



การเตรียมเปอร์ออกซิเดสในปริมาณสูงจากเปลือกยางพารา

Large - Scale Preparation of *Hevea* Bark Peroxidase

ปิยภรณ์ ภาษิตกุล

Piyaporn Pasitkul

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2537

เลขหมู่	OK495.87 16A 9954
Bib Key	61102

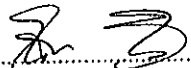
0.2

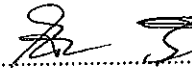
ชื่อวิทยานิพนธ์                      การเตรียมเปอร์ออกซิเดสในปริมาณสูงจากเปลือกยางพารา  
ผู้เขียน                                      นางสาว ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล  
สาขาวิชา                                      วิทยาศาสตร์ชีวภาพ


---


คณะกรรมการที่ปรึกษา

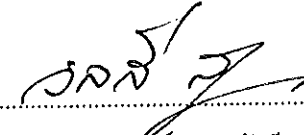
คณะกรรมการสอบ

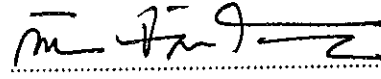
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

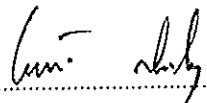
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีรยศ วิทิตสุวรรณกุล)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีรยศ วิทิตสุวรรณกุล)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วลิต สุวจิตตานนท์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาน จันทรพรหมมา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....  
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเตรียมเปอร็อกซิเดสในปริมาณสูงจากเปลือกยางพารา
ผู้เขียน	นางสาว ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา	2537

## บทคัดย่อ

ขั้นตอนการสกัดเปอร็อกซิเดสจากเปลือกยางพาราแบบ large-scale สามารถพัฒนาได้สำเร็จโดยเริ่มต้นด้วยเปลือกยางสดครั้งละประมาณ 80 กก. เปลือกยางจะถูกแยกเอาส่วนของซี่ยางออก โดยใช้เครื่องแยกซี่ยางซึ่งดัดแปลงมาจากเครื่องกระเทาะเปลือกถั่ว จากนั้นเปลือกยางที่ได้จะถูกนำมาอบด้วยเอทิลีนเป็นเวลาหนึ่งคืน แล้วจึงนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ เปลือกยางที่บดละเอียดแล้วจะนำมาใส่ถุงผ้า แล้วนำไปทำการสกัดในสารละลาย 0.4 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ด้วยการปั่นในเครื่องซักผ้า สารสกัดที่ได้จะมีสีน้ำตาลขุ่น ซึ่งต้องนำมาปั่นแยกเอาส่วนของเปลือกยางที่เป็นผงแขวนลอยออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง จากนั้นนำสารสกัดจากเปลือกยางมาทำการแยกชั้นในสารละลายที่ประกอบด้วย PEG 8,000 10% (w/v) และ เกลือ K-citrate 30% (w/v) สารละลายจะแยกเป็นสองส่วน โดยชั้นบนจะประกอบด้วยสารพวก polyphenolics ส่วนชั้นเกลือด้านล่างจะประกอบด้วยเปอร็อกซิเดส สารละลายเปอร็อกซิเดสจากส่วนล่าง จะถูกนำมาแยกเอาเกลือออกพร้อมทั้งถูกทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง ultrafiltration จากนั้นเปอร็อกซิเดสที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วย DEAE-cellulose โดยใช้วิธี batch-binding หรือ คอลัมน์ โครมาโตกราฟี โดยจะได้เปอร็อกซิเดสบริสุทธิ์น้ำหนักประมาณ 1.78-3.57 กรัม หรือคิดเป็นค่าเปอร็อกซิเดสแอกติวิตี ประมาณ  $1.95 \times 10^8$  -  $2.64 \times 10^8$  จากเปลือกยางสด 80 กก. และเมื่อนำเปอร็อกซิเดสบริสุทธิ์ไปหาน้ำหนักย่อยโดยทำ SDS-PAGE พบว่า มีโปรตีนแถบเดียวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน และ เปอร็อกซิเดสที่ได้สามารถ ออกซิไดซ์ IAA โดยการทำให้ ND-PAGE แล้วย้อมแอกติวิตี IAA จากการศึกษากลศาสตร์ โดยใช้

*o*-dianisidine และ  $H_2O_2$  เป็นสารตั้งต้น จะได้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 8.5 mM และ 1.13 mM ตามลำดับ และในการศึกษาความไวในการถูกยับยั้งด้วย KCN และ  $NaN_3$  พบว่ามีค่า  $K_i$  เท่ากับ 8.67  $\mu$ M และ 14.3  $\mu$ M ตามลำดับ ส่วน pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเปอร์ออกซิเดสที่ทำปฏิกิริยาคือ pH 5.4 และสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียสได้ และพบว่า ปริมาณเปอร์ออกซิเดสของเปลือกยาง จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณน้ำยางสดและปริมาณน้ำหนัวยางแห้งต่อการกรี๊ดแต่ละครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่า เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยาง (HBP) สามารถตกตะกอนสารประกอบฟีนอล และ สารประกอบอะนีนีน ความสามารถของ HBP ในการตกตะกอนสารประกอบดังกล่าวนี้ยังสามารถชักนำให้ยาปราบแมลงและศัตรูพืชบางตัวสามารถตกตะกอนร่วมได้ด้วย

Thesis Title      Large - Scale Preparation of *Hevea* Bark Peroxidase  
Author              Miss Piyaporn    Pasitkul  
Major Program    Biological    Sciences  
Academic Year    1994

### **Abstract**

A protocol for large-scale production of peroxidase from 80 kg of freshly collected *Hevea* bark was developed. Large-scale removal of rubber strings from fresh bark was carried out by threshing with the machine adapted from the peanut thresher. Rubber-free bark was treated with ethylene for an overnight and ground with beef grinding machine. Ground bark was filled into bags and loaded into the washing chamber of the washing machine containing 0.4 % sodium metabisulfite extract solution. A whirling motion generated by washing chamber assisted in extraction efficiency while spinning motion of spin-dry chamber aided in removal of the bark bulk solids. Suspended fine bark particles in the bark extract solution was removed by centrifugation. The clear bark extract was partitioned in solution containing 10 % (w/v) PEG 8,000 and 30% (w/v) K-citrate. The polyphenolics were separated in the top phase while peroxidase remained in the bottom phase. The bottom phase was isolated and subjected to simultaneous dialysis and concentration by using ultrafiltration. Peroxidase was further purified to homogeneity by large-scale DEAE-cellulose batch-binding or column chromatography.

The purified peroxidase ranging 1.78 to 3.57 gm or  $1.95 \times 10^8$  to  $2.64 \times 10^8$  activity unit were obtained from 80 kg raw bark material. The purified enzyme possesses a single polypeptide chain with molecular weight of 50,000 daltons and intrinsic IAA oxidase as determined by SDS-PAGE and ND-PAGE activity staining, respectively. Study on kinetics of *Hevea* bark peroxidase revealed  $K_m$  values for o-dianisidine and  $H_2O_2$  of 8.5 mM and 1.13 mM respectively. An apparent  $K_i$  of KCN and  $NaN_3$  from the Dixon plots were 8.67  $\mu$ M and 14.3  $\mu$ M respectively. Optimum pH of the enzyme was found to be 5.4 with thermal stability up to 50 °C. The level of peroxidase activity in bark strip was directly proportional to the volume of rubber latex and to a less extent, dry rubber yield obtained after each tapping. The *Hevea* bark peroxidase was found to be able to precipitate phenol and aromatic amines similar to those reported for horseradish enzyme. Co-precipitation of herbicide and insecticide with phenolic compound was observed in the presence of *Hevea* bark peroxidase.

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาให้คำชี้แนะแนวทางต่าง ๆ ในการค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจแก้วิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ทำให้ผู้วิจัยได้รับความรู้อันเป็นประโยชน์แก่งานวิจัยจนทำให้งานวิจัยสำเร็จตามจุดประสงค์ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์กับงานวิจัย

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมี และ รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร.นงพร โฉว์ฉณะ, ดร.นันทา เชิงเขาว์, อาจารย์ พรทิพย์ ประพันธ์พจน์ และคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้แนะนำสิ่งที่มีประโยชน์ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับสารเคมี และวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ด้วยดีเสมอ

ขอขอบคุณ สมาชิก PR 436 ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยนี้อย่างมาก

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กพท. (Office of the Science and Technology Development Board - STDB) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา รวมทั้ง มูลนิธิมหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณกำลังใจอันยิ่งใหญ่ของ คุณพ่อ, คุณแม่ และกำลังใจจากเพื่อน ๆ และ พี่ ๆ ทุกคน ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ปิยภรณ์ ภาษิตกุล

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
1. บทนำ	
บทนำตั้งเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	25
2. วัสดุ, อุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ	26
อุปกรณ์	30
วิธีการ	30
3. ผลการทดลอง	51
4. วิจารณ์	103
5. สรุป	113
เอกสารอ้างอิง	114
ภาคผนวก	123
ประวัติผู้เขียน	127



## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงความสัมพันธ์ของเวลาในการเกิด phase ระหว่างพอลิเมอร์ ชนิดต่าง ๆ กับเกลือ.....	17
2. การใช้ horseradish peroxidase (HRP) และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ในการตกตะกอนสารประกอบฟีนอล และสารประกอบอะนีนีน.....	23
3. แสดงชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant.....	31
4. แสดงส่วนประกอบของ เจล ดัดแปลงมาจาก Laemmli (1970).....	45
5. แสดงผลของแก๊สเอธิลีนต่อปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา.....	54
6. ผลของการทำ aqueous two-phase system โดยใช้ PEG ขนาดต่าง ๆ กับเกลือ 4 ชนิด.....	56
7. สรุptionขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราในระดับปริมาณสูง โดยวิธี แลกเปลี่ยนประจุ แบบ batch-binding.....	62
8. สรุptionขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราในระดับปริมาณสูง โดยวิธี แลกเปลี่ยนประจุ แบบ คอลัมน์ โครมาโตกราฟี.....	66
9. ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราโดยเปลี่ยน ความเข้มข้นของ o-dianisidine.....	75
10. ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราโดยเปลี่ยน ความเข้มข้นของ hydrogen peroxide.....	77
11. การเปรียบเทียบความจำเพาะของสารตั้งต้น (substrate specificity) ระหว่าง HRP กับ HBP.....	86
12. ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในเปลือกยาง ต่อการกรีด 1 ครั้ง กับปริมาณ น้ำยางสด และน้ำหนัวยางแห้ง.....	88

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
13. แสดงผลการตกตะกอนสารประกอบฟีนอลและสารประกอบอะนีนีน และผลการตกตะกอนร่วมระหว่างสารประกอบฟีนอลและอะนีนีนกับยาปราบแมลงและศัตรูพืชของ HBP และ HRP.....	94

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดง phase diagram ระหว่าง พอลิเมอร์ P กับ พอลิเมอร์ Q ใน น้ำที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส.....	10
2. แสดง phase diagram ระหว่าง polyethylene glycol (PEG) กับ เกลือ potassium phosphate.....	13
3. แผนภาพสภาวะระบบ aqueous two-phase system ระหว่าง PEG กับเกลือ	19
4. เครื่องแยกเปลือกยางออกจากเส้นนี้ียง.....	33
5. เครื่องบดเปลือกยางที่ดัดแปลงมาจากเครื่องบดเนื้อ.....	33
6. เปลือกยางบดละเอียดในถุงผ้า.....	35
7. การสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางในเครื่องซักผ้า.....	35
8. แสดงเครื่อง Millipore Pellicon.....	37
9. ขั้นตอนการเตรียมเปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา.....	40
10. ผลการใช้สารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน และ PVP ในขั้นตอนการสกัดสาร จากเปลือกยางพารา.....	52
11. สีของสารสกัดจากเปลือกยางพาราที่ได้จากการสกัดด้วย 0.4% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ และน้ำกลั่น.....	53
12. ลักษณะของเปลือกยางก่อนและหลังการลอกขี้ยาง และเปลือกยางบดละเอียด.....	58
13. การทำ aqueous two-phase system ของสารละลายระหว่าง PEG 8,000 10% (w/v) + เกลือ K-citrate 30% (w/v).....	60
14. แสดงเครื่องมือในการทำ คอลัมน์ DEAE-cellulose แบบปริมาณสูง.....	64
15. กราฟแสดงการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา โดย คอลัมน์ DEAE-cellulose.....	65

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
16. แสดงผลการทำ SDS-PAGE ของเปอร้ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์จากเปลือก ยางพารา.....	68
17. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลย่อยของโปรตีนกับการเคลื่อนที่ สัมพันธ์ที่ได้จากการศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE.....	69
18. ผลการทำ Non-denaturing เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ของ เปอร้ออกซิเดส ที่ทำบริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา.....	71
19. ผลการทำ Non-denaturing เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ของ เปอร้ออกซิเดส ที่ทำบริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา โดยเปรียบเทียบการย้อมโดยวิธีต่างๆ .....	72
20. ผลการทำ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แบบกึ่ง SDS.....	73
21. ผลของ Lineweaver - Burk plot ของ o-dianisidine.....	76
22. ผลของ Lineweaver - Burk plot ของ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	76
23. ผลของ Dixon plot ของความเข้มข้นของตัวยับยั้ง KCN กับ ส่วนกลับ ของอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ใน 1 นาที (1/V).....	79
24. ผลของ Dixon plot ของความเข้มข้นของตัวยับยั้ง NaN <sub>3</sub> กับ ส่วนกลับ ของอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ใน 1 นาที (1/V).....	81
25. ผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา.....	83
26. ผลของ pH ต่อการเสถียรภาพของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา.....	85
27. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเปอร้ออกซิเดส (U/เปลือกยาง 1 กรัม) กับปริมาณน้ำยางสด (มล./ต้น).....	89
28. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเปอร้ออกซิเดส (U/เปลือกยาง 1 กรัม) กับปริมาณน้ำยางแห้ง (กรัม/ต้น).....	90

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
29. แสดงผลของ HBP และ HRP ในการตกตะกอน phenol และ แพลนโทน...	95
30. แสดงผลของ HBP และ HRP ในการตกตะกอน 3-methyl phenol, โพลีดีอล และ แพลนโทน.....	96
31. แสดงผลของ HBP และ HRP ในการตกตะกอน 2-nitro phenol และ โพลีดีอล.....	97
32. แสดงผลของ HBP และ HRP ในการตกตะกอน aniline, ซีแลค และ เมโทรนัล.....	98
33. แสดงผลของ HBP และ HRP ในการตกตะกอน 1-naphthylamine และ เซฟวิน.....	99
34. แสดงผลของ HBP และ HRP ในการตกตะกอน 1-naphthylamine และ ฟอสตริน.....	100
35. แสดงผลของ HBP และ HRP ในการตกตะกอน 8-hydroxyquinoline, ฟอสตริน และ ซีแลค.....	101
36. แสดงผลของ HBP และ HRP ในการตกตะกอน 1,4-phenylenediamine dihydrochloride, เซฟวิน, แพลนโทน และ เมโทรนัล.....	102

## ตัวย่อและสัญลักษณ์

กก.	=	กิโลกรัม
ซม.	=	เซนติเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
DEAE	=	diethylaminoethyl
DMACA	=	dimethylaminocinnamaldehyde
HBP	=	<i>Hevea</i> peroxidase
HCl	=	hydrochloric acid
HRP	=	commercial horseradish peroxidase
IAA	=	indoacetic acid
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mM	=	milimolar
M	=	molar
N	=	normal
NaOH	=	sodium hydroxide
ND-PAGE	=	non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis
nm	=	nanometer
NMWL	=	nominal molecular weight limit
O.D.	=	optical density
pH	=	-log hydrogen ion concentration
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis

## ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

rpm	=	revolutions per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
Tris-HCl	=	tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride
TEMED	=	N,N,N',N' - tetramethyl ethylene diamine
$\alpha$	=	alpha
$\beta$	=	beta
$\mu\text{M}$	=	micromolar
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celsius
%	=	percent

# 1. บทนำ

## บทนำต้นเรื่อง

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ สามารถทำรายได้ส่งออกปีละหลายหมื่นล้านบาท ปัจจุบันประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกยางพาราประมาณ 10.7 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ในภาคใต้ 9.7 ล้านไร่ ที่เหลืออีกประมาณ 1 ล้านไร่ กระจายอยู่ตามภาคต่าง ๆ โดยเฉพาะทางภาคตะวันออก ดังนั้น 90% ของพื้นที่ปลูกยางจึงอยู่ในภาคใต้ และเมื่อเทียบกับพื้นที่ภาคใต้ทั้งหมด 44 ล้านไร่ สวนยางจะกินพื้นที่ 22% ของพื้นที่ทั้งภาค และเป็น 60% ของพื้นที่ทางการเกษตรภาคใต้ จังหวัดที่ปลูกยางมากที่สุดคือ จังหวัดสงขลา คิดเป็น 16% ของพื้นที่ปลูกยางภาคใต้ทั้งหมด ประมาณกันว่าประเทศไทยมีครอบครัวชาวสวนยางขนาดเล็กไม่ต่ำกว่า 800,000 ครอบครัว มีคนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับสวนยางพาราประมาณ 4 ล้านคน หรือ 9% ของประชากรทั้งประเทศ (สุชาติ จิตบรรจง, 2533.) และการส่งออกจะส่งออกขายในรูปของยางแผ่น แต่ราคายางที่ขายได้ไม่แน่นอน ผันผวนตามสถานการณ์หลาย ๆ อย่างที่เกิดขึ้นในประเทศต่าง ๆ เช่น ในฤดูที่ยางผลัดใบหรือฝนตกยาวนาน ชาวสวนยางกรีดยางไม่ได้ปริมาณยางในห้องตลาดน้อย ราคายางอาจจะสูงขึ้น หากปีไหนราคาน้ำมันซึ่งเป็นวัตถุดิบของยางสังเคราะห์มีราคาแพง ทำให้ยางสังเคราะห์มีราคาสูงขึ้น อุตสาหกรรมบางประเภทก็อาจจะหันมาใช้ยางธรรมชาติมากขึ้น ทำให้ราคายางธรรมชาติสูงขึ้น แต่ถ้ามีการนัดหยุดงานของกรรมกรในโรงงานผลิตยางรถยนต์ซึ่งเป็นผู้ใช้ยางรายใหญ่ ก็อาจจะทำให้ความต้องการยางธรรมชาติน้อยลง เพราะการผลิตยางรถยนต์หยุดชะงักก็จะมีผลทำให้ราคายางธรรมชาติลดลง การกีดกันทางการค้าหรือการเปลี่ยนแปลงทางการเมือง ล้วนแต่มีผลกระทบต่อการซื้อขายยางของโลกทั้งสิ้น ทำให้ชาวสวนยางส่วนใหญ่มีรายได้ไม่แน่นอน และค่อนข้างต่ำ

ปัจจุบันยังไม่มีผู้ใดนำเอาวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากการทำสวนยาง ได้แก่ เปลือกยาง(ขี้ยาง) ซึ่งได้จากการกรีดยางโดยการลอกเอาเส้นยางที่ติดกับเปลือกออก ไปใช้ให้เกิดคุณค่าทางเศรษฐกิจ



แต่ได้มีผู้พบว่า เปลือกยางมีส่วนประกอบของสารชีวเคมี คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในปริมาณสูง (Sattayasevana, 1990) เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระทบทางกายภาพ (physical stress) และ การคุกคามของโรคพืช (Lagrimini, 1987) ในกรณีของเปลือกยาง เวลาที่ชาวสวนทำการกรีดยางโดยใช้มีดกรีดบริเวณเปลือกต้นยาง เพื่อให้เกิดบาดแผลซึ่งมีผลให้ปลายท่อน้ำยางบริเวณดังกล่าวเปิดออก และน้ำยางก็จะไหลออกมา เพื่อเป็นการตอบสนองต่อการกรีดและเป็นการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรค ทำให้ต้นยางมีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกมา

เปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างมากมาย โดยเฉพาะเปอร์ออกซิเดสจาก horseradish ซึ่งมีประสิทธิภาพผลิตสารชีวเคมีผลิตาย ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ โดยการนำไปเป็นเอนไซม์ควบคุมสำหรับตรวจวัดระดับสารต่าง ๆ ในเลือดและปัสสาวะ ตลอดจนใช้เป็นเอนไซม์ร่วมในการติดฉลากเพื่อวินิจฉัยโรคจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่ผิดปกติของคนไข้ นอกจากนี้ Klibanov และคณะ (1983) ศึกษาพบว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถช่วยกำจัดสารพิษ และสารก่อมะเร็งบางชนิด ที่มีอยู่ในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น โรงงานทำพลาสติกและเรซิน, โรงงานสิ่งทอ, โรงงานผลิตสบู่ เป็นต้น โดยเปอร์ออกซิเดสจะไปทำปฏิกิริยากับสารดังกล่าวให้หมดสภาพเป็นพิษพร้อมทั้งตกตะกอนลงสู่ก้นบ่อ ซึ่งเป็นวิธีการลดมลภาวะเป็นพิษทางน้ำได้ดีวิธีหนึ่งก่อนที่จะปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

ด้วยเหตุนี้ ถ้าหากสามารถพัฒนาวิธีการผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยาง ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากสวนยางให้ได้ปริมาณมาก ๆ โดยมีต้นทุนการผลิตค่อนข้างต่ำก็จะเป็นประโยชน์ทั้งทางด้านการบุกเบิกอุตสาหกรรมการผลิตชีวเคมีภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้นใช้เองในประเทศ เพื่อทดแทนการนำเข้าและยังเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับชาวสวนยางอีกทางหนึ่ง

## การตรวจเอกสาร

เพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์ บทตรวจเอกสารจึงได้แบ่งเป็น 3 ส่วน ครอบคลุมถึง เปอร็อกซิเดสในพืช, การใช้ aqueous two-phase ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในพืช และการนำเปอร็อกซิเดสมาใช้ในการกำจัดสารพิษ ตามลำดับ

### 1.1 เปอร็อกซิเดสในพืช

เปอร็อกซิเดส (EC. 1.11.1.7 donor  $H_2O_2$  oxidoreductase) เป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจทางการศึกษาอย่างมาก เพราะสามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อของพืช โดยเฉพาะผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งจะพบเปอร็อกซิเดสในรูปของสารละลายอิสระ หรือจับอยู่กับส่วนประกอบต่าง ๆ ของผนังเซลล์ด้วยพันธะไอออนิก (ionic bond) หรือ พันธะโควาเลนต์ (covalent bond) (Ros et.al., 1988) ปัจจุบันพบว่า เปอร็อกซิเดสจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเมื่อพืชได้รับการคุกคามจากเชื้อโรค (pathogen) (Varner and Lin, 1989) หรือเมื่อพืชเกิดบาดแผล (wounding) ดังนั้น หน้าที่ของเปอร็อกซิเดสอาจจะเป็นการซ่อมแซมผนังเซลล์ ทำให้เกิดเป็นสารประกอบพวกอะลิฟาติก (aliphatic) หรือ อะโรมาติก (aromatic) บริเวณที่เกิดบาดแผล (Espelie and Franceschi, 1986) และจากการศึกษาเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลือง (*Glycine max* var Williams 82) ของ Gillikin และ Graham (1991) พบว่า สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลืองมีเปอร็อกซิเดสในปริมาณสูงมาก และเปอร็อกซิเดสที่พบมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) สามารถตรวจพบเอนไซม์นี้ได้ ในเมล็ดอ่อนที่มีอายุตั้งแต่ 21 วันขึ้นไป จนกระทั่งโตเป็นเมล็ดสมบูรณ์ จากการพบเปอร็อกซิเดสที่บริเวณนี้ทำให้เกิดสมมุติฐานว่า เปอร็อกซิเดสอาจจะเกี่ยวข้อง ในการทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดมีลักษณะแข็ง (hardening) ต่อมา Riquelme และ Lardemil (1993) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดของ *Araucaria Araucana* โดยการนำเมล็ด *A. Araucana* มาแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำเปลือกหุ้มเมล็ดมาสกัด พบว่า ในสารสกัดที่ได้มีแอกติวิตีของเปอร็อกซิเดสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 145,000 ดาลตัน และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการแช่น้ำของเมล็ดเป็น 72 ชั่วโมง แล้วนำเปลือกหุ้มเมล็ดมาสกัด สารสกัดที่ได้มีปริมาณเปอร็อกซิเดส

เพิ่มขึ้น แต่เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างออกไป คือ 83,000 ดาลตัน ซึ่งคล้ายกับกรณีที่ทำให้เมล็ดเกิดบาดแผลก่อนแล้วนำเมล็ดนั้นไปแช่น้ำ พบว่า สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่ได้จากเมล็ดที่แช่น้ำ 24 ชั่วโมง จะมีปริมาณเปอร์ออกซิเดสขนาด 83,000 ดาลตัน เพิ่มขึ้นคิดเป็น 20% ของปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่ไม่ได้แช่น้ำ และ ปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นจะคงที่อยู่นาน 96 ชั่วโมง โดยที่สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่ได้จากเมล็ดที่แช่น้ำ 72 ชั่วโมง จะมีปริมาณเปอร์ออกซิเดสขนาด 145,000 ดาลตัน ลดลงคิดเป็น 27% ของปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกหุ้มเมล็ดของเมล็ดที่ไม่ได้แช่น้ำ จากการที่พบว่าปริมาณเปอร์ออกซิเดสขนาด 83,000 ดาลตัน เพิ่มขึ้นทั้งในส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดปกติที่แช่น้ำ 72 ชั่วโมง และในเปลือกหุ้มเมล็ดที่ทำให้เกิดบาดแผล ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า เปอร์ออกซิเดสที่พบนี้อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ด ในขณะที่เดียวกันก็อาจมีหน้าที่ในการซ่อมแซมผนังเซลล์ที่เกิดบาดแผล

Lagrimini และ Rothstein (1987) ทำการศึกษาเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabaccum*) เช่น ส่วนของใบ (leaf), ราก (root), พืท (pith) และ ส่วนของแคลลัส (callus) โดยการทำให้ isoelectric focusing พบว่า แต่ละส่วนจะมี เปอร์ออกซิเดสที่มีลักษณะเป็นไอโซไซม์เฉพาะตัว (unique isozyme fingerprint) ที่แตกต่างกัน ในส่วนของราก พบว่า มีเปอร์ออกซิเดสทุกไอโซไซม์ที่พบในส่วนต่าง ๆ ของต้นยาสูบมีทั้งหมด 12 ไอโซไซม์ ในใบจะพบ 5 ไอโซไซม์ ในพืทพบ 4 ไอโซไซม์ และในแคลลัส 8 ไอโซไซม์ เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ต่างกันอาจมีหน้าที่ต่างกันไป ในการทดลองได้นำเอาส่วนของใบและพืทของต้นยาสูบมาทำให้เกิดบาดแผลก่อนนำไปแช่น้ำกลั่น หรือสารละลาย cyclohexamide ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มล. โดยทำการทดลองในที่มืด จากนั้นนำส่วนต่าง ๆ มาทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่มีระยะเวลาการแช่ต่างกัน พบว่า สารสกัดจากใบและพืทหลังการทำให้เกิดบาดแผลแล้ว แช่น้ำกลั่น 72 ชั่วโมง จะมีปริมาณ เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นและให้ค่าสูงสุด โดยเปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นเป็นไอโซไซม์ที่มีค่า pI เท่ากับ 9.3, 9.2 และ 8.9 ซึ่งไม่สามารถตรวจพบไอโซไซม์เหล่านี้ในสารสกัดจากใบและพืทปกติที่ไม่มีบาดแผล ดังนั้น เปอร์ออกซิเดสทั้ง 3 ไอโซไซม์ อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมผนังเซลล์ แต่ข้อเท็จจริงยังไม่ทราบแน่ชัด เพราะมีการตรวจพบว่าในรากของต้นยาสูบที่สมบูรณ์จะพบเปอร์ออกซิเดสทั้ง 3 ไอโซไซม์ด้วย ส่วนสารสกัดจากใบและพืทที่แช่ในสารละลาย

cyclohexamide นั้นจะมีปริมาณเปอร์ออกซิเดสน้อยมาก ทั้งนี้เพราะว่า cyclohexamide จะไปยับยั้งไม่ให้เกิดการสร้างเปอร์ออกซิเดส และยังพบว่า การ infect ใบยาสูบด้วย tobacco mosaic virus (TMV) สามารถชักนำให้เกิดการสร้างเปอร์ออกซิเดสขึ้นมาอีก หนึ่งไอโซไซม์ มีค่า pI เท่ากับ 5.6 โดยจะไม่พบเอนไซม์นี้ในเซลล์ปกติ ทำให้เกิดสมมุติฐานว่า เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์นี้อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช

ในขณะที่พืชเกิดบาดแผลนั้นนอกจากจะมีการสร้างเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นแล้ว ยังพบว่าการสร้างเอธิลีนเพิ่มขึ้นด้วย โดย Saltveit และ Dilley (1978) พบว่า หลังจากการทำให้ต้นอ่อนของถั่วเกิดบาดแผลแล้ว ประมาณ 26 นาที สามารถตรวจวัดปริมาณเอธิลีนที่เพิ่มขึ้นได้ และมีปริมาณเอธิลีนสูงสุดหลังการเกิดบาดแผลแล้วสองช่วงคือที่เวลา 56 และ 131 นาที

Imaseki (1970) ทำการศึกษาผลของแก๊สเอธิลีนกับปริมาณเปอร์ออกซิเดสในมันฝรั่ง โดยการนำมันฝรั่งมาเดือนเป็นชิ้นบาง ๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มม. และมีความหนา 2 มม. จากนั้นนำมาอบด้วยแก๊สเอธิลีนที่มีปริมาณความเข้มข้นต่างกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมันฝรั่งมาสกัดและทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส พบว่า สารสกัดจากมันฝรั่ง ที่ไม่ได้อบด้วยแก๊สเอธิลีน (ชุดควบคุม) มีปริมาณเปอร์ออกซิเดส 333 U/กรัม ในขณะที่สารสกัดจากมันฝรั่งที่อบด้วยแก๊สเอธิลีนความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร/ลิตร วัดปริมาณเปอร์ออกซิเดสได้ 985 U/กรัม ซึ่งมากกว่าชุดควบคุม 2.95 เท่า และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแก๊สเอธิลีนเป็น 1,000 ไมโครลิตร/ลิตร พบว่า มีปริมาณ เปอร์ออกซิเดส 1,125 U/กรัม ซึ่งมากกว่าชุดควบคุม 3.38 เท่า แสดงให้เห็นว่า แก๊สเอธิลีนมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณเปอร์ออกซิเดส

ต่อมาในปี ค.ศ. 1988 Abeles และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษาค่าผลของแก๊ส เอธิลีน ต่อปริมาณเปอร์ออกซิเดสในใบเลี้ยงของแตงกวา (*Cucumis sativus* L. cv Poinsett 76" ) ที่มีอายุได้ 2 สัปดาห์ โดยการนำเอาใบเลี้ยงของแตงกวามาอบด้วยแก๊ส เอธิลีนที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/ลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำใบเลี้ยงมาสกัด สารสกัดที่ได้จะมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000-33,000 ดาลตัน เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และพิสูจน์ได้ว่าโปรตีนที่เพิ่มขึ้นไม่ใช่ นิวคลีเอส (nuclease) เพราะเมื่อทำการวัดระดับ DNase และ Rnase แล้วให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่

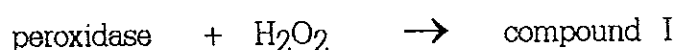
พบว่าลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน (amino acid sequence) ของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นนั้น มีการจัดเรียงตัวคล้ายกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบรื่ออกซิเตสจาก turnip และ horseradish ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โปรตีนที่เพิ่มขึ้นในสารสกัดจากใบเลี้ยงแตงกวาเนื่องจากการอบด้วยแก๊สเอธิลีน คือ เบรื่ออกซิเตส จากนั้นได้ทำการพิสูจน์ต่อว่า เบรื่ออกซิเตสที่ได้เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จริง โดยการนำเอาต้นอ่อนของแตงกวามา pretreat ด้วยเอธิลีนความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/ลิตร หรือ อากาศปกติ (ชุดควบคุม) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใบเลี้ยงจะถูกตัดออกมา treat ด้วย  $[^{35}\text{S}]\text{Na}_2\text{SO}_4$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเอาใบเลี้ยงมาสกัด สารสกัดที่ได้นำไป run เจล ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนด้วยการย้อมด้วยสี coomassie blue และการใช้ autoradiograms ซึ่งสามารถติดตามแถบโปรตีนที่มี radioactive ได้ ผลการทดลองพบว่า แถบโปรตีนขนาด 30,000-33,000 ดาลตัน ที่ได้จากสารสกัดจากใบเลี้ยงแตงกวาที่ถูกอบด้วยแก๊สเอธิลีน จะมีค่า radioactive มากกว่า แถบโปรตีนของสารสกัดจากใบเลี้ยงแตงกวาของชุดควบคุม แสดงว่า โปรตีน (30-33KD) เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ โดยการชักนำของแก๊สเอธิลีน ทั้งนี้เพราะเซลล์พืชจะสามารถเปลี่ยน  $[^{35}\text{S}]\text{ sulfate}$  ไปอยู่ในรูปของ methionine และ cysteine ที่มี radioactive ติดอยู่ได้ และเมื่อเปลี่ยนไปเป็น  $[^3\text{H}]\text{ leucine}$  ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

Biles C.L., Abeles F.B. และ Wilson C.L. (1990) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับผลของเอธิลีนต่อการต้านทานโรคของพืชในแตงกวา จากการวิจัยพบว่า เอธิลีนสามารถชักนำการสร้างเบรื่ออกซิเตส และ hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP) ได้ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้อาจมีผลเกี่ยวข้องกับการเกิดการต้านทานโรคของพืช

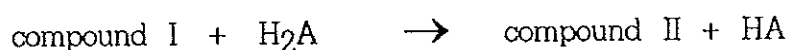
ส่วนอีกหน้าที่หนึ่งของเบรื่ออกซิเตส พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับขบวนการนำเสียของพืช เช่น ในมันสำปะหลังจะเกิดการนำเสียอย่างรวดเร็วหลังการเก็บเกี่ยว จากการศึกษพบว่า ลักษณะของเบรื่ออกซิเตสที่บริเวณเปลือกจะมีลักษณะต่างจากเบรื่ออกซิเตสในส่วนเนื้อของมันสำปะหลัง (ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล และ มนตรี จุฬาวังนทล , 2532)

Huystee และ Cairns (1982) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ของถั่วลิสง (peanut cells) ในอาหารเหลว สารสกัดที่ได้จากเซลล์ดังกล่าวประกอบด้วยเบรื่ออกซิเตสจำนวนมาก คิดเป็น 2% ของปริมาณโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นทั้งหมด ปริมาณเบรื่ออกซิเตสที่ถูกปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเหลว จะมีมากกว่าที่สกัดได้จากเซลล์ (cell extract) แสดง-

ว่าเปอร์ออกซิเดสนี้เป็น extracellular และ Maldonado และ Huystee (1980) พบว่ามีเปอร์ออกซิเดสปริมาณ 75 % ของปริมาณเปอร์ออกซิเดสทั้งหมดที่อยู่ในอาหารเหลว จะมีสมบัติเป็น cationic isozyme มีน้ำหนักโมเลกุล 40,000 ดาลตัน ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 15 % และมีลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับเปอร์ออกซิเดสจาก horseradish มีกลไกการทำงานที่สามารถเปลี่ยนจากรูปเอนไซม์ปกติไปเป็น compound I โดยอาศัย  $H_2O_2$



