การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา

Purification and Characterization of β-1,3-glucanase from *Hevea brasiliensis*

อาภรณ์ สันตะโร

Ahporn Suntaro

เลขหมู่ QK898 .ภ4 2538 ฉ.2
เลขที่ .....
...../17.ก.ค./2538...

Order Key...4421...
BIB Key...27919...

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2538

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา

ผู้เขียน นางสาวอาภรณ์ สันตะโร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเชาว์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเชาว์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

.....กรรมการ
(ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

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

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา

ผู้เขียน นางสาวอาภรณ์ สันตะโร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ตรวจพบในเกือบทุกส่วนของต้นยาง ได้แก่ ใบ, เปลือก, ราก, ซี-ซีรั่มและบี-ซีรั่ม แต่มีปริมาณไม่เท่ากัน บี-ซีรั่ม ได้จากออร์แกเนลล์ในน้ำยางซึ่งเรียกว่า ลูทอยด์ จากการศึกษาพบว่า ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส มีประมาณ 1,500-2,000 ยูนิต/น้ำยางสด 1 ลิตร และพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีปริมาณสูงมาก อาจเป็นเพราะภาวะกดดันจากการกรีดให้เกิดบาดแผลของเปลือกบริเวณลำต้น เพื่อเก็บผลผลิตน้ำยางสด หรือถูกกระทำด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ซึ่งชาวสวนใช้สำหรับเพิ่มผลผลิต เอนไซม์ชนิดนี้ทำให้บริสุทธิ์ได้ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และ แบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ได้ ในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII ปริมาณโปรตีนที่ได้หลังจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เท่ากับ 3.8 % และ 1.3 % ค่าความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 70.2 % และ 16.8 % ตามลำดับ

จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ พบว่าทั้งสองไอโซไซม์เป็นโปรตีนสายเดียวและเป็นโปรตีนเบสมีค่า pI มากกว่า 8.3 จัดเป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรต p-nitrophenyl-β-D-glucoside ได้ และสามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินาริน และ ซี-เอ็ม พาไคแมน ซึ่งสับสเตรต ทั้งสองชนิดเป็นโพลิเมอร์น้ำตาลกลูโคสที่มีพันธะเป็น β-1,3-glycosidic linkages แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตพัสทิวแลน ซึ่งไม่มีพันธะดังกล่าว ไอโซไซม์ GI และ GII มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้ถึง 60 องศาเซลเซียส มีความว่องไวสูงที่ช่วงอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส และมีค่าความว่องไวสูงสุดที่ pH 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ สำหรับในยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์ ไอโซไซม์ GI และ GII มีค่าความว่องไวสูงสุด ที่

pH 5.0 และ pH 6.0 ตามลำดับ และพบว่า GII มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนและเป็นเอนไซม์ที่มี polysaccharide binding site เป็นน้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลแมนโนส

จลนศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อศึกษาโดยใช้ลามินารินเป็นสับสเตรต ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2-1.4 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 5.0 พบว่าค่า K_m เอนไซม์ GI และGII เท่ากับ 1.25 มก/มล และ 1.33 มก./มล. ตามลำดับ สำหรับค่า V_{max} เท่ากับ 0.153 $A_{540/min}$ และ 0.142 $A_{540/min}$ ตามลำดับ ค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29.5 และ 33.1 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และเท่ากับ 31.6 และ 34.7 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE

สำหรับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในบีชีรั่มของยางพาราพันธุ์ GT1 พบว่ามีค่าความว่องไวของเอนไซม์สูงกว่าในพันธุ์ RRIM 600 ถึง 2 เท่า แต่สังเกตแถบโปรตีนจากการศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าในยางพันธุ์ GT1 มี GII เพียงแถบเดียว หลังจากที่ยางพาราทั้งสองพันธุ์ ถูกทาหน้ายางด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรลความเข้มข้น 2.5 % ในน้ำมันปาล์ม มีผลทำให้ปริมาณน้ำยางเพิ่มขึ้นโดยพบว่าปริมาณน้ำยางเพิ่มขึ้นต่อครั้งกรีดเป็น 1.3 เท่าในยางพันธุ์ RRIM 600 และ 2 เท่าในยางพันธุ์ GT1 ซึ่งทำให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำยางด้วยคือ 2.5 เท่า ในยางพันธุ์ RRIM 600 และ 3 เท่าในยางพันธุ์ GT1 เมื่อเปรียบเทียบจากปริมาณของน้ำยางจำนวน 1 ลิตรเท่ากัน

Thesis Title Purification and Characterization of β-1,3-glucanase from *Hevea brasiliensis*

Author Miss Ahporn Suntaro

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1994

Abstract

β-1,3-Glucanase was studied in latex of RRIM 600 rubber clone. It was detected in many parts of rubber trees such as latex (C-serum and B-serum), leaves and root. B-serum was prepared from organelles called lutoids. It contains high level of β-1,3-glucanase activity ca.1,500-2,000 units/liter of latex. The enzyme was purified from B-serum by ion-exchange and affinity chromatography on CM-cellulose and Con A-agarose columns, respectively. The percent yields of GI and GII are 3.8 and 1.3 and the percent recoveries are 70.2 and 16.8 respectively.

The two isozymes, revealed under SDS-PAGE and gel filtration to be monomeric proteins. They are basic proteins with pI higher than 8.3. The enzymes effectively hydrolysed laminarin and CM-pachyman but they did not hydrolysed pustulan and the other glucans. Therefore, the enzymes are specific to only β-1,3-glycosidic linkage.

They are classified as endo-β-1,3-glucanase because they failed to hydrolyse p-nitrophenyl β-D-glucoside substrate. Both isozymes are relatively heat stable which remain fully active up to 60 ^{o}C. The temperature optimum are 35-40 ^{o}C. The pH stability of two isozymes are 4.0-9.0 and pH optimum are 4.5 and 5.0 respectively. GII is a glycoprotein containing glucose and/or mannose as carbohydrate moiety, because of its strong binding property to Con A column.

Kinetic analyses with laminarin 0.2-1.4 mg./ml. as substrate indicate appearent K_m values of 1.25 mg./ml. (GI), 1.33 mg./ml. (GII) and V_{max} of 0.153 $A_{540/min}$ and 0.142 $A_{540/min}$ respectively. The two isozymes are monomeric proteins.

Their molecular weights are 29.5 and 33.1 kD when determined by gel filtration and are 31.6 and 34.7 kD when determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The level of enzyme β-1,3-glucanase in B-serum of GT1 was found to be two times higher than that of B-serum of RRIM 600. The number of isozymes was also different. There were two isozymes, GI and GII, in RRIM 600 but only GII detected in GT1. The study on effect of ethylene indicated that this plant hormone induced the actively level of β-1,3-glucanase in rubber trees. The resulted indicated that it increases of glucanase activities up to 2.5 fold in RRIM 600 and 3 fold in GT1, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเชาว์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการค้นคว้าทดลองงานวิจัย รวมทั้งการเขียนและการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล กรรมการที่ปรึกษาร่วม ได้กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำการวิจัยและอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมทั้งการเขียนและการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์ กรรมการภาควิชาชีวเคมี และรองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา กรรมการบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำการเขียน ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ อาจารย์พรทิพย์ ประพันธ์พจน์ รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์ และคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์และให้ความอนุเคราะห์ด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณ Professor. Bruce Stone ที่ได้กรุณาให้สารพัสทิวแลน และ ซี-เอ็ม พาไคแมน สำหรับทำการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีและสมาชิก PR 436 ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับวัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทำวิจัยนี้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณประสาท ศรประสิทธิ์ คุณปิยาภรณ์ ภาษิตกุล คุณสมบูรณ์ ประสงค์จันทร์ คุณชาญชัย สกุลบริรักษ์ คุณเริ่มอรุณ รักเผือก คุณพรรณี เคี่ยมขาว ที่ให้ความรู้และแนะนำการใช้เครื่องมือทางชีวเคมีและการเตรียมสารเคมีต่าง ๆ โดยเฉพาะคุณนพแก้ว เจริญทิพากร ซึ่งได้ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยและให้ความรู้เกี่ยวกับการใช้เครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับพิมพ์วิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณกำลังใจที่สำคัญจากคุณแม่ คุณตาคุณยาย คุณน้า พี่น้องและเพื่อนร่วมงานในโรงเรียนหาดใหญ่วิทยาลัย จ.สงขลา โรงเรียนแม่แตง จ.เชียงใหม่ ที่ให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

อาภรณ์ สันตะโร

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	26
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	27
วัสดุ	27
อุปกรณ์	29
วิธีการ	30
3. ผลการทดลอง	44
4. วิจารณ์	88
5. สรุป	96
เอกสารอ้างอิง	98
ประวัติผู้เขียน	107

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ในลูทอยด์และในไซโตซอล	7
2.	แสดงสัดส่วนเตรตที่เป็นเบต้า-กลูแคน หรือ เบต้า-ดี-กลูแคน (β-D-Glucan)	10
3.	แสดงตัวอย่างการศึกษาเรื่อง PR โปรตีนในพืช	18
4.	แสดงส่วนประกอบของเจล ดัดแปลงจาก Laemmli (1970)	38
5.	แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในสารตัวอย่าง จากส่วนต่าง ๆ ของต้นยางพารา	55
6.	แสดงปริมาณสุทธิของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ ในแต่ละขั้นตอน	61
7.	แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์ คือ GI และ GII เมื่อใช้ p-nitrophenyl-β-D-glucoside และ laminarin เป็นสับสเตรต	66
8.	แสดงปริมาณของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะ (V_e) สารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน ที่ใช้เปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่น	72
9.	แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ ของสารตัวอย่างที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ โดยวิธี SDS-PAGE	74
10.	แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์ GI เมื่อใช้ลามินารินเข้มข้นต่างกัน	76
11.	แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์ GII เมื่อใช้ลามินารินเข้มข้นต่างกัน	79
12.	แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์ระหว่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ พันธุ์ GT1	83
13 ก.	เปรียบเทียบปริมาณน้ำยางสด และค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ จากน้ำยางสดที่เก็บแบบวันเว้นวัน 3 ครั้ง ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600	86
13 ข.	เปรียบเทียบปริมาณน้ำยางสด และค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ จากน้ำยางสดที่เก็บแบบวันเว้นวัน 3 ครั้ง ของยางพาราพันธุ์ GT1	87

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	แสดงน้ำยางในหลอดปิดจุกเกลียว ที่แยกส่วนด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์	5
2.	แสดงลักษณะสูตรโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคส	8
3.	แสดงลักษณะสูตรโครงสร้างของโพลิแซคคาไรด์ ที่มีพันธะเบต้า-1,3	9
4.	แสดงการสังเคราะห์เอธิลีนจากสารตั้งต้น FMN เกิดขึ้นในสภาพที่มีแสง	21
5.	แสดงการสังเคราะห์เอธิลีนจากสารตั้งต้นเมไธโอนีน	22
6.	แสดงผลการปั่นน้ำยางสดด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์	45
7.	ภาพแสดงตะกอนก้นหลอด (bottom fraction) ของน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ GT1 หลังการปั่นแยกด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์	48
8.	ผลของความว่องไวเริ่มต้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม	50
9.	แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์ เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม	51
10.	แสดงผลของ pH ที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์ เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม	52
11.	แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	54
12.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าโปรตีนและความว่องไวเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose	57
13.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าโปรตีนและความว่องไวเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose	59
14.	แสดงแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	62
15.	กราฟแสดงความเสถียรต่ออุณหภูมิ (heat stability) ของเอนไซม์ GI และ GII	63
16.	กราฟแสดงความว่องไวเอนไซม์ GI และGII ที่ pH ต่าง ๆโดยใช้ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์	64

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
17.	กราฟแสดงความว่องไวเอนไซม์ GI และGII ที่ pH ต่าง ๆโดยใช้ยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์	67
18.	แสดงแถบโปรตีนจาก ND-SDS-PAGE ของเอนไซม์ที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R 250	68
19.	แสดงแถบโปรตีนจาก ND-SDS-PAGE ของเอนไซม์ที่ย้อมแอคติวิตี (stain activity) ด้วยสีย้อม 2,3,5 triphenyl tatrazolium chloride	69
20.	กราฟแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ GI และ GII จากวิธีเจลฟิลเตรชั่น	73
21.	กราฟแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ GI และ GII จากวิธี SDS-PAGE	75
22.	กราฟแสดงความว่องไวเอนไซม์ GI เมื่อใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่างกัน	77
23.	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ GI	78
24.	กราฟแสดงความว่องไวเอนไซม์ GII เมื่อใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่างกัน	80
25.	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ GII	81
26.	SDS-PAGE เปรียบเทียบแถบโปรตีนเอนไซม์ในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ GT1	84

ตัวย่อและสัญลักษณ์

A	=	Absorbance
ACC	=	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
BSA	=	Bovine serum albumin
cm	=	centrimetre
CM-cellulose	=	Carboxy methyl-cellulose
Con A	=	Concanavalin A
DEAE	=	Ethylene diamine tetra acetic acid
DNS	=	3,5 dinitrosalicylic acid
FMN	=	Flavin mononucleotide
GI	=	เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่ 1
GII	=	เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่ 2
IAA	=	Indole acetic acid (Auxins)
K_m	=	Michaelis-Menten Constant
M	=	Molar
mM	=	millimolar
M.W., M_r	=	Molecular weight
ND-PAGE	=	non denature Polyacrylamide gel electrophoresis
O.D.	=	Optical density
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
PEG	=	Polyethylene glycol
pH	=	-log Hydrogen ion concentration
rpm	=	revolution per minute
SAM	=	S-adenosyl methionine
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	N,N,N′,N′,-tetramethyl ethylene diamine
Tris-HCl	=	Tris (hydroxy methyl aminomethane hydrochloride)
V_{max}	=	Velocity maximum of activities
UC	=	Ultracentrifugation
α	=	alpha
β	=	beta
μM	=	micromolar
%	=	percent
^{o}C	=	degree celsius
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยที่ได้รับความสนใจในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตดีขึ้น รวมทั้งวิธีการปลูกการดูแลรักษาให้ต้นยางพาราเจริญเติบโตดีมีคุณภาพ ปราศจากโรคอันเกิดจากแมลงศัตรูพืชหรือจากเชื้อโรคต่าง ๆ เพื่อให้การปลูกยางในพื้นที่อันมีจำกัด ได้ผลผลิตคุ้มค่ากับการลงทุน ตลอดจนวิธีการป้องกันรักษาโรคไม่ให้เกิดอันตรายกับเนื้อไม้ยางพารา สำหรับนำไปทำเฟอร์นิเจอร์ต่าง ๆ ซึ่งได้รับความนิยมกันมากในปัจจุบัน สภาพแวดล้อมทั่วไปยางพาราเจริญเติบโตได้ดี ในเขตที่มีอุณหภูมิร้อนและชื้น เช่น ภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย รวมทั้งประเทศแถบใกล้เคียง เช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย และสิงคโปร์ ซึ่งประเทศเหล่านี้ มีสภาพอากาศเป็นแบบร้อนและชื้น เช่นเดียวกับประเทศไทย อาชีพการทำสวนยางพาราจัดเป็นอาชีพหลักอย่างหนึ่งของเกษตรกรในภาคใต้ โดยเฉพาะจังหวัดสงขลามีพื้นที่ปลูกยางพารามากกว่าจังหวัดอื่น จากพื้นที่ปลูกยางพาราทั่วประเทศจำนวน 11.2 ล้านไร่ ปลูกที่ภาคใต้พื้นที่รวม 9.7 ล้านไร่ ในบางจังหวัดของภาคตะวันออก 1.1 ล้านไร่ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือประมาณ 0.7 ล้านไร่ (ลิขิต นวลศรีและคณะ 2533) ผลผลิตของยางพาราในปี พ.ศ.2534 ประเทศไทยมีผลผลิตส่งออกยางพาราสูงสุดเป็นอันดับหนึ่งของโลก (รองลงมา คือ มาเลเซียและอินโดนีเซีย ตามลำดับ) เป็นมูลค่า 24,953.1 ล้านบาท ส่วนในปี พ.ศ.2535 ผลผลิตได้เพิ่มขึ้นคิดเป็นมูลค่า 28,734.4 ล้านบาท และจัดเป็นสินค้าออกอันดับสองรองจากข้าว (สนธยา ศรีธรรมา 2536)

จากสถิตินี้เห็นได้ว่ายางพารามีแนวโน้มการปลูกเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะแถบพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีการปลูกยางพาราแทนการปลูกมันสำปะหลังหรือพืชอื่น ๆ แต่การปลูกยางพารายังต้องมีแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ การดูแลรักษาในระยะต้นกล้า การป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ของต้นยางพาราในระยะเก็บผลผลิต เนื่องจากการปลูกยางจากอายุที่เป็นต้นกล้า จนถึงระยะได้ผลผลิตใช้เวลาประมาณ 5-6 ปี

จัดได้ว่าเป็นระยะเวลาที่นานมาก ต่อการรอเก็บผลผลิตที่ยังไม่แน่ใจว่าจะคุ้มค่าหรือไม่ หรือต้นยางพาราอาจเกิดโรคตายไป ก่อนที่จะโตหรืออยู่ในระยะเก็บผลผลิต เพราะต้นยางที่อยู่ในระยะนี้ จะถูกกรีดที่ส่วนเปลือกของลำต้น เพื่อรองเก็บเอาน้ำยางสด (rubber latex) ทำให้ต้นยางเกิดบาดแผล เปิดโอกาสให้เชื้อโรคโดยเฉพาะเชื้อราและแบคทีเรีย เข้าบุกรุกได้ ตัวอย่างเช่น ทำให้เกิดโรคเส้นดำ (black stripe) ที่หน้ายาง โรคใบร่วง โรคฝักเน่า จากเชื้อราพวก *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* โรคหน้ายางเน่า เปลือกเน่า หรือใบเน่า (mouldy rot) จากเชื้อราพวก *Caratosistic fimbriata* (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล 2522) โรคต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้ต้นยางพารามีผลผลิตต่ำลงมาก และอาจถึงขั้นต้นยางตายได้

ต้นยางพาราและพืชทั่วไป ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรค แต่มีการตอบสนองการบุกรุกของเชื้อโรค เช่น มีการสร้าง wax, cork หรือ cuticle เหนือผิวเซลล์ชั้นนอกสุด (epidermis cell) หรือการสร้างสารโมเลกุลเล็กพวก phytoalexin, tannin, cutin, lignin, phenol และ malanin ฯลฯ (พรทิพย์ วงศ์แก้ว 2533) และ PR โปรตีน (Pathogenesis Related Protein) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารภูมิคุ้มกันโรคให้กับพืช และทำลายเชื้อโรคที่บุกรุกพืช PR โปรตีนดังกล่าว ประกอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-glucanase) (Kombrink 1988) เอนไซม์ทั้งสองจะถูกกระตุ้นให้พืชสร้างมากขึ้นเมื่อมีเชื้อโรคมาบุกรุก เพื่อทำลายเชื้อราหรือแบคทีเรียซึ่งไคติเนสย่อยผนังเซลล์ในส่วนที่เป็นไคติน และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ย่อยผนังเซลล์ส่วนที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคน โดยเอนไซม์ทั้งสองทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการย่อยผนังเซลล์เชื้อโรค แต่ไม่ได้ย่อยสับสเตรตดังกล่าวในพืช (Huynh และคณะ 1992)

นอกจากถูกกระตุ้นให้พืชสร้างมากขึ้นเมื่อมีเชื้อโรคมาบุกรุกแล้ว PR โปรตีนยังถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในสภาวะกดดันบางอย่าง (stress condition) เช่น ต้นพืชบอบช้ำเกิดบาดแผล หรือถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีบางชนิด ได้แก่ ethylene hormone (Mauch 1992) salicylic acid, polyacrylic acid และ mercuric chloride (Ham และคณะ 1991) ต้นยางพาราถูกกรีดลำต้นเพื่อเก็บน้ำยางเกือบทุกวัน เป็นภาวะกดดันซึ่งอาจทำให้ต้นยางพาราสร้าง PR โปรตีนเพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้เชื้อโรคต่าง ๆ สามารถเข้าสู่ต้นยางได้ง่ายตามรอยกรีด จึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นยางพารา สร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นได้

Martin (1991) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไคติเนสในยางพารา พบว่าอยู่ในบี-ซีรั่ม และมีปริมาณสูงถึง 20 % ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในบี-ซีรั่ม เอนไซม์ไคติเนส (Poly 1,4 N-acetyl-β-glucosaminide glycanohydrolase) E.C.3.2.1.14 ทำหน้าที่ย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของผนังเซลล์เชื้อรา เอนไซม์ไคติเนสจึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบางชนิดได้ จากแนวทางการศึกษาเรื่องไคติเนสในบี-ซีรั่มของยางพารานี้ จึงเชื่อว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่มักจะทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ไคติเนส น่าจะมีมากด้วย

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-glucan-glucanohydrolase) E.C.3.2.1.6 เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราในส่วนที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคน และสามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ไคติเนสแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น *Tricoderma viride* จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยเอนไซม์ไคติเนส *Fusarium solani, Fusarium pisi* ถูกยับยั้งโดยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส แต่สำหรับเชื้อ *Fusarium sp.phasioli* จะถูกยับยั้งเมื่อเอนไซม์ทั้งสองทำงานร่วมกัน (Mauch และคณะ 1988) ลักษณะหน้าที่ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าว ทำให้เชื่อว่าในส่วนของบี-ซีรั่มในยางพารา น่าจะมีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งทำหน้าที่ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราบางชนิดได้ ในยางพาราต่างพันธุ์อาจมีปริมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสแตกต่างกันไป สังเกตจากต้นยางพาราต่างพันธุ์กันจะมีการทนต่อการ บุกรุกของเชื้อราต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน เช่น ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มักจะทนต่อการบุกรุกของเชื้อราสกุล *Collectroticum sp.* ซึ่งเชื้อนี้จะทำลายยางพาราในส่วนของใบและกิ่งที่เป็นยอดอ่อน ทั้งในช่วงอายุที่ยังเป็นต้นกล้าและต้นยางที่ ให้ผลผลิตได้แต่จะอ่อนแอต่อเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* มากกว่า ในยางพาราพันธุ์ GT1 และทั้งสองพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อ *Oidium heveae* พอกัน เชื้อราดังกล่าวนี้ทำให้ต้นยางพาราเกิดอาการเน่าหรือแห้งที่ส่วนใบ ยอดและดอกของยางพารา (พงษ์เทพ ขจรไชยกุล 2522)

จากสาเหตุเหล่านี้ จึงได้ศึกษาวิธีการทำให้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากบี-ซีรั่มยางพาราพันธุ์ RRIM 600 โดยเชื่อว่าในยางพันธุ์ใดมีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสปริมาณสูง จะมีความสามารถต้านทานโรคจากเชื้อราสูงด้วย และด้วยเหตุผลสำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถย่อยผนังเซลล์เชื้อราส่วนที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคน หากนำเอนไซม์ส่วนที่ทำให้บริสุทธิ์ได้แล้ว นำมาทดลองยับยั้งการเจริญเติบโต

ของเชื้อราบางชนิดที่เป็นสาเหตุการก่อโรคได้ จะเกิดประโยชน์ในแง่การรักษาโรคจากเชื้อราชนิดนั้น ๆ ในพืชได้ ตลอดถึงการที่จะได้ใช้ปริมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี (Biochemical Parameter) ในการคัดเลือกต้นกล้ายางพาราที่มีความต้านทานโรคไปปลูกได้เหมาะสมในทุกพื้นที่ และลดอัตราการตายในระยะต้นกล้า รวมทั้งลดการเกิดโรคกับต้นยางพาราในระยะที่เก็บผลผลิต เพื่อให้คุ้มค่ากับการลงทุนและการรอคอยที่ใช้เวลานานถึง 5-6 ปี และสามารถเก็บผลผลิตในสภาพน้ำยางสดได้เป็นระยะเวลานานถึง 25-30 ปี นอกจากนั้นแล้วเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส อาจสามารถทำลายเชื้อราที่ก่อโรคในพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ สัตว์เศรษฐกิจและรวมถึงเชื้อราที่ก่อโรคในคน จะมีประโยชน์ทาง การแพทย์ ทั้งในแง่การป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราเหล่านั้นได้ โดยใช้วิธีเตรียมทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ในปริมาณสูงระดับอุตสาหกรรม (large scale) ต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 ยางพารา *(Hevea brasiliensis)*

ยางพาราเป็นพืชที่มีน้ำยาง (latex) ในน้ำยางสดประกอบด้วยอนุภาคของยาง (rubber particles) สร้างจากเซลล์เฉพาะเรียกว่า laticiferous cells ลักษณะทั่วไปของน้ำยางสดคือเป็นของเหลวข้นสีขาว อนุภาคของยางอยู่ในสภาพสารแขวนลอยที่ปนอยู่กับของเหลว ซึ่งประกอบด้วยน้ำ สารโปรตีนต่าง ๆ เกลือแร่บางชนิด ไขมัน, waxs, steroids, phospholipid, free fatty acid, phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inosital, ไอออนและอนุมูลต่าง ๆ ได้แก่ Ca^{+2}, Mg^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2}, Na^{+}, K^{+}, CO_3^{-2}, PO_4^{-3} เป็นต้น (สุรศักดิ์ สุทธิสงค์ 2529)

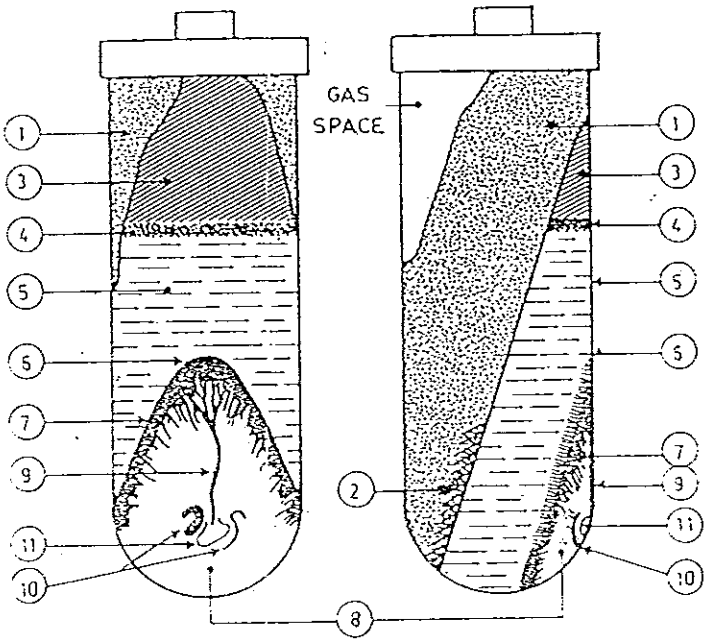
เมื่อนำน้ำยางสดแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการแยกส่วนโดยใช้เครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ (ultracentrifugation) หรือ UC อัตราเร็วในการหมุนเหวี่ยง 30,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที น้ำยางถูกแยกออกเป็น 4 ส่วน สังเกตได้ชัดเจน คือ

ส่วนที่ 1 เป็นยาง (rubber) เกาะตัวกันแน่นอยู่ชั้นบนสุดปิดกั้นส่วนของเหลวด้านล่างของหลอดไว้

ส่วนที่ 2 เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองเข้มของเฟรวิสลิ่ง (Frey Wyssling particles)**ติดกับส่วนของยางที่ผิวด้านล่างและอยู่เหนือของเหลวใส ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนและไขมันต่าง ๆ**

ส่วนที่ 3 เป็นของเหลวใสเรียกว่า ซี-ซีรั่ม (C-serum) **มีน้ำ สารโปรตีนและไอออนต่าง ๆ**

ส่วนที่ 4 เป็นตะกอนก้นหลอด (bottom fraction) **ลักษณะคล้ายเต้าหู้มีสีเหลืองอ่อน เป็นส่วนที่มีค่าความถ่วงจำเพาะสูงที่สุด ประกอบด้วยออร์แกเนลส์เรียกว่าลูทอยด์** (lutoids) **ภายในประกอบด้วยสารโปรตีนและสารอื่น ๆ มากมาย แสดงในรูปที่ 1**



รูปที่ 1 แสดงน้ำยางในหลอดปิดจุกเกลียวที่ผ่านการแยกส่วนด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ (ภาพโดย Moir 1959. J.Nature (london) 184; p.1626 อ้างโดย Auzac และคณะ 1989)

หมายเลข 1-3 เป็นส่วนเนื้อยาง (rubber)

หมายเลข 4 เป็นส่วนของเฟรวิสลิ่ง (Frey Wyssling particles)

หมายเลข 5 เป็นส่วนของซี-ซีรั่ม (C-serum)

หมายเลข 6-11 เป็นส่วนของตะกอนก้นหลอด (bottom fraction)

1.2 ลูทอยด์ (lutoids)

Haan และคณะ (1948.) อ้างโดย Auzac และคณะ (1989) กล่าวไว้ว่า ลูทอยด์เป็นออร์แกเนลล์ (organelles) มีลักษณะคล้ายไมโครแวคิวโอล (microvacuole) พบประมาณ 15-20 % ของน้ำยางสด มีขนาดประมาณ 0.1-0.3 ไมโครเมตร ในขณะที่อนุภาคของยางซึ่งมีขนาดประมาณ 0.03-3.0 ไมโครเมตร มีอยู่ 50-60 % ของน้ำยางสดลูทอยด์มีเนื้อเยื่อห่อหุ้มชั้นเดียว (Gomez และ Southorn 1969 อ้างโดย Auzac และคณะ 1975) รูปร่างเป็นแบบกลมรีเล็กน้อย (spherical) ภายในมีโปรตีนที่ละลายน้ำประมาณ 3 % โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 2 % ของน้ำหนักยางสดทั้งหมดและมีกลุ่ม phospholipid แขวนลอยอยู่ประมาณ 0.5 % ลูทอยด์จะแตกง่ายเมื่ออยู่นอกต้นยาง,อยู่ที่อุณหภูมิห้อง อยู่ในน้ำในสารพวก detergent ความเข้มข้น 0.05-0.1 % ในสารพวก triton X-100, X-14 หรือสารละลายแอมโมเนีย ฯลฯ (Pujarniscle 1968 อ้างโดย Auzac และคณะ 1989) เมื่อลูทอยด์แตกจะมีของเหลวค่อนข้างหนืดเล็กน้อยสีเหลืองใสเรียกว่าบี-ซีรั่ม (B-serum) เปรียบเหมือนสารละลายในไลโซไซม์ของแวคิวโอล บี-ซีรั่มมี pH 5.5-6.9 ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน Archer (1972) อ้างโดย Auzac และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์จากลูทอยด์คือไลโซไซม์มิวรามินิเดส (muraminidases) สามารถย่อยสลายสับสเตรต muco-polysaccharide ในไข่ขาวและผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อราได้ เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเบสเรียกว่า hevamine ในลูทอยด์ประกอบด้วยเอนไซม์อีกหลายชนิด ได้แก่ ไคติเนส (chitinase) เอสเทอเรส (esterase) แอสิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) เบต้า-เอ็นอะเซทิลกลูโคซามินิเดส (β-N-acetyl-glucosaminidase) NADH-ควิโนนรีดักเทส (NADH-quinone reductase) เอทีพีเอส (ATPase) เบต้า-กาแลคโตไซเดส (β-galactosidase) ไรโบนิวคลิเอส (ribonuclease) ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เบต้า-กลูโคไซเดส (β-glucosidase) ซึ่งจัดเป็นกลูคาเนสชนิดหนึ่ง (Coupe และคณะ 1972 อ้างโดย Auzac และคณะ 1975) ในส่วนโทโนพลาสต์ (tonoplast) ของลูทอยด์พบว่าประกอบด้วยส่วนที่มีสมบัติเป็น phosphatidic acid 82 % phospholipid 18 % (Dupont และคณะ 1976 อ้างโดย Auzac และคณะ 1975) นอกจากนี้ยังมีสารละลายอื่น อีกมากมายในลูทอยด์ (intralutoid solutes) ซึ่งประกอบด้วยซีรั่ม แร่ธาตุต่าง ๆ เช่น Mg, K, P, N, Cu ฯลฯ ซึ่งไอออนบางตัวจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในไซโตซอลได้ (สุรศักดิ์ สุทธิสงค์ 2529)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ในลูทอยด์กับในไซโตซอล (ดัดแปลงเป็นตารางจากข้อมูลของ Packer และ Douce (1987).หน้า 87-104 และข้อมูลของ สุรศักดิ์ สุทธิสงค์ (2529) หน้า 15-28)

