของเปอร็อกซิเดสลดลงเหลือ 6,912 หน่วย หรือคิดเป็น 33.2 % ของตอนเริ่มต้น มีปริมาณโปรตีน 246 มก. และมีค่าความว่องไวจำเพาะ เพิ่มขึ้นเป็น 28.1 หน่วย/มก.โปรตีน เปอร็อกซิเดสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.2 เท่า จากความว่องไวจำเพาะในตอนเริ่มต้น ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา 100 กรัม ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่างๆโดยวิธีที่ 1

Step	Total activity Unit ( $\mu\text{mole}/\text{min}$ )	Total Protein ( mg )	Specific activity Unit/mg protein	Yield (%)	Purification (fold)
Extract	20,810	2,376	8.8	100	1
Freez dry	18,275	2,300	7.9	87.8	0.9
ส่วนละลาย $S_2$ 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	14,169	1,430	9.9	68.1	1.13
ตะกอน $P_2$ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,439	324	26	40.6	2.95
ส่วนละลาย ( $P_3$ )	4,415	265	16.7	21.2	1.9
ไดอะไลซ์ตะกอน $P_2$ หรือส่วนใส $S_4$	6,912	246	28.1	33.2	3.2
CM-Cellulose	4,151	95	43.7	19.9	4.97
Sephadex G-75	2,899	30.8	94.1	13.93	10.7

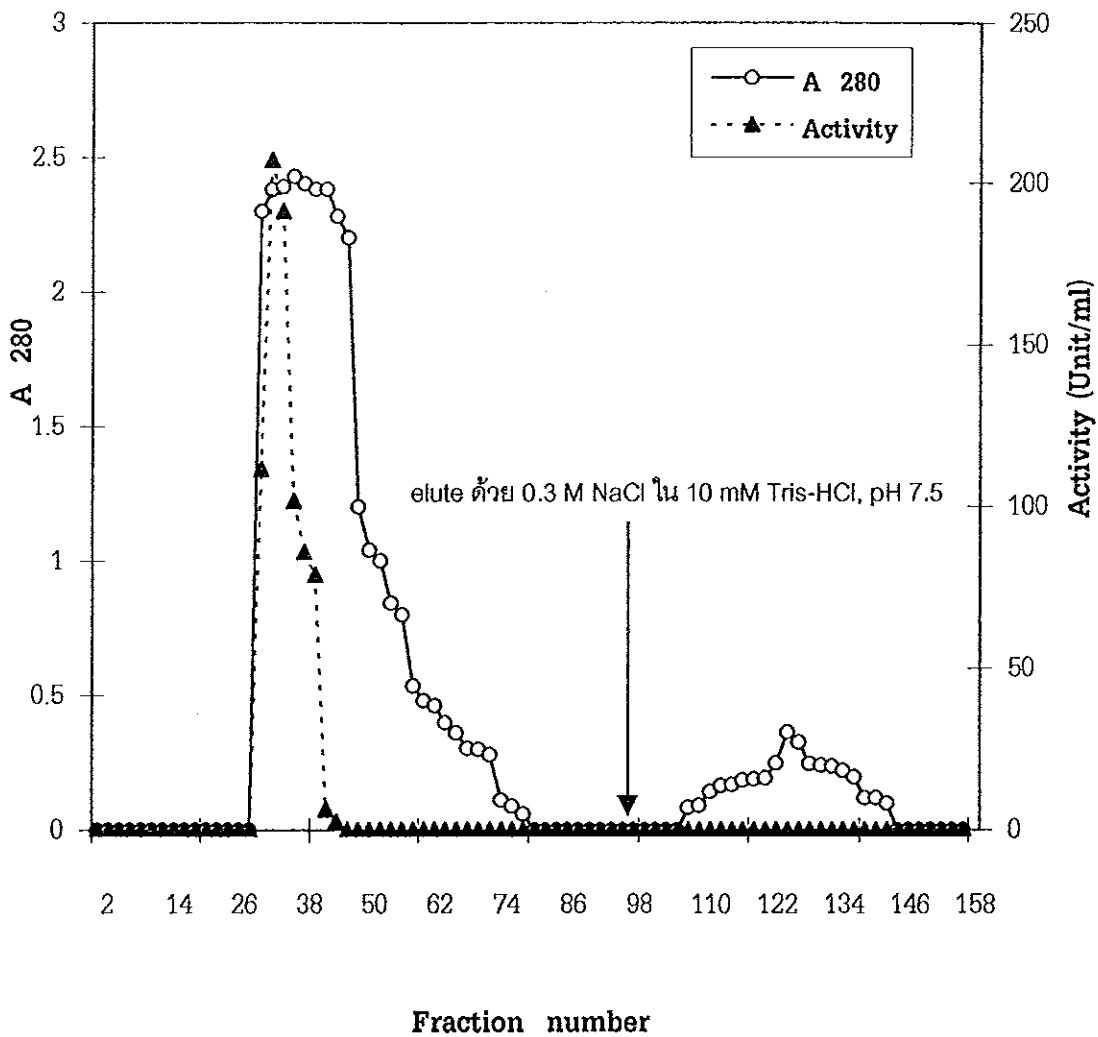
จากการทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์โดยวิธีที่ 1 นี้ เมื่อดูค่าความว่องไวจำเพาะเริ่มต้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีค่าเป็น 8.8 หน่วย/มก.โปรตีน หลังจากผ่านขั้นตอนต่างๆ ตามวิธีการข้างต้น มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 94.1 หน่วย/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.7 เท่า ได้เปอร์ออกซิเดสเพียง 13.93 % จากส่วนสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้น 100 กรัม



เมื่อนำเปอร็อกซิเดสหลังการไดอะไลซ์ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่ถูกชะออกมาในพีคแรก มีความว่องไวของเปอร็อกซิเดส แต่ในพีคที่ 2 ไม่มีความว่องไวของเปอร็อกซิเดส ดังรูปที่ 4 เมื่อรวมสารละลายโปรตีนของพีคแรกที่มีความว่องไวสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Centriflo membrane cone CF-25 แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว  $5,000 \times g$  พบว่ามีปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 95 มก. มีความว่องไว 4,151 หน่วย คิดเป็น 19.9 % และความว่องไวจำเพาะเท่ากับ 43.7 หน่วย/มก. โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 4.97 เท่า ดังตารางที่ 6 (เมื่อตรวจสอบดูโปรตีนและความว่องไวของเปอร็อกซิเดสในหลอดที่มีความว่องไวสูงโดย SDS-PAGE พบว่ายังมีโปรตีนอื่นปนอยู่ ดังรูปที่ 5)

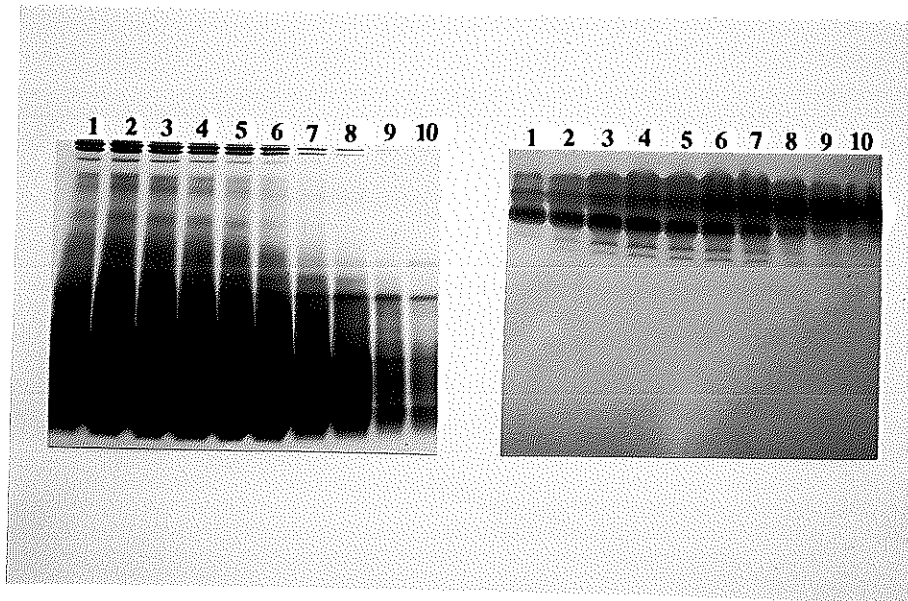
เมื่อนำโปรตีนพีคแรกที่ได้จากคอลัมน์ CM-Cellulose ซึ่งมีความว่องไวของเปอร็อกซิเดส ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-75 และชะคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 จะมีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค ดังรูปที่ 6 โปรตีนในพีคแรกมีความว่องไวของเปอร็อกซิเดสเป็น 2,899 หน่วย และมีปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 30.8 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะที่ได้เป็น 94 หน่วย/มก. โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 10.7 เท่า จากตอนเริ่มต้น ดังตารางที่ 6 ส่วนโปรตีนในพีคที่ 2 ไม่มีความว่องไวของเอนไซม์ ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ในระหว่างการแยกเปอร็อกซิเดสด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS-PAGE พบว่าหลอดที่มีความว่องไวสูงนั้นยังมีโปรตีนอื่นปนอยู่มากดังรูปที่ 7 จะเห็นได้จากบริเวณที่มีความว่องไวของเปอร็อกซิเดสอยู่นั้นแทบจะไม่มีโปรตีนอยู่เลยหรือมีโปรตีนอยู่น้อยมาก เมื่อนำเปอร็อกซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 มาแยกโดย ND-PAGE ตัดเจลเป็นแถบกว้าง 1 ซม. ตามความยาวดังรูปที่ 3 และนำมาแยกความว่องไวของเปอร็อกซิเดส และตัดเจลบริเวณที่มีความว่องไวส่วนที่เหลือมาสกัดเอาเปอร็อกซิเดสออก แล้วนำมาศึกษาในอิเล็กโทรโฟรีซิส ทั้งแบบ ND-PAGE และ SDS-PAGE พบว่ายังมีโปรตีนอื่นๆ ปนอยู่หลายแถบ ดังรูปที่ 8 จะเห็นว่า การแยกเปอร็อกซิเดสโดยวิธีที่ 1 นี้ไม่อาจทำให้บริสุทธิ์เพียงพอได้ และเปอร็อกซิเดสในใบยางพาราที่น่าจะเป็นโปรตีนที่มีอยู่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับโปรตีนอื่นในใบยางพารา

ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงวิธีการทำให้เปอร็อกซิเดสบริสุทธิ์ตั้งแต่ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40 - 80 % นำส่วนตะกอน  $P_2$  ที่ได้มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ปริมาณน้อยที่สุดจนตะกอนละลายหมด ทำให้ไม่มีตะกอนส่วน  $P_3$  เกิดขึ้น จึงได้นำเฉพาะสารละลายส่วนใส  $S_4$  ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นตามวิธีการที่ 2 ต่อไป



รูปที่ 4 การแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบยางพาราที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40-80 % โดยคอลัมน์ CM-Cellulose ตามวิธีการที่ 1

สารสกัดเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาตร 15 มล. มีโปรตีน 246 มล. ผ่านลงในคอลัมน์ CM-Cellulose (2 x 25 ซม.) ที่ 4°C ล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. จนค่า A 280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะต่อด้วย 0.3 M NaCl ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เก็บสารละลายหลอดละ 4 มล ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และความม่วงไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

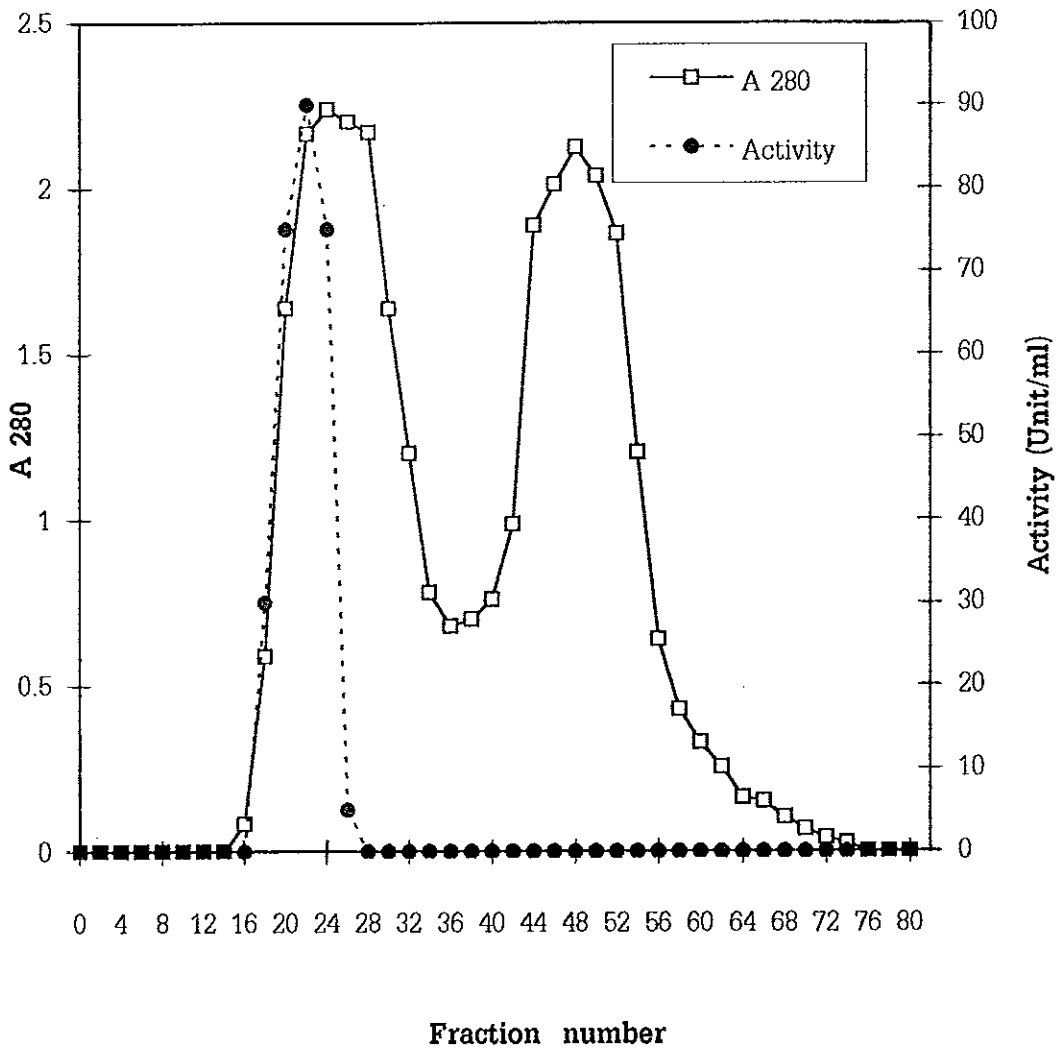


A

B

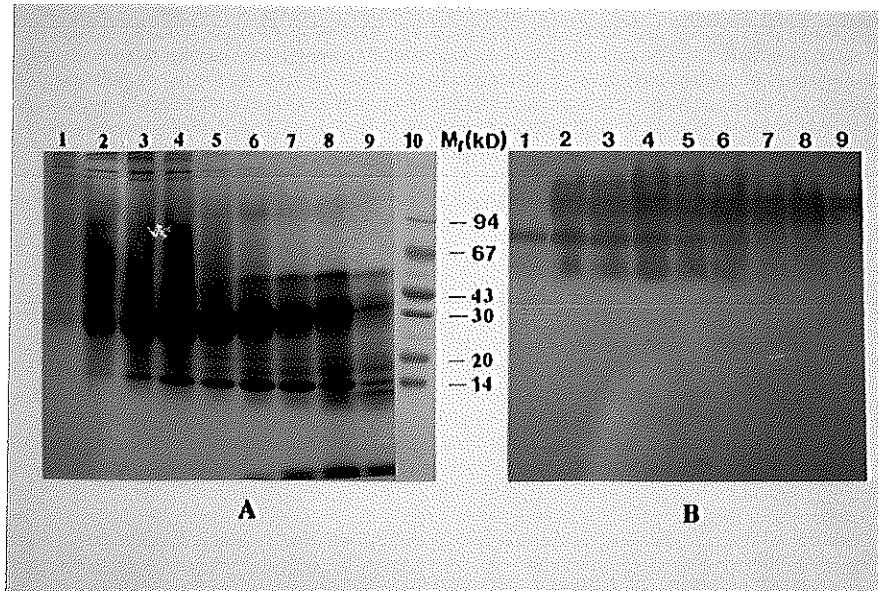
รูปที่ 5 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเปอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ CM-Cellulose วิธีที่ 1 ภาพ A ย้อมโปรตีน ภาพ B ย้อมความม่วงไวของเปอร์ออกซิเดส

แถวที่ 1	สารละลายในหลอดที่ 32
แถวที่ 2	สารละลายในหลอดที่ 33
แถวที่ 3	สารละลายในหลอดที่ 34
แถวที่ 4	สารละลายในหลอดที่ 35
แถวที่ 5	สารละลายในหลอดที่ 36
แถวที่ 6	สารละลายในหลอดที่ 37
แถวที่ 7	สารละลายในหลอดที่ 38
แถวที่ 8	สารละลายในหลอดที่ 39
แถวที่ 9	สารละลายในหลอดที่ 40
แถวที่ 10	สารละลายในหลอดที่ 41



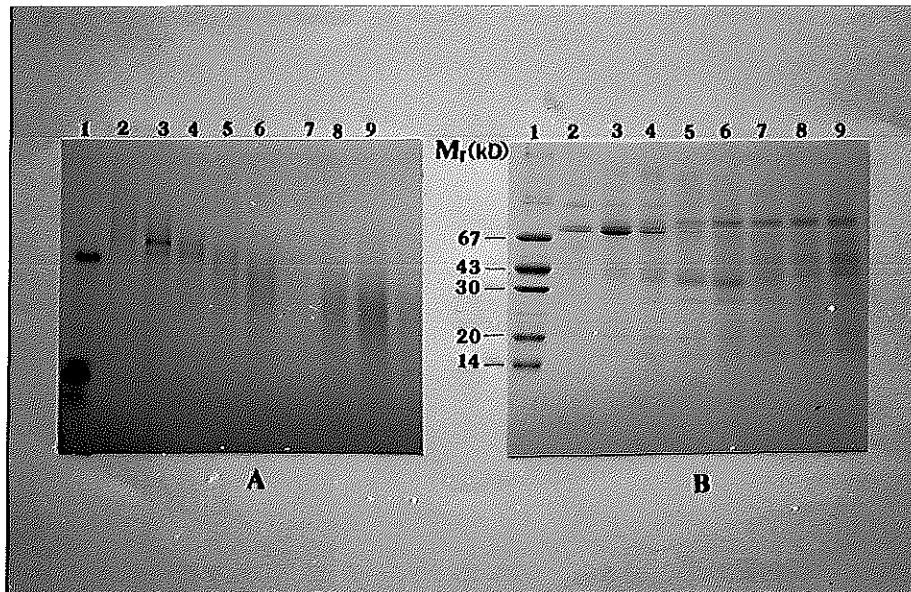
รูปที่ 6 การแยกเอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ CM-Cellulose โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีการที่ 1

สารละลายพีคที่มีเปอร็อกซิเดสจากคอลัมน์ CM-Cellulose มีปริมาณโปรตีน 95 มก. ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 (1.2 x 70 ซม.) ที่ 4°C ชะคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 15 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดส



รูปที่ 7 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 วิธีที่ 1 ภาพ A ย้อมโปรตีน ภาพ B ย้อมความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส

แถวที่ 1	สารละลายในหลอดที่ 18
แถวที่ 2	สารละลายในหลอดที่ 19
แถวที่ 3	สารละลายในหลอดที่ 20
แถวที่ 4	สารละลายในหลอดที่ 21
แถวที่ 5	สารละลายในหลอดที่ 22
แถวที่ 6	สารละลายในหลอดที่ 23
แถวที่ 7	สารละลายในหลอดที่ 24
แถวที่ 8	สารละลายในหลอดที่ 25
แถวที่ 9	สารละลายในหลอดที่ 26
แถวที่ 10	สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW



รูปที่ 8 แบบแผนโปรตีนที่ได้จากการตัดเจลบริเวณที่มีความว่องไวของเอนไซม์  
ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ ND-PAGE ตามวิธีที่ 1  
ภาพ A ย้อมโปรตีนแบบ ND-PAGE ของเปอร์ออกซิเดส  
ภาพ B ย้อมโปรตีนแบบ SDS-PAGE ของเปอร์ออกซิเดส

แถวที่ 1	สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW
แถวที่ 2	สารละลายในส่วนที่ 1
แถวที่ 3	สารละลายในส่วนที่ 2
แถวที่ 4	สารละลายในส่วนที่ 3
แถวที่ 5	สารละลายในส่วนที่ 4
แถวที่ 6	สารละลายในส่วนที่ 5
แถวที่ 7	สารละลายในส่วนที่ 6
แถวที่ 8	สารละลายในส่วนที่ 7
แถวที่ 9	สารละลายในส่วนที่ 8

### 3.3.2 ผลการทำเปอร์ออกซิเดสจากโบบางให้บริสุทธิ์โดยวิธีที่ 2

ภายหลังการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40 % ของความอิ่มตัว พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ในโบบางสกัดไม่ตกตะกอนในแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40 % โปรตีนยังอยู่ในส่วนที่เป็นสารละลาย  $S_2$  อยู่ถึง 90.8 % และความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสสูงถึง 93.9 % มีความบริสุทธิ์ที่กว่าเดิมเพียงเล็กน้อย คือเพิ่มจาก 1 เป็น 1.04 เท่า เมื่อตกตะกอนโปรตีนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 % ของความอิ่มตัว ความว่องไวอยู่ในส่วนของตะกอนถึง 58.3 % ในส่วนนี้มีโปรตีนเพียง 383 มก. หรือคิดเป็น 16 % ทำให้ความว่องไวจำเพาะสูงขึ้นจาก 9.5 เป็น 34.7 หน่วย/มก.หรือมีความบริสุทธิ์ที่สูงขึ้นถึง 3.7 เท่า (ตารางที่ 7) เมื่อนำเปอร์ออกซิเดสในส่วน  $P_2$  ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ให้มีปริมาตรน้อยที่สุดจนตะกอนละลายหมด และนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าโปรตีนในส่วน  $P_2$  นี้จะแยกออกเป็น 2 พีค เปอร์ออกซิเดสจะถูกชะออกจากคอลัมน์ในพีคแรก ดังรูปที่ 9 แสดงว่าเปอร์ออกซิเดสไม่จับกับ DEAE-Sephacel และมีความว่องไวคิดเป็น 46.8 % ของสารสกัดในตอนเริ่มต้น และมีความว่องไวจำเพาะเป็น 659.3 หน่วย/มก.โปรตีน หรือมีความบริสุทธิ์ที่สูงขึ้นเป็น 69.4 เท่า และมีโปรตีนเหลือเพียง 16.2 มก. ดังตารางที่ 7 เมื่อตรวจสอบดูโปรตีนในส่วนที่มีความว่องไวสูงจากคอลัมน์ โดย PAGE ทั้งแบบ ND-PAGE และ SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนตรงกับแถบของเปอร์ออกซิเดสแต่ยังมีโปรตีนอื่นๆที่ไม่ใช่เปอร์ออกซิเดสซึ่งมีขนาดเล็กๆปนอยู่ ดังรูปที่ 10 และ 11 ตามลำดับ