และ compound I เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนเป็น compound II



ส่วน compound II เมื่อรับอิเล็กตรอนอิสระอีกก็สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นเอนไซม์ปกติได้ ดังนี้



$H_2A$  คือ reducing substrate ซึ่งเปอร์ออกซิเดสสามารถใช้ได้ ซึ่งได้แก่ สารประกอบจำพวก phenolic, สารประกอบอะโรมาติกเอมีน หรืออาจจะเป็นสารประกอบอนินทรีย์บางชนิด เช่น ferrocyanide

สำหรับพืชยืนต้นถึงแม้จะมีการศึกษาไม่มากนัก แต่ได้มีการพบว่าเปลือกยางพาราที่ได้จากการกรีดหรือทำให้เกิดบาดแผลบริเวณต้น มีปริมาณเปอร์ออกซิเดสสูงมากและสูงกว่าในน้ำยางพาราหลายร้อยเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับต่อหน่วยน้ำหนักที่เท่ากัน เปอร์ออกซิเดสที่ทำปฏิกิริยาจากเปลือกยางพาราจะประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เดี่ยว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน และเมื่อทำการย้อมแอสซิไดต์ของเอนไซม์ที่ได้จากเปลือกยาง เทียบกับในซี-ซีรัมน้ำยาง ด้วย *o*-dianisidine พบว่าเป็นไอโซไซม์คนละชนิดกันโดยมีตำแหน่งของโปรตีนที่แตกต่างกัน (Sattayasevana , 1990)

## 1.2. Aqueous two-phase system

ในปี ค.ศ. 1896 Beijerinck, เป็นผู้ ค้นพบวิธีนี้เป็นคนแรก โดยค้นพบว่าถ้านำ gelatin มาผสมกับ agar หรือน้ำแข็ง ของผสมที่ได้จะมีลักษณะขุ่น และแยกตัวออกเป็น

สองชั้น โดยส่วนของชั้นล่างจะประกอบด้วย agar ทว่า น้ำแข็งเป็นส่วนมาก ส่วนชั้นบนก็จะประกอบด้วย gelatin ต่อมาในปี ค.ศ. 1950 Albertson ได้ค้นพบการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากของผสม โดยอาศัยความแตกต่างในการเกิด partitioning ของ immisible two-phase system (Almqvist and Wiksell, 1960) ซึ่งหลักสำคัญของเทคนิคนี้ ประกอบด้วย น้ำ และ พอลิเมอร์ 2 ชนิด ที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic พอลิเมอร์ตัวที่นิยมใช้ คือ polyethylene glycol (PEG) กับ dextran (DX) หรืออาจจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ กับเกลือ โดยเกลือที่นิยมใช้คือ เกลือฟอสเฟต และการเกิด phase ระหว่าง พอลิเมอร์กับพอลิเมอร์จะเกิดจากแรงดึงผิวที่แตกต่างกัน ดังนั้นอาจจะมี การเติมพวก minor contaminants เช่น detergents หรือ surfactants ต่าง ๆ เพื่อช่วยให้เกิดแรงดึงผิวบริเวณผิวหน้า (surface) ส่วนการเกิดการแยกชั้นระหว่างพอลิเมอร์กับเกลือจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของคุณสมบัติทางด้านกายภาพ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการเกิด phase ในกรณีนี้จะพบว่า ชั้นบนจะประกอบด้วยพอลิเมอร์เป็นส่วนมาก ในขณะที่ชั้นล่างจะเป็นส่วนของเกลือหรือ DX (Dove and Mitra, 1986)

การนำเอาเทคนิคการทำ aqueous two-phase มาใช้ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์ มีข้อได้เปรียบหลายประการ คือ ระบบมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ ทำให้ไม่เกิดความรุนแรงต่อเสถียรภาพ (stability) ของสารชีวโมเลกุล เพราะค่าแรงดึงผิว (interfacial tensions) ในระบบนี้จะต่ำกว่าระบบ aqueous-organic หรือ organic-organic ตัวอย่างเช่น ค่าแรงดึงผิวระหว่าง ฟีนอลกับน้ำ เท่ากับ 50 dyne/cm. ในขณะที่ค่าแรงดึงผิวของ aqueous two-phase system เท่ากับ 0.1 dyne/cm. จึงทำให้การสูญเสียสภาพโปรตีนเกิดได้น้อยมากและของผสมที่ได้สามารถแยกออกจากกันได้ง่ายโดยตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นเอง หรือเอาไปปั่นให้แยกชั้นด้วยเครื่องมือเหวี่ยงที่มีความเร็วไม่สูงนัก ก็สามารถเกิดการแยกชั้นได้ ถ้าเป็นการทำการแยกชั้นระหว่าง พอลิเมอร์กับเกลือ การแยกชั้นของระบบจะขึ้นอยู่กับค่า pH และคุณสมบัติของเกลือที่ใช้ซึ่งจะมีผลกระทบต่อขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ขั้นต่อไปน้อยมาก นอกจากนั้น เทคนิคนี้สามารถทำได้ง่ายและง่ายต่อการขยายปริมาณการสกัดในปริมาณสูงได้ รวมทั้งใช้เวลาไม่มากนักจึงเป็นการประหยัดเวลาด้วย

aqueous two-phase system จึงเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้กันมากโดยเฉพาะในการวิเคราะห์ทางชีวเคมี และ เทคโนโลยีชีวภาพ (Albertson, 1986) และที่สำคัญวิธีนี้ช่วยแก้-

ปัญหาการกำจัดสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่มากในสารสกัดจากพืช โดยทั่วไปแล้ว การเลือกแหล่งวัตถุดิบสำหรับสกัดเอนไซม์ส่วนใหญ่มักจะมาจากสัตว์ ทั้งนี้เพราะเซลล์สัตว์มีผนังเซลล์น้อยและผนังเซลล์ไม่เหนียวแบบเซลล์พืช นอกจากนี้ในเซลล์พืชยังประกอบด้วย เส้นใยเซลลูโลสซึ่งฝังตัวอยู่ใน phycocolloids มีลักษณะคล้ายกับ pectins, carragecnans, agar และ alginates ซึ่งสารเหล่านี้มีผลทำให้สารสกัดที่ได้จากพืชมีความหนืดสูงและอิทธิพลของสารจาก secondary metabolite ซึ่งมีมากในแวคิววอล (vacuoles) จะมีผลทำให้เสถียรภาพ (stability) ของเอนไซม์ลดลงในระหว่างขบวนการสกัด (Harborne, 1989) สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีอยู่มากมาย เช่น tannins หรืออาจจะเป็น pigment ที่มีลักษณะคล้ายกับ anthocyanins หรือ flavanoids (Loomis, 1974) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถตรึงเอาเอนไซม์ไว้แล้วเกิดเป็นสารที่คล้ายพอลิเมอร์ ทำให้เป็นปัญหาในการแยกเอาเอนไซม์ออกในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ดังนั้น การเลือกวัตถุดิบในการสกัดเอนไซม์จากพืชมักจะหลีกเลี่ยงวัตถุดิบที่มี slimes pigment และ ฟีนอล เช่น สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) แต่เมื่อค้นพบเทคนิคการทำ aqueous two-phase system พบว่าสามารถแก้ไข ปัญหาเหล่านี้ได้ผลดีทำให้มีการนำเอาสาหร่ายสีน้ำตาล *Ascophyllum nodosum* (Vilter, 1984) รวมทั้ง *Laminaria saccharina* และ *Laminaria digitata* (Jordan and Vilter, 1990) มาเป็นวัตถุดิบในการสกัดสาร พบว่า ในสารสกัดที่ได้มีเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโบรมไนด์ (bromide) และไอโอดด์ (iodide) โดยใช้ hydrogen peroxide และมี vanadium เป็น prosthetic group

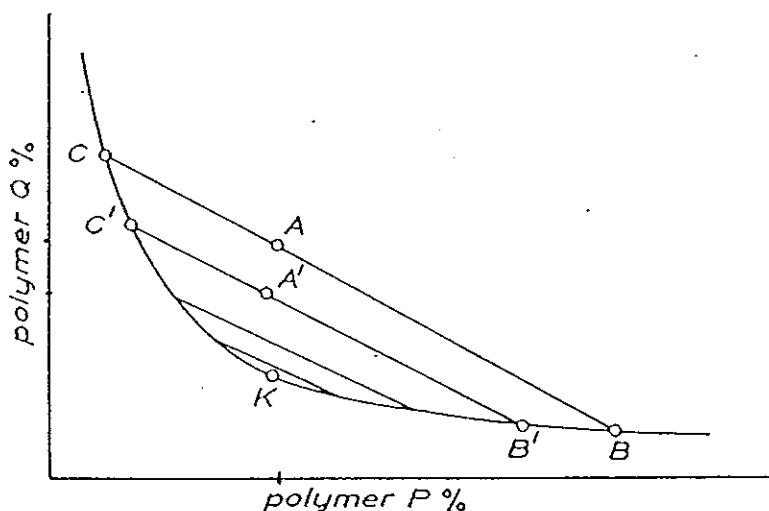
ตลอดเวลาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาประยุกต์ เทคนิคนี้กับงานวิจัยต่าง ๆ มากมาย เช่น มีการพยายามค้นหาพอลิเมอร์ที่มีราคาไม่แพง มาใช้ในการพัฒนาเทคนิคนี้ให้มีความเป็น biospecific สำหรับเซลล์ต่าง ๆ ทำให้ขบวนการทำบริสุทธิ์มีความรวดเร็วมากขึ้น ใช้เป็นตัวยึดโปรตีน โดยอาศัยเทคนิคการทำคอลัมน์ร่วมด้วยสำหรับการแยกโปรตีน และกรดนิวคลีอิก, พัฒนาให้เทคนิคนี้ใช้ได้ทั้งที่อุณหภูมิสูงและต่ำ มีการนำเอาพวกสารอนินทรีย์ที่ละลายน้ำมาใช้ร่วมด้วยเพื่อทำการแยกชั้นสารที่ไม่ค่อยละลายน้ำ

### 1.2.1 คุณสมบัติของ phase

การรวมกันระหว่างของสองอย่างที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (immisibile) อาจจะทำให้เกิดชั้นระหว่าง พอลิเมอร์ กับ พอลิเมอร์ หรือระหว่าง พอลิเมอร์ กับ เกลือ ปริมาณที่ใช้



ในการเกิด phase ระหว่างพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ สามารถเขียนเป็น phase diagram ได้ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 phase diagram ระหว่าง พอลิเมอร์ P กับ พอลิเมอร์ Q ในน้ำที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

เส้นโค้ง CB ที่ลากแบ่งพื้นที่ออกเป็น 2 ส่วน เรียกว่า binodal curve ตำแหน่งบริเวณเหนือเส้นโค้ง เป็นบริเวณที่เกิด two-phase ในขณะที่บริเวณใต้เส้นโค้งจะไม่เกิดการแยก phase ส่วนจุด B, B', C และ C' เรียกว่า node เส้นที่ลากจากจุด C → จุด B และจากจุด C' → จุด B' เรียกว่า tie-line จุด A และ A' เป็นตำแหน่งบนเส้น tie-line CB และ C'B' ตามลำดับ อัตราส่วนระหว่างความยาวของเส้น AB/AC หรือ AB'/AC' จะเท่ากับ อัตราส่วนของปริมาณน้ำหนัก phase บน ต่อปริมาณน้ำหนัก phase ล่าง (น้ำหนักคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ w/w) ของจุด A และ จุด A' ในการเกิด phase ซึ่งความสัมพันธ์นี้ได้จากสมการที่ 1-9

$$m_t + m_b = m_o \dots\dots\dots 1$$

โดยที่  $m_t$  = น้ำหนักพอลิเมอร์ P ใน phase บน

$m_b$  = น้ำหนักพอลิเมอร์ P ใน phase ล่าง

$m_o$  = น้ำหนักรวมของพอลิเมอร์ P

แต่  $m_t = V_t d_t \cdot C_t / 100$  .....2

และ  $m_b = V_b d_b \cdot C_b / 100$  .....3

โดยที่  $V_t$  และ  $V_b$  = ปริมาณของพอลิเมอร์ P ใน phase บน และ phase |  
ล่าง

$d_t$  และ  $d_b$  = ความหนาแน่นของพอลิเมอร์ P ใน phase บน และ  
phase ล่าง

$C_t$  และ  $C_b$  = ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ P คิดเป็นเปอร์เซ็นต์  
(w/w) ของ phase บน และ phase ล่าง

ดังนั้น  $m_o = (V_t d_t + V_b d_b) \cdot C_o$  .....4

โดยที่  $C_o$  = ความเข้มข้นรวมของพอลิเมอร์ P คิดเป็นเปอร์เซ็นต์  
(w/w)

แทนค่าสมการที่ 2, 3, และ 4 ลงในสมการที่ 1

$$V_t d_t \cdot C_t + V_b d_b \cdot C_b = (V_t d_t + V_b d_b) \cdot C_o \quad \dots\dots\dots 5$$

หรือ  $V_t d_t = C_b \cdot C_o$  .....6

$$V_b d_b = C_o \cdot C_t$$

แต่จาก diagram  $C_b \cdot C_o = AB$  .....7

$$C_o \cdot C_t = AC$$

ดังนั้น  $V_t d_t = AB$  .....8

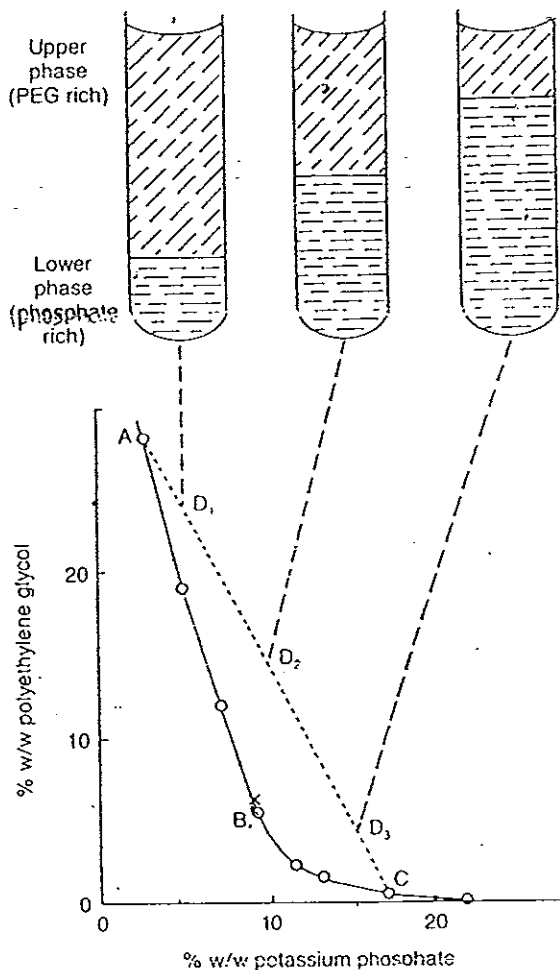
$$V_b d_b = AC$$

และ  $V_t = d_t AB$  .....9

$$V_b = d_b AC$$

แต่ความหนาแน่นของพอลิเมอร์ไม่แตกต่างจากความหนาแน่นของน้ำมากนัก (ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของพอลิเมอร์ 1.00 - 1.10 ) ดังนั้น อัตราส่วนปริมาตรของ phase บน และ phase ล่าง ที่จุด A อาจประมาณได้จากอัตราส่วนระหว่างความยาวของ เส้น AB และ AC บน tie-line

ส่วนการเกิด phase ระหว่าง พอลิเมอร์ กับ เกลือ สามารถเขียนเป็น phase diagram ได้ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 phase diagram ระหว่าง Polyethylene glycol (PEG) กับ เกลือ potassium phosphate (Huddleston *et.al.* 1991)

A = ตำแหน่งที่มีองค์ประกอบของชั้นบนมาก (PEG-rich)

C = ตำแหน่งที่มีองค์ประกอบของชั้นล่างมาก (salt-rich)

B = critical point คือ ตำแหน่งที่มีค่า partition coefficient เท่ากับ 1

D1, D2 และ D3 แสดงตำแหน่งที่อยู่บน tie-line เดียวกัน จึงให้ค่า partition coefficient เท่ากัน แต่ปริมาณของ phase บน และ phase ล่าง แต่ละจุดไม่เท่ากัน

ค่า partition coefficient (K) เป็นค่าที่แสดงถึง อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนในชั้นบนต่อปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนในชั้นล่าง สามารถหาได้จากสมการที่ 1

$$K = C_T / C_B \quad \text{-----1}$$

โดยที่  $C_T$  = ความเข้มข้นของโปรตีนชั้นบน

$C_B$  = ความเข้มข้นของโปรตีนชั้นล่าง

ค่า K จะเป็นค่าคงที่เฉพาะของระบบหนึ่งเท่านั้น ในระบบที่ต่างไปก็จะมีค่า K ที่ต่างไปด้วย ใน phase หนึ่ง ๆ จะประกอบด้วยโมเลกุลที่แตกต่างกันออกไป จึงเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลทำให้มีพลังงานเกิดขึ้น ค่าพลังงานที่เกิดขึ้นหาได้จากสมการของ Bronstedt เป็นสมการที่ 2

$$K = e^{\lambda M / kT} \quad \text{-----2}$$

โดยที่  $\lambda$  = ตัวบ่งบอกลักษณะของ phase system และแรงดึงดูดของสารประกอบ

M = ค่าน้ำหนักมวลโมเลกุล

k = ค่าคงที่ของ Boltzmann

T = อุณหภูมิ

ถ้าสารประกอบมีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง ( $M_r > 10^6$ ) ค่า K ที่ได้จะเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก แม้ว่าค่า  $\lambda$  จะเปลี่ยนแปลงก็ตาม

สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย การเกิดการแยกชั้น สามารถเกิดการแยกได้หลายรูปแบบ ทำให้ได้ค่า K ที่มีช่วงกว้างมาก มีค่าตั้งแต่ 0.02 - 1.0 ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์และเกลือที่ใช้

แต่ในกรณีที่เกิดการแยกชั้นแล้ว โปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในชั้นหนึ่งชั้นใดเพียงชั้นเดียว ให้ใช้ค่า partition ratio (P) เป็นตัวบ่งบอกความสามารถในการแยกโดยคิดเป็นร้อยละเทียบกับปริมาณเริ่มต้นทั้งหมด

## 1.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการ partitioning aqueous two-phase system

### 1.2.2.1. ขนาดของพอลิเมอร์

ลักษณะโครงสร้างของพอลิเมอร์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ โครงสร้างของ

พอลิเมอร์ จะประกอบด้วย ionic groups และ น้ำหนักมวลโมเลกุล โดยทั่วไปพบว่าถ้าใช้พอลิเมอร์ ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลน้อยจะทำให้มีพื้นที่ของชั้นล่าง ( bottom phase ) เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบความเร็วในการแยกชั้นระหว่าง พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลมาก กับพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลน้อย พบว่า หากใช้พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลมาก จะใช้เวลาในการเกิดการแยกชั้นน้อยกว่าพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลน้อย ถ้ามีเปอร์เซ็นต์พอลิเมอร์เท่ากัน

#### 1.2.2.2. ชนิดของเกลือ

ชนิดของเกลือที่ใช้ก็มีผลต่อความสามารถ ในการแยกสารเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะ biomaterials ที่มีประจุ (charge) ที่เปลี่ยนแปลงตาม pH ดังนั้นการเลือกชนิดของเกลือและ pH จึงมีผลต่อค่า partition coefficient หรือ partition ratio

ในระบบการเกิด phase ระหว่าง PEG กับ DX พบว่า โปรตีนจะ partition ไปอยู่ในชั้นของ DX ได้ดีกว่าชั้น PEG และค่า K จะยิ่งสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ พอลิเมอร์ นอกจากนี้ค่า K จะเปลี่ยนแปลงได้โดยใช้เกลือที่ระดับความเข้มข้น 25 - 250 mM ค่า K ของโปรตีนที่มีประจุเป็นลบจะมีเรียงลำดับจาก น้อย→มาก ดังนี้  $\text{ClO}_4^- < \text{SCN}^- < \text{I}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{acetate} < \text{F}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{HPO}_4^{2-}$  ส่วนประจุบวกเรียงลำดับจาก น้อย→มาก ดังนี้  $\text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Li}^+$  นั่นคือ โปรตีนที่มีประจุเป็นลบ จะอยู่ในชั้น DX เมื่อมี  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SCN}^-$  และ  $\text{I}^-$  แต่จะอยู่ในชั้น PEG เมื่อมี  $\text{SO}_4^{2-}$  และ  $\text{HPO}_4^{2-}$  ส่วนโปรตีนที่มีประจุเป็น บวก จะได้ผลในทางตรงกันข้าม ความสัมพันธ์ที่ได้จะเป็นไปตามสมการที่ 3

$$\log K = \log k_0 + \gamma Z \quad \text{-----}3$$

K = ค่า partition coefficient

$k_0$  = ค่า partition coefficient ของโปรตีนที่ไม่มีประจุ

Z = ปริมาณโปรตีนที่มีประจุลบ

$\gamma$  = factor ที่ขึ้นอยู่กับ composition ของ phase system และชนิดของเกลือที่ใช้

แม้ว่า DX และ PEG จะไม่มีประจุ แต่ไอออนของเกลือบางชนิดจะจับกับ DX และ PEG ได้แตกต่างกัน จึงทำให้เกิดการแยกชั้นของสารที่มีประจุแตกต่างกัน

### 1.2.2.3. ความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือ

การเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือ เป็นการเพิ่มแรงตึงผิว (interfacial tensions) ทำให้สามารถเกิดการแยกได้ดีขึ้น โดยการเพิ่มความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือให้สูงขึ้น จะเป็นการทำให้เกิดการแยกชั้นของสาร หรือโปรตีนไปอยู่ในชั้นใดชั้นหนึ่งมากขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปโปรตีนมักจะอยู่ในชั้นของ Dextran หรือเกลือมากกว่าอยู่ในชั้นของ PEG

### 1.2.2.4. การดัดแปลง (modified) รูปแบบของพอลิเมอร์

การเชื่อม (link) กลุ่มที่มีประจุ (charge group) เข้ากับพอลิเมอร์ เช่น PEG จะทำให้การ partition ของโปรตีนขึ้นกับ pH มากขึ้น และ ทำให้การแยกเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ การนำเอา PEG มาเชื่อมต่อกับ ligand จำพวกโคเอนไซม์ หรือ แอนติบอดี (antibody) จะทำให้เกิดการแยกชั้นไปอยู่ในชั้นของ PEG ได้ดียิ่งขึ้น วิธีนี้เรียกว่า " affinity partitioning " นิยมใช้ในการแยก พวกโปรตีน เซลล์ต่าง ๆ รวมทั้ง เมมเบรน (membranes) นอกจากนี้อาจทำการเชื่อม PEG กับ aliphatic chain เรียกวิธีนี้ว่า " hydrophobic partitioning "

### 1.2.2.5. อุณหภูมิ และ pH

การเกิดการแยกชั้น (partition) ระหว่างพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ จะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิ เพราะการแยกชั้นโดยใช้พอลิเมอร์ชนิดเดียวกันแต่ทำที่อุณหภูมิต่างกัน phase diagram ที่ได้จะต่างกัน รวมทั้งอุณหภูมิก็นมีผลในการทำให้เกิดการแยกได้ช้าหรือเร็ว พบว่า ระหว่าง PEG กับ DX จะสามารถเกิดการแยก phase ได้ดีถ้ามีความเข้มข้นของพอลิเมอร์น้อย ๆ และทำที่อุณหภูมิต่ำ ในขณะที่ระบบของ dextran-methyl cellulose การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิไม่มีผลต่อระบบ ส่วนระบบของพอลิเมอร์กับเกลือ จะเกี่ยวข้องกับ pH เพราะประจุในระบบจะเปลี่ยนแปลงตามค่า pH

### 1.2.2.6. ชนิดของพอลิเมอร์และเกลือ

เวลาที่ใช้ในการเกิด phase จะขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ และเกลือ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของเวลาในการเกิด phase ระหว่าง พอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ และ เกลือ

Phase system	Time
salt - polyethylene glycol	5-15 min
dextran - polyethylene glycol	5-60 min
dextran sulfate - polyethylene glycol	5-60 min
dextran - methylcellulose	1-12 hrs
dextran sulfate - methylcellulose	1-12 hrs
dextran - polyvinylalcohol	0.5-6 hrs
dextran sulfate - polyvinylalcohol	0.5-6 hrs
dextran - hydroxypropyldextran	0.5-6 hrs
dextran sulfate - hydroxypropyldextran	0.5-6 hrs

ที่มา : Almqvist and Wiskell 1960. " Partion of Cell Particles and Macromolecules " John Wiley and Son. New York หน้าที่ 89

### 1.2.3 การแยกพอลิเมอร์ออกจากโปรตีน หรือ เอนไซม์

ในการสกัดแยกเอาเอนไซม์ โดยอาศัยเทคนิค aqueous two-phase system ในกรณีนี้เอนไซม์ที่ต้องการแยกนั้นอยู่ในชั้นบน คือ อยู่ร่วมกับ PEG การที่จะแยกเอาเอนไซม์ออกจาก PEG นั้นสามารถทำได้ 3 วิธี ดังนี้

ก. แยกเอาชั้นบนที่มี PEG + เอนไซม์ที่ต้องการ มาเติมเกลือทำให้เกิด phase ใหม่ เพื่อให้เอนไซม์กลับลงมาอยู่ในชั้นของเกลือ จากนั้นสามารถแยกเอาเกลือออกได้โดยการผ่าน ultrafiltration หรือ dialysis

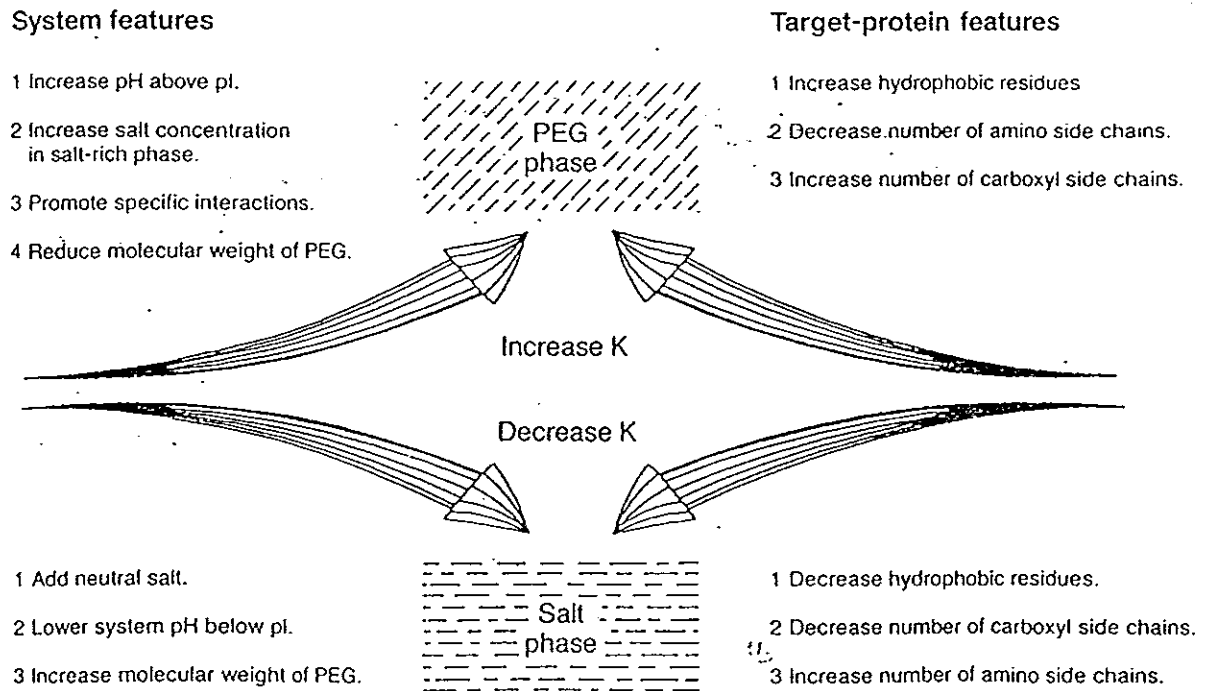
ข. อาจแยกเอาเอนไซม์ออกจาก PEG โดยตรง โดยการทำให้เจือจางมาก ๆ แล้วนำไปผ่าน ultrafiltration membrane วิธีนี้สามารถใช้ได้กับเอนไซม์ที่มีโมเลกุลสูงมาก ๆ (highmolecular weight) แต่ได้ผลไม่ค่อยดีนัก



ค. อาศัยการเกิด absorption ของเอนไซม์กับ ion exchangers หรือ ทาตัว absorbents ที่เหมาะสม ที่เอนไซม์สามารถจับ (bind) ได้ดี อาจจะต้องทำการปรับ pH หรือ เปลี่ยนแปลง ionic strength ทำให้ PEG จะถูกชะออกมาก่อน ส่วนเอนไซม์ ที่ต้องการก็จะถูกชะ (elute) ออกมากับบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่หลัง

#### 1.2.4 กลไกการเกิด phase ระหว่าง PEG / เกลือ ในการแยกโปรตีน

กลไกการเกิด phase ระหว่าง PEG กับ เกลือ ในการแยกโปรตีนไม่สามารถสรุปเป็นกฎเกณฑ์แน่นอนได้ (Huddleston *et.al.*, 1991) เพราะระบบสามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อมีปัจจัยหนึ่งปัจจัยใดเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ค่า K ของระบบเพิ่มขึ้นหรือลดลง เช่น ถ้าโปรตีนถูกแยกขึ้นไปอยู่ในชั้นบนเพิ่มมากขึ้น ค่า K ก็เพิ่มขึ้นด้วย ( $K = CT/CB$ ) ซึ่งการที่จะทำให้โปรตีนถูกพาขึ้นไปชั้นบนอาจทำได้โดยการ เพิ่ม pH ของระบบให้สูงกว่าค่า pI ของโปรตีน ทำให้โปรตีนส่วนใหญ่มีประจุเป็น ลบ โปรตีนก็จะขึ้นไปอยู่ในชั้น PEG ถ้าปรับ pH ให้ลดต่ำกว่าค่า pI ของโปรตีนทำให้โปรตีนมีประจุเป็น บวก โปรตีนก็จะชอบ ที่จะอยู่ในชั้นเกลือมากกว่า กรณีนี้ทำให้ค่า K ลดลง นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ การเปลี่ยนแปลงพอลิเมอร์ให้มีประจุ ทำให้พอลิเมอร์สามารถจับกับโปรตีนที่มีประจุตรงกันข้ามได้ดีก็มีผลทำให้โปรตีนถูกพาขึ้นไปอยู่ในชั้นบนเพิ่มมากขึ้น สำหรับโครงสร้างของโปรตีนก็เช่นกัน ถ้าส่วน residues มีความเป็น hydrophobic เพิ่มมากขึ้นโปรตีนก็จะขึ้นไปอยู่ในชั้น PEG ได้ดี เช่นเดียวกับการที่โปรตีนมีลักษณะเป็นสายสั้น ๆ หรือมี carboxyl group มากจะสามารถจับกับ PEG ได้ดี ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แผนภาพสรุประบบ aqueous two-phase system ระหว่าง PEG กับ เกลือ จาก Huddleston *et.al*, 1991

### 1.3. การกำจัดสารพิษพวกสารประกอบฟีนอล (phenol) และ สารประกอบอะนิลีน (aniline) จากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม

ฟีนอลและอะนิลีน เป็นสารที่ตรวจพบได้จากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น โรงงานแปรรูปถ่านหิน, โรงงานทำพลาสติกและเรซิน, โรงงานปิโตรเลียม, โรงงานสิ่งทอและสี ย้อม, โรงงานผลิตสารเคมี, โรงงานผลิตสบู่และสารทำความสะอาด (detergents) โรงงานทำผ้า เพดาน, โรงงานเสื้อผ้าสำเร็จรูป และโรงงานทำเหล็กและเหล็กกล้า เป็นต้น ซึ่งพบว่า ทั้งฟีนอล และอะนิลีนมีความเป็นพิษ ตัวอย่างเช่น benzidine และอนุพันธ์ของ naphthalmine, aminoazobenzenes และ o-toluidine สารเหล่านี้ตรวจพบว่าเป็นสารก่อเกิดมะเร็งใน มนุษย์ (human carcinogens) (Alberti and Klibanov, 1981) นอกจากนี้ สาร ประกอบ phenolics ซึ่งพบมากในน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกสีกระดาษ ในขั้นตอนการฟอกสีเนื้อไม้ ด้วยต่างเป็นสารที่เป็นอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำ (Peyton, 1984) ดังนั้นการกำจัดสารเหล่านี้ออกจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม ก่อนที่จะปล่อยน้ำ ทิ้งเหล่านี้ลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ จึงเป็นสิ่งจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่งที่ควรปฏิบัติ

สำหรับวิธีการที่นิยมกระทำกันในการกำจัดสารพิษเหล่านี้ อาจใช้เทคนิคการดูดซับบน คาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon), การกลั่นด้วยไอน้ำ, การสลายด้วยเบคทีเรีย และ การออกซิไดซ์สารเคมีโดยอาศัยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า หรือ การฉายแสง เป็นต้น ซึ่ง วิธีการทั้งหมดนี้ถึงแม้จะใช้ได้ผล แต่ก็มีข้อเสียหลายอย่าง เช่น ต้องใช้จ่ายสูงมาก, ไม่สามารถ กำจัดสารพิษได้หมดสมบูรณ์ และยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่อันตราย โดยเกิดการสร้าง สารใหม่ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-products) กลายเป็นสารพิษ (hazardous) ใหม่ขึ้นมา แทน (Alberti and Klibanov, 1981)

Klibanov และคณะ (1980) ได้ทำการศึกษาคิดหาวิธีการกำจัดสารประกอบฟีนอลและ อะนิลีน โดยการใช้เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถพอลิเมอร์ไรซ์สารประกอบฟีนอล เป็น lignin ในพืช ในการทดลองเลือกใช้ horseradish peroxidase (HRP) พบว่า HRP สามารถออกซิไดซ์ฟีนอลและสารประกอบอะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) ต่าง ๆ ด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ทำให้เกิดเป็น phenoxy radical และอนุมูลอิสระของสาร อะโรมาติกเอมีน ซึ่งอนุมูลเหล่านี้ สามารถแพร่กระจายจากบริเวณแรงของเอนไซม์เข้าสู่สาร ละลายและทำปฏิกิริยากันทำให้เกิดการพอลิเมอร์ไรซ์ ได้ผลผลิตเป็นสารพอลิเมอร์ ลักษณะเด่น

ของพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นคือ การไม่ละลายน้ำมีลักษณะเป็นตะกอน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการเปลี่ยนสภาพสารประกอบฟีนอล และสารประกอบอะโรมาติก จากความเป็นสารที่ละลายน้ำ (water-soluble) ไปเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลดี ทำให้สามารถแยก pollutants ออกจากน้ำได้ง่าย อาจใช้การกรอง (filtration) หรือ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน (sedimentation)