ไอออนและสารละลาย	ลูทอยด์	ไซโตซอล	อัตราส่วนในลูทอยด์ : ไซโตซอล	อ้างอิง
K^+	31.2	30.1	1.0	
Mg^{+2}	64.2	8.3	8.0	
Ca^{+2}	1.51	0.25	6.0	
Cu^{+2}	0.046	0.021	2.0	
Pi	76	9.1	8.7	(1)
sucrose	5.8	40.5	0.1	
citrate	53.0	5.7	9.3	
malate	17.3	14.6	1.2	(2)
acidic amino acid	22.9	59.9	0.4	
neutral amino acid	21.1	36.4	0.6	
basic amino acid	56.9	6.6	8.6	(3)

(1) Rebaillier และคณะ (1971) อ้างโดย Auzac และคณะ (1989)

(2) Auzac และคณะ (1989)

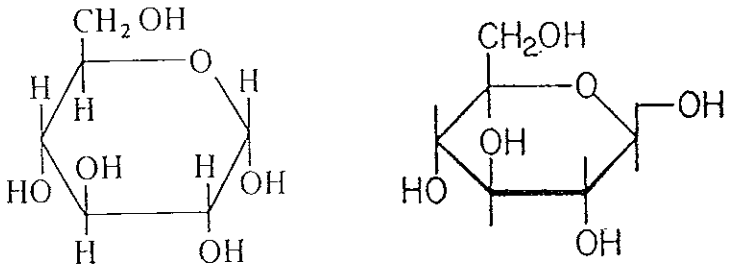
(3) Brzozowska และคณะ (1974) อ้างโดย Auzac และคณะ (1989)

1.3 การศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-glucanase β-1,3-D-glucan glucohydrolase หรือ β-1,3-D-glucan-glucanohydrolase) E.C.3.2.1.6 E.C. 3.2.1.39 E.C.3.2.1.58 เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolases) ทำหน้าที่สลายพันธะเบต้า-1,3-กลูแคน (β-1,3-D-glycosidic linkage) เช่น ลามินาริน (laminarin) ซีเอ็ม-พาไคแมน (CM-pachyman) กลูแคนจากยีสต์ (yeast glucan) ไลชินิน (lichenin) และกลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ (barley glucan) ไม่สลายพันธะของเบต้า-กลูแคนที่พันธะไม่เป็นเบต้า-1,3 เช่น พัสทิวเลน (pustulan) ซึ่งมีพันธะเป็นเบต้า-1,6-กลูแคน กลูแคนมีหลายชนิด ดังแสดงโครงสร้างอย่างย่อของสับสเตรตแต่ละตัวในตารางที่ 2

1.4 เบต้า-ดี-กลูแคน สับสเตรตของเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนส

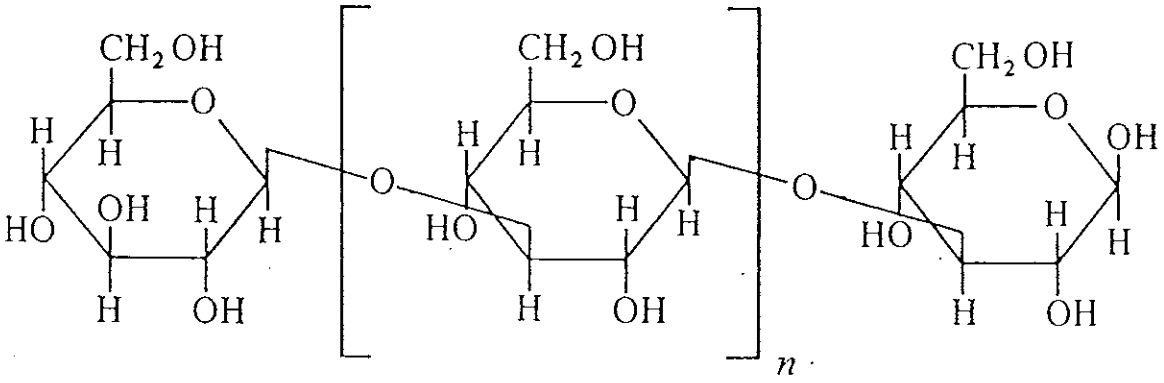
เบต้า-ดี-กลูแคน คือโพลิเมอร์ของน้ำตาล-ดี-กลูโคส (D-Glucose) ซึ่งมีพันธะเป็นชนิดเบต้า-1,3 น้ำตาลกลูโคสและพันธะของโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นเบต้า-1,3 ได้แสดงตัวอย่างโครงสร้างในรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โพลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่ 2-6 โมเลกุล จัดเป็นน้ำตาลเชิงซ้อนหรือเรียกว่าโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) แต่ถ้าเกิน 25 โมเลกุลขึ้นไป จัดเป็นโพลิแซคคาไรด์ (polyssaccharide) กลูแคนอาจเป็นพันธะแบบเดียวตลอดหรือต่างแบบกัน ดังแสดงในตารางที่ 2



(1) (2)

รูปที่ 2 แสดงลักษณะสูตรโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคส (structure of glucose)

(1) α-D-glucose (2) β-D-glucose (Harborne, 1973)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะสูตรโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์ที่มีพันธะเป็นเบต้า-1,3
(Structure of polysaccharide β-1,3-linkages) (Goodwin และ Mercer 1983)

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างสับสเตรตที่เป็นเบต้า-กลูแคน หรือ เบต้า-ดี-กลูแคน (β-D-glucan) (Hrmova และคณะ 1993)

แหล่งเบต้า-1,3-กลูแคน	อัตราส่วนพันธะ	พันธะหลักและโครงสร้าง	อ้างอิง
ซี เอ็ม พาไคแมน	(1→3)-β	$[Glc1\rightarrow 3Glc]_n$	(1)
(Poria cocos)			
พัสทิวแลน	(1→6)-β	$[Glc1\rightarrow 6Glc]_n$	(2)
(Umbilicaria pusturata)			
		Glc | 1→6	
ลามินาริน	(1→3:1→6)-β	$[Glc1\rightarrow 3Glc]_3\rightarrow 3Glc]_n$	(3)
(Laminaria digitata)	7:1		
		Glc | 1→6	
(Eisenia bicyclis)	3 :2	[Glc1→3Glc Glc | | 1→6 $[Glc1\rightarrow 3Glc1\rightarrow 3Glc\text{-}]_n$	
		$[Glc1\rightarrow 3Glc]_{1\text{-}2}$ | 1→6	
กลูแคนจากยีสต์	(1→3:1→6)-β	$[Glc1\rightarrow 3Glc_2]_n$	(4)
(saccharomyces cerevisiae)	4:1		
ไลชินิน	(1 →4:1→3)-β	$[Glc1\rightarrow 4Glc1\rightarrow 4Glc1\rightarrow 3Glc]_n$	(5)
(Cetraria islandica)	2:1		

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่งเบต้า-1,3-กลูแคน	อัตราส่วนพันธะ	พันธะหลักและโครงสร้าง	อ้างอิง
กลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ *(Hordeum vulgare)*	(1 →4:1→3)-β 2.3-2.7:1	$[Glc1\rightarrow 4Glc1\rightarrow 4Glc1\rightarrow 3Glc]_n$	(6)

Harada และคณะ(1968) (1) Lindberg และ Mc.Pherson (1954) (2) Bull และ Chesters (1963) (3) Kogan และ Alfoldi (1988) (4) Perlin และ Suzuki (1962) (5) Woodward และคณะ (1983) (6) (ซี เอ็ม พาไคแมนและพัสทิวแลน ที่ใช้ทดลองได้รับความกรุณาจาก Prof. Stone)

1.5 ตัวอย่างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ศึกษาในแหล่งต่าง ๆ

1.5.1 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยีสต์

1.5.1.1 ยีสต์ชนิด *Arthrobacter luteus* และ *Rhizopus sp.* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว สามารถสลายพันธะของสับสเตรต แตกต่างจากเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั่วไปคือจะสลายพันธะของเบต้า-1,3-กลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์เท่านั้น จะทำงานร่วมกับเอนไซม์เอนโดลามินาริเนสและเอ็กโซลามินาริเนสในยีสต์ชนิด *Rhizopus sp* น้ำหนักโมเลกุลจากการศึกษาโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นเท่ากับ $1.9x10^4$ ดาลตัน สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์ในส่วนที่เป็นกิ่งของสับสเตรต (debranching glycosidic bond enzyme) คือย่อยสลายผนังเซลล์ยีสต์ที่เป็นหน่อ (budding) ให้หลุดออกจากเซลล์ยีสต์ต้นแบบหรือยีสต์ที่เป็นเซลล์แม่ ทำให้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบ มีความแตกต่างจากเอนไซม์ลามินาริเนสในยีสต์เองด้วย (Harada และคณะ 1972 อ้างโดย Brimacombe 1975) สำหรับในยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* และ *S. lactis* สามารถสลายพันธะเบต้า-1,3 แบบสุ่ม (random) จึงจัดเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส จะทำงานร่วมกับเอนโดลามินาริเนสและเอ็กโซลามินาริเนส ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสจำนวนน้อย มักเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ต่าง ๆ ที่ได้จากการย่อยสลายลามินาริน ได้แก่ลามินาริไบโอส ลามินาริไตรโอส และลามินาริเตตระโอส แต่ถ้าทำงานร่วมกับ

เอนไซม์เบต้า-กลูโคไซเดส (β-glucosidase) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสมากขึ้น มักพบเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้คู่กันในยีสต์ที่กำลังแตกหน่อ (Matile และคณะ 1971 อ้างโดย Brimacombe 1975)

1.5.2. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในเชื้อรา

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ศึกษาในเชื้อรา *Aspergillus nidulans* เป็นเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์เอ็กโซแอลฟา-1,3-กลูคาเนส (exo α-1,3-glucanase) เสมอ (Zonneveld และคณะ 1971 อ้างโดย Brimacome 1975) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุและเจลฟิลเตรชั่น (ion-exchange and gel filtration chromatography) มีคุณสมบัติทางกายภาพเช่น ทำงานได้ดีที่ pH 5.0-6.2 สามารถย่อยสลายลามินารินได้ดี แต่ไม่สามารถย่อยสลายไนเจอแรน (nigeran) ซึ่งมีพันธะแบบแอลฟา-1,3 สำหรับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สามารถสลายพันธะของลามินาริน ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลกลูโคสแต่อัตราการสลายพันธะต่ำสุดเมื่อใช้สับสเตรตลามินาริไบโอส และอัตราการย่อยสลายจะค่อย ๆ สูงขึ้นเมื่อใช้สับสเตรตที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น เช่น ลามินาริเตตระโอส ลามินาริเพนตะโอส และ ลามินาริน ถ้ามีการทำงานร่วมกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคไซเดส ที่ pH 5.0-6.0 จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลกลูโคสมากขึ้น แต่ถ้ามีไอออนของโลหะพวก Hg^{+2} จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองได้ (Holten และคณะ 1972 อ้างโดย Brimacombe 1975) และในกลุ่มเชื้อราที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิสูง (Thermophilic fungi) ชนิด *Chaetonium thermophilum, Miriococum albomyces, Thermomyces ibadamensis* และโดยเฉพาะ *Thermomyces lanuginosa* ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุหลายขั้นตอน สามารถย่อยสลายพันธะเบต้า-1,3 ในลามินารินและยีสต์กลูแคนได้ แต่ไม่สามารถสลายพันธะเบต้า-1,3 ในบาร์เลย์กลูแคน ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสเท่านั้นจัดเป็นเอนไซม์เอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส เนื่องจากสามารถสลายพันธะเบต้า-1,3-กลูแคนจากโมเลกุลนอกสุดเข้ามาครั้งละ 1 โมเลกุล ส่วนในเชื้อราชนิดอื่น ๆ ที่ศึกษาร่วมกัน จะสามารถสลายพันธะสับสเตรตที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคนได้แบบสุ่ม หรือแบบอิสระ คือเป็นแบบเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสนั่นเอง (Bacon และคณะ 1972 อ้างโดย Brimacombe 1975) สำหรับ การทำงานเอนไซม์เอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสในเชื้อรา *Cochliobolus miyabeanus* จะทำงานร่วมกับเอนไซม์เบต้า-1,6-กลูคาเนสเสมอ (Nanba และคณะ 1974 อ้างโดย Brimacome 1975)

1.5.3. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในสัตว์

ในสัตว์กลุ่มอาร์โธรปอด (arthropod) ที่ได้รับเชื้อชนิด *Rhagium inguisto* พบว่าเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส มีการทำงานร่วมกับเอนไซม์ ลามินาริเนส (Reese และคณะ (1971) อ้างโดย Brimacombe (1975) พบว่าเอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส ในอาร์โธรปอดกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *Helix pomatia* พบว่าสามารถย่อยสลายพันธะเบต้า-1,3 ของซีเอ็ม-พาไคแมนและลามินารินได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ pH 5.0-6.0 และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุและแบบจำเพาะเจาะจงกับซีเอ็ม-พาไคแมนได้ (ion-exchange and affinity CM-pachyman column chromatography) ถ้าสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปเป็นสภาพเบสมากขึ้นจะมีการทำงานเหมือนกับเอนไซม์เอ็กโซลามินาริเนส (Noble และคณะ 1968 อ้างโดย Brimacombe 1975)

1.5.4 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในพืช

1.5.4.1 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยาสูบ (*Nicotiana glutinosa*) สามารถย่อยสลายพันธะเบต้า-1,3-กลูแคนของโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกลุ่มน้ำตาลตั้งแต่ 4-7 โมเลกุล เช่น ลามินาริเตตระโอส ลามินาริเพนตะโอส และมีอัตราการย่อยสลายสูงมากขึ้นเป็นลำดับ เมื่อใช้สับสเตรตที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ซีเอ็ม-พาไคแมนเป็นสับสเตรต แต่ความว่องไวของเอนไซม์จะมีอัตราลดต่ำลง เมื่อปริมาณผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น ถ้าให้ใบยาสูบได้รับเอธิลีน (ethylene) ใบสีเหลืองจะมีปริมาณเอนไซม์มากกว่าในใบสีเขียว และสามารถแสดงความว่องไวเป็นเอนไซม์ลามินาริเนส (Abeles และคณะ 1972 อ้างโดย Brimacombe และคณะ 1975)

1.5.4.2 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum valgare*) ซึ่ง Hrmova และ Fincher 1993 ศึกษาพบว่าหลังจากใบข้าวบาร์เลย์ได้รับเชื้อ *Aspergillus niger*. จะสร้างเอนไซม์เบต้า-1,4-กลูคาเนส หรือเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นมาและทำงานร่วมกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสย่อยสลายพันธะเบต้า-1,3-กลูแคน และเบต้า-1,4-กลูแคนในข้าวบาร์เลย์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะของกลูแคนจากเนื้อผลมะม่วง เพราะเป็นแอลฟา-1,3-กลูแคน เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์ในใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุและเจลฟิลเตรชั่น พบว่าลักษณะเป็นโปรตีนสายเดียวมี 3 ไอโซไซม์ M.W. เท่ากับ 32 Kd ค่า pI 8.8-10.3 ทำงานได้ดีเท่ากันที่ pH 4.8 ทั้งสามไอโซไซม์

สามารถสลายพันธะเบต้า-1,3 ในลามินารินแต่ไม่สลายพันธะเบต้า-1,3-1,6 กลูแคนจากยีสต์ เบต้า-1,6-จากพัสทิวแลน และเบต้า-1,4 จากเซลลูโลส

1.6. เอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเบต้า-1,3-กลูแคน จากน้ำตาลโมเลกุลที่อยู่นอกสุดของกลูแคนนั้น ๆ หรือโอลิโกเมอร์ชนิดต่าง ๆ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส และโอลิโกแซคคาไรด์หรือสารประกอบอื่น ๆ ออกมา ตัวอย่างการทำงานของเอนไซม์เอ็กโซเบต้า1,3-กลูคาเนสเมื่อใช้ p-nitrophenyl-β-D-glucoside ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสกับสารประกอบ p-nitrophenol ซึ่งให้สีเหลืองใสเมื่ออยู่ในสารละลายเบส เช่น ใน 0.3 M โซเดียมไฮดรอกไซด์และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเบต้า-1,3-กลูแคนแบบสุ่ม (random) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ประเภทนี้ จะเป็นโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดตัวอย่างการย่อยสลายสับสเตรตที่เป็นลามินาริน (*Laminaria digitata*) ซึ่งมีพันธะเป็นเบต้า-1,3และเบต้า-1,6 อัตราส่วน 7:1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ลามินาริไบโอส ลามินาริไตรโอส ลามินาริเตตระโอส และโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ เป็นต้น

1.6.1 เอ็กโซ-เอนโดเอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสที่ศึกษาในพืชและในเชื้อ

1.6.1.1 เอ็กโซ-เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ศึกษาในพืช

จากการศึกษาของ Keen และคณะ (1983) ได้ศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากใบเลี้ยงของถั่วเหลืองซึ่งถูกกระตุ้นจากเชื้อ *Phytophthora megasperm sp. glycinea* เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส มี 2 ไอโซไซม์คือชนิดที่มีค่า pI 8.7 และ 10.5 มีค่า M_r 33 กิโลดาลตัน ไอโซไซม์ที่มีค่า pI 10.5 มีมากกว่า ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี SDS-PAGE และวิธีเจลฟิลเตรชั่น เอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายสับสเตรต ที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคนจากลามินารินได้ นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสับสเตรตที่เป็น ซี เอ็ม-พาไดแมน ซึ่งมี พันธะน้ำตาลกลูโคสเป็นเบต้า-1,3 อย่างเดียว แต่เอนไซม์ดังกล่าว ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตสังเคราะห์ คือ p-nitrophenyl-β-D-glucoside ข้อพิสูจน์เหล่านี้เป็นการยืนยันได้ว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำให้บริสุทธิ์จากใบเลี้ยงถั่วเหลือง ซึ่งถูกกระตุ้นการสร้างโดยเชื้อ *phytophthora megasperma s.p. glycenea* มีคุณลักษณะเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสดังกล่าวจัดเป็น PR โปรตีน (plant pathogenesis related proteins) ด้วยเปรียบเสมือนเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้น เพื่อทำหน้าที่ต่อต้านการเข้าทำลายเนื้อเยื่อเซลล์พืช จากเชื้อราดังกล่าว สำหรับ Kurosaki และคณะ (1992) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในเนื้อเยื่อแครอทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าเป็นเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส และทำงานแบบเสริมกันกับเอนไซม์ไคติเนส ส่วนเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในข้าวบาร์เลย์ (Varghese และคณะ 1994) และในยาสูบ (Payne และคณะ 1990) พบว่าเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสเช่นเดียวกัน แต่ในข้าวสาลี (Sock และคณะ 1990) พบว่าหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Puccinia graminis* มีทั้งเอ็กโซและเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส

1.6.1.2 เอ็กโซ-เอนโดเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ศึกษาในเชื้อ

จากการศึกษาของ Molina, และคณะ (1989) พบว่า เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อ *Candida albicans* 1001 เป็นเอนไซม์เอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส มีลักษณะ เป็นโปรตีนสายเดียว (single protein) และปรากฏแถบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์เพียงแถบเดียว เมื่อทำการแยกโปรตีนโดยใช้วิธี ND-PAGE แต่จะแยกแถบโปรตีนออกเป็น 2 แถบ คือเป็น 2 สับยูนิต เมื่อแยกแถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE เอนไซม์ทั้ง 2 สับยูนิต เมื่อใช้ลามินาริน และ p-nitrophenyl-β-D-glucoside เป็นสับสเตรตจะให้ผลบวก เอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งการทำงานด้วย glucono-delta-lactone ซึ่งประกอบด้วยส่วนของไอออนที่สำคัญคือ Hg^{2+} และ Ag^{2+} และจะมีความว่องไวมากเมื่ออยู่ใน periplasm แต่ก็ตรวจพบเอนไซม์ชนิดนี้ในส่วนของ cytoplasmic membrane รวมทั้งในส่วนที่เป็น culture medium ด้วย สำหรับ Tangarone และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อชนิด *Trichoderma lonibrachiatum chiatum* เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยลามินารินให้เป็นน้ำตาลเชิงซ้อน (oligosaccharide) พวกที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลเพนโตสประกอบอยู่ได้ ส่วนการศึกษาของ Lioberas และคณะ (1988) เกี่ยวกับเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งทำการแยกออกจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* .ในสารละลายที่เชื้อขับออกนอกเซลล์ (extracellular) โดยเติมเกลือให้ตกตะกอน (salting out) แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยเจลฟิลเตรชั่น มีค่า p I เท่ากับ 4.7 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้จะมีค่าความว่องไวเพิ่มขึ้น เมื่อสภาพแวดล้อมของการทำงานที่มีมีไอออน ขนาดใหญ่ เช่น SDS และ ethylene diamine-tatracetate

1.7. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเป็น PR โปรตีน

PR โปรตีน (pathogenesis related protein) เป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อการป้องกันอันตรายให้แก่ต้นพืชเอง จากการถูกบุกรุกของเชื้อโรค การถูกกระทบกระเทือนจากการใช้สารเคมี (chemical treatments) ฮอร์โมนพืชบางชนิดหรือถูกกดดันจากการเกิดบาดแผล (wounding) ในปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อการต่อต้าน (defense responses) ถ้าต้นพืชอ่อนแอก็จะเกิดโรคได้ (susceptible) ในสภาวะที่เชื้อโรคบุกรุกพืชได้แต่ไม่สามารถก่อโรคหรือเข้าทำลายเซลล์พืชให้เกิดความเสียหายรุนแรงต่อพืชได้นั้น เนื่องจากพืชมีความต้านทานต่อโรค ซึ่งความต้านทานดังกล่าว เกิดจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเซลล์ ที่ถูกกระตุ้นหลังจากสัมผัสกับเชื้อโรคทั้งทางกายภาพและทางเคมีแล้ว

Mauch และคณะ (1988) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบคู่กับเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากฝักถั่วสันเตา ที่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ *Fusarium solani* และ *F. phasioli* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ 15 ชนิดใน 18 ชนิดที่ทดสอบ แต่ถ้าใช้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพียงอย่างเดียว จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Fusarium solani* และ *F. pisi* ได้

Legrand และคณะ (1987) ได้ศึกษาพบว่าสารพวก PR โปรตีนในพืชไม่มีมาก่อนหรือมีน้อยมาก แต่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อโรคหรือสารเคมีบางชนิด สารโปรตีนดังกล่าวที่สร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่ต่อต้าน หรือยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ได้แก่ สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound) ไฟโตอะเลซิน (phytoalexin) และกลุ่มเอนไซม์อีกหลายชนิด เช่น ฟีนิลอะละนีน แอมโมเนียไลเอส เปอร์ออกซิเดส ไดฟีนิลออกซิเดส (diphenyl oxidase) ไคติเนส (chitinase) ไคโตแซนเนส (chitosanase) เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-D-glucanase) เบต้ากลูโคไซเดส (β-glucosidase) และไลโซไซม์ (lysozyme) ฯลฯ การสร้างเอนไซม์สำหรับทำหน้าที่เป็น PR โปรตีนเหล่านี้เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง เกิดขึ้นเมื่อมีเชื้อโรคบุกรุกเท่านั้นไม่ใช่จากการควบคุมปกติของยีนส์พันธุกรรม ส่วนใหญ่ป้องกันเชื้อที่มีฤทธิ์ปานกลางถึงต่ำและมักจะไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคใด พืชส่วนใหญ่มีสารประกอบโครงสร้างแข็งแรง เพื่อต้านทานโรค (toterance) เช่น cork, waxs, cuticle, เยื่อหุ้มเซลล์ก็มีส่วนช่วยป้องกันโรคให้กับพืชได้ สภาพแวดล้อมก็มีผลต่อการเกิดโรคของพืชได้บ้าง เช่น ความชื้น ลม ฝน ธาตุอาหาร และสารเคมี แสงสว่าง การแตกของเซลล์และเกิดบาดแผล

จากการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของ Asselin (1993) โดยวิธีอิเลคโตรฟอริซิสแบบกลับขั้ว (electrophoresis diversity) เกี่ยวกับเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เอนไซม์ไลโซไซม์และอีกหลายเอนไซม์ ที่มีคุณสมบัติย่อยสลายพันธะของน้ำตาลเอ็นอะเซติลกลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine) ของไคติน สารประกอบโพลีแซคคาไรด์ของเบต้า-1,3-กลูแคน แต่เอนไซม์เหล่านี้ไม่ได้ทำหน้าที่ในพืช แต่จะทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งมีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบสำคัญ

Duering (1993) ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไลโซไซม์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายผนังเซลล์แบคทีเรียที่มีส่วนประกอบของเปบติโดไกลแคนมิวรีน (murine) เอนไซม์นี้เปรียบการทำงานเหมือนกับเอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนส จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไลโซไซม์ในพืชทำหน้าที่ 2 อย่าง (bifunctional enzyme) คือทำหน้าที่ย่อยสลายแบบเอนไซม์ไคติเนส (chitinase activity) และแบบเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-D-glucanase activity) สำหรับเบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่เกิดขึ้นในพืชแต่ละชนิดต่างกัน หลังจากพืชเหล่านั้น ได้รับเชื้อรา *Fusarium solani f. sp. F. sp. phasioli* และสารพวกไคโตแซนในพืชหลายชนิด มีปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นไม่เท่ากัน คือในถั่วลันเตา (pea) จะเพิ่มขึ้น 78 % ในถั่วแขก (bean) 62 % ในยาสูบ (tobacco) 60 % ในถั่วเหลือง (soybean) 57 % และในข้าวบาร์เลย์ 51 % โดยเฉพาะในข้าวบาร์เลย์เกิดเอนไซม์เบต้า-1,3-1,4-กลูคาเนส (ลามินาริเนส) เพิ่มขึ้นถึง 48 % อีกด้วย (Ming-Mei และคณะ 1992) ตัวอย่างการศึกษาเรื่อง PR โปรตีนในพืชต่าง ๆ ซึ่งได้รับเชื้อหรือสารเคมีบางชนิด ได้แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างการศึกษาเรื่อง PR โปรตีนในพืช

พืชที่ศึกษา	เชื้อ/สารเคมีที่ใช้	ผลจากการศึกษา	อ้างอิง
1) ใบ,รากและแคลัส ยาสูบ	TMV/	เกิด PR โปรตีน 8 ชนิด แสดงคุณสมบัติเป็นไคติเนส 5 ชนิดและเป็นเบต้า-1,3-กลูคาเนส 3 ชนิด	(1)
2) ใบมันฝรั่ง	/salicylate	เกิด PR โปรตีน 8 ชนิด มี 3 ชนิดเป็นเบต้า-1,3-กลูคาเนส มีค่า M.W 21,26.5 และ 34.5 kd อีก 5 ชนิดเป็นไคติเนส	(2)
3) ใบข้าวสาลี	*Puccinia graminis*/	เกิดเอนโดและเอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น 10 เท่า ความร้อนและเอธีลีนไม่มีผลต่อการเกิดเอนไซม์	(3)
	/mercury treatment	เกิดเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น 2 เท่า ไคติเนสเกิดขึ้นเล็กน้อย	
4) รากข้าวบาร์เลย์	/ดินเปียกรวมกับน้ำตาลกลูโคส /casein /hydrolysate +beta-1,3-glucan	เกิดเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น 4 เท่าในรากต้นกล้าข้าวบาร์เลย์ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่รากต้นกล้าเพิ่มขึ้น 1,000 เท่า รวมทั้ง PRโปรตีนอื่นเช่น ไฟโตอะเลซิน	(4)
5) ใบถั่วเหลือง	/salicylic acid /polyacrylic acid+ mercuric chloride	เกิดไฟโตอะเลซินมาก แต่เอนไซม์น้อย เกิดเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มขึ้นมาก	(5)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พืชที่ศึกษา	เชื้อ/สารเคมีที่ใช้	ผลจากการศึกษา	อ้างอิง
	Phytophthora magasperma H 20/	เกิดเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เพิ่มขึ้น	

อ้างอิง (1) Tahiri-Alaoui และคณะ (1990) (2) Pierpoint และคณะ (1990)
(3) Sock และคณะ (1990) (4) Sotalova และคณะ (1988)
(5) Ham และคณะ (1991)

1.8 คุณสมบัติของความเป็นไกลโคโปรตีนของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

จากการศึกษาของ Notario และคณะ (1982) พบว่าเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส (E.C.3.2.1.58) ทำให้บริสุทธิ์จากยีสต์ชนิด *Candida utilis* มีส่วนประกอบของน้ำตาลแมนโนส (D-mannose) มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนชนิดกรด แต่เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากส่วนของอาหารเหลวที่เลี้ยงยีสต์ชนิด *Kluyveromyces aestuarii* ซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่ในคอลัมน์ sephadex G 50 และทำให้เข้มข้นมากขึ้นโดยใช้ PEG พบว่าเป็นเอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสและมีถึง 3 ไอโซไซม์ ซึ่งไอโซไซม์แรกมีคุณลักษณะเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่สองเป็นเอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสและไอโซไซม์ที่สามเป็นเอ็กโซเบต้า-1,3-1,6-กลูคาเนส ทั้งสามไอโซไซม์มีลักษณะเป็นไกลโคโปรตีน ส่วนเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ในยีสต์ชนิด *Schizosaccharomyces versatilis* จะเป็นไกลโคโปรตีนชนิดที่ไม่มีส่วนประกอบของฟอสเฟต มีคาร์โบไฮเดรตน้อย สำหรับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยการตกตะกอนกับ Con A (Concanavalin A) และพบว่าเป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำตาลแมนโนสเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส นี้มีคุณลักษณะของ polysaccharide binding ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ Con A ในระดับที่มากกว่า

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ส่วนเอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส มีน้ำตาลกลูโคสจึงมีความจำเพาะเจาะจงต่อ Con A ในระดับที่น้อยกว่า (Brimacombe 1975)

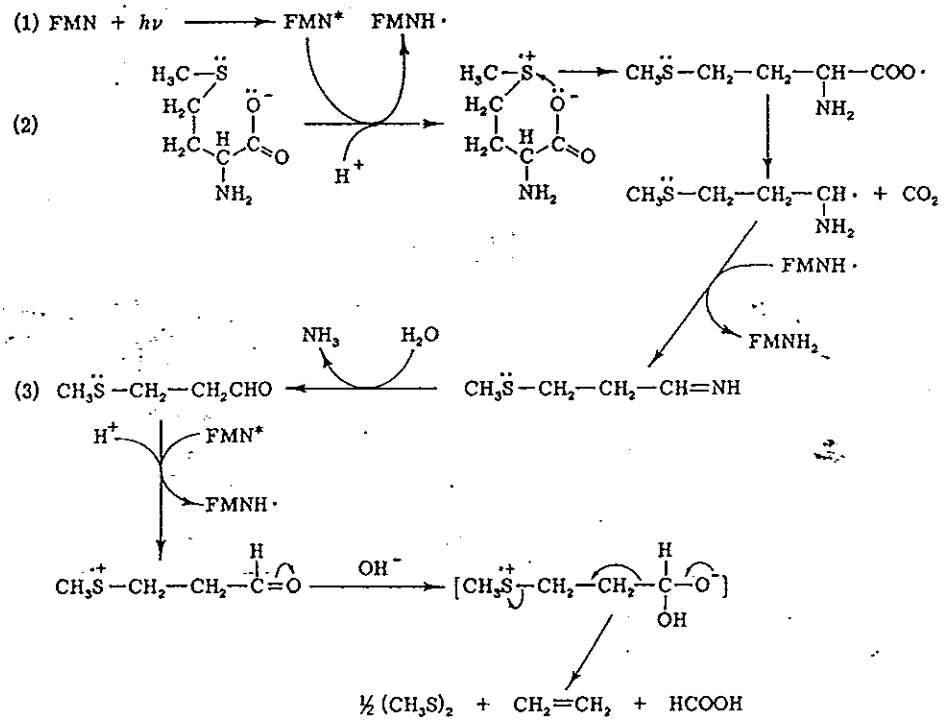
1.9. สารเคมีเอธิลีน, เอธิลีนในพืชและผลการใช้สารเคมีเอธีลีนกับพืชทั่วไป