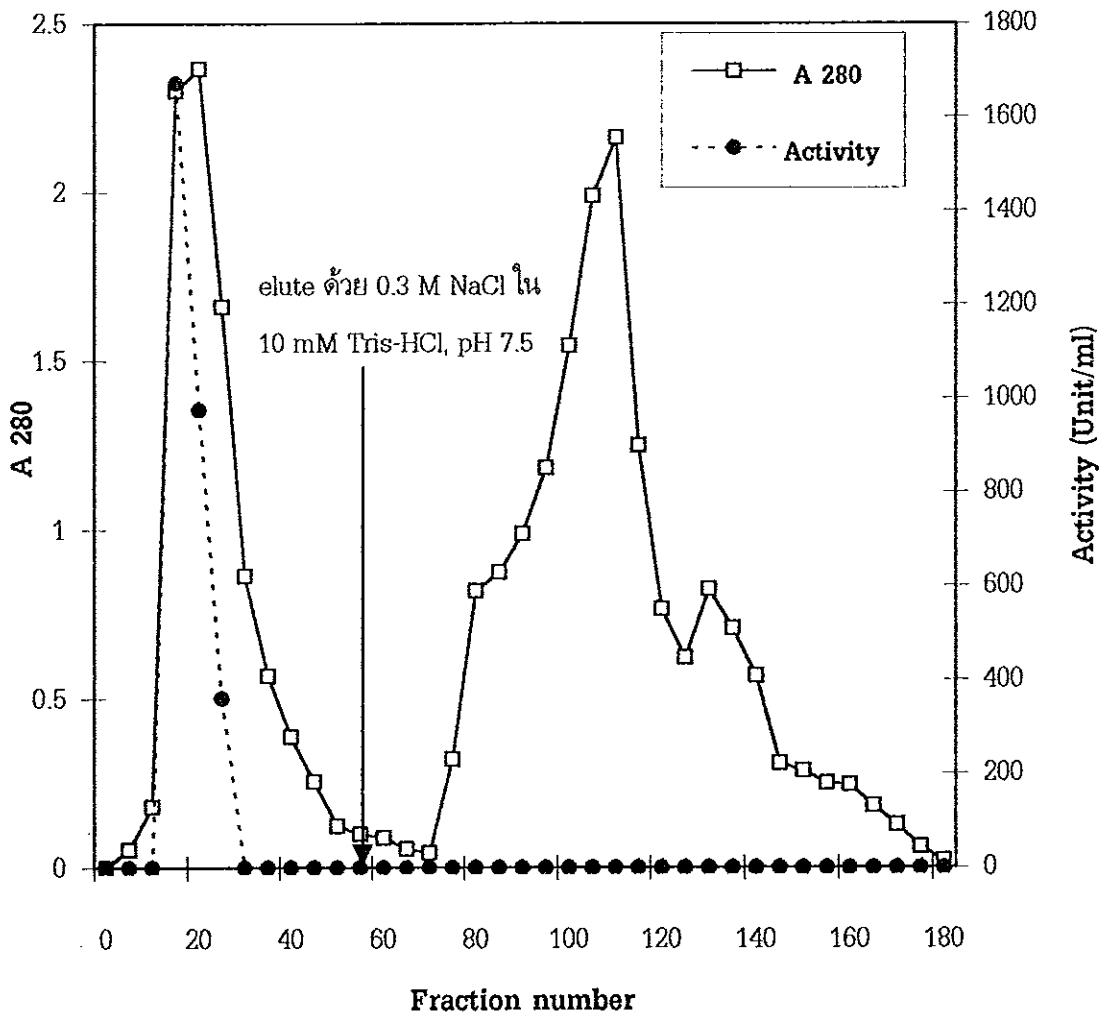
เมื่อนำเปอร์ออกซิเดสที่รวมได้จากพีคที่มีความว่องไวผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephadex G-75 พบว่าเปอร์ออกซิเดสจะถูกชะออกมาในพีคแรก ดังรูปที่ 12 และมีความว่องไวคิดเป็น 40 % ของสารสกัดในตอนเริ่มต้น และมีโปรตีนเหลือเพียง 8.4 มก. มีความว่องไวจำเพาะสูงขึ้นเป็น 1,092 หน่วย/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์ที่สูงขึ้นถึง 115 เท่า ดังแสดงตารางที่ 7 เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำให้ PAGE แบบมี SDS-PAGE และ ND-PAGE พบว่ามีโปรตีนขนาดเล็กๆปนอยู่บางส่วนได้ผลดังรูปที่ 13, 14 ก่อนที่จะนำเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอีกโดยใช้คอลัมน์ Con A-Sepharose ได้นำเปอร์ออกซิเดสจากคอลัมน์ Sephadex G-75 มาวัดค่า RZ พบว่าเปอร์ออกซิเดสจากโบบางพารามีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 และ 277 นาโนเมตร ซึ่งอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงทั้งสองพีคมีค่าเท่ากับ 0.938 ดังรูปที่ 15

ตารางที่ 7 ผลการทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา 100 กรัม ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่างๆโดยวิธีที่ 2

Step	Total activity Unit ( $\mu\text{mole}/\text{min}$ )	Total Protein ( mg )	Specific activity Unit/mg protein	Yield (%)	Purification (fold)
Extract	22,839	2,397	9.5	100	1
ส่วนละลาย ( $\text{S}_2$ ) 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	21,450	2,177	9.8	93.9	1.04
ตะกอน $\text{P}_2$ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	13,307	383	34.7	58.3	3.7
DEAE-Sephacel	10,680	16.2	659.3	46.8	69.4
Sephadex G-75	9,174	8.4	1,092.1	40	115
Con A-Sepharose	7,677	6.6	1,163	33.6	122.4

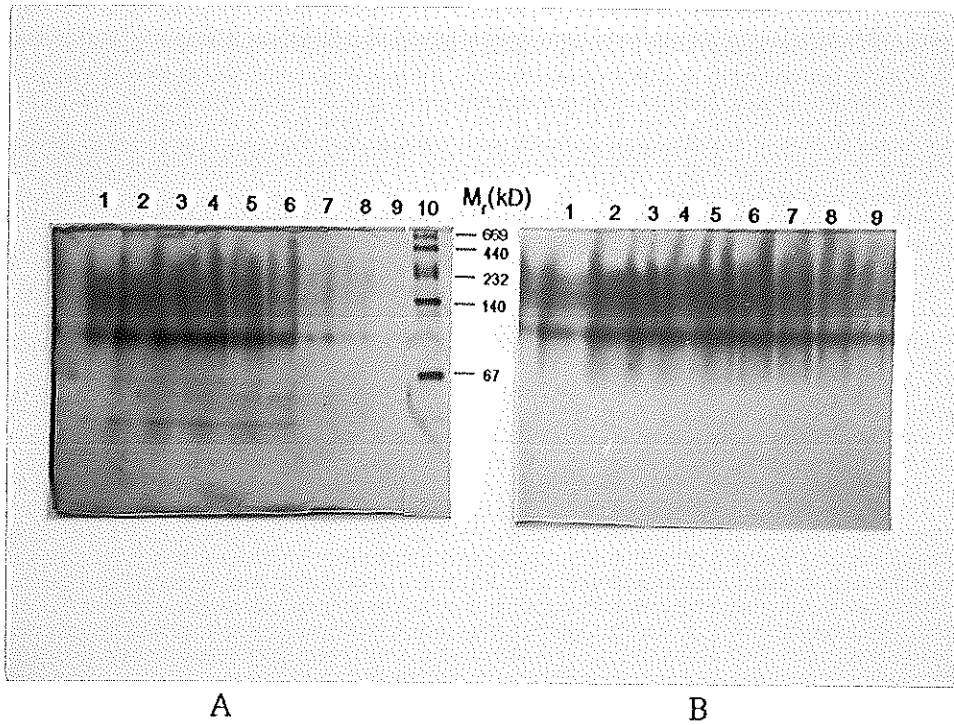
จากการทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์โดยวิธีที่ 2 นี้ เมื่อดูค่าความว่องไวจำเพาะเริ่มต้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีค่าเป็น 9.5 หน่วย/มก.โปรตีน หลังจากผ่านขั้นตอนต่างๆ ตามวิธีการข้างต้น มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 1,163 หน่วย/มก.โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 122.4 เท่า ได้เปอร์ออกซิเดสถึง 33.6 % จากส่วนสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้น 100 กรัม





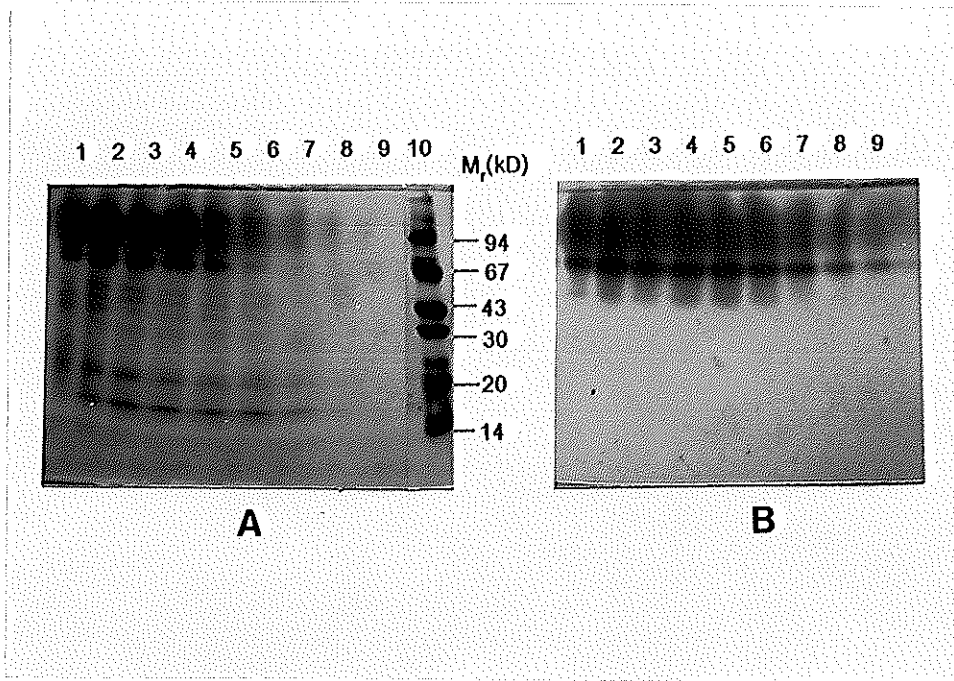
รูปที่ 9 การแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบยางพาราที่ได้จากการตกตะกอน  
โปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40-80 % โดยคอลัมน์  
DEAE-Sephacel ตามวิธีการที่ 2

สารสกัดเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร  
16 มล. มีปริมาณโปรตีน 383 มก. ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel (3 x 13 ซม.) ที่ 4°C  
ล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. จนค่า A 280  
เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะต่อด้วย 0.3 M NaCl ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เก็บสารละลาย  
หลอดละ 4 มล. วัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแต่ละหลอด



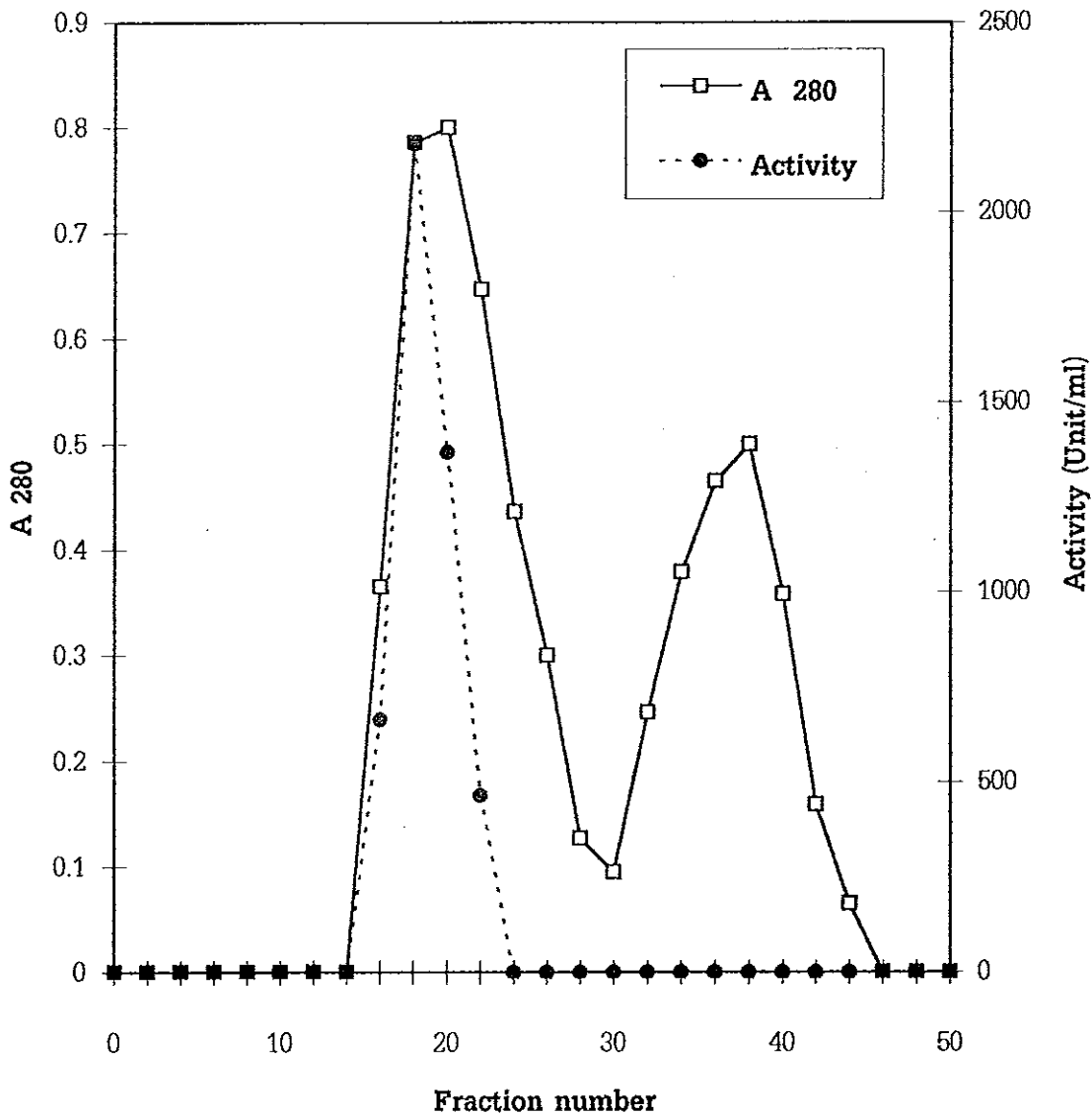
รูปที่ 10 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ND-PAGE ของเปอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel วิธีที่ 2 ภาพ A ย้อมโปรตีน ภาพ B ย้อมความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส

แถวที่ 1	สารละลายในหลอดที่ 15
แถวที่ 2	สารละลายในหลอดที่ 16
แถวที่ 3	สารละลายในหลอดที่ 17
แถวที่ 4	สารละลายในหลอดที่ 18
แถวที่ 5	สารละลายในหลอดที่ 19
แถวที่ 6	สารละลายในหลอดที่ 20
แถวที่ 7	สารละลายในหลอดที่ 21
แถวที่ 8	สารละลายในหลอดที่ 22
แถวที่ 9	สารละลายในหลอดที่ 23
แถวที่ 10	สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด HMW



รูปที่ 11 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel วิธีที่ 2 ภาพ A ย้อมโปรตีน ภาพ B ย้อมความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส

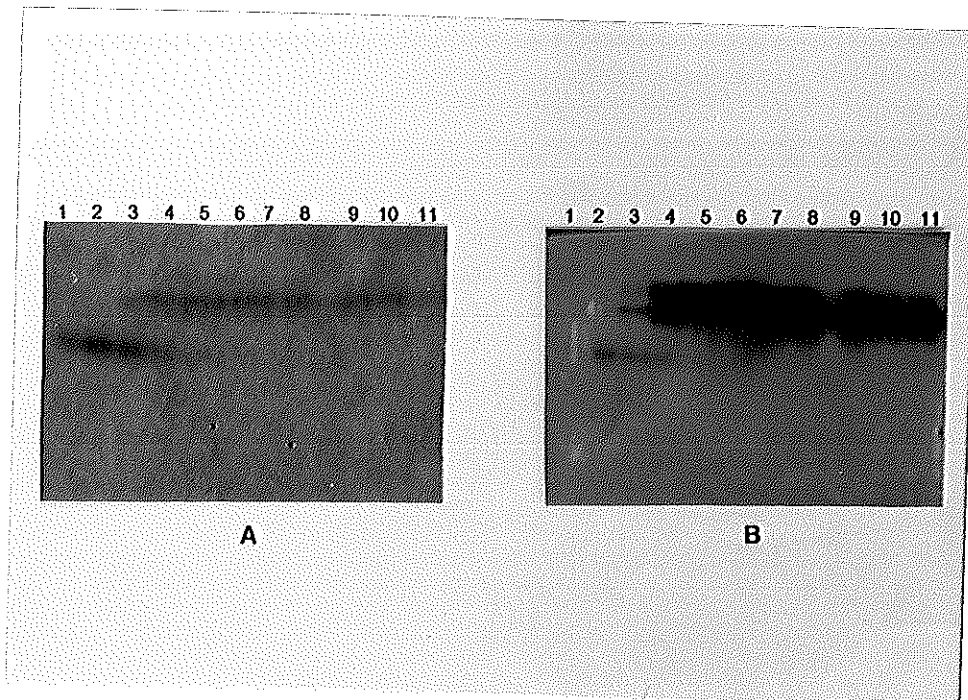
แถวที่ 1	สารละลายในหลอดที่ 15
แถวที่ 2	สารละลายในหลอดที่ 16
แถวที่ 3	สารละลายในหลอดที่ 17
แถวที่ 4	สารละลายในหลอดที่ 18
แถวที่ 5	สารละลายในหลอดที่ 19
แถวที่ 6	สารละลายในหลอดที่ 20
แถวที่ 7	สารละลายในหลอดที่ 21
แถวที่ 8	สารละลายในหลอดที่ 22
แถวที่ 9	สารละลายในหลอดที่ 23
แถวที่ 10	สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW



รูปที่ 12 การแยกเอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

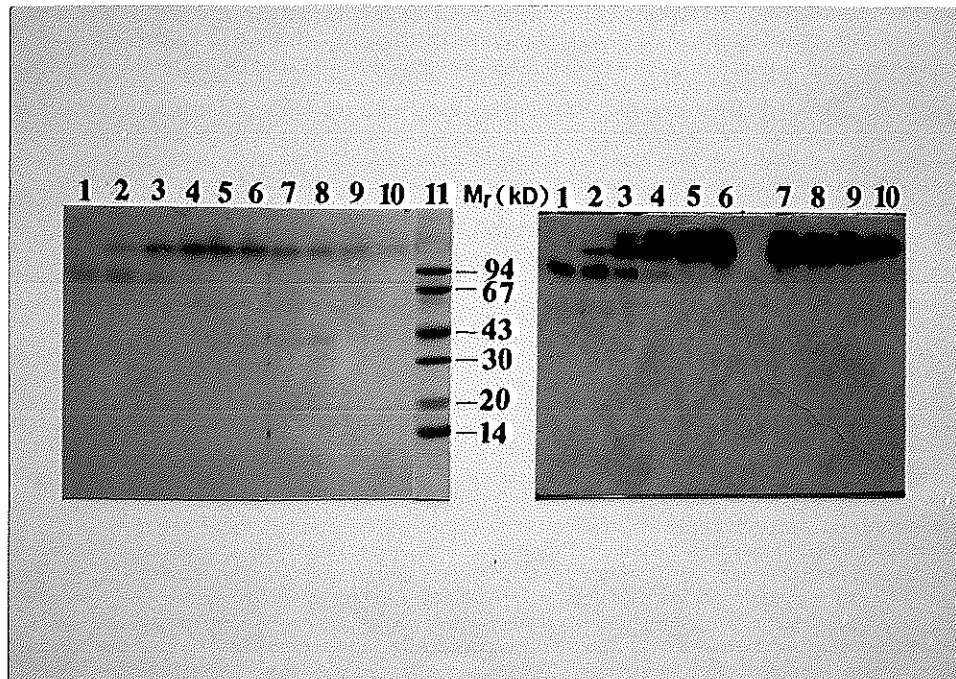
โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีการที่ 2

สารละลายฟีดที่มีเปอร็อกซิเดสจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel มีปริมาณโปรตีน 16.2 มก. ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 (1.2 x 70 ซม.) ที่ 4°C ชะคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 15 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ A 280 และความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสแต่ละหลอด



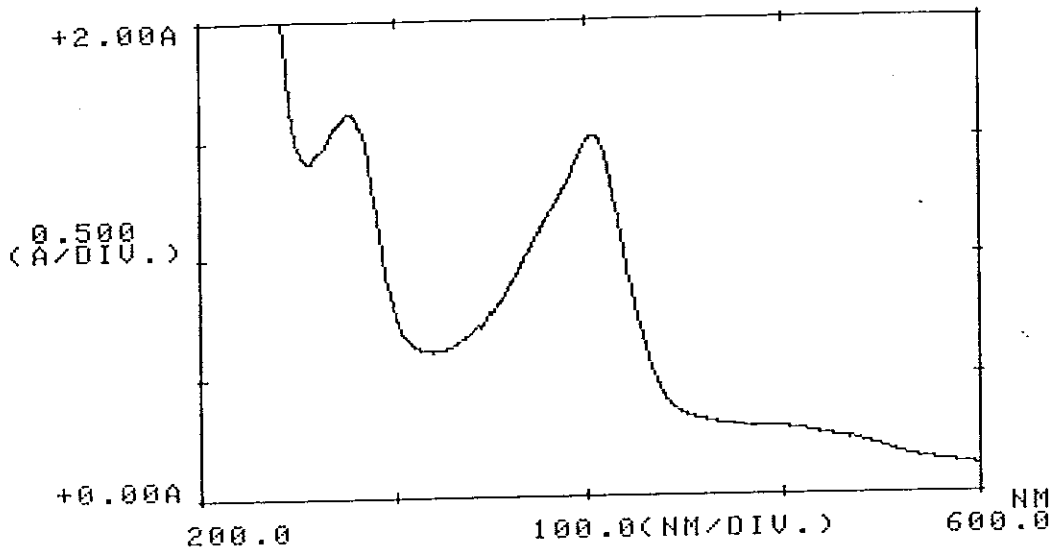
รูปที่ 13 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ ND-PAGE ของเปอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 วิธีที่ 2 ภาพ A ย้อมโปรตีน ภาพ B ย้อมความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส

แถวที่ 1	สารละลายในหลอดที่ 14
แถวที่ 2	สารละลายในหลอดที่ 15
แถวที่ 3	สารละลายในหลอดที่ 16
แถวที่ 4	สารละลายในหลอดที่ 17
แถวที่ 5	สารละลายในหลอดที่ 18
แถวที่ 6	สารละลายในหลอดที่ 19
แถวที่ 7	สารละลายในหลอดที่ 20
แถวที่ 8	สารละลายในหลอดที่ 21
แถวที่ 9	สารละลายในหลอดที่ 22
แถวที่ 10	สารละลายในหลอดที่ 23
แถวที่ 11	สารละลายในหลอดที่ 24



รูปที่ 14 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเปอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 วิธีที่ 2 ภาพ A ย้อมโปรตีน ภาพ B ย้อมความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส

แถวที่ 1	สารละลายในหลอดที่ 15
แถวที่ 2	สารละลายในหลอดที่ 16
แถวที่ 3	สารละลายในหลอดที่ 17
แถวที่ 4	สารละลายในหลอดที่ 18
แถวที่ 5	สารละลายในหลอดที่ 19
แถวที่ 6	สารละลายในหลอดที่ 20
แถวที่ 7	สารละลายในหลอดที่ 21
แถวที่ 8	สารละลายในหลอดที่ 22
แถวที่ 9	สารละลายในหลอดที่ 23
แถวที่ 10	สารละลายในหลอดที่ 24
แถวที่ 11	สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW



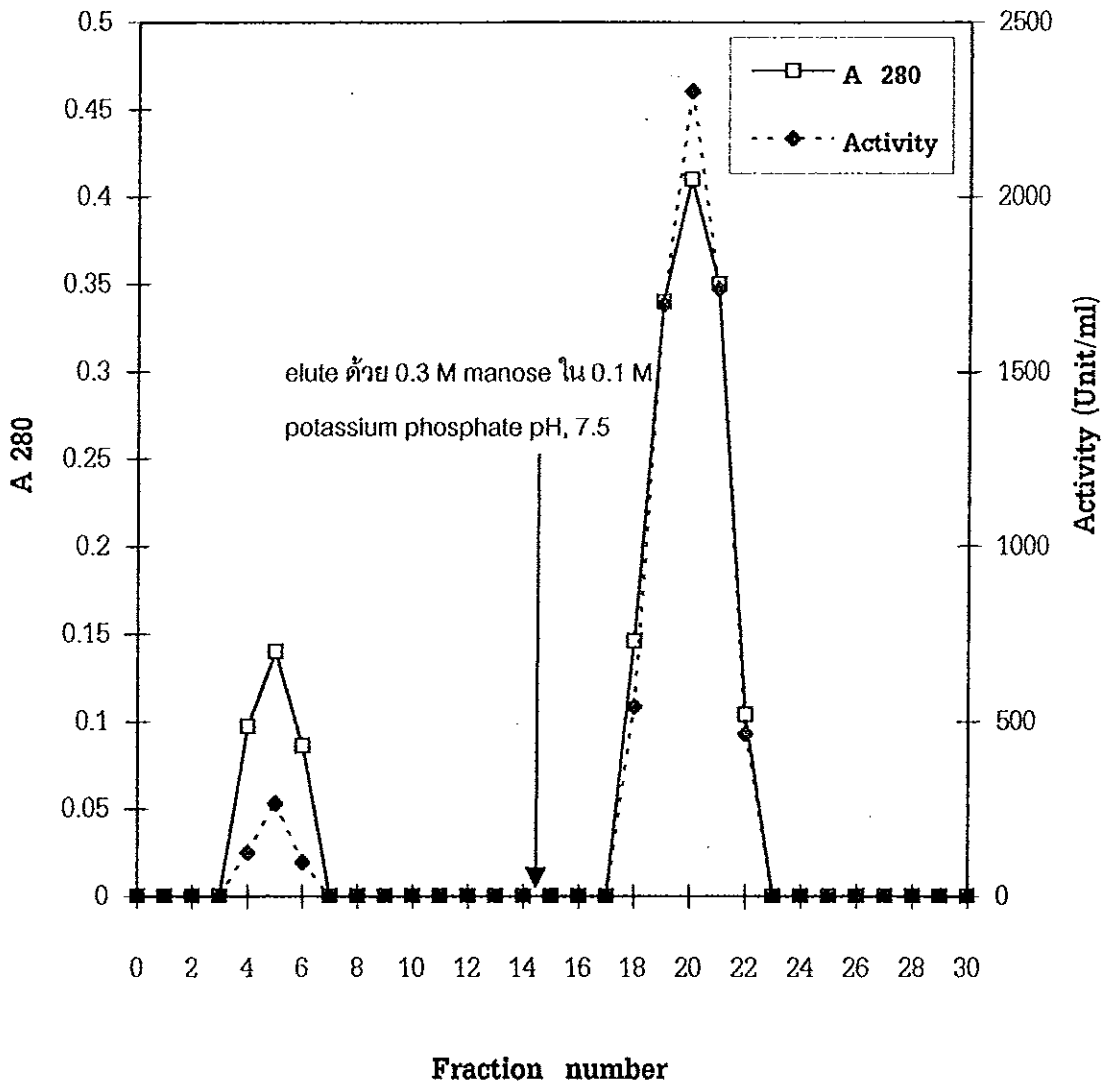
\*\*\* PEAK-PICK \*\*\*

-- PEAK --		-- VALLEY --	
$\lambda$	ABS	$\lambda$	ABS
403.0	1.513	320.0	0.611
277.0	1.613	256.0	1.485