ค่าที่ใช้ในการบอกปริมาณของสารที่สามารถตกตะกอนได้ คือค่า remove efficiency ซึ่งหมายถึง ค่าที่คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารที่ตกตะกอนได้ เทียบกับปริมาณสารก่อนตกตะกอน ในการทดลองตกตะกอนฟีนอลด้วย HRP พบว่าถ้าใช้ HRP ความเข้มข้น 0.5 U/มล. กับ 2 mM  $H_2O_2$  สามารถตกตะกอนฟีนอลที่มีความเข้มข้น 100 ppm. (0.1 กรัม/ลิตร) ได้ค่า remove efficiency เท่ากับ 85 % และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น HRP เป็น 1 U/มล. สามารถตกตะกอนฟีนอลได้เพิ่มมากขึ้นเป็น 99% ในขณะเดียวกัน ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลเป็น 500 ppm. พบว่า HRP 1 U/มล. สามารถตกตะกอน ฟีนอลได้ 98% แสดงว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ HRP ต่ำ ๆ ไม่สามารถตกตะกอนฟีนอลได้หมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เอนไซม์เกิดการ inactivation ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา (Klibanov and Scoott, 1983)

Alberti และ Klibanov (1981) ได้ทำการทดลองตกตะกอนฟีนอลในที่เย็น โดยนำสารละลายฟีนอลมาปรับ pH ให้มี pH เท่ากับ 7 แล้วนำไปแช่ในตู้เย็นจนสารละลายมีอุณหภูมิ ประมาณ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม HRP 100 U และ 2.5 mM  $H_2O_2$  ตั้งทิ้งไว้ 40 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลายมาทดสอบหาปริมาณฟีนอล พบว่ามีฟีนอลเหลืออยู่ 3.3 ppm. ซึ่งจากเริ่มต้นมี 105 ppm. คิดเป็นค่า remove efficiency เท่ากับ 96.5 % นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดลองนำเอา horseradish สดมาปั่นให้ละเอียดแล้วคั้นเอาสารสกัดมาทดสอบ ความสามารถในการตกตะกอนฟีนอลและสารประกอบฟีนอลต่าง ๆ เทียบกับเปอร์ออกซิเดสที่ซื้อมาจากบริษัทผู้ผลิตสารชีวเคมีขาย ผลที่ได้พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ตัวอย่าง เช่น สารสกัดจาก horseradish สามารถตกตะกอนฟีนอลได้ 89.9 % ตกตะกอน 2-chloro phenol ได้ 98.7 % และตกตะกอน 8-hydroxy-quinoline ได้ 98.7 % ในขณะที่เปอร์ออกซิเดสที่ซื้อมาสามารถตกตะกอนฟีนอลได้ 97.6 %

ตกตะกอน 2-chloro phenol ได้ 99.7 % และตกตะกอน 8-hydroxyquinoline ได้ 99.9 % ดังนั้นเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการตกตะกอน ไม่จำเป็นต้องเป็นเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ก็สามารถใช้ตกตะกอนสารพิษเหล่านี้ได้

สารจำพวก polychlorinated biphenyls (PCB's) เป็นสารพิษที่พบในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม เป็นสารที่กำจัดได้ยากมาก ทำการทดลองโดยนำเอา PCB's ซึ่งประกอบด้วย 4,4'-dichlorobiphenyl ปริมาณ 10 ppm. และ 2,4,5,-trichlorobiphenyl ปริมาณ 3 ppm ไปตกตะกอนด้วย HRP โดยใช้ HRP 60 U/มล. กับ 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> พบว่า ไม่มีตะกอนเกิดขึ้น แต่เมื่อนำน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปถ่านหิน (ประกอบด้วย ammonia, chloride, cyanide, thiocyanate และ phenol) มารวมเข้าด้วยกัน สามารถตกตะกอน PCB's ได้ 91% และสามารถตกตะกอนฟีนอลในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปถ่านหินได้ 86% จากปรากฏการณ์นี้จะเห็นว่า แม้ว่า pollutants นั้นจะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ HRP ได้โดยตรง แต่สามารถที่จะตกตะกอนได้ ถ้ามี pollutants ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ HRP รวมอยู่ หรือ การที่มีสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ HRP ได้ดีอาจมีผลทำให้เกิดการรวมกัน (combine) กับสารตัวอื่นทำให้เกิดการตกตะกอนร่วมกัน (Klibanov and Scott, 1983) ซึ่งเป็นข้อดีข้อหนึ่งของการใช้เปอร์ออกซิเดสในการตกตะกอนสารพิษ ทั้งนี้เพราะ ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมนั้น จะมีสารประกอบต่าง ๆ มากมาย ไม่ได้มีสารใดสารหนึ่งเพียงสารเดียว

วิธีการนำเอาเปอร์ออกซิเดสมากำจัดสารพิษนั้นนับว่าเป็นความสำเร็จในการกำจัดสารพิษได้ดีวิธีหนึ่ง และสามารถกำจัดสารพิษได้เกือบสมบูรณ์ร้อยละร้อยเปอร์เซ็นต์ (ข้อมูลแสดงในตารางที่ 2) และค่าใช้จ่ายก็ไม่สูงมาก (น้ำเสีย 1000 ลิตร : 0.69 ดอลลาร์ Alberti, 1981) และได้มีการทดลอง นำเอาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากแหล่งอื่น มาทดสอบความสามารถในการตกตะกอนของสารประกอบฟีนอลและอะนีนีน โดย Boonsiri (1985) พบว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้จาก ผักกวางตุ้ง (choy-sum), ผักบู่ (convolvulus), ตำลึง (climber) และ หัวไชเท้า (horseradish) สามารถก่อให้เกิดพวกฟีนอลิก และสารพวก อะโรมาติกเอมีน เป็นอนุภาคอิสระและเกิดการ polymerize เป็นตะกอน ซึ่งตะกอนนี้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าและสามารถแยกตะกอนออกจากสารละลายได้โดยการกรอง หรือใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นตัวปั่นแยกตะกอน

ตารางที่ 2 การใช้ horseradish peroxidase (HRP), และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ในการตกตะกอนสารประกอบฟีนอล และสารประกอบอะนีน (ที่มา : Alberti and Klibanov, 1981 )

Pollutant	Removal Efficiency
Benzidine	99.94
3,3-Dimethoxybenzidine	99.9
3,3-Diaminobenzidine	99.6
3,3-Dichlorobenzidine	99.9
3,3-Dimethylbenzidine	99.6
1-Naphthylamine	99.7
2-Naphthylamine	98.9
5-Nitro-1-naphthylamine	99.6
N,N -Dimethylnaphthylamine	93.2
Phenol	85.3
2-Methoxyphenol	98.0
3-Methoxyphenol	98.6
4-Methoxyphenol	89.1
2-Methylphenol	86.2
3-Methylphenol	95.3
4-Methylphenol	85.0
2-Chlorophenol	99.9
3-Chlorophenol	66.9
4-Chlorophenol	98.7
2,3-Dimethylphenol	99.7
2,6-Dimethylphenol	82.3
Aniline	72.9

Pollutant	Removal Efficiency
4-Chloroaniline	62.5
4-Bromoaniline	84.5
4-Fluoroaniline	86.4
1,3-Diaminophenol	98.6
Diphenylamine	80.5
1-Naphthol	99.6
2-Nitroso-1-naphthol	98.9
4-Phenylphenol	99.9
8-Hydroxyquinoline	99.8

## วัตถุประสงค์

1. พัฒนาระบบการผลิตเปอร์ออกซิเดสที่บริสุทธิ์จากเปลือกยางพาราในปริมาณสูงให้ได้ปริมาณของเอนไซม์ต่อหน่วยน้ำหนักสูงสุด
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณยางแห้งในน้ำยางกับปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางที่สกัดได้จากต้นยาง
3. ศึกษาสมบัติทางกายภาพ และ จลน์ศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้
4. ทดสอบการนำมาประยุกต์ใช้ของเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้ ในแง่ของความสามารถในการตกตะกอนสารประกอบฟีนอล และ สารประกอบอะโรมาติกบางชนิดซึ่งจะพบในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น โรงงานทำพลาสติกและเรซิน โรงงานสิ่งทอ และ โรงงานผลิตสบู่ เป็นต้น



## 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

### วัสดุ

#### สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อมาจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	-	Merck
Acrylamide	71.1	Merck
Albumin	67,000	Sigma
Ammonium persulfate (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	228.7	Merck
Ammonium sulfate (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132.14	Fluka
Ascorbic acid	-	-
Blue dextran	2x10 <sup>6</sup>	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Coomassie blue R	-	Sigma
Copper sulfate pentahydrate	249.69	Merck
p-Coumaric acid	-	Sigma
DEAE-cellulose (DE 52)	-	Whatman
4,6-Dithionat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	-	-

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Dimethylaminnamaldehyde (C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO)	175.2	Sigma
Ethanol (absolute) (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	-	Merck
Folin phenol reagent	-	Sigma
Indole-3-acetic acid (C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> )	175.2	Sigma
Glycine	75.07	Merck
Horseradish peroxidase type II (HRP)	-	Sigma
Horseradish peroxidase type VI (HRP)	40,000	Sigma
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	34.02	Redel-De-Haan
α-Lactoalbumin	14,400	Sigma
Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	246.48	Hopkin & Williams
2-Mercaptoethanol	78.13	Merck
Methanol	-	BDH
N,N-Methylene bisacrylamide	154.2	Merck
N,N,N,N,-Tetramethylene- diamine (TEMED)	116.2	Sigma
Ovalbumin	45,000	Sigma
o-dianisidine	244.3	Sigma

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Pepsin	34,000	Sigma
Phosphorylase b	94,000	Sigma
Polyethylene glycol	1,500	Fluka
Polyethylene glycol	4,000	Riedel-De-Haan
Polyethylene glycol	6,000	Biochemical
Polyethylene glycol	8,000	Sigma
HO (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> H		
Polyvinyl pyrrolidone	-	-
Potassium carbonate (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	138.21	Fluka
Potassium citrate (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> K <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O)	324.42	Merck
Potassium cyanide	65.11	Merck
Potassium phosphate monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	136.09	Merck
Potassium phosphate dibasic (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	174.2	Merck
Potassium dichromate (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	294	Sigma
Potassium sodium tartrate	282.22	Sigma
Pyrogallol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> )	126.1	Sigma
Sephadex G-100	-	Pharmacia
Sodium acetate anhydrous	82.04	Merck

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Sodium azide	65.02	Merck
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	Merck
Sodium disulfite (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	-	Riedel-de-Haan
Sodium dodecyl sulfate	-	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	40.0	Merck
Sodium phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	156.01	Merck
Sucrose	-	Merck
Thiourea	-	-
Tris (hydroxymethyl aminomethane)	121.1	Fluka

### วัตถุดิบ

เปลือกยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ส่วนใหญ่ได้ทำการซื้อจากชาวสวนยาง บริเวณ ตำบลทุ่งลุง อำเภอ หาดใหญ่ จังหวัด สงขลา และมีบางส่วนได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัย ยางสงขลา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัด.สงขลา , กล่าวนี้ว่า ซื้อจากตลาดสด

## อุปกรณ์

1. CE 272 Linear ultraviolet spectrophotometer series 2 (CeCil).
2. Fraction collector ISCO Model Foxy 200
3. kontron UV-Vis spectrophotometer ของ Unikon 810
4. micropipette ของ Oxford
5. Millipore Pellicon
6. pH meter model SA 230 (Orin research)
7. power supply model 3200
8. pump ISCO model HF
9. UV/Vis Detector ISCO UA-6
10. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 5 ตำแหน่งของ Sartorius รุ่น 2474
11. เครื่องชั่งงานเดียวทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Mettler รุ่น P1210
12. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Sorvall รุ่น SS-3 automatic
19. เครื่องหมุนเหวี่ยง Mistral 4L

## วิธีการ

### 2.1 การศึกษาผลของการใช้สารป้องกันการออกซิเดชัน (antioxidant) และ polyvinylpyrrolidone (PVP) ในการป้องกันการสร้างสีของพอลิฟีนอล (polyphenol) ในขั้นตอนการสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยาง

นำเปลือกยางที่รวบรวมได้จากการกรีดต้นยางพารา มาลอกเอาเส้นสีขาวออก และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) แบ่งเปลือกยางที่บดละเอียดเป็นชุด ๆ ละ 5 กรัม โดยนำแต่ละชุดมาสกัดในน้ำกลั่น หรือ สารละลาย antioxidant จำนวน 5 ชนิด ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังตารางที่ 3 ใช้อัตราส่วน เปลือกยางบดละเอียด 1 กรัม ต่อ น้ำกลั่น หรือ สารละลาย 2 มล. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำมาปั่นแยกตะกอนด้วย เครื่องหมุนเหวี่ยง

Sorvall รุ่น SS-3 automatic ที่ความเร็ว 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที 25 องศาเซลเซียส จะได้สารละลายสีน้ำตาลที่เรียกว่า สารสกัดจากเปลือกยาง (Bark extract) นำสารสกัดที่ได้ แต่ละชุดมาหาปริมาณ เปอร์ออกซิเดส เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการสกัด ในน้ำกลั่น กับการสกัดในสารละลาย antioxidant แต่ละชนิดและแต่ละความเข้มข้น รวมทั้ง เปรียบเทียบสีของสารสกัดที่ได้ในแต่ละชุดโดยการประมาณด้วยสายตา

ตารางที่ 3 แสดงชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant

ชื่อสาร	ระดับความเข้มข้น			
Dithionate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )	0.05%	0.1%	0.2%	0.4%
Sodium disulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )	0.05%	0.1%	0.2%	0.4%
Thiourea	0.05%	0.1%	0.2%	0.4%
Ascorbic	2 mM	4 mM	8 mM	16 mM
PVP	1%	2%	4%	8%

## 2.2. การศึกษาผลของแก๊สเอทิลีน (ethylene) ต่อปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา

นำเปลือกยางสดที่ลอกเอาเส้นสีเขียวออกแล้วมาชั่งน้ำหนักแบ่งเป็นชุด ๆ แต่ละชุดจะมี น้ำหนักเท่ากัน นำเปลือกยางแต่ละชุดมาอบในกล่องพลาสติกขนาดเดียวกันและมีฝาปิดสนิท โดยใส่กล้วยน้ำว้าสุก (*Musa Sapientum Linn*) แบ่งเปลือกยางแต่ละชุดออกมาสกัดในสารละลาย 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ที่ระยะเวลาการอบต่างกัน คือ 0, 21 และ 42 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้แต่ละชุดนำมาปั่นแยกตะกอน จากนั้นนำมาหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส และเปรียบเทียบปริมาณเปอร์ออกซิเดส ที่มีระยะเวลาการอบต่าง ๆ กัน

### 2.3. การศึกษาอัตราส่วนของ polyethylene glycol (PEG) ที่มีขนาดต่าง ๆ กับปริมาณเกลือชนิดต่าง ๆ ในการทำ aqueous two-phase system ของสารสกัดจากยางพารา

ในการทดลองจะนำสารสกัดจากเปลือกยาง 3 มล. ผสมกับ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน คือ 1,500, 4,000, 6,000, และ 8,000 อย่างละ 0.3 กรัม เขย่าจน PEG ละลายหมด แล้วค่อย ๆ เติมเกลือลงไปที่ละน้อยเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้สักครู่ สังเกตว่าสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น หรือไม่ ถ้าสารละลายยังไม่แยกเป็น 2 ชั้น ก็ให้เติมเกลือไปเรื่อย ๆ จนสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น บันทึกปริมาณเกลือที่ใช้ในการทำให้สารละลายแยกชั้น สำหรับเกลือที่ใช้ในการทดลองมี 4 ชนิด คือ K-citrate,  $K_2CO_3$ ,  $MgSO_4$  และ  $(NH_4)_2SO_4$  เมื่อสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น แล้วแยกเอาส่วนชั้นล่างและชั้นบน มาทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส บันทึกผลการทดลอง เนื่องจากเกลือชนิดต่าง ๆ อาจมีผลต่อการทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส เราจึงได้ทำการทดสอบ ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในสารสกัดจากเปลือกยางที่มีเกลือทั้ง 4 ชนิดละลาย อยู่ในปริมาณเดียวกับที่ใช้ในการทำให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น รวมทั้งได้ทำการวัดค่า pH และสังเกตสีของสารละลาย

### 2.4. การสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราแบบปริมาณสูง

#### 2.4.1 การเตรียมเปลือกยางพารา

เปลือกยางพาราที่นำมาทดลอง ได้มาจากสวนยางบ้านทุ่งสูง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในการทดลองจะใช้เปลือกยางที่กรีดจากต้นยางพาราในตอนเช้าของวันที่ทำการทดลอง โดยใช้เปลือกยางครั้งละประมาณ 80 กก. นำเปลือกยางมาแยกเอาส่วนของซี่ยางออก โดยใช้เครื่องแยก ซี่ยางซึ่งดัดแปลงมาจากเครื่องกระเทาะเปลือกถั่ว (รูปที่ 4) จะได้เปลือกยางที่ไม่มีซี่ยาง จากนั้นจะนำมาอบกับกล้วยน้ำว้าสุก (*Musa Sapientum* Linn) ในถังที่มีฝาปิดสนิทเป็นเวลาข้ามคืน หรือประมาณ 16-20 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วน เปลือกยาง 10 กก. ต่อกล้วยน้ำว้าสุก 2 หวีใหญ่ หรือ 3 หวีเล็ก ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเปอร์ออกซิเดส เพราะจากการทดลองเบื้องต้น (ดูข้อ 2.2) พบว่า แก๊สเอทิลีนจากกล้วยสามารถเพิ่มปริมาณเปอร์ออกซิเดสในเปลือกยางได้ จากนั้นนำเปลือกยางมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดที่ดัดแปลงมาจากเครื่องบดเนื้อ (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 เครื่องแยกเปลือกยางออกจากเส้นข้าว



รูปที่ 5 เครื่องบดเปลือกยางที่ดัดแปลงมาจากเครื่องบดเนื้อ



#### 2.4.2 การสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา

นำเอาเปลือกยางที่บดละเอียดมาซึ่งใส่ถุงผ้าถุงละ 3 กก. และทำการสกัดด้วยการนำมาปั่นในเครื่องซักผ้า ซึ่งใช้อัตราส่วน เปลือกยางบดละเอียด 9 กก. (3 ถุง) ต่อสารละลาย 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  24 ลิตร สกัดโดยการปั่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ยกถุงผ้าออกมาปั่นแห้งและรวบรวมสารสกัดที่ได้จากการสกัดและปั่นแห้ง โดยสารสกัดจากเปลือกยางจะมีสีน้ำตาลเข้มขุ่น และจะมีส่วนของเปลือกยางที่เป็นผงละเอียดปนอยู่ด้วย จึงต้องนำมาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Mistral 4L ที่ความเร็ว 2,700 rpm เป็นเวลา 30 นาที 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเอาตะกอนออก นำสารสกัดที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อเป็นการกำจัดตะกอนในส่วนที่จะปั่นออกมาในเวลาที่จะสกัดออกจากขวด centrifuge และสำหรับน้ำที่ใช้ในการสกัดนั้นใช้น้ำประปา เพราะได้ทำการทดลองแล้วว่า ปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำประปาให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อความสะดวกและประหยัดจึงเลือกใช้น้ำประปาแทนน้ำกลั่น



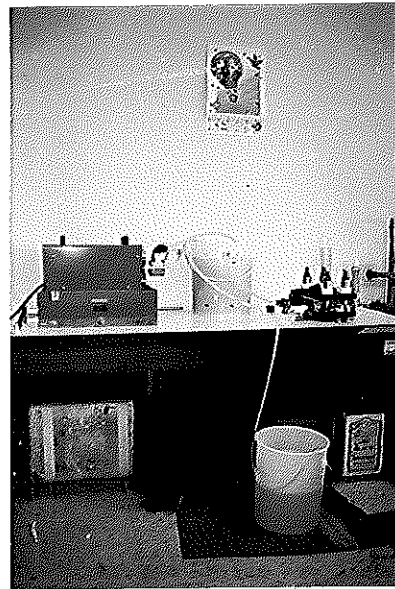
รูปที่ 6 เปลือกยางบดละเอียดในถุงผ้า ถุงละ 3 ก.ก.



รูปที่ 7 การสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราในเครื่องซักผ้า

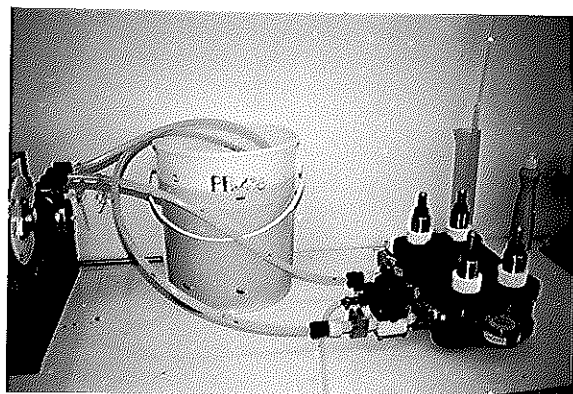
## 2.5. การแยกสารประกอบ phenolics ออกจากสารสกัดจากเปลือกยาง โดยใช้ aqueous two-phase system

สารสกัดจากเปลือกยางที่ได้ มักมีสีน้ำตาลเข้ม ทั้งนี้เกิดจากการปนของสารประกอบจำพวก phenolics และ พอลีฟีนอล สารประกอบพอลิเมอร์เหล่านี้ สามารถรวมตัวกับเออนไซม์ไว้ ทำให้เป็นปัญหาในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ขั้นต่อไป จึงจำเป็นต้องทำการแยกเอาพวกสารสีและสารประกอบดังกล่าวออกจากสารสกัด และวิธีหนึ่งซึ่งสามารถแยกสารประกอบ phenolics ออกได้ผลดี คือ การทำ aqueous two-phase system โดยการเติม polyethylene glycol (PEG) 8,000 10% (w/v) ลงในสารสกัดที่ได้จากขั้นตอน 2.4.2 ทำการคนจน PEG ละลายหมด แล้วจึงเติมเกลือ K-citrate 30% (w/v) คนต่อจนเกลือละลายหมด หลังจากตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที สารละลายจะเริ่มแยกเป็น 2 ชั้น สำหรับการทดลองนี้จะทิ้งไว้ค้างคืน เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณค่อนข้างมากและเพื่อให้เกิดการแยกชั้นที่สมบูรณ์ จะได้สารละลาย 2 ชั้น โดยชั้นบนจะมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำประกอบด้วย PEG สารสี และ สารประกอบ phenolics ส่วนชั้นล่างจะมีสีเหลืองประกอบด้วยเกลือ K-citrate และ เบอรัออกซิเดส ซึ่งจะทำการแยกเอาสารละลายชั้นล่างออกมา จากนั้นจะนำสารละลายชั้นล่างไปแยกเอาเกลือออก (dialyze) โดยการเติมน้ำกลั่นลงในสารละลาย พร้อมทั้งทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการกรองผ่านเครื่อง Ultrafiltration (Millipore Pellicon) ใช้ cassette filter NMWL 30,000 (รูปที่ 8) ตั้งให้ความดันของทางด้าน feed มากกว่าทางด้าน permeate 30 psi ทำให้สารประกอบต่าง ๆ ที่มีขนาดเล็กกว่า 30,000 ดาลตัน รวมทั้งเกลือหลุดออกทาง permeate (ถึง ข รูปที่ 8) สำหรับเอนไซม์เบอรัออกซิเดส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน จะถูกแยกออกมาจากสารประกอบต่าง ๆ ได้ โดยจะอยู่ในส่วน retentate (ถึง ก รูปที่ 8)



ก

ข



รูปที่ 8 เครื่อง Millipore Pellicon

## 2.6. การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสโดยวิธีแลกเปลี่ยนประจุ

### 2.6.1 การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสโดยวิธี แลกเปลี่ยนประจุ แบบ batch-binding

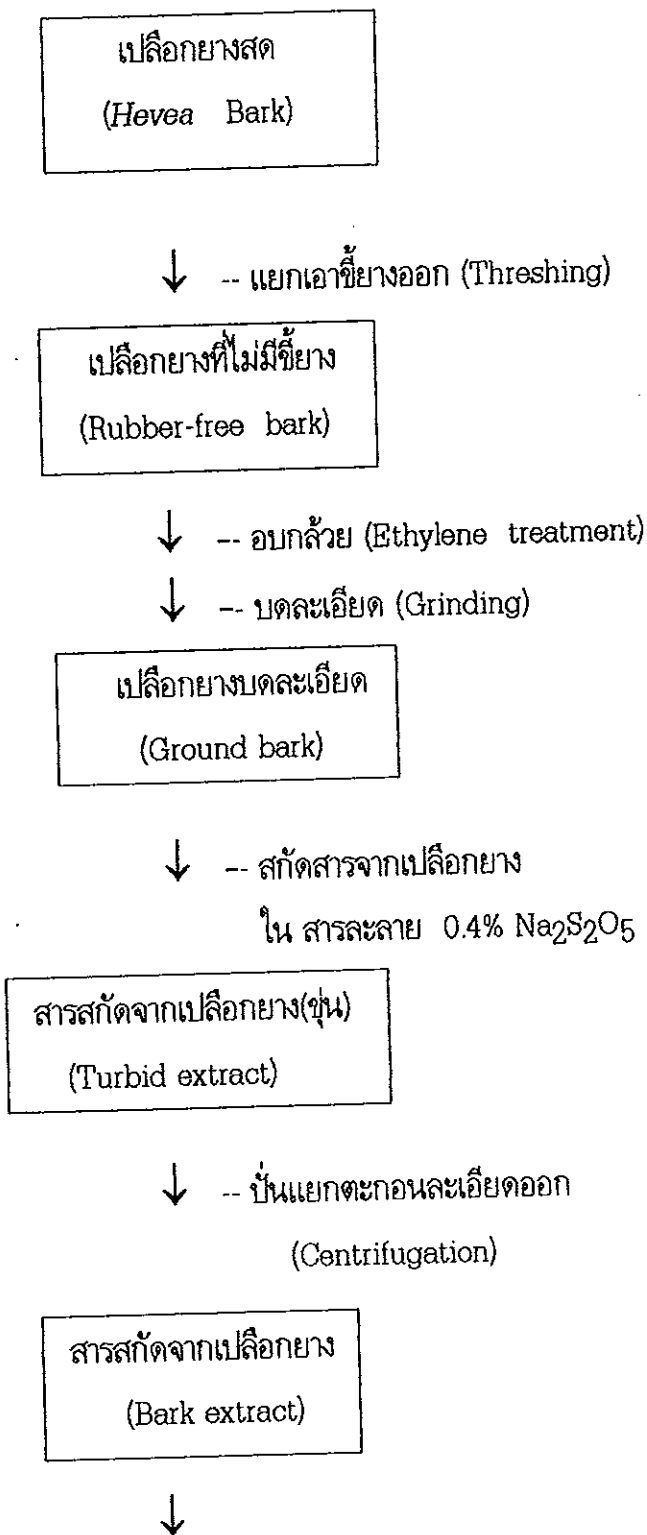
ซึ่ง DEAE-cellulose 100 กรัม นำมาทำให้อิ่มตัวด้วยน้ำกลั่น (ใช้เวลาประมาณ 15 ชั่วโมง) นำ DEAE-cellulose มาล้างด้วยกรด โดยแช่ใน 0.1 N HCl เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นจน มีค่า pH เป็น 4 จากนั้นนำ DEAE-cellulose มาล้างต่อด้วยด่าง โดยการแช่ใน 0.5 N NaOH เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด่างออกด้วยน้ำกลั่นจนมีค่า pH เป็น 7 แล้วจึงนำ DEAE-cellulose ไปแช่ใน 10 mM Tris-HCl pH 7 จนถึงจุดสมดุลย์ใช้สายยางดูดเอาบัฟเฟอร์ออกจนหมด แล้วใส่สารสกัดจากเปลือกยางที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.5 ลงไปกวนผสมให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กในอัตราเร็วช้าที่สุด เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปล่อยให้ DEAE-cellulose นอนก้นใช้สายยางดูดเอาส่วนใสออกแล้วล้าง DEAE-cellulose ด้วยบัฟเฟอร์เดิม 2 ครั้ง แล้วจึงชะ(elute) เอนไซม์ออกด้วยบัฟเฟอร์เดิม แต่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ในความเข้มข้น 0.4 M ทำการชะโดยกวนผสมให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้ DEAE-cellulose นอนก้นใช้สายยางดูดเอาส่วนใสออกมาแล้วทำการชะซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนใสที่ได้แต่ละครั้งมาวัดปริมาณและทดสอบหาเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตี จากนั้นรวมส่วนใสที่มีเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตี มาแยกเอาเกลือโซเดียมคลอไรด์ออก พร้อมทั้งทำให้เข้มข้นขึ้น ด้วยการเติมน้ำกลั่นเพื่อเจือจางเกลือพร้อมกรองผ่านเครื่อง Ultrafiltration (Millipore Pellicon) ใช้ cassette filter NMWL 10,000 โดยให้ความดันด้าน feed มากกว่าทางด้าน retentate 30 psi

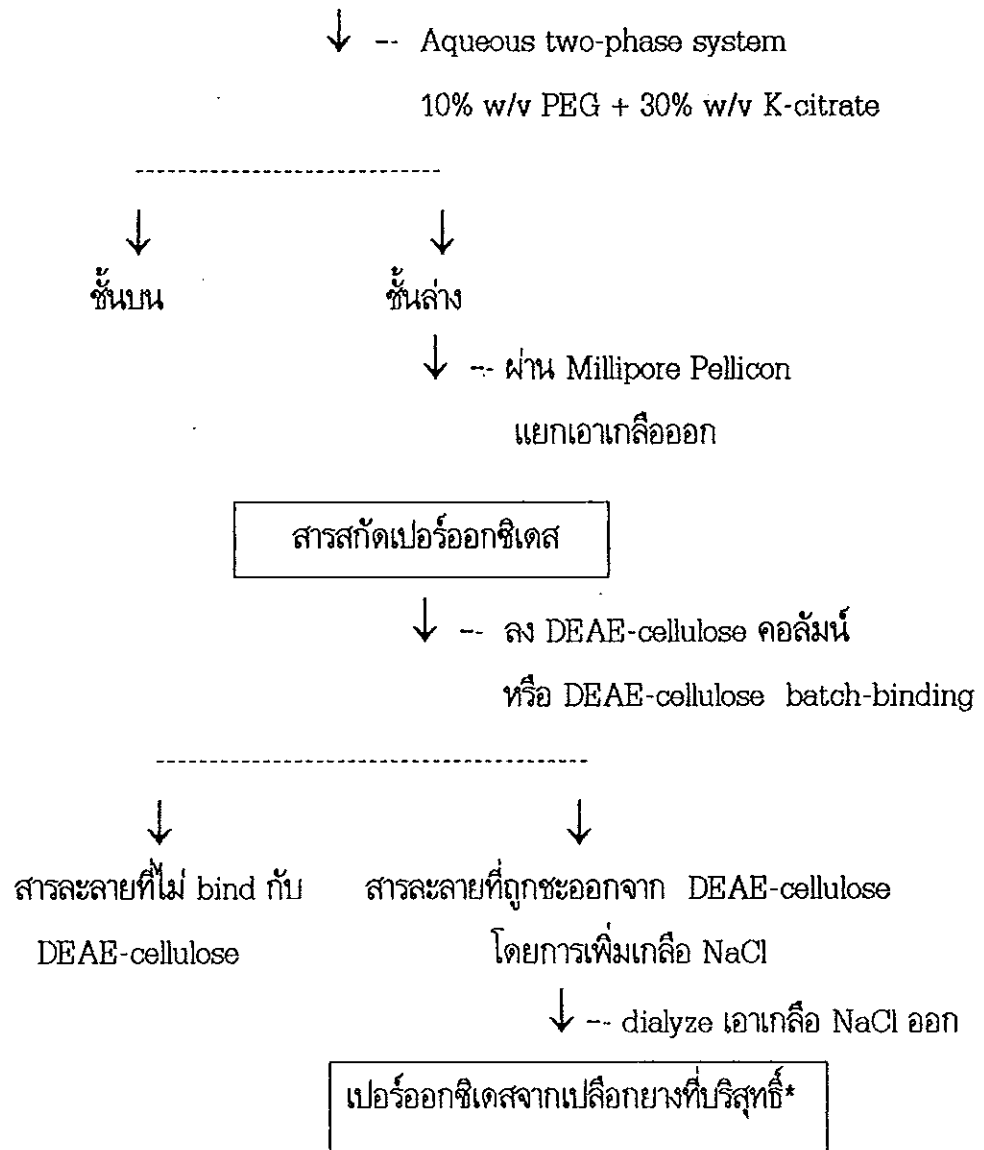
### 2.6.2 การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสโดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบนคอลัมน์ (ion exchange column chromatography)

นำสารสกัดจากเปลือกยางที่ได้จาก ขั้นตอนที่ 2.5 มาทำบริสุทธิ์ต่อไปโดยการผ่านลงใน DEAE-cellulose คอลัมน์ (คอลัมน์ Bio-Rad 11x 100 ซม.) ซึ่งได้รับการปรับให้สมดุลย์ด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7 มาก่อน หลังจากนั้นนำสารสกัดผ่านลงในคอลัมน์แล้ว ทำการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ในอัตราเร็ว 405 มล./ ชั่วโมง จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าต่ำกว่า 0.01 จากนั้นทำการชะ

(elute) เอนไซม์ด้วยการเพิ่มเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในบัฟเฟอร์เดิมให้ได้ความเข้มข้น 0.3 M เก็บสารละลายที่ออกมาเป็นส่วน ๆ ในขวดเก็บสาร โดยเก็บ fraction ละ 135 มล. ต่อ 20 นาที โดยใช้เครื่องเก็บสารแยกส่วนอัตโนมัติ (automatic fraction collector) เก็บจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร คงที่และเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบหาความว่องไว (แอกติวิตี) ของเปอร้ออกซิเดส ส่วนที่มีแอกติวิตีจะถูกเก็บรวมกัน แล้วนำไปแยกเอาเกลือโซเดียมคลอไรด์ออก และทำให้เข้มข้นขึ้น โดยการเติมน้ำกลั่นเพื่อเจือจางเกลือแล้วกรองผ่านเครื่อง Ultrafiltration (Millipore Pellicon) ใช้ cassette filter NMWL 10,000 โดยให้ความดันของทางด้าน feed มากกว่าทางด้าน retentate 30 psi เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1

ขั้นตอนการเตรียมเปอร์ออกไซด์ให้บริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา





\*\* เก็บที่ freezer -60 องศาเซลเซียส หรือทำเป็นผงแห้ง (freeze-dry) แล้วเก็บใน freezer

รูปที่ 9 ขั้นตอนการเตรียมเปอร็อกซิเดสให้บริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา



## 2.7. การวัดปริมาณเปอร์ออกซิเดส

### 2.7.1 การหาปริมาณเปอร์ออกซิเดสโดยใช้ *o*-dianisidine

วิธีของ Shannon และคณะ (1966) ซึ่งสารเคมีที่ใช้มีดังนี้

1. 0.05 M sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.4
2. 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. 0.5% (w/v) *o*-dianisidine

4. สารละลายที่ต้องการหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส

ขั้นตอนการทดลองทำโดย

นำสารสกัดจากเปลือกยาง ที่ต้องการหาปริมาณเปอร์ออกซิเดสมา 0.01 มล. (อาจจะต้องทำการเจือจางให้เหมาะสมก่อนนำมาทดสอบ) ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 0.05 M sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.4 ปริมาตร 2.84 มล. และ 0.5% *o*-dianisidine 0.05 มล. ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติม 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 มล. ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง พร้อมทั้งเริ่มจับเวลา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง CE 272 Linear ultraviolet spectrophotometer series 2 บันทึกค่าทุก ๆ 15 วินาที จนครบ 3 นาที นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส โดยให้ 1 unit ของ peroxidase activity มีค่าเท่ากับปริมาณ เอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสง 460 นาโนเมตร เปลี่ยนไป 0.1 หน่วยต่อนาที (การทดลองนี้ทำที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 30 องศาเซลเซียส)

### 2.7.2 การวัดปริมาณเปอร์ออกซิเดสโดยใช้ pyrogallol

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้

1. 0.1 M potassium phosphate บัฟเฟอร์ pH 6.0 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
2. 0.147 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. 5 % (w/v) pyrogallol

4. สารละลายที่ต้องการหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส

ขั้นตอนการทดลองทำโดย

ปิเปต 0.1 M potassium phosphate 0.32 มล. น้ำกลั่น 2.1 มล. 0.147 M

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.16 มล. และ 5% (w/v) pyrogallol 0.32 มล ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส 0.1 มล. ลงไปผสมให้เข้ากันแล้ว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากสมการนี้

$$\text{Units / มก.} = \frac{\Delta A_{420 \text{ nm}} / 20 \text{ นาที}}{\text{-----}}$$

$$(12 *) \times (\text{มก. เอนไซม์ หรือ มล. ของสารละลาย})$$

\*\* 12 = ค่า Extinction coefficient ของเปอร์ออกซิเดสซึ่งวัดค่าโดย Sigma

## 2.8. การวัดปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้สารตัวอย่างโปรตีนในความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) ปริมาตร 3 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จึงเติมสารละลายฟอลิน-ฟินอล (Folin-phenol reagent) ปริมาตร 0.3 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และสามารถหาความเข้มข้นของโปรตีนได้ โดยนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ โบวิน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin - BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ

## 2.9. การทำ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

ตามวิธีของ Laemmli (1970) สารเคมีที่ใช้และวิธีการเตรียมสารมีดังนี้

- 30% acrylamide solution : ซึ่ง 30 กรัม acrylamide + 0.8 กรัม N,N'-methylene bisacrylamide ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และ เก็บไว้ในขวดสีชา 4 องศาเซลเซียส

- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 : ซึ่ง 6 กรัม Tris-HCl ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย HCl ปรับปริมาตร 100 มล. เก็บในขวดสีชา 4 องศาเซลเซียส

- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 : ซึ่ง 18 กรัม Tris-HCl ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย HCl ปรับปริมาตรรวมเป็น 100 มล. เก็บในขวดสีชา 4 องศาเซลเซียส

- 1% SDS : ชั่ง 1 กรัม SDS ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 1% ammonium persulfate : ชั่ง 0.1 กรัม ammonium persulfate ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. เก็บในขวดสีชา 4 องศาเซลเซียส ไม่ควรเก็บไว้นานเกินไป
- อีเลคโตรโพรซีส บัฟเฟอร์ สำหรับ SDS-PAGE : ชั่ง 3.03 กรัม Tris-HCl + 14.4 กรัม glycine + 1 กรัม SDS (sodium dodecyl sulfate) ละลายในน้ำกลั่นปรับให้ได้ pH 8.3 ปรับปริมาตรรวมเป็น 1,000 มล.
- อีเลคโตรโพรซีส บัฟเฟอร์ สำหรับ non-denaturing PAGE : ชั่ง 3.03 กรัม Tris-HCl + 14.4 กรัม glycine ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH 8.3 ปรับปริมาตรรวมเป็น 1000 มล.
- สีย้อม coomassie brilliant blue R 250 : ชั่ง 2.5 กรัม coomassie brilliant blue R 250 ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 20 มล. + acetic acid 500 มล. คน ( stir ) ประมาณ 2 ชั่วโมง ปรับปริมาตร 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง
- Sample buffer สำหรับ SDS-PAGE : ชั่ง 1.42 กรัม Tris-HCl + 4 กรัม SDS + 20 มล. glycerol + 10 มล. mercaptoethanol + 0.02 กรัม Brophenolblue ซึ่งทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 70 มล. ปรับให้ได้ pH 6.8 ด้วย HCl ปรับปริมาตร รวมเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น
- Sample buffer สำหรับ non-denaturing PAGE มีส่วนประกอบและวิธีการเตรียมเหมือนกับ sample buffer สำหรับ SDS-PAGE ยกเว้นไม่มี SDS และ mercaptoethanol
- Destaining solution : methanol 100 มล. + acetic acid 100 มล. และ น้ำกลั่น 800 มล.
- Fixative solution : methanol 400 มล. + acetic acid 70 มล. และ น้ำกลั่น 530 มล.

ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบของเจล ดัดแปลงจาก Laemmli (1970)

% gel	Separating gel				stacking gel	
	non - SDS		SDS		non - SDS	SDS
	5%	12%	7%	15%	3%	3%
30% Acrylamide (ml)	0.5	1.2	0.7	1.5	0.5	0.3
1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (ml)	0.75	0.75	0.75	0.75	-	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	-	-	-	-	1.25	0.75
1% SDS ( $\mu$ l)	-	-	300	300	-	300
1% Ammonium persulfate ( $\mu$ l)	75	75	75	75	200	120
น้ำ (ml)	1.67	0.97	0.36	1.17	3	1.53
TEMED ( $\mu$ l)	5	5	5	5	5	5
ปริมาตรสุทธิ (ml)	3	3	3	3	5	3

## 2.10. การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเปอร้ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเปลือกยางพารา

### 2.10.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร้ออกซิเดส

น้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร้ออกซิเดสทำได้จากการทำ SDS-PAGE ซึ่งใช้ slab เจล โดยเตรียม gradient 7-15% เจล สำหรับ separating gel และ 3% สำหรับ stacking gel ซึ่งรายละเอียดส่วนประกอบต่าง ๆ อยู่ในตารางที่ 4 เตรียมสารละลายโปรตีน โดยนำเอาโปรตีนมาผสมกับ sample buffer สำหรับ SDS-PAGE จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 3-5 นาที การ load sample ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 5-20 ไมโครกรัม / ช่อง เจล กระแสไฟฟ้าที่ใช้แยก stacking gel ใช้กระแสไฟฟ้า 24 mA ใช้เวลาประมาณ 40 นาที สำหรับ separating gel ใช้กระแสไฟฟ้า 18-20 mA ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นสี coomassie brilliant blue R-250 เคลื่อนที่มาเกือบสุดปลายเจล การเคลื่อนที่ของโปรตีนในเจลสามารถมองเห็นได้โดยการย้อมโปรตีนด้วยสีย้อม coomassie brilliant blue R250 โดยแช่แผ่นเจลในสีย้อมประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีย้อมออกด้วย destaining solution จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินหรือสีฟ้าเข้มชัดเจน

### 2.10.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวม และทดสอบสมบัติการเป็น IAA oxidase ของเปอร้ออกซิเดส หลังการทำบริสุทธิ์แล้ว อาศัยการทำ ND-PAGE

เตรียม slab เจล โดยใช้ gradient 5-12% สำหรับ separating gel และ 3% สำหรับ stacking gel ซึ่งรายละเอียดส่วนประกอบต่าง ๆ อยู่ในตารางที่ 4 เตรียมสารละลายโปรตีน โดยนำโปรตีนมาผสมกับ sample buffer สำหรับ ND-PAGE ทำการ load sample โดยให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 5-20 ไมโครกรัม/ช่อง เจล กระแสไฟฟ้าที่ใช้แยก stacking gel และ separating gel ใช้เหมือนกันกับการทำ SDS-PAGE ส่วนการติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนทำได้โดยการย้อมโปรตีนด้วย coomassie brilliant blue R250 พร้อมทั้งดูว่าโปรตีนดังกล่าวมี เปอร้ออกซิเดสแอกติวิตี และ IAA oxidase โดยการย้อมแอกติวิตี ของ เปอร้ออกซิเดส และ ของ IAA-oxidase ตามลำดับ

สำหรับการย้อมโปรตีนในวิธีที่ 1 สีย้อม และวิธีการย้อมทำเช่นเดียวกับการย้อม SDS-PAGE ในหัวข้อ 10.1 ส่วนการย้อมแอกติวิตีมีรายละเอียด ดังนี้

การย้อมด้วยแอกติวิตีของเปอร้ออกซิเดส

นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.05% o-dianisidine 20 มล.

0.05 M sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.4 80 มล. และ 0.1 M  $H_2O_2$  1 มล. เป็นเวลา 30 นาที ในที่มีด จากนั้นนำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ตีรังเจลด้วย สารละลาย 50% methanol แถบโปรตีนที่มีเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีจะมีสีน้ำตาลแดง-ส้ม

การย้อมด้วยแอกติวิตีของ IAA-oxidase

นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย A ซึ่งประกอบด้วย 2 M acetic acid , 4.6 มล. 2 M sodium acetate, 0.4 มล. 4.5 mM p-coumaric acid, 2 มล. 1 mM  $H_2O_2$  2 มล. 1.5 mM IAA และ น้ำ 2 มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแผ่นเจลมาแช่ใน 1% periodic ซึ่งละลายใน 2% acetic acid เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำแผ่นเจลมาแช่ใน 0.5 % ( w/v ) dimethylaminomaldehyde (DMACA) ซึ่งละลายใน 0.1 N HCl. จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนสีแดง-แดงม่วง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง เก็บแผ่นเจลในสารละลาย 20% methanol ( James *et al.*, 1975)

การย้อมแอกติวิตีของเปอร์ออกซิเดสนอกจากจะใช้การ run เจล แบบ ND-PAGE แล้วยังย้อมได้โดยการ run เจล แบบทั้ง SDS-PAGE ซึ่งทำได้โดยเตรียม separating gel และ stacking gel แบบ SDS-PAGE แต่ในการเตรียม สารละลายโปรตีนใช้ sample buffer สำหรับ ND PAGE และไม่ต้องนำไปต้มใช้ อิเล็กโตรโฟรีซิส บัฟเฟอร์ แบบ SDS-PAGE เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จแล้วนำแผ่นเจล มาแช่ใน 20% isopropanol 30 นาที เพื่อล้างเอา SDS ออก จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วย น้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำแผ่นเจลนี้ไปย้อมแอกติวิตีของเปอร์ออกซิเดส หรือย้อม IAA-oxidase จะได้ผลเช่นเดียวกับการทำแบบ ND-PAGE

### 2.10.3 การศึกษาจลนศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดส

การทดลองใช้เปอร์ออกซิเดสที่ได้จาก การทำบริสุทธิ์ด้วย DEAE-Cellulose คอลัมน์ ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ( 0.643 มก./มล.) โดยในการทดสอบหาค่า  $K_m$  ของ o-dianisidine โดยใช้ o-dianisidine ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.6, 1.2, .8, 2.4 และ  $3 \times 10^{-3}$  M ใช้  $H_2O_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 M ส่วนการทดสอบหาค่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  ใช้  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้นต่างกัันดังนี้ 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 และ  $3 \times 10^{-3}$  M ใช้

*o*-dianisidine ที่ความเข้มข้น  $1.2 \times 10^{-3}$  M ค่า  $K_m$  หาได้จากการเขียนกราฟ ระหว่าง  $1/v$  ปริมาณเปอร์ออกซิเดส กับ  $1/\text{ความเข้มข้นของสับสเตรท}$

#### 2.10.4 การศึกษาผลของตัวยับยั้ง potassium cyanide (KCN) และ sodium azide (NaN<sub>3</sub>) ต่อแอกติวิตีของเปอร์ออกซิเดส

การทดลองทำโดยใช้ความเข้มข้น  $0-4 \times 10^{-5}$  M สำหรับ KCN และ  $0-4 \times 10^{-5}$  M สำหรับ NaN<sub>3</sub> ส่วน *o*-dianisidine ใช้ 3 ระดับความเข้มข้น คือ  $3 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$  และ  $5 \times 10^{-5}$  M และใช้ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0.1 M ค่า  $K_i$  หาได้จากการทำ Dixon plot ระหว่าง ความเข้มข้นของตัวยับยั้งกับส่วนกลับของอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ใน 1 นาที ( $1/v$ )

#### 2.10.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเปอร์ออกซิเดส

นำเปอร์ออกซิเดส ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเปลือกยางพาราที่มีโปรตีน 0.5 มก./มล. และ เปอร์ออกซิเดสจาก Horseradish type II มีปริมาณโปรตีน 1 มก./มล. มาอุ่นในอ่างควบคุมความร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับปริมาณของเปอร์ออกซิเดสที่เก็บไว้ในน้ำแข็ง

#### 2.10.6 การศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเปอร์ออกซิเดส

นำเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมไว้ได้จากเปลือกยางพาราที่มีปริมาณโปรตีน 0.5 มก./มล. และ เปอร์ออกซิเดสจาก Horseradish type II มีปริมาณโปรตีน 1 มก./มล. มาทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส ใน 50 mM sodium acetate บัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ กัน คือ pH 4.4, 5, 5.4, 6, 6.4 และ 7.4 เปรียบเทียบปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่ได้ในแต่ละ pH

#### 2.10.7 การเปรียบเทียบความไวของ เปอร์ออกซิเดสจากยางพารา กับ เปอร์ออกซิเดส จาก Horseradish โดยใช้สารตั้งต้น pyrogallol และ *o*-dianisidine

นำเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา และ Horseradish type VI ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 1 มก. / มล. มาทดสอบหาแอกติวิตีของเปอร์ออกซิเดสในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยของ 0.05 % (w/v) *o*-dianisidine , 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ใน 50 mM sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.4 แล้วเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่มี 5% (w/v) pyrogallol

0.147 M  $H_2O_2$  ใน 0.1 M potassium phosphate pH 6 กำหนดหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส แต่ละชนิดและแต่ละสภาวะ บันทึกผลการทดลองพร้อมทั้งเปรียบเทียบผลที่ได้

### 2.11. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเปอร์ออกซิเดส จากเปลือกยางพารา กับ ปริมาณผลผลิตที่กรีดได้จากต้นยางที่ให้ผลผลิตต่างกัน

ทำการกรีดเปลือกยางของต้นยางพาราที่ให้ผลผลิตเป็นปริมาณน้ำยางสดแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ต้นยางที่ให้ผลผลิตสูง (high), ต้นยางที่ให้ผลผลิตปานกลาง (medium) และ ต้นยางที่ให้ผลผลิตต่ำ (low) โดยใช้ปริมาณน้ำยางสดทั้งหมดที่ได้ของแต่ละต้นเป็นตัวกำหนด นำเปลือกยางพาราที่ได้มาลอกเอาซี่ยางออก และบดละเอียดด้วยเครื่องปั่นแล้วจึงนำมาสกัดใน น้ำกลั่นในอัตราส่วนเปลือกยางบดละเอียด 1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 2 มล. และปั่นแยกตะกอน ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Sorvall รุ่น SS-3 automatic ที่ความเร็ว 10,000 rpm 20 นาที 25 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส เปรียบเทียบปริมาณเปอร์ออกซิเดส ที่ได้จากต้นยางแต่ละต้น เทียบกับปริมาณน้ำยางสด และน้ำหนักเนื้อยางแห้ง และการทดลองนี้ จะทำซ้ำ 3 ครั้ง คือ กรีดยางติดต่อกัน 3 วัน ใช้ต้นยางชุดเดียวกันทั้ง 3 วัน และทำการสกัด หาปริมาณเปอร์ออกซิเดส พร้อมทั้งวัดปริมาณน้ำยางสดและทำน้ำหนักยางแห้ง (dry rubber) วันต่อวัน

### 2.12. การศึกษาถึงประสิทธิภาพในการใช้เปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้จากเปลือกยาง ตกตะกอน สารประกอบฟีนอลและสารประกอบอะนีนีน โดยเปรียบเทียบกับการใช้เปอร์ออกซิเดส จาก Horseradish (HRP)

สารประกอบฟีนอล และ สารประกอบอะนีนีน ที่นำมาศึกษา คือ Phenol, 4-Methoxy phenol, 3-Methyl phenol, 2-Nitro phenol, 2,4-Dinitrophenol, Aniline, 4-Bromoaniline, 1-Naphthylamine, 8-Hydroxyquinone, 1,4-Phenylene diamine dihydrochloride ซึ่งสารอย่างละ 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 30 มล ปั่นต่ออย่างละ 1 มล ใส่หลอดทดลองขนาดกลาง ใส่ 0.1 M  $H_2O_2$  100 ไมโครลิตร และ HRP type VI 10 ไมโครลิตร (มีแอกติวิตี 4,800 U) หรือเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้ 20 ไมโครลิตร (มีแอกติวิตี 1,600 U) ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 20 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง (ค่าแอกติวิตีของเปอร์ออกซิเดสได้จากการวัดโดยใช้วิธีในข้อ 2.7.1)



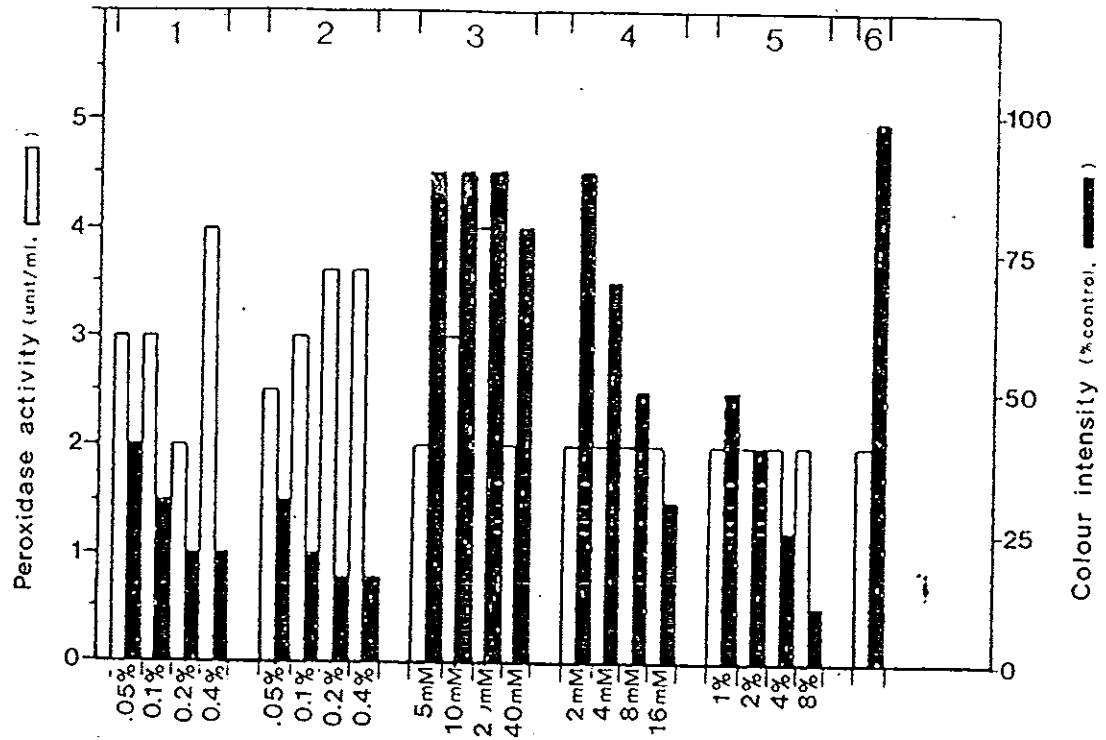
**2.13. การศึกษาประสิทธิภาพความสามารถในการตกตะกอนร่วม ระหว่างสารประกอบฟีนอล และอะนีนีน กับยาปราบแมลงและศัตรูพืชของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราโดย เปรียบเทียบกับเปอร์ออกซิเดสจาก Horesradish**

ยาปราบแมลงและศัตรูพืชที่นำมาศึกษาคือ แพลนโทน (paraquat), แลคโซ (alachlor ) โพลิดอล (methyl parathion), เซฟวิน และ เมโทรนัล ใช้อัตราส่วน 80 มล./ลิตร รัตอับ (gluphosate) ใช้ 0.66 กรัม/ลิตร, ซีแลค (clothodium) ใช้ 25 มล./ลิตร, และ ฟอสตริน (mevinphos) ใช้ 0.5 มล./ลิตร การทดลองปีเปิดสารละลาย อย่างละ 0.5 มล. รวมกับสารละลายของสารประกอบฟีนอลและอะนีนีนอย่างละ 0.5 มล. ใส่ 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 ไมโครลิตร และ HRP type VI 10 ไมโครลิตร หรือ เปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 20 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง

### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1. ผลของการใช้สารป้องกันการออกซิเดชัน (antioxidant) และ polyvinylpyrrolidone (PVP) ในขั้นตอนการสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยาง

จากการนำเปลือกยางที่ลอกเอาชีเยียงออกและบดละเอียด มาสกัดในสารละลาย antioxidant 4 ชนิด และ PVP ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า สารสกัดที่ได้จะมีสีเหลืองและสีอ่อนกว่าสีของสารสกัดจากเปลือกยางที่สกัดในน้ำ (รูปที่ 10) และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส พบว่า ปริมาณเปอร์ออกซิเดสของสารสกัดในสารละลาย antioxidant และ PVP ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จะได้ปริมาณเปอร์ออกซิเดสทั้งหมดมากกว่าและเท่ากับปริมาณเปอร์ออกซิเดสของสารสกัดที่สกัดในน้ำกลั่นล้วน ๆ ดังผลการทดลอง แสดงในรูปที่ 10 และ 11 จากข้อมูลดังกล่าว ถ้าเปรียบเทียบปริมาณสีของสารสกัดที่ได้ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยให้สารสกัดจากเปลือกยางในน้ำกลั่น 100% จะเห็นว่า สารสกัดใน 8% PVP มีความเข้มของสีของสารสกัด 1/10 (10%) ของสีที่สกัดด้วยน้ำกลั่นล้วน ๆ (กะโดยสายตา) ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุดมีปริมาณเปอร์ออกซิเดส 2,000 unit ซึ่งเท่ากับปริมาณเปอร์ออกซิเดสของสารสกัดจากเปลือกยางในน้ำกลั่น ส่วนสารสกัดที่ให้ปริมาณเปอร์ออกซิเดส สูงสุดคือ สารสกัดใน 0.2 % thiourea มีปริมาณเปอร์ออกซิเดส 4,000 unit หรือมากเป็น 2 เท่าของสารสกัดจากเปลือกยางในน้ำกลั่น แต่มีความเข้มของสีลดลงเมื่อเทียบสีที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่นล้วน ๆ เล็กน้อยประมาณ (9/10 หรือ 90%) ในขณะที่สารสกัดใน 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  มีปริมาณเปอร์ออกซิเดส 3,600 unit หรือมากเป็น 1.8 เท่าของสารสกัดจากเปลือกยางในน้ำกลั่น และมีปริมาณความเข้มของสี 2/10 หรือ 20% ดังนั้นจึงเลือกใช้ 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ในขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกยางในระดับปริมาณสูง.



รูปที่ 10 แสดงผลของการใช้สาร antioxidant และ PVP ในขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกยางพารา

ช่องหมายเลข 1 =  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

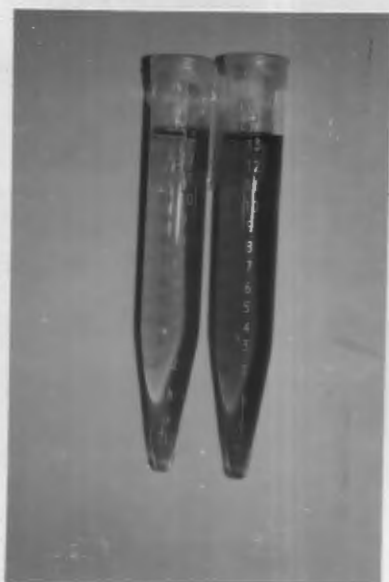
ช่องหมายเลข 2 =  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

ช่องหมายเลข 3 = Thiourea

ช่องหมายเลข 4 = Ascorbic acid

ช่องหมายเลข 5 = PVP

ช่องหมายเลข 6 = น้ำกลั่น (control)



ก ข

รูปที่ 11 สีของสารสกัดเปลือกยางที่ได้จากการสกัดโดยสารละลาย 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (ก) และ น้ำกลั่น (ข)

### 3.2. ผลของแก๊สเอธิลีนต่อปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา

เมื่อนำเปลือกยางน้ำหนัก 5 กรัม ในแต่ละชุดทดลองซึ่ง ประกอบด้วยเปลือกยางสดที่อบในกล่องด้วยกล้วยน้ำว้าสุก 4 ลูก และ ชุดควบคุมซึ่ง ประกอบด้วยเปลือกยางสดอบในกล่องแต่ไม่มีกล้วยน้ำว้า มาบดละเอียดและทำการสกัดในสารละลาย 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ที่มีระยะเวลาการอบต่างกัน คือที่ 0, 21 และ 42 ชั่วโมง นำสารสกัดแต่ละชุดมาหาปริมาณ เปอร์ออกซิเดสพบว่า ในชุดที่ระยะเวลาการอบ 0 ชั่วโมง มีปริมาณเปอร์ออกซิเดส  $7,520 \pm 678$  unit เท่ากับชุดที่ควบคุมที่ระยะเวลาการอบ 0 ชั่วโมง และที่ระยะเวลาการอบ 21 ชั่วโมง ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในชุดทดลองเพิ่มเป็น  $13,600 \pm 678$  unit ในขณะที่ชุดที่ควบคุม วัดปริมาณเปอร์ออกซิเดสได้  $7,720 \pm 577$  unit และที่ระยะเวลาการอบ 42 ชั่วโมง ได้ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในชุดทดลองเป็น  $13,900 \pm 169$  unit ซึ่งเพิ่มขึ้นจากชุดทดลองที่มีระยะเวลาการอบ 21 ชั่วโมง เล็กน้อย ในขณะที่เดียวกันวัดปริมาณเปอร์ออกซิเดสในชุดควบคุม ได้  $7,330 \pm 113$  unit ซึ่งลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีระยะเวลาการอบ 21 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงว่า แก๊สเอธิลีนที่ปลดปล่อยออกมาจากกล้วยน้ำว้าสุก สามารถเพิ่ม ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในเปลือกยางได้ และระยะเวลาการอบที่เหมาะสม คือประมาณ 21 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลของแก๊สเอธิลีนต่อปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเปอร์ออกซิเดส (unit)	
	เปลือกยางสด + เอธิลีน	เปลือกยางสด
0	$7,520 \pm 678.8$	$7,520 \pm 678.8$
21	$13,600 \pm 678.8$	$7,720 \pm 678.8$
42	$13,900 \pm 169$	$7,330 \pm 113$

### 3.3. ผลของการศึกษาอัตราส่วนของ polyethyne glycol (PEG) ขนาดต่าง ๆ กับเกลือชนิดต่าง ๆ ในการทำ aqueous two-phase system สารสกัดจากเปลือกยางพารา

จากการทดลอง พบว่า สารสกัดจากเปลือกยางพาราที่สกัดในสารละลาย 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  มีค่า pH 5.37 เมื่อรวมกับเกลือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  และ K-citrate วัดค่า pH ได้ 5.5, 4.4, 6.04 และ 7.14 ตามลำดับ และปริมาณเกลือที่ใช้ในการทำให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.5-1.1 กรัม สารละลายที่แยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนจะมีสีดำ ส่วนชั้นล่างจะมีสีเหลือง ยกเว้นในเกลือ  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ที่ชั้นล่างมีสีดำ ส่วนปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่ทดสอบได้ พบว่า จะมีมากในชั้นล่างและมีน้อยมากจนวัดค่าไม่ได้ในชั้นบน เนื่องจากมีส่วนของ PEG สารสี และสารประกอบ phenolics ปนอยู่เป็นส่วนมาก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6

ซึ่งพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำ aqueous two-phase system ของสารสกัดจากเปลือกยาง คือ PEG 8,000 (10% w/v) กับ เกลือ K-citrate (30% w/v) เพราะมีปริมาณเปอร์ออกซิเดส ในชั้นล่างสูงถึง 92.78% และไม่มี PEG ผสมอยู่ในชั้นล่างดังกล่าว เพราะไม่มีตะกอนเกิดขึ้นเมื่อนำไปทดสอบด้วยสารละลาย Folin ปกติ PEG ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ จะทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin ได้ตะกอนขาวขุ่น และมีผลทำให้ค่า blank ในการหาโปรตีนสูงขึ้น ทำให้ค่าโปรตีนที่วัดได้ต่ำกว่าความเป็นจริง (Peterson, 1979) การหาปริมาณโปรตีนของสารละลายที่มี PEG อยู่ด้วยโดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ ค่าที่วัดได้จะมีความผิดพลาดสูง แต่อาจแก้ไขได้โดยใช้วิธีของ Bensadoun และ Weinstein (1976) โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย sodium deoxycholate ร่วมกับ trichoroacetic acid (TCA) ก่อนเพื่อแยกเอา PEG ออก แล้วนำตะกอนโปรตีนมาละลายกลับในสารละลายแล้วจึงนำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ ซึ่งเป็นการยุ่งยาก และ PEG ที่ปนอยู่จะแยกออกสารละลายได้ค่อนข้างยาก ซึ่งจะเป็นปัญหาในการทำบริสุทธ์เอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป ดังนั้นเพื่อเป็นการสะดวกและง่ายต่อการทำบริสุทธ์เอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป จึงเลือกใช้ PEG 8,000 กับเกลือ K-citrate ในการทำ aqueous two-phase system ของสารสกัดจากเปลือกยางพารา ในระดับปริมาณสูง

ตารางที่ 6 ผลของการทำ aqueous two-phase system โดยใช้ PEG ขนาดต่าง ๆ กับเกลือ

	ปริมาณเกลือ (กรัม)	% Recovery	ปริมาณ PEG ในชั้นล่าง
PEG 1,500 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.7	71.9	++
PEG 1,500 + MgSO <sub>4</sub>	1.1	89.25	++
PEG 1,500 + K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5	62.29	-
PEG 1,500 + K-citrate	1.1	67.83	+
PEG 4,000 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.7	35.95	+
PEG 4,000 + MgSO <sub>4</sub>	0.7	89.29	++
PEG 4,000 + K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5	59.69	-
PEG 4,000 + K-citrate	0.9	67.42	+
PEG 6,000 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.7	43.71	-
PEG 6,000 + MgSO <sub>4</sub>	0.7	89.29	+
PEG 6,000 + K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5	71.30	+
PEG 6,000 + K-citrate	0.9	60.30	+
PEG 8,000 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.7	88.57	+
PEG 8,000 + MgSO <sub>4</sub>	0.7	91.07	++
PEG 8,000 + K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5	56.35	-
PEG 8,000 + K-citrate	0.9	92.78	-

++ หมายถึง มีตะกอนเกิดขึ้นมากเมื่อนำสารละลายชั้นล่างมาทำปฏิกิริยากับ Folin แสดงว่ามี PEG ผสมอยู่ในสารละลายที่นำมาทดสอบสูง

### 3.4. ผลการสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราในระดับปริมาณสูง

เปลือกยางสดที่นำมาทดลองจะเป็นเปลือกยางที่มีส่วนของซี่ยางติดอยู่ (รูปที่ 12.1) ในการทดลอง 3 ครั้ง ใช้เปลือกยางสด 75-80 กก. หลังจากทำการแยกเอาส่วนของซี่ยางออกโดยใช้เครื่องกระเทาะเปลือกถั่ว จะได้เปลือกยางที่ไม่มีซี่ยางปนอยู่ 41 กก. (รูปที่ 12.2) ซึ่งเครื่องจะสามารถแยกเปลือกยางได้ 7 กก. ต่อ 1 ชั่วโมง นำเปลือกยางที่ได้มาอบด้วยกล้วยน้ำว้าสุกโดยใส่ในถังพลาสติกที่มีฝาปิดสนิท ใช้อัตราส่วน เปลือกยาง 10 กก. ต่อ กล้วยน้ำว้าสุก 2 หรือ 3 หวีเล็ก เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นจึงนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อจะได้เปลือกยางที่บดละเอียด ดังรูปที่ 12.3 ซึ่งใช้เวลาบดละเอียด 3.5 กก. ต่อ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเปลือกยางบดละเอียดไปสกัดในสารละลาย 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  โดยใช้เครื่องซักผ้าเขย่าเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด (รูปที่ 7) ใช้อัตราส่วน เปลือกยางบดละเอียด 9 กก. ต่อ สารละลาย 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  24 ลิตร สกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สุดท้ายจะได้สารสกัดจากเปลือกยางทั้งหมดอยู่ในช่วง 96 ลิตร เมื่อนำไปปั่นแยกตะกอนละเอียดออกปริมาณสารสกัดที่ได้ 65-74 ลิตร มีค่าแอกติวิตีเฉลี่ย  $3.44-4.63 \times 10^8$  (ตารางที่ 7)





12.1

เปลือกยางสดก่อนลอกเอาซี่ยางออก



12.2

เปลือกยางสดที่ลอกเอาซี่ยางออกแล้ว



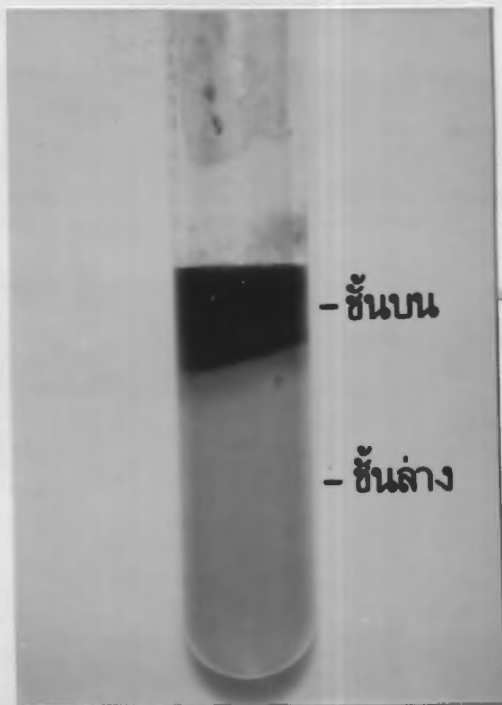
12.3

เปลือกยางบดละเอียด

รูปที่ 12 ลักษณะของเปลือกยางก่อนและหลังการลอกเอาซี่ยางออกและเปลือกยางบดละเอียด

### 3.5. ผลการแยกสารประกอบ phenolics ออกจากสารสกัดจากเปลือกยาง โดยใช้ Aqueous two-phase system

จากการทำ aqueous two-phase system ของสารสกัดจากเปลือกยางระหว่าง PEG 8,000 10% (w/v) กับ เกลือ K-citrate 30% (w/v) พบว่า สารสีและสารประกอบ phenolic ส่วนใหญ่จะถูกพาขึ้นไปอยู่ชั้นบนร่วมกับ PEG ทำให้สารละลายในชั้นบนมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ในขณะที่เดียวกันเปอร์ออกซิเดสจะถูกพาลงมาอยู่ในชั้นล่างร่วมกับเกลือ K-citrate โดยสารละลายชั้นล่างมีสีเหลือง (รูปที่ 13) ปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่ได้ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 70.89% ของปริมาณเปอร์ออกซิเดสก่อนการ partition มีความไวจำเพาะ  $3.7-7.0 \times 10^4$  U/mg (ข้อมูลแสดงในตารางที่ 7) หลังจากทำการแยกเอาเปอร์ออกซิเดสออกจากเกลือ K-citrate และทำให้เข้มข้นขึ้น โดยการผ่านเครื่อง ultrafiltration (Milipore Pellicon) ใช้ cassette filter NMWL 30,000 สารประกอบต่าง ๆ ที่มีขนาดเล็กกว่า 30,000 ดาลตัน จะถูกแยกออกมาทาง permeate ในขณะที่สารประกอบที่มีขนาดใหญ่กว่า 30,000 ดาลตัน รวมทั้งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน จะอยู่ในส่วนของ retentate (รูปที่ 8)