1.9.1 เอธิลีนและสารปลดปล่อยเอธิลีน

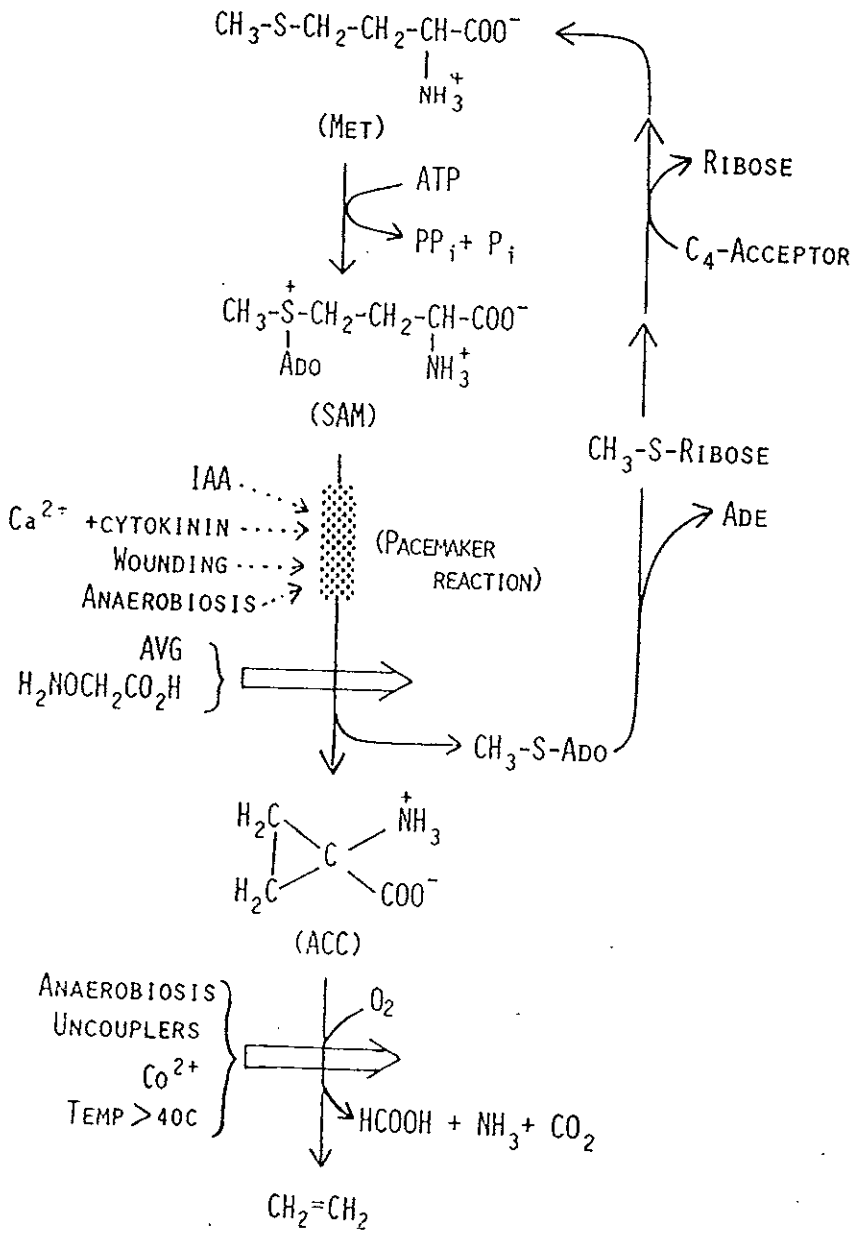
เอธิลีนมีสูตรทั่วไป C_2H_4 เป็นก๊าซที่พบได้ทั่วไปและเป็นฮอร์โมนพืชมีคุณสมบัติทางชีววิทยาและทางชีวเคมีหลายประการด้วยกัน ในทางการเกษตรจะใช้ชื่อทางเคมีว่า 2-chloroethyl phosphonic acid หรือชื่อทางการค้าว่า เอธิฟอน (ethephon), อิเทรล (ethrel), อิเทรลลาเท็กซ์ (ethrel latex) หรือซีฟา (cepha) และบางครั้งอาจใช้ในรูปของก๊าซอะเซติลีนโดยนำคัลเซียมคาร์ไบด์ทำปฏิกิริยากับน้ำ

1.9.2 เอธิลีนในพืชทั่วไป

กระบวนการสร้างเอธิลีนในพืชมีหลายวิถี เช่น ในสภาพแวดล้อมที่มีแสงสว่างทำให้สาร FMN เปลี่ยนเป็นเอธิลีน ในภาวะที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและกลูโคสออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมี Cu^{+2} เป็นโคแฟคเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4 นอกจากนี้การสร้างเอธิลีนในเนื้อเยื่อพืช โดยมี methionine เป็นสารตั้งต้นทั่วไป สรุปเป็นกระบวนการได้ว่าหลังจากกระตุ้นด้วยเอนไซม์ เช่น methionine adenosyltransferase บริเวณที่มีแสง หรือมีอากาศ บางปฏิกิริยาจะถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน IAA, cytokinin + Ca^{+2} ภาวะการสังเคราะห์สารที่ไม่ใช้อากาศและการเกิดบาดแผล จะทำให้เกิดสาร intermediate ที่เป็น อนุพันธ์ของ adenosine คือ SAM หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสาร ACC ก่อนจะเปลี่ยนมาเป็น ethylene ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 4 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์เอธีลีน จากสารตั้งต้น FMN เกิดขึ้นในสภาพที่มีแสง (Yang และคณะ 1967 อ้างโดย Bonner 1976)



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์เอธิลีนในเนื้อเยื่อผลแอปเปิลในอากาศปกติ ซึ่ง มีสารเมไธโอนีน เป็นสารตั้งต้น โดย → แสดงวิถีการสังเคราะห์เอธิลีน และ ⇒ แสดงวิถีการย้อนกลับของปฏิกิริยา Met, Ado และ Ade หมายถึง methionine, adenosine และ adenine ตามลำดับ (Skoog 1980.)

1.9.3 สารเคมีเอธิลีนมีผลต่อพืชทั่วไป

สารเคมีเอธิลีนมีผลต่อพืชทั่วไป ไม่ว่าจะเป็นเอธิลีนที่พืชสร้างขึ้นเองหรือได้รับจากภายนอก ตัวอย่างเช่น

1) ยับยั้งการแบ่งเซลล์ในพืชบางชนิด เช่น มันเทศ พิทูเนีย
2) ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA
3) ชักนำให้เกิดการบานของดอกและการสุกของผล
4) ยับยั้งการขยายขนาดของเซลล์บางกรณีในขณะเดียวกันก็สามารถกระตุ้นการขยาย ขนาดของเซลล์ได้ด้วย
5) ชักนำการร่วงของใบ หรือการผลัดใบ การสุกและการร่วงของผล
6) ยับยั้งการขนส่งฮอร์โมนออกซิน (auxins) ไปยังส่วนอื่นของต้นพืช
7) ชักนำการสังเคราะห์เอนไซม์บางชนิดได้เช่น ถ้าใช้ความเข้มข้น 2 มก/ต้น กับมะละกอทำให้ ต้นมะละกอ ผลิตเอนไซม์ปาเปน (papain) เพิ่มมากขึ้น
8) ชักนำการสร้างสาร phytoalexins
9) ชักนำการไหลเพิ่มขึ้นของน้ำยางพารา
10) เร่งการเกิดรากของพืชบางชนิด เช่น หอมหัวใหญ่ มันเทศ หรือใช้ลดการยึดตัวของพืชบางชนิด เช่น พิทูเนีย บานชื่น

1.9.4 ปัจจัยที่ส่งเสริมและยับยั้งพืชเกี่ยวกับการสร้างเอธิลีน

จากการรวบรวมโดย พีรเดช ทองอำไพ (2529) กล่าวถึงปัจจัยที่ส่งเสริมและยับยั้งการสร้างเอธิลีนของพืชบางกรณีดังนี้ คือ

1.9.4.1 <u>อุณหภูมิ</u> ถ้าอุณหภูมิสูงมีผลให้พืชสร้างเอธิลีนได้มากขึ้นโดยเฉพาะช่วงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเพิ่มขึ้นถึง 40 องศาเซลเซียส จะทำให้พืชหยุดสร้างเอธิลีนได้ และหยุดสร้างหรือสร้างได้น้อยที่อุณหภูมิต่ำ 4-5 องศาเซลเซียส

1.9.4.2 <u>ปริมาณก๊าซ</u> พืชจะสร้างเอธิลีนได้มากขึ้นในสภาพอากาศปกติที่มีก๊าซออกซิเจน 21 % ส่วนบริเวณที่มีก๊าซออกซิเจนเพียง 0.5-5.0 % จะสร้างเอธิลีนน้อย และบริเวณที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาก พืชมีสภาพการหายใจต่ำลงไม่สามารถสร้างเอธิลีนเพื่อทำหน้าที่ปกติได้

1.9.4.3 <u>การเกิดบาดแผลหรือรอยช้ำ</u> พืชที่ได้รับรอยช้ำ หรือเกิดบาดแผล เนื่องจากการทำเครื่องหมาย การกรีดเอาน้ำยาง การสอยการหล่นของผลไม้การกระแทก กระเทือนขณะขนส่ง จะทำให้พืชสร้างเอธิลีนมากขึ้น

1.9.4.4 <u>ฮอร์โมนพืชบางชนิดและสารดูดซับเอธิลีน</u> ฮอร์โมนพืชที่กระตุ้นการสังเคราะห์เอธิลีน เช่น ออกซิน และ ไซโตไคนิน ส่วนสารดูดซับเอธิลีน เช่น ด่างทับทิม (potassium permanganate) ทำปฏิกิริยากับเอธิลีนเกิดสารใหม่พวก มังกานีสไดออกไซด์ และเอธิลีนไกลคอล ซึ่งไม่เปลี่ยนกลับมาเป็นเอธิลีนได้อีก จากสมการ

$$KMnO_4 + C_2H_4 \longrightarrow C_2H_6O_2 + MnO_2 + K_2O$$

1.9.4.5 สารเคมีกลุ่ม silver salt เช่น silverthiosulfate และ silvernitrate มีผลยับยั้งการสร้างเอธิลีนในพืชส่วนใหญ่ได้ ใช้ชะลอการบานของดอกไม้ที่ตัดดอกขาย เช่น กุหลาบ คาเนชั่น

1.9.5 การศึกษาผลของเอธิลีนในพืชชนิดอื่น

จากการศึกษาของ Mauch และคณะ (1984) ได้ศึกษาการให้เอธิลีนและเชื้อรา *Fusarium f. sp. pisi* กับฝักถั่วลันเตา (pea pods) หลังจาก 30 ชั่วโมงผ่านไป จะมีผลกระตุ้นให้ปริมาณเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มขึ้นถึง 9 เท่า และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เพิ่มขึ้น 4 เท่า แต่ถ้าให้ได้รับเชื้อราชนิด *F. solani f. sp. phasioli* จะไม่มีผลต่อการเพิ่มของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเลยและเมื่อให้เอธีลีนก็ไม่มีผลเช่นกัน เมื่อลองให้เอธิลีนไปพร้อมกับเชื้อก็ไม่มีผลเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเอธิลีนไม่มีผลให้ฝักถั่วลันเตาสร้างเอนไซม์ได้ ในทางกลับกัน ถ้าให้เชื้อทั้งสองชนิดในสภาพของสปอร์พร้อมกัน จะทำให้ฝักถั่วลันเตาสร้างสารพวก PR โปรตีนหลายชนิดคือ นอกจากเอนไซม์ทั้งสองแล้ว ยังมีสารพวกเอธิลีน ไฟโตอะเลซินด้วย และถ้าให้แคดเมี่ยมไอออน (cadmium ion) แอคติโนไมซิน-ดี (actinomycin-D) และไคโตแซน (chitosan) จะทำให้ฝักถั่วมีเอธิลีนเพิ่มขึ้นด้วย แต่จะถูกยับยั้งการสร้างได้เมื่อนำฝักถั่ว ไปอบในสารเคมี aminoethoxy vinyl glycine และถ้าอบฝักถั่วที่ไม่ติดเชื้อในสารเคมีดังกล่าว จะเกิดเอธิลีนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการกระตุ้นด้วยเชื้อรา สารเคมีหรือเอธิลีน ในฝักถั่วลันเตา ก็มีผลให้เกิดทั้งเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส แต่เอธิลีนที่เพิ่มขึ้นหลังจากถั่วได้รับสารเคมีบางชนิดดังกล่าวไม่ใช่เป็นสัญญาณ (signal) สำหรับบอกการเพิ่มของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเสมอไป

จากการศึกษาของ Mauch และคณะ (1992) โดยการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟี ตรวจสอบโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ immunoblotting พบว่าหลังจาก ใบถั่วเหลืองได้รับการกระตุ้นด้วยเอธิลีนจะทำให้ใบถั่วเหลืองมีการสร้างเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นและสะสมเฉพาะที่คือ ช่องว่างของแวคิวโอลในเซลล์ผิวใบใกล้กับเซลล์ปากใบ กับเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นเนื้อเยื่อท่อลำเลียง ในขณะที่เนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ไม่มีเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สะสมอยู่เลย

นอกจากนี้ เอธิลีนที่ฉีดพ่นลงในส่วนของใบเลี้ยงต้นอ่อนถั่วเหลือง (hypocotyls of soybean seedlings) จะทำให้เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส (E.C. 3.2.1.39) เพิ่มจากเดิม 4 เท่า สามารถต้านทานโรคจากเชื้อ *Phytophthora megasperma f. sp. glycenia* ได้มากขึ้น และยังมีสารต้านทานโรคชนิดอื่นเกิดขึ้นด้วย เช่น phytoalexin, glyceollin เป็นต้น แต่เอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ทำให้บริสุทธิ์จากถั่วเหลืองดังกล่าว ไม่มีการตอบสนองที่เป็น fungitoxic ให้กับเชื้อราอื่นเลย และถ้ามีการฉีดพ่นเอธีลีนเพิ่มขึ้นกว่าเดิมอีกจะทำให้ถั่วเหลืองสร้างสาร glyceollin เพิ่มขึ้น (Yoshikawa และคณะ 1990)

1.9.6. อิเทรลหรือเอธิลีนกับการให้ผลผลิตของน้ำยางสดในยางพารา

ชาวสวนยางพาราจะใช้อิเทรล ที่เป็นสารเคมีเร่งน้ำยาง ผสมกับน้ำมันปาล์มให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการมาทาที่เปลือกต้นยาง เพื่อเร่งให้น้ำยางสดได้เพิ่มมากกว่าปกติต่อครั้งกรีด ซึ่งใช้กับต้นยางที่อายุเกิน 15 ปี ขึ้นไป หรือใช้กับต้นยางที่เตรียมตัดโค่นก่อนหมดอายุให้ผลผลิต ปริมาณสารเคมีอิเทรลที่ใช้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 2-2.5 % แต่ละพันธุ์จะให้ผลแตกต่างกัน จากการทดลองของโชคชัย เอนกชัย (2531) พันธุ์ของยางพาราที่ให้ผลผลิตหลังจากใช้สารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล จะมีผลผลิตเพิ่มขึ้นต่างกัน เช่น อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำยางในพันธุ์ RRIM 600, RRIM 605, RRIM 623 และ RRIM 501 จะน้อยคือประมาณ 1.5 เท่า แต่ในยางพันธุ์ GT1 เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า และยางพันธุ์อื่นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือประมาณ 1.2-1.3 เท่า เช่นในพันธุ์ PR 107, Banglang, PB 5/51 PB 86 เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากส่วนต่าง ๆ ของต้นยางพารา ได้แก่ น้ำยาง เปลือกยาง รากยาง และใบยาง

2. ทำให้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากน้ำยางสด มีความความบริสุทธิ์ โดยอาศัยเทคนิคทางชีวเคมี

3. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและจลนศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่บริสุทธิ์แล้ว

4. เปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในส่วนของ บี-ซีรั่ม ในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ GT1

5. เปรียบเทียบผลจากการใช้สารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ต่อ ค่าความว่องไว ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยางพันธุ์ RRIM 600 และ พันธุ์ GT1

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

วัสดุที่ใช้ได้จากการซื้อหาในท้องถิ่น ดังนี้

1. น้ำยางสด กรีดจากต้นยางพาราที่ศูนย์วิจัยยางคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
2. ถ้วยพลาสติก หรือถุงพลาสติกสะอาดสำหรับรองรับน้ำยางสดแต่ละต้น
3. น้ำแข็ง สำหรับแช่น้ำยางสดไม่ให้แข็งตัว
4. มีดกรีดยางโดยเฉพาะเรียกว่ามีดเจบอง
5. ท่อโลหะขนาดเล็ก สำหรับตอกติดกับต้นยางให้น้ำยางไหลลงภาชนะ
6. ผ้าก๊อซ สำหรับกรองน้ำยางสด

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
acrylamide gel	71.1	Merck
ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	132.14	Analyticals corloerba
ammonium per sulfate $(NH_4)_2S_2O_8$	228.7	Merck
Biogel P-150		Biorad U.S.A.
Blomophenol blue R		Sigma
blue dextran	$2x10^6$	Sigma
boric acid H_3BO_3	61.83	Merck
Bovine serum albumin BSA	67,000	Pharmacia
calcium chloride	147.02	Vitayasom
carbonic anhydrase	30,000	Pharmacia

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
citric acid anhydrate $C_6H_8O_7.H_2O$	210.14	Sigma
Coomassie brilliant blue R 250		Sigma
cupric sulphate $CuSO_4$	249.68	Sigma
CM cellulose 23		Whatman
3,5 dinitrosalicylic acid $(NO_2)_2C_6H_2(OH)$-COOH.H_2O		BDH
di potassium hydrogen orthophosphate anhydrous K_2HPO_4	174.18	Merck
ethrel solution (สารเคมีเร่งน้ำยาง) C_2H_4		Union carbide
Folin phenol reagent $C_{45}H_{44}N_3O_7S_2Na$		Sigma
glycine	75.07	Merck
glucose $C_6H_{12}O_6$	198.17	BDH
glacial acetic acid CH_3COOH	60.05	Merck
glycerol $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$	92.09	M&B
hydrochloric acid HCl	36.46	Merck
α-lactoalbumin	14,400	Sigma
laminarin (*Laminaria digitata*)		Sigma
2-mercaptoethanol	78.13	Merck
methanol CH_3OH	32.04	BDH
methyl-α-D-manopyranoside $C_7H_{14}O_6$	194.2	Sigma
methyl-α-D-glucopyranoside $C_7H_{14}O_6$	194.2	Sigma
manganese chloride $MnCl_2$	197.91	Merck
magnesium chloride $MgCl_2$	203.31	Merck
N-N Methylene bis acrylamide	154.2	Merck
N,N-N′,N′,-tetramethylene diamine (TEMED)	116.2	Sigma
ovalbumin	45,000	Pharmacia

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
p-nitrophenyl -β-D-glucopyranoside [$C_{12}H_{15}NO_3$]-Glc	301.3	Sigma
phosphorylase b	94,000	Sigma
potassium dichromate $K_2Cr_2O_7$	294	Sigma
potassium sodium tartrate	282.23	M&B
sodium acetate $CH_3COONa.3H_2O$	136.08	Analyticals corloerba
sodium carbonate Na_2CO_3	105.99	FERAK
sodium chloride	58.44	Merck
sodium citrate	294.10	Sigma
sodium dodecylsulfate	288.4	Merck
sodium hydroxide NaOH	40	Merck
soybean tripsin inhibitor	20,100	Pharmacia
Tris (hydroxy methyl aminomethane)	121.14	Fluka
2,3,5 triphenyl tatrazolium chloride		Sigma

อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ ขนาด 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ลิตร พร้อมกรวยกรองขนาดใหญ่
2. กระบอกตวงและขวดรูปชมพู่
3. ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับตักสาร
4. ปิเปตแก้ว ขนาด 2 ml, 5 ml และ 10 ml และหลอดหยดสารพร้อมจุกยาง
5. ไมโครออโตปิเปต พร้อมทิฟ ขนาด 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
6. คอลัมน์หลอดแก้ว ขนาด 2.5X10, 2.5X25 และ 1.5X90 cm
7. กล่องพลาสติกปิดฝาแน่น สำหรับเก็บแผ่นเจล

8. กล้องถ่ายรูป
9. แผ่นเซลโลเฟนและคลิปโลหะขนาดกลาง
10. สายยางขนาดเล็ก
11. ขวดสีชาเก็บสารเคมีที่จำเป็นต่าง ๆ
12. เครื่องอัลตร้าเซนตริฟิวจ์ (ultracentrifugation) UC L8-70 M Beckman, (U.S.A.)
13. เครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 operation Beckman, (U.S.A.)
14. เครื่องเซนตริฟิวจ์ MSE MISTRAL 4 L, (England)
15. เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ model H-3, kokusan, (Japan)
16. เครื่องชั่ง Satorius model 2474, (Germany)
17. เครื่องชั่ง Mettler PJ 3000, (Germany)
18. เครื่องเก็บสารตัวอย่าง Fraction collector model 2110, Biorad, (U.S.A.)
19. Microtube pump MP-3 EYELA, (Japan)
20. Shimazu UV-VIS recording spectrophotometer model UV 160 A, (Japan)
21. Power supply model 1000/500 Biorad, (U.S.A.)
22. เครื่อง Run gel Electrophoresis ATTA Coroperation, (Japan)
23. pH meter model SA 230 (orion research), (England)
24. Stir plate Nuova II (Thermolyme), (England)
25. ตู้อบ Napco model 630, (England)
26. ตู้แช่แข็ง Scien Temp lo-cold Freeze Adrian, (U.S.A.)
27. ตู้แช่แข็ง Sanyo, (Japan)

วิธีการ

2.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

2.1.1 การเตรียมบี-ซีรั่มจากน้ำยางพารา

2.1.1.1 การเก็บน้ำยางสด

ใช้มีดกรีดยางหรือมีดเจบอง กรีดส่วนเปลือกของต้นยาง (ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ศูนย์วิจัยการยางคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา) จำนวน 10 ต้น ใช้ถ้วยสะอาดซึ่งแช่น้ำแข็งรองรับน้ำยาง ปล่อยให้น้ำยางไหลประมาณ 1 ชั่วโมง จึงเก็บน้ำยางรวมกันได้ประมาณ 1 ลิตร กรองด้วยผ้าก๊อซแล้วบรรจุลงในหลอดปิดจุกเกลียว ซึ่งใช้กับเครื่อง UC ชั่งน้ำหนักรวมหลอดละ 53.00 กรัม จะมีน้ำยางบรรจุอยู่หลอดละ 25 มล.

2.1.1.2 การปั่นแยกน้ำยางสด

นำน้ำยางสดในหลอดปิดจุกเกลียวจำนวน 12 หลอด วางลงในโรเตอร์ชนิด Ty 50.2 Ti หมุนเหวี่ยงน้ำยางด้วยเครื่อง UC อัตราเร็วต่อการหมุนเหวี่ยง 30,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที น้ำยางสดแต่ละหลอดถูกแยกออกเป็น 4 ส่วน คือส่วนบนสุดเป็นเนื้อยาง (rubber) ส่วนที่สองถัดลงไปมีสีเหลืองเรียกว่า เฟรวิสลิ่ง (Frey Wyssling particles) ส่วนที่สามเป็นสารละลายใสเรียกว่าซี-ซีรั่ม (C-serum) ส่วนล่างสุดเป็นตะกอนชั้นก้นหลอด (bottom fraction) ซึ่งเป็นส่วนที่นำไปเตรียมเป็น บี-ซีรั่ม ต่อไป

2.1.1.3 การเก็บสารตัวอย่าง (ตะกอนก้นหลอด) หลังการหมุนเหวี่ยงน้ำยางสด

เปิดจุกเกลียวหลอด ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเอาส่วนเฟรวิสลิ่งออกก่อนตามด้วยซี-ซีรั่ม หลังจากนั้นใช้ช้อนตักเอาเนื้อยางชั้นบนสุดออก แล้วตักตะกอนโปรตีนที่อยู่ก้นหลอด ใส่ภาชนะสำหรับแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.1.1.4 การแช่แข็งสลับกับการละลาย

นำตะกอนก้นหลอดซึ่งแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด นำกลับไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิเดิมอีกทำสลับกัน 5 ครั้ง จะได้ของเหลวปนกับตะกอน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 โรเตอร์ JA 20 ใช้อัตราเร็วหมุนเหวี่ยง 15,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะได้สารละลายใสเรียกว่าบี-ซีรั่ม

2.1.2 การเตรียมสารตัวอย่างจากส่วนอื่น ๆ ของยางพารา

ใช้ใบยางอ่อน ใบยางแก่ รากยางและเปลือกยางอย่างละ 50 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 250 มล.แยกกันอย่างละบีกเกอร์ แต่ละบีกเกอร์เติมบัฟเฟอร์ 0.1 M โซเดียมอะซีเตต pH 5.0 จำนวน 50 มล. ปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) คั้นเอาเฉพาะน้ำ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 โรเตอร์ JA-20 อัตราเร็วในการหมุนเหวี่ยงเท่ากับ 15,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนใสไปตรวจสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส สำหรับซี-ซีรั่ม นำซี-ซีรั่ม ที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงน้ำยางสดด้วยเครื่อง UC ซึ่งเก็บที่ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส. แช่น้ำที่อุณหภูมิห้องจนละลายแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง นำส่วนใสหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

2.2 การตรวจสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

2.2.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้

2.2.1.1 บัฟเฟอร์

ชั่งโซเดียมอะซีเตต จำนวน 13.60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปปรับ pH เป็น 5.0 โดยใช้กรดอะซีติกเข้มข้น เติมน้ำกลั่นเพิ่มให้ครบ 1 ลิตร จะได้บัฟเฟอร์โซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 0.1 M pH 5.0 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.1.2 สารสับสเตรท

ชั่งลามินาริน จำนวน 0.05 กรัมละลายใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตต บัฟเฟอร์ จำนวน 25 มล. จะได้สารสับสเตรตที่มีความเข้มข้น 2 มก./มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.1.3 สารละลาย DNS

ชั่ง DNS จำนวน 5 กรัม ละลายใน 2.0 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 มล. ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายโซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต จำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 250 มล. ลงไปในขณะที่ยังร้อนอยู่คนให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำให้ครบ 500 มล.เก็บที่อุณภูมิห้อง

2.2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ใช้น้ำตาลกลูโคส จำนวน1.94 กรัม ละลายใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 จำนวน 100 มล. จะได้ 0.1 M ของน้ำตาลกลูโคส หลังจากนั้นนำมาทำให้เจือจางด้วยบัฟเฟอร์เป็น 5 ความเข้มข้นคือ 0.1, 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 ไมโครโมล และใช้สารปริมาตร 100 ไมโครลิตรเท่ากันทุกหลอด นำไปเติมสารละลาย DNS จำนวน 0.2 มล. และ 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ จำนวน 0.2 มล. แล้วนำลงต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที วางไว้ให้เย็น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นหลอดละ 0.9 มล. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.2.3 วิธีตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลคาเนส

ใช้สารตัวอย่างจำนวน 10 ไมโครลิตรผสมกับสับสเตรตลามินารินความเข้มข้น 2.0 มก./มล. จำนวน 90 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันนำลงแช่และเขย่าเบา ๆ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำขึ้นต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย DNS จำนวน 0.2 มล. รวมกับบัฟเฟอร์จำนวน 0.2 มล. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ตั้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 0.9 มล. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้หาค่าความว่องไวเป็นค่ายูนิต (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส กำหนดให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ 1 ยูนิต เท่ากับจำนวนไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคสที่สามารถ แสดงตำแหน่งรีดิวซ์ได้ (reducing end) ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS ให้สีน้ำตาลแดง จัดเป็นผลิตภัณฑ์ (product) ที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายลามินารินได้ในเวลา 1 นาที

2.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

2.3.1 การเตรียมสารเคมี

2.3.1.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ประกอบด้วย 2 % ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M จำนวน 100 มล.เติม 1 % ของสารละลายโซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรตในน้ำกลั่น จำนวน 1 มล. และเติม 1 % ของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ในน้ำกลั่น จำนวน 1 มล. คนให้เข้ากันเตรียมแล้วใช้ทันที

2.3.1.2 สารละลายโฟลิน

ใช้สารละลายโฟลินความเข้มข้น 2.0 M ผสมน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:2 จะได้สารละลายโฟลินความเข้มข้น 1.0 M เตรียมแล้วใช้ทันที

2.3.1.3 โปรตีนมาตรฐาน BSA

ใช้ BSA (fraction 5) จำนวน 2 มก. ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 มล. จะได้โปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 2 มก./มล. นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามลำดับ (serial dilution) จะได้ปริมาณโปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้นเป็น 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัม ตามลำดับ

2.3.2 วิธีการหาปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA แต่ละความเข้มข้น (เตรียมจากข้อ 2.3.1.3) จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดสอบ 5 หลอด และสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์แต่ละหลอด จำนวน 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายโฟลินหลอดละ 0.3 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของสารตัวอย่าง นำไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA

2.4 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟี่

2.4.1 โครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM cellulose

2.4.1.1 การเตรียม CM cellulose

ใช้ CM-cellulose จำนวน 20 กรัมใน 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 500 มล. คนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเทสารละลายส่วนบนออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจน CM-cellulose pH เท่ากับน้ำกลั่นจากนั้นเติม 0.5 M กรดไฮโดรคลอริก จำนวน 500 มล. คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทเอาส่วนกรดออกล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีสภาพ pH เท่ากับน้ำกลั่น จากนั้นเติม 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 บรรจุลงในคอลัมน์ ขนาด 2.5 x25 cm. (ปริมาตร 60 มล.)