รูปที่ 15 การดูดกลืนแสงของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในชั้นตอนคอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีการที่ 2

แล้วจึงนำเปอร็อกซิเดสผ่านคอลัมน์ Con A-Sepharose เมื่อล้างคอลัมน์ มีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค ซึ่งมีความไวต่ำกว่าสารละลายโปรตีนพีคที่ 2 ที่ได้จากชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดียวกันแต่มิ่้น้ำตาล mannose 0.3 M อยู่ด้วย ดังรูปที่ 16 เมื่อรวมสารละลายโปรตีนของพีค 2 ที่มีความไวของเปอร็อกซิเดสสูงเข้าด้วยกันแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดย Centriflo membrane cone CF 25 พบว่าสารละลายโปรตีนพีคที่ 2 มีปริมาณโปรตีน 6.6 มก. มีความไวของเปอร็อกซิเดสคิดเป็น 7,677 หน่วย คิดเป็น 33.6 % ของเปอร็อกซิเดสในตอนเริ่มต้น มีความไวจำเพาะเป็น 1,163 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็น 122.4 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 7





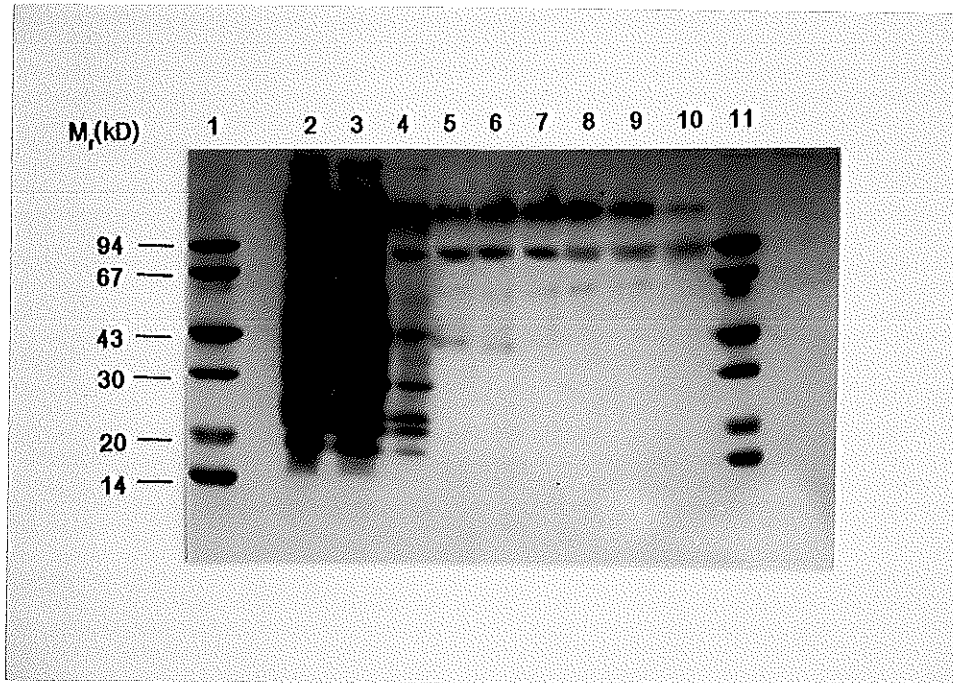
รูปที่ 16 การแยกเอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากสารละลายโปรตีนพีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 โดยคอลัมน์ Con A-Sepharose

เปอร็อกซิเดสจากคอลัมน์ Sephadex G-75 มีปริมาณโปรตีน 8.4 มล. ผ่านลงคอลัมน์ Con A-Sepharose (1.2 x 5 ซม.) ที่ 4°C ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M potassium phosphate, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 9 มล./ชม. จนค่า A 280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะต่อด้วย 0.3 M mannose ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A 280 และความมั่งไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในแต่ละหลอด

### 3.4 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แยกได้ตามวิธีที่ 2

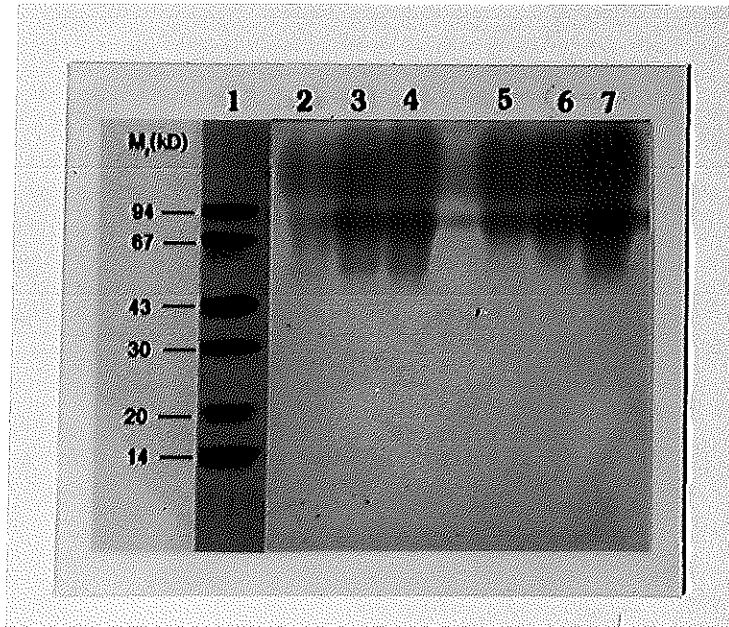
โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

เมื่อนำเปอร์ออกซิเดสตั้งแต่สารสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้นจนผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีชนิดต่างๆตามขั้นตอนในข้อ 2.10.2 แถวที่ 1 และ 11 เป็นโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW, แถวที่ 2 สารสกัดใบยางพาราจะมีแถบโปรตีนที่ชัดเจนหลายแถบและแถบจางๆเล็กๆซึ่งมีและมึ่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ในแถวที่ 3 เป็นโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต มีแถบโปรตีนลักษณะคล้ายกับแถวที่ 2 มีการกำจัดโปรตีนออกมาบางส่วนเท่านั้น ส่วนแถวที่ 4 เป็นเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel โปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำถูกกำจัดไป มีความว่องไวจำเพาะสูงขึ้นถึง 69.4 เท่า แต่เมื่อทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแล้วยังปรากฏว่ามีแถบโปรตีนใกล้เคียงกับขั้นตอนในแถวที่ 2 อาจเป็นเพราะโปรตีนที่ถูกกำจัดไปเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมากหรืออาจจะเป็นพวกสี แถวที่ 5, 6, 7, 8 เป็นเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ก็ยังมีโปรตีนอื่นๆปนอยู่เพียงส่วนน้อย ส่วนในแถวที่ 9, 10 เป็นเปอร์ออกซิเดสในขั้นตอนของคอลัมน์ Con A-Sepharose นั้นสามารถกำจัดโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 67,000 ดาลตันได้และปรากฏโปรตีนที่เป็นแถบเปอร์ออกซิเดสได้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 17 เมื่อนำแผ่นเจลส่วนที่ย้อมความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสเทียบกับส่วนที่ย้อมโปรตีนซึ่งมีโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลพบแถบเปอร์ออกซิเดส 2 แถบ มีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.20 และ 0.27 ตามลำดับ ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการย้อมความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสนั้น พบว่าเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากขั้นตอนต่างๆมีรูปแบบที่ปรากฏในโนโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS เหมือนกัน แต่แถบมีลักษณะแผ่กระจาย (ในบางครั้งสามารถสังเกตได้ว่าลักษณะที่แผ่กระจายนั้นมีแถบความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสประมาณ 3 แถบ ซึ่งมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ประมาณ 0.18, 0.20 และ 0.27)



รูปที่ 17 แบบแผนการย้ายโปรตีนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ ตามวิธีที่ 2 ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS

- |              |                                                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| แถวที่ 1, 11 | สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW                                                                               |
| แถวที่ 2     | สารสกัดเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา มีโปรตีน 80 $\mu$ g                                                        |
| แถวที่ 3     | สารสกัดเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40-80 % มีโปรตีน 80 $\mu$ g |
| แถวที่ 4     | สารละลายเปอร์ออกซิเดสฟิค ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel มีโปรตีน 50 $\mu$ g                                 |
| แถวที่ 5, 6, | สารละลายเปอร์ออกซิเดสฟิค ที่ได้จากคอลัมน์                                                                   |
| 7, 8         | Sephadex G-75 มีโปรตีน 20 $\mu$ g                                                                           |
| แถวที่ 9, 10 | สารละลายเปอร์ออกซิเดสฟิค ที่ได้จากคอลัมน์                                                                   |
|              | Con A-Sepharose มีโปรตีน 20 $\mu$ g                                                                         |



รูปที่ 18 แบบแผนการย้ายความว่องไวของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์  
ในขั้นตอนต่างๆ ตามวิธีที่ 2 ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอริซิสแบบมี SDS

- |             |                                                                                                                       |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| แถวที่ 1    | สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW                                                                                         |
| แถวที่ 2    | สารละลายเปอร้ออกซิเดสพืค ที่ได้จากคอลัมน์<br>Con A-Sepharose มีโปรตีน 10 $\mu\text{g}$                                |
| แถวที่ 3    | สารละลายเปอร้ออกซิเดส ที่ได้จากคอลัมน์<br>Sephadex G-75 มีโปรตีน 30 $\mu\text{g}$                                     |
| แถวที่ 4    | สารละลายเปอร้ออกซิเดสพืค ที่ได้จากคอลัมน์<br>DEAE-Sepacel มีโปรตีน 30 $\mu\text{g}$                                   |
| แถวที่ 5    | สารสกัดเปอร้ออกซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วย<br>แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40-80 % มีโปรตีน 30 $\mu\text{g}$ |
| แถวที่ 6, 7 | สารสกัดเปอร้ออกซิเดสจากไบบางพารา มีโปรตีน 40, 30 $\mu\text{g}$                                                        |

### 3.5 ผลการย้อมไกลโคโปรตีน

เมื่อนำเปอร็อกซิเดสในชั้นตอนคอลัมน์ Con A-Sepharose มาย้อมไกลโคโปรตีนด้วยสารละลายฟูกซิน-ซัลไฟด์ และสารละลายอัลเซียน บลู พบว่าทั้งสองวิธี ปรากฏแถบไกลโคโปรตีนเพียง 2 แถบ อยู่บริเวณส่วนบนของแผ่นเจล ดังรูปที่ 19 ซึ่งมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากับ 0.18 และ 0.20 เมื่อเปรียบเทียบกับ การย้อมโปรตีนและความว่องไวของเปอร็อกซิเดสแล้ว พบว่ามีแถบเปอร็อกซิเดสที่บริเวณเดียวกัน ดังนั้นเปอร็อกซิเดสในใบยางพาราเป็นไกลโคโปรตีน

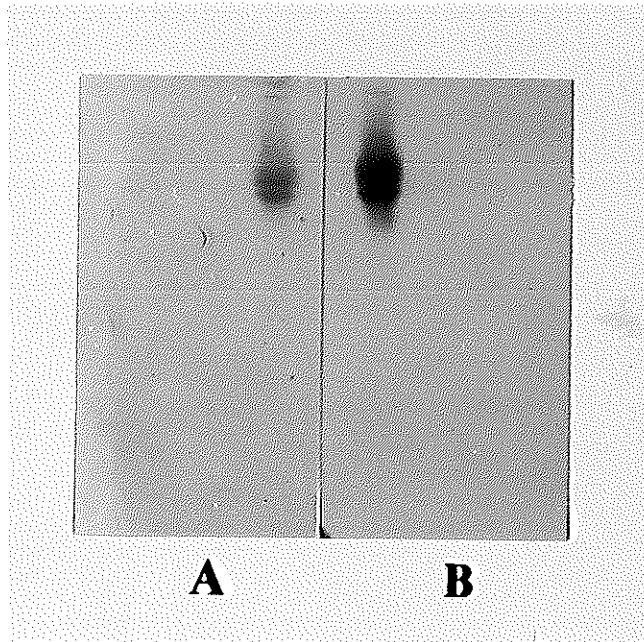
### 3.6 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เปอร็อกซิเดส

#### 3.6.1 น้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราโดย SDS-PAGE

การทำน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร็อกซิเดสที่แยกได้จากคอลัมน์ Con A-Sepharose ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS ตามวิธีการในข้อ 2.11.1 นำแผ่นที่ย้อมทั้งความว่องไวของเปอร็อกซิเดสและแผ่นที่ย้อมโปรตีนมาเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์กับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว 6 ตัว ดังรูปที่ 20 พบว่าเจลส่วนที่ย้อมโปรตีนและที่ย้อมความว่องไวของเปอร็อกซิเดส พบเพียง 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 และ 120,000 ดาลตัน ในบางครั้งจะปรากฏแถบของความว่องไวของเปอร็อกซิเดส ถึง 3 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลย่อยเท่ากับ 85,000 ดาลตัน และแถบขนาดเล็กๆ 2 แถบอยู่ถัดขึ้นไป มีขนาดประมาณ 120,000 และ 125,000 ดาลตัน ตามลำดับ ดังรูปที่ 21

#### 3.6.2 น้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราโดย ND-PAGE

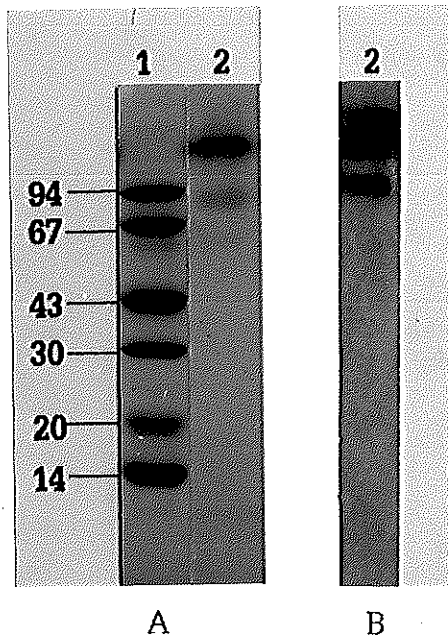
น้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร็อกซิเดสทำได้โดยการทำให้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสในสภาพธรรมชาติ จากตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sepharose นั้น เนื่องจากมีโปรตีนมาตรฐานชนิด HMW เปรียบเทียบอยู่แล้ว ตามวิธีการในข้อ 2.11.2 พบว่าทั้งส่วนที่ย้อมโปรตีนและความว่องไวของเปอร็อกซิเดสนั้นติดแถบ 3 แถบชัดเจน ดังรูปที่ 22 แถบเปอร็อกซิเดสที่เคลื่อนที่ได้มากที่สุดมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ประมาณ 0.53 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 85,000 ดาลตัน ส่วนแถบที่อยู่ถัดขึ้นมาจะมีลักษณะแผ่กระจายเข้มพบแถบประมาณ 2 แถบมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.4 มีน้ำหนักโมเลกุล 125,000 ดาลตัน และแถบที่เคลื่อนที่ได้น้อยที่สุดมีค่า 0.38 มีน้ำหนักโมเลกุล 140,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 23



รูปที่ 19 การย้อมไกลโคโปรตีนของสารละลายเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากชั้นตอน  
ของคอลัมน์ Con A-Sepharose (มีปริมาณโปรตีน 20  $\mu$ g)

ภาพ A ย้อมไกลโคโปรตีนด้วยสี อัลเซียน บลู

ภาพ B ย้อมไกลโคโปรตีนด้วยสี ฟูกซิน-ซัลไฟด์

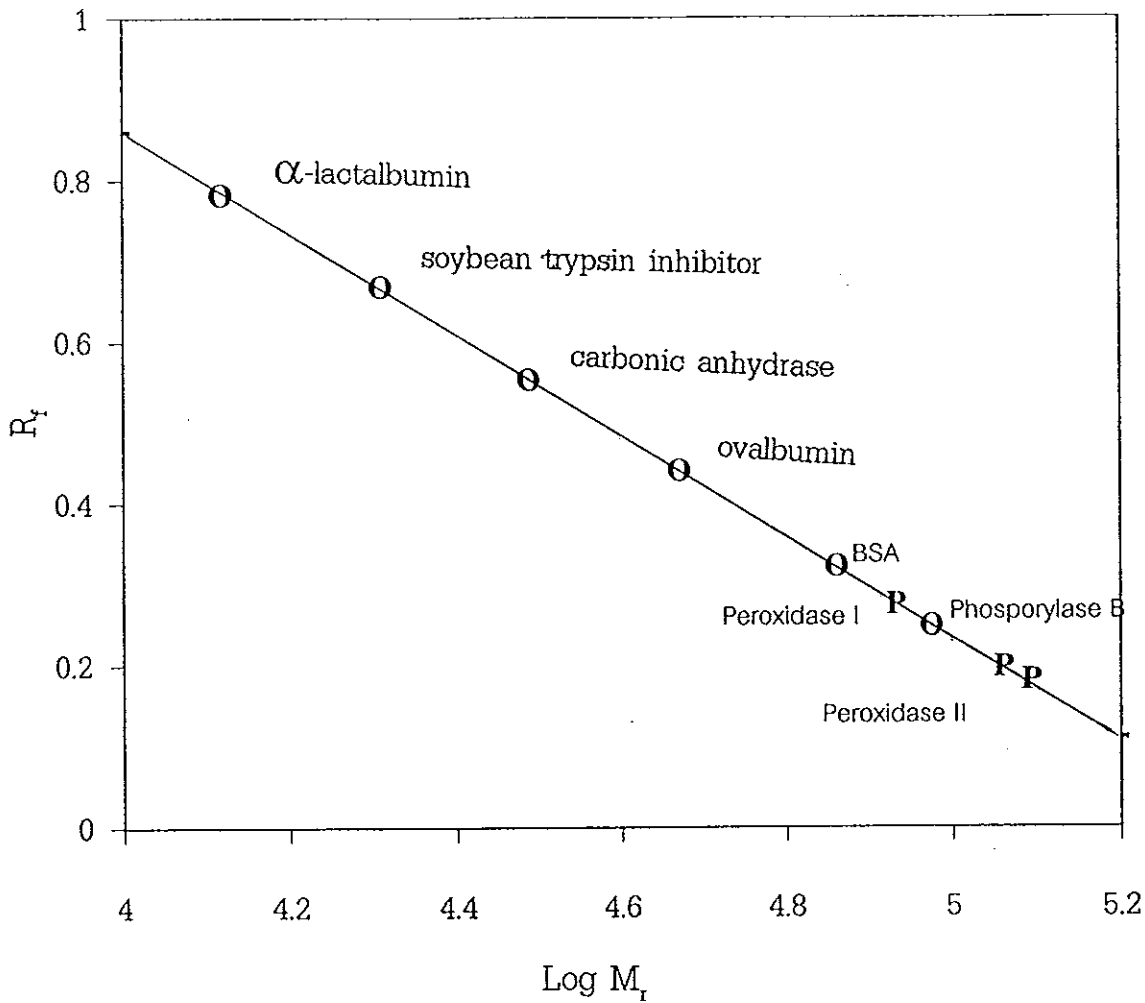


รูปที่ 20 แบบแผนการหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จากคอลัมน์ Con A-Sepharose ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS

ภาพ A ย้อมโปรตีน ภาพ B ย้อมความม่วงไวเอนไซม์

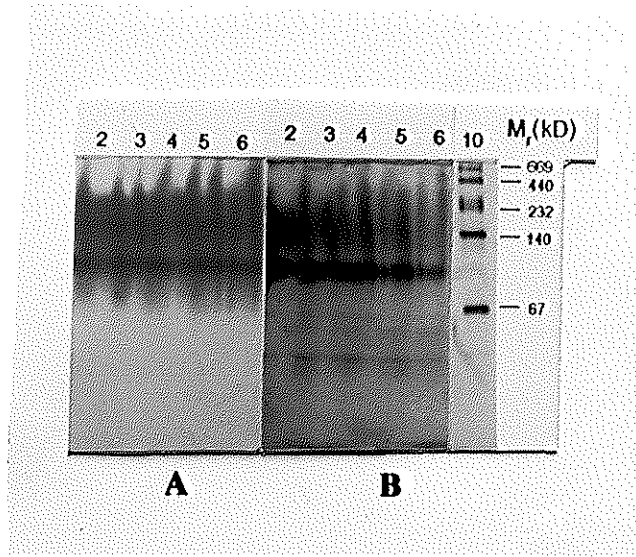
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐานชนิด LMW

แถวที่ 2 สารละลายเปอร้ออกซิเดสจากคอลัมน์ Con A-Sepharose  
มีปริมาณโปรตีน 20  $\mu\text{g}$



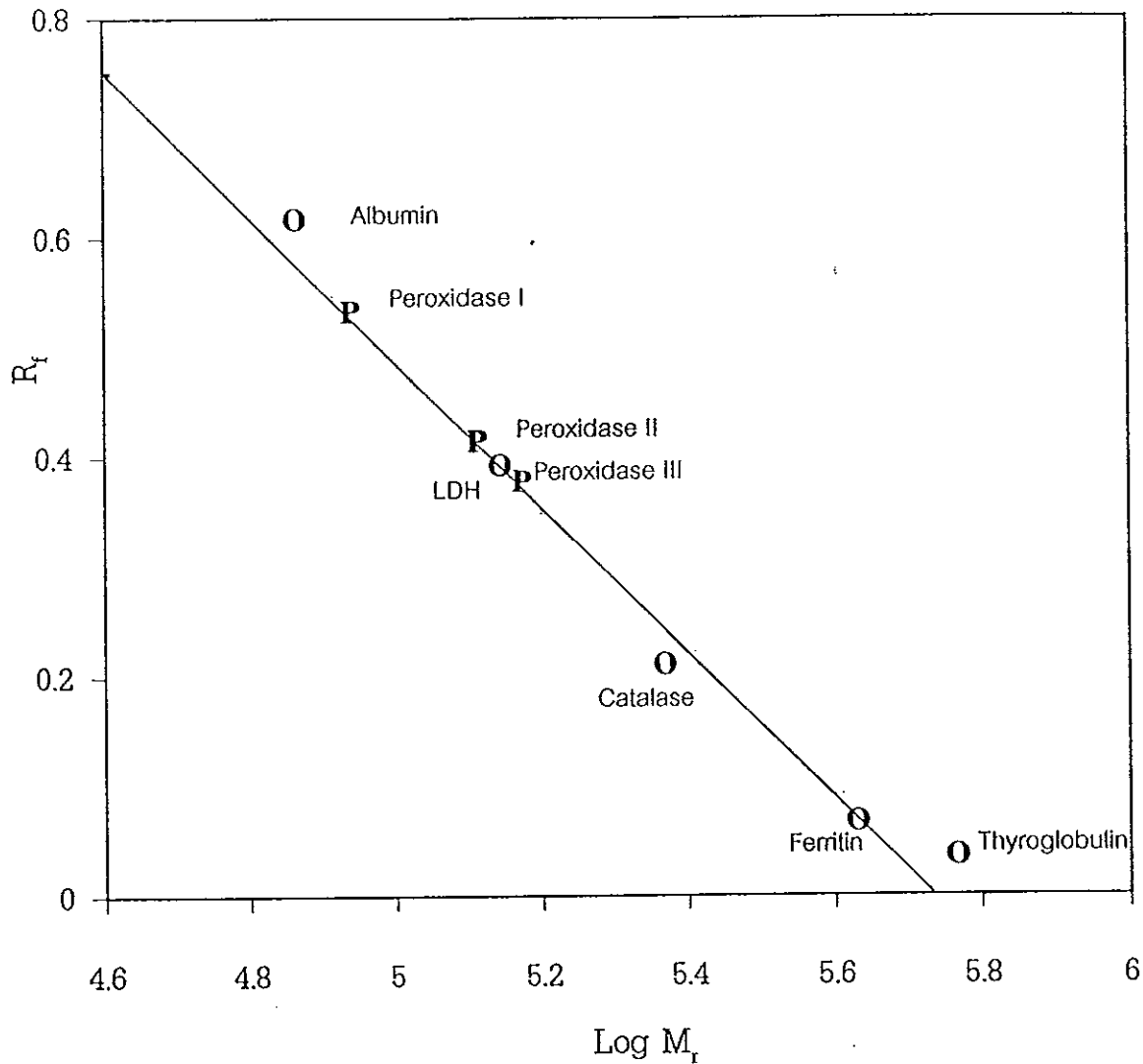
รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลของเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS โดย plot ระหว่าง  $\text{Log } M_r$  ของโปรตีนมาตรฐานและ  $R_f$  ซึ่งเป็นค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด





รูปที่ 22 แบบแผนการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ ND-PAGE  
 ภาพ A ย้อมความม่วงไวเปอร้ออกซิเดส  
 ภาพ B ย้อมโปรตีน