รูปที่ 13 การทำ aqueous two-phase system ของสารละลาย ระหว่าง PEG 8,000 10% (w/v) + เกลือ K-citrate 30% (w/v)

### 3.6. ผลการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดส

#### 3.6.1 ผลการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดส โดยวิธีแลกเปลี่ยนประจุ แบบ batch-binding

การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีนี้ ทำโดยการนำสารสกัดจากเปลือกยางหลังการผ่าน aqueous two-phase ขั้นตอนในรูปที่ 9 มาผสมกับ DEAE-cellulose ซึ่งแช่ใน 10 mM Tris-HCl pH 7 โดยการกวนเป็นเวลา 15 ชั่วโมง (อัตราส่วน DEAE-cellulose 1 ลิตร ต่อสารสกัดจากเปลือกยาง 1 ลิตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตั้งส่วนใสมาทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส พบว่ามีน้อยมากประมาณ 1.26% ของปริมาณเปอร์ออกซิเดสทั้งหมด ซึ่งแสดงว่า เปอร์ออกซิเดสเกาะจับกับ DEAE-cellulose ได้เกือบ 100% เมื่อทำการชะเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมแต่เพิ่ม 0.4 M NaCl ลงไปด้วย เปอร์ออกซิเดสที่ bind กับ DEAE-cellulose จะถูกชะออกมา ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7 และจากการทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดสของส่วนที่ bind กับ DEAE-cellulose ในการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ได้ค่า yield อยู่ในช่วง 51-57% โดยเอนไซม์มีค่า RZ อยู่ในช่วง 1.7-3.5 กรัม (ค่า RZ คือค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร ต่อ 275 นาโนเมตร )

ตารางที่ 7 สรุปขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เปอร็อกซิเดสจากเปลือกยางพาราในระดับปริมาณสูง  
โดยวิธีแลกเปลี่ยนประจุ แบบ batch-binding

Yield	Preparation		
	#1	#2	#3
Bark materials (kg)	75.00	88.00	80.00
Bark extract (l)	65.00	73.89	72.26
Total activity (unit)	$3.44 \times 10^8$	$4.63 \times 10^8$	$4.30 \times 10^8$
Specific activity (unit/mg)	nd	nd	nd
Total protein*	nd	nd	nd
<b>Aqueous two-phase fraction:</b>			
Total volume (l)	3.78	4.66	3.90
Total activity (unit)	$2.27 \times 10^8$	$3.38 \times 10^8$	$3.12 \times 10^8$
Specific activity (unit/mg)	$7.00 \times 10^4$	$3.70 \times 10^4$	$4.10 \times 10^4$
Total protein (g)	3.24	9.14	7.61
<b>DEAE-cellulose batch-binding</b>			
Elute (@ 0.4 N NaCl)			
Total activity (unit)	$1.95 \times 10^8$	$2.64 \times 10^8$	$2.20 \times 10^8$
Specific activity (unit/mg)	$1.10 \times 10^5$	$7.40 \times 10^4$	$1.00 \times 10^5$
RZ Value	0.60	0.67	0.95
Total protein (g)	1.78	3.57	2.20
yield (%)	56.68	57	51.16

nd = ไม่ได้ทำการหาโปรตีน เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบ phenolics มาก มีผลทำให้ค่าที่ได้คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง

### 3.6.2 ผลการทำบริสุทธิ์เปอร็อกซิเดส แบบแลกเปลี่ยนประจุ บนคอลัมน์ โครมาโตกราฟี

นำสารสกัดจากเปลือกยางที่ผ่านการทำ aqueous two-phase system และผ่านเครื่อง ultrafiltration (Millipore Pellicon) เพื่อแยกเอาเกลือออกพร้อมทั้งทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยการลง คอลัมน์ DEAE-cellulose ขนาดใหญ่ (รูปที่ 14) เมื่อ wash คอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl pH7 จะมีส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind (unbound fraction) กับ DEAE-cellulose หลุดออกมา และชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม แต่มีการเพิ่ม 0.3 M NaCl ลงไปโปรตีนที่ bind (bound fraction) กับ DEAE-cellulose จะถูกชะออกมา ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 15 จากการทดสอบหาปริมาณเปอร็อกซิเดส พบว่าส่วน bound มีค่า yield 41.55% มีค่าความว่องไวจำเพาะ 67,849 U/มก. มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.75 เท่า และมีค่า RZ เท่ากับ 0.48 ส่วน unbound ปรากฏว่ามีแอกติวิตีของเปอร็อกซิเดสอยู่ด้วย คิดเป็น 1.38% ของเปอร็อกซิเดสทั้งหมด โดยมีค่า RZ เท่ากับ 0.117

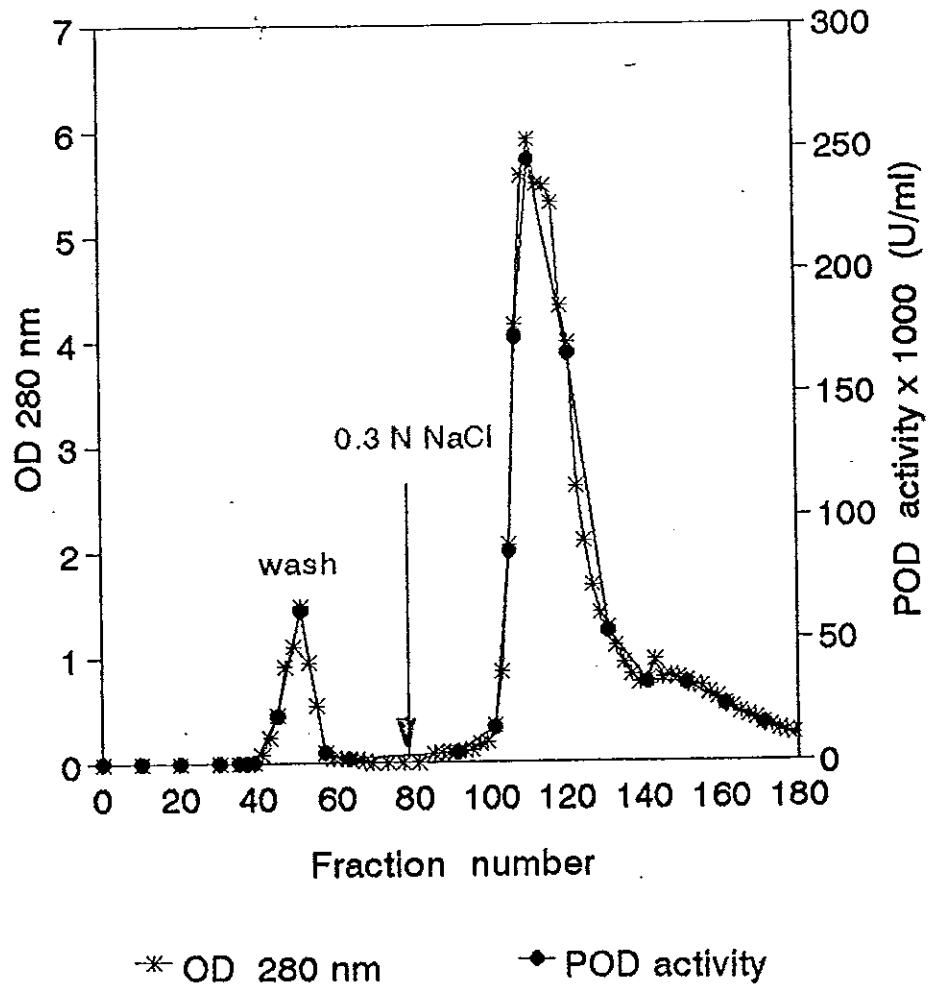


รูปที่ 14 แสดงเครื่องมือในการทำ คอลัมน์ DEAE-cellulose แบบปริมาณสูง

1 = pump ISCO Model HF

2 = fraction collector ISCO Model Model Foxy 200

3 = UV/vis Detector ISCO UA-6



รูปที่ 15 การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราโดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose (11 x 100 ซม) ซะคอลัมน์ด้วย 0.3 M NaCl ใน 10 mM Tris-Hcl pH 7 อัตราเร็ว 9 มล/1 นาที เก็บสารละลายครั้งละ 135 มล.จนค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร คงที่และเข้าใกล้ศูนย์



ตารางที่ 8 สรุปขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เปอร็อกซิเดสจากเปลือกยางพาราในระดับปริมาณสูง  
โดยวิธีแลกเปลี่ยนประจุ แบบ คอลัมน์ โครมาโตกราฟี

Step	Total activity (U)	Total Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)	RZ
Bark extract	$4.38 \times 10^8$	$4.58 \times 10^5$	956.33	1	100	nd
Aqueous-2-phase	$3.67 \times 10^8$	$1.03 \times 10^4$	35,631.07	37.90	78.90	nd
Bound DEAE-cellulose	$1.82 \times 10^8$	$1.86 \times 10^3$	97,849.46	102.32	41.55	0.48
Unbound DEAE-cellulose	$6.04 \times 10^6$	-	-	-	1.38	0.117

\*\*เปลือกยางสดที่ใช้หนัก 80 กก.

nd = not determined

### 3.7. ผลการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเปอร้ออกซิเดสที่สกัดได้จากเปลือกยางพารา

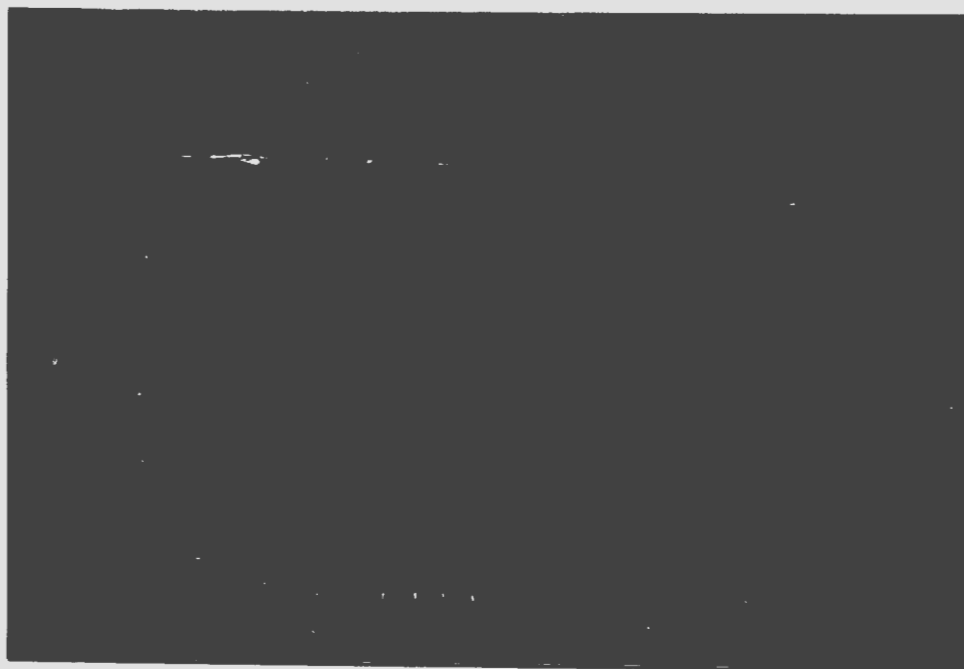
#### 3.7.1 ผลการศึกษาการหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา

##### โดยวิธี SDS-PAGE

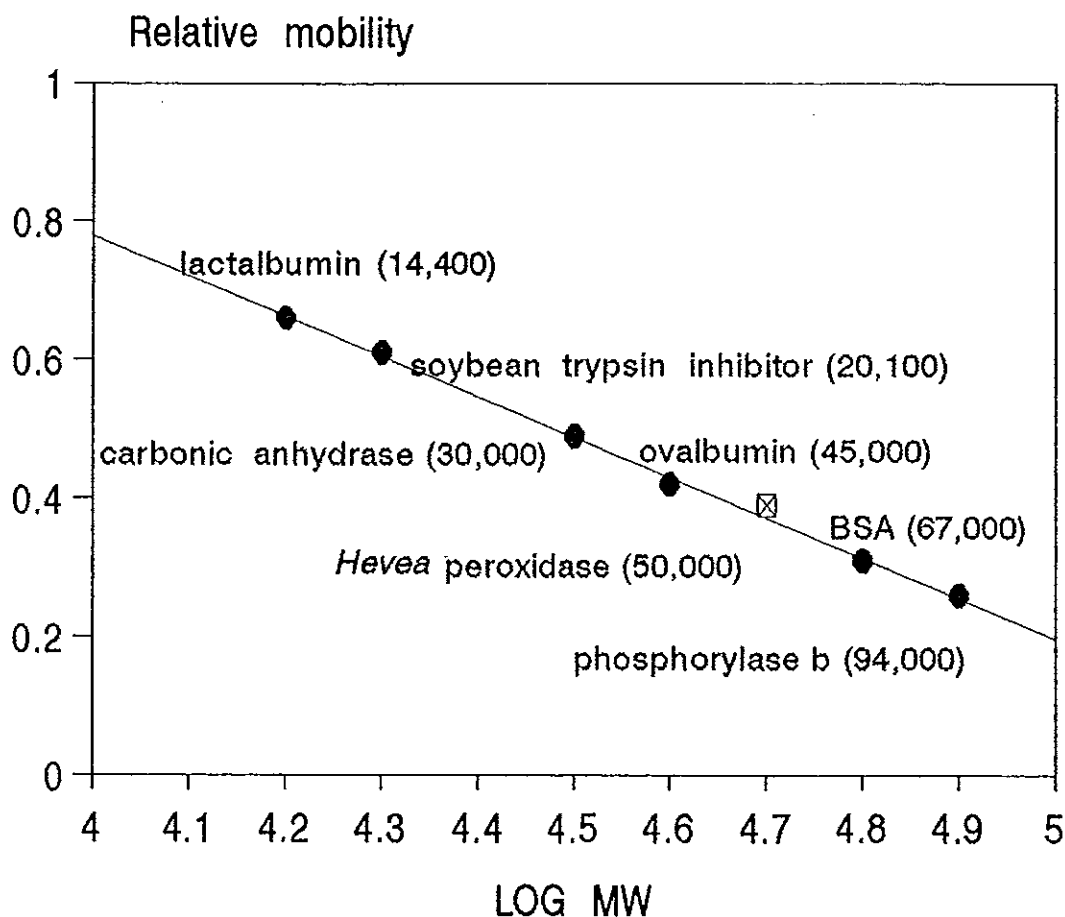
จากการศึกษาการกระจายของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่เตรียมได้ จากเปลือกยางพารา โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนของเปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราหลังจากทำบริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์ DEAE-cellulose แล้วจะมีแถบเดียว (ช่องที่ 2,3 รูปที่ 16) เมื่อนำน้ำหนักโมเลกุลย่อย โดยเปรียบเทียบกับสารเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว 6 ตัว คือ phosphorylase b ( MW 94,000 ดาลตัน ), bovine serum albumin (MW 67,000 ดาลตัน), ovalbumin (MW 43,000 ดาลตัน), carbonic anhydrase (MW 30,000 ดาลตัน), soybean trypsin inhibitor (MW 20,100) และ  $\alpha$ -lactalbumin (MW 14,400 ดาลตัน) (รูปที่ 16) แล้วเขียนกราฟระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ดังรูปที่ 17 พบว่า เปอร้ออกซิเดสจากเปลือกยางพารามีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 50,000 ดาลตัน

#### 3.7.2 การย้อมแอกติวิตีของเปอร้ออกซิเดสหลังการทำบริสุทธิ์โดย ND-PAGE

ได้นำเปอร้ออกซิเดสส่วนที่ได้จากการทำ aqueous two-phase system และ ส่วนที่เป็น bound และ unbound fraction ของคอลัมน์ DEAE-cellulose ไปแยกในเจล อีแลคโตรโฟรีซิส โดยวิธี non-denaturing แบบ slab เจล (gradient 4-10% ) แล้วย้อมโปรตีน 2 วิธี คือ ย้อมด้วย coomassie blue R 250 และย้อมแอกติวิตีเปอร้ออกซิเดส ได้ผลดังรูปที่ 18 แสดงให้เห็นว่า เปอร้ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์โดย DEAE-cellulose ในส่วน bound fraction มีโปรตีนเพียงแถบเดียว เมื่อย้อมด้วย coomassie blue R 250 และอยู่ในตำแหน่งเดียวกับโปรตีนที่ย้อมด้วยแอกติวิตีของเปอร้ออกซิเดส ส่วนเปอร้ออกซิเดสในส่วน unbound fraction ที่แยกได้จาก คอลัมน์ DEAE-cellulose มีตำแหน่งโปรตีนที่ย้อมด้วย แอกติวิตีต่างจาก bound fraction และมีปริมาณโปรตีนน้อยมากจึงไม่สามารถย้อม coomassie blue R 250 ได้



- รูปที่ 16 SDS-PAGE ของเปอร์ออกซิเดสทำบริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา
- ช่องที่ 1 = โปรตีนที่ได้จากจาก unbound DEAE-cellulose fraction
  - ช่องที่ 2,3 = เปอร์ออกซิเดสที่ elute จาก คอลัมน์ DEAE-cellulose
  - ช่องที่ 4 = เปอร์ออกซิเดสจาก Horseradish type VI
- ช่องที่ 2,3 และ 4 มีปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม
- ช่องที่ 1 มีปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม



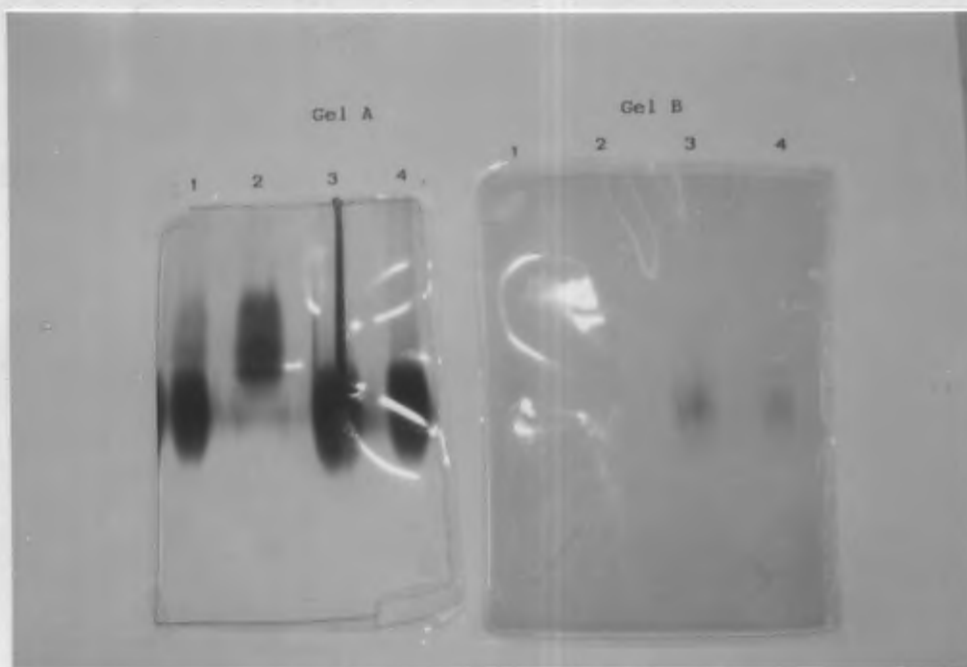
รูปที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุล ของโปรตีนกับการเคลื่อนที่สัมพันธ์ ที่ได้จากการศึกษา โดยวิธี SDS-PAGE โดยมีโปรตีนมาตรฐาน 6 ตัว คือ phosphorylase b (MW 94,000 ดาลตัน), bovine serum albumin (MW 67,000 ดาลตัน), ovalbumin (MW 43,000 ดาลตัน), carbonic anhydrase (MW 30,000 ดาลตัน), soybean trypsin inhibitor (MW 20,100 ดาลตัน) และ  $\alpha$ -lactalbumine (MW 14,400 ดาลตัน) จากกราฟน้ำหนักโมเลกุลของ เพอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราเท่ากับ 50,000 ดาลตัน

### 3.7.3 คุณสมบัติการเป็น IAA oxidase เปอร้ออกซิเดสหลังทำบริสุทธิ์แล้ว

จากการนำเปอร้ออกซิเดสที่เตรียมได้จากเปลือกยางพารา ไปแยกใน เจล อีเลคโตรโฟรีซิส โดยวิธี non-denaturing แบบ slab เจล (gradient 4-10%) แล้วย้อมโปรตีน โดยวิธีต่าง ๆ 3 วิธี คือ ย้อมด้วย coomassie blue R 250, ย้อมด้วยสารย้อมแอกติวิตีเปอร้ออกซิเดส และ ย้อมด้วยสารย้อมแอกติวิตี IAA oxidase พบว่า เปอร้ออกซิเดสในส่วน unbound และ bound DEAE-cellulose fraction สามารถออกซิไดส์ได้ทั้ง o-dianidine และ IAA ดังแสดงในรูปที่ 19 ซึ่งเป็นการทำ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส แบบกึ่ง SDS-PAGE พบว่า ตำแหน่งของโปรตีนที่ได้จากการย้อมด้วย coomassie blue R 250 มีเพียงตำแหน่งเดียว และตรงกับโปรตีนที่ย้อมด้วยแอกติวิตีของเปอร้ออกซิเดส และ IAA oxidase ผลที่ได้นี้คล้ายคลึงกับการทำ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส แบบ non-denaturing (รูปที่ 18)

### 3.7.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา

นำเปอร้ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์ได้ใหม่จากเปลือกยางพาราโดยผ่าน คอลัมน์ DEAE-cellulose กับเปอร้ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์ได้จากการผ่าน DEAE-cellulose batch-binding ที่เก็บไว้ในรูปของสารละลาย ที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6-8 เดือน ไปแยกใน เจล อีเลคโตรโฟรีซิส โดยวิธี กึ่ง SDS-PAGE แบบ slab เจล (gradient 7-15%) และทำการย้อมโปรตีนด้วย coomassie blue R 250, และ ย้อมด้วยแอกติวิตีเปอร้ออกซิเดส พบว่า เปอร้ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์เสร็จใหม่ มีแถบโปรตีนเด่นชัดเพียงแถบเดียว มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 50,000 ดาลตัน (รูปที่ 19 ช่องที่ 4 และ 5) ส่วนเปอร้ออกซิเดสที่เก็บไว้นานจะมีแถบโปรตีนที่มีโมเลกุลต่ำกว่าโปรตีนหลักปรากฏ (รูปที่ 19 ช่องที่ 2, 3 และ 6-10) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้สามารถกำจัดได้ โดยผ่านคอลัมน์ CM-cellulose เปอร้ออกซิเดสจะอยู่ในส่วนของ unbound (รูปที่ 19 ช่องที่ 1 และ 11) และผลการย้อมโปรตีนด้วยสารย้อมแอกติวิตีเปอร้ออกซิเดส ก็ได้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว และมีตำแหน่งเดียวกับแถบโปรตีนที่ย้อมด้วย coomassie blue R 250



รูปที่ 18 Non-denaturing gel electrophoresis ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา

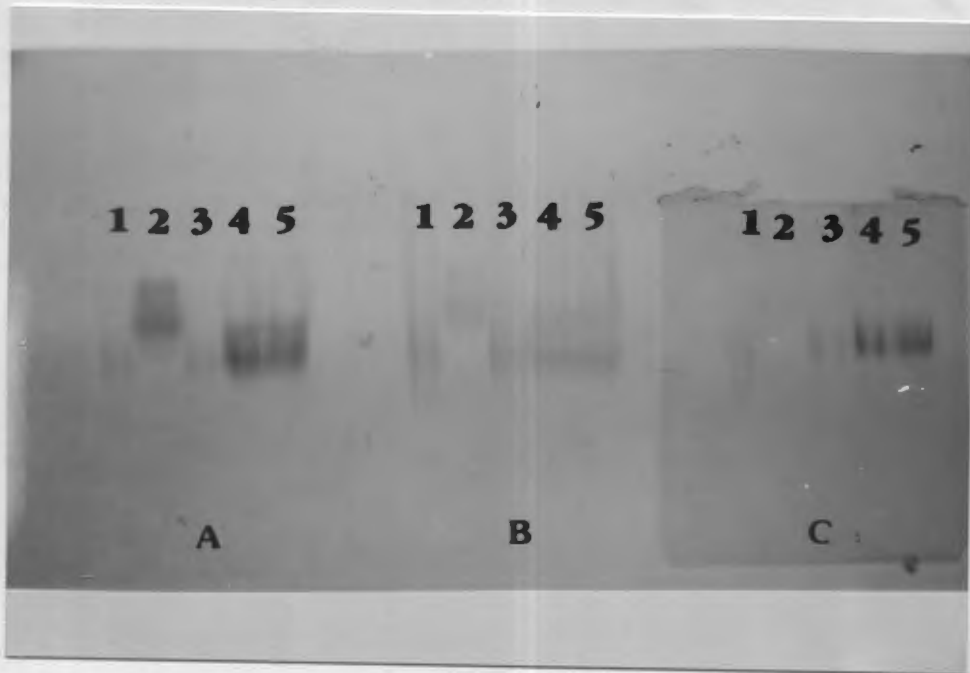
Gel A : การย้อมด้วย o-dianisidine

Gel B : การย้อมด้วย coomassie blue R-250

ช่องที่ 1 = เปอร์ออกซิเดสจาก aqueous two-phase

ช่องที่ 2 = เปอร์ออกซิเดสจาก unbound คอลัมน์ DEAE-cellulose

ช่องที่ 3 = เปอร์ออกซิเดสจาก bound คอลัมน์ DEAE-cellulose



รูปที่ 19 Non-denaturing PAGE ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา โดยการเปรียบเทียบการย้อมโดยวิธีต่าง ๆ

Gel A : การย้อมแบบ IAA-oxidase activity

Gel B : การย้อมแบบ peroxidase activity

Gel C : การย้อมด้วย coomassie blue R-255

ช่องที่ 1 เปอร์ออกซิเดสจาก aqueous two-phase

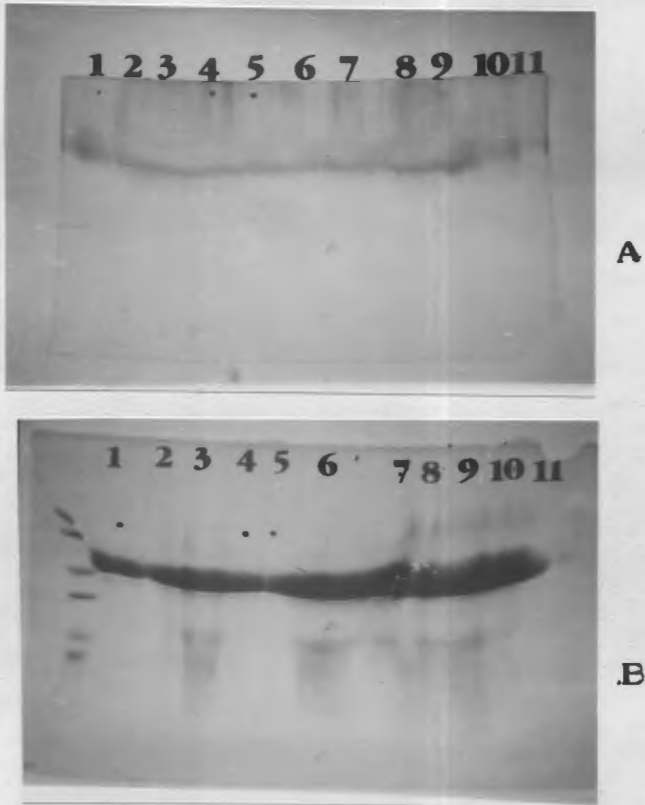
ช่องที่ 2 เปอร์ออกซิเดสจาก unbound DEAG-cellulose คอลัมน์

ช่องที่ 3 เปอร์ออกซิเดสจาก bound DEAE-cellulose คอลัมน์

ช่องที่ 4 เปอร์ออกซิเดสจาก bound DEAE-cellulose คอลัมน์

ช่องที่ 5 เปอร์ออกซิเดสจาก unbound CM-cellulose คอลัมน์

ช่องที่ 1, 3, 4 และ 5 มีปริมาณโปรตีน 20 ไมโครกรัม ส่วน ช่องที่ 2 มีปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม



รูปที่ 20 การทำ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ กึ่ง SDS-PAGE

Gel A :ย้อม o-dianisidine

Gel B :ย้อมด้วย coomassie blue R 250

ช่องที่ 1 = เปอร์ออกซิเดสจาก unbound CM-cellulose คอลัมน์ prep # 3 (after storage)

ช่องที่ 2,3,6,7 = เปอร์ออกซิเดสจาก DEAE-cellulose batch-biding prep # 1 # 2 # 3 (after storage)

ช่องที่ 4,5 = เปอร์ออกซิเดสจาก bound DEAE-cellulose คอลัมน์ (new prep)

ช่องที่ 8-10 = เปอร์ออกซิเดสจาก DEAE-cellulose batch-biding prep # 1-3 (after storage)

ช่องที่ 11 = เปอร์ออกซิเดสจาก unbound CM-cellulose คอลัมน์ prep # 1-3 (after storage)



### 3.7.5 ผลการศึกษาจลศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้จากเปลือกยางพารา

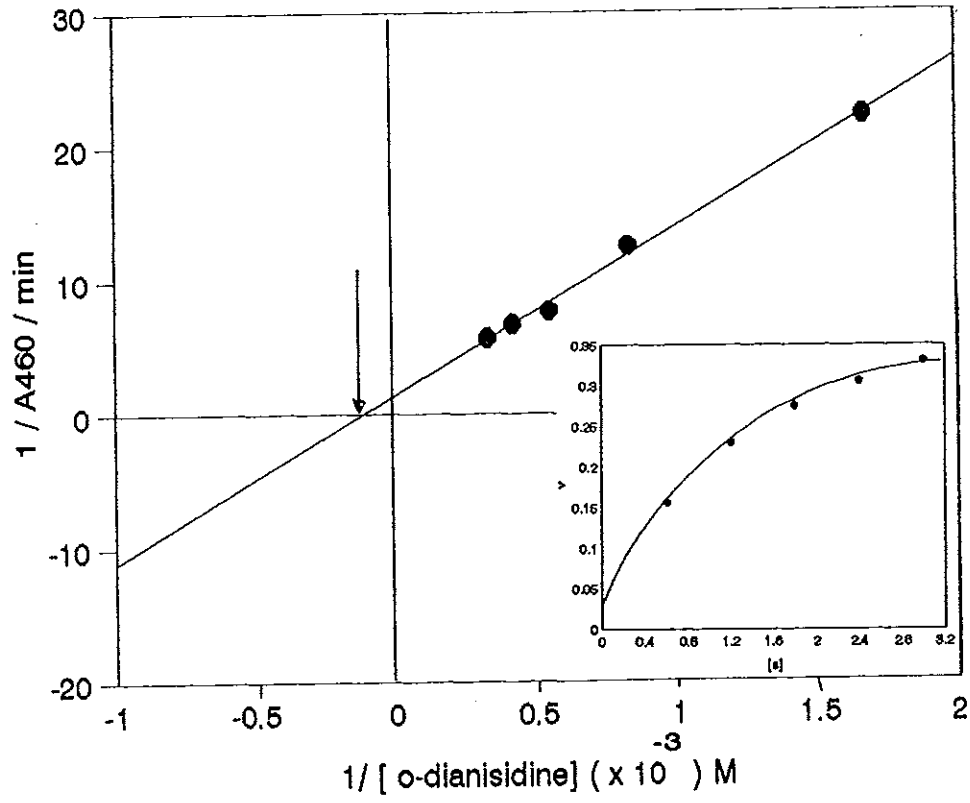
จากการนำเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราที่ได้จากการผ่าน คอลัมน์ DEAE-cellulose (0.643 มก./มล.) มาทดสอบหาค่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine และ  $H_2O_2$  โดยในการหาค่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine จะใช้ *o*-dianisidine ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ตั้งแต่  $0.6-3 \times 10^{-3}$  M ผสมกับ 0.1 M  $H_2O_2$  ส่วนการหาค่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  ใช้  $H_2O_2$  ที่มีความเข้มข้น  $0.6-3 \times 10^{-3}$  M ผสมกับ 0.5% *o*-dianisidine ค่าที่ได้แต่ละจุดจะนำมาคำนวณ (ผลแสดงในตารางที่ 9 และ 10) และเขียนกราฟระหว่างสัดส่วนผกผัน  $1/v$  ปริมาณ - เปอร์ออกซิเดสแอคทีวิตี กับ ความเข้มข้นของซับสเตรทที่มีการเปลี่ยนแปลง พบว่าค่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine จากกราฟมีค่าเท่ากับ 8.5 mM (รูปที่ 20) และค่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  จากกราฟมีค่าเท่ากับ 1.13 mM (รูปที่ 21) จากผลการทดลองจะเห็นว่าเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารามีค่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine สูงกว่า  $K_m$  ของ  $H_2O_2$  6.5 เท่า

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาจลนศาสตร์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของ o-dianisidine

[o-dianisidine] x10 <sup>-3</sup> M	Δ A <sub>460</sub> /min	$\frac{1}{[o-dianisidine] \times 10^{-3} M}$	$\frac{1}{A_{460}/min}$
3	0.175	0.33	5.71
2.4	0.15	0.416	6.67
1.8	0.13	0.55	7.41
1.2	0.08	0.83	12.5
0.6	0.045	1.667	22.2

$$\frac{1}{V_{max}} = 1.11 (A_{460}/min)^{-1} \quad V_{max} = 0.9 A_{460}/min$$

$$\frac{-1}{K_m} = -0.12 \times 10^{-3} M^{-1} \quad K_m = 8.5 \times 10^{-3} M$$