2.4.1.2 หลังจากปรับสภาพสมดุลของ CM cellulose ในบัฟเฟอร์ดังกล่าวให้มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งคอลัมน์แล้วใช้ บี-รั่ม จำนวน 20 มล. ตรวจสอบหาค่าความว่องไว

โดยรวมของเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนส (total activity) และหาค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด หลังจากนั้นนำลงคอลัมน์ ซึ่งตั้งไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อัตราเร็วในการไหลของบัฟเฟอร์ผ่านคอลัมน์ (flow rate) ประมาณ 12 มล./ชั่วโมง และเก็บสารตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บสาร (Fraction collector) หลอดละ 1.8 มล. เมื่อล้างคอลัมน์เอาโปรตีนส่วนที่ไม่แลกเปลี่ยนประจุกับคอลัมน์ (unbound CM) ออกจนหมด โดยสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโมเมตร จากนั้นจึงใช้ 0.0-1.0 M โซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน โดยค่อยๆเพิ่มความเข้มข้น (gradient) ของสารละลาย ชะเอาโปรตีนที่แลกเปลี่ยนปรระจุกับคอลัมน์ (bound CM) นำโปรตีนแต่ละหลอดตรวจสอบค่าความว่องไวเอนไซม์แล้วนำไปเตรียมให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยโครมาโตกราฟฟี่แบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose

2.4.2 โครมาโตกราฟฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose

2.4.2.1 การเตรียม Con A agarose

ใช้ Con A agarose สำเร็จรูป จำนวน 15 มล. ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M โซเดียมอะซีเตต pH 6.0 ซึ่งเติม 1.0 M โซเดียมคลอไรด์ และเติมมักเนเซียมคลอไรด์ มังกานีสคลอไรด์ คัลเซียมคลอไรด์ อย่างละ 1.0 mM บรรจุลงคอลัมน์ขนาด 2.5X10 cm. (ปริมาตร 15 cm^3) ปรับสภาพให้สม่ำเสมอด้วยบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2.2 นำสารตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ CM cellulose (bound CM) เติมอย่างละ 1 mM ของมักเนเซียมคลอไรด์ มังกานีสคลอไรด์ และคัลเซียมคลอไรด์ ทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย Con A agarose โดยใช้อัตราเร็วในการไหลของสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ (flow rate) เท่ากับ 6 มล./ชั่วโมง เก็บสารตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนเริ่มตั้งแต่หลอดที่ 1-25 เก็บหลอดละ 4 มล. หลอดที่ 25-75 เก็บหลอดละ 2 มล. และหลอดที่ 76-90 เก็บหลอดละ 1 มล. โปรตีนที่ไม่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับคอลัมน์จะหลุดออกเรียกว่า unbound Con A เป็น peak แรก ตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของแต่ละหลอด หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ต่อไปปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ล้างประมาณ 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ โปรตีนที่จำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ในระดับต่ำกว่า จะถูกบัฟเฟอร์ชะออกมาเป็น unbound Con A (peak ที่สอง) หลังจากนั้นใช้สารละลาย 0.2 M ของน้ำตาลแมนโนไซด์ (α-D-methylmannoside) โปรตีนที่จำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ในระดับที่สูงกว่าถูก ชะออกมาเป็น bound Con A (peak ที่สาม) หาค่าความว่องไวเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนสแต่ละหลอด ทั้ง peak ที่สองและสาม

ซึ่งเป็นค่าความว่องไวเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่ 1 (GI) และไอโซไซม์ที่ 2 (GII) ตามลำดับ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ทั้ง 2 ชนิด นำมารวมกันแล้วกำจัดเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซ์ และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้อะควอไซด์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสต่อไป

2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอริซิสแบบ SDS-PAGE

2.5.1 การเตรียมเจล

เตรียมตามวิธีของ Laemmli (1970) วิธีการเตรียมและสารเคมีที่ใช้มีดังนี้

2.5.1.1 เตรียม separating gel 30 % acrylamide solution :

ชั่ง acrylamide จำนวน 30 กรัม + bis acrylamide จำนวน 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มล. คนให้เข้ากันกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.1.2 เตรียมบัฟเฟอร์ 1.5 M Tris-HCl pH 8.9 :

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

2.5.1.3 เตรียมบัฟเฟอร์ 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 ใช้วิธีเดียวกับเตรียม 1.5 M แต่ชั่ง Tris เพียง 6.03 กรัม และปรับ pH 6.8

2.5.1.4 เตรียม 10 % SDS :

ชั่ง SDS (sodium dodesyl sulfate) จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5.1.5 เตรียม 1 % ของแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต :

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต จำนวน 0.1 กรัมละลายน้ำกลั่น 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.1.6 เตรียมอิเลคโตรฟอริซิสหรืออิเลคโตรดบัฟเฟอร์สำหรับ SDS-PAGE

ชั่ง Tris จำนวน 3.03 กรัมรวมกับ glycine จำนวน 14.4 กรัม และ SDS จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.3 โดยใช้ไกลซีนปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร สำหรับ ND-SDS-PAGE ใช้วิธีการเตรียมสารแบบเดียวกัน แต่ไม่มี SDS

2.5.1.7 **เตรียมบัฟเฟอร์สารตัวอย่าง** (sample buffer) :

สำหรับ SDS-PAGE ชั่ง Tris 1.42 กรัม + SDS 4 กรัม + glycerol 20 มล. +mercaptoethanol 10 มล. กรัม นำสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 70 มล. ปรับ pH 6.8 โดยใช้ HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสำหรับ non SDS-PAGE ใช้สารตัวอย่างแบบเดียวกัน ยกเว้น SDS และ mercaptoethanol

2.5.2 การเตรียมสีย้อมโปรตีนสารละลายขจัดสีส่วนเกินและสารละลายเก็บเจล

2.5.2.1 เตรียมสีย้อมโปรตีน (staining solution) :

ชั่งสีย้อม coomassie brilliant blue R 250 จำนวน 2.5 กรัม ละลายในกรดอะซีติก 20 มล.และน้ำกลั่น 500 มล. คนให้เข้ากันเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2.5.2.2 เตรียมสารขจัดสีส่วนเกินหลังย้อมเจล (destain solution) :

ใช้ methanol จำนวน 400 มล. รวมกับ gracial acetic acid 70 มล. ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5.2.3 เตรียมสารละลายเก็บเจล (fixative solution)

ใช้ methanol จำนวน 100 มล. รวมกับ glacial acetic acid จำนวน 70 มล.ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบของเจล ดัดแปลงจาก Laemmli (1970)

ส่วนประกอบของเจล	separating gel			stacking gel	
	SDS		non SDS	SDS	non SDS
	7%	15%	4%	3%	3%
30% acrylamide (ml)	0.7	1.5	1.2	0.3	0.3
1.5M.Tris-HCl pH8.9(ml)	0.75	0.75	2.15	-	-
0.5M.Tris-HCl pH6.8 (ml)-	-	-	0.75	0.75	-
10% SDS (µl)	60	60	-	60	-
1%Ammoniumpersulfate(µl)	75	75	225	120	120
D.W.(ml)	1.44	0.64	4.42	1.77	1.83
TEMED(µl)	5	5	5	5	5
Total volume(ml)	3	3	10	3	3

2.6 วิธีศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนสจากยางพารา

2.6.1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (heat stability)

ใช้สารตัวอย่างทั้ง GI และ GII ใส่หลอดทดสอบชนิดละ 9 หลอดแต่ละหลอดมีปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม ปิดจุกหลอดแล้วนำลงแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ต่างกันคือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งพร้อมกันทุกหลอด นำแต่ละหลอดตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์ โดยเติมลามินารินความเข้มข้น 2 มก./มล. จำนวน 90 ไมโครลิตร แช่และเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีนำลงต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาทีเติมสารละลาย DNS 0.2 มล.และบัฟเฟอร์ 0.2 มล. นำลงต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 0.9 มล. อ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดทุกอุณหภูมิ

2.6.2 สภาพแวดล้อมของกรด-เบสที่เอนไซม์ทำงานได้ดี (pH optimum)

2.6.2.1 ใช้โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์

นำเอนไซม์ที่เตรียมได้ ทั้ง GI และGIIใส่หลอดทดสอบ ชนิดละ 5 หลอด แต่ละหลอดมีปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัมเติม 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ซึ่งมีค่า pH ต่างกันคือ pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 หลอดละ 100 มล นำเอาแต่ละหลอดมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2.6.2.2 ใช้ยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์

เตรียมยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์โดยใช้ citric acid จำนวน 6.008 กรัม รวมกับ potassium dihydrogen phosphate จำนวน 3.893 กรัม รวมกับ boric acid จำนวน 1.67 กรัม รวมกับ diethylbarbituric acid จำนวน 5.266 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ได้ pH เริ่มต้นเป็น 2.6 นำมาปรับ pH ค่าต่าง ๆ โดยใช้ 0.2-0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้ค่า pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ตามลำดับหลังจากนั้นนำไปทดสอบสารตัวอย่างแบบเดียวกับการใช้โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์

2.6.3 การทดสอบด้วย p-nitrophenyl-β-D-glucoside

ใช้สารตัวอย่างได้แก่ GI, GII, bound CM และบี-ซีรั่ม ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 50 ไมโครกรัม เติมสารละลาย 5 mM p-nitrophenyl β-D-glucoside

ใน 0.5 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 จำนวน 0.3 มล. นำไปแช่และเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาเติม 0.3 M โซเดียมคาร์บอเนตจำนวน 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากันประมาณ 5 นาทีนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร วิธีการนี้เพื่อทดสอบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสหรือเอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งสังเกตโดยดูผลการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรถ้าผลเป็นบวกแสดงว่าเอนไซม์เป็นเอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส ถ้าผลเป็นลบแสดงว่าเป็นเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส

2.6.4 การย้อมสีแสดงคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

2.6.4.1 ใช้เจลแผ่น (slab gel) แบบ ND-SDS-PAGE 4 % ตามตารางที่ 4 ใช้สารตัวอย่าง 3 ชนิด คือบี-ซีรั่ม GI และ GII ซึ่งปริมาณโปรตีนชนิดละ 100 ไมโครกรัมเติม 50 % กลีเซอรอล แล้วหยอดลงเจลผ่านกระแสไฟฟ้า โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าเท่ากับ 250 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 18 มิลลิแอมแปร์ ต่อสลับขั้ว เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.6.4.2 นำแผ่นเจลล้างน้ำกลั่นให้สะอาด แช่ไว้ใน 50 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 แล้วนำมาแช่ใน 1 % ลามินาริน ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน แช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลแช่ลงในสารละลายผสมระหว่างเมธานอล กรดอะซีติก และน้ำกลั่นอัตราส่วน 5:2:5 เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำให้สะอาดนำลงแช่ไว้ใน 0.3 กรัมของ 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride ซึ่งละลายอยู่ใน 1 M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 มล. เป็นเวลา 5 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปรากฏสีแดงอมส้มชัดเจนแล้วให้รีบนำแผ่นเจลขึ้นจากอ่างควบคุมอุณหภูมิ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่นเจลแช่ลงในสารละลาย 3 % กลีเซอรอล + 4 % เมธานอล + 10 % กรดอะซีติก ถ่ายภาพเก็บไว้ทันที

2.6.5 วิธีหาค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

2.6.5.1 โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น

ชั่ง Biogel P-150 จำนวน 10 กรัมต้มใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 จำนวน 500 มล. ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 0.5 M ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็นแล้วบรรจุลงคอลัมน์ขนาด 1.5 x 55 cm. (ประมาณ 90 มล.) ปรับสภาพของเนื้อเจลในคอลัมน์ให้สม่ำเสมอด้วยบัฟเฟอร์ และปรับอัตราการไหลของบัฟเฟอร์ (flow rate) เท่ากับ 12 มล./ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ blue dextran และ

potassium dicromate สำหรับหาค่า void volume (V_O) และ total volume (V_t) ตามลำดับ ใช้โปรตีนมาตรฐานคือ BSA (bovine serum albumin) M.W. 67,000, pepsin M.W. 34,000, carbonic anhydrase M.W. 30,000 และ α-lactoalbumin M.W.14,200 ดาลตัน นำสารตัวอย่าง GI และ GII ชนิดละ 1 มิลลิกรัม หาปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะเอาสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ (V_e) นำปริมาตรสารโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างมาหาค่า K เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้สูตรการหาดังนี้

$$K = V_e - V_O / V_i$$

นำค่า K มาคำนวนหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบ ค่า K กับ ค่า log M.W. ของโปรตีนมาตรฐาน

2.6.5.2 หาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอริซิส

ใช้วิธีการเตรียมเจล 7-15 % ตามส่วนประกอบ ในตารางที่ 1 แบบ SDS-PAGE ใช้สารตัวอย่างมีปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัมทั้ง GI และ GII ใช้สารตัวอย่างคือ บี-ซีรั่มปริมาณโปรตีนเท่ากับ 20 ไมโครกรัมและ bound CM ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 20 ไมโครกรัม ใช้โปรตีนมาตรฐาน คือ phosphorylase M.W.94,000, BSA M.W. 67,000, ovalbumin M.W. 45,000, carbonic anhydrase M.W. 30,000 และ α-lactalbumin M.W.14,200 เมื่อหยอดสารตัวอย่างลงช่องเจลเรียบร้อยแล้ว ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้แรงเคลื่อน 250 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 24 มิลลิแอมแปร์ ปล่อยให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านเจลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สังเกตให้ขอบสีย้อมสารตัวอย่าง เคลื่อนที่มาถึงบริเวณขอบล่างสุดของแผ่นเจลพอดีจึงหยุดกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นเจลย้อมสี Coomassie brilliant blue R 250 นำมาวัดระยะการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานโดยใช้สูตร

Rf = ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ไป / ระยะทางที่บัฟเฟอร์เคลื่อนที่ไป

แล้วนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่า log M.W. ของสารโปรตีนมาตรฐาน เพื่ออ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างทั้ง GI และ GII ต่อไป

2.7. วิธีการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนสจากยางพารา

2.7.1 ใช้ลามินารินที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ 0.2, 0.5, 0.8,1.1 และ 1.4 มก./มล. หาค่าความว่องไวของเอนไซม์โดยใช้เอนไซม์ 10 ไมโครกรัม ทั้ง GI และ GII

2.7.2 ใส่ลามินารินความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ลงในหลอดทดสอบ จำนวน 10 หลอด โดยใส่หลอดละ 0.2 มล. นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปรับอุณหภูมิ เติมเอนไซม์ GI ลงไปแต่ละหลอด ใช้เวลาต่างกัน 1 นาที เมื่อครบ 10 หลอด นำมาต้มในอ่างน้ำเดือดทันที เป็นเวลา 3 นาที นำมาเติมสารละลาย DNS และบัฟเฟอร์อย่างละ 0.2 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้ง เป็นเวลา 5 นาที นำขึ้นตั้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 0.7 มล. แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.7.3 ใช้วิธีการเดียวกับ ข้อ 2.7.2 แต่เปลี่ยนลามินาริน เป็นความเข้มข้น 0.5, 0.8, 1.1 และ 1.4 มก./ มล. ตามลำดับ

2.7.4 ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2.7.2 และ 2.7.3 แต่เปลี่ยนเอนไซม์เป็น GII

2.7.5 นำค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละนาทีที่ต่างกันของ GI และ GII หาค่า K_m และ V_{max} ตามวิธีการของ Michaelis mentan

2.8. วิธีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบลักษณะเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนสในยางพารา พันธุ์ RRIM 600 และ พันธุ์ GT1

2.8.1 ใช้น้ำยางสดจากต้นยาง 2 พันธุ์ คือพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ GT1 โดยกำหนดต้นยางเพื่อการทดลองพันธุ์ละ 12 ต้น เริ่มกรีดน้ำยางเวลา 06.30 น. เก็บน้ำยางเวลา 07.30 น. นำน้ำยางที่เก็บได้พันธุ์ละ 150 มล. บรรจุหลอดเพื่อหมุนเหวี่ยงน้ำยางสด โดยใช้เครื่อง UC. แล้วแยกเอาส่วนของ ซี-ซีรั่ม และส่วนของตะกอนก้นหลอด เตรียมเป็นบี-ซีรั่ม สำหรับตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์ต่อไป

2.8.2 ในส่วนของ ซี-ซีรั่ม หมุนเหวี่ยงแยกอีกครั้ง ด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำส่วนใสที่ได้มาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ เปรียบเทียบกันระหว่างสองพันธุ์ยางพารา โดยใช้ซี-ซีรั่มที่เจือจาง 10 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการตรวจสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์

2.8.3 หาค่าความว่องไวของเอนไซม์ในบี-ซีรั่มของยางพาราทั้งสองพันธุ์ เปรียบเทียบกันโดยใช้บี-ซีรั่ม ที่เจือจาง 20 เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการตรวจสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์และศึกษาข้อแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มของยางพาราทั้งสองพันธุ์ โดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอริซิส ในส่วนของบี-ซีรั่มและส่วนที่เป็นสารตัวอย่าง

ซึ่งทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose มาแล้ว (bound CM) โดยใช้ชนิดของ CM cellulose และบัฟเฟอร์ ตามวิธีการเดียวกันกับขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ในข้อ 2.4.1 และเจลที่ใช้เป็นแบบ SDS-PAGE 7-15 % ใช้ส่วนประกอบของเจลตามตารางที่ 4

2.9 การศึกษาผลของอิเทรลต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนส

2.9.1 การกำหนดต้นยางสำหรับการทดลอง

ใช้ต้นยางพารา 2 พันธุ์คือ RRIM 600 และ GT1 อายุประมาณ 20 ปี ที่ศูนย์วิจัยยางคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา กำหนดไว้พันธุ์ละ 12 ต้น เก็บน้ำยางแบบรวมกันทั้ง 12 ต้น เก็บ 3 ครั้งแบบวันเว้นวัน กรีดน้ำยางเวลา 06.30 น. และเก็บน้ำยางเวลา 07.30.น. นำน้ำยางสดยางสองพันธุ์มาผสมน้ำ อัตราส่วน 1:2 แล้วคนในที่เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง UC. แยกเอาส่วนใสมาตรวจสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ เปรียบเทียบปริมาณน้ำยางและค่าความว่องไวของเอนไซม์ของยางทั้งสองพันธุ์

2.9.2 การเตรียมสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล

ใช้อิเทรลความเข้มข้น 10 % โดยผสมกับน้ำมันปาล์มให้มีความเข้มข้น 2.5 % ทาหน้ายางเหนือรอยกรีดเป็นแนวกว้าง 3 นิ้ว ทิ้งไว้ 2 วัน จึงเริ่มเก็บน้ำยางอีก 3 ครั้ง แบบวันเว้นวัน โดยกรีดและเก็บแบบเดียวกับ ข้อ 2.9.1 และใช้วิธีทดสอบหาค่าความว่องไวเอนไซม์แบบเดียวกัน

2.9.3 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์

หลังจากเก็บน้ำยางรวมกันทุกต้น ในกลุ่มของต้นยางประเภทเดียวกันแล้ว กรองน้ำยางด้วยผ้าก๊อซ เติมน้ำกลั่นลงไปให้น้ำยางมีปริมาตรเพิ่มเป็น 2 เท่า คนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเอาส่วนใสด้วยเครื่อง UC ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยอัตราเร็วในการหมุนเหวี่ยง 30,000 rpm เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ได้ หาค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส นำค่าของปริมาณน้ำยาง และค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ เปรียบเทียบกันระหว่างยางสองพันธุ์ และระหว่างก่อนทาหน้ายางด้วยสารเคมีอิเทรลและหลังจากทาหน้ายางด้วยสารเคมีอิเทรลแล้ว

3. ผลการทดลอง

3.1. ผลการเตรียมสารตัวอย่างบี-ซีรั่มในขั้นตอนการปั่นน้ำยางสด

3.1.1. การเก็บน้ำยางสด (rubber latex)

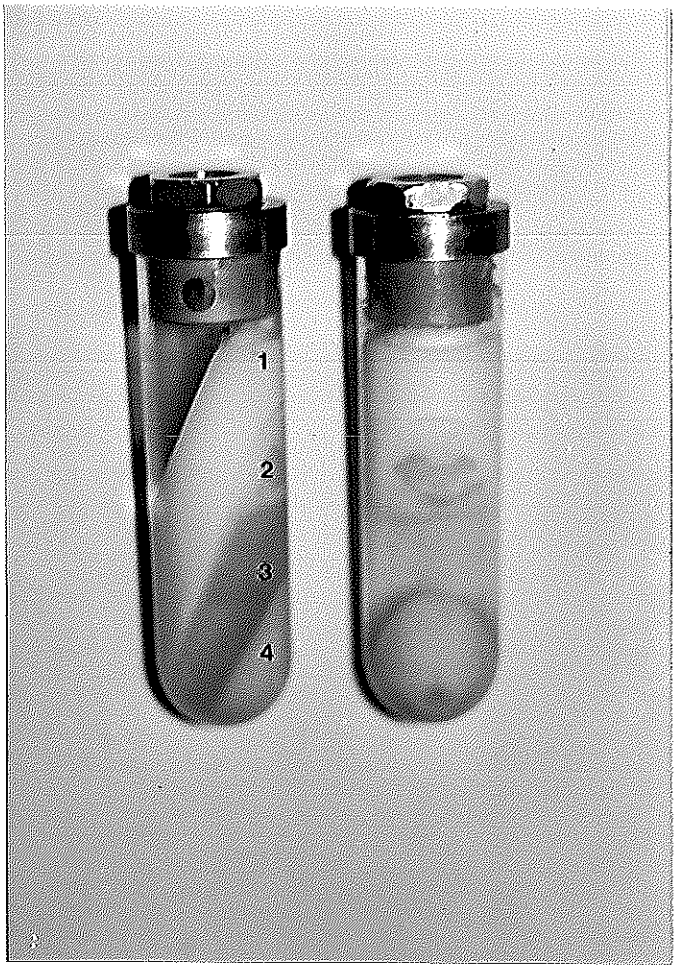
หลังจากเก็บน้ำยางสด โดยวิธีการแช่น้ำแข็งตลอดเวลา เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์ นำมาแยกส่วนด้วยเครื่อง UC น้ำยางสดถูกแยกออกเป็น 4 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 เป็นเนื้อยาง (rubber) มีสีขาวจับกันเป็นก้อนแข็งโดยเฉพาะผิวหน้า แต่ส่วนล่างที่สัมผัสกับสารละลายของส่วนที่ 2 และส่วนที่ 3 ยังมีสภาพเป็นของเหลวและมีความหนืด

ส่วนที่ 2 มีสีเหลืองเกาะกันเป็นก้อน ลักษณะเนื้อนิ่มแบบไขมัน เรียกว่า เฟรวิสลิ่ง (Frey Wyssling particles)

ส่วนที่ 3 เป็นสารละลายใสส่วนบนมีเนื้อยางสีขาวติดอยู่บ้างเรียกว่า ซี-ซีรั่ม (C-serum)

ส่วนที่ 4 เป็นตะกอนก้นหลอด (bottom fraction) ลักษณะนิ่มมีสีเหลืองอ่อนหรือสีครีมหรือสีครีมอมเทา ซึ่งประกอบด้วยออร์แกเนลล์สำคัญเรียกว่า ลูทอยด์ (lutiods) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 6 แสดงผลการปั่นน้ำยางสดด้วยเครื่อง UC

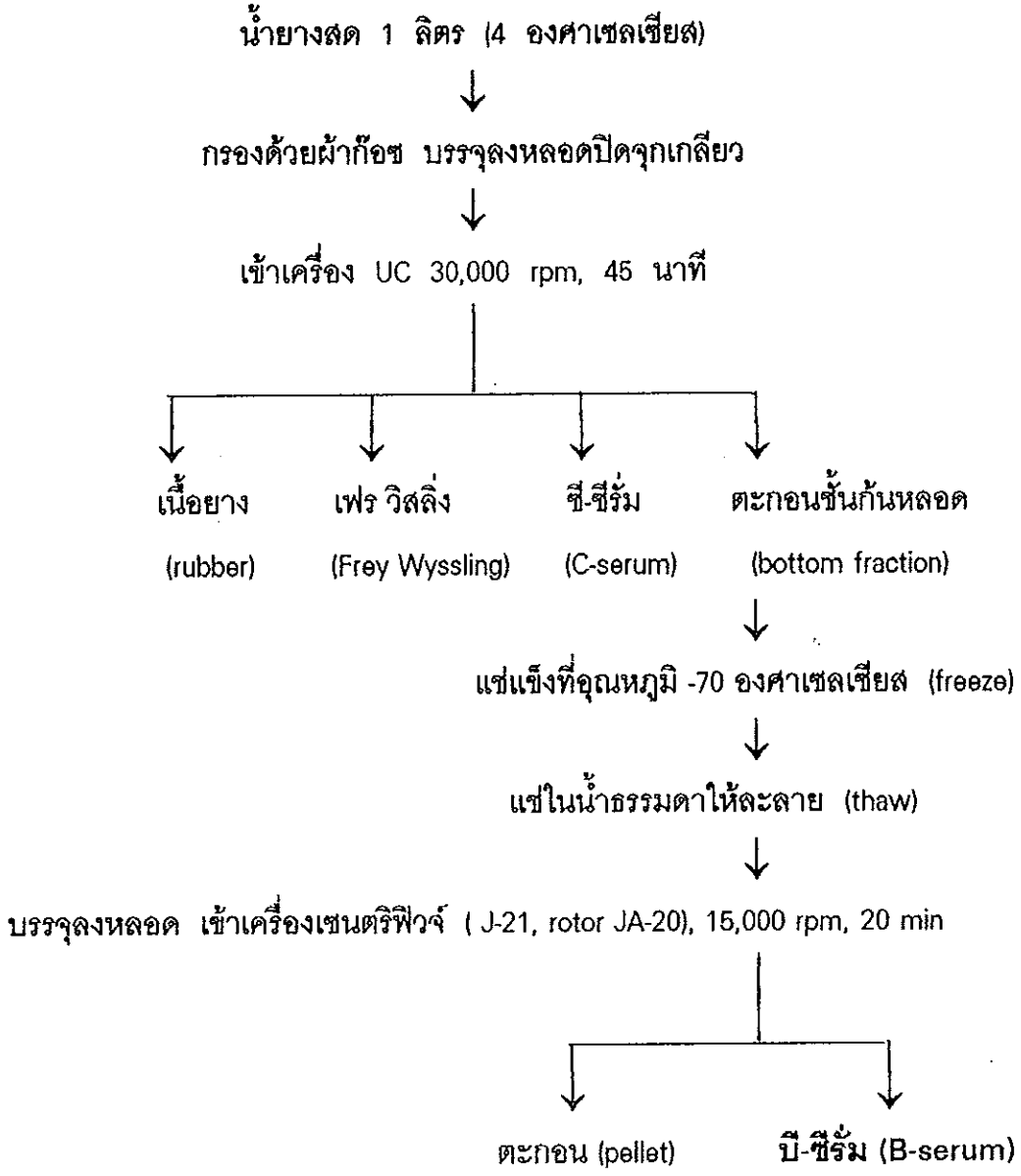
จากรูป หมายเลข 1 คือชั้นเนื้อยาง (rubber)

หมายเลข 2 คือชั้นของเฟร วิสลิ่ง (Frey Wyssling particles)

หมายเลข 3 คือชั้นของซี-ซีรั่ม (C-serum)

หมายเลข 4 คือชั้นของตะกอนก้นหลอด (bottom fraction)

3.1.2. แผนภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมบี-ซีรั่ม



หลังจากเก็บตะกอนก้นหลอดซึ่งมีลูทอยด์ ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นำตะกอนก้นหลอดที่แช่แข็งมาแช่น้ำจนละลาย ทำเช่นนี้สลับกันจนครบ 5 ครั้ง เพื่อให้ลูทอยด์แตก ได้สารละลายใสสีเหลืองเรียกว่า บี-ซีรั่ม ซึ่งเป็นส่วนที่นำไปเตรียมทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสต่อไป

น้ำยางสดจำนวน 1 ลิตร ซึ่งเก็บในฤดูกาลที่ต้นยางมีความสมบูรณ์ที่สุด (healthy) เตรียมบี-ซีรั่มได้ประมาณ 100-125 มล. ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเฉลี่ยเท่ากับ 12-16 ยูนิต/มล.บี-ซีรั่ม หรือเท่ากับ 1,500-2,000 ยูนิต/ลิตรน้ำยางสด ในฤดูกาลที่ยางผลัดใบหรือเพิ่งแตกใบอ่อนใหม่ ๆ หรือต้นยางไม่สมบูรณ์ จะได้บี-ซีรั่มน้อยลงประมาณ 40-50 % นอกจากนี้ บี-ซีรั่ม ในช่วงฤดูร้อนจะได้ปริมาณน้อยและพบว่าจะเกิดสีดำได้ง่ายเมื่อทิ้งไว้ในอากาศที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากมีสารประกอบพวกฟีโนลิกจำนวนมากกว่าปกติ สีและปริมาณของ bottom fraction ของต้นยางพาราแต่ละต้นในพันธุ์เดียวกันแตกต่างกันด้วยคือ ต้นที่ให้น้ำยางน้อยจะมี bottom fraction น้อยมากและมีสีซีดจางมากบางต้นเป็นสีครีมอมเทา ซึ่งตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส พบว่ามีน้อยกว่าปกติประมาณ 40-50 %

บี-ซีรั่ม ซึ่งนำมาทำแห้ง (freeze dry) จะได้ประมาณ 15-20 กรัมต่อการปั่นน้ำยาง 1 ลิตร พบว่า เมื่อนำมาตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์โดยนำบี-ซีรั่มแห้งจำนวน 5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 20 mM โซเดียมอะซีเตต pH 5.0 จำนวน 30 มล. คนให้ละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงเอาเฉพาะส่วนใสด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ได้ปริมาณ 28 มล.จะได้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ 4.0-5.0 ยูนิต/มล. หรือ 600 ยูนิต/20 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งลดลงประมาณ 3 เท่า

สำหรับ bottom fraction ของยางต่างพันธุ์กัน จะมีลักษณะสีต่างกัน เปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ GT1 พบว่าในปริมาตรน้ำยางสด 1 ลิตร เท่ากัน พันธุ์ RRIM 600 ให้ bottom fraction ได้มากกว่าและมีสีเหลืองอ่อนกว่าเล็กน้อย ส่วนพันธุ์ GT1 ให้ปริมาณ bottom fraction น้อยกว่าแต่มีสีเหลืองเข้มกว่า ดังแสดงในรูปที่ 7

(1) (2)

รูปที่ 7 แสดงตะกอนก้นหลอด (bottom fraction) ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ GT1 หลังจากผ่านการแยกด้วยเครื่อง UC อัตราเร็ว 30,000 rpm เป็นเวลา 45 นาที

(1) ตะกอนก้นหลอด ยางพาราพันธุ์ RRIM 600

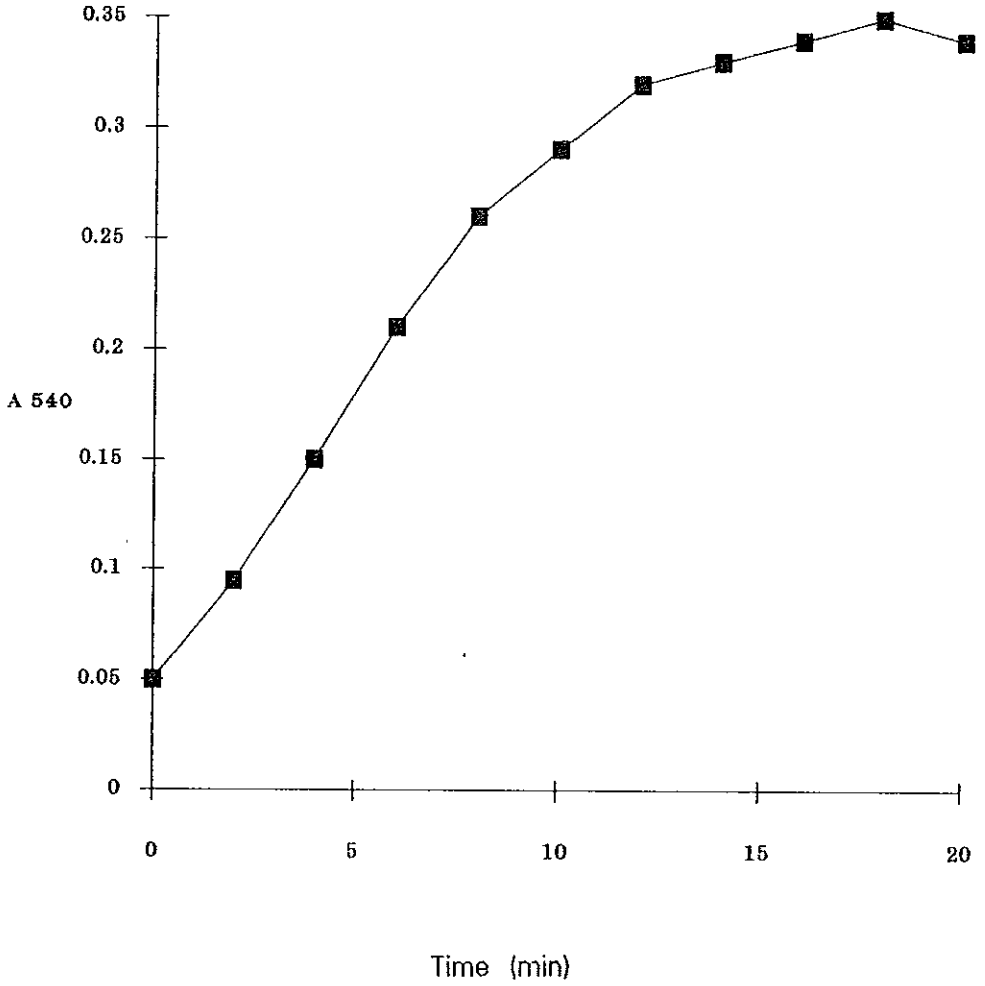
(2) ตะกอนก้นหลอด ยางพาราพันธุ์ GT1

3.2. การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

ความว่องไว (activity) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสใช้วิธีการตรวจวัดโดยดัดแปลงวิธีการของ Bruner (1965). คือใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของ reducing sugar ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS (3,5 dinitrosalicylic acid) กำหนดให้ 1 ยูนิต เท่ากับ 1 ไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคส ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 1 นาที ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตต pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.2.1 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการวัดความเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