แถวที่ 2, 3, 4, 5, 6 สารละลายเปอร้ออกซิเดสจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel  
 มีปริมาณโปรตีนแต่ละช่อง 40-50  $\mu\text{g}$   
 แถวที่ 10 โปรตีนมาตรฐานชนิด HMW



รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ND-PAGE ทั้งการย้ายโปรตีนและความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส โดยการ plot ระหว่าง  $\text{Log } M_r$  และ  $R_f$  ซึ่งเป็นค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด

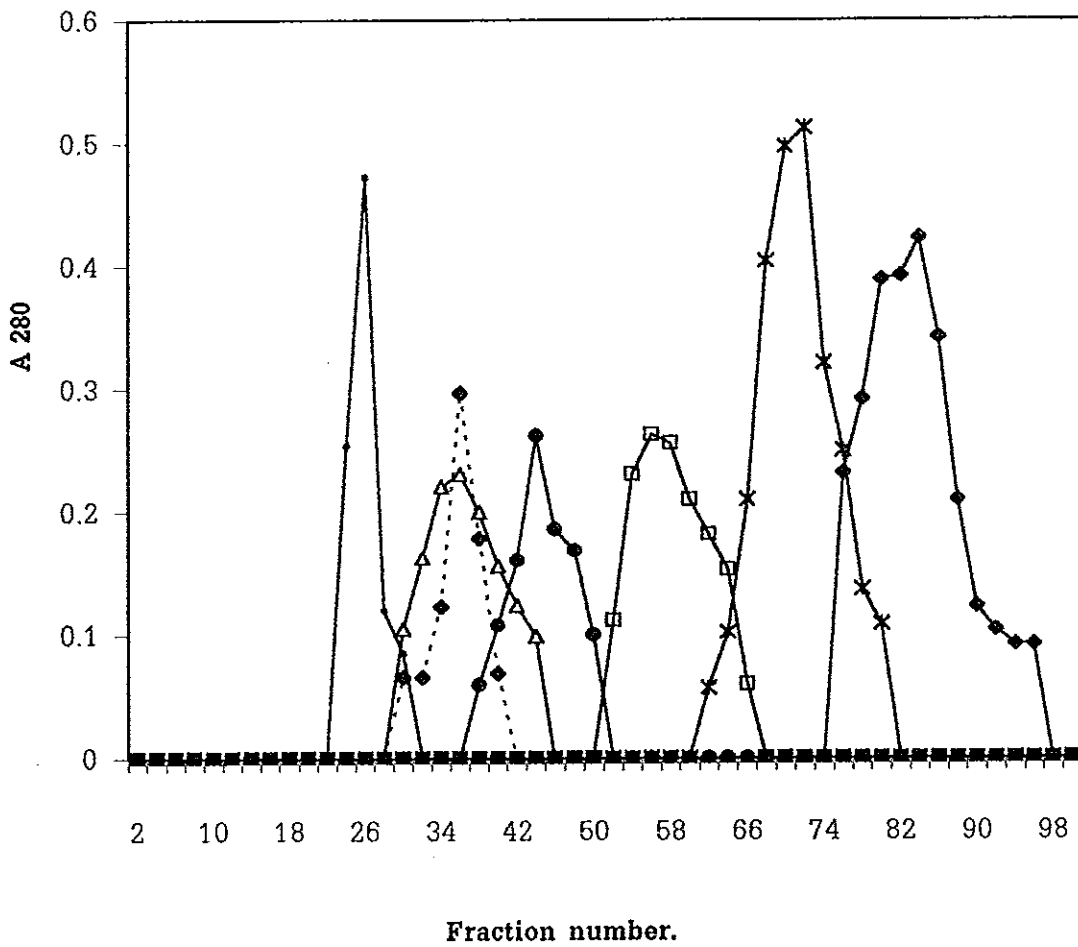
### 3.6.3 น้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสจากไบบางพาราโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสที่ได้จากชั้นตอนคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยวิธีเจลฟิลเตรชันทำได้โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-150 ตามวิธีการในข้อ 2.11.3 พบว่าโปรตีนและความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสถูกชะออกมาในพีคใหญ่พีคเดียว และพีคเล็กๆถูกชะออกมาก่อนอีก 1 พีค ดังรูปที่ 24 เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า  $\log$  น้ำหนักโมเลกุล กับค่า  $K_{av}$  ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของเปอร้ออกซิเดสได้ ซึ่งมีขนาด 204,000 และ 215,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 25

## 3.7 ผลการศึกษาสมบัติของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส

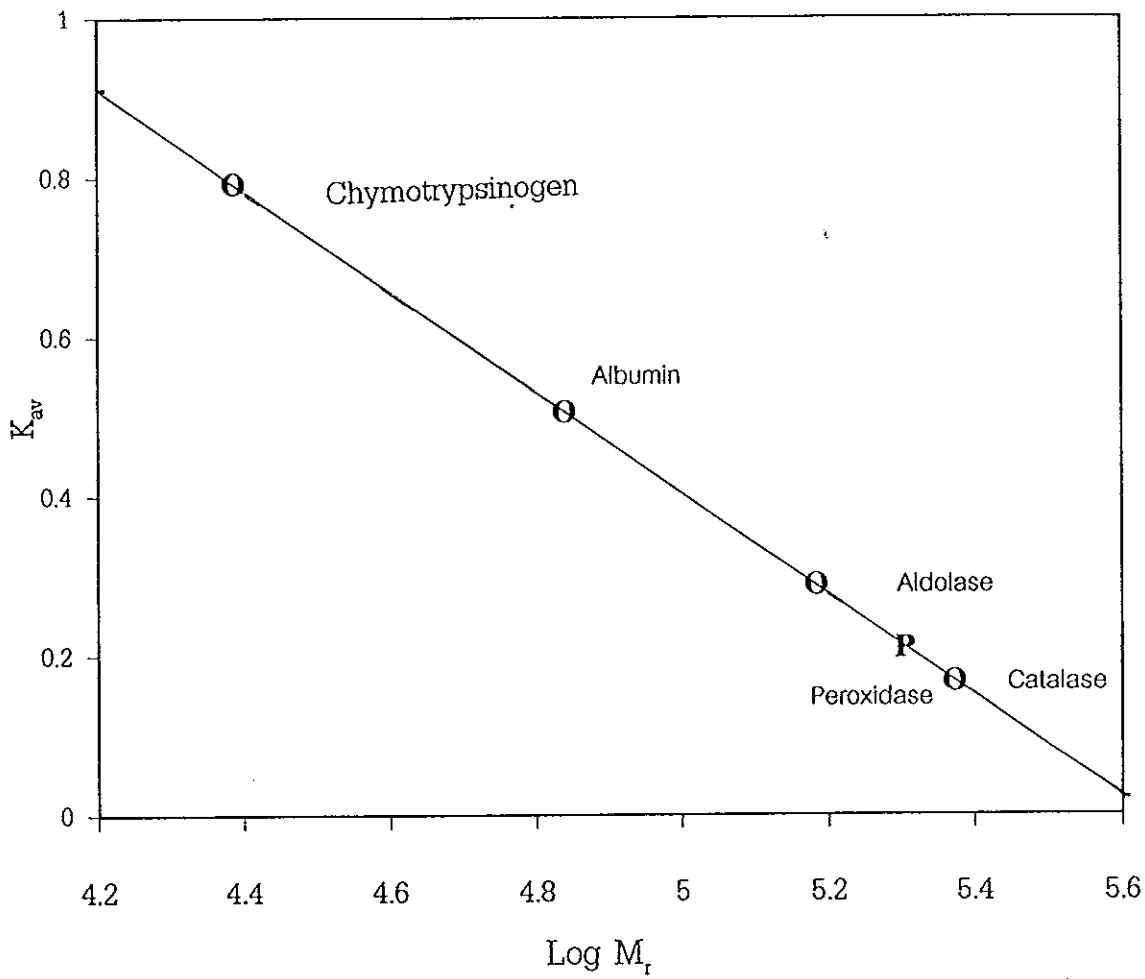
### 3.7.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเปอร้ออกซิเดส

เมื่อนำเปอร้ออกซิเดสที่ได้จากไบบางพารา หลังจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ Sephadex G-75 (partially purified enzyme, PPE) มาอุ่นที่อุณหภูมิ 40 และ 50°C เป็นเวลา 24 ชม. พบว่าไม่มีผลต่อความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส กล่าวคือ เหมือนกับการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ที่อุณหภูมิ 60°C นั้น พบว่าการอุ่น 1 ชม. จะมีส่วนทำให้ความว่องไวเพิ่มขึ้นจาก 2,960 เป็น 3,517 หน่วย/มล. คิดเป็น 19 % ของความว่องไวที่เพิ่มขึ้นในตอนเริ่มต้น แต่เมื่ออุ่นเปอร้ออกซิเดสต่อไปอีก 2 ชม. ความว่องไวลดลงเหลือประมาณ 1,670 หน่วย/มล. หรือคิดเป็น 56 % ของความว่องไวเริ่มต้น และสูญเสียความว่องไวทั้งหมด หากอุ่นที่ 60°C 24 ชม. แต่ในส่วนของการอุ่นที่อุณหภูมิสูงขึ้นคือที่ 70°C และ 80°C นั้น ความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสเริ่มลดลงตั้งแต่ 30 นาทีแรกของการอุ่น และลดลงเรื่อยๆโดยการอุ่นที่ 70°C เป็นเวลา 12 ชม. ความว่องไวลดลงจาก 2,960 เหลือ 592 หน่วย/มล. หรือเหลือเพียง 20 % และความว่องไวลดลงเป็นศูนย์เมื่ออุ่นครบ 24 ชม. ส่วนการอุ่นที่ 80°C ความว่องไวลดลงเป็นศูนย์ตั้งแต่ 1 ชม. ครึ่งของการทดสอบ ดังรูปที่ 26 แสดงว่าเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากไบบางพาราสามารถทนต่ออุณหภูมิในช่วง 30 - 50°C ได้นานถึง 24 ชม. ส่วนที่ 60°C ที่เวลาอุ่นนาน 1 ชม. มีผลในการกระตุ้นความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส แต่ความว่องไวจะค่อยๆลดลงหากอุ่นเป็นเวลานานกว่า 2 ชม.

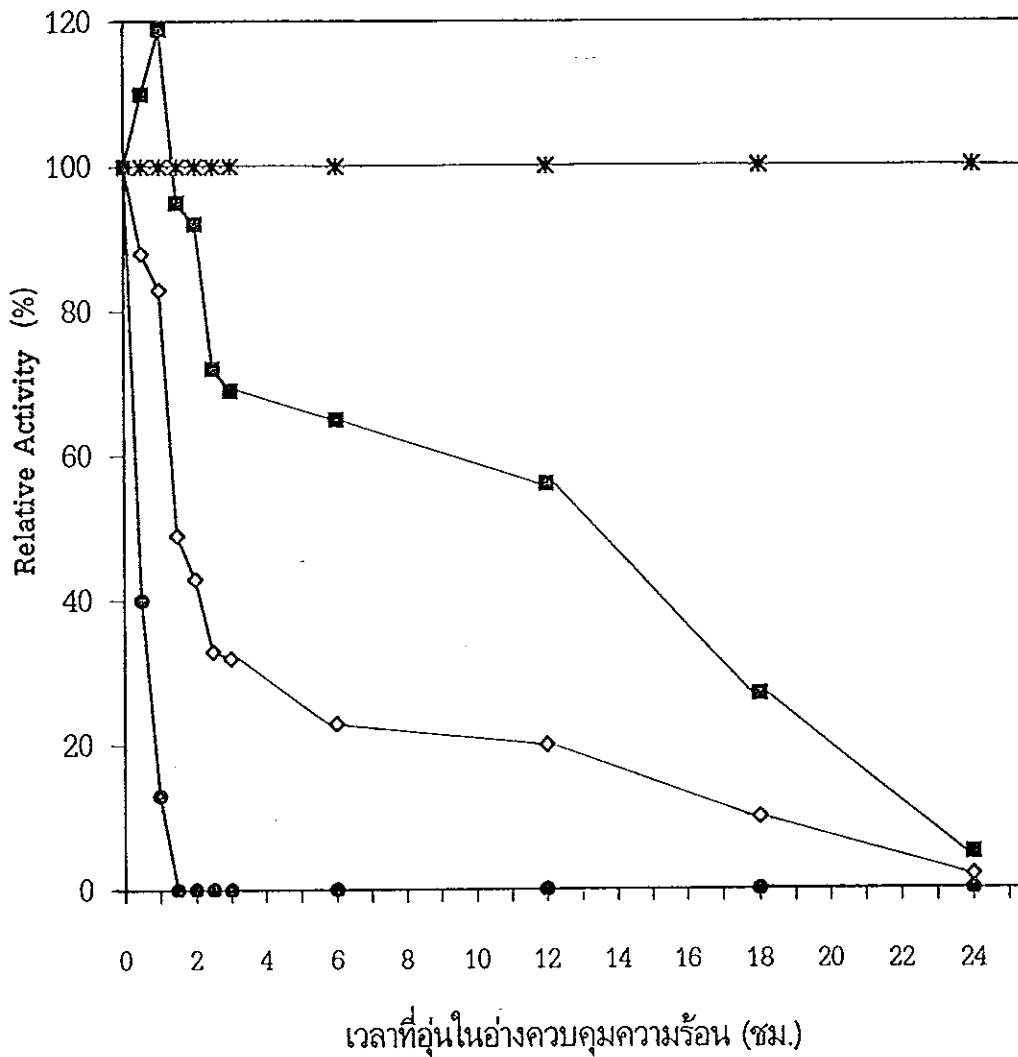


รูปที่ 24 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร็อกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยคอลัมน์ Sephadex G-150

- |                  |                        |
|------------------|------------------------|
| —●— Blue dextran | —◻— BSA                |
| —▲— Catalase     | —*— Chymotrypsinogen A |
| —◆— Peroxidase   | —◆— $K_2Cr_2O_7$       |
| —●— Aldolase     |                        |



รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร็อกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 โดย plot ระหว่าง  $\text{Log } M_r$  ของโปรตีนมาตรฐานและ  $K_{av}$  ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด



รูปที่ 26 ผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. โดยเจือจางให้มีความว่องไว 2,960 หน่วย/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร อยู่ในสารละลาย 50 mM sodium-acetate, pH 5.4 มาทดสอบความทนต่ออุณหภูมิในช่วง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80°C เป็นเวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 0-24 ชม.

—*— 30 °C	—■— 60 °C
—*— 40 °C	—◇— 70 °C
—*— 50 °C	—●— 80 °C

### 3.7.2 ผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส

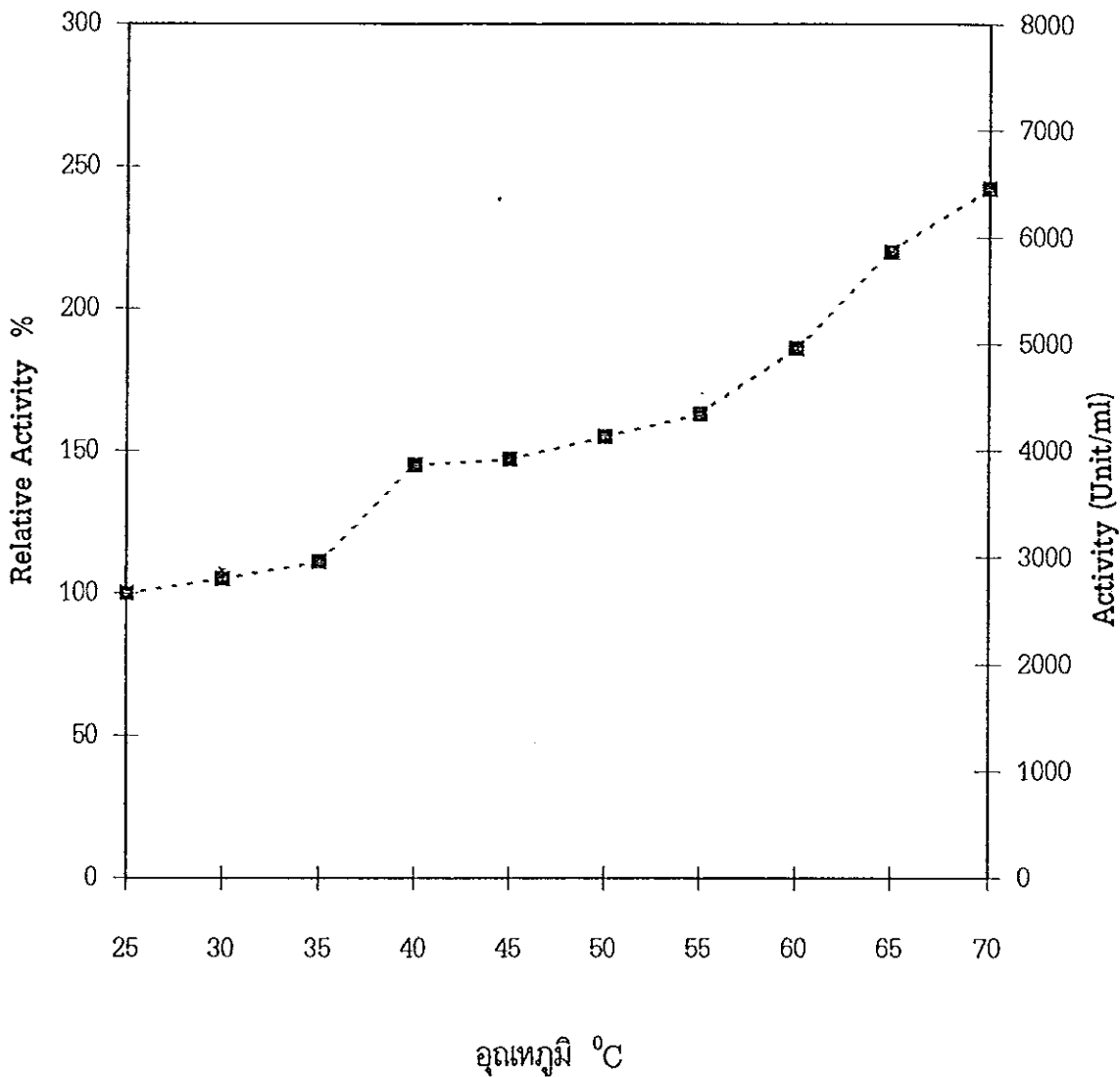
เมื่อนำเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) มาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยา พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C ความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 2,959 และ 3,139 หน่วย/มล.ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกความว่องไวก็จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ แสดงว่าเปอร้ออกซิเดสจากไบยางพาราสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง เป็นที่น่าสังเกตว่าที่อุณหภูมิสูงขึ้น แต่เปอร้ออกซิเดสไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ อาจเป็นเพราะช่วงเวลาที่เปอร้ออกซิเดสอยู่ในเครื่อง spectrophotometry ที่อุณหภูมิสูงนั้นสั้นเพียง 1-2 นาที ก่อนการติดตามปฏิกิริยาที่อุณหภูมิตามที่กำหนด เปอร้ออกซิเดสจึงยังไม่สูญเสียสภาพทางธรรมชาติ แม้ว่าจะศึกษาที่อุณหภูมิสูงถึง 60, 65, และ 70°C ความว่องไวยังไม่ลดลงแต่จะเพิ่มขึ้นอีกจาก 2,829 เป็น 5,251, 6,232 และ 6,832 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 25°C ดังรูปที่ 27

### 3.7.3 ผลของ pH ต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส ที่อุณหภูมิ 30 และ 60°C

เมื่อนำเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 มาศึกษาผลของ pH ที่อุณหภูมิ 30 และ 60°C พบว่าเปอร้ออกซิเดสจากไบยางพารามีความว่องไวสูงที่สุดที่ pH 5.5 ใน 50 mM sodium-acetate ของทั้งสองอุณหภูมิ และที่ pH 5.5 เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจาก 30 เป็น 60°C ความว่องไวจะเพิ่มจาก 2,900 เป็น 4,178 หน่วย/มล. หรือคิดเป็น 144 % นอกจากนี้ยังพบว่า ทุกๆ ค่า pH ของบัฟเฟอร์เปอร้ออกซิเดสจะทำงานได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 60°C ดังรูปที่ 28 ซึ่งสอดคล้องกับผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสในข้อ 3.7.2

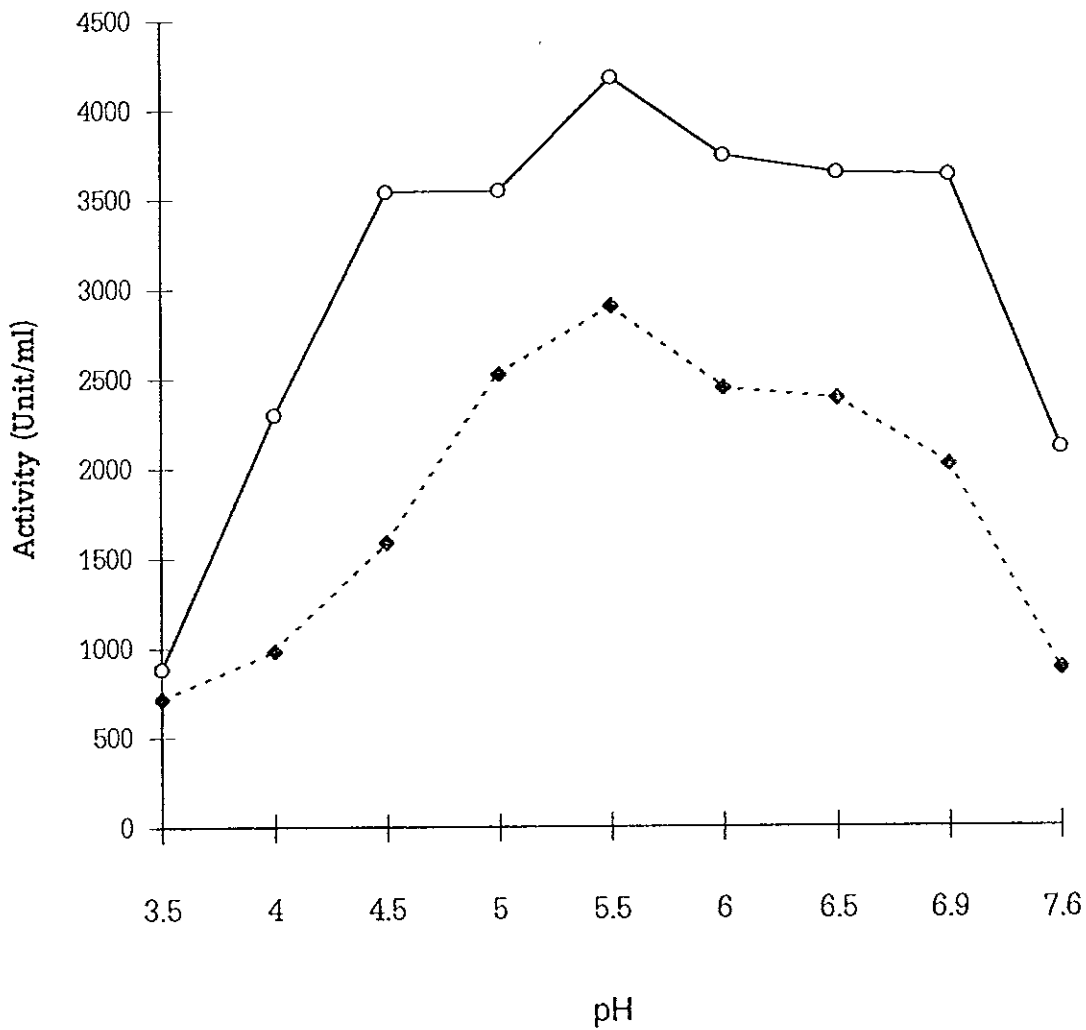
### 3.7.4 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากไบยางพารา

จากการนำเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 มาทดสอบหาค่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine และ  $H_2O_2$  พบว่าค่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine มีค่าเท่ากับ 0.22 mM เมื่อใช้ค่าความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  คงที่ที่  $8.33 \times 10^{-4}$  M ดังรูปที่ 29 ส่วนค่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  เมื่อความเข้มข้นของ *o*-dianisidine คงที่ที่  $8.33 \times 10^{-5}$  M เท่ากับ 2.56 mM ดังรูปที่ 30 เปอร้ออกซิเดสจากไบยางพารามีค่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  สูงกว่า *o*-dianisidine 11.6 เท่า แสดงว่า เปอร้ออกซิเดสจากไบยางพารามีความจำเพาะต่อ *o*-dianisidine มากกว่า เพราะมีค่า  $K_m$  เพียง 0.22 mM



รูปที่ 27 ผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ดอกทีเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์  
 ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล.  
 โดยเจือจางให้มีความว่องไว 2,829 หน่วย/มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทดสอบ  
 ความว่องไวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆในช่วง 25 - 70°C