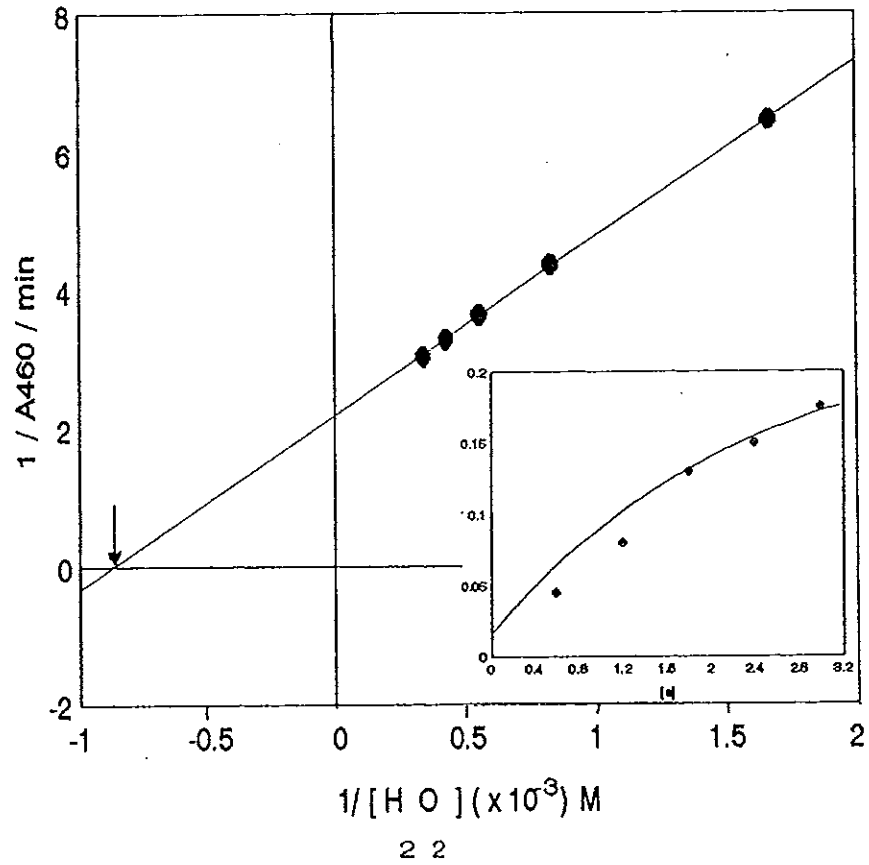
รูปที่ 21 ผลของ Lineweaver-Burk plot ของ o-dianisidine จากกราฟ ได้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 8.5 mM

ตารางที่ 10 ผลการศึกษาจลนศาสตร์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือยกวางพารา โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของ hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ $\times 10^{-3} \text{ M}$	$\Delta A_{460}/\text{min}$	$\frac{1}{[\text{H}_2\text{O}_2] \times 10 \text{ M}}$	$\frac{1}{A_{460}/\text{min}}$
3	0.33	0.33	3.03
2.4	0.305	0.416	3.28
1.8	0.275	0.55	3.64
1.2	0.23	0.83	4.35
0.6	0.156	1.667	6.45

$$\frac{1}{V_{\max}} = 2.22 (\text{A}_{460}/\text{min})^{-1} \quad V_{\max} = 0.45 \text{ A}_{460}/\text{min}$$

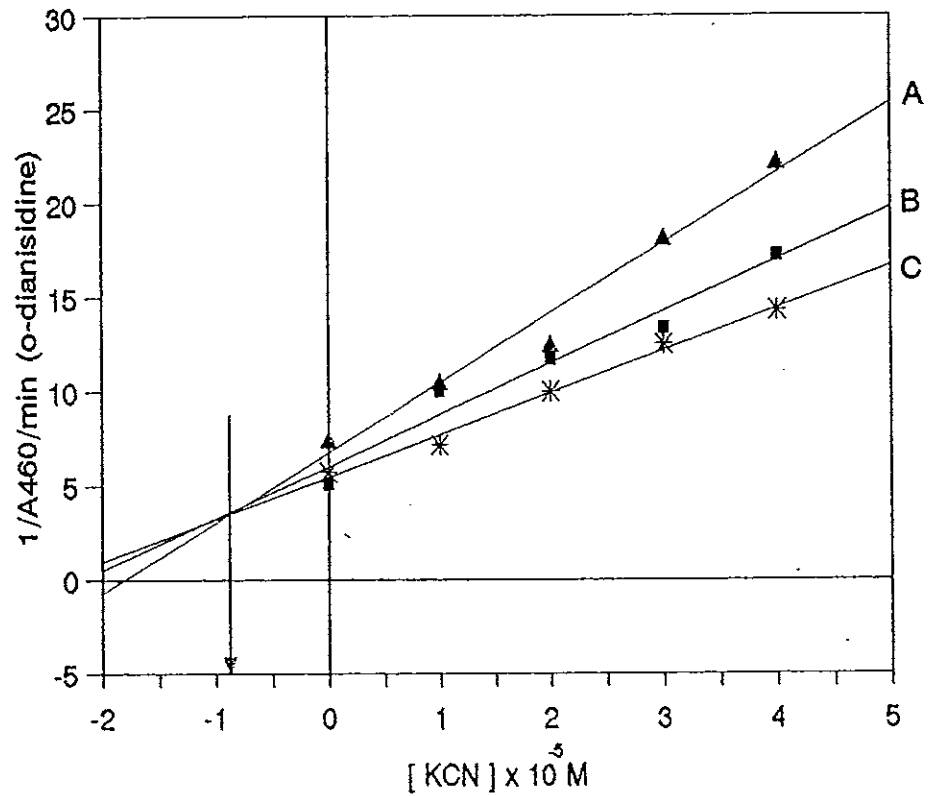
$$\frac{-1}{K_m} = -0.88 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \quad K_m = 1.13 \times 10^{-3} \text{ M}$$



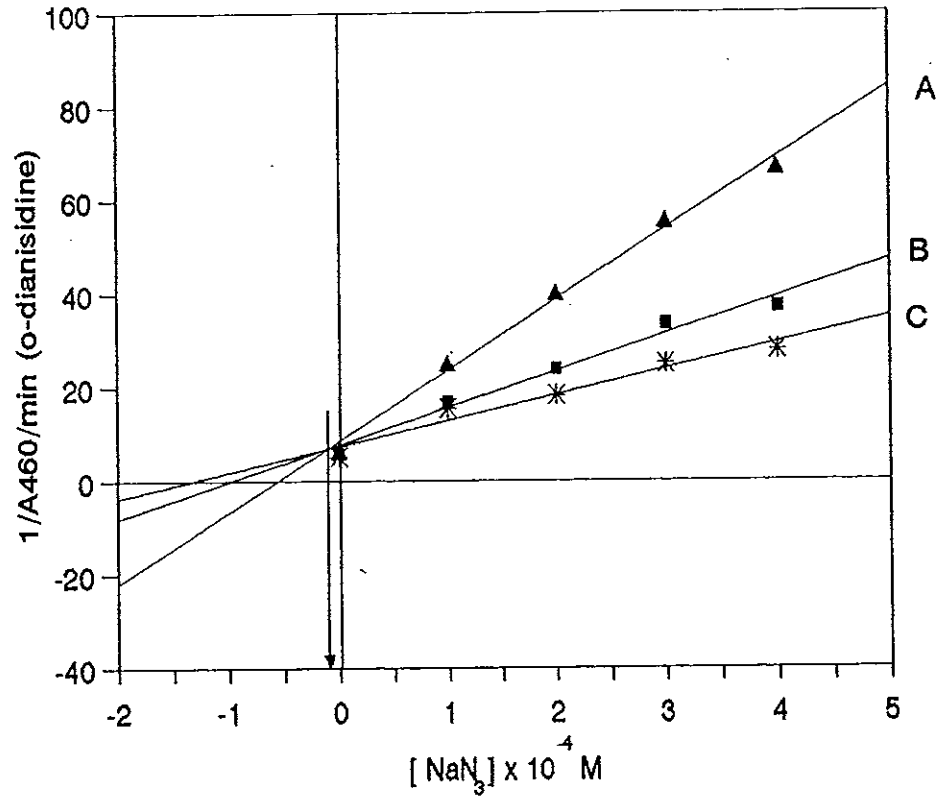
รูปที่ 22 ผลของ Lineweaver-Burk plot ของ  $H_2O_2$  จากกราฟได้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 1.13 mM

### 3.7.6 ผลของตัวยับยั้ง potassium cyanide (KCN) และ sodium azide (NaN<sub>3</sub>) ต่อแอกติวิตีของเปอร์ออกซิเดส

นำเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราที่ได้จากการผ่าน คอลัมน์ DEAE-cellulose ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 0.643 มก./มล. มาทดสอบถึงผลของตัวยับยั้งด้วย KCN และ NaN<sub>3</sub> ซึ่งในการทดลองใช้ KCN ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่  $0-4 \times 10^{-5}$  M และ NaN<sub>3</sub> ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่  $0-4 \times 10^{-4}$  M ส่วน o-dianisidine ใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ ตั้งแต่ช่วง  $3-5 \times 10^{-5}$  M และใช้ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้นคงที่ คือ 0.1 M นำผลที่ได้นำมาเขียนกราฟ Dixon plot ระหว่างความเข้มข้นของตัวยับยั้งกับสัดส่วนกลับของอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ใน 1 นาที พบว่า ค่า K<sub>i</sub> ของ KCN เท่ากับ 8.67  $\mu$ M (รูปที่ 23) และค่า K<sub>i</sub> ของ NaN<sub>3</sub> เท่ากับ 14.3  $\mu$ M (รูปที่ 24) จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราถูกยับยั้งได้โดย KCN มากกว่า NaN<sub>3</sub> 1.64 เท่า



รูปที่ 23 Dixon plot ของความเข้มข้นของตัวยับยั้ง KCN กับส่วนกลับของอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ใน 1 นาที ( $1/v$ ) และความเข้มข้นระดับต่างๆ ของ KCN คือ 0, 1, 2, 3 และ  $4 \times 10^{-5}$  M ต่อความเข้มข้นของ o-dianisidine ในระดับ  $3 \times 10^{-5}$  M (เส้น A),  $4 \times 10^{-5}$  M (เส้น B) และ  $5 \times 10^{-5}$  M (เส้น C) จากกราฟค่า  $K_i$  ของ KCN เท่ากับ  $8.67 \mu\text{M}$

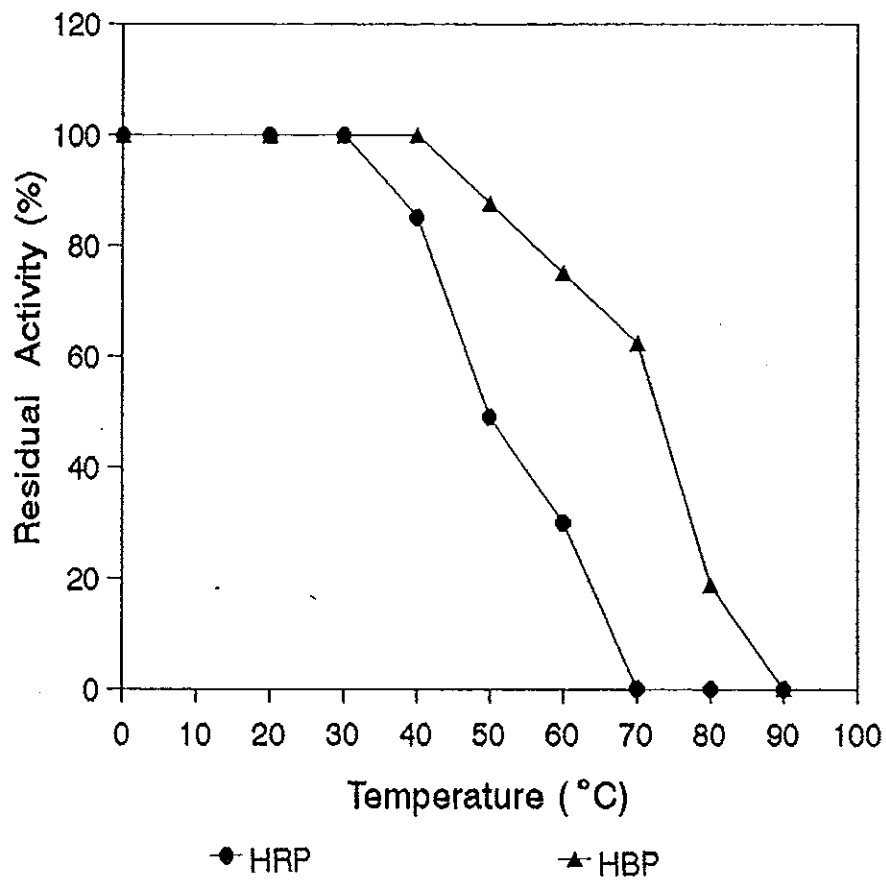


รูปที่ 24 Dixon plot ของความเข้มข้นของตัวยับยั้ง  $\text{NaN}_3$  กับส่วนกลับของอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ใน 1 นาที ( $1/v$ ) และความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ของ  $\text{NaN}_3$  คือ 0, 1, 2, 3 และ  $4 \times 10^{-4}$  M ต่อความเข้มข้นของ *o*-dianisidine ในระดับ  $3 \times 10^{-5}$  M (เส้น A),  $4 \times 10^{-5}$  M (เส้น B) และ  $5 \times 10^{-5}$  M (เส้น C) จากกราฟสามารถหาค่า  $K_i$  ของ  $\text{NaN}_3$  เท่ากับ  $14.3 \mu\text{M}$



### 3.7.7 ผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

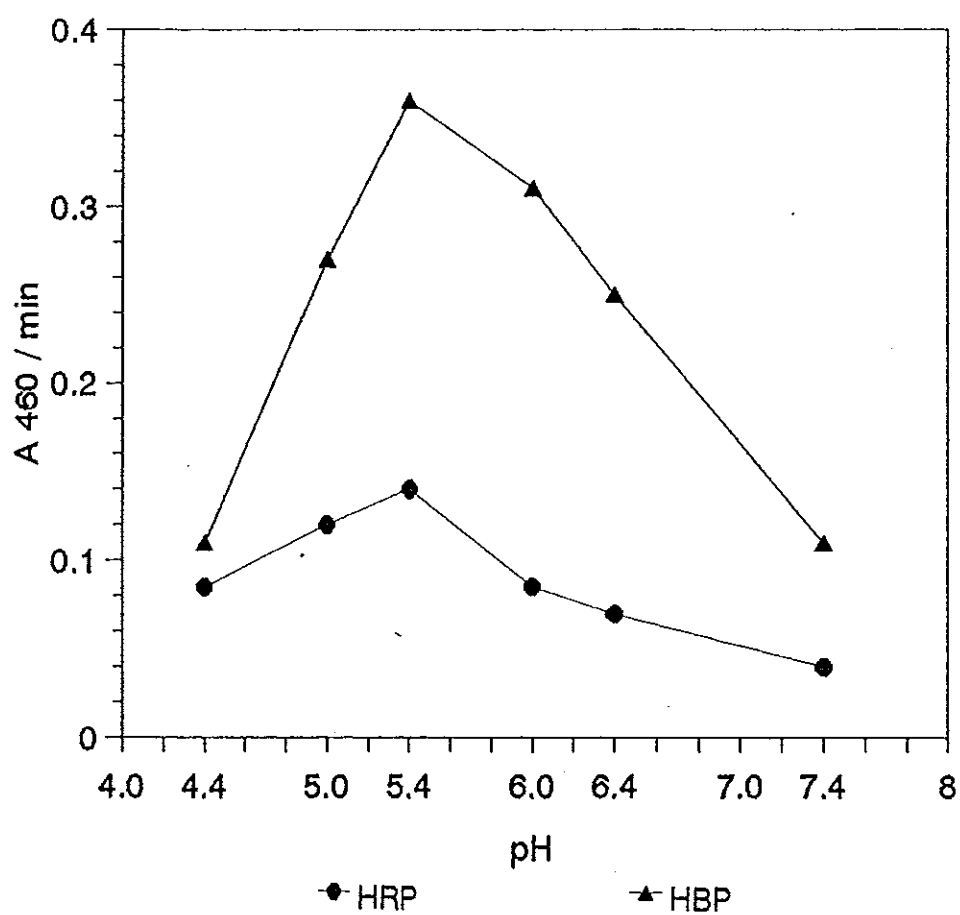
เมื่อนำเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้จากเปลือกยางพารา หลังการผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บนคอลัมน์ DEAE-cellulose มีปริมาณโปรตีน 0.5 มก./มล. และเปอร์ออกซิเดสของ horseradish (HRP) type II (ปริมาณโปรตีน 1 มก./มล.) มาอุ่นในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการนำมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้น นำมาหาปริมาณเปอร์ออกซิเดสพบว่า เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราสามารถทนต่ออุณหภูมิช่วง 20-40 องศาเซลเซียสได้ดี โดยให้ค่าปริมาณเปอร์ออกซิเดสเท่ากับชุดควบคุม (ที่เก็บไว้ในน้ำแข็ง) หลังจากนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นปริมาณเปอร์ออกซิเดสจะค่อย ๆ ลดลง โดยลดลงเหลือครึ่งหนึ่งของปริมาณเริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส และมีค่าเป็น 0 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในขณะที่ เปอร์ออกซิเดสของ horseradish type II สามารถทนต่ออุณหภูมิช่วง 20-30 องศาเซลเซียสได้ดี และปริมาณเปอร์ออกซิเดสจะลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของปริมาณเริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีค่าเป็น 0 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ดังผลการทดลองในรูปที่ 25



รูปที่ 25 ผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากเปลือกขางพารา (▲—▲) เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แช่ไว้ในน้ำแข็ง และ horseradish (●—●)

### 3.7.8 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เมื่อนำเอาเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกขางพารา (0.5มก./มล.) และเปอร์ออกซิเดสจาก horseradish type II (ปริมาณโปรตีน 1 มก./มล.) มาทดสอบหาแอกติวิตี ที่ pH ต่าง ๆ กัน คือ pH 4.4, 5, 5.4, 6, 6.4 และ 7.4 โดยใช้ 50 mM sodium acetate บัฟเฟอร์ และ *o*-dianisidine เป็นสารตั้งต้น จากผลการทดลองพบว่า ทั้งเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกขางพาราและเปอร์ออกซิเดสจาก Horseradish มีค่าเปอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ pH 5.4 ดังผลการทดลองในรูปที่ 26



รูปที่ 26 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกขางพารา (0.5 มก./มล) ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ) และ horseradish (1 มก./มล) ( $\bullet$ — $\bullet$ ) โดยใช้ 50 mM sodium acetate บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 4.4 - 7.4

**3.7.9 การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารตั้งต้น pyrogallol และ o-dianisidine ต่อ  
แอกติวิตีของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา *Hevea brasiliensis* (HRP)  
และ Horseradish (HRP)**

จากการทดลองโดยการนำเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์จากเปลือกยางพารา (HBP) และ HRP type VI ทั้งคู่มีปริมาณโปรตีน 1 มก./มล. มา 10 ไมโครลิตร ทดสอบหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส โดยใช้สารตั้งต้น o-dianisidine และ pyrogallol ผลแสดงในตารางที่ 11 โดยปรากฏว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากัน แอกติวิตีของเปอร์ออกซิเดสของ HBP จะสูงกว่าเปอร์ออกซิเดสของ HRP 1.3 เท่า เมื่อใช้ o-dianisidine แต่ในทางกลับกัน เมื่อใช้ pyrogallol เป็นสารตั้งต้น ปริมาณแอกติวิตีเปอร์ออกซิเดสของ HRP กลับสูงกว่า HBP 12.65 เท่า

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบความจำเพาะของสารตั้งต้น (substrate specificity) ระหว่าง HRP และ HBP

ชนิดของเปอร์ออกซิเดส	ปริมาณแอกติวิตี (U/มล.)	
	o-dianisidine	pyrogallol
HBP	250,000	13.83
HRP	192,000	175

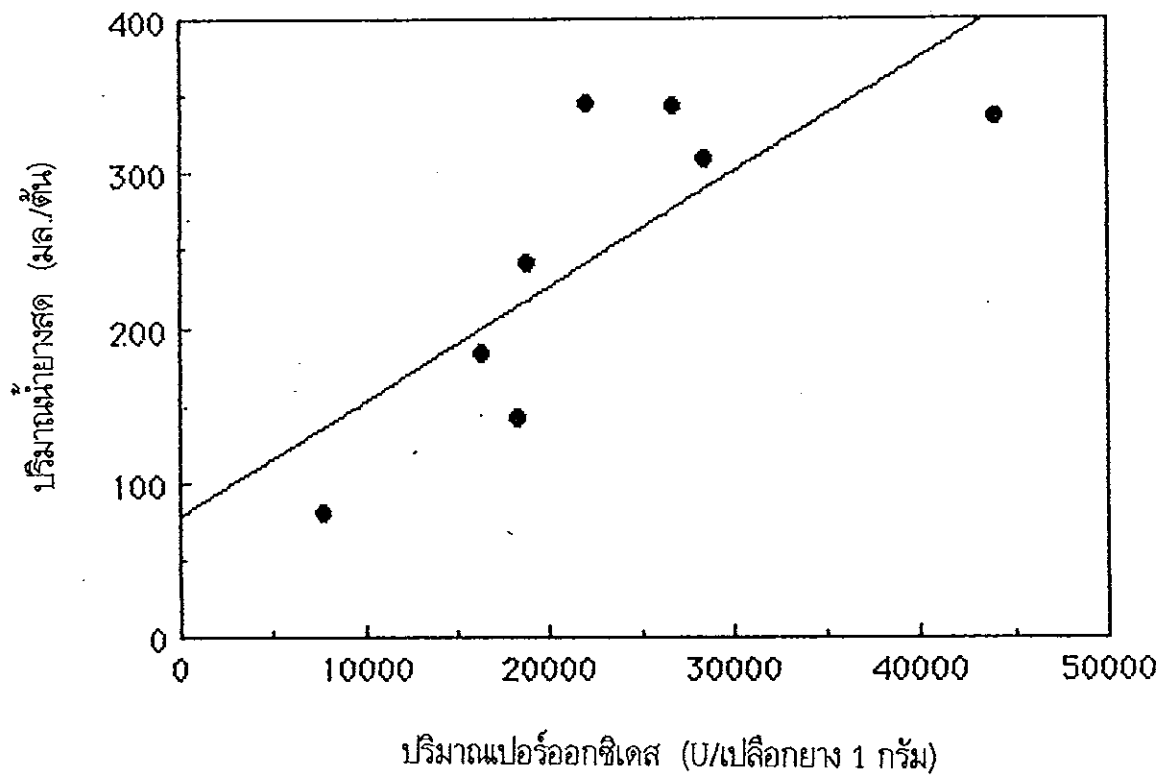
### 3.8. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยางแห้งกับปริมาณของเปอร์ออกซิเดสจาก เปลือกยางที่กรีดได้จากต้นยาง

จากการนำสารสกัดจากเปลือกยางพารา ที่ได้จากการกรีดเปลือกยางของต้นยางแต่ละต้น ที่มีผลผลิต (น้ำยางสด) ต่างกัน แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ต้นยางที่มีปริมาณน้ำยางสดต่อต้นสูง (high) ปานกลาง (medium) และต่ำ (low) มาหาปริมาณเปอร์ออกซิเดส พบว่าปริมาณเปอร์ออกซิเดสมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำยางสด คือ เปลือกยางจากต้นยางที่มีผลผลิตสูง จะมีปริมาณเปอร์ออกซิเดสสูงและสูงกว่าเปลือกยางต้นยางที่มีผลผลิตปานกลางและต่ำ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 11 เมื่อนำมาหาค่าสหสัมพันธ์ (correlation) หรือค่า  $r$  มีค่าเท่ากับ 0.77 (รูปที่ 27)

เมื่อนำน้ำยางสดมาอบแห้งและชั่งน้ำหนักยาง (dry rubber) ที่ได้ จากนั้นนำค่าที่ได้ มาหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักยาง (กรัม) กับปริมาณเปอร์ออกซิเดส (unit/กรัม) ได้  $r = 0.67$  (รูปที่ 28)

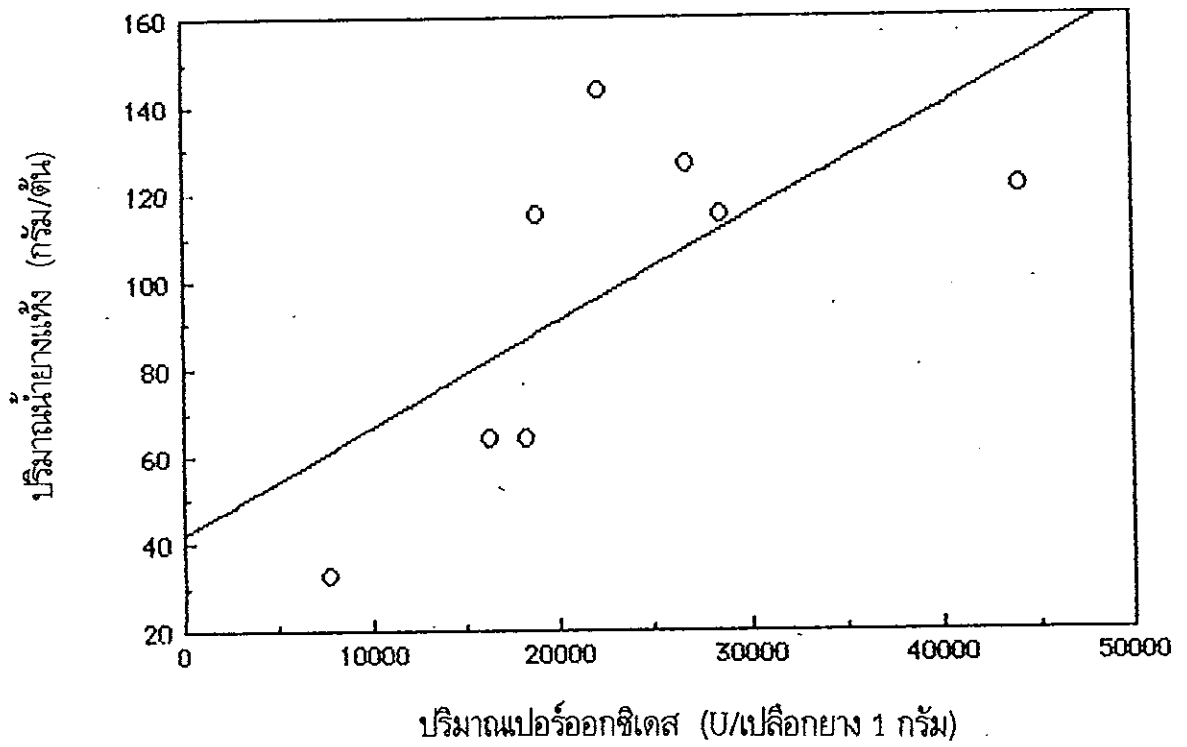
ตารางที่ 12 ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในเปลือกยาง ต่อการกรีด 1 ครั้ง กับปริมาณน้ำยางสดและ  
น้ำยางแห้ง

ต้นที่	ปริมาณเปอร์ออกซิเดส unit/เปลือกยาง 1 กรัม	ปริมาณน้ำยางสด มล./ต้น	ปริมาณน้ำยางแห้ง กรัม/ต้น
1	$7.65 \times 10^3 \pm 4.28$	$80.00 \pm 10$	$32.73 \pm 3.89$
2	$16.3 \times 10^3 \pm 2.25$	$183.33 \pm 20.83$	$63.95 \pm 7.28$
3	$18.22 \times 10^3 \pm 1.05$	$143.33 \pm 5.77$	$64.47 \pm 3.49$
4	$18.77 \times 10^3 \pm 4.84$	$241.67 \pm 29.29$	$115.08 \pm 20.86$
5	$22.1 \times 10^3 \pm 4.31$	$345.00 \pm 13.23$	$143.35 \pm 6.02$
6	$26.75 \times 10^3 \pm 9.55$	$343.33 \pm 5.77$	$126.76 \pm 4.49$
7	$28.5 \times 10^3 \pm 6.25$	$308.33 \pm 23.63$	$115.04 \pm 10.47$
8	$44.00 \times 10^3 \pm 8.79$	$336.67 \pm 5.77$	$121.43 \pm 2.07$



รูปที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเปอร์ออกไซด์ ( U /เปลือกยาง 1 กรัม ) กับ ปริมาณน้ำยางสด ( มล./ตัน ) จากกราฟค่า  $r = 0.779$





รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเปอร์ออกไซด์ ( U/เปลือกยาง 1 กรัม ) กับ ปริมาณน้ำยางแห้ง ( กรัม/ตัน ) จากกราฟค่า  $r = 0.675$

### 3.9 การเปรียบเทียบความสามารถในการตกตะกอน สารประกอบฟีนอล และ สารประกอบอะนีนีลีนและการตกตะกอนร่วมของสารประกอบฟีนอล และอะนีนีลีน กับยาปราบแมลงและศัตรูพืช ระหว่างเปอร์ออกซิเดสที่เตรียมจากเปลือกยางพารา (HBP) กับ horseradish

จากผลการทดลอง พบว่าทั้ง HBP และ HRP สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลและสารประกอบอะนีนีลีนได้ โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13 และ รูปที่ 29-36 ซึ่งพบว่า HBP สามารถตกตะกอนฟีนอลได้ดีเท่ากับ HRP (รูปที่ 29) และ HBP สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อนำ ฟีนอลมารวมกับ แพลนโชน (รูปที่ 29), เซพวิน หรือ รวด้อ๊ับ แต่จะได้ผลการตกตะกอนน้อยลงเมื่อนำฟีนอลมารวมกับ โพลิดอล, ฟอสตริน, ซีแลส หรือ เมโทรนัล และให้ผลคงเดิมเมื่อนำฟีนอลมารวมกับ แลสโซ่ สำหรับผลของ HRP พบว่า HRP สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อนำฟีนอลมารวมกับแพลนโชน (รูปที่ 29) หรือ รวด้อ๊ับ แต่จะได้ผลการตกตะกอนน้อยลง เมื่อนำฟีนอลมารวมกับ เซพวิน, ซีแลส หรือ เมโทรนัล และให้ผลคงเดิมเมื่อนำฟีนอลมารวมกับ โพลิดอล, ฟอสตริน หรือ แลสโซ่

สำหรับผลการตกตะกอนของ 4-methylphenol พบว่า HRP สามารถตกตะกอนสารนี้ได้ดีกว่า HBP แต่ HBP สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อนำ 4-methylphenol มารวมกับ เซพวิน หรือ โพลิดอล แต่จะได้ผลการตกตะกอนน้อยลงเมื่อนำ 4-methylphenol มารวมกับ ฟอสตริน, แพลนโชน, แลสโซ่ ซีแลส หรือ เมโทรนัล ในขณะที่ HRP ไม่สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อนำมารวมกับสารทดลองทั้ง 8 ชนิด แต่กลับให้ผลของตะกอนลดลงเมื่อนำ 4-methylphenol มารวมกับ ฟอสตริน, แพลนโชน, แลสโซ่ ซีแลส หรือ เมโทรนัล และให้ผลคงเดิมเมื่อนำ 4-methylphenol มารวมกับ เซพวิน, โพลิดอล หรือ รวด้อ๊ับ

ส่วนผลการตกตะกอน 2-nitro phenol พบว่าทั้ง HRP และ HBP ไม่สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนสารนี้ได้ (รูปที่ 31) แต่ HBP ทำให้เกิดการตกตะกอนเมื่อนำ 2-nitro phenol มารวมกับ โพลิดอล (รูปที่ 31) ฟอสตริน หรือ แลสโซ่ สำหรับ HRP ทำให้เกิดการตกตะกอนได้เมื่อนำ 2-nitro phenol มารวมกับ โพลิดอล (รูปที่ 31) หรือ แลสโซ่

ผลการตกตะกอน 2,4-dinitrophenol พบว่าทั้ง HRP และ HBP ไม่สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนสารนี้ได้ แต่ทั้ง HRP และ HBP สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนได้เมื่อนำ 2,4-dinitrophenol มารวมกับ เซพวิน, โพลิดอล หรือ แลสโซ่

ส่วนผลการตกตะกอน aniline พบว่าทั้งHRP และ HBP สามารถตกตะกอน aniline ได้ดีเท่า ๆ กัน (รูปที่ 32) และ HBP สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อนำ aniline มารวมกับ เซพวิน, หรือ เมโทรนัล (รูปที่ 32) แต่จะให้ผลการตกตะกอนน้อยลงเมื่อนำ aniline มารวมกับ ฟอสดริน, แพลนโซน, ราวดีอับ หรือ โพลิดอล และให้ผลคงเดิมเมื่อนำ aniline มารวมกับ แลสโซ หรือ ซีแลส (รูปที่ 32) ส่วน HRP สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อนำ aniline มารวมกับ แพลนโซน, ราวดีอับ, โพลิดอล หรือ ซีแลส (รูปที่ 32) และให้ผลคงเดิมเมื่อนำ aniline มารวมกับ เซพวิน หรือ แลสโซ

ผลการตกตะกอน 4-bromoaniline พบว่าทั้งHRP และ HBP สามารถตกตะกอน 4-bromoaniline ได้ดีเท่า ๆ กัน แต่ HBP ไม่สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้น และทำให้เกิดการตกตะกอนน้อยลง เมื่อนำ 4-bromoaniline มารวมกับ ฟอสดริน, แพลนโซน, ราวดีอับ แลสโซ ซีแลส หรือ เมโทรนัล และให้ผลคงเดิมเมื่อนำมารวมกับ เซพวิน หรือ โพลิดอล ส่วน HRP สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อนำ 4-bromoaniline มารวมกับ ฟอสดริน, แพลนโซน, ราวดีอับ, ซีแลส หรือ เมโทรนัล และให้ผลคงเดิมเมื่อนำมารวมกับ โพลิดอล

สำหรับผลการตกตะกอน 1-naphthylamine พบว่าทั้งHRP และ HBP ไม่สามารถตกตะกอนสารนี้ได้ (รูปที่ 33 และ 34) แต่ HBP สามารถตกตะกอนได้เมื่อนำ 1-naphthylamine มารวมกับ โพลิดอล, แลสโซ, ซีแลส, เซพวิน (รูปที่ 33) หรือ ฟอสดริน (รูปที่ 34) และให้ผลคงเดิมเมื่อนำมารวมกับ แพลนโซน, ราวดีอับ หรือ เมโทรนัล ส่วน HRP สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อนำ 1-naphthylamine มารวมกับ เซพวิน (รูปที่ 33), โพลิดอล, ฟอสดริน (รูปที่ 34) แลสโซ หรือ ซีแลส และให้ผลคงเดิมเมื่อนำมารวมกับ แพลนโซน, ราวดีอับ หรือ เมโทรนัล

ส่วนผลการตกตะกอน 1,4-phenylenediamine dihydrochloride พบว่าทั้งHRP และ HBP สามารถตกตะกอนสารนี้ได้ดีมาก (รูปที่ 36) และ HBP สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อนำมารวมกับ เมโทรนัล (รูปที่ 36) หรือ โพลิดอล แต่จะให้ผลการตกตะกอนลดลงเมื่อนำมารวมกับ ฟอสดริน, แพลนโซน หรือ ราวดีอับ และให้ผลคงเดิมเมื่อนำมารวมกับ เซพวิน (รูปที่ 36) ซีแลส หรือ แลสโซ ส่วนผลของ HRP สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อนำมารวมกับ ฟอสดริน, ราวดีอับ, แลสโซ หรือ ซีแลส

ผลการตกตะกอน 8-hydroxyquinoline พบว่า HRP สามารถตกตะกอนสารนี้ได้ดีกว่า HBP มาก (รูปที่ 35) แต่ HBP สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อนำสารนี้มารวมกับ เซพวิน, โพลีดอล, ฟอสตริน (รูปที่ 35) แลสโซ่ หรือ ซีแลส (รูปที่ 35) และให้ผลคงเดิมเมื่อนำมารวมกับ แพลนโทน, ราวด์อับ หรือ เมโทรนัล ส่วน HRP สามารถตกตะกอนได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อนำมารวมกับ ซีแลส (รูปที่ 35) แต่ให้ผลการตกตะกอนลดลงเมื่อนำสารนี้มารวมกับ ฟอสตริน, ราวด์อับ, แลสโซ่ หรือ เมโทรนัล และให้ผลคงเดิมเมื่อนำมารวมกับ เซพวิน หรือ โพลีดอล