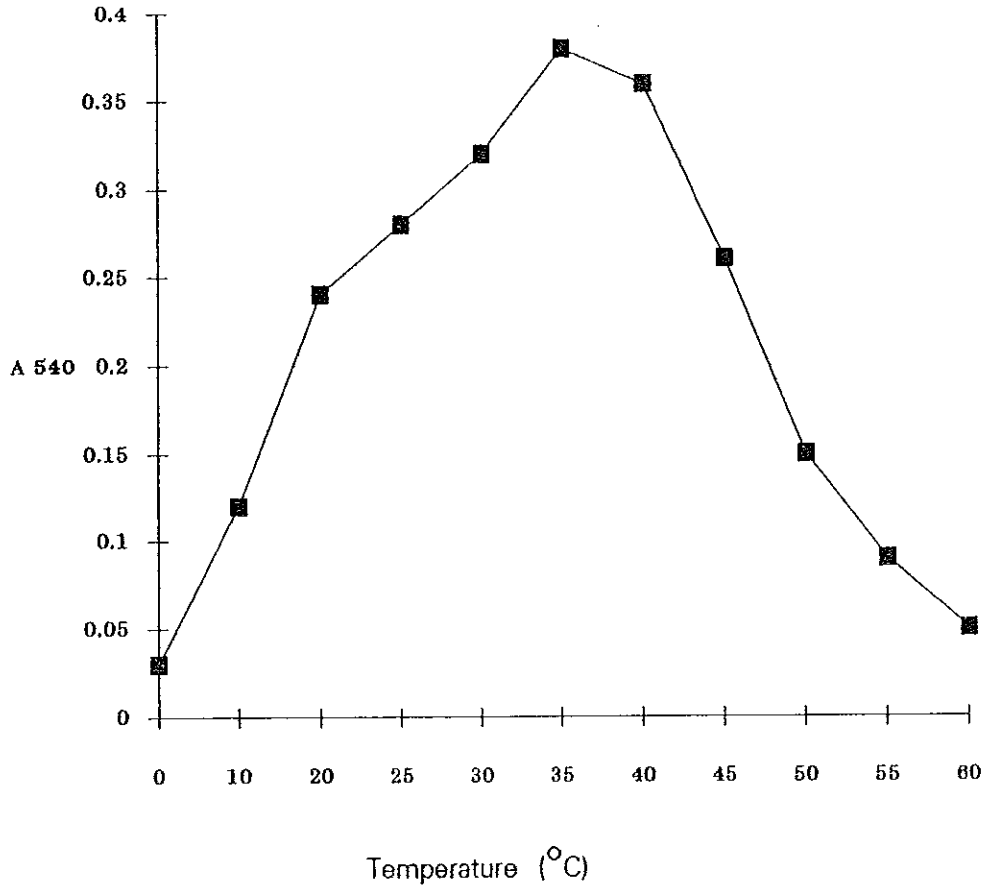
จากการทดสอบ โดยใช้บี-ซีรั่มที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัมใช้สับสเตรตลามินารินซึ่งมีความเข้มข้น 2 มก./มล. กำหนดเวลาหน่วยเป็นนาที พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการหาความเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์มีความว่องไวเริ่มต้น (initial rate) เท่ากับ 10 นาที ดังผลในกราฟรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลของความว่องไวเริ่มต้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม โดยใช้บี-ซีรั่มที่มีปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม อ่านค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่การดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและกำหนดหน่วยเวลาเป็นนาที

3.2.2 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม

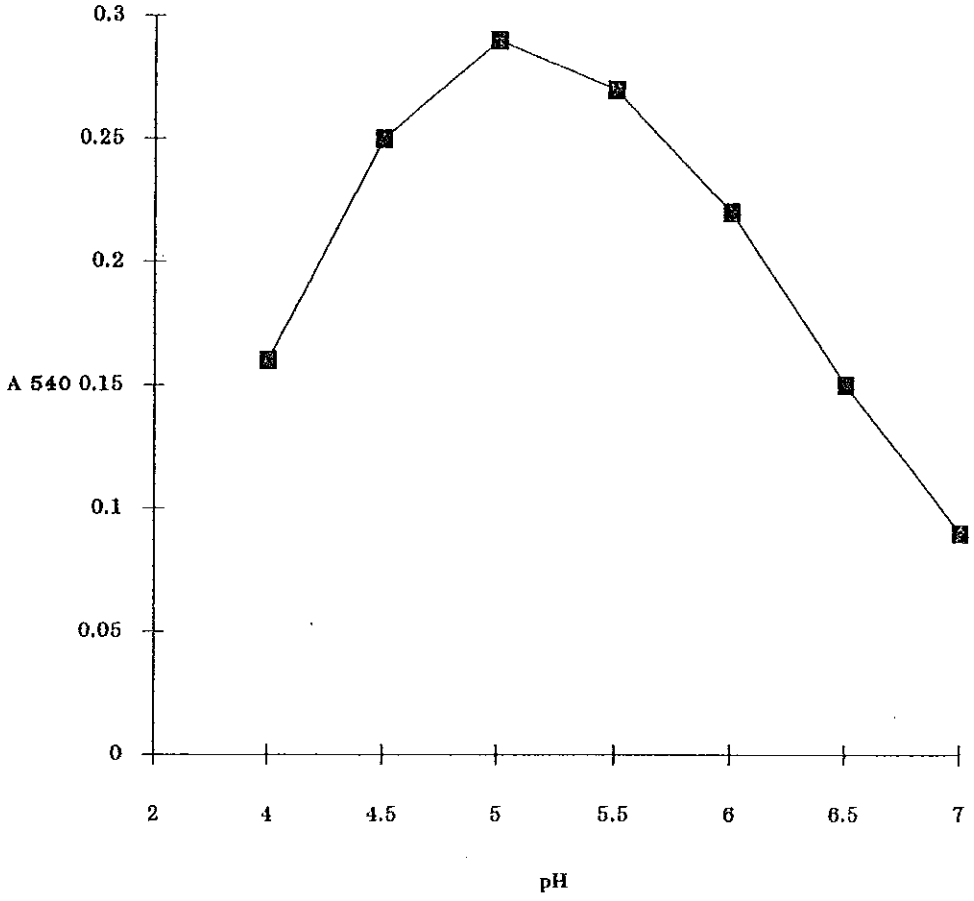
ผลจากการทดสอบความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่ม โดยใช้เวลา 10 นาที และใช้บี-ซีรั่มที่มีโปรตีน 100 ไมโครกรัม ใช้ลามินารินเป็นสับสเตรต ความเข้มข้น 2 มก./มล. อุณหภูมิที่เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส มีความว่องไวสูงสุดเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ดังผลในกราฟรูปที่ 9



รูปที่ 9 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่มกำหนดอุณหภูมิเป็นองศาเซลเซียสและอ่านค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 540 นาโนเมตร

3.2.3 ผลการทดสอบ pH ที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม

ผลจากการทดสอบความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่มที่ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 10 นาที ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ และในยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์ โดยใช้ปริมาณโปรตีนจากบี-ซีรั่มเท่ากับ 100 ไมโครกรัม และใช้ลามินารินความเข้มข้น 2 มก./มล. ค่าความว่องไวสูงสุดที่ pH 5.0 เท่ากันทั้งสองบัฟเฟอร์ ดังผลในกราฟรูปที่ 10



รูปที่ 10 กราฟแสดง pH ที่เหมาะสมกับความว่องไวเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม อ่านค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่การดูดกลืนแสงเท่ากับ 540 นาโนเมตร

3.2.4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม

2 มก./มล. ลามินาริน 90 ไมโครลิตร + เอนไซม์ 10 ไมโครลิตร

ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตต pH 5.0

↓

แช่และเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

↓

ต้มในอ่างน้ำเดือด 2 นาที

↓

เติมสารละลาย DNS 0.2 มล.+ บัฟเฟอร์ 0.2 มล.

↓

ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที

↓

เติมน้ำกลั่น 0.9 มล.

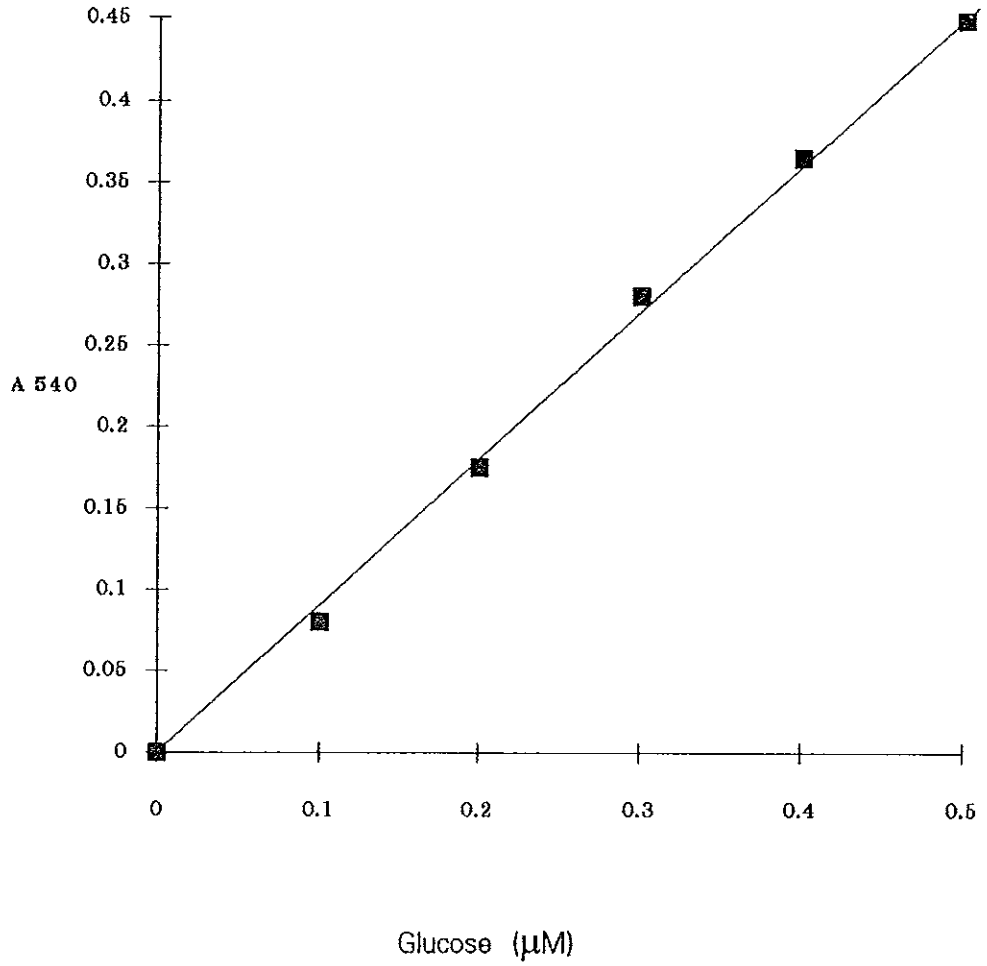
↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.2.5 การคำนวณหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีค่า slope เท่ากับ 0.8920 สามารถคำนวนหาปริมาณน้ำตาลของ unknown ได้จากสูตร

ปริมาณน้ำตาล = A_{540}/slope



รูปที่ 11 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 0.1, 0.2, 0.3,0.4 และ 0.5 ไมโครโมล อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

3.3. ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากส่วนต่าง ๆ ของยางพารา

จากการตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเปรียบเทียบกันในส่วนต่าง ๆ ของยางพาราเพื่อดูการกระจายของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยเปรียบเทียบค่าความว่องไวของสารตัวอย่างเริ่มต้น (clude extract) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสมีทั่วทั้งลำต้นของยางพารา ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในสารตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของยางพารา

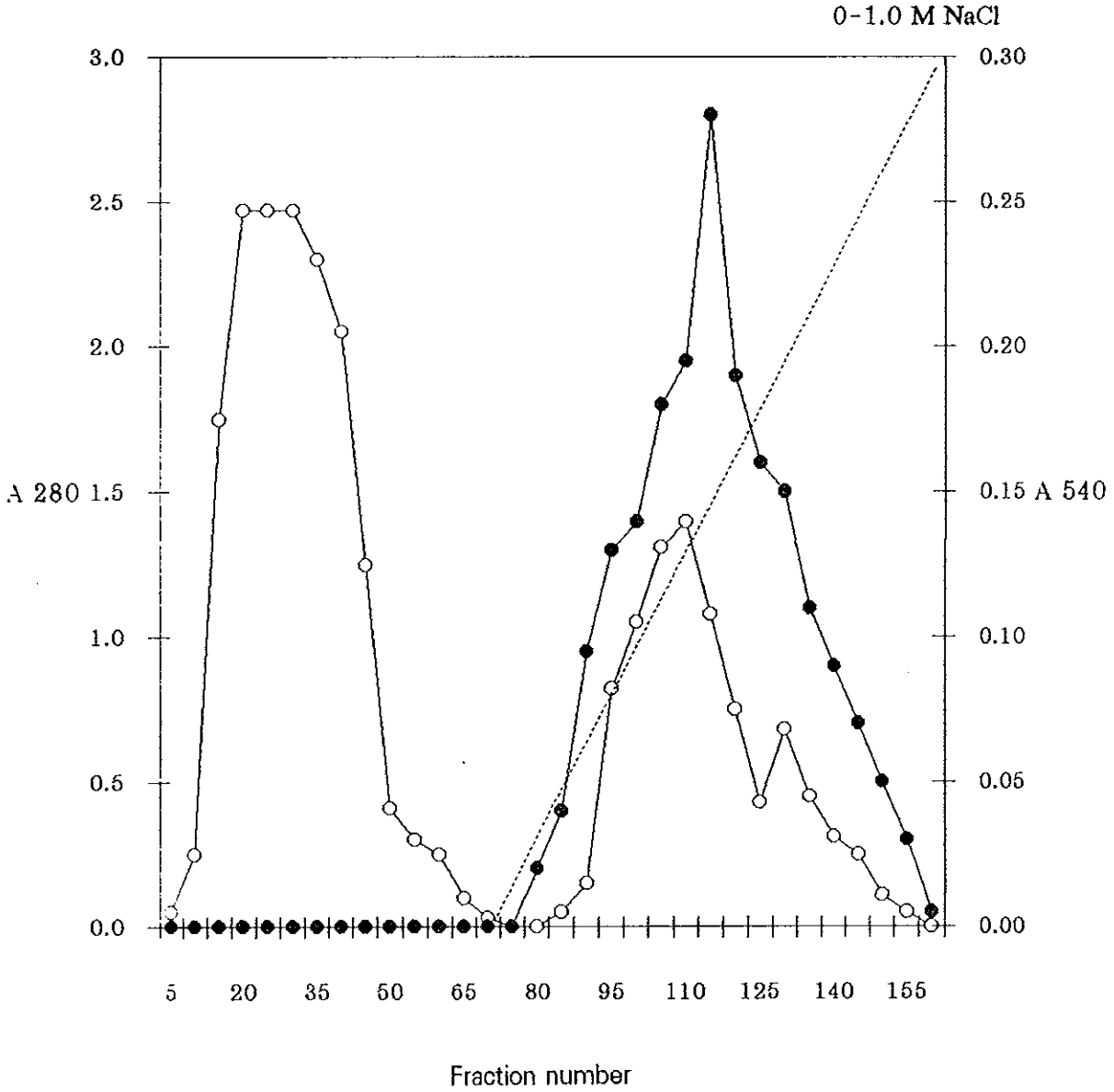
แหล่งสารตัวอย่าง	ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์	
บี-ซีรั่ม	1,500 - 2,000	ยูนิต/ลิตรน้ำยางสด
ซี-ซีรั่ม	1,400 - 1,800	ยูนิต/ลิตรน้ำยางสด
ใบยางอ่อน	6.85 - 8.00	ยูนิต/กรัมน้ำหนักสด
ใบยางแก่	0.77 - 0.90	ยูนิต/กรัมน้ำหนักสด
เปลือกยาง	0.03 - 0.06	ยูนิต/กรัมน้ำหนักสด
รากยาง	0.06 - 0.08	ยูนิต/กรัมน้ำหนักสด

3.4 ผลการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่จากบี-ซีรั่ม

3.4.1 ผลของโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose

จากการใช้บี-ซีรั่มจำนวน 20 มล. มีค่าความว่องไวของเอนไซม์ 231 ยูนิต มีปริมาณโปรตีน 324.8 มก. ทำให้บริสุทธิ์โดยแลกเปลี่ยนประจุกับ CM cellulose ขนาด ของคอลัมน์เท่ากับ 2.5x25 เซนติเมตร หรือปริมาตร 60 มล.ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ให้อัตราเร็วในการไหลเท่ากับ 12 มล./ชั่วโมง เก็บสารตัวอย่างโดยใช้เครื่องเก็บสารแยกส่วน (fraction collector) หลอดละ 1.8 มล. หลังจากใช้บัฟเฟอร์ล้างเอาส่วนที่ไม่แลกเปลี่ยนประจุกับ CM (unbound CM) ออกหมดแล้ว ชะเอาสารตัวอย่างที่แลกเปลี่ยนประจุกับ CM (bound CM) ใช้ 0-1.0 M โซเดียมคลอไรด์ ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 โดยการเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเรื่อย ๆ (gradient) สารตัวอย่างจะถูกชะออกในช่วงที่โซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้น 0.6-1.0 M นำสารตัวอย่างที่ได้แต่ละหลอดหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 540 นาโนเมตรและค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 280 นาโนเมตร ดังกราฟรูปที่ 12

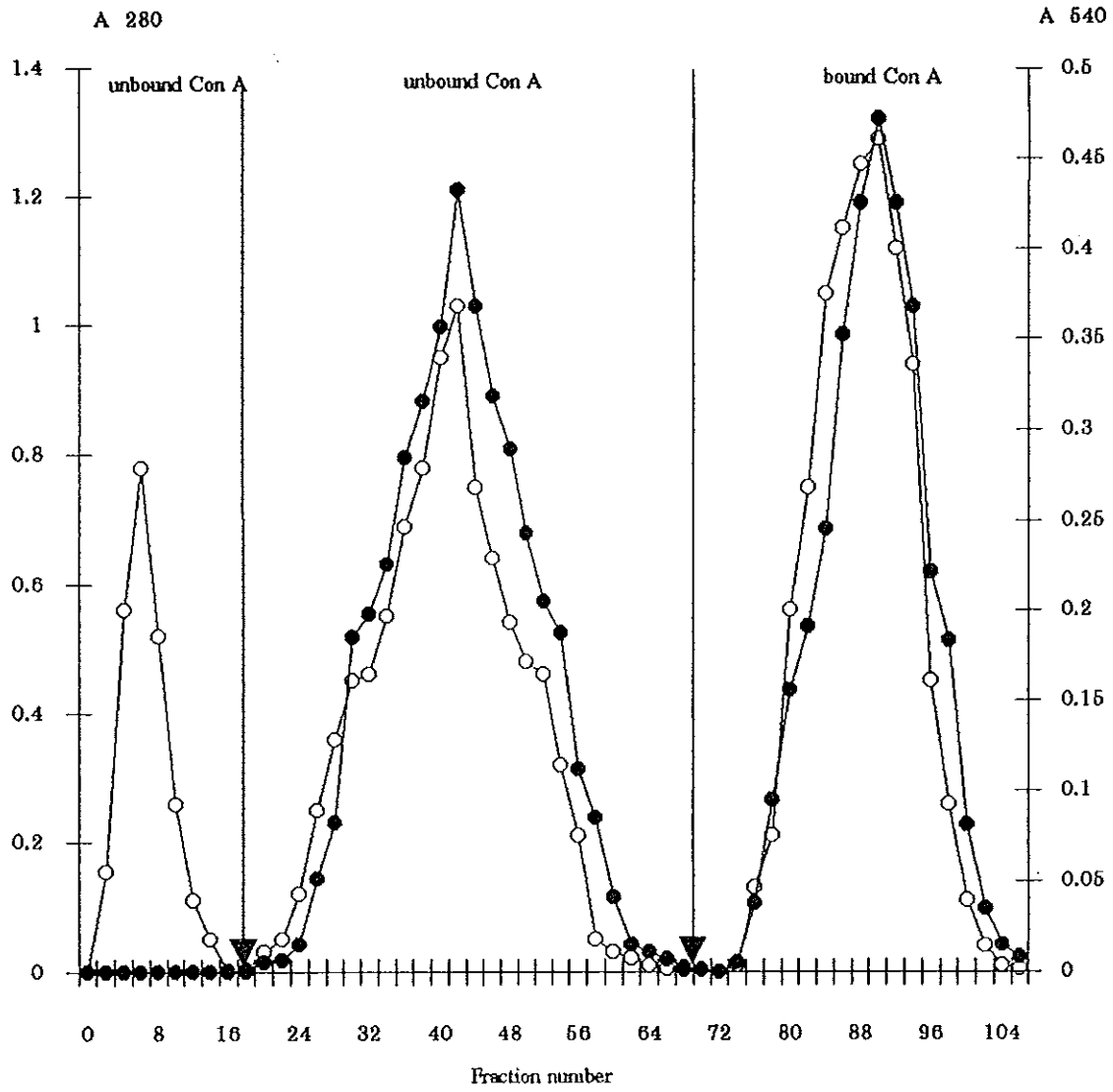
หลังจากรวมสารตัวอย่างจากหลอดที่ 100-160 ได้จำนวนสารตัวอย่างทั้งหมด 150 มล. มีค่าความว่องไวรวม (total activity) ของเอนไซม์เท่ากับ 215.6 ยูนิต มีปริมาณโปรตีน 36.96 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) 5.83 ยูนิต/มก.โปรตีน และได้ปริมาณสุทธิ (yeild) ของเอนไซม์ 93 % ค่าความบริสุทธิ์ (purification fold) ของเอนไซม์เป็น 8.17 เท่า



รูปที่ 12 แสดงผลการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose ขนาดคอลัมน์ 2.5 X 25 cm ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0, (O—O) แสดงปริมาณโปรตีนที่ A_{280} nm peak 1 เป็น unbound CM, peak 2 เป็น bound CM, (●—●) แสดงความว่องไวเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ A_{540} nm ถูกชะออกด้วย 0-1.0 M NaCl

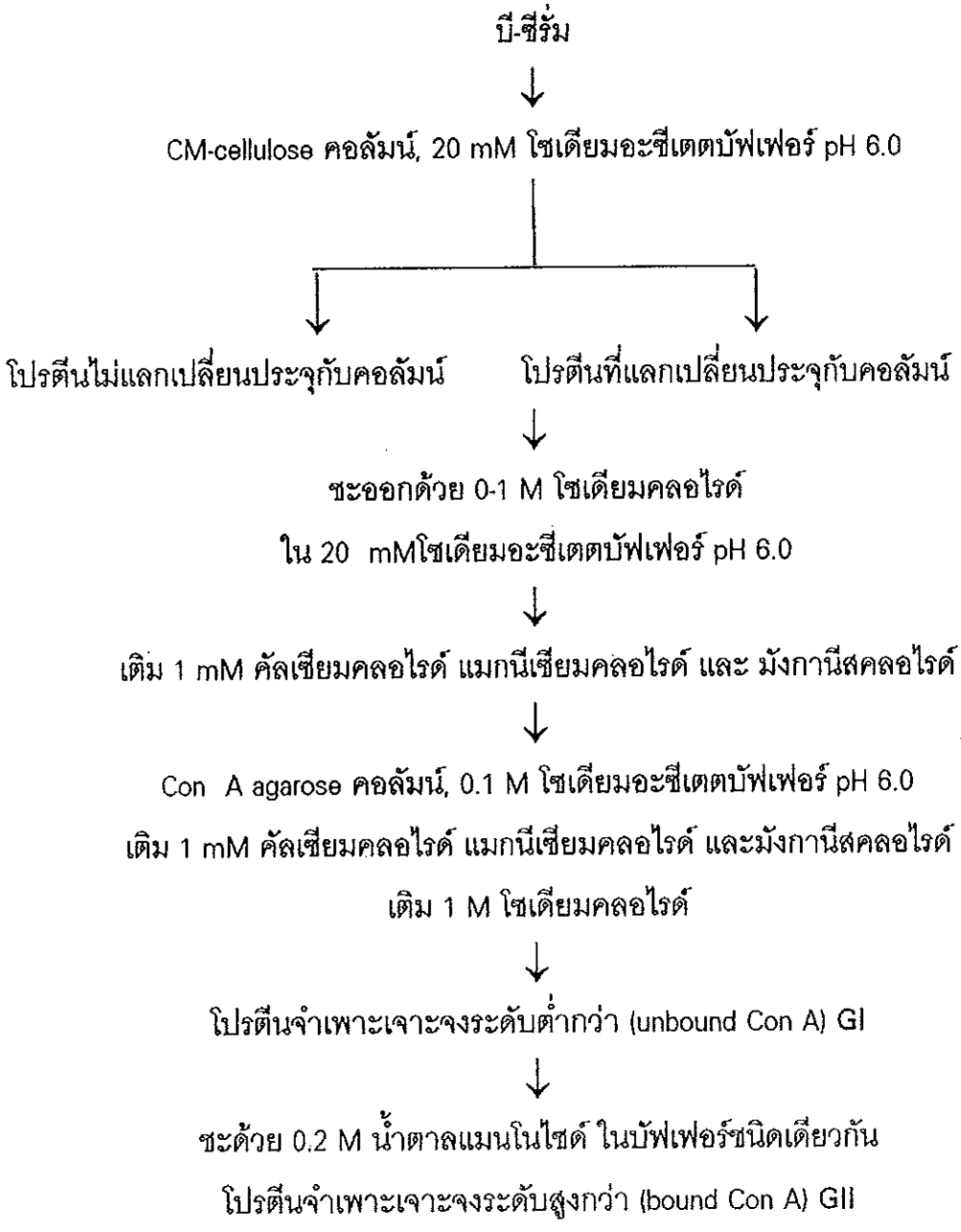
3.4.2 ผลของโครมาโตกราฟฟีแบบจำเพาะจะจงกับ Con A agarose

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ CM-cellulose (bound CM) จำนวน 150 มล. เติมสารละลายคัลเซียมคลอไรด์ มักเนเซียมคลอไรด์ และมังกานีสคลอไรด์ อย่างละ 1 mM เพื่อเพิ่มไอออนในการจับเกาะกับคอลัมน์ ผ่านสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ Con A agarose ขณะที่ผ่านสารตัวอย่างลงคอลัมน์ เก็บสารตัวอย่างในเครื่องเก็บสาร แยกส่วนโดยเก็บหลอดละ 4 มล. โปรตีนที่ไม่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose (unbound Con A) จะถูกล้างออกมาด้วยบัฟเฟอร์ หลังจากผ่านสารตัวอย่างลงคอลัมน์หมด ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 1 M โซเดียมคลอไรด์และ อย่างละ 1 mM คัลเซียมคลอไรด์ มักเนเซียมคลอไรด์ และมังกานีสคลอไรด์ โปรตีนที่ไม่ จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับคอลัมน์จะหลุดออกมาจนหมด ล้างคอลัมน์ต่อไปอีก ประมาณ 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จะมีโปรตีนซึ่งสามารถจับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับ คอลัมน์ในระดับที่น้อยกว่า ซึ่งเป็นสารตัวอย่างของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ที่ 1 (GI) ถูกล้างออกมาใน peak ที่สอง โดยเก็บสารตัวอย่างหลอดละ 2 มล. หลังจากไดอะไลซ์ อะไลซ์ใน 20 mM. โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ได้ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์ 162.75 ยูนิต มีโปรตีนสุทธิ 12.5 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะ 13.02 ยูนิต/มก. ความว่องไว เอนไซม์เท่ากับ 70.2 % ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 18.2 เท่า หลังจากนั้น ทำการ ชะคอลัมน์ ด้วย 0.2 M ของน้ำตาลแมนโนไซด์ และเก็บสารตัวอย่างหลอดละ 1 มล. จะได้โปรตีนที่จับเกาะแบบจำเพาะเจาะจงกับคอลัมน์ในระดับสูงกว่า เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ที่ 2 (GII) ซึ่ง ถูกชะออกมาใน peak ที่สาม มีค่าความว่องไว เอนไซม์รวมเท่ากับ 39.06 ยูนิต มีโปรตีนสุทธิเท่ากับ 4.1 มก. ค่าความว่องไวจำเพาะ ของเอนไซม์เท่ากับ 9.52 ยูนิต/มก. ความว่องไวเอนไซม์เท่ากับ 16.8 % ค่าความบริสุทธิ์ ของเอนไซม์เท่ากับ 13.5 เท่า ดังกราฟ รูปที่ 13 และแสดงปริมาณสุทธิทุกขั้นตอนการทำให้ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ จากบี-ซีรั่ม ดังตารางที่ 6



รูปที่ 13 แสดงการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose โดยใช้คอลัมน์ขนาด 2.5X10 cm ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ + 1 M NaCl+1 mM $CaCl_2$, $MgCl_2$ $MnCl_2$ pH 6.0, (O—O) แสดงปริมาณโปรตีนที่ A_{280} nm ซึ่งใน peak 1 และ 2 เป็น unbound Con A, peak 3 เป็น bound Con A (●—●) แสดงความว่องไวเอนไซม์ที่ A_{540} nm peak 2 แสดงความว่องไวเอนไซม์ (GI), peak 3 เป็นความว่องไวเอนไซม์ (GII) ซึ่งชะออกด้วย 0.2 M แมนโนไซด์

3.4.3 แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากบี-ซีรั่ม

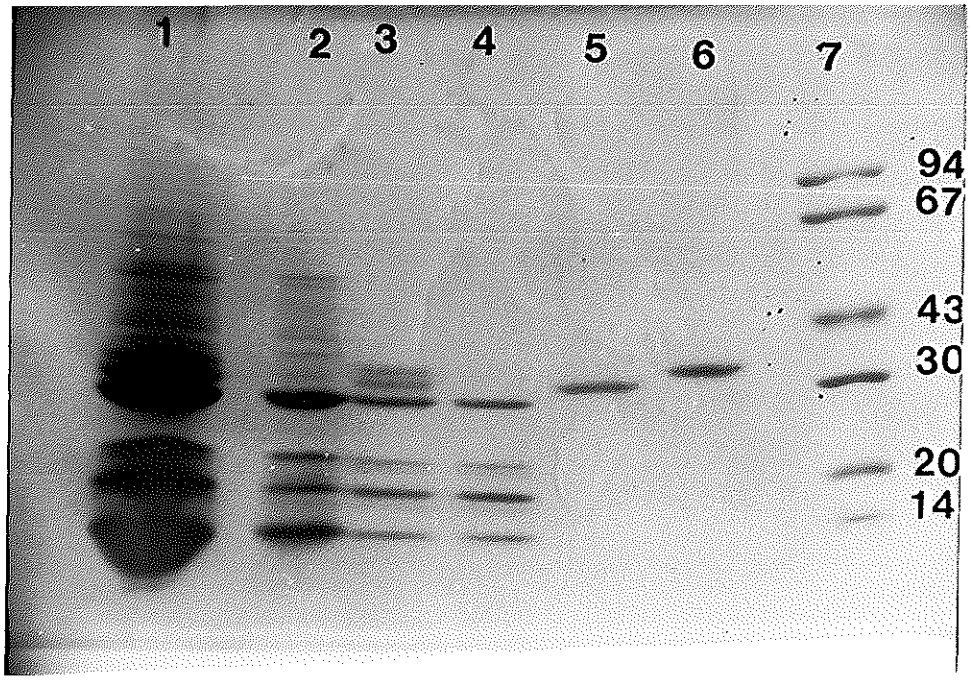


ตารางที่ 6 แสดงปริมาณสุทธิของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์		โปรตีน (มก.)	ความว่องไว (ยูนิต)	ความว่องไวจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)	ปริมาณสุทธิ (%)	ค่าบริสุทธิ์ (เท่า)
B-serum		324.80	231.84	0.713	100.0	-
CM-cellulose		36.94	215.60	5.83	93.0	8.2
Con A agarose	GI	12.50	162.75	13.02	70.2	18.2
	GII	4.10	39.06	9.52	16.8	13.5

3.5 ผลการตรวจสอบค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี SDS-PAGE

จากวิธีการเตรียมเจล 7-15 % ตามส่วนประกอบเจลแบบ SDS-PAGE ในตารางที่ 4 ใช้โปรตีนมาตรฐานดังนี้ คือ phosphorylase M.W.94,000, BSA M.W.67,000, ovalbumin M.W. 45,000, carbonic anhydrase M.W. 30,000, soybean tripsin inhibitor M.W. 20,100 และ α-lactalbumin M.W. 14,400 แถบโปรตีนเปรียบเทียบตั้งแต่สารตัวอย่างเริ่มต้น คือ บี-ซีรั่ม ผ่านวิธีการทำให้บริสุทธิ์ไปเรื่อย ๆ จนได้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII ซึ่งได้เป็นโปรตีนแถบเดียว แสดงแถบโปรตีนต่าง ๆ ในรูปที่ 14



รูปที่ 14 เจลอิเลคโตรฟอริซิส แบบ SDS-PAGE

ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีนจากบี-ซีรั่ม (200 µg)

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีนจาก unbound CM (50 µg)