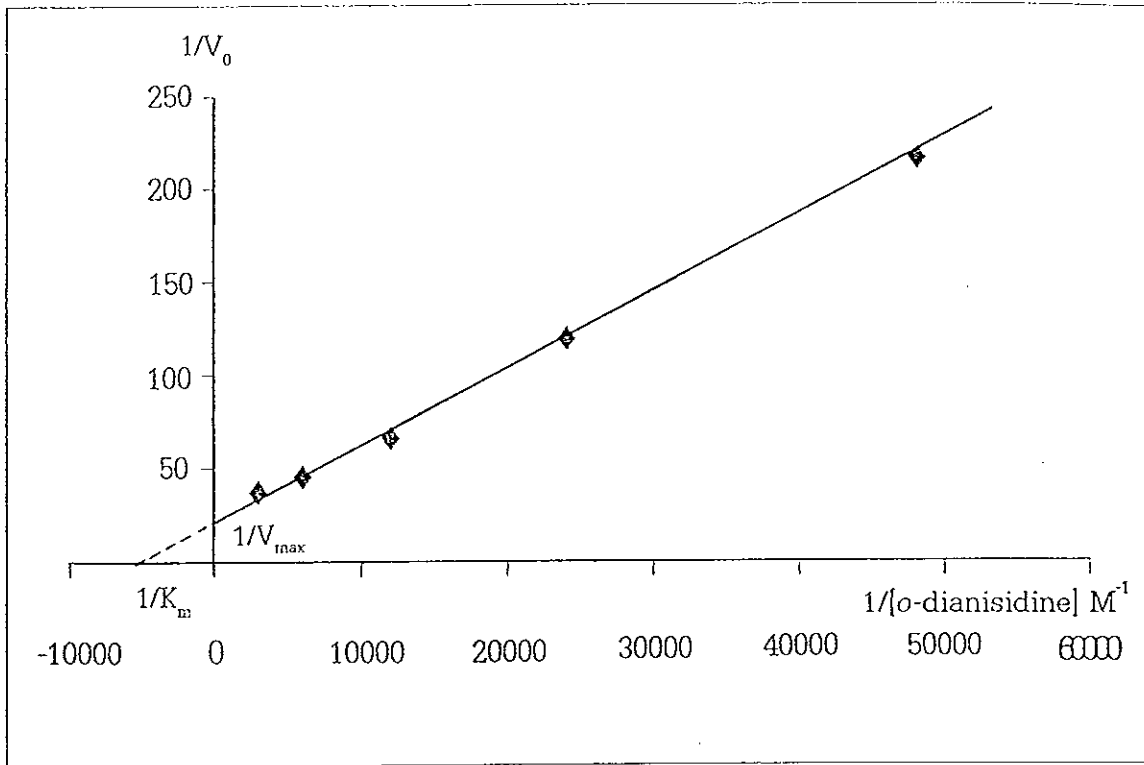




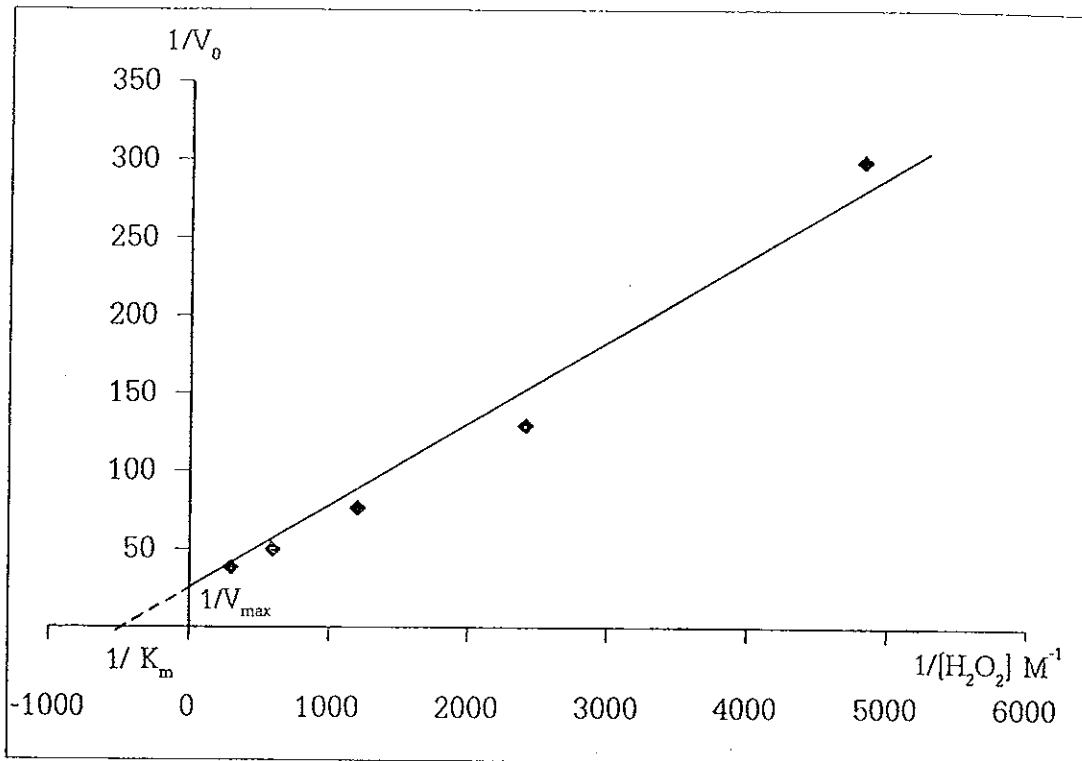
รูปที่ 28 ผลของ pH ต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 30 และ 60°C มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาทดสอบความว่องไวของเอนไซม์ใน 50 mM sodium-acetate ที่ pH ต่างๆกัน ในช่วง 3.5 - 7.6

--◆-- Activity 30°C

—○— Activity 60°C



รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $1/V_0$  และ  $1/[o\text{-dianisidine}]$  กับผลความเข้มข้นของ  $o\text{-dianisidine}$  ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากใบยางพารา โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ  $o\text{-dianisidine}$  ในช่วง  $2.08 \times 10^{-5} - 3.33 \times 10^{-4} \text{ M}$  และให้ความเข้มข้นของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  คงที่ที่  $8.33 \times 10^{-4} \text{ M}$  ในการทดลองใช้เปอร์ออกซิเดส ที่มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล.  
 $o\text{-dianisidine}$  มีค่า  $K_m = 0.22 \text{ mM}$



รูปที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $1/V_0$  และ  $1/[H_2O_2]$  กับผลความเข้มข้นของ  $[H_2O_2]$  ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากไบบางพารา โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  ในช่วง  $2.08 \times 10^{-4} - 3.33 \times 10^{-3} \text{ M}$  และให้ความเข้มข้นของ *o*-dianisidine คงที่ที่  $8.33 \times 10^{-6} \text{ M}$  ในการทดลอง ใช้เปอร์ออกซิเดส ที่มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล.

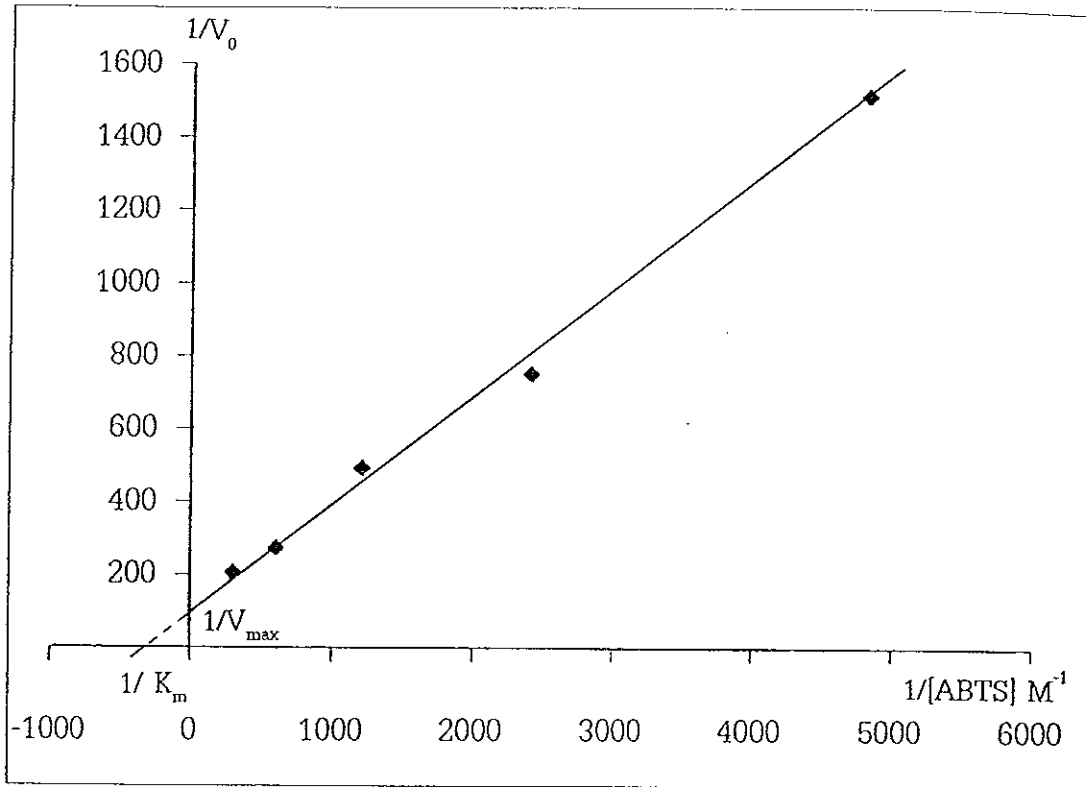
$H_2O_2$  มีค่า  $K_m = 2.56 \text{ mM}$

### 3.7.5 ผลการเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราโดยใช้สารตั้งต้นเป็น *o*-dianisidine, ABTS , pyrogallol และ ascorbate

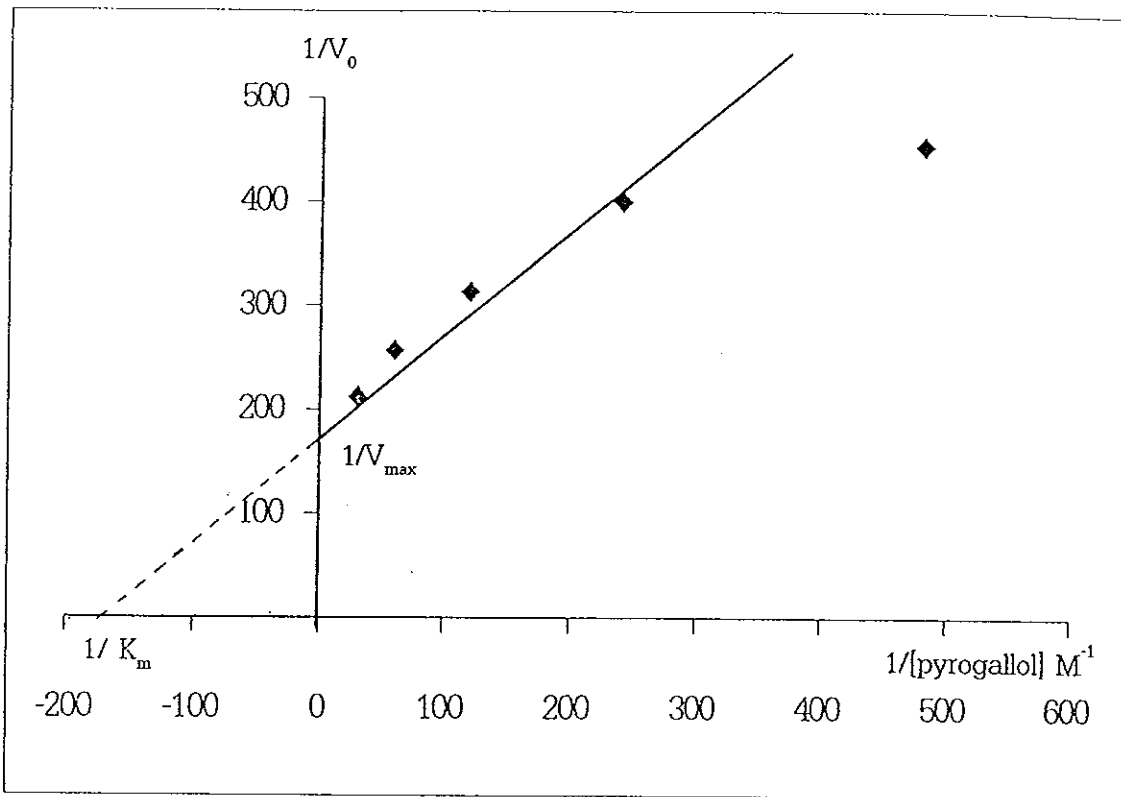
จากการทดลองนำเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. มา 10 ไมโครลิตร มาหาความว่องไวเปอร์ออกซิเดสโดยใช้สารตั้งต้น *o*-dianisidine, ABTS, pyrogallol และ ascorbate ความเข้มข้นต่างกันตามวิธีการในข้อ 2.12.5 โดยใช้เปอร์ออกซิเดสที่มีความเข้มข้นเท่ากันและใช้ความเข้มข้นของ  $H_2O_2$  ที่ระดับคงที่เท่ากับ  $8.33 \times 10^{-4}$  M เมื่อคำนวณค่า  $K_m$  ของสับสเตรททั้ง 4 ตัวที่ทดสอบ พบว่าสับสเตรทที่มีค่า  $K_m$  น้อยที่สุด คือ *o*-dianisidine น้อยกว่า ABTS และ pyrogallol โดยมีค่าเท่ากับ 0.22, 3.03 และ 6.60 mM ดังแสดงในรูปที่ 29, 31 และ 32 ตามลำดับ ส่วน ascorbate ไม่สามารถหาค่า  $K_m$  ได้เนื่องจากเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราไม่สามารถใช้ ascorbate เป็นสับสเตรทได้ แสดงว่า *o*-dianisidine เป็นสับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับเปอร์ออกซิเดสมากที่สุด

### 3.7.6 ผลการเก็บเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไว้ที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ $-20^{\circ}C$

การเก็บเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ Sephadex G-75 ในรูปสารละลายอยู่ใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ  $-20^{\circ}C$  เป็นเวลา 3 เดือน โดยมีความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสเริ่มต้นก่อนการเก็บเป็น 4,246 หน่วย/มล. พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องนั้นความว่องไวลดลงเหลือ 2,547 หน่วย/มล. หรือคิดเป็น 60 % ภายใน 1 สัปดาห์และลดลงเป็นศูนย์ในสัปดาห์ที่ 5 แต่การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ  $-20^{\circ}C$  นั้น ความว่องไวไม่ลดลงแม้ว่าจะเก็บไว้เป็นเวลานานถึง 8 สัปดาห์ และลดลงเพียงเล็กน้อยในภายหลัง ความว่องไวลดลงเพียง 4% ของการเก็บที่  $4^{\circ}C$  และในเดือนที่ 3 ความว่องไวลดลงเหลือ 3,960 และ 4,016 หน่วย/มล. หรือคิดเป็น 92 และ 94 % ตามลำดับเมื่อเทียบกับความว่องไวในตอนเริ่มต้น ดังรูปที่ 33 แสดงว่าสามารถเก็บเปอร์ออกซิเดสในรูปของสารละลายที่ถูกเจือจางอยู่ในบัฟเฟอร์ pH 7.5 ไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ  $-20^{\circ}C$  ได้นานถึง 3 เดือนโดยความว่องไวลดลงเพียงเล็กน้อยในเดือนที่ 3 แต่ไม่สามารถเก็บสารละลายเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิห้องได้นานเกิน 1 สัปดาห์โดยที่ความว่องไวไม่ลดลง

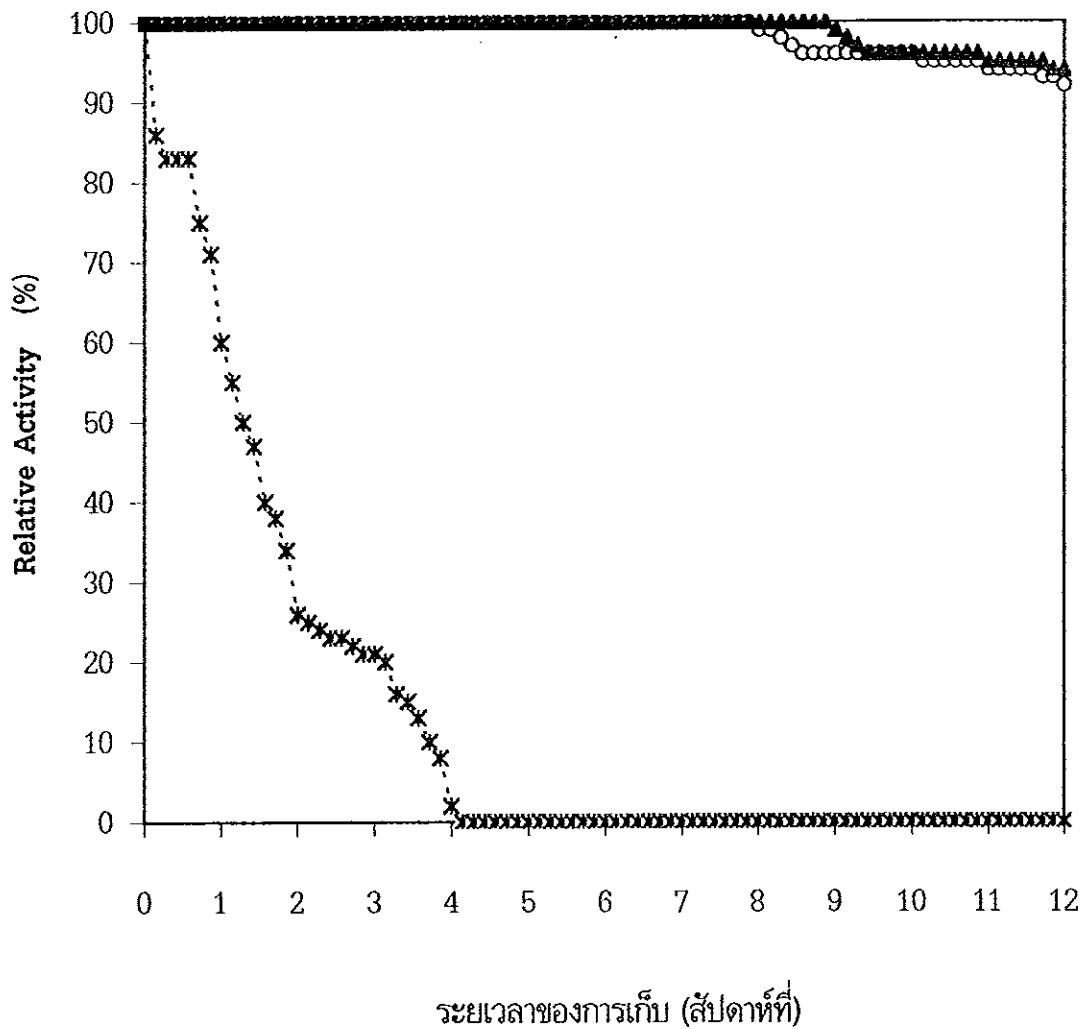


รูปที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $1/V_0$  และ  $1/[ABTS]$  กับผลความเข้มข้นของ [ABTS] ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากไบบางพารา โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ [ABTS] ในช่วง  $2.08 \times 10^{-4}$  -  $3.33 \times 10^{-3}$  M และให้ความเข้มข้นของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  คงที่ที่  $8.33 \times 10^{-4}$  M ในการทดลองใช้เปอร์ออกซิเดสที่มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. [ABTS] มีค่า  $K_m = 3.03 \text{ mM}$



รูปที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $1/V_0$  และ  $1/[\text{pyrogallol}]$  กับผลความเข้มข้นของ  $[\text{pyrogallol}]$  ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากใบยางพารา โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ pyrogallol ในช่วง  $3.33 \times 10^{-3} - 2.08 \times 10^{-2} \text{ M}$  และให้ความเข้มข้นของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  คงที่ที่  $8.33 \times 10^{-4} \text{ M}$  ในการทดลองใช้เปอร์ออกซิเดส ที่มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล.

pyrogallol มีค่า  $K_m = 6.60 \text{ mM}$



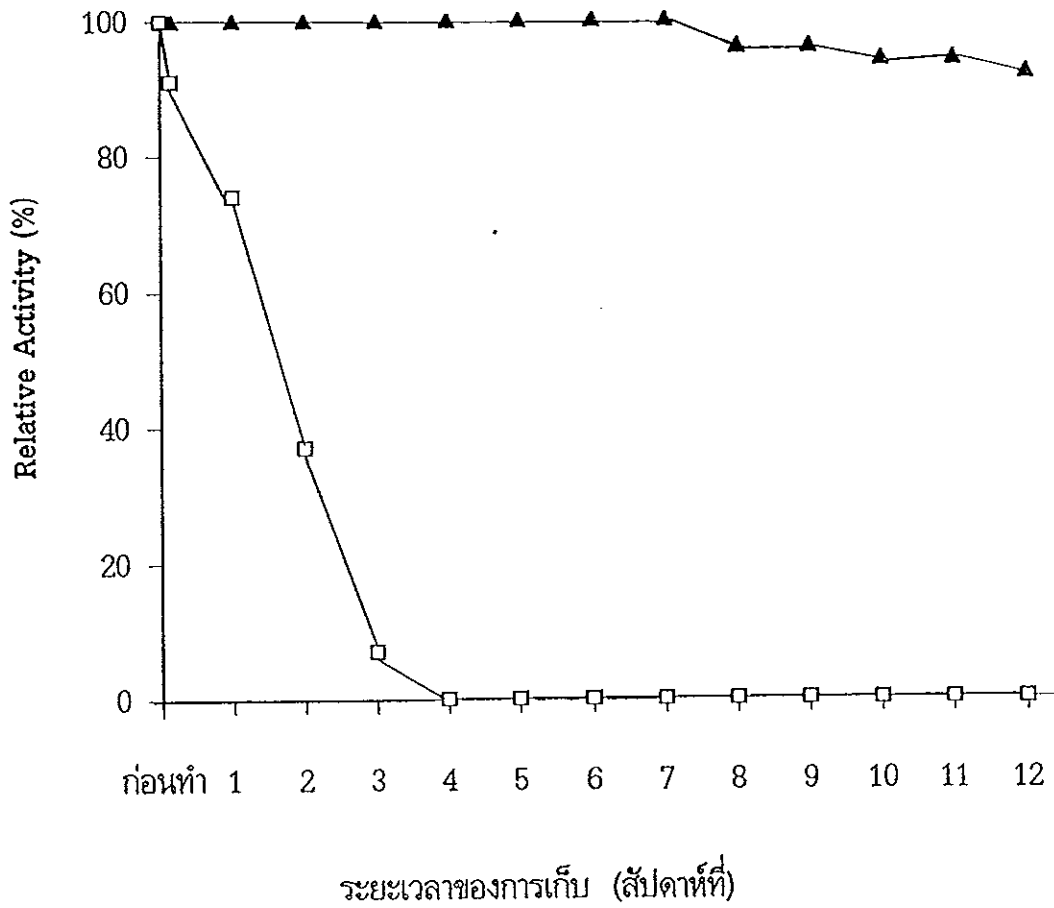
รูปที่ 33 ผลของการเก็บเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ Sephadex G-75 ในรูปของสารละลาย ที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ  $-20^{\circ}\text{C}$  มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. เจือจางให้มีความว่องไว 4,200 หน่วย/มล. ในหลอดทดลองตลอด 10 ไมโครลิตร ทดสอบความทนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเวลา 3 เดือน

- x— อุณหภูมิห้อง
- o— อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$
- ▲— อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3.7.7 ผลการเก็บเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 4°C ในรูปของการไลโอไฟไลซ์ และในรูปของสารละลาย

การเก็บเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ Sephadex G-75 ในรูปของการทำไลโอไฟไลซ์ เปรียบเทียบกับการเก็บในรูปของสารละลายใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 ตามวิธี 2.12.7 โดยมีความว่องไวเริ่มต้นก่อนการเก็บเป็น 4,000 หน่วย/มล พบว่า หลังจากการเก็บเปอร้ออกซิเดสในรูปไลโอไฟไลซ์ไว้ 1 สัปดาห์ ความว่องไวลดลงเหลือ 3,021 หน่วย/มล. หรือคิดเป็น 75 % ของความว่องไวเริ่มต้น และลดลงเป็นศูนย์ในสัปดาห์ที่ 4 แต่เปอร้ออกซิเดสในรูปของสารละลาย ค่าความว่องไวจะลดลงเพียงเล็กน้อย โดยภายหลังเดือนที่ 2 และ 3 โดยมีความว่องไวลดลงเหลือ 96 และ 92 % ตามลำดับ ดังรูปที่ 34 แสดงว่าการเก็บเปอร้ออกซิเดสให้อยู่ในรูปแบบของสารละลายที่อยู่ในบัฟเฟอร์ได้นานกว่าการที่ให้อยู่ในรูปผงแห้ง





รูปที่ 34 เปรียบเทียบผลการเก็บเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้แห้งโดยการไลโอฟีไลซ์ และอยู่ในรูปของสารละลาย เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาต่างๆกัน มีปริมาณโปรตีน 8.4 มก./มล. เจือจางให้มีความว่องไว 4,000 หน่วย/มล. ในหลอดทดลองหลอดละ 10 ไมโครลิตร