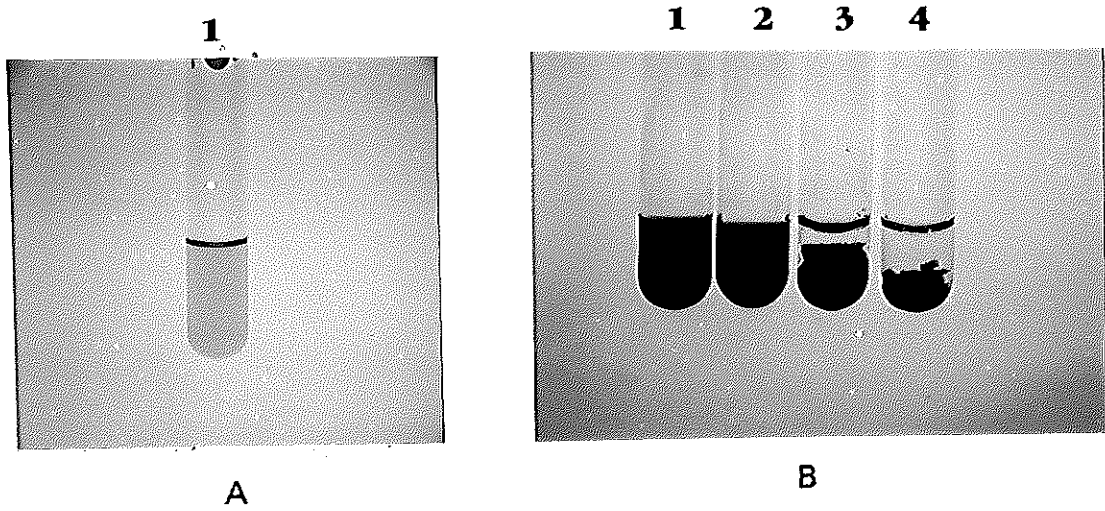
ตารางที่ 13 ผลการตกตะกอนสารประกอบฟีนอล และสารประกอบอะนีนและผลการตกตะกอนร่วม ระหว่างสารประกอบฟีนอลและอะนีน กับยาปราบแมลงและศัตรูพืช ของ HRP และ HBP

สารที่ใช้ทดสอบการ ตกตะกอนร่วม	Control		เซพวิน		โพลิดอน		ฟอสตริน		แพลนโซน		ราวดีอับ		แลสโซ		ซีแลค		เมโทรนัล	
	HBP	HRP	HBP	HRP	HBP	HRP	HBP	HRP	HBP	HRP	HBP	HRP	HBP	HRP	HBP	HRP	HBP	HRP
phenol	V/+3	V/+3	0/0	0/0	V/+2	V/+2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/+2	0/+2	0/0	0/0
4-methoxyphenol	V/+3	V/+4	V/+4	V/+4	V/+4	V/+4	V/0	V/0	V/0	V/+3	V/+4	V/+2	V/+2	V/+2	V/+2	V/+2	V/+2	V/+3
3-methyl phenol	V/+4	0/0	V/+1	0/0	V/+5	V/+5	V/+1	V/+1	V/+5	V/+5	V/+2	V/+1	V/+2	V/+2	V/+1	V/+1	V/0	V/+1
2-nitro phenol	0/0	0/0	0/0	0/0	V/+5	V/+5	V/+2	0/0	0/0	0/0	V/0	V/0	V/+1	V/+1	0/0	0/+1	0/0	0/0
2,4-dinitrophenol	0/0	0/0	V/+3	0/+3	V/+5	V/+5	0/0	0/0	V/0	V/0	0/0	0/0	0/+1	0/+1	0/+1	0/+1	0/0	0/0
aniline	V/+3	V/+3	V/+5	V/+3	V/+4	V/+4	V/0	V/+4	V/0	V/0	V/0	V/0	V/+3	V/+3	V/+3	V/+4	V/+4	V/+4
4-bromoaniline	V/+3	V/+3	V/+3	V/+5	V/+3	V/+5	V/+1	V/+1	V/+1	V/0	V/0	V/0	V/+1	V/+4	V/+2	V/+2	V/0	V/+2
1-naphthylamine	0/0	0/0	V/+3	V/+5	V/+4	V/+4	V/+3	V/+5	V/0	V/0	V/0	V/0	V/+2	V/+2	V/+1	V/+4	V/0	V/0
8-hydroxyquinoline	V/+1	V/+4	V/+3	V/+5	V/+5	V/+5	V/+5	V/+2	0/0	0/0	V/0	V/0	V/+2	V/+2	V/+4	V/+5	V/0	V/+3
1,4-phenylenediamine dihydrochloride	V/+4	V/+4	V/+4	V/+3	V/+5	V/+5	V/0	V/+2	V/0	V/+3	V/+2	V/+2	V/+4	V/+2	V/+4	V/+2	V/+4	V/+5

V = มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย      +1 = มีตะกอนลักษณะขุ่นเล็กน้อย      +2 = มีการตกตะกอนเล็กน้อย      +3 = มีการตกตะกอนปานกลาง

+4 = มีการตกตะกอนมาก      +5 = มีการตกตะกอนสมบูรณ์

\* เมื่อใช้ o-dianisidine เป็นสับสเตรท ปริมาณแอคติวิตีของ HRP มากกว่า HBP ประมาณ 1.5 เท่า



1 = phenol + แพลนโซน

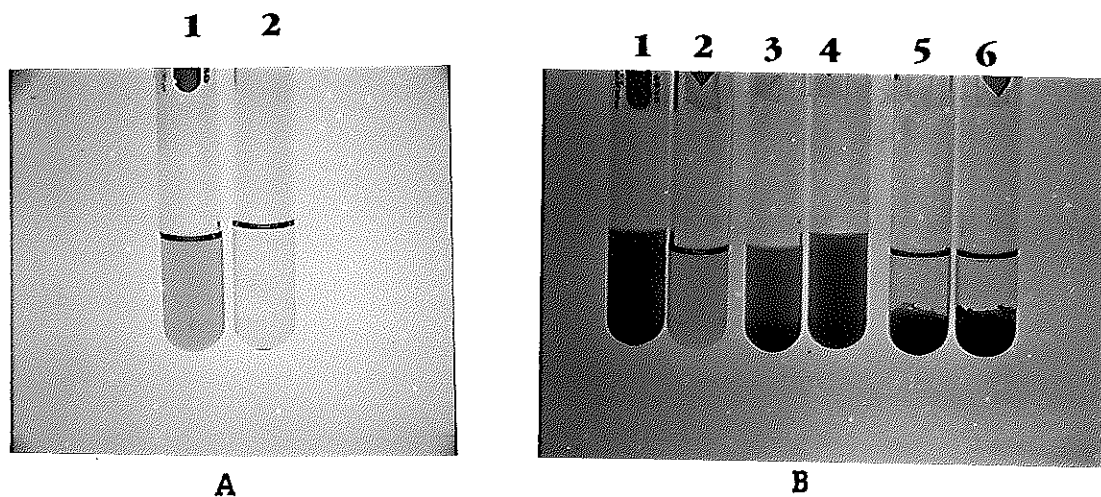
1 = phenol + HBP

2 = phenol + HRP

3 = phenol + แพลนโซน + HBP

4 = phenol + แพลนโซน + HRP

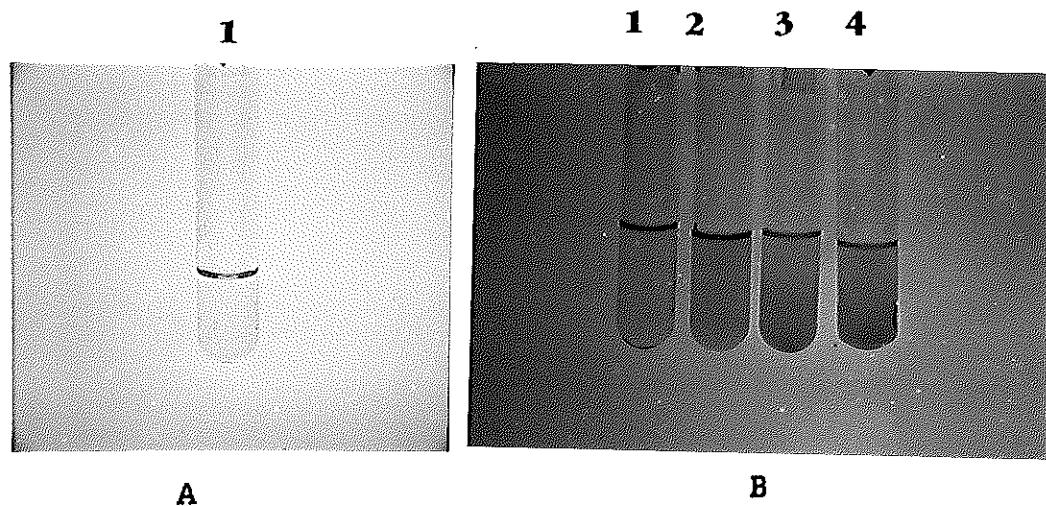
รูปที่ 29 แสดงผลของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) และ horseradish (HRP) ในการตกตะกอน phenol และ แพลนโซน



- 1 = 3-methyl phenol + แพลนโชน  
 2 = 3-methyl phenol + โพลีดอล

- 1 = 3-methyl phenol + HBP  
 2 = 3-methyl phenol + HRP  
 3 = 3-methyl phenol + โพลีดอล + HBP  
 4 = 3-methyl phenol + โพลีดอล + HRP  
 5 = 3-methyl phenol + แพลนโชน + HBP  
 6 = 3-methyl phenol + แพลนโชน + HRP

รูปที่ 30 แสดงผลของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) และ horseradish (HRP) ในการตกตะกอน 3-methyl phenol, โพลีดอล และ แพลนโชน



1 = 2-nitrophenol + ไพริดีน

1 = 2-nitrophenol + HBP

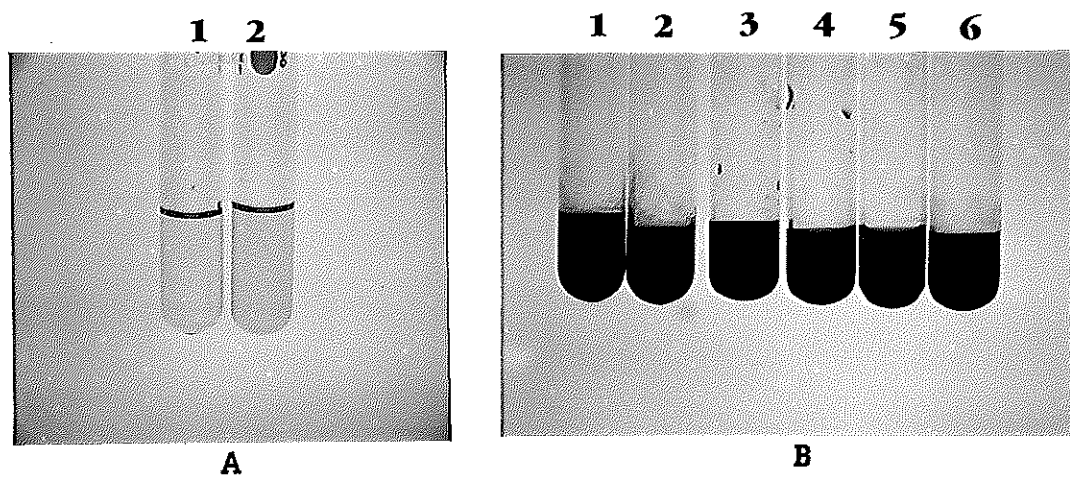
2 = 2-nitrophenol + HRP

3 = 2-nitrophenol + ไพริดีน + HBP

4 = 2-nitrophenol + ไพริดีน + HRP

รูปที่ 31 แสดงผลของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกขางพารา (HBP) และ horseradish (HRP) ในการตกตะกอน 2-nitrophenol และไพริดีน

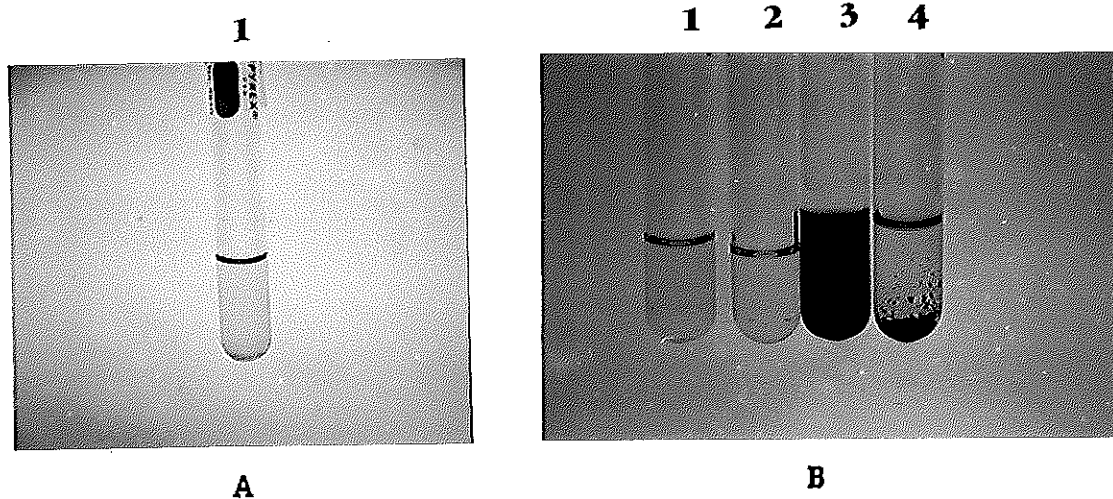




- 1 = aniline + ซีแลค  
2 = aniline + เมโทรนัล

- 1 = aniline + HBP  
2 = aniline + HRP  
3 = aniline + ซีแลค + HBP  
4 = aniline + ซีแลค + HRP  
5 = aniline + เมโทรนัล + HBP  
6 = aniline + เมโทรนัล + HRP

รูปที่ 32 แสดงผลของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) และ horseradish (HRP) ในการตกตะกอน aniline, ซีแลค และ เมโทรนัล



1 = 1-naphthylamine + เซฟวิน

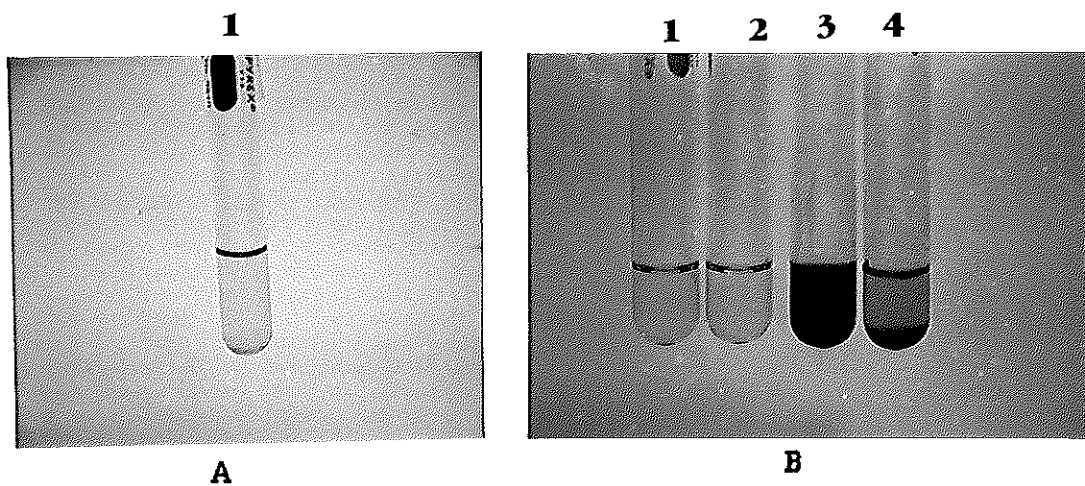
1 = 1-naphthylamine + HBP

2 = 1-naphthylamine + HRP

3 = 1-naphthylamine + เซฟวิน + HBP

4 = 1-naphthylamine + เซฟวิน + HRP

รูปที่ 33 แสดงผลของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) และ horseradish (HRP) ในการตกตะกอน 1-naphthylamine และ เซฟวิน



1 = 1-naphthylamine + ฟอสตริน

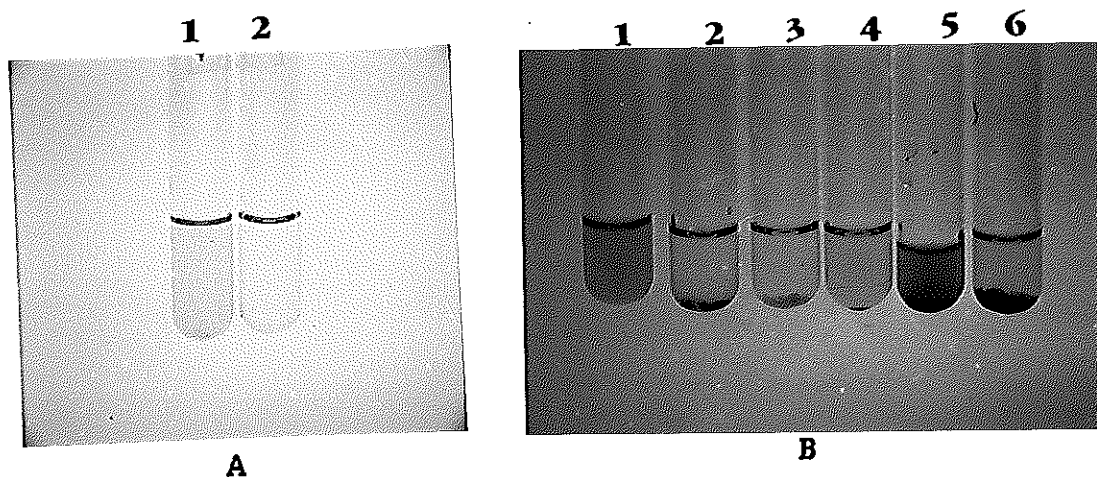
1 = 1-naphthylamine + HBP

2 = 1-naphthylamine + HRP

3 = 1-naphthylamine + ฟอสตริน + HBP

4 = 1-naphthylamine + ฟอสตริน + HRP

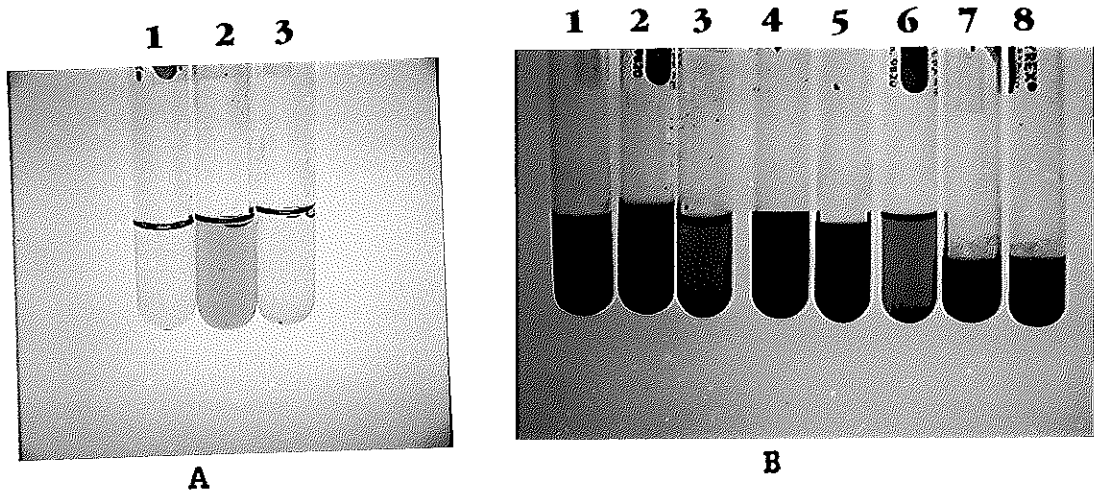
รูปที่ 34 แสดงผลของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) และ horseradish (HRP) ในการตกตะกอน 1-naphthylamine และ ฟอสตริน



- 1 = 8-hydroxyquinoline + ฟอสตริน  
 2 = 8-hydroxyquinoline + ซีแลค

- 1 = 8-hydroxyquinoline + HBP  
 2 = 8-hydroxyquinoline + HRP  
 3 = 8-hydroxyquinoline + ฟอสตริน + HBP  
 4 = 8-hydroxyquinoline + ฟอสตริน + HRP  
 5 = 8-hydroxyquinoline + ซีแลค + HBP  
 6 = 8-hydroxyquinoline + ซีแลค + HRP

รูปที่ 35 แสดงผลของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) และ horseradish (HRP) ในการตกตะกอน 8-hydroxyquinoline; ฟอสตรินและซีแลค



- |  |  |
|--|--|
| 1 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ เซฟวิน   | 1 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ HBP            |
| 2 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ แพลนโชน  | 2 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ HRP            |
| 3 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ เมโทรนัล | 3 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ เซฟวิน + HBP   |
|  | 4 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ เซฟวิน + HRP   |
|  | 5 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ แพลนโชน + HBP  |
|  | 6 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ แพลนโชน + HRP  |
|  | 7 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ เมโทรนัล + HBP |
|  | 8 = 1,4-phenylenediamine dihydrochloride<br>+ เมโทรนัล + HRP |

รูปที่ 36 แสดงผลของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) และ horseradish (HRP) ในการตกตะกอน 1,4-phenylenediamine dihydrochloride, เซฟวิน, แพลนโชน และ เมโทรนัล

## 4. วิจารณ์

### 4.1. การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา

#### 4.1.1 การใช้สารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant) และ polyvinylpyrrolidone (PVP) ในขั้นตอนการสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยาง

เนื่องจากสารสกัดจากพืชส่วนมากจะประกอบด้วย พอลิฟีนอล, เม็ดสี (pigment) ต่าง ๆ รวมทั้งสารประกอบ phenolics อยู่เป็นจำนวนมาก และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของพอลิฟีนอลที่มี พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase) และ เปอร์ออกซิเดส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้พอลิฟีนอลถูกออกซิไดส์ไปเป็น quinone และ น้ำ ซึ่ง quinone จะถูกเปลี่ยนไปเป็นรงควัตถุสีน้ำตาล หรือ สีดำ (melanin) เป็นสาเหตุของการทำให้สารสกัดจากพืชมีสีน้ำตาล ดังนั้นเมื่อนำเอาสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันมาใช้ในขั้นตอนการสกัดสารจากพืช ก็จะทำให้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของพอลิฟีนอลลดน้อยลง ทำให้สารสกัดที่ได้มีสีอ่อนหรือจางลง ซึ่งจากผลการทดลองในรูปที่ 10 พบว่าถ้าใช้ PVP ความเข้มข้น 8 % (w/v) ในการสกัดสารจากเปลือกยาง จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสีน้อยที่สุด (10%) เมื่อเทียบกับสีของสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่น ส่วนสารสกัดจากเปลือกยางที่สกัดด้วย 0.4 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสี 20% ซึ่งมีความเข้มข้นของสีมากกว่าเล็กน้อย แต่มีปริมาณเปอร์ออกซิเดสมากกว่า 1.8 เท่าของปริมาณเปอร์ออกซิเดสของสารสกัดที่สกัดด้วย 8 % PVP ดังนั้น 0.4 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  จึงเป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้ในขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกยางพารา เพราะใช้สารป้องกันการเกิดออกซิเดชันน้อยกว่าและได้สารสกัดที่มีสีจางและมีปริมาณ เปอร์ออกซิเดสสูง ซึ่งจะแตกต่างจากการสกัดเลคตินจากเปลือกยางพารา ที่ใช้ 5% PVP (สุปรดี ไทยนุกูล, 2534) ซึ่งเป็นการสกัดสารจากเปลือกยางเหมือนกันแต่เป็นสารคนละตัว ก็อาจใช้ PVP ในปริมาณที่ต่างกัน หรือแม้แต่ในการสกัด phosphoenolpyruvate carboxy-kinase จากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Ascophyllum nodosum*) ก็มีการใช้ 10% (w/v) PVP ในขั้นตอนการสกัด (Vilter, 1990) นอกจากนี้ในการสกัดเปอร์ออกซิเดสจากมะเขือเทศ ใช้ 20 % (w/v) PVP ร่วมกับ 10 % sodium ascorbate (Kokkinakis and Brooks, 1979)

#### 4.1.2 ผลของแก๊สเอธิลีนต่อปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยาง

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่าแก๊สเอธิลีนที่ปลดปล่อยจากกล้วยน้ำว้าสามารถเพิ่มปริมาณเปอร์ออกซิเดสในเปลือกยางได้ โดยมีระยะเวลาอบที่เหมาะสม คือ 21 ชั่วโมง ซึ่งกลไกในการที่แก๊สเอธิลีนสามารถทำให้ปริมาณเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นได้เกือบเท่าตัว จาก 7,520 U/กรัม ไปเป็น 13,600 U/กรัม นั้น ยังเป็นเรื่องที่ต้องทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป แต่ก็ได้มีการทดลองผลของแก๊สเอธิลีนกับปริมาณเปอร์ออกซิเดส ในมันฝรั่ง โดย Imaseki (1970) พบว่า มันฝรั่งที่ถูกเหวี่ยงเป็นชั้นบาง ๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 มม. และ มีความหนา 2 มม. นำมาอบด้วยแก๊สเอธิลีน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ ชุดการทดลองที่อบด้วยแก๊สเอธิลีนความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร/ลิตร สารสกัดที่ได้มีปริมาณเปอร์ออกซิเดส 930 U/กรัม ซึ่งปริมาณเปอร์ออกซิเดสที่ได้ จะมากกว่าปริมาณเปอร์ออกซิเดสของสารสกัดจากชุดควบคุม 2.79 เท่า และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแก๊สเอธิลีนเป็น 100 ไมโครลิตร/ลิตร สารสกัดที่ได้มีปริมาณเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นเป็น 985 U/กรัม ซึ่งมากกว่าชุดควบคุม 2.95 เท่า ต่อมาได้มีการศึกษา พบว่า หลังจากที่เกิดบาดแผลจะมีการสร้างแก๊สเอธิลีนออกมา สามารถวัดระดับแก๊สเอธิลีนที่ถูกสร้างออกมาได้ 2 peak โดย peak ที่ 1 วัดได้หลังจากพืชเกิดบาดแผลแล้ว 56 นาที ส่วน peak ที่ 2 วัดได้หลังจากพืชเกิดบาดแผล 131 นาที (Saltveit and Dilley, 1978) ดังนั้น ในกรณีของเปลือกยางที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งมีบาดแผลที่เกิดจากการกรีดยางของชาวสวนยาง และการนำเปลือกยางมาอบด้วยกล้วยน้ำว้าสุกซึ่งถือเป็นแหล่งผลิตแก๊สเอธิลีนให้แก่เปลือกยาง อาจทำให้มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสขึ้นที่บริเวณเปลือกยาง จึงทำให้สารสกัดที่ได้ มีปริมาณเปอร์ออกซิเดสเพิ่มมากขึ้น และจากการศึกษาของ Abeles และคณะ (1988) พบว่า แก๊สเอธิลีนสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบเลี้ยงของแตงกวาได้ โดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 30,000-33,000 ดาลตัน ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน คล้ายกับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของเปอร์ออกซิเดสจาก turnip และ horsersdish

#### 4.1.3 การทำ aqueous two-phase system

การทำ partition สารสกัดจากเปลือกยางด้วย PEG 8,000 10 % (w/v) กับ เกลือ K-citrate 30 % (w/v) พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสส่วนใหญ่จะถูกพาลงมาอยู่ในชั้นของเกลือโดยคิดเป็น 92 % ของปริมาณเปอร์ออกซิเดสเริ่มต้น เมื่อทดลองในปริมาณน้อย ๆ

(3 มล.) และเมื่อเพิ่มปริมาณมากขึ้น (> 40 ลิตร) จะได้เปอร์ออกซิเดสประมาณ 70-78 % ที่อยู่ในชั้นล่าง ซึ่งวิธีนี้นับได้ว่าเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง ที่สามารถทำบริสุทธิ์สารสกัดที่มีสารสี และสารประกอบ phenolics อยู่เป็นจำนวนมากได้ ผลแสดงในรูปที่ 13 แต่การที่โปรตีนจะถูกพาขึ้นไปอยู่ในชั้นบนหรือชั้นล่าง ไม่มีกฎเกณฑ์ที่แน่นอน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น pH, อุณหภูมิ, ชนิดของเกลือ, องค์ประกอบทางเคมีและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ เป็นต้น (Dove and Mital, 1986) ดังตัวอย่างการแยกเอา bromoperoxidase จากสาหร่ายสีน้ำตาลด้วย PEG 1,500 10 % (w/v) กับ เกลือ  $K_2CO_3$  15 % ผลที่ได้ก็คือ เปอร์ออกซิเดสจะอยู่ในชั้นบน 93 % และอยู่ชั้นล่าง 7 % (Vilter, 1990) และวิธีนี้เหมาะสำหรับการทำในระดับปริมาณสูง เพราะสามารถทำได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และ ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องมือเพียงที่มีความเร็วสูง เพราะอาศัยการเกิด phase เป็นตัวแยกโปรตีน และใช้เวลาน้อย รวมทั้งสารเคมีที่ใช้มีราคาไม่แพง นอกจากนี้ เกลือ citrate ที่นำมาใช้ก็เป็นเกลือที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมาก (Vernau and Kula, 1990)

#### 4.1.4 การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสโดยวิธี แลกเปลี่ยนประจุ แบบ คอลัมน์ โครมาโตกราฟี และ batch-binding

นำเปอร์ออกซิเดสหลังการทำ aqueous two-phase ไปทำบริสุทธิ์ต่อ โดยการนำสารสกัดที่ได้มาผ่านบน คอลัมน์ DEAE-cellulose หรือเอามาผสมกับ DEAE-cellulose ซึ่งเปอร์ออกซิเดสสามารถจับ (bind) ได้ดีกับ DEAE-cellulose ที่ pH 7 และแอนไอออนจะถูกชะออกมาด้วย 0.3 N NaCl และ 0.4 N NaCl ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ yield ที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วิธีแตกต่างกันไม่มากนัก โดยวิธีผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ได้ 42 % (ตารางที่ 8) ส่วนวิธี batch-binding จะได้ 51-57 % (ตารางที่ 7) ส่วนค่า RZ ซึ่งเป็นค่าของอัตราส่วนระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 403 กับ 275 นาโนเมตร พบว่าเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose มีค่า RZ = 0.48 (ตารางที่ 8) ส่วนเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการทำ batch-binding มีค่า RZ = 0.6, 0.67 และ 0.97 (ตารางที่ 7) ค่า RZ เป็นค่าใช้บอกถึงการมี heme group อยู่ไม่ใช่เป็นค่าบอกถึงความบริสุทธิ์ เพราะแอนไอออนเปอร์ออกซิเดสแต่ละชนิดก็จะมีค่า RZ ที่แตกต่างกันออกไป (Tijssen and Kurstak, 1984) เช่น เปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากถั่วลิสงมีค่า RZ = 3.5 (Sesto and Huystee, 1989) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจาก Horseradish type ต่างกันก็มีค่า RZ ต่างกัน ตัวอย่างเช่น



type II มีค่า RZ = 1.7 ส่วน type IV มีค่า RZ = 3.5 เป็นต้น (sigma catalog'91) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจาก turnip และ แครอท มีค่า RZ = 2.64 และ 2.19 ตามลำดับ ส่วนเปอร์ออกซิเดสที่ได้จาก *Bacillus Stearothermophilus* มีค่า RZ = 0.35 (Loprasert, Urabe and Okada, 1990) สำหรับค่า RZ ของเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์จากเปลือกยางพารามีค่าแตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของต้นยาง หรือฤดูกาล ทั้งนี้เพราะเปลือกยางพาราที่เก็บในช่วงก่อนการผลัดใบและหลังการผลัดใบให้ผลที่ต่างกัน ในช่วงเดือนมิถุนายน - กรกฎาคม จะได้ เปอร์ออกซิเดสที่มีค่า RZ = 0.6 - 0.67 ส่วนในช่วงเดือนสิงหาคม - กันยายน เปอร์ออกซิเดสที่ได้มีค่า RZ = 0.48 ในช่วงเดือนมกราคม - กุมภาพันธ์ เปอร์ออกซิเดสที่ได้มีค่า RZ = 0.95 แต่นี้เป็นเพียงข้อสังเกตหนึ่งเท่านั้นส่วนสาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด

ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากเปลือกยางพารา พบว่า เริ่มต้นจากเปลือกยางสด 80 กก. เมื่อแยกเอาขี้ยางออกจะมีน้ำหนักเปลือกยางประมาณ 40 กก. ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์ จะได้เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ประมาณ 4 กรัม หรือ 0.01% ซึ่งนับว่าเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ดีมากแหล่งหนึ่งเมื่อเทียบกับ เปอร์ออกซิเดสที่ได้จาก turnip เริ่มต้นด้วย 240 กก. ได้เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ 0.053 กรัม หรือ 0.000022 % ของน้ำหนักวัตถุดิบ (Mazza et.al. 1968) ส่วนเปอร์ออกซิเดสที่ได้จาก horseradish เริ่มต้นด้วย 50 กก. ได้เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ 0.02 กรัม หรือ 0.00004 % ของน้ำหนักวัตถุดิบ (Braithwaite, 1976) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจาก *Bacillus Stearothermophilus* ที่ clone ใน *Escherichia coli* พบว่า จาก culture 200 มล. จะได้เปอร์ออกซิเดสที่บริสุทธิ์ 0.03 กรัม หรือ 15 % ของน้ำหนักวัตถุดิบ . (Loprasert, Urabe and Okada : 1990) ในกรณี cloning นี้ หากเปรียบเทียบกับเปลือกยางแล้ว น้ำหนักเปอร์ออกซิเดสที่ได้ต่อน้ำหนัก culture จะดีกว่าของเปลือกยาง แต่การเปรียบเทียบวิธีนี้ ไม่สามารถชี้ให้เห็นข้อแตกต่างของ yield ในแง่ของแอกติวิตี ต่อน้ำหนักวัตถุดิบ เพราะไม่ได้เทียบ total activity / วัตถุดิบ นอกจากนี้ เปอร์ออกซิเดสแต่ละแหล่งจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นไม่เหมือนกัน