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนจาก bound CM (30 µg)

ช่องที่ 4 เป็นแถบโปรตีนจาก unbound Con A (30 µg)

ช่องที่ 5 เป็นแถบโปรตีน ของ GI (10 µg)

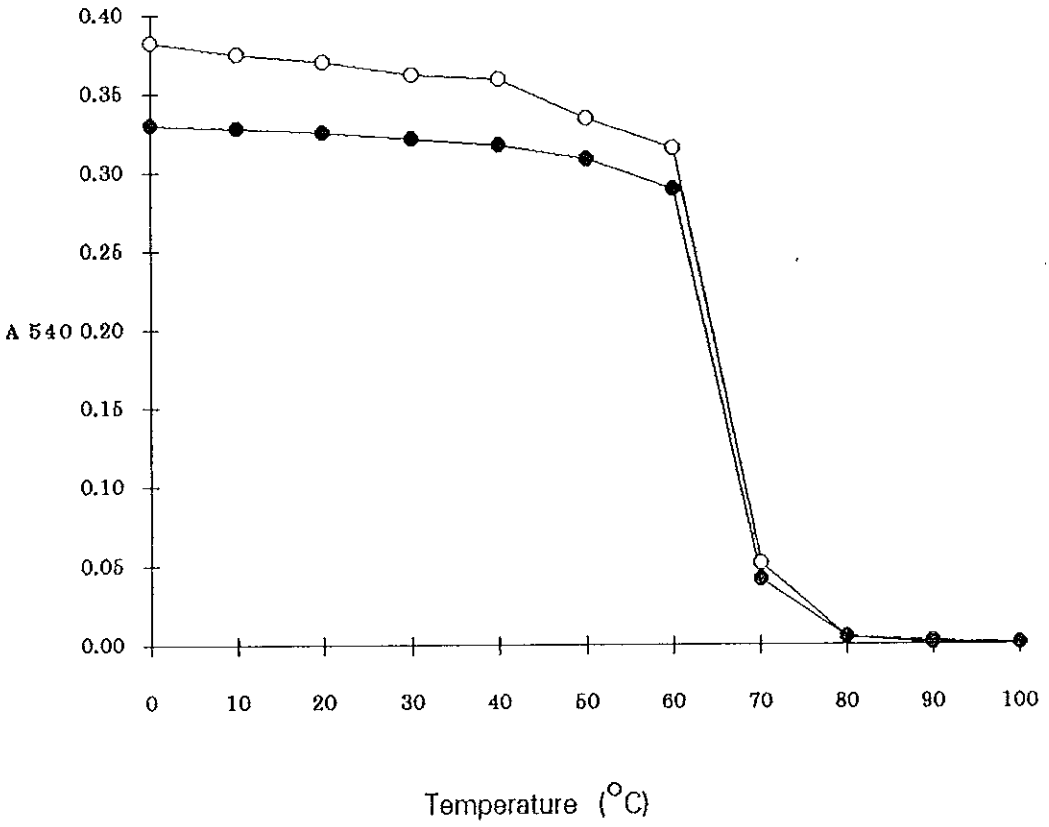
ช่องที่ 6 เป็นแถบโปรตีน ของ GII (10 µg)

ช่องที่ 7 เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน

3.6 ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม

3.6.1 ผลการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์

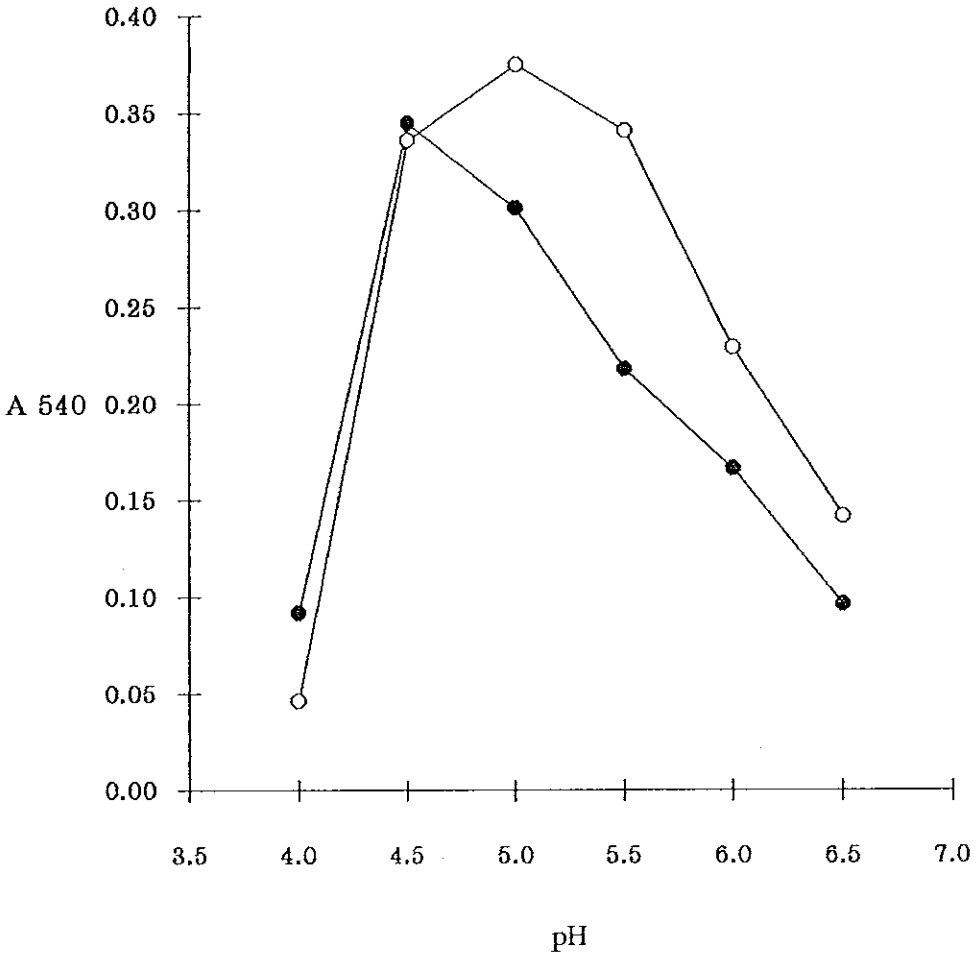
จากการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ (heat stability) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้งสองไอโซไซม์คือ GI และ GII สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูง 60 องศาเซลเซียส เท่ากันทั้งสองไอโซไซม์ แสดงค่าความว่องไวจากกราฟรูปที่ 15 เมื่อใช้เอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม ต่อการทดสอบแต่ละปฏิกิริยา



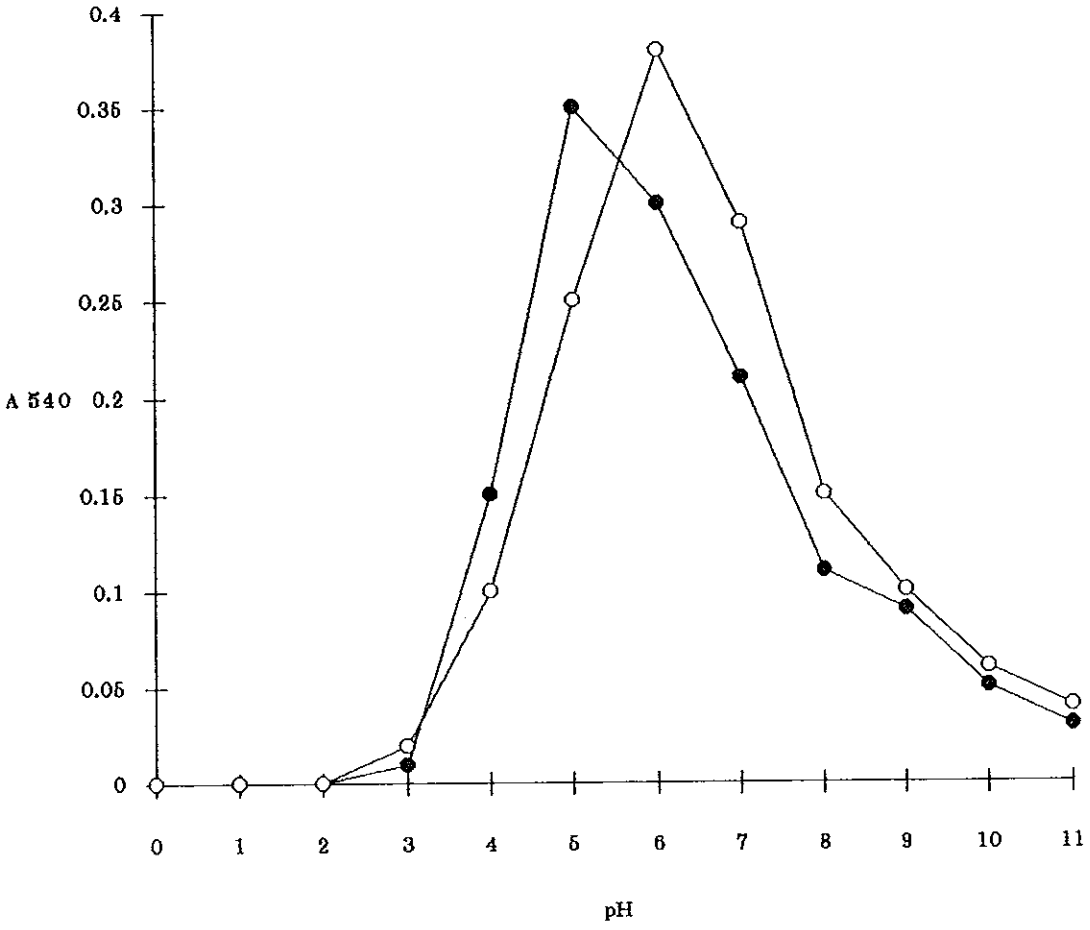
รูปที่ 15 กราฟแสดงความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GI (●—●) และ GII (O—O)

3.6.2 ผลของ pH ที่มีต่อความว่องไวของเอนไซม์ (pH optimum)

pH ที่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ทั้งสองไอโซไซม์ต่างกันเล็กน้อยคือ GI มีความว่องไวดีที่สุดที่ pH 4.5 GII มีความว่องไวดีที่สุดที่ pH 5.0 เมื่อใช้โซเดียมอะซีเตตเป็นบัฟเฟอร์ แต่ถ้าใช้ยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์จะทำให้ความว่องไวทั้งสองไอโซไซม์ดีที่สุดที่ pH 5.0 และ pH 6.0 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลทำนองเดียวกันคือไอโซไซม์ GI มีความว่องไวใน pH ที่ต่ำกว่า ไอโซไซม์ GII ดังแสดงในกราฟรูปที่ 16 และ รูปที่ 17 ตามลำดับ



รูปที่ 16 กราฟแสดงค่าความว่องไวที่ pH ต่าง ๆ ใน 0.1 M. โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม์ GI (●—●) และ GII (O—O)



รูปที่ 17 กราฟแสดงค่าความว่องไวที่ pH ต่าง ๆ โดยใช้ยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไอโซไซม GI (●—●) และ GII (O—O)

3.6.3 ผลการทดสอบกับ p-nitrophenyl-β-D-glucoside

ใช้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสย่อยสลายสับสเตรต p-nitrophenyl-β-D-glucoside ซึ่งเป็น p-nitrophenol ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็น derivative เพื่อทดสอบว่าเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอ็กโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสหรือเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสจากตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสง ที่ 420 nm เป็นการตรวจสอบสารสีเหลืองของ p-nitrophenol ซึ่งจะให้สีเหลืองเมื่ออยู่ในสารละลายเบส ในที่นี้ใช้ 0.3 M.โซเดียมคาร์บอเนต แต่ผลการทดลองเป็นลบแสดงว่าทั้ง GI และ GII มีคุณสมบัติเป็นชนิดเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส (endo-β-1,3-glucanase) ถึงแม้ว่าจะใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 2.5 เท่า ตารางที่ 7 ผลการทดลองเปรียบเทียบกันเมื่อใช้ p-nitrophenyl-β-D-glucoside และ laminarin เป็นสับสเตรตอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรและ 540 นาโนเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 7 แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์ ทั้งสองไอโซไซม์คือ GI และ GII เมื่อใช้ p-nitrophenyl-β-D-glucoside และ laminarin เป็นสับสเตรต ตามลำดับ

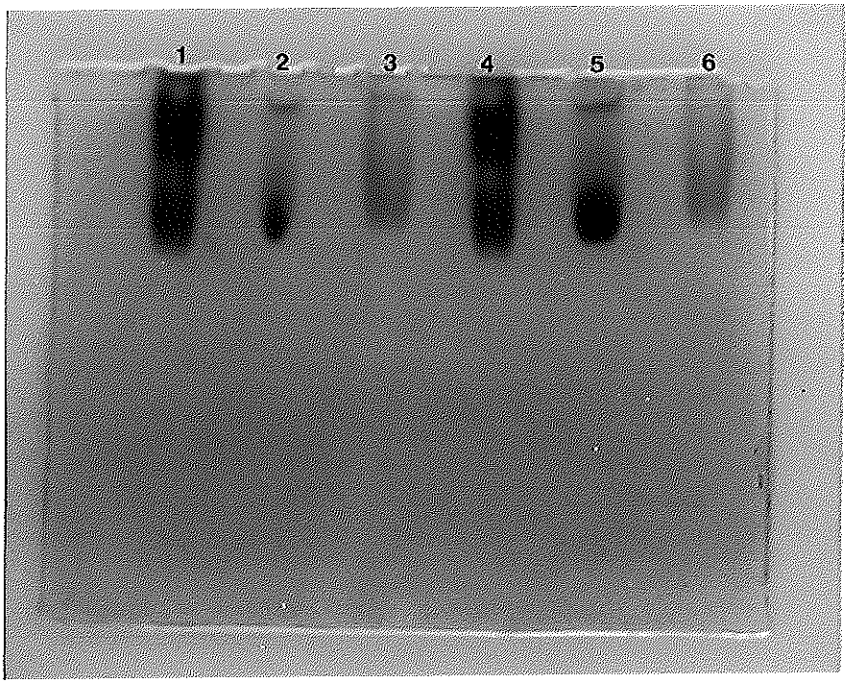
โปรตีนสารตัวอย่าง	A_{420}	A_{540}
B-serum dil 1:20	0.30	0.116
unbound CM dil 1:10	0.45	0.003
bound CM dil 1:4	0.06	0.102
GI (โปรตีน 20 ไมโครกรัม)	0.01	0.332
GII (โปรตีน 20 ไมโครกรัม)	0.01	0.326
GI (โปรตีน 50 ไมโครกรัม)	0.01	0.723
GII (โปรตีน 50 ไมโครกรัม)	0.01	0.698

3.6.4 ผลการย้อมสีแสดงลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ (stain activity)

3.6.4.1 แยกแถบโปรตีนโดยใช้ 4 % ND-PAGE และใช้กระแสไฟฟ้าแบบกลับขั้ว เนื่องจากอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ ที่ pH 8.3 ซึ่งใช้ในการแยกแถบโปรตีนด้วยวิธีเจลอิเลคโตรฟอริซีสนั้น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้ง 2 ไอโซไซม์ ยังเป็นประจุบวกอยู่ โปรตีนดังกล่าว จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ จากขั้วลบไปยังขั้วบวกเหมือนกับการแยกแถบโปรตีนทั่วไปซึ่งมีค่า pI ต่ำกว่า 8.3

จากการทดลองใช้สารตัวอย่าง 3 ชนิด คือบี-ซีรั่ม, GI และ GII ย้อมโปรตีนเปรียบเทียบกัน 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ย้อมด้วยสีย้อม Coomassie brilliant blue R 250 และแบบที่ 2 ย้อมด้วย 1 % laminarin + 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride ดังแสดงในรูปที่ 18 และ รูปที่ 19 ตามลำดับ

จากรูปที่ 18 จะเห็นว่าแถบโปรตีนของบี-ซีรั่มในช่องที่ 1 ย้อม ติดสีน้ำเงิน ถึง 3 แถบ ในขณะที่ รูปที่ 19 ย้อมติดสีแดงอมส้มเพียงแถบเดียว ในช่องที่ 2 และ 3 ของรูปที่ 18 ย้อมติดสีน้ำเงินช่องละ 1 แถบ ซึ่งตรงกับตำแหน่งของแถบสีแดงอมส้มในช่องที่ 2 และ 3 ของรูปที่ 19



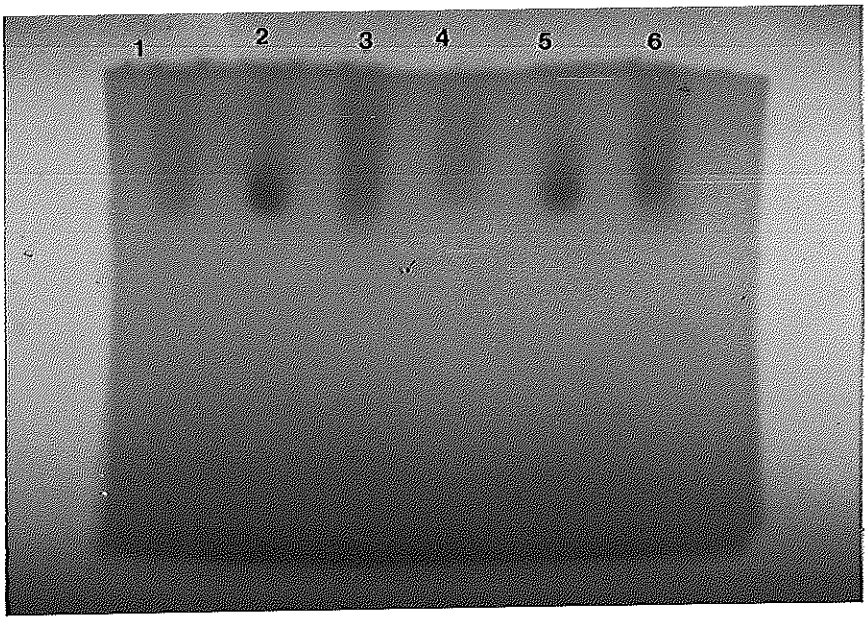
รูปที่ 18 แสดงแถบโปรตีนที่ย้อมด้วย สีย้อมโปรตีนชนิด Coomassie brilliant blue R 250

ช่องที่ 1 โปรตีนจาก บี-ซีรั่ม

ช่องที่ 2 โปรตีนจาก GI

ช่องที่ 3 โปรตีนจาก GII

ช่องที่ 4,5, และ 6 ใช้สารตัวอย่างทำนองเดียวกับช่องที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 19 แสดงแถบโปรตีน ที่ย้อมด้วยสีย้อมเอนไซม์ (stain activity) 1 % laminarin + 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride

ช่องที่ 1 แถบโปรตีนจาก บี-ซีรั่ม

ช่องที่ 2 แถบโปรตีนจาก GI

ช่องที่ 3 แถบโปรตีนจาก GII

ช่องที่ 4, 5, และ 6 ใช้สารตัวอย่างทำนองเดียวกับช่องที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

3.6.4.2 แผนภาพแสดงการย้อมแอคติวิตี ของเอนไซม์ใน PAGE 4 % pH 8.3

การแยกแถบโปรตีนใน PAGE ใช้กระแสไฟฟ้าแบบกลับขั้ว เนื่องจากในอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 สารโปรตีนตัวอย่างมีประจุเป็นบวกจึงไม่เคลื่อนที่เหมือนโปรตีนอื่น ๆ ที่เคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก ตามวิธีการเดียวกันและสภาพแวดล้อมเดียวกัน การเกิดแถบสี (stain activity) เกิดขึ้นภายในช่วงเวลา 1-2 นาทีเท่านั้น หลังจากนั้นสีดังกล่าวค่อย ๆ จางหายไป

PAGE 4 % pH 8.3 โปรตีนบี-ซีรั่ม, GI, และ GII

ผ่านกระแสไฟฟ้ากลับขั้ว 18 mA. 250 V. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

↓

นำแผ่นเจลล้างน้ำกลั่น

↓

แช่แผ่นเจลใน 50 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นเวลา 5 นาที

↓

แช่แผ่นเจลใน 1% ลามินาริน ใน 50 mM โซเดียมอะซีเตต pH 5.0

ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 นาที

↓

แช่แผ่นเจลในสารละลาย เมธานอล/กรดอะซีติก/น้ำกลั่น อัตราส่วน 5:2:5

เป็นเวลา 10 นาที

↓

แช่แผ่นเจลใน 0.3 กรัม 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride

ละลายใน 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 200 มล. ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ

80 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที

↓

เกิดแถบสีแดงอมส้มที่แถบโปรตีนเอนไซม์

หลังจากนั้นแช่เจลไว้ใน 3 % กลีเซอรอล + 4 %เมธานอล + 10 % กรดอะซีติก

3.6.5 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

3.6.5.1 โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น

จากตารางที่ 8 น้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส GI เท่ากับ 29500 ดาลตัน หรือเท่ากับ 29.5 กิโลดาลตัน ส่วน GII น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 33100 ดาลตัน หรือ 33.1 กิโลดาลตัน จากการหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น ซึ่งใช้คอลัมน์ Biogel P-150 ขนาด 1.5x55 เซนติเมตร (ประมาณ 90 มล.)ใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 หาค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยใช้สูตร $K = V_e - V_o/V_i = V_e - V_o/V_t - V_o$

เมื่อกำหนดให้ K = สัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตร

V_e = ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะสารตัวอย่างออกมาจากคอลัมน์

V_o = ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะ 1% ของบลูเดกซ์แตรน (blue dextran) มีค่าเท่ากับ 23.5 มล.

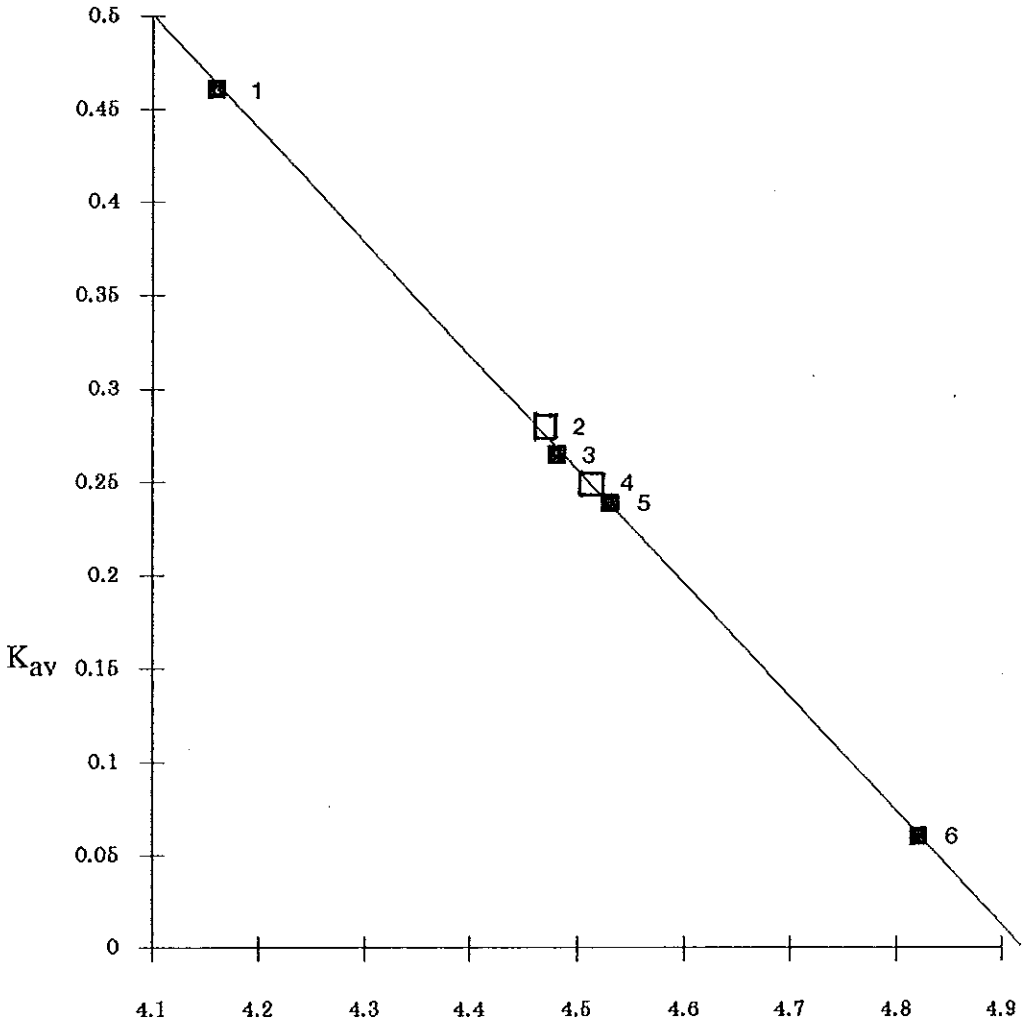
V_t = ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะ 1% ของโปตัสเซียมไดโครเมต (potassium dicromate) มีค่าเท่ากับ 90.5 มล.

$V_i = V_t - V_o$

คำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลของ GI ได้เท่ากับ 29.5 กิโลดาลตัน ค่าน้ำหนักโมเลกุลของ GII ได้เท่ากับ 33.1 กิโลดาลตัน ดังแสดงในกราฟรูปที่ 20

ตารางที่ 8 แสดงปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะ (V_e) เอาสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานที่ใช้

สารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์	M.W.	log M.W.	V_e (ml)	K
BSA	67000	4.82	27.50	0.060
pepsin	34000	4.53	39.50	0.239
carbonic anhydrase	30000	4.48	41.20	0.265
α-lactalbumin	14400	4.16	54.40	0.461
GI	29500	-	41.8	0.273
GII	33100	-	39.8	0.243



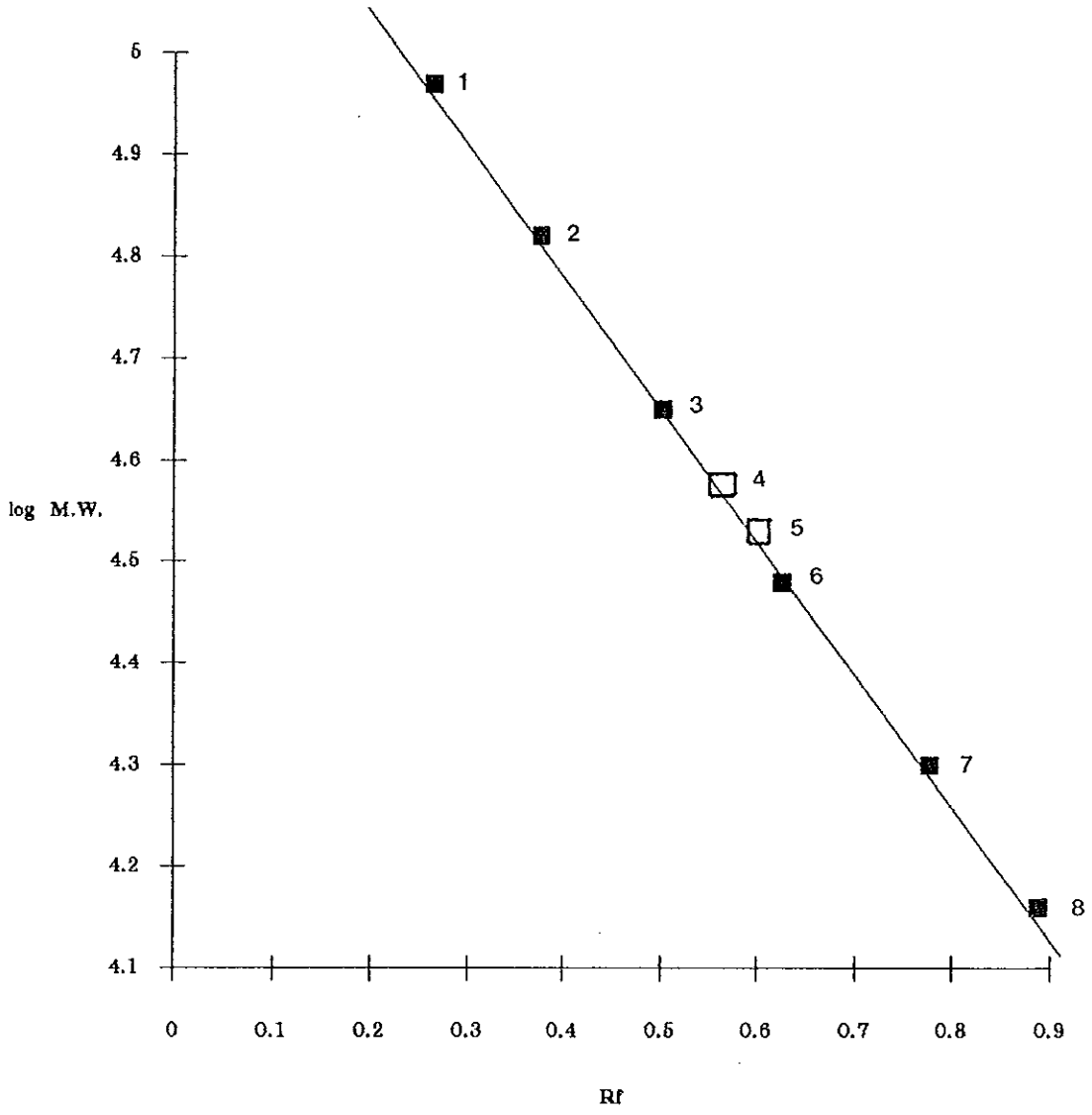
รูปที่ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log molecular weight กับค่า K ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนส GI, GII โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นใน คอลัมน์ Biogel P-150 ในโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 แต่ละจุดคือ α-lactalbumin (1), GI (2), carbonic anhydrase (3), GII (4), pepsin (5) และ BSA (6)

3.6.5.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยประมาณด้วยวิธี SDS-PAGE

จากตารางที่ 9 แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้จาก บี-ซีรั่ม โดยวิธี SDS-PAGE ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของ GI เท่ากับ 31.6 กิโลดาลตัน และ GII เท่ากับ 34.7 กิโลดาลตัน ดังแสดงในกราฟรูปที่ 21

ตารางที่ 9 แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของ GI และ GII เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี SDS-PAGE

ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ไป(cm)		ค่า Rf	M.W.	log M.W.
dye	6.8			
α-lactalbumin	6.10	0.897	14400	4.16
soybean tripsin inhibitor	5.27	0.776	20100	4.30
carbonic anhydrase	4.25	0.635	30000	4.48
ovalbumin	3.4	0.50	45000	4.65
bovine serum albumin	2.55	0.375	67000	4.82
phosphorylase	1.80	0.264	94000	4.97
GI	4.28	0.617	31600	-
GII	4.10	0.602	34700	-



รูปที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log molegular weight และ ค่า Rf จากการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE แต่ละจุดคือ phosphorelase(1), BSA (2), ovalbumin (3), GII (4), GI (5), carbonic anhydrase (6),soybean trisin inhibitor (7) และ α-lactoalbumin (8)