---▲--- สารละลาย  
 —□— ไลโอฟีไลซ์

### 3.8 ผลของสารต่างๆที่มีอิทธิพลต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดส

#### 3.8.1 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออนและ EDTA

การศึกษาผลของไดวาเลนท์แคทไอออน ได้แก่  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  และ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-400 mM เมื่อผสมกับเปอร็อกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในชั้นตอน Sephadex G-75 เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้ใส่ไดวาเลนท์แคทไอออน หรือ EDTA พบว่าไดวาเลนท์แคทไอออนทั้งสองมีผลกระตุ้นความว่องไวของเปอร็อกซิเดสในระดับหนึ่ง คือ  $\text{Ca}^{+2}$  ในรูปของ  $\text{CaCl}_2$  ที่ความเข้มข้นสูงที่ 200 mM สามารถกระตุ้นความว่องไวได้สูงที่สุดถึง 120 % แต่หลังจากเพิ่มความเข้มข้นของ  $\text{Ca}^{+2}$  ไปจนถึง 300 และ 400 mM พบว่าความสามารถในการกระตุ้นลดลงเหลือ 65 % และ 40 % ตามลำดับ ส่วน  $\text{Mg}^{+2}$  ที่ความเข้มข้น 50 mM กระตุ้นความว่องไวได้ถึง 50 % ของความว่องไวตอนเริ่มต้นแต่ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 mM การกระตุ้นลดลงเหลือ 15 % และ 10 % ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปจนถึง 300 และ 400 mM กลับมีผลยับยั้งโดยที่ความว่องไวลดลงประมาณ 5 % และ 10 % ตามลำดับ ส่วน EDTA ที่ความเข้มข้น 10 mM มีผลกระตุ้นความว่องไวของเปอร็อกซิเดสเพิ่มขึ้น 18 % และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 mM กระตุ้นความว่องไวเพิ่มขึ้นเป็น 25 % ของความว่องไวของเอนไซม์ในตอนเริ่มต้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 400 mM กลับไม่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดส ดังตารางที่ 8

#### 3.8.2 ผลของไดไธโอทรีทอล (DTT) และ p-CMB

##### 3.8.2.1 ผลของไดไธโอทรีทอล (DTT)

ไดไธโอทรีทอลเป็นสารที่ช่วยให้เอนไซม์ที่มี reactive sulfhydryl groups มีความคงตัว แต่การศึกษาความว่องไวของเปอร็อกซิเดสที่ผ่านการแยกโปรตีนออกในชั้นตอนคอลัมน์ Sephadex G-75 เมื่อมีไดไธโอทรีทอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 - 10 mM พบว่า ไดไธโอทรีทอลที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 mM สามารถยับยั้งความว่องไวของเปอร็อกซิเดสได้ประมาณ 88 % และที่ความเข้มข้นของไดไธโอทรีทอลเป็น 1 mM และ 10 mM สามารถยับยั้งความว่องไวได้ 96 % และ 100 % ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่า ไดไธโอทรีทอล เป็นตัวยับยั้งที่รุนแรงมาก

ตารางที่ 8 สารที่มีอิทธิพลต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราในขั้นตอน  
ของคอลัมน์ Sephadex G-75 (PPE) ความว่องไวทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง  $\pm$  SD

Substance	Concentration (mM)	Activation or inhibition	
		% activity	
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	+ 29	$\pm$ 2.65 %
	10 mM	+ 55	$\pm$ 2.52 %
	50 mM	+ 70	$\pm$ 1.53 %
	100 mM	+ 90	$\pm$ 3.52 %
	200 mM	+ 120	$\pm$ 3.61 %
	300 mM	+ 65	$\pm$ 1.53 %
	400 mM	+ 40	$\pm$ 4.1 %
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	+ 21	$\pm$ 2.6 %
	10 mM	+ 30	$\pm$ 3.1 %
	50 mM	+ 50	$\pm$ 3.1 %
	100 mM	+ 15	$\pm$ 2.3 %
	200 mM	+ 10	$\pm$ 2 %
	300 mM	- 5	$\pm$ 2.5 %
	400 mM	- 10	$\pm$ 2 %
EDTA	1 mM	+ 10	$\pm$ 1.5 %
	10 mM	+ 18	$\pm$ 1.5%
	50 mM	+ 25	$\pm$ 2.52%
	100-400 mM		0

+ Activate

- Inhibit

ตารางที่ 8 (ต่อ) สารที่มีอิทธิพลต่อความม่วงไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา

Substance	Concentration (mM)	Activation or inhibition
		% activity
DTT	0.1 mM	- 88 ± 2 %
	1 mM	- 96 ± 1.5 %
	10 mM	- 100 ± 0 %
p-CMB	0.1 mM	0
	1 mM	- 5 ± 1.15 %
	10 mM	- 65 ± 3.05 %
	50 mM	- 85 ± 3.05 %
	100 mM	- 100 ± 0 %
NaN <sub>3</sub>	0.01 mM	0
	0.1 mM	- 45 ± 2.08 %
	1 mM	- 72 ± 2.5 %
	10 mM	- 81 ± 1.7 %
	50 mM	- 90 ± 2.08 %
	100 mM	- 100 ± 0 %
KCN	0.1 mM	- 90 ± 4.7 %
	1 mM	- 100 ± 0 %
SDS	0.01 mM	+ 30 ± 3.78 %
	0.1 mM	+ 20 ± 3.05 %
	1 mM	0
	10 mM	- 56 ± 1.15 %
	50 mM	- 65 ± 2.08 %
	100 mM	- 84 ± 4.04 %
	150 mM	- 100 ± 0 %

+ Activate

- Inhibit

### 3.8.2.2 ผลของ *p*-CMB

ในการศึกษาผลของ *p*-CMB ที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0 - 100 mM ต่อความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในชั้นตอน Sephadex G-75 พบว่า *p*-CMB ที่ความเข้มข้น 0.1 mM ไม่มีผลในการยับยั้งความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ *p*-CMB เป็น 1 mM, 10 mM, 50 mM จนถึง 100 mM สามารถยับยั้งความว่องไวได้ 5, 65, 85 และ 100 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสในตอนเริ่มต้นก่อนการเติม *p*-CMB ดังตารางที่ 8

### 3.8.3 ผลของ $\text{NaN}_3$ และ KCN

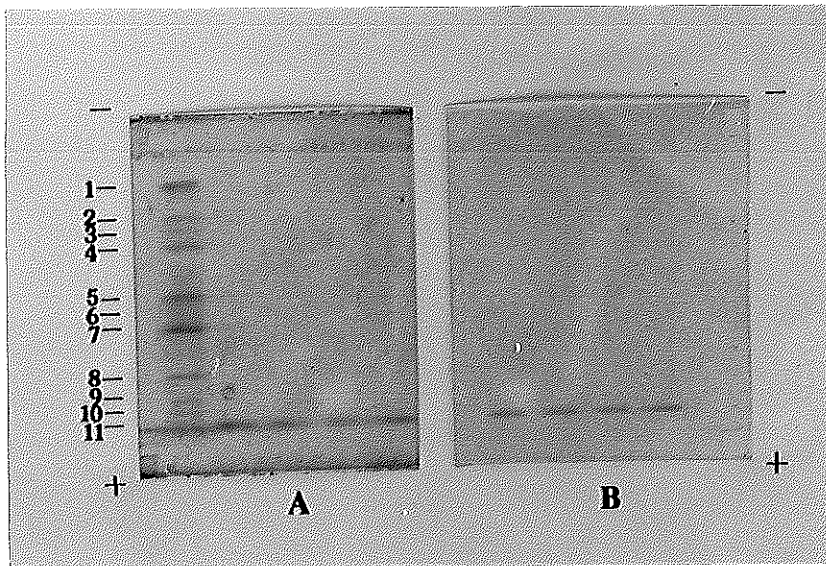
การศึกษาผลของตัวยับยั้ง  $\text{NaN}_3$  (sodium azide) และ KCN (potassium cyanide) ที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0-100 mM ต่อความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในชั้นตอน Sephadex G-75 พบว่าเมื่อมีความเข้มข้นของ  $\text{NaN}_3$  ผสมอยู่ 0.01 mM ไม่มีการยับยั้งความว่องไวแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ  $\text{NaN}_3$  ขึ้นเป็น 0.1, 1, 10, 50 และ 100 mM สามารถยับยั้งความว่องไวได้ถึง 45 %, 72 %, 81 %, 90 และ 100 % ตามลำดับ ส่วนผลของ KCN ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 mM พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถยับยั้งความว่องไวได้ 90% และ ยับยั้งได้ 100 % ที่ความเข้มข้นของ KCN 1 mM จะเห็นได้ว่า KCN สามารถยับยั้งความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสได้รุนแรงกว่า  $\text{NaN}_3$  เพราะใช้เพียง 1 mM ก็สามารถยับยั้งได้ 100 % ดังตารางที่ 8

### 3.8.4 ผลของ SDS

ในการศึกษาผลของ SDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 - 200 mM ต่อความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในชั้นตอน Sephadex G-75 พบว่า SDS ที่ความเข้มข้น 0.01 mM มีผลกระตุ้นความว่องไวถึง 30 % แต่เมื่อเพิ่มไปจนถึง 0.1 mM ความสามารถในการกระตุ้นลดลงเหลือ 10 % ส่วนที่ความเข้มข้นในช่วง 1 mM ไม่มีผลต่อการทำงานของเปอร้ออกซิเดสแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 10 mM SDS จะสามารถยับยั้งความว่องไวได้ 56 % และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS จนถึง 50, 100 และ 150 mM ความว่องไวลดลงถึง 65%, 84 % และ 100 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติม SDS ดังตาราง 8

### 3.9 pI ของแอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

การวิเคราะห์หาค่า pI (isoelectric point) หรือค่า pH ที่โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ของเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากคอลัมน์ Con A-Sepharose โดยการทำให้ isoelectric focusing เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI พบว่าเปอร์ออกซิเดสมีแถบโปรตีนและแถบความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสเพียง 1 แถบ มีค่า pI 3.6 ดังรูปที่ 35



รูปที่ 35 Isoelectric point ของเปอร์ออกซิเดสที่แยกให้บริสุทธิ์ขึ้นในชั้นตอนคอลัมน์ Con A-Sepharose

ภาพ A ย้อมโปรตีน ภาพ B ย้อมความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส

แถบที่ 1	ทริปซินเจน	มีค่า pI	9.3
แถบที่ 2	เลนทิลเลคติน	มีค่า pI	8.8
แถบที่ 3	เลนทิลเลคติน	มีค่า pI	8.6
แถบที่ 4	เลนทิลเลคติน	มีค่า pI	8.2
แถบที่ 5	ไมโอโกลบิน	มีค่า pI	7.2
แถบที่ 6	ไมโอโกลบิน	มีค่า pI	6.8
แถบที่ 7	คาร์บอนิกแอนไฮเดรส	มีค่า pI	6.6
แถบที่ 8	คาร์บอนิกแอนไฮเดรส	มีค่า pI	5.9
แถบที่ 9	บีตา-แลคโทโกลบูลิน	มีค่า pI	5.1
แถบที่ 10	ซอปปินทริปซินอินฮิบิเตอร์	มีค่า pI	4.6
แถบที่ 11	อะไมโลกลูโคซิเลส	มีค่า pI	3.6

## 4. วิจารณ์ผลการทดลอง

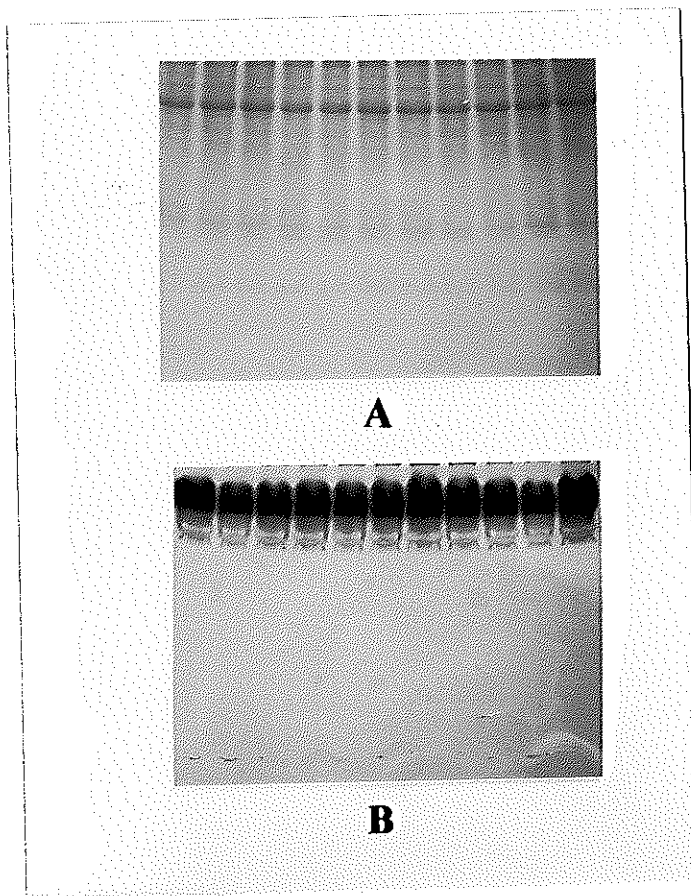
### 4.1 ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในใบยางพารา

การเปรียบเทียบปริมาณเปอร์ออกซิเดสในใบยางพารา, หัวไชเท้า และหัวผักกาดหนูขาว (horseradish) จากน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม เท่ากัน พบว่าหัวไชเท้า มีความว่องไว  $677 \pm 12$  หน่วย มากกว่าหัวผักกาดหนูขาวและใบยางพาราซึ่งมีความว่องไวประมาณ  $557 \pm 11$  หน่วย และ  $215 \pm 15$  หน่วย ตามลำดับ ส่วนปริมาณโปรตีนในใบยางพารามีมากกว่า หัวไชเท้า และหัวผักกาดหนูขาว ประมาณ  $23 \pm 1.6$  มก.,  $1.4 \pm 0.21$  และ  $1.2 \pm 0.29$  ตามลำดับ ทำให้ใบยางพารามีค่าความว่องไวจำเพาะของเปอร์ออกซิเดสต่ำ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเปอร์ออกซิเดสในต้นยางพาราส่วนอื่นๆ เช่น เปลือกยางพารามีปริมาณเปอร์ออกซิเดสอยู่สูงกว่าในส่วน C-serum หลายร้อยเท่าและเป็นไอโซไซม์คนละชนิดกัน (Sattayasevana, 1990) ส่วนใบยางพาราก็มีปริมาณเปอร์ออกซิเดสอยู่สูงกว่าในส่วนของ C-serum ที่ได้จากน้ำยางพารามาก (วัลลี สุวจิตตานนท์ และ คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์, 2535) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างใบยางพารากับเปลือกยางพาราน้ำหนัก 1 กรัม เท่ากัน พบว่า ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในใบยางพาราสูงกว่าเปลือกยางพารา และในบางการทดลองหากนำสารสกัดใบยางพารามาทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ ND-PAGE พบแถบโปรตีนและความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสชัดเจนเพียง 1 แถบ ส่วนโปรตีนอื่นๆมีอยู่ปริมาณน้อยมาก ดังรูปที่ 36 หากเป็นเช่นนี้การนำเอาเปอร์ออกซิเดสไปประยุกต์ใช้ต่อไปน่าจะทำได้ง่าย การที่พบว่าบางครั้งมีโปรตีนอื่นๆปนอยู่น้อยนั้น อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณเปอร์ออกซิเดสในใบยางพารามีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล (Baier *et al.*, 1993) และสภาพแวดล้อม

### 4.2 สมบัติของสารสกัดเปอร์ออกซิเดส

เนื่องจากสารสกัดเปอร์ออกซิเดสในขั้นตอนแรก ( $S_1$ ) ของการทำบริสุทธิ์ที่มีปริมาณมากทำให้ในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต้องใช้เกลือปริมาณมาก จึงจำเป็นต้องทำสารสกัดให้เข้มข้นขึ้นโดยนำไปไลโอไฟไลซ์ มีผลทำให้ความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสลดลง 10 % อาจเนื่องมาจากการไลโอไฟไลซ์ที่อาศัยหลักการระเหิด ซึ่งบริการโดยหน่วยเครื่องมือกลางของคณะวิทยาศาสตร์ไม่ได้ทำติดต่อกันจนสาร

แห้งสนิทอาจทำให้เปอร์ออกซิเดสบางส่วนเสียสภาพไป และการละลายกลับมาของสารสกัดที่แห้งใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ออกมาไม่หมด อาจทำให้สูญเสียความว่องไวเปอร์ออกซิเดสบางส่วนเหล่านี้ไป ในการทดลองอาจนำวิธีการลดปริมาณสารสกัดโดยการไลโอไฟไลซ์มาประยุกต์ใช้ได้ ในกรณีที่เราไม่ทราบปริมาณของสารสกัดมากเพื่อเหมาะในการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 36 แบบแผนการย้อมโปรตีนและความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส  
ในสารสกัดจากไมยางพาราในขั้นตอน S<sub>1</sub>



#### 4.3 การทำให้เอนไซม์เปอร็อกซิเดสบริสุทธิ์

การแยกเปอร็อกซิเดสให้บริสุทธิ์ที่ได้ศึกษา 2 วิธีนั้น ต้องอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี หลายแบบรวมกันได้แก่ แบบแลกเปลี่ยนประจุ ใช้คอลัมน์ CM-Cellulose และคอลัมน์ DEAE-Sephacel, แบบเจลฟิลเตรชัน ใช้ Sephadex G-75 และคอลัมน์แบบจำเพาะใช้ Con A-Sepharose

พบว่าวิธีการที่ 1 ได้เปอร็อกซิเดสในขั้นตอนสุดท้ายน้อยเพียง 13.9 % สาเหตุอาจเกิดจากการสูญเสียความว่องไวจากการไลโอไฟไลซ์ประมาณ 10 % (ตารางที่ 5) และการละลายตะกอนกลับนั้นเหลือเปอร็อกซิเดสเพียง 40.6% นอกจากนี้การไดอะไลซ์เอาเกลือออกยังทำให้ความว่องไวของเปอร็อกซิเดสลดลงเหลือ 33.2 % เนื่องจากหมู่พรอสเตติก บางส่วนอาจหลุดออก ทำให้เปอร็อกซิเดสอยู่ในรูปที่ไม่ว่องไวจึงทำให้ความว่องไวลดลงได้ หรือเป็นเพราะเปอร็อกซิเดสเป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งจับกับเมมเบรนของถุงไดอะไลซิสได้ ทำให้เปอร็อกซิเดสบางส่วนหายไปขั้นตอนนี้ ความว่องไวรวมของเปอร็อกซิเดสจึงลดลง และยังมีความบริสุทธิ์ไม่สูงมากนัก คือมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเพียง 10.7 เท่า (ตารางที่ 6)

เมื่อรวมเปอร็อกซิเดสที่มีความว่องไวสูงที่แยกได้จากคอลัมน์ CM-Cellulose มาแยกต่อโดยใช้โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน ใช้แยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันออกจากกัน ในการทดลองจะใช้ Sephadex G-75 สามารถแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 5,000-80,000 ดาลตัน เปอร็อกซิเดสถูกชะออกมาในพีคแรก ซึ่งเป็นช่วงของปริมาตรภายนอกเม็ดเจล คอลัมน์นี้จึงมีความเหมาะสมในการแยกเปอร็อกซิเดสจากโอยางพาราเพราะสามารถกำจัดโปรตีนและพวกสีที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กได้ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเปอร็อกซิเดสที่ถูกชะออกมาในพีคแรกโดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ย้อมทั้งโปรตีนและความว่องไวพบแถบความว่องไวของเปอร็อกซิเดส 3-5 แถบ และในบริเวณนี้แถบมองไม่เห็นแถบโปรตีนของเปอร็อกซิเดส แต่โปรตีนส่วนใหญ่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยๆ

เมื่อนำเอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 ไปแยกโดยใช้ ND-PAGE และสกัดเอาแต่ส่วนที่มีเปอร็อกซิเดสมารวมกันแล้วศึกษาต่อใน ND-PAGE และ SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับแถบของเปอร็อกซิเดส แต่ยังไม่

มีแถบโปรตีนที่มีขนาดเล็กๆอื่นๆ ประปนอยู่ ดังรูปที่ 8 แสดงว่าวิธีการที่ 1 ไม่สามารถแยก เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้

การแยกเปอร้ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ตามวิธีการที่ 2 นี้ได้ข้ามขั้นตอนที่ทำให้สารสกัด เข้มข้นขึ้นด้วยการไลโอไฟไลซ์ โดยเริ่มจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 % ได้ตะกอน  $P_2$  นำมาละลายกลับด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาณน้อยที่สุดจนตะกอนละลายหมด สารละลายที่ได้ผ่านลงคอลัมน์ DEAE-Sephacel เปอร้ออกซิเดส ถูกชะออกมาในพีคแรกเช่นเดียวกับคอลัมน์ CM-Cellulose ทั้งที่เปอร้ออกซิเดสน่าจะจับกับ คอลัมน์ DEAE-Sephacel เพราะมีประจุลบ อาจเนื่องจากผลของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ในขั้นตอน  $S_4$  ที่ไม่ได้กำจัดเกลือออก อย่างไรก็ตามเปอร้ออกซิเดสถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นถึง 69.4 เท่า เมื่อนำมาแยกต่อโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75 โปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค เปอร้ออกซิเดสจะอยู่ในพีคแรกเท่านั้น เปอร้ออกซิเดสที่ได้เกือบจะบริสุทธิ์มีแถบโปรตีน อื่นๆเพียงส่วนน้อยเท่านั้น ความว่องไวของเปอร้ออกซิเดส 9,174 หน่วย คิดเป็น 40% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 115 เท่า

โปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 จนเกือบบริสุทธิ์ เมื่อแยกต่อ โดยใช้ คอลัมน์ Con A-Sepharose พบว่ามีเปอร้ออกซิเดสถูกชะออกมา 2 พีค ทั้งสอง พีคมีความว่องไวทั้งคู่ แต่พีคที่ 2 ที่ถูกชะออกมาด้วยน้ำตาลแมนโนส มีความว่องไวสูงกว่า (7,677 หน่วย) คิดเป็น 33.6 % มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 122.4 เท่า

การทำเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ตามวิธีการที่ 2 นี้จะทำให้ได้ปริมาณของ เปอร้ออกซิเดสสูงพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้ต่อไปในอนาคต

#### 4.4 ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่แยกได้

เปอร้ออกซิเดสจากใบยางพาราในขั้นตอนแรกถึงขั้นตอนสุดท้ายของการทำบริสุทธิ์ ทั้ง 2 วิธีการ พบว่าก่อนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นมีประมาณ 5 ไอโซไซม์ และเปอร้ออกซิเดส อาจไม่ได้เป็น หน่วยย่อย เพราะมีรูปแบบการเคลื่อนที่เหมือนกันทั้ง ND-PAGE และ SDS-PAGE และหลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์แบบต่างๆ เปอร้ออกซิเดส ที่แยกได้ตามวิธีการที่ 2 นี้ค่อนข้างบริสุทธิ์ และได้เอนไซม์เปอร้ออกซิเดสมากกว่าวิธีการที่ 1 และจากการศึกษาทั้ง ND-PAGE และ SDS-PAGE มีแถบโปรตีนของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส เหลืออยู่ประมาณ 3 แถบ มีโปรตีนอื่นๆปนอยู่น้อยมาก การศึกษาเปอร้ออกซิเดสโดย

SDS-PAGE ไม่ได้ต้มสารตัวอย่างกับ SDS และ mercaptoethanol เพื่อรักษาความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสไว้ จึงทำให้ย้อมความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสในแผ่นเจลภายหลังการทำ SDS-PAGE ได้

ค่า RZ (Reinheitzahl) คืออัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 / 275 เป็นค่าที่บอกถึงการมีหมู่ฮีม (heme group) อยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ (Araiso and Dunford, 1981) ไม่ใช่ค่าที่บอกถึงความบริสุทธิ์เพราะเปอร้ออกซิเดสจากแหล่งต่างกันมีค่า RZ แตกต่างกันออกไป (Tijssen and Kurstak, 1984) Shannon และคณะ (1966) พบว่าอัตราส่วนนี้ของแต่ละไอโซไซม์เปลี่ยนแปลงโดยเกี่ยวข้องกับอิทธิพลของบัฟเฟอร์และพีเอชด้วย ส่วนค่า RZ ของเปอร้ออกซิเดสจากไบบางพาราในชั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex-G 75 มีค่า RZ 0.938 ดังรูปที่ 15 แสดงว่าเปอร้ออกซิเดสจากไบบางพาราเป็นโปรตีนที่มีหมู่ฮีม เช่นเดียวกับเปอร้ออกซิเดสจากพืชชนิดอื่นๆ เช่น เปอร้ออกซิเดสจากใบชา (Kvaratskhelia *et al.*, 1997)

#### 4.5 สมบัติของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส

เปอร้ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์ได้จากไบบางพาราตามวิธีการที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย โดยวิธี SDS-PAGE ในส่วนที่ย้อมโปรตีนมีแถบเพียง 2 แถบ คือ 85,000 และ 120,000 ดาลตัน และเมื่อพิจารณาการย้อมความว่องไวของเอนไซม์จะพบแถบเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 125,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 20 เมื่อรวมน้ำหนักโมเลกุลที่ทำได้โดย SDS-PAGE จากแถบโปรตีนทั้งสองแถบมีค่าเท่ากับ 205,000 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสที่ได้ทำโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-150 ซึ่งเปอร้ออกซิเดสถูกชะออกมาเพียงพีคใหญ่เพียงพีคเดียวมีค่าเท่ากับ 204,000 ดาลตัน แต่ยังมีพีคเล็กซึ่งมีลักษณะเป็นไหล์พีคถูกชะออกมาก่อนลักษณะพีคเช่นนี้เป็นไปได้ว่าโมเลกุลของเปอร้ออกซิเดส อาจเกิดการรวมตัวกันทำให้ไม่สามารถแยกออกจากกันโดยเจลฟิลเตรชัน ส่วนน้ำหนักโมเลกุลรวมของเปอร้ออกซิเดสจากชั้นตอน DEAE-Sephacel โดยวิธี ND-PAGE นั้น พบแถบเปอร้ออกซิเดส 3 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 เป็นแถบที่ชัดเจนและ 125,000 กับ 140,000 ดาลตัน เป็นแถบจางๆ เมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลรวมโดยเจลฟิลเตรชันมีค่าต่างกัน