#### 4.2. การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากเปลือกยางพารา

##### 4.2.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราโดยวิธี SDS-

จากการนำเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์แล้วจากเปลือกยางพารามาหาค่าน้ำหนักโมเลกุลย่อย โดยวิธี SDS-PAGE แบบ slab gel พบว่าการใช้ 7-15% polyacrylamide gel และย้อมโปรตีนด้วย coomassie blue R 250 สามารถแยกและเห็นแถบโปรตีนที่เด่นชัดเพียง 1 แถบ ดังรูปที่ 16 น้ำหนักโมเลกุลย่อยเมื่อเทียบจากโปรตีนมาตรฐาน มีค่า 50,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 17 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากเปลือกยางพารามีค่าใกล้เคียง และแตกต่างจากเปอร์ออกซิเดสแหล่งอื่น ๆ เช่น เปอร์ออกซิเดสจาก *Bacillus Stearothermophilus* มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 86,000 ดาลตัน (Loprasert, Urabe and Okada : 1990) เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลือง (*Glycin max* var Williams 82) มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 37,000 ดาลตัน (Gillikin and Graham: 1991) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจาก *Ipomoeabatatas* ในส่วนของต้นอ่อน มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 42,000 ดาลตัน (Floris, Medda and Rinaldi: 1984 a) และเปอร์ออกซิเดสจาก *Euphorbia Characas latex* มีน้ำหนักโมเลกุลย่อย 48,000 ดาลตัน (Floris, Medda and Rinaldi: 1984 b)

#### 4.2.2 การศึกษาคุณสมบัติการเป็น IAA oxidase ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา

นำเอาเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเปลือกยางพารา มาทำการทดสอบโดยการทำ gel electrophoresis แบบ non-denaturing ทำการย้อม 3 วิธี คือ (1) ย้อมโปรตีนด้วยสีย้อม coomassie blue R-250, (2) ย้อมแบบ peroxidase activity staining และ (3) ย้อมแบบ IAA-oxidase activity staining ได้ผลดังรูปที่ 18 และ 19 จะเห็นว่าตำแหน่งของสีที่ย้อมทั้ง 3 วิธี เป็นตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่า เปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากเปลือกยางพาราสามารถ ออกซิไดส์ IAA และ o-dianisidine ได้ ในระบบที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งผลนี้เหมือนกันกับ เปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากถั่วลิสง (peanut cell) ซึ่งจากการศึกษาของ Zheng และ Huystee (1992) พบว่า เปอร์ออกซิเดสที่เตรียมจากส่วนของผนังเซลล์จะสามารถออกซิไดส์ IAA ได้เพิ่มมากขึ้นเป็น 19% เมื่อมีการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าไปในระบบ ส่วนเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากมะเขือเทศ ก็สามารถออกซิไดส์ IAA ได้ถ้าในระบบมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อยู่ด้วย และสามารถวัดระดับ IAA oxidase ได้้น้อยมาก (0.003 ไมโครโมล  $O_2$ /นาที่ ถ้าในระบบมี 2,4-dichlorophenol, p-coumaric acid และแมงกานีส) ซึ่งคล้ายกับเปอร์ออกซิเดสจาก *Euphorbia Characas latex* ที่ไม่สามารถ

ออกซิโดส IAA ได้เช่นกัน ถ้าในระบบมี 2,4-dichlorophenol, *p*-coumaric acid และ แมงกานีส (Floris, Medda and Rinaldi: 1984 b) แต่จะต่างจาก HRP ที่สามารถวัดระดับ IAA oxidase ได้สูงมาก (0.153 ไมโครโมล O<sub>2</sub>/นาทีก) ถ้าในระบบมี 2,4-dichlorophenol, *p*-coumaric acid และ แมงกานีส (Kokkinakis and Brooks, 1979)

#### 4.2.3 การศึกษาจลนศาสตร์ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP)

ในการศึกษาค่า  $K_m$  ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา พบว่า  $K_m$  ที่ได้จากการทำ Lineweaver - Burk plot ซึ่งผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 และ 21 และตารางที่ 9 และ 10 ผลที่ได้ คือ  $K_m$  ของ *o*-dianisidine เท่ากับ 8.3 mM และค่า  $K_m$  ของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เท่ากับ 1.13 mM ซึ่งเมื่อเทียบกับค่า  $K_m$  ของเปอร์ออกซิเดสจาก soybean (5.9 mM , 0.58 mM) โดยใช้ guaiacol กับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sessa and Anderson, 1981) จะเห็นว่าทั้ง HBP และ เปอร์ออกซิเดสจาก soybean ต่างมีค่า  $K_m$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> มากกว่า  $K_m$  ของ *o*-dianisidine หรือ guaiacol แต่เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากเมล็ด และต้นอ่อนของ *Aruaucaria Arucana* นั้นมีค่า  $K_m$  ของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ ค่า  $K_m$  ของ *o*-phenylenediamine เท่ากัน คือ เท่ากับ 13.6 mM (Riquelme and Cardmil, 1993)

#### 4.2.4 การศึกษาผลของตัวยับยั้ง KCN และ NaN<sub>3</sub>

จากผลการทดลองแสดงในรูปที่ 23 และ 24 แสดงให้เห็นว่า KCN ( $K_i = 8.67 \mu\text{M}$ ) และ NaN<sub>3</sub> ( $K_i = 14.3 \mu\text{M}$ ) ต่างเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) คือมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสับสเตรท จึงสามารถจับกับบริเวณเร่ง (catalytic site) ของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับสับสเตรท ทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างตัวยับยั้งกับสับสเตรท ในการที่จะจับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งเดียวกัน ซึ่งค่า  $K_i$  ที่ได้มีค่าใกล้เคียงและแตกต่างกับเปอร์ออกซิเดสจากแหล่งอื่น ๆ เช่น ใน *Euphobia Characias latex* มีค่า  $K_i$  ของ KCN เท่ากับ 10  $\mu\text{M}$  ซึ่งใกล้เคียงกับของยางพารา และค่า  $K_i$  ของ NaN<sub>3</sub> เท่ากับ 3 mM ซึ่งสูงกว่าของยางพารา (Floris, Medda and Rinaldi: 1984 b) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจาก *Ipomoeabatatas* มีค่า  $K_i$  ของ KCN เท่ากับ 0.5  $\mu\text{M}$  ซึ่งใกล้เคียงกับของยางพารา และ  $K_i$  ของ NaN<sub>3</sub> เท่ากับ 2 mM ซึ่งสูงกว่าของยางพารา (Floris, Medda and Rinaldi : 1984 a)

#### 4.2.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเสถียรภาพของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) โดยเปรียบเทียบกับเปอร์ออกซิเดสจาก horseradish (HRP)

จากผลการทดลอง (รูปที่ 25) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่า HRP เพราะมีค่าเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีที่คงที่ ในช่วงอุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ HRP ให้ค่าเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีที่คงที่ ในช่วงอุณหภูมิที่แคบกว่า คือ 20-30 องศาเซลเซียส และ HBP มีค่าเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของค่าเปอร์ออกซิเดสเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งดีกว่า HRP ที่มีค่าเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีเริ่มต้นที่ 57 องศาเซลเซียส ค่าเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีของ HBP จะถูกทำลายหมดไปที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิที่เปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีของ HRP ถูกทำลายหมด คือ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่า HBP จะค่อนข้างทนความร้อนได้ดีในช่วง 0-50 องศาเซลเซียส แต่ก็มีรายงานว่า เปอร์ออกซิเดสที่ได้จาก *Basillus Stearothermophilus* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงกว่า คือสูงถึง 70 องศาเซลเซียส (Loprasert, Urabe and Okada, 1990) ซึ่งดีกว่า HBP เช่นเดียวกับเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลือง ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีเช่นกัน คือ สามารถทนได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยหากอุ่นที่อุณหภูมิดังกล่าวนานถึง 72 นาที แอกติวิตีจึงลดลงเหลือ 3% ของแอกติวิตีเริ่มต้น และหากอุ่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แอกติวิตีจะถูกทำลายหมดหรือลดลงเป็นศูนย์ (Gillikin and Graham, 1991) ซึ่งต่างจากเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจาก green peas ซึ่งประกอบด้วย 3 ไอโซไซม์ โดยไอโซไซม์ที่เป็น neutral นั้นไม่ทนความร้อน (heat labile) จะถูกทำลายหมดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ในขณะที่อีก 2 ไอโซไซม์ ที่เป็น cationic สามารถทนต่ออุณหภูมิในช่วง 30-70 องศาเซลเซียสได้ (Halpin, Pressey, Jen and Mondy, 1989)

#### 4.2.6 การศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากการทดลองซึ่งแสดงในรูปที่ 26 จะเห็นว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ทั้งจากเปลือกยางพาราและจาก horseradish โดยใช้ o-dianisidine เป็นสารตั้งต้น คือ pH 5.4 ใน 50 mM sodium acetate จะคล้ายกันกับเปอร์ออกซิเดสจาก *Ipomoeabatatas* มี pH optimum ที่ pH 5.75 ใน 0.1 M sodium acetate และใช้ o-dianisidine เป็นสารตั้งต้นเช่นกัน ในขณะที่เดียวกันเปอร์ออกซิเดสจาก *Ipomoeabatatas* ก็มี pH optimum ที่ pH 7 ใน 0.1 M potassium phosphate ใช้ pyrogallol เป็นสารตั้งต้น (Floris, Medda and Rinaldi, 1984 a) ส่วนเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลือง

มี pH optimum ที่ pH 5.5 ใน 0.5 M potassium acetate โดยใช้ guaiacol เป็นสารตั้งต้น (Gillikin and Graham, 1991) และเปอร์ออกซิเดสจากเมล็ดและต้นอ่อนของ *Araucaria Araucana* มี pH optimum ที่ pH 5 ใน 0.1 M sodium citrate โดยใช้ o-phenylenediamine เป็นสารตั้งต้น (Riquelme and Cardemil, 1993)

#### 4.2.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา กับ ปริมาณน้ำยางสดและน้ำหนักยางแห้งของต้นยางที่ให้ผลผลิตต่างกัน

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางกับปริมาณน้ำยางสดและน้ำหนักยางแห้งของต้นยางที่ให้ผลผลิตต่างกัน พบว่า เปอร์ออกซิเดสของเปลือกยางจากต้นยางที่มีผลผลิตสูงจะมีปริมาณเปอร์ออกซิเดสสูง และสูงกว่าเปลือกยางจากต้นยางที่มีผลผลิตปานกลางและต่ำ และเมื่อนำปริมาณเปอร์ออกซิเดส (U/กรัม) กับ ปริมาณน้ำยางสด (มล./ต้น) มาหาความสัมพันธ์ได้ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) เท่ากับ 0.77 (ตารางที่ 11 และ รูปที่ 27) และเมื่อนำน้ำยางสดมาอบแห้งและชั่งน้ำหนักยาง พบว่า ค่าสหสัมพันธ์ ระหว่างน้ำหนักยางแห้ง (กรัม/ต้น) กับ เปอร์ออกซิเดส (U/กรัม) ได้ลดลงเป็น 0.67 (ตารางที่ 11 และ รูปที่ 28) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปริมาณเปอร์ออกซิเดสกับผลผลิตที่ได้มีความสัมพันธ์ในทางบวก และมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำยางมากกว่าน้ำหนักยางแห้ง เมื่อต้นยางถูกกรีดโดยชาวสวนทำให้เกิดบาดแผล ซึ่งมีผลให้ปลายท่อน้ำยางบริเวณดังกล่าวเปิดออกและน้ำยางก็จะไหลออกมา และเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นในกรณีที่มีบาดแผลเพื่อทำลายเชื้อโรคที่อาจคุกคามบริเวณบาดแผล หรือเร่งการสร้างสารเพื่อเป็นการสมานแผล สำหรับกลไกการทำงานของเปอร์ออกซิเดสต่อการไหลของน้ำยาง หรือ การอุดตันของท่อน้ำยาง ยังเป็นเรื่องที่ต้องทำการศึกษากันต่อไป

#### 4.3 การตกตะกอนสารประกอบฟีนอลและสารประกอบอะนีนีน และการตกตะกอนร่วมระหว่าง สารประกอบฟีนอลและอะนีนีนกับยาปราบแมลงและศัตรูพืช ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา (HBP) กับ เปอร์ออกซิเดสจาก horseradish (HRP)

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 11 รูปที่ 29-38 ว่าทั้ง HRP และ HBP สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล และอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล คือ 4-methoxyphenol และ 3-methyl phenol แต่ไม่สามารถตกตะกอนอนุพันธ์ของสารประกอบ

ฟีนอลที่เป็น 2-nitro phenol และ 2,4-dinitrophenol ได้ ส่วนสารประกอบอะโรมาติกต่าง ๆ พบว่าทั้ง HRP และ HBP สามารถตกตะกอน aniline, 4-bromoaniline และ 1,4-phenylenediamine dihydrochloride ได้ ซึ่งจะเห็นว่า HBP มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ HRP (Alberti and Klibanov, 1981) และคล้ายกับเปอร์ออกซิเดสที่ได้จาก *Euphobia Characias* latex ก็สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลและอะโรมาติกได้ (Floris, Medda and Rinaldi, 1984) โดยการทำให้เกิดการพอลิเมอร์ไรซ์พอลิเมอร์ ได้สารพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำและมีสี ซึ่ง Alberti และ Klibanov (1981) ได้อธิบายการเกิดตะกอนว่าอาจเกิดจากการที่เปอร์ออกซิเดสไปออกซิไดส์พวก phenolics ไปเป็น aryloxy radicals ซึ่งสภาพของอนุภาคอิสระแบบนี้สามารถ เกิดการพอลิเมอร์ไรซ์ไปเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำได้ด้วยตัวของมันเอง ส่วนกลไกในการเกิดสี อาจเกิดจากการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ของสารประกอบอะโรมาติก โดยเปลี่ยนไปอยู่ในรูปตะกอนและทำให้เกิดสี หรือ อาจเกิดจากปฏิกิริยาการสร้างวงแหวน (cyclization) เป็นอะโรมาติกอีกรูปหนึ่งที่มีตำแหน่ง  $\pi$  bond อยู่ในระนาบเดียวกันทำให้อิเล็กตรอนสามารถเคลื่อนย้าย (delocalized) ได้ ง่ายจึงเกิดเป็น highly conjugate system ทำให้เกิดมีตะกอน และสำหรับการทดลองนี้ เป็นการทดสอบเพื่อดูความสามารถของ HBP มีเตรียมได้ในการตกตะกอน สารประกอบฟีนอล และอะโรมาติก โดยเปรียบเทียบกับความสามารถของ HRP ซึ่งในการทดลองไม่ได้ทำการวัด ปริมาณสารประกอบที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยา ใช้การสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย และ ปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้น เป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการตกตะกอนของเอนไซม์

สำหรับปฏิกิริยาของการเกิดตกตะกอนร่วมระหว่างยาปราบแมลงและศัตรูพืชกับสารประกอบ ฟีนอลและอะโรมาติกนั้น พบว่า บางชุดการทดลองมีตะกอนเกิดเพิ่มมากกว่าเมื่อเทียบกับชุดการ ทดลองที่มีสารประกอบเพียงตัวเดียว แต่กลไกการเกิดนี้ยังไม่แน่ชัด เช่น 2-nitro phenol และ 2,4-dinitrophenol เมื่อทดสอบด้วย HRP และ HBP ให้ผล 0/0 คือไม่มีตะกอนและสี เกิดขึ้น แต่เมื่อนำมารวมกับโพลิดอล หรืออีกชื่อเรียกว่า methyl parathion ที่ใช้เป็นยาปราบแมลง เป็นสารพวก organophosphorus จะให้ผลการตกตะกอนเป็น V/+5 คือ มี สีและตะกอนเกิดขึ้นมาก ทำนองเดียวกันกับกรณีของ 1-naphylamine และ ฟอสตริน ซึ่งเป็นยาปราบแมลง ที่มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า mevinphos เป็นพิษเมื่อสัมผัส ไม่สามารถตกตะกอน ได้ด้วย HRP และ HBP แต่เมื่อนำ 1-naphylamine มารวมกับฟอสตริน และใช้ HRP

จะให้ผลการตกตะกอนเป็น V/+5 และหากใช้ HBP จะให้ผลเป็น V/0 ส่วน phenol และ 3-methyl phenol ให้ผลการตกตะกอนด้วย HBP เป็น V/+3 และ V/+4 ตามลำดับ และเมื่อนำมารวมกับ แพลนโทน หรืออีกชื่อเรียกว่า paraquat เป็นยาปราบศัตรูพืช ที่เฉพาะตัว มันเองไม่สามารถตกตะกอนด้วย HRP หรือ HBP ได้ แต่เมื่อรวม phenol และ 3-methyl phenol ให้ผลเป็น V/+5 ซึ่งในกรณีนี้คล้ายกับการทดลองของ Klibanov และคณะ (1980) ซึ่งได้ทำการทดลองโดยทำการตกตะกอน phenol อย่างเดียวคิดค่า removal efficiency ได้ 74.6 % แต่เมื่อเติม o-dianisidine, benzidine หรือ 8-hydroxyquinoline ลงไปด้วยจะมีค่า removal efficiency เพิ่มขึ้นเป็น 99.7, 99.5 และ 99.8% ตามลำดับ หรือในการทดลองทำนองเดียวกัน คือ หากตกตะกอน o-aminophenol เพียงอย่างเดียวจะได้ค่า removal efficiency 48.6% แต่เมื่อรวมกับ 1-naphthol หรือ p-phenylphenol หรือ 2,7-naphthalenediol หรือ 2,3-dimethylphenol เข้าไปด้วย จะทำให้ได้ค่า removal efficiency เพิ่มขึ้นเป็น 84.9, 92.0, 95.3 และ 95.1% ตามลำดับ ซึ่งได้มีการสันนิษฐานว่า การเพิ่มสารประกอบเหล่านี้ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นจึงทำให้เกิดตะกอนเพิ่มมากขึ้น หรือเป็นเพราะว่า การที่มีสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเปอร์ออกซิเดสได้ดี อาจมีผลทำให้เกิดการรวมกับสารตัวอื่นได้ทำให้เกิดการช่วยในการตกตะกอนร่วมผลที่ได้จึงมีตะกอนเกิดเพิ่มขึ้น (Klibanov and Scott, 1983) ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีการรวมกันระหว่างสารประกอบฟีนอล หรือ สารประกอบอะโรมาติกกับยาปราบแมลงและศัตรูพืช จะให้ผลการตกตะกอนลดลง ปรากฏการณ์นี้อาจเนื่องมาจากเมื่อมีการรวมกันของสาร อาจมีสารตัวกลางที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดปฏิกิริยามีผลไปยังยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ จึงมีผลทำให้สามารถเกิดตะกอนได้น้อยลง ซึ่งกลไกที่แน่ชัดยังไม่ทราบ

การที่เปอร์ออกซิเดสสามารถตกตะกอนสารประกอบเหล่านี้ได้ นับว่าเป็นทางเลือกที่ดีวิธีหนึ่งในการกำจัดสารที่มีความเป็นพิษออกจากร่างน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพราะวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย และถ้าได้มีการศึกษากันอย่างละเอียดอาจในแง่ของการหาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ที่น้อยที่สุดที่จะทำให้เกิดการตกตะกอน เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม และทรัพยากรน้ำ

## 5. สรุป

จากการศึกษาเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา พอที่จะสรุปเป็นข้อ ๆ ได้ดังนี้

1. เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราสามารถทำบริสุทธิ์ได้ โดยการสกัดใน 0.4%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  แล้วทำ aqueous two-phase system ระหว่าง PEG 8,000 10% (w/v) กับเกลือ K-citrate 30% (w/v) จากนั้นนำมาผ่าน DEAE-cellulose โดยวิธี batch-binding หรือ คอลัมน์ โครมาโตกราฟี
2. เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา มีน้ำหนักหน่วยย่อย 50,000 ดาลตัน
3. เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา สามารถออกซิไดส์ IAA ได้
4. pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา คือ 50 mM sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.4
5. เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา สามารถทนต่อความร้อนได้ถึง 50 องศาเซลเซียส
6. ค่า  $K_m$  ของเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพารา เมื่อใช้ *o*-dianisidine และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  เป็นสารตั้งต้น มีค่าเท่ากับ 8.5 mM และ 1.13 mM ตามลำดับ
7. การศึกษาความไวในการถูกยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่า KCN และ  $\text{NaN}_3$  มีค่า  $K_i$  เท่ากับ 8.67  $\mu\text{M}$  และ 14.3  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ
8. แก๊สเอธิลีนจากกล้วยน้ำว้าสามารถเพิ่มปริมาณเปอร์ออกซิเดสในเปลือกยางสดได้
9. ปริมาณเปอร์ออกซิเดสในเปลือกยางที่กรีดได้จากต้นยางพารา มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำยางสด  $r = 0.779$  และมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักยางแห้ง  $r = 0.675$
10. เปอร์ออกซิเดสจากเปลือกยางพาราสามารถตกตะกอนสารประกอบฟีนอล และอะนีสีนบางชนิดได้ และใช้ยาปราบแมลงและศัตรูพืชเป็นตัวช่วยในการตกตะกอนได้



## เอกสารอ้างอิง

ธิดารัตน์ เอกสิทธิ์กุล และ มนตรี จุฬาวัดเนทล 2535 "เปอร์ออกซิเดสจากมันสำปะหลัง"  
การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 15 ณ  
มหาวิทยาลัย เชียงใหม่. หน้า 574-575

สุชาติ จิตบรรจง 2533. " ยางพารา ยางเรเดียลและเอดส์ " แลใต้. 2, หน้า 14-16

สุปรีย์ ไทบุญกุล 2534 " เลคตินจากยางพารา " วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Abeles B. F. et. al. 1988. " Induced of 33-KD and 60-KD peroxidase  
during ethylene induced senescence of cucumber cotyledons ",  
Plant Physiol 87 : 609-615

Alberti N. B. and Klibanov M. A. 1981." Enzymatic removal of dissolved  
from industrial aqueous effluents ", Biotech and Bioeng. 11 : 373-  
379

Albert F. and Anderson J. A.. 1987 " The effect of *Pseudomonasputida*  
colonization on root surface peroxidase ", Plant. Physiol. 85 : 537-  
541

Almqvist and Wiksell . 1960. Partition of Cell particles and Macromolecules  
The Nature Series , New York : John Wiley and sons.

- Arend J 1981 "Purification of peroxidase-conjugated antibody for enzyme immunoassay by affinity chromatography on concanavalin A "  
Methods physiol Plant 73 : 166-175
- Bensadoun A. and Weinstein. 1976 " Assay of proteins in the presence of interfering materials ", Anal. Biochem. 70 : 241-250
- Biles C. L. , Abeles F. B. and Wilson C. L. 1990. " The role of ethylene in anthracnose of cucumber, *cucumis sativus*, case by *Colletotrichum lagenarium* ", Phytopathology. 80(8) ; 732-736
- Biles C. L. and Abeles F. B. 1991 " Xylem sap protein ", Plant Physiol 96 : 597-601
- Boonsiri Patchanee. 1985 " Peroxidase in Thai Vegetables ", Master of Science (Biochemistry) , Mahidol University.
- Brathwaite A. 1976. " Unit cell dimension of crystalline horseradish peroxidase "  
J. Mol. Biol. 106 : 229-230
- Chibbar N. R . and Huystee van B. R. 1982 " Dharacterization of peroxidase in plant cell " Plant Physiol 75 : 956-958
- Conroy M. James, Borzelleca C. David and McDonell A. Leslie. 1982. " Homology of Plant Peroxidase an immunochemical approach "  
Plant. Physiol. 69 : 28-31

Davis S. and Burns G. R. 1990. "Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidase", Appl. Microbiol. Biotechnol. 32 : 721-726.

De Boer E., Van Kooyk Y., Tromp MPM., Plat H. and Wever R. 1986  
"Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum* : A novel class of enzyme containing vanadium as a prosthetic group" Biochem Biophys. Acta. 869 (1) : 48-53

Decedue J. C, Rogers J. S. and Borchert R. 1984. "Molecular weight differences among potato peroxidase", Phytochemistry 23 (4) : 723-727.

Dordick, S. J. Marletta A. M. and Klibanov. M. A. 1987. "Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media", Biotech. and Bioeng. 30 : 31-36

Dove G. B. and Mitra G. 1986. "Recovery of protein from polyethylene glycol-water solution by salt partition separation, recovery and purification", Biotechnology 1 : 93-108

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

- Fukumori Y., Fujiwara T., Takahashi O. Y., Mukohata Y. and Yamanaka T. 1985. " Purification and properties of peroxidase from *Halobacterium halobium* L-33 ", J. Biochem 98 : 1055-1061
- Gillikin W. J. and Graham. S. J. 1991. " Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine Max* ", Plant. Physiol. 96 : 214-220
- Giovanni F, Medda R. and Rinaldi A. 1984. a " Peroxidase from *Ipomoea batatas* seedling : Purification and properties " Phytochemistry. 23 (8) : 1527-1529
- , 1984 b. " Peroxidase from *Euphorbia Characias* latex : purification and properties ", Phytochemistry. 23 (5) : 953-956.
- Gove P. James and Hoyle C. Merrill 1975. " The isozymic similarity of indoleacetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish ", Plant. Physiol. 56 : 684-687.
- Halip B., Pressey R., Jen J. and Mondy N. 1989. " Purification and characterization of peroxidase isoenzyme from green peas (*Pisum sativum*) " J. Food Sci. 54 : 644-649
- Harborne J. B. 1986. " Plant phenolic ", Methods in plant Biochemistry. vol 1 Plant Phenolic Academic Press London.

- Huddleston J., Veide A., Kohten K., Flanagan J., Enfors S. O. and Lyddialt A. 1991. " The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems ", Tibtech 9 (Nov.) : 381-388
- Huystee van B. R. and Cairns W. L. 1982. " Review progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development ", Phytochemistry. 21 : 1843-1847
- Imaseki H. 1970. " Induction of peroxidase activity by ethylene in sweet potato ", Plant. Physiol. 46 : 172-174.
- Jordan P. and Vilter H. 1990. " Native bromoperoxidase do not bind to nitrocellulose use of DEAE-cellulose as an alternative in blotting ", Electrophoresis. 11 (8) : 653-655
- Klibanov M. A., Alberti B. N., Morris E. D. and Felshin L. M. 1980. " Enzymatic removal of toxic phenol and anilines from waste waters ", J. Appl. Biochem. 2 : 414-421
- Klibanov M. A., Tu T-M and Scott P. K. 1983 " Peroxidase-Catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste water " Science 221 : 259-260
- Kokkinakis M. D. and Brooks L. J. 1979. " Tomato peroxidase purification, characterization, and catalytic properties ", Plant. Physiol. 63, : 93-99.

- Laemmli, U. K. 1970 " Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub> " Nature 227 : 680-685
- Lagrainini L.M. and Rothstein S. 1987, " Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection ", Plant. Physiol. 84 : 438-442
- Lieb B. H. and Still C. C. 1969. " Herbicide metabolism in plants : Specificity of peroxidase for aniline substrates " Plant Physiol 44 : 1672-1672
- Loomis W. D. 1974. " Overcoming problem of phenolics and quinones in the isolation of plant enzyme and organelles ' , Methods in Enzymology 31 : 528-544
- 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 H. Oliver, Roserough J. Nira. Lewis Farr A. and Randall J. Rose, 1951 " Protein measurement with the folin phenol reagent " , J. Biol.Chem. 193 : 265-275
- Maldonddo B. A. and Huystee van B. R. 1980. " Isolation of cationic peroxidase from cultered peanut cell " , Can. J. Bot. 58 : 2280-2284

- Mattaiison B. and Ling G. T. 1980. " Partition affinity ligand assay (pala) : A new approach to binding assays ", J. Immunological Methods 38 : 217-223
- Peterson L. Gary. 1979 " Review of the Folin phenol quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall " Anal. Biochem. 100 : 201-220
- Peyton T. 1984. " Biological disposal of Hazardous waste ", Enzyme Microb. Technol. 6 : 146-154
- Riquelme A. and Cardemil. L.. 1993. " Peroxidase in the cell wall of seeds and seeding of *Araucaria Araucana* ", Phytochemistry. 32(1) : 15-20.
- Ros B. A., Pedreno M. A., Munoz R. and Sabater F. 1988 " Luprine peroxidase : Isolatatio and charcaterization of cell wall-bound isoperoxidase activity ", Physiol Plant. 71 (4) : 448-454
- Saltveil E. Mikal and Dillely R. David. 1978. " Rapidly induced wound ethylene from excised segments of *Etiolated Pisum Sativum* L, Cv Alaska characterization of the response ", Plant Physiol 61 : 447-450
- Sattayasevana Benjamas. 1990. " Study on Peroxidase from *Hevea brasiliensis* ", Master of Science (Biological Science) Prince of Songkla University.

- Sessa J. D. and Anderson I. R.. 1981. " Soybean peroxidase : purification and some properties ", J. Agric. Food Chem. 29 : 960-965
- Sesto A.P. and Huystee van. B. R. 1989. " Purification and yield of a cationic peroxidase from a peanut suspension cell culture ", Plant. Sci. 61 : 163-168
- Shannon M. L., Kay E. and Lew Y. J. 1966. " Peroxidase isozymes from horseradish roots ", J. Biolo. chem. 241 (9) : 2166-2172
- 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
- Varner J. E. and Lin L-SH. 1989 " Plant cell wall Architecture ", Cell 56 (2) : 231-239
- Vaughan A. Peter, Hall F. Geoffrey and Best J. David, 1990 " Aryl acylamidase from *Rhodococcus erythropolis* NCIB 12273 " Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 : 42-46
- Vernau J. Kula M-R. 1990. " Extraction of protein from biological raw material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase system ", Biotechnol. Appl. Biochem. 12 (4) : 397-404.



- Vilter H. 1984. " Peroxidase from phaeophyceae : A vanadium (V) dependent peroxidase from *Ascophillum Nodosum* ", Phytochemistry 23 : 1387-1390
- Vilter H. 1990. " Aqueous two-phase extraction of plant enzyme from sources containing large amounts of tannins and anionic mucilages ", Bioseparation. 4 : 283-292
- Walter H., Johansson G. and Brooks E. D. 1991 " Review partitioning in aqueous two-phase systems recent results ", Anal. Biochem. 197 ; 1-18
- Walter H., Johansson G. 1986. " Review Partitioning in aqueous two-phase system : An Overview ", Anal. Biochem. 155 : 215-242
- Yamazaki H. and Yamazaki I. 1973. " The reaction between indole-3-acetic acid and HRP ", Arch. Biochem. Biophys. 154 : 147-149.
- Zheng X. and Huystee van B. R. 1992. " Anionic peroxidase catalysed ascorbic acid and IAA oxidation in the presence of hydrogen peroxide a defense system against peroxidative stress in peanut plant ", Phytochemistry 31 (6) : 1895-1898.

## ภาคผนวก

### 1. รายละเอียดเกี่ยวกับยาปราบแมลงและศัตรูพืช

#### พาราควอต (paraquat)

Active Ingredient

1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium dichloride 27.6% w/v

1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium ion 20% w/v

#### วิธีใช้

60-80 ลบ.ซม. ผสมน้ำ 20- ลิตร สำหรับวัชพืชในพืชไร่

80-100 ลบ.ซม. ผสมน้ำ 20 ลิตร สำหรับวัชพืชในพืชปลูกหลังฤดูทำนา, บนขอบบ่อ  
เลี้ยงปลา, พื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร

#### ราวด็อกซ์ (glyphosate.)

Active Ingredient

N-(phosphonomethyl) glycine. monoammonium salt 14% w/w

Acid equivalent

N-(phosphonomethyl) glycine 68% w/w

#### วิธีใช้

120 กรัม ต่อน้ำ 80 ลิตร หญ้าคาที่โล่ง

40 กรัม ต่อน้ำ 60 ลิตร วัชพืชใบแคบทั่วไป

#### แอลสโร (alachlor)

Active Ingredient

2-chloro-2,6-diethyl-N-(methoxymethyl) acetanilide. 48% w/v

**วิธีใช้** ขึ้นกับชนิดของดิน

ดินทราย, ร่วนปนทราย	500-600	ลบ.ชม.	ผสมน้ำ	60-80	ลิตร
ดินเหนียว ปานกลาง	700-800	"	"	"	"
ดินเหนียวจัด	800-1000	"	"	"	"

**ซีแลค (Clethodim)**

Active Ingredient.

(E,E)-(+)-2-(1-(((3-chloro-2-propenyl) oxy) amino) propyl)-5-(2-(ethylthio) propyl)-3-hydroxy-2-cyclohexen-1-one. 24% w/v.

**วิธีใช้**

50-60 ลบ.ชม. ผสมน้ำ 20 ลิตร

**ฟอสควิน (mevinphos)**

Active Ingredient

methyl-3-(dimethoxyphosphinyloxy) but-2-enoate. 24% w/v

Inert ingredients 76%

**วิธีใช้**

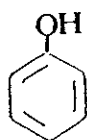
10-20 ลบ.ชม. ผสมน้ำ 20 ลิตร

**โพลิดอล POLIDOL-E 605 M50 (Methyl parathion)**

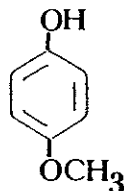
Active. Ingredient.

O,O-dimethyl 0-4-nitrophenyl phosphorothioate. 50% w/v

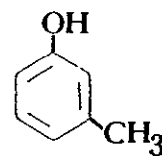
## 2. โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลและอะนีน



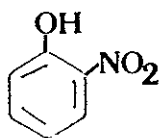
Phenol



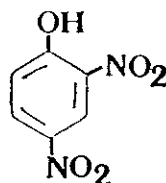
4-Methoxyphenol



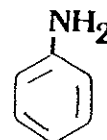
3-Methyl phenol



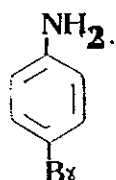
2-Nitro phenol



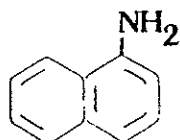
2,4-Dinitrophenol



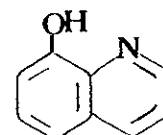
Aniline



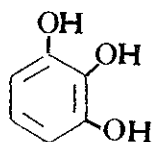
4-Bromoaniline



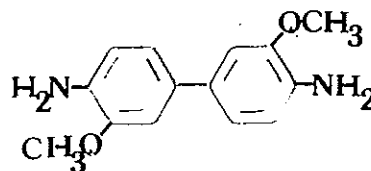
1-Naphthylamine



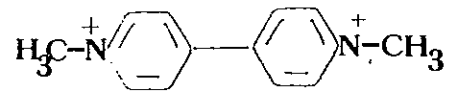
8-Hydroxyquinoline



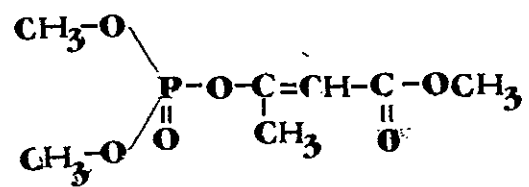
pyrogallol



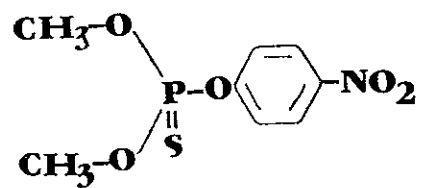
o-dianisidine



แพลนโทน (paraquat)



ฟอสตริน (mevinphos)



โพลีคอลล (methylparathion)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว ปิยาภรณ์ ภาษิตกุล

วัน เดือน ปี เกิด 27 มีนาคม 2511

วุฒิการศึกษา

วุฒิ

ชื่อสถาบัน

ปีที่สำเร็จการศึกษา

การศึกษาระดับบัณฑิต มหาวิทาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา

2532

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษ)

ทุนบัณฑิตศึกษาประจำปี 2533 จากสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กพท. (Office of the Science and Technology Development Board - STDB)