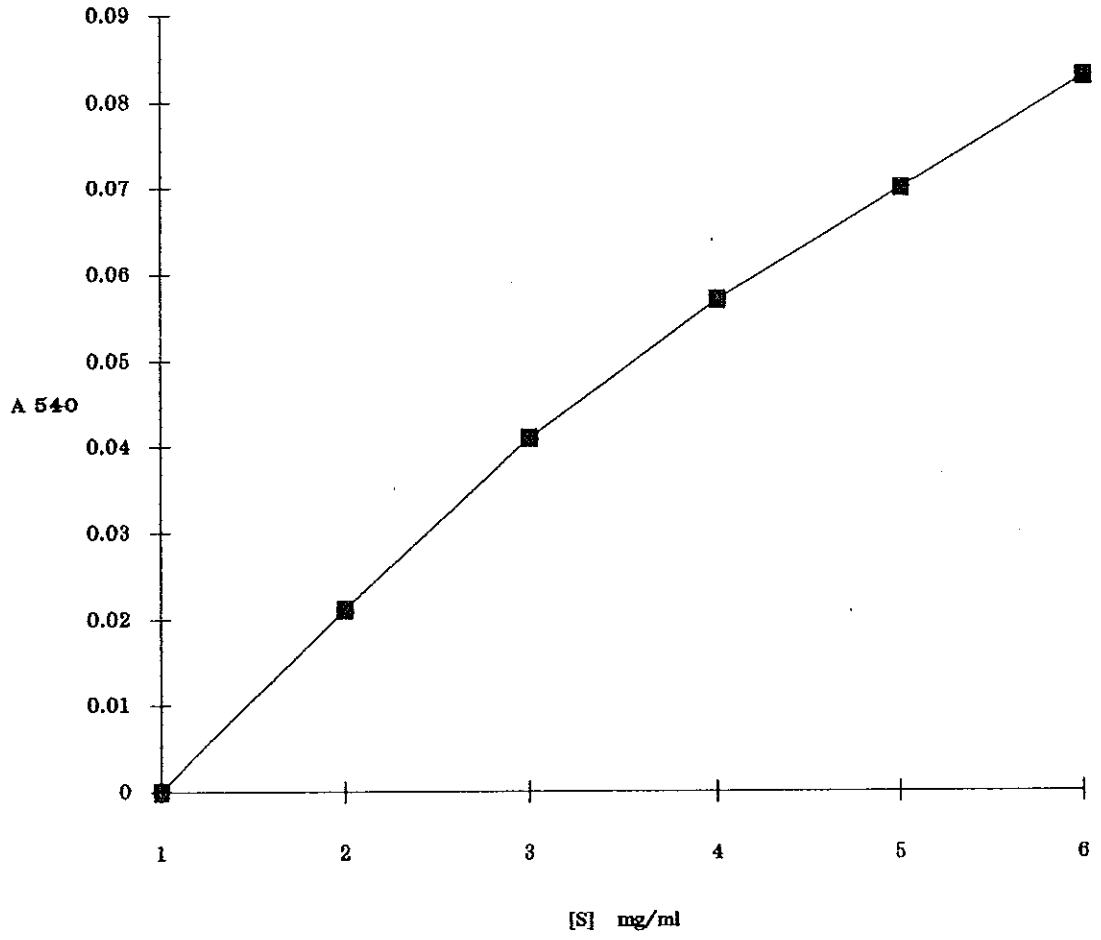
3.7 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่ม

3.7.1 ค่า K_m และ ค่า V_{max} ของ GI

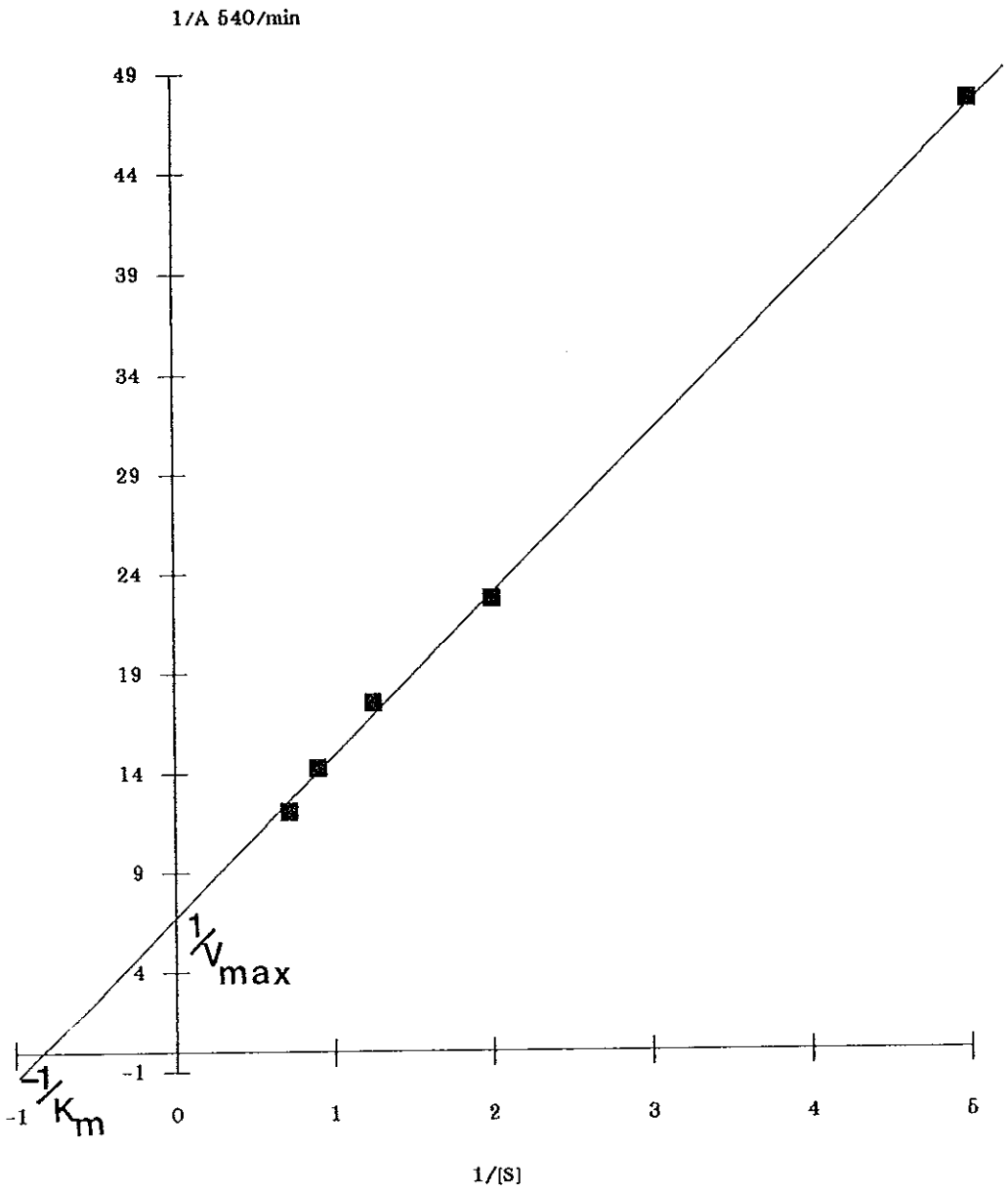
จากการศึกษา อัตราเร็วของปฏิริยา (V) ของทั้งสองไอโซไซม์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของลามินารินแตกต่างกัน ระหว่าง 0.2-1.4 มก./มล. ผลการหาค่าความว่องไว แสดงในตารางที่ 10 โดยแต่ละปฏิกิริยาใช้เอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10 ไมโครกรัม ค่า K_m ของ GI เท่ากับ 1.25 มก./มล. และค่า V_{max} เท่ากับ 0.153 $A_{540/min}$

ตารางที่ 10 แสดงค่าความว่องไวเอนไซม์ GI ใช้สับสเตรตลามินารินความเข้มข้นต่างกัน

ปริมาณสารตั้งต้น มก./มล.	1/[S]	$A_{.540/min}$	1/ $A_{.540/min}$
1.4	0.714	0.083	12.04
1.1	0.900	0.070	14.28
0.8	1.250	0.057	17.54
0.5	2.000	0.041	22.72
0.2	5.000	0.021	47.60



รูปที่ 22 กราฟแสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์ GI เมื่อใช้สับสเตรตความเข้มข้นต่างกัน



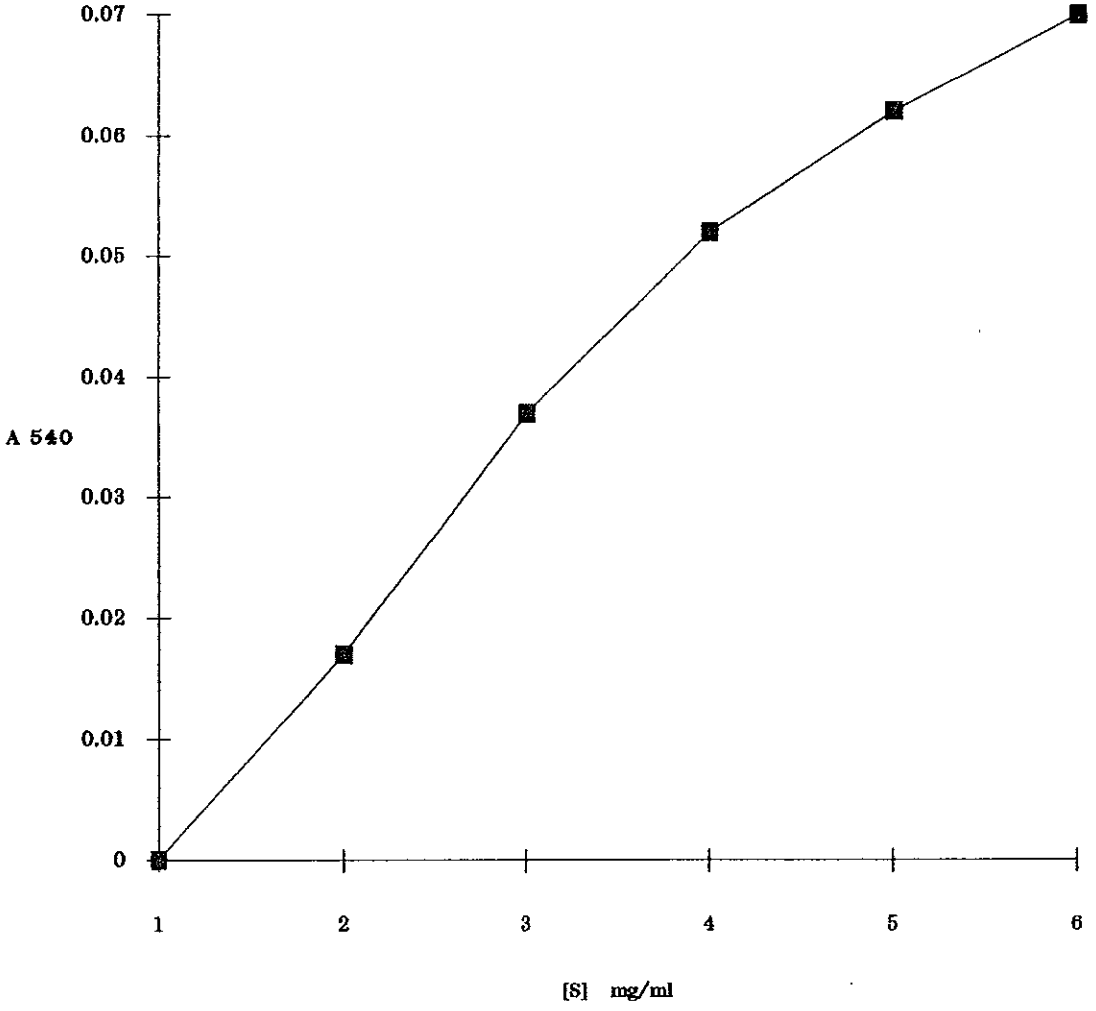
รูปที่ 23 กราฟแสดงการหาค่า K_m และ V_{max} ของ GI
จากกราฟ $-1/K_m$ เท่ากับ 0.8, ค่า K_m เท่ากับ 1.25 มก./มล.
$1/V_{max}$ เท่ากับ 6.5, V_{max} เท่ากับ 0.153 $A_{540/min}$

3.7.2 ค่า K_m และ V_{max} ของ GII

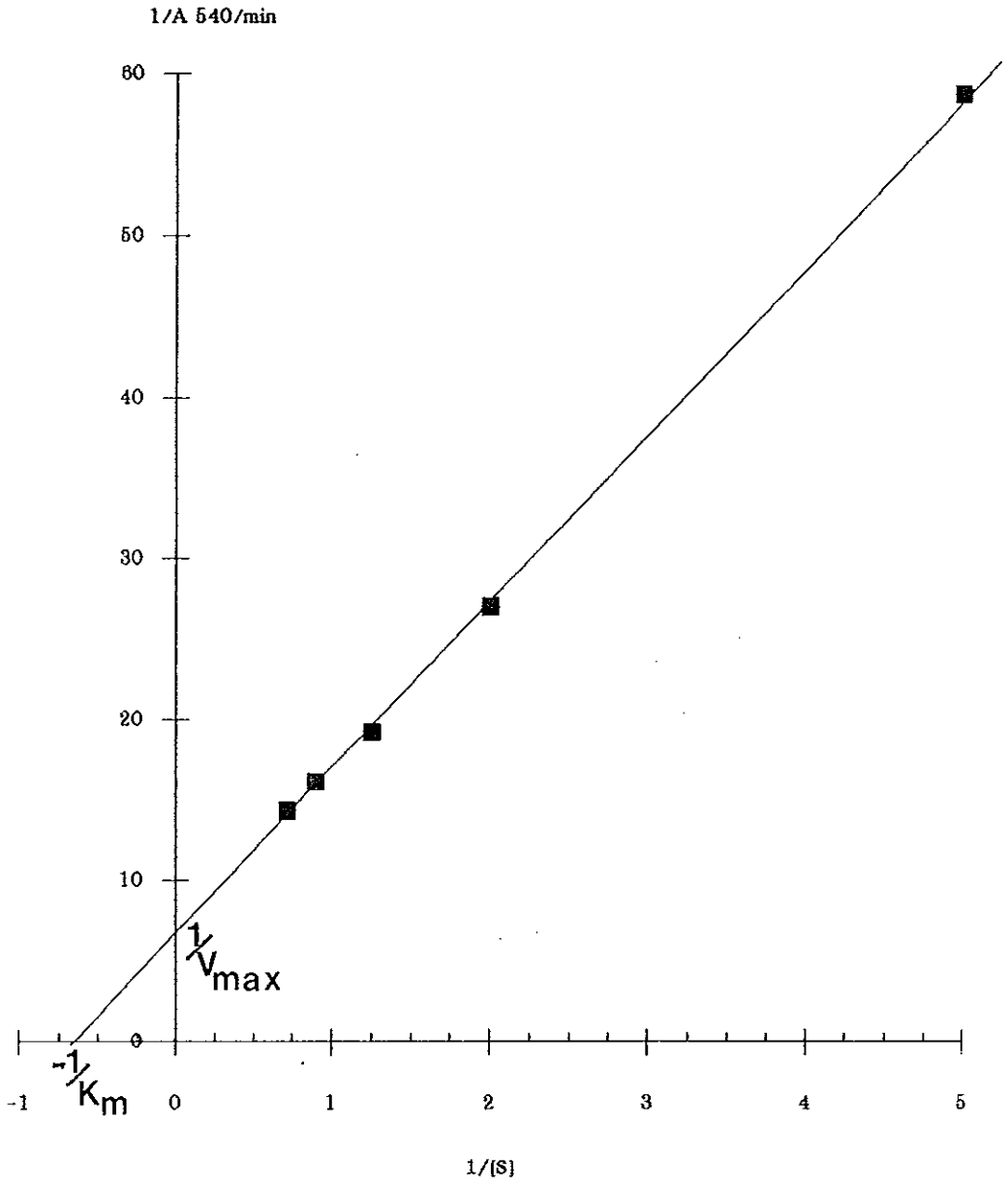
จากการใช้ความเข้มข้นของสับสเตรตต่างกัน ค่า K_m ของ GII เท่ากับ 1.33 มก./มล. และค่า V_{max} เท่ากับ 0.142 $A_{540/min}$ แสดงผลในตารางที่ 11 และกราฟรูปที่ 24

ตารางที่ 11 แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์ GII เมื่อใช้สับสเตรตลามินารินที่มีความเข้มข้นต่างกัน

ปริมาณสารตั้งต้น(มก./มล.)	$1/_{[S]}$	$A_{540/min}$	$1/A_{540/min}$
1.4	0.714	0.070	14.20
1.1	0.900	0.062	16.10
0.8	1.250	0.052	19.20
0.5	2.000	0.037	27.02
0.2	5.000	0.018	55.55



รูปที่ 24 กราฟแสดงการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ GII เมื่อใช้สับสเตรตลามินารินที่มีความเข้มข้นต่างกัน



รูปที่ 25 กราฟแสดงการหาค่า K_m และ ค่า V_{max} ของ GII

จากกราฟ $-1/K_m$ เท่ากับ 0.75, ค่า K_m เท่ากับ 1.33 มก./มล.

$1/V_{max}$ เท่ากับ 7.0, V_{max} เท่ากับ 0.142 $A_{540/min}$

3.8 ผลการศึกษาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ พันธุ์ GT1

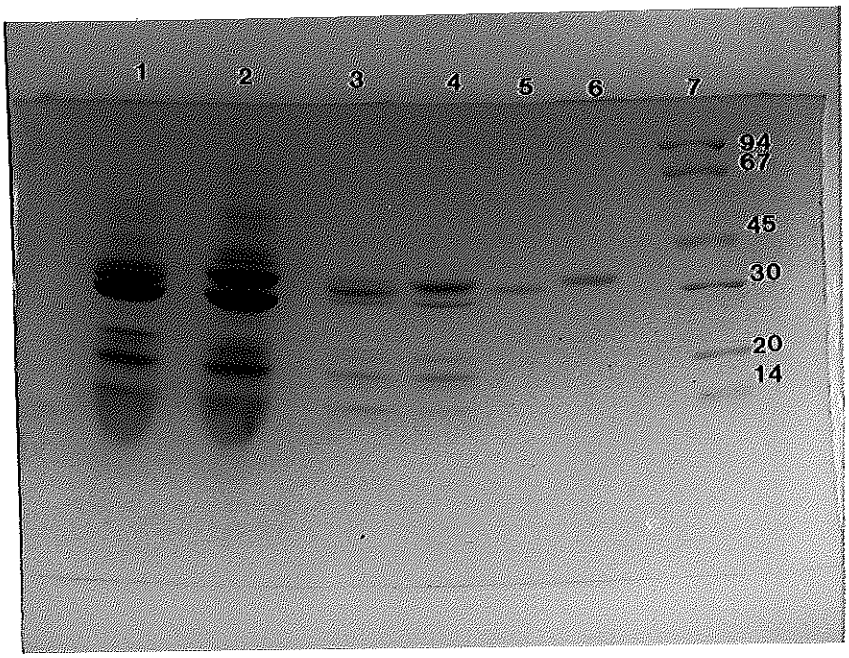
3.8.1 ผลจากการศึกษาลักษณะและค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสระหว่างยางพันธุ์ RRIM 600 และยางพันธุ์ GT1 โดยเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งในส่วนของซี-ซีรั่มและบี-ซีรั่ม สำหรับในซี-ซีรั่ม ค่าความว่องไวของเอนไซม์ในยางพันธุ์ GT1 จะมีค่ามากกว่าในยางพันธุ์ RRIM 600 ประมาณ 1.1 เท่าหรือเฉลี่ยแล้วเท่ากัน โดยเปรียบเทียบค่าความว่องไวรวมจากยางพารา 1 ลิตร เมื่อเก็บน้ำยางสดจากต้นยางทั้งสองพันธุ์ในแหล่งเดียวกันและเวลาเดียวกัน ค่าความว่องไวของเอนไซม์ของบี-ซีรั่มใน ยางพันธุ์ RRIM 600 จะมีเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII ซึ่งค่าความว่องไวของ GI มีมากกว่า GII ประมาณ 3-4 เท่า แต่ในพันธุ์ GT1 จะมีเพียงไอโซไซม์เดียว คือ GII แต่ค่าความว่องไวรวมจะมากกว่าในพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งเกิดจากค่าความว่องไวของ GI รวมกับ GII แล้วประมาณ 2 เท่า

จากตารางที่ 12 พบว่าค่าความว่องไวเฉลี่ยในบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่ม ของยางพันธุ์ RRIM 600 มีค่าเท่ากับ 13.2 ยูนิต/มล.และ 3.4 ยูนิต/มล. ตามลำดับ ส่วนค่าความว่องไวเฉลี่ยในบี-ซีรั่มและซี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 มีค่าเป็น 23.5 ยูนิต/มล. และ 3.5 ยูนิต/ มล. ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าในยางพันธุ์ RRIM 600 1.9 เท่าหรือประมาณ 2 เท่าในบี-ซีรั่ม และ 1.1 เท่า หรือเฉลี่ยเท่ากันในซี-ซีรั่ม

ตารางที่ 12 แสดงค่าความว่องไวรวม (ยูนิต) ของเอนไซม์ระหว่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ พันธุ์ GT1 เมื่อเปรียบเทียบจากน้ำยางสดจำนวน 1 ลิตร การทดลองเก็บน้ำยางทุก 2 วัน และเก็บทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย

	RRIM 600				GT1			
	บี-ซีรั่ม		ซี-ซีรั่ม		บี-ซีรั่ม		ซี-ซีรั่ม	
	มล.	ยูนิต	มล.	ยูนิต	มล.	ยูนิต	มล.	ยูนิต
1.	109	1417	305	1067	120	2784	312	1154
2.	93	1207	303	1030	99	2346	318	1113
3.	103	1380	312	1029	125	2937	325	1105
เฉลี่ย	101	1334	306	1042	114	2689	318	1124

3.8.2 เปรียบเทียบลักษณะที่ต่างกันของโปรตีนในบี-ซีรั่มของยางทั้ง 2 พันธุ์ โดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอริซิสแบบ SDS-PAGE ใช้สารตัวอย่างเป็นบี-ซีรั่ม และสารตัวอย่างที่ผ่านการแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์ CM cellulose (bound CM) จากแถบโปรตีนในรูปที่ 26 พบว่าในบี-ซีรั่มของยางพันธุ์ GT1 มีแถบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ชัดเจนเพียงแถบเดียว คือตรงตำแหน่งของ GII ส่วนแถบโปรตีนตรงตำแหน่งของ GI มีน้อยมากหรือไม่มีเลยในบางการทดลอง ส่วนในบี-ซีรั่ม ของยางพันธุ์ RRIM 600 มีแถบโปรตีนเป็นเอนไซม์ เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์เป็น 2 แถบชัดเจน คือ GI และ GII



รูปที่ 26 เจลอิเลคโตรฟอริซีส เปรียบเทียบแถบโปรตีนในยางทั้งสองพันธุ์

ช่องที่ 1 เป็นแถบโปรตีน บี-ซีรั่มของพันธุ์ RRIM 600

ช่องที่ 2 เป็นแถบโปรตีน บี-ซีรั่มของพันธุ์ GT1

ช่องที่ 3 เป็นแถบโปรตีนจาก bound CM ของพันธุ์ RRIM 600

ช่องที่ 4 เป็นแถบโปรตีนจาก bound CM ของพันธุ์ GT1

ช่องที่ 5, 6 และ 7 เป็นแถบโปรตีนของ GI, GII และแถบโปรตีนมาตรฐาน

3.9 ผลของอิเทรลต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยางพันธุ์ RRIM 600 และ พันธุ์ GT1

ศึกษาค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในยางพารา ทั้งสองพันธุ์ โดยศึกษาที่สภาพปกติและสภาพที่ทาสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ดังแสดงในตารางที่ 13 ก. และ ตารางที่ 13 ข. ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในยางพันธุ์ RRIM 600 ก่อนและหลังจากทาสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ผลการเปรียบเทียบพบว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์จากการเก็บครั้งที่ 1 เพิ่มขึ้น 3.1 เท่า เมื่อเทียบกับก่อนทาสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล และค่าความว่องไวของเอนไซม์จากการเก็บครั้งที่ 2 และ 3 มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับการเก็บครั้งที่ 1 ส่วนน้ำยางในยางพันธุ์ GT1 ค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่ได้จากการเก็บครั้งที่ 1 หลังจากที่ต้นยางถูกทาหน้ายางด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรลแล้ว มีค่าเพิ่มขึ้นถึง 3.5 เท่า เมื่อเทียบกับก่อนทา ทั้งนี้เนื่องจากสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล มีผลทำให้ปริมาณน้ำยางเพิ่มขึ้น โดยพบว่าในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ปริมาณน้ำยาง เฉลี่ยเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า และในยางพาราพันธุ์ GT1 ปริมาณน้ำยางเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 2 เท่า จึงทำให้ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำยางด้วย นอกจากนี้ ความเข้มข้นของเอนไซม์ยังเพิ่มขึ้นในยางทั้งสองพันธุ์ หลังจากทาหน้ายางด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรลแล้ว โดยมีค่าความว่องไวรวมเพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เท่าในยางพันธุ์ RRIM 600 และเพิ่มขึ้นประมาณ 3.0 เท่าในพันธุ์ GT1 เมื่อเปรียบเทียบจากปริมาณน้ำยาง 1 ลิตรเท่ากัน

ตารางที่ 13 ก เปรียบเทียบปริมาณน้ำยางสด และ ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์จากน้ำยางสดที่เก็บแบบวันเว้นวัน 3 ครั้ง ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600

พันธุ์ยาง RRIM 600	น้ำยางสด (มล.)	ความว่องไวเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)	ความว่องไวรวม (ยูนิต)
<u>ก่อนทาสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล</u>			
เก็บครั้งที่ (1)	795	3.69	2933.55
เก็บครั้งที่ (2)	820	3.71	3042.20
เก็บครั้งที่ (3)	855	3.68	3146.40
เฉลี่ย	823.3	3.70	3046.21
<u>หลังทาสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล</u>			
เก็บครั้งที่ (1)	1300	7.05	9165.00
เก็บครั้งที่ (2)	1150	6.91	7946.50
เก็บครั้งที่ (3)	970	6.61	6411.70
เฉลี่ย	1140.0	6.85	7809.0

ตารางที่ 13 ข เปรียบเทียบปริมาณน้ำยางสด และ ค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์
จาก น้ำยางสดที่เก็บแบบวันเว้นวัน 3 ครั้ง ของยางพาราพันธุ์ GT1

พันธุ์ยาง GT1	น้ำยางสด (มล.)	ความว่องไวเอนไซม์ ยูนิต/มล.	ความว่องไวรวม ยูนิต
ก่อนทาสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล			
เก็บครั้งที่ (1)	415	6.88	2855.2
เก็บครั้งที่ (2)	450	7.02	3159.0
เก็บครั้งที่ (3)	465	7.38	3431.7
เฉลี่ย	443.3	7.10	3148.6
หลังทาสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล			
เก็บครั้งที่ (1)	880	11.34	9990.8
เก็บครั้งที่ (2)	870	11.12	9674.4
เก็บครั้งที่ (3)	840	10.32	8868.8
เฉลี่ย	863.3	10.94	9444.5

4. วิจารณ์

4.1 แหล่งที่พบและศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบว่ามีอยู่เกือบทุกส่วนของต้นยาง (ตารางที่ 5) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์จาก บี-ซีรั่มในน้ำยางสด ซึ่งในบี-ซีรั่ม มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเฉลี่ย 1,500-2,000 ยูนิต/1 ลิตรของน้ำยางสด จัดว่ามีปริมาณสูง จึงได้ศึกษาการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและจลนศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และผลของเอธิลีนในรูปของสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรลต่อค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยาง พันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ GT1 ในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบว่ามีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII และทั้งสองไอโซไซม์มีความว่องไวในปฏิกิริยาเดียวกัน แต่คุณสมบัติทางกายภาพต่างกันเล็กน้อย เช่น มีความว่องไวได้ดีที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส และมีความทนต่ออุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียสเหมือนกัน แต่มีความว่องไวใน pH ที่แตกต่างกันเล็กน้อยคือ pH 5.0 สำหรับ GI และ pH 5.5 สำหรับ GII ค่า K_m ใกล้เคียงกันคือ 1.25 มก./มล. สำหรับ GI และ 1.33 มก./มล สำหรับ GII และ ค่า V_{max} ก็ใกล้เคียงกันคือ GI มีค่า 0.153 A_{540}/นาที GI I มีค่าเท่ากับ 0.142 540/นาที และทั้งสองไอโซไซม์ สามารถแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose (bound CM) ที่ pH 6.0-8.0 ใน 20 mM ของ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ในพืชชนิดอื่นที่ศึกษากันส่วนใหญ่เป็นพืชล้มลุก มีการศึกษาการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากส่วนของใบ เช่น Hrmova และ Fincher (1993) ได้ศึกษาในใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์ พบว่ามีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 3 ไอโซไซม์ คือ GI GII และ GIII Bulcke และคณะ (1989) และ Payne และคณะ (1991) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในใบยาสูบให้ผลทำนองเดียวกัน คือ พบว่ามี 2 ไอโซไซม์และสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ หลังจากที่ต้นยาสูบได้รับฮอร์โมน กลุ่ม cytokinins, auxin, ethylene และ pathogen ต่าง ๆ เอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น PR โปรตีนและมีการ ทำงานร่วมกับเอนไซม์ไคติเนส Kombrink และคณะ (1988) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในใบมันฝรั่ง พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น PR โปรตีน มีการทำงานร่วมกับเอนไซม์ไคติเนส

Mauch, และคณะ (1992) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในใบถั่วเหลือง ได้กล่าวถึงคุณสมบัติที่เป็น PR โปรตีน และการทำงานร่วมกับเอนไซม์ไคติเนสเช่นกัน จากการศึกษาของ Kombrink และ Hahlbrock (1986) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่ศึกษาโดยการนำเอาเซลล์ของใบผักชีฝรั่ง (parsley) นำมาเพาะเลี้ยงให้เป็นแคลัส (callus) สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยความร้อนและเชื้อรา *Phytophthora megasperma f.sp.glycenia* (Pmg elicitor). พบว่าค่าความว่องไวเพิ่มขึ้น 100 % เมื่อใช้ความเข้มข้นของ Pmg elicitor เท่ากับ 30 μg/ml. และมีเอนไซม์อีกหลายชนิดเกิดขึ้น เช่น phenylpropanoid synthase, phenylalnine ammonia lyase (PAL), 4 cumarate CoA ligase (4CL) glucose-6-phosphatase, dehydrogenase, phosphofructokinase, pyrophosphatase, chitinase, fructose-6-phosphatase และ phosphotransferase สำหรับ Kurosaki และคณะ (192) ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในหัวแครอท Mauch (1984) ศึกษาในฝักถั่วลันเตา (peapods) ก็ให้ผลลักษณะเดียวกัน เป็นต้น สำหรับในยางพาราเนื่อง จากถูกกรีดเกือบทุกวัน ทำให้เชื้อราบุกรุกต้นยาง ได้ง่าย นอกจากนี้ ชาวสวนใช้สารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรลทาหน้ายางเพื่อเพิ่มผลผลิต ก็อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่กระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น

4.2 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จากส่วนของบี-ซีรั่มในยางพาราพันธุ์ RRIM 600

บี-ซีรั่มในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ตามสภาพธรรมชาติจะมีค่า pH 5.5-6.2 ถ้านำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจะมีค่าความว่องไวเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสอยู่ในช่วงเกลือมีความเข้มข้น 40-50 % แต่หลังจากไดอะไลซ์โปรตีนที่ตกตะกอนได้ด้วยถุงไดอะไลซิสใน 20 mM โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์แล้ว ค่าความว่องไวเอนไซม์เหลือเพียง 5-10 % อาจเนื่องจากโปรตีนเกาะติดถุงไดอะไลซิสมากเกินไป จึงใช้วิธีไดอะไลซ์บี-ซีรั่มในบัฟเฟอร์ที่จะทำให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์เท่านั้น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่มทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose ที่ pH 6.0 (กราฟรูปที่ 12) และโครมาโตกราฟฟี่แบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose (กราฟรูปที่ 13) ในโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เช่นกัน พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ทั้งสองไอโซไซม์สามารถจับเกาะกับ CM-cellulose ได้ดีใกล้เคียงกัน และ ชะออกด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์