น้ำหนักโมเลกุลของเปอร้ออกซิเดสจากใบยางพารามีค่าใกล้เคียงกับเปอร้ออกซิเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 86,000 ดาลตัน (Loprasert et al., 1990) และ แคทไอออนิก เปอร้ออกซิเดส 2 รูปแบบจากผนังเซลล์ของเมล็ด *Araucaria araucana* มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 83,000 และ 145,000 ดาลตัน (Riquelme and Cardemil, 1995) ส่วนเปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพารามีน้ำหนักโมเลกุลย่อยเป็น 54,000 ดาลตัน (ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล, 2537) และเปอร้ออกซิเดสจากพืชพวกตะบองเพชร *Opuntia* มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย  $58,000 \pm 2,000$  ดาลตัน (Padiglia et al., 1995)

เมื่อทำ isoelectric focusing พบแถบโปรตีนและความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสที่ตรงกันเพียงแถบเดียว ซึ่งมี pI 3.6 แสดงว่าเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้นี้ค่อนข้างบริสุทธิ์ มีประจุลบ หรือเป็น แอซิดิก โปรตีนเพราะมีการเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกและมี pI ใกล้เคียงกับเปอร้ออกซิเดส จากเปลือกยางพาราซึ่งมีค่า pI 3.5 (Wititsuwannakul et al., 1997) เปอร้ออกซิเดสจากพืชแต่ละชนิดจะมีค่า pI ที่แตกต่างกันออกไป เช่น เปอร้ออกซิเดสจากพืชพวกตะบองเพชร *Opuntia* เป็น แคทไอออนิก เปอร้ออกซิเดส มี pI 7.2 (Padiglia et al., 1995) และ แคทไอออนิก เปอร้ออกซิเดส 2 ตัว ที่แยกจากเปลือกหุ้มเมล็ดของ *Araucaria araucana* มีค่า pI 10.5 ทั้งคู่ (Riquelme and Cardemil, 1993)

เปอร้ออกซิเดสจากใบยางพาราสามารถทนต่ออุณหภูมิ 30-50°C ได้ดี เพราะมีค่าความว่องไวคงที่ นานถึง 1 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 60°C นั้น ความว่องไวเอนไซม์ในช่วง 5 ชม.แรกลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ที่อุณหภูมิ 70-80°C นั้น ความว่องไวลดลงหลังจาก 30 นาทีแรกของการอุ่น เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร้ออกซิเดสจากแหล่งอื่นๆ พบว่าเปอร้ออกซิเดสจากแหล่งต่างกัน จะทนต่ออุณหภูมิได้ต่างกัน เช่น เปอร้ออกซิเดสที่ได้จาก *Bacillus stearothermophilus* ทนต่ออุณหภูมิ 70°C ได้ดี (Loprasert et al., 1990) เปอร้ออกซิเดสที่แยกจากใบของ *Ipomoea palmetta* พบว่าสามารถทนต่ออุณหภูมิ 60°C ได้นาน 5 ชม. แต่เมื่ออุ่นที่อุณหภูมิ 80°C นาน 1 ชม. นั้นจะสูญเสียความว่องไวประมาณ 80 % (Srinivas et al., 1999) ส่วนเปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราที่ได้จากการกรีดนั้น ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ที่ 40-50°C ในช่วงเวลาของการอุ่นเพียง 20 นาที ความว่องไวลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของความว่องไวในตอนเริ่มต้น (ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล, 2537) เปอร้ออกซิเดสจากเชื้อราที่อยู่ในเนื้อไม้ที่เน่าเปื่อยซึ่งทนต่ออุณหภูมิ 60°C ได้นาน 60 นาที (Heinzkill et al., 1998)

นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์ออกซิเดสจากไບอยางพาราทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 60-70°C เช่นเดียวกับเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากไບของ *Ipomoea palmetta* ซึ่งทำงานได้ตั้งแต่ 10-80°C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานคือ 50°C หากอุณหภูมิสูงกว่า 50°C การทำงานของเอนไซม์เริ่มลดลง (Srinivas et al., 1999) และเปอร์ออกซิเดสจาก *Opuntia* และ *Ficus indica* ทำงานได้ในช่วง 25-70°C (Padiglia, et. al 1995) การเพิ่มอุณหภูมิทำให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงมากนั้กอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติได้ อัตราเร็วการเร่งปฏิกิริยาจะลดลง แต่สำหรับเปอร์ออกซิเดสจากไບอยางพาราสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น 30-70°C ความว่องไวในการเร่งปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เกิดเนื่องจากการออกซิไดส์ *o*-dianisidine โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นแต่อย่างใดเพราะอุณหภูมิสูงขึ้นหากไม่มีเอนไซม์ ปฏิกิริยาก็ไม่อาจเกิดขึ้นได้

pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากไບอยางพาราคือ pH 5.5 ความว่องไวของเอนไซม์ ค่อยๆเพิ่มขึ้นตาม pH จนถึงจุดที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดแล้วจึงค่อยๆลดลง ดังรูป 28 ในการทดลองนี้เลือกใช้บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 50 mM sodium acetate ให้มี pH ต่างๆและทดสอบความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสตลอดช่วงการทดลองคือ 3.5-7.6 แม้ว่าความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์อาจไม่เหมาะสมเพราะ pKa ของ acetate บัฟเฟอร์ มีค่า 4.76 แต่จากการทดลองครั้งนี้ใช้ acetate อย่างเดียวเพื่อลดผลจากไอออนที่เป็นองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ ทั้งนี้เพราะว่า pH 5.5 เหมือนกันแต่ใช้บัฟเฟอร์ต่างกันคือ acetate (0.05 M) และ phosphate ( 0.05 M) พบว่าความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสใน acetate บัฟเฟอร์ จะสูงกว่า phosphate บัฟเฟอร์ (100 : 73 %) และยังพบว่าหากใช้ universal บัฟเฟอร์ pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ 5.5 นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 30 และ 60°C pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเปอร์ออกซิเดสจากไບอยางพาราคือ pH 5.5 ใน 50 mM sodium acetate ซึ่งใกล้เคียงกับเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล, 2537) มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ pH 5.4 ใน 50 mM sodium acetate และใช้ *o*-dianisidine เป็นสารตั้งต้นเช่นกัน

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดสจากไບียงพารา พบว่าค่า  $K_m$  ที่ได้จากการทำ Lineweaver - Burk plot กับ *o*-dianisidine และ  $H_2O_2$  เท่ากับ 0.22 mM และ 2.56 mM ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ  $K_m$  ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือยกยางพารา โดยใช้ *o*-dianisidine มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 8.3 mM ส่วนค่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  เท่ากับ 1.13 mM (ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล, 2537) จะเห็นว่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine ต่อเปอร์ออกซิเดสจากไบียงพาราจะมีค่าน้อยกว่าในเปลือยกยางพาราประมาณ 37 เท่า แต่ค่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  ในไบียงพารามีค่ามากกว่าเปอร์ออกซิเดสจากเปลือยกยางพารา 2 เท่า แสดงว่าเปอร์ออกซิเดสจากพืชชนิดเดียวกันแต่จากส่วนของเนื้อเยื่อที่ต่างกันมีความสามารถในการจับสับสเตรทได้ต่างกันด้วย ส่วน อะซิดิก เปอร์ออกซิเดส จากเซลล์ของมันเทศที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีค่า  $K_m$  ต่อ pyrogallol และ  $H_2O_2$  เท่ากับ 2.53 และ 5.76 mM ตามลำดับ (Kwak *et al.*, 1995)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากไบียงพารา จำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆกันคือ *o*-dianisidine, ABTS และ pyrogallol เปอร์ออกซิเดสจับกับสับสเตรทได้แตกต่างกันโดยมี  $K_m$  กับ *o*-dianisidine น้อยที่สุดเท่ากับ 0.22 mM ส่วน  $K_m$  ของ ABTS มีค่า 3.03 mM และ pyrogallol มีค่า  $K_m$  6.60 mM แต่เปอร์ออกซิเดสจากไบียงพาราไม่สามารถใช้ ascorbate เป็นสับสเตรทได้ อาจเป็นไปได้ที่บริเวณเร่งของเปอร์ออกซิเดสพอเหมาะสำหรับโครงสร้างของ *o*-dianisidine ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้เร็วมากแม้ใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเพียงเล็กน้อย

การเก็บเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในชั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-75 เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าที่อุณหภูมิห้องไม่สามารถเก็บสารละลายเปอร์ออกซิเดสได้นานเกิน 1 สัปดาห์ แต่สามารถเก็บสารละลายเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 4 และ 20°C เป็นเวลา 3 เดือน โดยความว่องไวลดลงเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้พบว่าการเก็บเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 4°C ในรูปสารละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ได้นานกว่า การทำให้อยู่ในรูปแห้งหลังการไลโอไฟไลซ์ อาจเนื่องมาจากก่อนการทำไลโอไฟไลซ์ เปอร์ออกซิเดสอยู่ในรูปของสารละลายที่เจือจางและมีปริมาตรเพียง 10 ไมโครลิตร หลังการทำไลโอไฟไลซ์แล้วเปอร์ออกซิเดสอาจสูญเสียความว่องไวได้หรืออาจเกิดจากเปอร์ออกซิเดสบางส่วนแห้งติดอยู่กับก้นหลอดเก็บสาร ดังนั้นเปอร์ออกซิเดสจึงไม่เสถียรเมื่อเก็บอยู่ในรูปผงแห้ง

## 4.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา

### 4.6.1 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออนและ EDTA

เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราต้องการไดวาเลนท์แคทไอออนที่ความเข้มข้นระดับหนึ่งช่วยในการทำงาน เช่น  $\text{CaCl}_2$  200 mM กระตุ้นความว่องไวได้สูงสุดถึง 120 % จากความว่องไวในตอนเริ่มต้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 400 mM ทำให้การกระตุ้นความว่องไวลดลง 40 % นอกจากนี้ยังพบว่า  $\text{MgCl}_2$  ความเข้มข้น 50 mM กระตุ้นความว่องไวได้สูงสุดเพียง 50 % เท่านั้น  $\text{Mg}^{2+}$  อาจทำหน้าที่เช่นเดียวกับ  $\text{Ca}^{2+}$  แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 300 และ 400 mM มีผลยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ 5 และ 10 % ตามลำดับ

EDTA เป็นสารคีเลท สามารถจับไดวาเลนท์แคทไอออนที่เป็นองค์ประกอบของชีวโมเลกุล เช่น เอนไซม์หลายตัวที่ต้องการไดวาเลนท์แคทไอออน หากมี EDTA อยู่ในปฏิกิริยาอาจยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ได้ ปกติแล้วเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมี  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุล (Morishima *et al.*, 1986) ช่วยให้โครงสร้างของเปอร์ออกซิเดสมีความเสถียร (Shiro *et al.*, 1986) เช่นเปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาว (horseradish) มี 2 โมลของ  $\text{Ca}^{2+}$  /โมลของโปรตีน เป็นองค์ประกอบการกำจัดไอออนเหล่านี้ออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลง แต่การเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นบริเวณใกล้ๆหมู่ซีสมี (Shiro *et al.*, 1986) ซึ่งอาจทำให้อัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาลดลง

จากการทดลองพบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 50 mM สามารถกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ เช่นเดียวกับกรณีของ  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นต่อไปเรื่อยๆถึง 400 mM ไม่มีผลในการส่งเสริม การที่ EDTA สามารถกระตุ้นการทำงานของเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารานั้น ยังไม่ทราบสาเหตุ และไม่ทราบว่าในโครงสร้างของเปอร์ออกซิเดสมี  $\text{Ca}^{2+}$  อยู่มากน้อยเท่าใดและมีหน้าที่อย่างไรเพราะเมื่อเพิ่มความเข้มข้น EDTA ในช่วง 100-400 mM กลับไม่มีผลต่อการทำงานของเปอร์ออกซิเดส เป็นสิ่งที่ยังต้องศึกษาต่อไปในอนาคต แต่สำหรับเปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาว พบว่า EDTA จะยับยั้งปฏิกิริยาการออกซิไดส์ของ iodide และ guaiacol ได้ ในลักษณะแข่งขันกับสับสเตรท ไม่ใช่ผลจากการกำจัด  $\text{Ca}^{2+}$  แต่ EDTA จะยับยั้งเปอร์ออกซิเดส โดยเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Bhattacharyya *et al.*, 1994 )

#### 4.6.2 ผลของไดไธอทรีทอล (DTT) และ p-CMB

DTT เป็นสาร reducing agent สามารถทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ที่พบในเอนไซม์ หรืออาจทำหน้าที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ได้ด้วย จากการทดลอง พบว่า DTT ความเข้มข้น 1 mM ยับยั้งความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสได้ถึง 94 % และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 mM ยับยั้งความว่องไวได้ 100 % จึงไม่แน่ใจว่า DTT เป็นสับสเตรทที่แข่งขันกับ o-dianisidine เพื่อแย่งจับกับเปอร์ออกซิเดสหรือไม่อย่างไร ปกติแล้วในโมเลกุลของเปอร์ออกซิเดสจากพืชชนิดอื่นๆ เช่น จากหัวผักกาดหนูขาว มี conserved cys อยู่ถึง 4 ตำแหน่ง (Shiro *et al.*, 1986) มีส่วนเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งของเปอร์ออกซิเดส การทำลายพันธะไดซัลไฟด์ทำให้บริเวณเร่งเปลี่ยนไปได้การทำงานจึงลดลง เช่นเดียวกับเปอร์ออกซิเดสจากข้าวโพด (maize) ถูกยับยั้งได้ด้วย DTT (Myton and Fry, 1995)

ส่วนสาร p-CMB เป็นสารที่มีโลหะ  $Hg^{2+}$  เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย สามารถจับกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (-SH) ที่เอนไซม์อย่างถาวร หากหมู่ซัลฟ์ไฮดริลเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ อาจทำให้เอนไซม์เสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ จากผลการทดลอง พบว่า p-CMB สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากใบยางพาราได้ จะต้องใช้ความเข้มข้นถึง 100 mM จึงยับยั้งความว่องไวได้ 100 % ดังตารางที่ 8 แสดงว่าของเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา มีหมู่ -SH ที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ p-CMB ทำให้ไม่สามารถจับกับสับสเตรทหรือยับยั้งการทำงานของเปอร์ออกซิเดสนั่นเอง

#### 4.6.3 ผลของ $NaN_3$ และ KCN

KCN ความเข้มข้นเพียง 1 mM ยับยั้งความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสได้ 100 % ส่วน  $NaN_3$  ที่ความเข้มข้น 1 mM เท่ากันนั้น ยับยั้งความว่องไวได้น้อยกว่าเล็กน้อย (72 %) และที่ความเข้มข้น 10 mM ยับยั้งได้ 100 % สารทั้งสองเป็นตัวยับยั้งเปอร์ออกซิเดส อาจเข้าไปจับหมู่ฮีมของเปอร์ออกซิเดสทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และพบว่า เปอร์ออกซิเดสจากแหล่งต่างๆ เช่น *Sphagnum magellanicum* และมี o-dianisidine เป็นสับสเตรทยังถูกยับยั้งโดย  $CN^-$  และ  $N_3^-$  ที่ 1 mM และ 100 mM ตามลำดับ (Tutschek, 1979) เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกองยางพาราถูกยับยั้งได้ด้วยสารทั้ง



สองตัวนี้ โดยมีค่า  $K_1$  ของ KCN และ  $\text{NaN}_3$  มีค่าเท่ากับ  $10 \mu\text{M}$  และ  $2.7 \text{ mM}$  ตามลำดับ (Wititsuwanakul *et al.*, 1997) นอกจากนี้เปอร้ออกซิเดสในรา *Coprinus friesii* ที่ถูกปล่อยออกมาออกเซลล์ ถูกยับยั้งได้โดย  $\text{NaN}_3$  เช่นกันโดย มีค่า  $K_1$  เท่ากับ  $21.8 \mu\text{M}$  (Heinzkill *et al.*, 1998)

#### 4.6.4 ผลของ SDS

SDS เป็นสาร แอนไอออนิกดีเทอร์เจนท์ (anionic detergent) ซึ่งมีประจุลบ สามารถจับกับโปรตีนบริเวณที่เป็น ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ทำให้โปรตีนคลายการขดม้วนออก (unfold) เป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีรูปร่างเป็น random coiled ทำให้โปรตีนมีลักษณะผิดไปจากเดิมหรือเสียสภาพธรรมชาติ จากการทดลองพบว่า SDS ที่ความเข้มข้น 0-0.01 mM กระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ได้ถึง 30 % เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 1 mM กลับไม่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ แต่เมื่อเพิ่มไปจนถึง 10 mM สามารถยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ได้ถึง 56 % และความเข้มข้นที่ 150 mM สามารถยับยั้งได้ 100 % ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการจับกันของเอนไซม์กับสับสเตรทที่มี SDS ที่ความเข้มข้น 0-0.01 mM เกิดขึ้นเร็วมากโดยสังเกตจากสีที่เกิดขึ้นของปฏิกริยา ที่ความเข้มข้นต่างๆ นี้ อาจทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเกิดได้ดี แต่เมื่อความเข้มข้นสูงมากเกินไปจะมีผลทำให้รูปร่างของโมเลกุลเสียไป

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการหาค่าหน้าหนักโมเลกุลของ เอนไซม์เปอร้ออกซิเดส โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในส่วนที่ย้อมความว่องไวกรณีที่มี SDS (0.1 mM) รวมอยู่ด้วย แต่ในการทดลองนั้นไม่ได้ต้มโปรตีนก่อนที่ทำ SDS-PAGE ทำให้สามารถติดตามแถบความว่องไวซึ่งมีสีน้ำตาลแดงได้ และในบางครั้งแม้จะไม่มี การกำจัด SDS ออกจากแผ่นเจล ยังปรากฏแถบความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสบนแผ่นเจล เช่นเดียวกับติดตามความว่องไวในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS ของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากหัวผักกาดหนูขาว (horseradish) โดย Schmidt (1986 อ้างโดย Bischoff *et al.*, 1998)

## 5. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการสกัดเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากใบยางพารา การทำให้เปอร้ออกซิเดสบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเปอร้ออกซิเดสบริสุทธิ์ที่แยกได้ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สารสกัดเปอร้ออกซิเดสที่ได้จากใบยางพาราเมื่อนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีการไลโอไฟไลซ์นั้นทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ลดลงประมาณ 10 %
2. ในการแยกสารสกัดเปอร้ออกซิเดสตามวิธีการที่ 1 โดยคอลัมน์ CM-Cellulose และคอลัมน์ Sephadex G-75 พบว่าเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่แยกได้คิดเป็น 13.9 % มีความบริสุทธิ์ขึ้นเพียง 10.7 เท่า จากสารสกัดหยาบในตอนเริ่มต้น
3. การทำให้เปอร้ออกซิเดสบริสุทธิ์ตามวิธีการที่ 2 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel, Sephadex G-75 และ Con A-Sepharose จะแยกเปอร้ออกซิเดสได้บริสุทธิ์คิดเป็น 33.6 % และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 122.4 เท่า ของสารสกัดหยาบเริ่มต้น
4. เปอร้ออกซิเดสที่แยกได้มีลักษณะการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าทั้งแบบ ND-PAGE และ SDS-PAGE คล้ายคลึงกัน โดยที่ก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีประมาณ 5 ไอโซไซม์ และหลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นจะเหลือ 2 หรือ 3 ไอโซไซม์
5. น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่แยกให้บริสุทธิ์จากขั้นตอนของคอลัมน์ Con A-Sepharose ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบมี SDS ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 และ 120,000 ดาลตัน ส่วนแผ่นเจลส่วนที่ย้อมความว่องไวของเปอร้ออกซิเดสพบแถบเพิ่มขึ้นอีก 1 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล 125,000 ดาลตัน ด้วย
6. น้ำหนักโมเลกุลรวมของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่แยกได้จากขั้นตอนของคอลัมน์ Con A-Sepharose จากการหาโดยคอลัมน์ Sephadex G-150 มีค่าเท่ากับ 204,000 ดาลตัน
7. น้ำหนักโมเลกุลของเปอร้ออกซิเดสที่แยกได้ในขั้นตอนของ DEAE-Sephacel พบ แถบโปรตีนและความว่องไว 3 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ND-PAGE ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 85,000, 125,000 และ 140,000 ดาลตัน

8. เปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราเป็นไกลโคโปรตีนสามารถย่อยตัด ลีอัลเซอิน-บลู และ ฟูกซิน-ซัลไฟด์
9. เปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราเป็นโปรตีนที่มีหมู่ heme เป็นองค์ประกอบเพราะมีการดูดกลืนแสงที่ 403 และ 277 ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 0.938
10. pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราคือ 50 mM sodium acetate บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.5
11. เปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-70°C และสามารถทนต่อความร้อนอุณหภูมิในช่วง 30-50°C นาน 24 ชม. โดยที่ความว่องไวไม่ลดลง
12. เปอร็อกซิเดสจากใบยางพารามีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็น *o*-dianisidine มากกว่า H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ABTS และ pyrogallol โดยมีค่า K<sub>m</sub> เท่ากับ 0.22, 2.56, 3.03 และ 6.60 mM ตามลำดับ
13. สามารถเก็บเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในรูปของสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 °C ได้นานถึง 3 เดือน แต่ไม่สามารถเก็บในรูปของการทำให้แห้งโดยการไลโอไฟไลซ์
14. ไควาเลนท์แคทไอออน เช่น Ca<sup>2+</sup> ที่ความเข้มข้น 200 mM สามารถกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ได้สูงที่สุดถึง 120 % แต่ Mg<sup>2+</sup> ที่ความเข้มข้น 50 mM สามารถกระตุ้นความว่องไวได้ 50 % ส่วน EDTA และ SDS ที่ความเข้มข้น 50 mM และ 0.01 mM สามารถกระตุ้นความว่องไวเอนไซม์ได้สูงสุดเป็น 25 และ 30 % ตามลำดับ
15. สารที่มีผลในการยับยั้งความว่องไวของเปอร็อกซิเดสคือ KCN, DTT, NaN<sub>3</sub>, *p*-CMB และ SDS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100, 100 และ 150 mM ตามลำดับ สามารถยับยั้งความว่องไวเอนไซม์ได้ 100 % จึงสรุปได้ว่า KCN เป็นตัวยับยั้งที่รุนแรงที่สุด
16. เปอร็อกซิเดสที่แยกได้เป็น acidic มีค่าไอโซอิเล็กทริกเพียงค่าเดียวเท่ากับ 3.6

ผลจากการศึกษาเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในใบยางพาราทำให้ทราบรายละเอียดต่างๆ เช่น ปริมาณเปอร็อกซิเดสในใบยางพารา, วิธีการทำเปอร็อกซิเดสให้บริสุทธิ์, คุณสมบัติด้านต่างๆของเปอร็อกซิเดส ซึ่งเป็นแนวทางในการนำเปอร็อกซิเดสจากใบยางพาราไปประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง

- ธิดารัตน์ เอกสิทธิ์กุล และ มนต์วี จุฬาวัฒนทล 2535. "เปอร์ออกซิเดสจากมันสำปะหลัง"  
การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 15  
ณ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่. หน้า 547-575
- ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล. 2537. "การเตรียมเปอร์ออกซิเดสในปริมาณสูงจากเปลือกยางพารา"  
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วัลลี สุวจิตตานนท์ และ คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์. 2535. "รายงานการวิจัยเรื่อง การจำแนก  
พันธุ์ยางพาราโดยไอโซไซม์อิเล็กโทรฟอรีซิส"
- อโนทัย งานทวี 2538. "การเพิ่มขีดความสามารถของอุตสาหกรรมยางพาราในการแข่งขัน  
กับต่างประเทศ" ว. ข่าวกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง 33 : 23-28
- Abrahams, S., Hayes, C.M. and Watson, J.M. 1996. "Organ-specific expression  
of three peroxidase-encoding cDNAs from lucerne (*Medicago  
sativa*)." *Aust. J. Plant Physiol.* 23 : 551-559
- Agostini, E, Medina, M.J., Silvia, R., Forchetti, M.D. and Tigier, H. 1997.  
"Properties of anionic peroxidase isoenzymes from turnip  
(*Brassica napus* L.) root." *J. Agric. Food Chem.* 45 : 596-598
- Aibara, S., Kobayashi, T., and Morita, Y. 1981. "Isolation and properties of  
basic isoenzymes of horseradish peroxidase." *J. Biochem.*  
90 : 489-496

- Alberti, N.B. and Klivanov, M.A. 1981. "Enzymatic removal of dissolved from industrial aqueous effluents." *Biotech. and Bioeng.* 11 : 373-379
- Anderson, M.D., Prasad, T.K. and Stewart, C.R. 1995. "Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings." *Plant Physiol.* 109 : 1247-1257
- Araiso, T. and Dunford, H.B. 1981. "Horseradish peroxidase. Complex formation with anions and hydrocyanic acid." *J. Biol. Chem.* 256 : 10099
- Asada, K., 1988. "Ascorbate peroxidase as a scavenger of hydrogen peroxide in plant." in *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*, Hayaishi, O., Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Ator, M.A., and Ortiz de Montellano P.R. 1987. "Protein control of prosthetic heme reactivity." *J. Biol. Chem.* 258 : 9913-9924
- Baier, M., Goldberg, R., Catesson, A.M., Francesch, C. and Rolando, C. 1993. "Seasonal changes of isoperoxidase from poplar bark tissues." *Phytochemistry* 32 (4) : 789 - 793
- Bhattacharyya, D.K., Adak, S., Bandyopadhyay, U. and Banerjee, R.K. 1994. "Mechanism of inhibition of horseradish peroxidase-catalysed iodide oxidation by EDTA." *Biochem. J.* 298 : 281 - 288

- Biles, C.L., Abeles, F.B. and Wilson, C.L. 1990. "The role of ethylene in anthracnose of cucumber, *Cucumis sativus*, caused by *Colletotrichum lagenarium*." *Phytopathology* 80 (8) : 732-735
- Bischoff, K.M., Shi, L. and Kennelly, P.J. 1998. "The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal. Biochem.* 260 : 1-17
- Breton, F., Sanier, C. and D'Auzac, J. 1997. "Scopoletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*." *J. Plant Physiol.* 151 : 595-602
- Breusegem, F.V., Villarroel, R., Montagu, M.V., and Inze, D. 1995. "Ascorbate peroxidase cDNA from maize" *Plant physiol.* 107 : 649-650
- Brownleader, M. and Golden, K.D. 1993. "An inhibitor of extensin peroxidase in cultured tomato cells" *Phytochemistry* 33 (4) : 755-758
- Bunkelmann, J.R. and Trelease, R.N. 1996. "Ascorbate peroxidase." *Plant Physiol.* 110 : 589-598
- Caramelo, L., Martinez, M.J. and Martinez, A.T. 1999. "A search for ligninolytic peroxidase in the fungus *Pleurotus eryngii* involving  $\alpha$ -keto- $\gamma$  thiomethylbutyric acid and lignin model dimers." *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (3) : 916-922

- Chabanet, A., Catesson, A.M. and Goldberg, R. 1993. "Peroxidase and phenoloxidase activity in mung bean hypocotyl cell walls." *Phytochemistry* 33 (4) : 759-763
- Chaloupkova, K. and Smart, C.C. 1994. "The abscisic acid induction of a novel peroxidase is antagonized by cytokinin in *Spirodela polyrrhiza* L." *Plant Physiol.* 105 : 497-507
- Christensen, J.H., Bauw, G., Welinder, K.G., Montagu, M.V. and Boerjan, W. 1998. "Purification and characterization of peroxidase correlated with lignification in poplar xylem." *Plant Physiol.* 118 : 125-135
- Cohen, J.D. and Bandurski, R.S., 1978 "The bound auxin : protection of indole-3-acetic acid from peroxidase-catalyzed oxidation." *Planta* 139 : 203
- Collins, P.J., Dobson, A.D.W. and Field, J.A. 1998 "Reduction of the 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) cation radical by physiological organic acid in the absence and presence of manganese." *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6) : 2026-2031
- Condit, C.M. and Meagher, R.B. 1986. "A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of *Petunia*." *Nature* 323 (11) : 178-180
- Converso, D.A. and Fernandez, M.E. 1995. "Peroxidase isozymes from wheat germ : Purification and properties." *Phytochemistry* 40 (5) : 1341-1345

- Curtis, M.D., Nourse, J.P. and Manners, J.M. 1995. "Nucleotide sequence of cationic peroxidase gene from the tropical forage legume *Stylosanthes humilis*." *Plant Physiol.* 108 : 1303-1304
- Davis, B.J. 1964. "Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein." *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121 : 404-427
- Decedue, C.J., Rogers, S.J. and Borchert, R. 1984. "Molecular weight differences among potato peroxidase." *Phytochemistry* 23 (4) : 723-727
- de Hann, J.B., Bladier, C.B., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R.D., Cheung, N.S., Bronson, R.T., Silvestro, M.J., Wild, S., Zheng, S.S., Beart, P.M., Hertzog, P.J. and Kola, I. 1998. "Mice with homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agent paraquat and hydrogen peroxide." *J. Biol. Chem.* 273 (35) 22528-22536
- de Marco, A. and Roubelakis-Angelakis, A. 1996. "The complexity of enzymic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplasts." *Plant Physiol.* 110 : 137-145
- de Pinto, M.C and Ros Barcelo, A. 1996. "Inhibition of both peroxidase and laccase by desferal (desferrioxamine mesylate)." *Phytochemistry* 42 (2) : 283 - 286



- Dudler, R., Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J. and Mauch, F. 1991 " Nucleotide sequence of a peroxidase-encoding wheat gene." *Plant Mol. Biol.* 16 : 329-331
- Dunford, H.B. 1963. "Horseradish peroxidase : Structure and kinetic properties" *Peroxidase in Chemistry and Biology* (vol. II ), pp 1-17
- Espelie, K.E. and Franceschi, V.R. 1986 "Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wounding-healing potato tuber tissue." *Plant Physiol.* 81 : 487
- Ferrer, M.A. and Ros Barcelo, A. 1994. "Inactivation of cell wall acidic peroxidase isoenzymes during the oxidation of coniferyl alcohol in lupins" *Phytochemistry* 36 (5) : 1161 - 1163
- Fry, S.C. 1982. "Phenolic components of the primary cell wall." *Biochem. J.* 203 : 493-504
- Fry, S.C. 1986. "Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms." *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37 : 165-186
- Fujiyama, K., Takemura, H., Shinmoyo, A., Okada, H., and Takano, M. 1990 "Genomic DNA structure of two new horseradish peroxidase-encoding gene." *Gene* 89 : 163-169

- Grison, R. and Pilet, P.E. 1985. "Maize root peroxidase : Relationship with polyphenol oxidases." *Phytochemistry* 24 (11) : 2519 - 2521
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1989 "Protection against oxidants in biological systems : the superoxide theory of oxygen toxicity." *Free Radicals in Biology and Medicine* (2<sup>nd</sup> ed), 543 pp. Clarendon Press, Oxford
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Cross, C.E. 1992. "Free radicals, antioxidant, and human disease : Where are we now ?" *J. Lab. Clin. Med.* 119 (6) : 598-620
- Hammond-Kosack., K.E. and Jones, J.D.G. 1996 "Resistance gene-dependent plant defense responses." *Plant cell.* 8 : 1773-1791
- Hazell, P. and Murry, D.R. 1982. "Peroxidase isozymes and leaf senescence in sunflower *Helianthus annus* L." *Z. Pflanzenphysiol.* 108 : 87
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. and Anke, T. 1998. "Characterization of laccases and peroxidase from wood-rotting fungi (Family *Coprinaceae*) *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 1601-1606
- Hinman, R.L. and Lang, J., 1965. "Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid." *Biochemistry* 24 : 144-158

- Hu, C. and van Huystee, R.B. 1989. "Role of carbohydrate moieties in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidase." *Biochem. J.* 263 : 129-135
- Hurst, R., Bao, Y., Ridley, S. and Williamson, G. 1999 "Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin." *Biochem. J.* 338 : 723 - 728
- Ishikawa, T., Takeda, T., Shigeoka, S., Hirayama, O. and Mitsunaga, T. 1993. "Hydrogen peroxidase generation in organelles of *Euglena gracilis*." *Phytochemistry* 33 (6) : 1297-1299
- Itoh, N., Sasaki, H., Ohsawa, N., Shibata, M.S. and Miura, J'I 1996. "Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera* is regulated by its vanadate content." *Phytochemistry* 42 (2) : 277-281
- Jackson, P., Brownleader, M., Freire, P.O. and Ricardo, C.P.P. 1999. "An extensin peroxidase is associated with white-light inhibition of lupin (*Lupinus albus*) hypocotyl growth." *Aust. J. Plant Physiol.* 26 : 29 - 36
- Jackson, P. and Ricardo, C.P.P. 1992. "Cytochrome c aided resolution of *Lupinus albus* isoperoxidase in cathodal polyacrylamide gel electrophoresis system." *Anal. Biochem.* 200 : 36-41
- Jackson, P. and Ricardo, C.P.P. 1998. "The changing peroxidase polymorphism in *Lupinus albus* during vegetative development." *Aust. J. Plant. Physiol.* 25 : 261 - 269

- Jacob, R.A. and Burri, B. 1996. "Oxidative damage and defense." *Am. J. Clin. Nutr.* 63 : 985s-990s
- Jespersen, H.M., Kjaersgard, I.V.H., Ostergaard, L. and Welinder, K.G. 1997. "From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase." *Biochem. J.* 326 : 305 - 310
- Jonsson, L.J., Palmqvist, E. and Nilvebrant, N-O. 1998 "Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 : 691-697
- Kahn, V. 1985 "Tropolone-a compound that can aid in differentiating between tyrosinase and peroxidase." *Phytochemistry* 24 : 915-920
- Kim, S.J. and Shoda, M. 1999. "Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes." *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (3) : 1029-1035
- Klibanov, M.A., Alberti B.N., Morris E.D. and Felshin L.M. 1981. "Enzyme removal of toxic phenol and anilines from waste water." *J. Appl. Biochem* 2 : 414-421
- Klibanov, M.A., Ju T-M and Scott P.K. 1983. "Peroxidase-catalyzed remove of phenols from coal-conversion waste water." *Science* 221 : 259-260

- Klotz, K. and Lagrimini, L.M. 1996. "Phytohormone control of the tobacco anionic peroxidase promoter." *Plant Mol. Biol.* 31 : 565 - 573
- Kvaratskhelia, M., Winkel, C. and Thorneley, R.N.F. 1997. "Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves." *Plant Physiol.* 114 : 1237-1245
- Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. 1992. "Cloning and sequencing of a cDNA encoding ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana*." *Plant Mol. Biol.* 18 : 691-701
- Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. 1995. "Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide." *Plant Mol. Biol.* 29 : 479 - 489
- Kwak, S-S., Kim, S-K., Lee, M-S., Jung, K-H., Park, I-H. and Liu, J-R. 1995. "Acidic peroxidase from suspension-cultures of sweet potato." *Phytochemistry* 39 (5) : 981 - 984
- Kwak, S-S., Kim, S-K., Park, I-H. and Liu, J.R. 1996. "Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemical in sweet potato." *Phytochemistry* 43 (3) : 565 - 568
- Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 : 680-685

- Lagrimini, L.M. and Rothstein S. 1987. "Tissue specificity of tobacco peroxidase isozyme and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection." *Plant Physiol.* 84 : 438-442
- Lagrimini, L.M., Joly, R.J., Dunlap, J.R. and Liu, T-T.Y, 1997. "The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development." *Plant Mol. Biol.* 33 : 887 - 895
- Lee, M.Y. and Kim, S.S. 1994 "Characteristics of six isoperoxidase from Korean radish root." *Phytochemistry* 35 (2) : 287 - 290
- Liu, Y., Qian, J., Fu, X., Liu, H. Deng, J. and Yu, T. 1997 "Immobilization of horseradish peroxidase onto a composite membrane of regenerated silk fibroin and polyvinyl alcohol and its application to a new methylene blue-mediating sensor for hydrogen peroxide." *Enzyme Microb. Technol.* 21 : 154-159
- Loprasert, S., Itaru, U. and Hirosuke, O. 1990. "Overproduction and single step purification of *Bacillus stearothermophilus* peroxidase in *Escherichia coli*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 : 690-692
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. "Protein measurement with the Folin-phenol reagent." *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275
- Lynen F. 1969 "Biochemical problem of rubber synthesis." *J. Rubb. Res. Inst, Malaya.* 21 (4) : 389-406

- Maldonado, B.A. and van Huystee B.R. 1980 " Isolation of cationic peroxidase from cultered peanut cell." *Can. J. Bot.* 58 : 2280-2284
- McDougall, G.J. 1993. "Solubilization of wall-bound peroxidases limited proteolysis." *Phytochemistry* 33 (4) : 765 - 767
- McManus, M.T. 1994. "Peroxidase in the separation zone during ethylene-induced bean leaf abscission." *Phytochemistry* 35 (3) : 567 - 572
- Miyake, C., Cao, W.H. and Asada, K. 1993. " Purification and molecular properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts." *Plant Cell Physiol.* 34 : 881-889
- Morishima, I. and Ogawa, S. 1978. "Proton nuclear magnetic resonance spectra of compounds I and II of horseradish peroxidase." *Biochemistry* 17 (21) : 4385
- Morishima, I., Kurono, M. and Shiro, Y. 1986. "Presence of endogenous calcium ion in horseradish peroxidase." *J. Biol. Chem.* 261 (20) : 9391-9399
- Myton, K.E. and Fry, S. 1995 "Dithiothreitol and cobalt effects on membrane-associated peroxidase oxidizing feruloyl-CoA." *Phytochemistry* 38 (3) : 573-577

- Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., and Gotoh, N. 1995 "Interaction among vitamin C vitamin E, and beta-carotene." *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (supp 1) : 1322s-1326s
- Ohlsson, P.I., Paul, K.G. and Sjöholm, I. 1977 "Circular dichroism studies on native and artificial horseradish peroxidase." *J. Biol. Chem.* 252 : 8222
- Orvar, B.L. and Eills, B.E. 1995 "Isolation of a cDNA encoding cytosolic ascorbate peroxidase in tobacco." *Plant Physiol.* 108 : 839 - 840
- Osakabe, K., Koyama, H., Kawai, S., Katayama, Y. and Morohoshi, N. 1994. "Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidase of *Populus kitakamiensis*." *Plant Sci.* 103 :167 -175
- Osakabe, K., Koyama, H., Kawai, S., Katayama, Y. and Morohoshi, N. 1995. "Molecular cloning of two tandemly arranged peroxidase genes from *Populus kitakamiensis* and their differential regulation in the stem." *Plant Mol. Biol.* 28 : 677 - 689
- Padiglia, A., Cruciani, E., Pazzaglia, G., Medda, R. and Floris, G. 1995 "Purification and characterization of *Opuntia* peroxidase." *Phytochemistry* 38 (2) : 295 - 297
- Polle, A. and Junkermann, W. 1994 "Inhibition of apoplastic and symplastic peroxidase activity from Norway spruce by the photooxidant hydroxymethyl hydroperoxide." *Plant Physiol.* 104 : 617-621



- Pomar, F., Bernal, M.A., Diaz, J. and Merino, F. 1997 "Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase." *Phytochemistry* 46 (8) : 1313 - 1317
- Poulos, T. and Kraut, J. 1980 "The stereochemistry of peroxidase catalysis." *J. Biol. Chem.* 255 (17) : 8199-8205
- Poulos, T., Edwards, S.L., Wariishi, H. and Gold, M.H. 1993. "Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å<sup>0</sup>." *J. Biol. Chem.* 268 (6) : 4429-4440
- Poulos, T.L., Patterson, W.R. and Sundaramoorthy, M. 1995. "The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidase : the role of non-haem metal in catalytic mechanism." *Biochem. Soc. Trans.* 23 : 228 - 232
- Qian, J., Liu, Y., Liu, H., Yu, T. and Deng, J. 1996. "An amperometric new methylene blue N-mediating sensor for hydrogen peroxide based on regenerated silk fibroin as an immobilization matrix for peroxidase." *Anal. Biochem.* 236 : 208-241
- Ralph, J.P. and Catchside, D.E.A. 1998. " Involvement of manganese peroxidase in the transformation of macromolecules from low-rank coal by *Phanerochaete chrysosporium*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 : 778-784

- Reimann, C., Ringli, C. and Dudler, R. 1992. "Complementary DNA cloning and Sequence analysis of a pathogen-induced peroxidase from rice." *Plant Physiol.* 100 : 1611-1612
- Ridge, I. and Osborne, D.J. 1970 "Hydroxyproline and peroxidase in cell walls of *pisum sativum* : regulation by ethylene." *J. Exp. Bot.* 21 : 843
- Riquelme, A. and Cardemil, L. 1993 "Peroxidase in the cell walls of seeds and seedlings of *Araucaria araucana*." *Phytochemistry* 32 (1) : 15 - 20
- Riquelme, A. and Cardemil, L. 1995 "Two cationic peroxidase from cell walls of *Araucaria araucana* seeds." *Phytochemistry* 39 (1) : 29 - 32
- Rodriguez Maranon, M.J. and van Huystee, R.B. 1994. "Plant peroxidases : interaction between their prosthetic groups." *Phytochemistry* 37 (5) : 1217-1225
- Ros, B.A., Pedreno, M.A., Munoz, R. and Sabater, F. 1988 "Lupine peroxidase : isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity." *Physiol. Plant* 71 (4) : 448-454
- Ruiz-Duenas, F.J., Guillen, F., Camarero, S., Perez-Boada, M., Martines, M.J. and Martinez, A.T. 1999 "Regulation of peroxidase transcript level in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*." *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (10) : 4458-4463

- Saeki, K., Ishikawa, O., Fukuoka, T., Nakagawa, H., Kai, Y., Kakuno, T., Yamashita, J., Kasai, N. and Horio, T. 1986 "Barley leaf peroxidase : purification and characterization" *J. Biochem.* 99 : 485 - 494
- Saint-Joanis, B., Souchon, H., Wilming, M., Johnsson, K., Alzari, P.M. and Cole, S.T. 1999. "Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid of the catalase/oxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*." *Biochem. J.* 338 : 753-760
- Sanchez, M., Pena, M.J., Revilla, G. and Zarra, I. 1996. "Changes in dehydrodiferulic acid and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl." *Plant Physiol.* 111 : 941-946
- Sattayasevana Benjamas. 1990. "Study on peroxidase from *Hevea brasiliensis*"  
Master of science (Biological Science) Prince of Songkla University
- Shannon, L.M., Kay, E. and Lew, J.Y. 1966. "Peroxidase isozymes from horseradish roots" *J. Biol. Chem.* 241 (9) : 2166 - 2172
- Shiro, Y., Kurono, M. and Marishima, I. 1986 "Presence of endogenous calcium ion and function and structural regulation in horseradish peroxidase." *J. Biol. Chem.* 261 (20) : 9382-9390
- Singh, A.K. and Shichi, H. 1998 "A novel glutathione peroxidase in bovine eye." *J. Biol. Chem.* 273 (40) : 26171 - 26178

- Sornwatana, T. and Chulavatnatol, M. 1996 " Changes in peroxidase isozymes during post-harvest deterioration of cassava tubers" The 22<sup>nd</sup> Congress Science and Technology of Thailand, October 16-18 : 278
- Srinivas, N.D., Rashmi, K.R. and Raghavarao, K.S.M.S. 1999. "Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration." *Process Biochem.* 35 : 43 - 48
- Sugimoto, M. Furui, S. and Suzuki, Y. 1997. " Molecular Cloning and characterization of a cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach." *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (8) : 1379 - 1381
- Thordal-Christensen, H., Brandt, J., Cho, B.H., Rasmussen, S.K., Gregersen, P.L., Smedegaard-Petersen, V. and Collinge, D.B. 1991 " cDNA cloning and characterization of barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*." *Plant Pathol.* 40 :395-409
- Tijssen, P. and Kurstak, E. 1984 " Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase antibody conjugates for enzyme immunoassays." *Anal. Biochem.* 136 : 451-457
- Tournaire, C., Kushnir, S., Bauw, G., Inze, D., de la Serve, B.T. and Renaudin, J-P. 1996. "A thiol protease and an anionic peroxidase are induced by lowering cytokinins during callus growth in *Putunia*." *Plant Physiol.* 111 : 159-168

- Tutschek, R. 1979. "Characterization of a peroxidase from *Sphagnum magellanicum*" *Phytochemistry* 18 : 1437 - 1439
- Tyson, H. 1992. "Relationship among amino acid sequences of animal, microbial and plant peroxidase." *Theore. Appl. Genetics* 84 : 643-655
- Underhill, S.J.R. and Critchley, C. 1995. "Cellular localisation of polyphenol oxidase and peroxidase activity in *Litchi chinensis* Sonn. pericarp." *Aust. J. Plant Physiol.* 22 : 627-632
- Urzua, U., Kersten, P.J. and Vicuna, R. 1998. "Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acid synthesis by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide" *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1) : 68-73
- Van Huystee, R.B. and Cairns, W.L. 1982. "Review : Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development." *Biochemistry* 21 (8) : 1834-1982
- Van Huystee, R.B. and Zheng, X. 1993. "Cationic peanut peroxidase and the oxidation of ferulic acid" *Phytochemistry* 34 (4) : 1437 - 1439
- Varner, J.E. and Cassab, G.I. 1986. "A new protein in petunia." *Nature* 323 (11) : 110

- Vioque, A., Albi, M.A. and Vioque, B. 1981 "Role of IAA oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid." *Phytochemistry* 20 (7) : 1473-1475
- Wardi, A.H. and Michos, G.A. 1972 "Alcian blue staining of glycoprotein in acrylamide disc electrophoresis." *Anal. Biochem.* 49 : 607-609
- Webb, R.P. and Allen, R.D. 1995 " Isolation and characterization of cDNA for spinach cytosolic ascorbate peroxidase." *Plant Physiol.* 108 : 1325
- Weger, H.G. 1997 "Interaction between Cu(II), Mn(II) and salicylhydroxamic acid in determination of algal peroxidase activity." *Phytochemistry* 46 (2) : 195 - 201
- Wititsuwannakul, R. 1986 "Diurnal variation of HMG CoA reductase in latex of *Hevea brasiliensis*." *Experientia* 42 : 45-46
- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Benjamaz, S., Pasitkul, P. 1997 "Peroxidase from *Hevea brasiliensis* bark : Purification and properties." *Phytochemistry* 44 (2) : 237 - 241
- Xue, L, Charest, P.M. and Jabaji-Hare, S.H. 1998 "Systemic induction of peroxidase, 1,3- $\beta$ -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* Species." *Phytopathology* 88 (4) : 359-365

- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Tamoi, M., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. 1999.  
"Alternatively spliced mRNA variants of chloroplast ascorbate  
peroxidase isoenzymes in spinach leaves." *Biochem. J.* 338 : 41-48
- Young, S.A., Guo, A., Guikema, J.A., White, F.F. and Leach, J.E. 1995 " Rice  
cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during  
incompatible interaction with *Xanthomonas oryzae pv oryzae*."  
*Plant Physiol.* 107 : 1333-1341
- Zacharius, R.M., Zell, T.G., Morrison, J.H. and Woodloch, J.J. 1969 "Glycoprotein  
staining following electrophoresis on acrylamide gels." *Anal. Biochem.*  
30 : 148-152
- Zancani, M., Nagy, G., Vianello, A and Macri, F. 1995 "Copper-inhibited  
NADH-dependent peroxidase activity of purified soya bean plasma  
membranes." *Phytochemistry* 40 (2) : 367-371
- Zheng, X. and van Huystee, R.B. 1992 "Anionic peroxidase catalysed  
ascorbic acid and IAA oxidation in presence of hydrogen peroxide :  
A defence system against peroxidative stress in peanut plant."  
*Phytochemistry* 31 (6) : 1895-1898

ภาคผนวก



ตารางที่ 9 แสดงส่วนประกอบของเจล (4 - 8 %) ดัดแปลงวิธีจาก Davis (1964)

ส่วนประกอบของเจล	stacking gel 3% (5ml)	separating gel	
		4% (3ml)	8% (3 ml)
30% Acrylamide-0.8 % bisacrylamide	0.50 ml	0.40 ml	0.80 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.63 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.50 ml	1.50 ml
10% Ammonium persulphate	50 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
น้ำกลั่น	3.82 ml	1.07 ml	1.07 ml
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Total Volume	5 ml	3 ml	3 ml

ตารางที่ 10 แสดงส่วนประกอบของเจล (7 - 15 %) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel	Separating gel	
	3% ( 5 ml )	7 % (3 ml)	15% (3ml)
30% Acrylamide-0.8 % bisacrylamide	0.5 ml	0.7 ml	1.5 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	0.75 ml	0.75 ml
0.2 M EDTA	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
10 % SDS	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
5% Ammonium persulphate	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
น้ำกลั่น	3 ml	1.5 ml	0.70 ml
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Total volume	5 ml	3 ml	3 ml

ตารางที่ 11 แสดงส่วนประกอบของเจล (7-15 %) ดัดแปลงจากวิธีของ Davis (1964)

ส่วนประกอบ	Stacking gel 3% ( 5 ml )	Separating gel	
		7 % (3 ml)	15% (3ml)
30%Acrylamide-0.8 % bisacrylamide	0.5 ml	0.7 ml	1.5 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	0.75 ml	0.75 ml
0.2 M EDTA	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
5% Ammonium persulphate	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
น้ำกลั่น	3 ml	1.5 ml	0.70 ml
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Total volume	5 ml	3 ml	3 ml

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวพัชรากร รัตนภูมิ	
วัน เดือน ปีเกิด	28 พฤศจิกายน 2517	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	<u>ปีที่สำเร็จการศึกษา</u>
ศาสตรบัณฑิต (เคมี)	สถาบันราชภัฏภูเก็ต	2540