ที่มีความเข้มข้น ระหว่าง 0.6-1.0 M จากการที่ไอโซไซม์ GII สามารถจับเกาะกับ Con A agarose คอลัมน์ได้ เนื่องจาก Con A agarose คือคอลัมน์ agarose ที่มีเลคติน Concanavalin A เป็น ligand แสดง ให้เห็นว่า GII ไอโซไซม์ มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนที่มี polysaccharide biding site เป็นน้ำตาลกลูโคสและหรือน้ำตาลแมนโนส ซึ่งวิธีนี้ใกล้เคียงกับการศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากยีสต์ *Saccharomyces cereviseae* ที่สามารถบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนกับ Concanavalin A (Notario และคณะ) การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่คล้ายคลึงกัน เช่น จากการศึกษาของ Hrmova และ Fincher (1993) พบว่าในข้าวบาร์เลย์มีเอนไซม์ชนิดนี้ 3 ไอโซไซม์คือ GI GII และ GIII ได้นำสารสกัดจากใบอ่อน ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-cellulose ใน Tris-HCl pH 8.0 นำ unbound DE ทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยใช้ CM-sepharose ชะออกด้วย 0.0-0.5 M โซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์ที่มี pH 5.0 peak แรก ถูกชะออกมาช่วงที่เกลือมีความเข้มข้น 0.075 M peak สอง ชะออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.125 M นำแต่ละ peak ทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย chromatofocusing pH 11.0 หลังจากนั้นใช้วิธีเจลฟิลเตรชั่นใน Bio-gel P-60 peak แรกจะได้เอนไซม์ GIII ค่า pI เท่ากับ 9.9 มีปริมาณโปรตีน 4.3 % ส่วน peak สอง มี 2 ไอโซไซม์คือ GI และ GII ค่า pI เท่ากับ 10.3 และ 9.8 ตามลำดับ สำหรับปริมาณโปรตีนเท่ากับ 3.6 % และ 3.4 % แต่สำหรับ Varghese และคณะ (1994) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในเมล็ดข้าบาร์เลย์ พบว่า มีคุณสมบัติเป็น PR โปรตีนเช่นกัน และสามารถย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อราส่วนที่เป็นเบต้า-1,3,1,6-กลูแคนได้ และเอนไซม์ดังกล่าวพบว่าอยู่รวมกับเอนไซม์เบต้า-1,3,1,4-กลูคาเนส ซึ่งจะย่อยสลายผนังเซลล์ของเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวที่กำลังงอก ส่วนวิธีเตรียมเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้บริสุทธิ์จากฝักถั่วลันเตาตามวิธีของ Mauch และคณะ (1988) โดยใช้ไนโตรเจนเหลวสกัดสาร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตไดอะไลซ์ใน 10 mM Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.0 ทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟฟี่กับ Tris-acry DEAE นำเอาส่วนโปรตีนเบส ทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธี chromatofocusing ที่ pH 10.5-8.0 ได้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ อีกวิธีหนึ่งคือให้ส่วนของโปรตีนเบส affnity กับ chitin นำโปรตีนที่ adsorbed chitin ทำให้บริสุทธิ์ เพิ่มขึ้นด้วยวิธี chromatofocusing ได้เอนไซม์ไคติเนส 2 ไอโซไซม์

และนำโปรตีนส่วนที่เป็น non adsorbed chitin ผ่านการกรอง ultrafiltration แล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยวิธี chromatofocusing ที่ pH 10.5-8.0 ได้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์เช่นกัน การศึกษาของ Keen และ Yoshikawa (1983) ทำให้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากใบถั่วเหลือง โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากนั้นไดอะไลซ์ใน 3 mM Tris-HCl pH 7.3 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดย ion exchange DEAE-cellulose นำ unbound DEAE ลง CM-Biogel A แล้วปรับ pH 5.0 โดยใช้โปตัสเซียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ชะออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์เพิ่มด้วยวิธี electrofocusing ใช้ LKB 8100 pH 3.0-10 และวิธีเจลฟิลเตรชั่นใน CM-Biogel P-150 หลังจากไดอะไลซ์และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยอะควอไซด์ จะได้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ค่า pI 8.7 และ 10.5

4.3 น้ำหนักโมเลกุล (M.W.) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 สองไอโซไซม์มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนโมเลกุลเดี่ยว (monomeric protein) สามารถย่อยสับสเตรตลามินารินแบบเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสและให้ผลลบกับ p-nitrophenyl-β-D-glucoside ตรวจสอบด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่น M.W. ของ GI และ GII ต่างกันเล็กน้อยคือเท่ากับ 29.5 และ 33.1 kD ตามลำดับ ส่วนในการตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE ค่า M.W. ของ GI และ GII เท่ากับ 31.6 และ 34.7 kD ตามลำดับ (กราฟรูปที่ 20 และ 21)

จากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นและโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งทำให้ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลต่างกันเล็กน้อย เพราะการตรวจสอบด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่นนั้นโปรตีนของเอนไซม์อยู่ในสภาพธรรมชาติ ส่วนการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลวิธี SDS-PAGE ต้องทำให้โปรตีนเสียภาพด้วยการเติมสาร SDS และ mercaptoethanol ทำให้โมเลกุลแตกต่างกันออกไป จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ ในขณะมีกระแสไฟฟ้า ในเจลอิเลคโตรฟอริซิสดังกล่าว อย่างไรก็ตาม M.W. ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับที่พบในพืชชนิดอื่นด้วย เช่น จากการศึกษาของ Keen และ Yoshikawa (1983) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในใบถั่วเหลือง เป็นชนิดเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส มี 2 ไอโซไซม์ ค่า M.W. 33 kD Mauch และคณะ (1988) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในถั่วลิสง พบว่ามี 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII M.W. 33.5 และ 34.0 kD ตามลำดับ

และเป็น PR โปรตีนที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์ไคติเนสด้วย Fink และคณะ (1988) ได้ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จากใบข้าวโอ๊ต (Avena sativa L.) ประกอบด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 10 % ของโปรตีนทั้งหมด พบว่ามี 3 ไอโซไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 52, 31.3 และ 22 kD ตามลำดับ ค่า pI เท่ากับ 5.1, 4.9 และ 3.0 ตามลำดับ วิธีการตรวจวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์ ใช้ลามินาริน ใน 50 mM โปตัสเซียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เป็นสับสเตรต เติมสารละลายคอปเปอร์ (copper reagent) นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำมาเติมสารละลาย arsenomolypdate จำนวน 1 มล. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ซึ่งวิธีการวัดค่าความว่องไวนี้ จัดเป็นอีกวิธีหนึ่งที่แตกต่างไปจากวิธีใน ข้อ 2.2 ซึ่งใช้วัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่มของยางพารา Gaudot (1992) ศึกษาในพืชตระกูลต้นหอม (glomus species) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส M.W. 30 kD Kauffmann และคณะ (1987) ศึกษา M.W.ของเอนไซม์ชนิดนี้ในใบยาสูบ (*Nicotiana tobacum*) พบว่าเท่ากับ 33-34 kD สำหรับการศึกษาของ Hrmova และ Fincher (1993) ในใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์ M.W.เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้ง 3 ไอโซไซม์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่น ได้เท่ากับ 31 kD และถ้าตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE ได้ 33 Kd ทั้ง 3 ไอโซไซม์ จะสังเกตได้ว่าทั้งสองวิธี ทำให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ตัวเดียวกันมีค่าต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากสภาพโปรตีนต่างกันดังกล่าวแล้วข้างต้น สำหรับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในจุลินทรีย์บางชนิด มีขนาดแตกต่างจากในพืช มักมีขนาดใหญ่กว่าหรือเล็กกว่า เช่น จากการศึกษาของ Fleet และ Phaff (1974) อ้างโดย Brimacombe (1975) ได้ศึกษาในยีสต์ชนิด *Schizoaccharomyces versatilis* พบว่ามีค่า M.W. เท่ากับ 97 kD Molina และคณะ (1989) ศึกษาในยีสต์ชนิด *Candida albicans* พบว่ามีเอนไซม์เบต้า-1ฒ3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63 และ 44 kD ตามลำดับ Lorito และคณะ (1994) ศึกษาในเชื้อราชนิด *Trichoderma harzianum* พบว่ามี M.W. เท่ากับ 78 kD ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรีย มักมีขนาดเล็กกว่าในพืช เช่น จากการศึกษาของ Manner และ Wilson (1973) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในแบคทีเรียทั่วไป มี M.W. 16 kD Loberas และคณะ (1988) ศึกษาในแบคทีเรียชนิด *Bacillus licheniformis* พบว่ามี M.W. เท่ากับ 27-28 kD

4.4 ค่า pI และการย้อมสีแสดงลักษณะเฉพาะของเอนไซม์

4.4.1 ข้อสรุปเกี่ยวกับค่า pI ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากบี-ซีรั่มของยางพารา โดยการแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี ND-PAGE พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก อย่างการแยกแถบโปรตีนโดยทั่วไป ที่มีค่า pI ต่ำกว่า 8.3 จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา มีค่า pI สูง กว่า 8.3 ทั้งสองไอโซไซม์ เมื่อทดลองแยกแถบโปรตีนด้วยวิธีการเดียวกัน และใช้กระแสไฟฟ้าแบบกลับขั้ว พบว่าเอนไซม์เคลื่อนที่จากขั้วบวกไปยังขั้วลบได้ จากที่พบในพืชชนิดอื่น ๆ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสก็มีค่า pI สูง ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาของ Hrmova และ Fincher (1993) ซึ่งศึกษาจากใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์พบว่า ค่า pI ของ GI, GII และ GIII อยู่ระหว่าง 8.8-10.3 จากการศึกษาของ Keen และ Yoshikawa (1983) ได้ศึกษาเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสในใบเลี้ยงของถั่วเหลือง (soybean cotyledons) พบว่าค่า pI เท่ากับ 8.7 และ 10.5 Domingo (1994) ได้ศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้ในมะเขือเทศ พบว่ามีทั้งที่ ค่า pI สูงและต่ำ คือ เท่ากับ 10.5 และ 5.2 เป็นต้น สำหรับค่า pI ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบในจุลินทรีย์ มักจะเป็น โปรตีน ที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (acidic protein) เนื่องจากค่า pI ต่ำ ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาของ Notario และคณะ (1976) ศึกษาในยีสต์ *Candida utilis* มีค่า pI เท่ากับ 4.1 ส่วนในเชื้อรา ชนิด *Trichoderma herzianum* พบว่าค่า pI เท่ากับ 6.2 และ 4.6 (Lorito และคณะ 1994.) ในเชื้อรา ชนิด *Candida albicans* 1001 มีค่า pI เท่ากับ 4.0 (Molina และคณะ 1989.) และที่พบในเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus lichenifromis* พบว่าค่า pI เท่ากับ 4.7 (Lioberas และคณะ 1988.)

4.4.2 วิธีการ stain activity ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่ม (ดัดแปลงวิธีที่คล้ายกับวิธีการของ Pan และคณะ 1989.) ใช้สีย้อมชนิด 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (แผนภาพ ข้อ 3.6.4.2 และรูปที่ 19) สังเกตได้ว่า บริเวณที่มีแถบโปรตีนเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนสอยู่ในเจล จะติดสีย้อมเป็นแถบสีแดงชัดเจน ซึ่งแสดงลักษณะเฉพาะให้เห็นว่าโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ได้จากบี-ซีรั่มของน้ำยางพาราสดนั้นเป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสแน่นอน แต่เนื่องจากต้องใช้การแยกแถบโปรตีนใน PAGE แบบกลับขั้วไฟฟ้าซึ่งมีโปรตีนจำนวนน้อยที่มีคุณสมบัติเป็นเช่นนี้ ในช่องที่ 1 รูปที่ 19 ซึ่งเป็นสารตัวอย่างจาก บี-รั่ม ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 3 แถบเท่านั้น เมื่อย้อมเจลด้วยสีย้อมโปรตีนทั่วไปคือ

Coomassie brilliant blue R 250 แต่เมื่อแยกแถบโปรตีนทำนองเดียวกัน แล้วนำมาย้อมสีแสดงลักษณะเฉพาะคือ 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride จะปรากฏชัดเจนเพียงแถบเดียวตรงกับตำแหน่งของเอนไซม์ทั้งสองไอโซไซม์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สีย้อมดังกล่าวสามารถ ย้อมสีแสดงลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามสีย้อมดังกล่าวจะปรากฏให้เห็นเพียงระยะเวลาสั้นมากเพียง 2-3 นาที แล้วจางหายไป และการแยกแถบโปรตีนใน PAGE 4 % ในการให้กระแสไฟฟ้า 3 ชั่วโมง ซึ่งค่อนข้างนานและเจลมีความร้อนจึงมีผลให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยกว่านี้การเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนลงสู่แผ่นเจลได้น้อย มีผลให้แพร่กระจายได้ง่ายเมื่อนำแผ่นเจลย้อมสีแต่ละขั้นตอนและโดยเฉพาะขั้นตอนที่ต้อง incubated ไว้กับสับสเตรตลามินาริน ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ประกอบกับเจล 4 % ซึ่งค่อนข้างอ่อนนิ่มไม่ค่อยอยู่ตัวเหมือนเจลที่ใช้เปอร์เซ็นต์สูงกว่านี้ แต่จากการทดลองใช้เจล 7 % ผ่านกระแสไฟฟ้าลงสู่เจลนานต่างกัน เป็น 1, 2 และ 3 ชั่วโมง โปรตีนเอนไซม์ไม่เคลื่อนที่ลงสู่แผ่นเจล

4.4.3 จากวิธีการของ Shimoni, M. 1994. ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งสำหรับการ stain activity ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่คล้ายกับวิธีการของ Pan และคณะ (1989) ซึ่งการใช้สารเคมีต่าง ๆ สำหรับทำการ stain activity และปริมาณสารเคมี มีอัตราส่วนที่ใช้แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามวิธีการ stain activity ทั้งสองวิธีการก็ทำให้แถบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หลังจากย้อมด้วย 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride แล้วจะปรากฏแถบโปรตีนแสดงลักษณะเฉพาะเป็นสีแดง (red/purple) เหมือนกัน แต่เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มาจากต่างแหล่งกัน มีความแตกต่างกันในลักษณะเฉพาะบางประการ จึงต้องใช้สารเคมีอัตราส่วนต่างกันบ้าง เปอร์เซ็นต์ของการเตรียมเจลก็เช่นเดียวกัน (ND-PAGE) แตกต่างกันออกไป ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือเอนไซม์มีสภาพเป็นกรด (acidic protein) มีค่า pI ต่ำ สามารถ ผ่านกระแสไฟฟ้าตามขั้วปกติ ในการทำเจลอิเลคโตรฟอริซิสได้ แต่สำหรับเอนไซม์จากบางแหล่งมีสภาพเป็นเบส (basic protein) จึงมีค่า pI สูง การแยกแถบโปรตีนโดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอริซิส จึงต้องใช้วิธีผ่านกระแสไฟฟ้าแบบกลับขั้ว

4.4.4 สำหรับวิธีการ stain activity ของ Dumas-Guadot, E. และคณะ 1992 ใช้วิธีการและชนิดของสีย้อมแตกต่างกันไปคือใช้ aniline blue fluorochrome รวมถึงการสังเกตแถบโปรตีนเอนไซม์ภายใต้แสง UV ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่แตกต่างกันออกไป

4.5 ผลของการใช้สารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เปรียบเทียบจากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ GT1

เนื่องจากสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล มีผลต่อการไหลเพิ่มมากขึ้น ในยางแต่ละพันธุ์แตกต่างกัน พันธุ์ RRIM 600 ตามสภาพปกติให้น้ำยางต่อครั้งกรีดมากกว่าพันธุ์ GT1 หลังจากใช้สารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรลแล้วพบว่า พันธุ์ GT1 จะให้ปริมาณน้ำยางเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า แต่สำหรับพันธุ์ RRIM 600 ให้ปริมาณน้ำยางเพิ่มจากปกติเพียง 1.4 เท่า ดังนั้นความว่องไวรวมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จึงเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำยาง โดยเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า ในยางพันธุ์ RRIM 600 และ 3 เท่า ในพันธุ์ GT1 ถ้าคำนวณความว่องไวต่อความเข้มข้น ในพันธุ์ RRIM 600 เพิ่มเป็น 2 เท่า และพันธุ์ GT1 ในบางการทดลองเพิ่มเป็น 1.5 เท่า แต่บางการทดลองเพิ่มเป็น 1.2 เท่า จึงจัดได้ว่าไม่ชัดเจน และได้สังเกตพบว่ายางพาราทุกพันธุ์ในฤดูผลัดใบและเพิ่งแตกใบอ่อนให้น้ำยาง น้อยลงมากกว่า 60 % ได้ทดลองนำน้ำยางสดที่เก็บช่วงเวลาดังกล่าว มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง UC แยกเอาตะกอนก้นหลอด พบว่าให้ปริมาณน้อยลงมากกว่า 50 % และสีของตะกอนเป็นสีเหลือง หรือเป็นสีดำอมเทา ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า 1,3 กลูคาเนส จึงลดลงตามไปด้วย

5. สรุป

1. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่มของยางพารา ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบ ion exchange CM-cellulose column และ affinity Concanavalin A agarose column

2. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์ GII มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนที่มี carbohydrate site chain เป็นน้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลแมนโนส ซึ่งมีความจำเพาะในการจับกับ Concanavalin A ที่ใช้เป็น ligand ใน agarose column ได้ โดย GII มีความจำเพาะเจาะจงในการจับเกาะกับ Con A ได้แน่นกว่า GI

3. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มี 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII ปริมาณของ GI มีค่ามากกว่าGII ประมาณ 3-4 เท่า

4. GI และ GII มีลักษณะเป็นโปรตีนโมเลกุลเดี่ยว มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29.5 และ 33.1 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และมีค่าประมาณ 31.6 และ 34.7 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE ตามลำดับ

5. GI และ GII มีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส ทำงานได้ดีที่สุดในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส

6. GI และ GII มีความว่องไวของเอนไซม์ในช่วง pH 4.0-9.0 และสามารถทำงานได้ดีที่สุดเท่ากับ pH 4.5 และ pH 5.0 ตามลำดับ ในโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ และเท่ากับ pH 5.0 และ pH 6.0 ตามลำดับ ในยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์

7. GI และ GII มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส และสามารถสลายพันธะได้ดีกับสับสเตรต laminarin และ CM-pachyman และไม่สามารถสลายพันธะของสับสเตรต lichenin และ pusturan

8. ค่า pI ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่ม มีค่ามากกว่า 8.3 จัดเป็น basic protein สามารถแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose ที่ช่วง pH 6.0-8.0 ได้ และการแยกแถบโปรตีนโดยวิธี ND-PAGE ต้องให้กระแสไฟฟ้าแบบกลับขั้ว

9. ทดสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์โดยใช้สารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid และใช้สีย้อมโปรตีนชนิด 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride สำหรับ stain activity

10. ค่า K_m ของ GI เท่ากับ 1.25 มก./มล. ค่า V_{max} เท่ากับ 0.153 $A_{540/min}$ ค่า K_m ของ GII เท่ากับ 1.33 มก./มล. ค่า V_{max} เท่ากับ 0.142 $A_{540/min}$

11. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ GT1 มีเพียง 1 ไอโซไซม์มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ GII ในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และมีค่าความว่องไวสูงกว่า GI และ GII รวมกันเป็น 2 เท่า

12. ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ก่อนและหลังจากทาหน้ายางด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ GT1 จะเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 2.5 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับส่วนปริมาณน้ำยางสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 1.4 และ 2 เท่า ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

โชคชัย เอนกชัย 2531 "เอกสารประกอบการบรรยายการฝึกอบรมเจ้าหน้าที่หลักสูตรวิชายาง" กลุ่มพืชศาสตร์การยาง ศูนย์วิจัยยางจังหวัดสงขลา เรื่องการใช้สารเคมีเร่งน้ำยางสำหรับสวนยางขนาดเล็ก หน้า 17-48.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล 2522. โรคและศัตรูของยางพารา เอกสารฉบับที่ 13 ศูนย์วิจัยการยางหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา หน้า 7-44.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว 2533. โรคพืชวิทยาชั้นสูง โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางเกษตร ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 11-18, 182-184

พีรเดช ทองอำไพ 2529 "ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์และแนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย" ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 14-23.

ลิขิต นวลศรี และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร 2533. "การสำรวจพื้นที่การปลูกยางพาราของประเทศไทย ปี 2533 โดยใช้ข้อมูลดาวเทียมแลนด์แซทระบบ TM สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร หน้า 4-7.

สนธยา ศรีธรรมา 2536. ข่าวกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง วารสารยางพารา ฉบับที่ 121 ปีที่ 31 หน้า 4-10.

สุรศักดิ์ สุทธิสงค์ 2529. "เอกสารประกอบการอบรมเกี่ยวกับยางพารา" สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร หน้า 15-28.

Asselin, A. 1993. "Plant enzymes with antimicrobial properties." Phytoprotection. 74 (1) : 3-18.

Auzac, J., Jacob, J. L. and Chrestin, H. 1989. "Physiology of Rubber Tree Latex" CBC' Florida U.S.A. pp. 23-82.

Bernfeld, M.M. 1955. "Amylase, α and β" Method in Enzymology. 1 : 149-158.

Brimacombe, J.S. 1975. "Carbohydrate Chemistry" The Chemical Society. Burlington House, London. Vol (6), pp. 465-472., Vol (7), pp. 428-469., Vol (8), pp. 282-293.

Bonner,J. and Varner, J. E. 1976. "Plant Biochemistry" Academic Press Inc. New York U.S.A. pp. 714-723.

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

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

Cenamor, R. Molina, M.,Galdona, J.,Sanchez, M. and Nombela, C. 1987. "Production and secretion of *Saccharomyces cerevisiae* β-glucanases difference betweeen protoplast and periplasmic enzymes". Journal of Bacteriology. 133 : 619-628.

Chen, L. ,Fincher, G. B. and Bordier, P. 1993. "Evoltion of polysaccaride hydrolase substrate specificity" The Journal of Biogical Chemical. 268 (18) : 13318-13326.

Churngchow, N., Suntaro, A. and Wititsuwannakul, R. 1995. "Two β-1,3-glucanase isozymes from the latex of *Hevea brasiliensis*" Phytochemistry. (in press)

Conrads-Strauch, J., Dow, J. M., Melligan, D. E., Parra, R. and Daniels, M. J. 1990. "Induction of hydrolytic enzymes in Brassica Campertric in response to pathovars of *Xanthomonas campertris*". Plant Phathol. 93. (1) : 238-243.

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

Copa-Patino, J. L.,Zhang, Y. Padmaperuma, B.,Marsden, L., Broda, P. and Sinnott, M. L. 1993."Polarimetry and ^{13}C n.m.r. show that the hydrolase of -D-glucopyranosyl fluoride by (1,3)-glucanases from Phamero chaete *Chrysosporium* and *Sporotrichum dimorphosporum* have opposite sterio chemistries". Biochem.J. 293 : 591-594.

Deutscher, M. P. 1990. "Guide to Protein Purification" Method in Enzymology. AP. 182 : 309-379.

Devlin, T. M. 1993. "Biochemistry" Ed3 Department of Biolgical Chemimtry Hahneman" University School of Medicine Philadelphia Pennsylvania pp. 373-378 and pp.147-156.

Duering, K. 1993. "Can lysozymes mediats antibacterial resistance in plants ?". Plant-Mol.-Biol. 23 (1) : 209-214.

Fincher, G.B., Lock, P.A., Morgan, M. M. Lingelbach, K., Wettenhall, R. E. H., Mercer, J. F. B., Brandt, A. and Thomson K. K. 1986. "Primary structure of the (1,3-1,4)-D-glucan 4-glucanohydrolase from barley aleurone". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 : 2081-2085.

Fink, W., Liefland, M. and Mendgen, K. 1988. "Chitinases and beta-1,3-glucanases in the apoplastic compartment of Oat leaves (*Avana sativa.L.*)". Journal of Plant Molecular Biology. 88 : 270-275.

Fleet, G. H. and Phaff, H. J. 1974. "Glucanases in *Schizosaccharomyces* isolation and properties of the cell wall association β-1,3-glucanase". The Journal of Biological Chemistry. 249 (6) : 1717-1728.

Friebe, B. and Holldorf, A. W. 1975. "Control of extracellular β-1,3-glucanase activity in a Basidiomycete species". Journal of Bacteriology. 122 (3) : 818-825.

Gaudot, E. D., Grenier, J.,Furlan, V. and Asselin, A. 1992. "Chitinase, chitosanase and β-1,3-glucanase activity in Allium and Pisum roots colonized by glomus species. Plant Sci. 84 : 17-24.

Goodwin, T.W and Mercer, E. I. 1983. "Introduction to Plant Biochemistry" Pergaman Press Ltd. U.K. pp. 266-268.

Grenier, J. and Asselin, A. 1993. "Detection of β-1,3-glucanase activity in gels containing alkali-soluble yeast glucan". Anal. Biochemistry. 212 : 301-302

Han, K. S., Kauffmann, S., Albersheim/, P. and Darvill, A. G. 1991. "A soybean pathogenesis-related protein with β-1,3-glucanase activity releases phytoaexin elicitor-active heat-stable flagments from fungal walls". J.Molecular Plant Microbe Interaction. 4 (6) : 545-552.

Harborne, J. 1973. "Phytochemical Methods (A Guide to Modern Techiques of Plant Analysis)" Fakenham Press Ltd. Great Britain U.K. pp. 213-223.

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

Huub, J., Linthorst, M., Melchers, L. S., Mayer, A., Roekel, J. S. C. V., Cornelissen, B. J. C. and Bol, J. F. 1990. "Analysis of gene families encoding acidic and basic β-1,3-glucanase of tobacco." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 : 8756-8760.

Huynh, K. G. 1992. "Antifungal protein from plants" The Journal of Biological Chemistry. 267 (10) : 6635-6640.

Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B. 1987. "Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-glucanase activity". The EMBO. Journal. 6 (11) : 3209-3212.

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

Kombrink, E., Schroder, M. and Mahlbrock, K. 1988. Several "Pathogenesis-relate protein" in potato are -1,3-β -glucanase and chitinase" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 782-786.

Kragh, K. M., Jacobsen, S. Mikkelsen, J. D. and Nielsen, K. A. 1991. "Purification and characterization of three chitinases and one β-1,3-glucanase accumulating in the medium of cell suspension cultures of barley (*Hordeum valgare*)".Plant Science. 76 : 65-77.

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

Kush, A., Goyvaerts, E., Chye, M. L. and Chua, N. H. 1990. "Laticifer specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree)." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87 : 1787-1790.

Lai, D. M. L., Hoj,P. B. and Fincher, G. B. 1993. "Purification and characterization of (1,3-1,4)-β-glucan endohydrolases from germinated wheat. (*Triticum aestivum*)" Plant Molecular Biology. 22 : 847-859

Laemmli, U. K. 1970. "Clearvage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T." Nature. 227 : 680-685.

Legrand M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritic, B. 1987. "Biologycal function of pathogenesis-related proteins ; Four tobacco pathogenesis-related proteins and chitinases" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 : 6750-6754.

Lioberas J., Guerd, E. and Bernues, J. 1988. "Purification and characterization of endo β-(1,3-1,4)-D-glucanase activity from *Bacillus licheiformis*." Appl. Microbiol. Biotechnol. 29 (1) : 32-38.

Lorito, M., Hayes, C. K.,Pietro, A. D., Woo, S. L. and Harman, G. E. 1994. "Purification, characterization and synergistic activity of a glucan-1,3-β- glucosidase an N-Acetyl-β-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*" Molecular Plant Pathology. 84 (4) : 398-405.

Macgregor, E. A. and Ballance, G. M. 1991. "Possible secondary structure in plant and yeast β-glucanase." Biochem. J. 274 : 41-43.

Malehorn, D. E., Scott, K. and Shah, D. M. 1993. "structure and expression of a barley acidic β-glucanase gene." Plant Molecular Biology. 22 : 347-360.

Malet, C., Jimenez-Barbero, J., Bernabe, M., Brosa, C. and Planas, A. 1993. Stereochemical caurse and strcture of the products of the enzymic action of endo-1,3-1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. Biochem J. 296 : 753-758.

Manners D. J.,Masson, A. J. and Patterson, J. C. 1973. "The structure of a -(1,3)-D-glucan from yeast cell walls." Biochem J. 135 : 19-30.

Manners. D. J.and Wilson, G. 1973. "Some properties of a bacterial endo- -(1,3)-glucanase system" Biochem J. 135 : 11-18.

Martin, M. N. 1991. "The latex *Hevea brasiliensis* contians high levels of both chitinase and chitinase/lysozyme." Plant. Physiol. 95 : 469-476.

Matta, A., Abbattista, G. I. and Ferraris, L. 1988. "Stimulation of β-1,3-glucanase and chitinase by stresses that induce resistance to Fusarium wilt in tobacco." Phytopathol. Mediters. 27 : 45-50.

Mauch, F., Hadwinger, L. A. and Boller, T. 1984." Ethylene ; Symptom, not signal for the induction of chitinase and β-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and eilicitor." Plant. Physiol. 76 : 607-611.

Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. 1988. "Antifungal hydrolases in pea tissue" Plant. Physiol. 88 : 936-942.

Mauch, F., Meehl, B. J. and Staehelin, A. L. 1992."Ethylene induced chitinases and β-1,3-glucanase accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves." Planta. 186 : 367-375.

Melchers, L. S., Seta-Buurlage, M. B., Vloemans, S. A. and Woloshuk, C. P. 1993. "Extracellular targetting of the vacular tobacco proteins AP-24 chitinase and β-1,3-glucanase in trangenic plants." Plant. Molecular Biology. 21 : 583-593.

Ming-Mei, C., Hadwiger, L. A. , Horovitz, D. 1992. "Molecular characterization of apea beta-1,3-glucanase induced by Fusarium solani and chitosan challenge". Plant. Mol Biol. 20 : 609-618.

Miranda, D., Rhee, V. D., Lemmers, R. and Bol, J. F. 1993. "Analysis of regulatory elements involed in stress-induced and organ specific expression of tobacco acidic and basic β-1,3-glucanase genes." Plant. Molecular. Biology. 21 : 454-461.

Molina, M., Cenamor, R., Sanchez, M. and Nombela, C. 1989. "Purification and some properties of *Candida albicans* exo-β-1,3-glucanase" Journal of General Microbiology. 135 (2) : 309-314.

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

Notario, V., Villa, T. G. and Villanueva, J. R. "Purification of an exo-β-1,3-glucanase from cell-free extracts of *Candida utilis*" Biochemical. J. 159 : 555-562.

Okuda, K., Li, L., Kudlicka, K., Kuga, S., and Brown, R. M. 1993. "β-glucan synthesis is the cotton fiber"1.Identification of 1,4- and-β-1,3-glucans synthesized in vitro."Plant. Physiol. 101 : 1131-1142.

Packer, L. and Douce, R. 1987."Plant cell membranes" Method in Enzymology. 148 : 87-104.

Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kuec, J. 1989. "Direct detection of β-1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide elctrophoresis and isoelectrofocusing gels."Anal. Biochem. 182 : 136-140.

————.1991. "A technique for detection of chitinase,β-1,3-glucanase and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel elctrophoresis or isoeletrofocusing." Phytopathology. 81 (9) : 970-974.

Payne, G., Ahl, P., Moyer, M., Harper, A., Beck, J., Meins, F. and Ryals, J. 1990. "Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinase from tobacco." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 : 98-102.

Payne, G., Word, E., Gaffney, T., Goy, P. A., Moyer, M. and Harper, A. 1990. "Evidence for a third structural class of β-1,3-glucanase in tobacco". Plant. Molecular. Biology. 15 :797-808.

Philpott, W. A. and Chapman, J. M. 1977. "A new improved method for the assay of endo β-1,3-glucanase." Anal. Biochemistry. 79 : 257-263.

Pierpoint, W. S., Jackson, P. J. Evans R. M. 1990. "The pressence of a thaumatin-like protein, a chitinase and a glucanase among the pathogenesis-related proteins of potato (*Solanum tuberosom*" Physiol. Mol. Plant.Pathol. 36 (4) : 325-338.

Rapp, P. 1989. "β-1,3-glucanase β-1,6-glucanase and β-glucosidase activities of sclerotium glucanicum : Synthesis and properties." Journal of General Microbiology. 135 : 2847-2858.

Rehm, H. J. and Reed, G. 1987. "Enzyme Technology" Biotecnology. John F. Kennedy. 7a : 382-385

Santos, T., Villanueva, J. K. and Nombela, C. 1977."Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β-glucanases." Journal. of Bacteriology. 129 (1) : 52-58.

Shimoi, H., Limura, Y. Obata, T. and Tadenuma, M. 1992. "Molecular structure of rarobacter faecitabidus protease 1" The Journal. of Biological. Chemistry. 267 (35) : 25189-25195.

Shimoni, M. 1994. "A method for activity staining of peroxidases and β-1,3-glucanase isozymes in polyacrylamide electrophoresis gels". Anal. Biochemistry. 220 : 36-38.

Skoog, F. 1980. "Plant Growth Substance 1979" Springer Verlag. Berlin Heidelberg. Germany. pp. 219-236.

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

Sock, J.,Roringer, R. and Kang, Z. 1990. "Extracelluar beta-1,3-glucanases in stem rust affected and abiotically stressed wheat leaves. Immunocytochemical localization of the enzyme and detection of multiple froms in gels by activity staining with dye-labeled laminarin" Plant Physiology. 94 (4) : 1376-1389.

Somssich, L. E., Schmelzer, E., Bollmann, J. and Hahlbrock, K. 1986. "Rapid activation by fungal elicitor of gene encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 : 2427-2430.

Sotolova, I.,Jandera, A. and Hanzlikova, A. 1988. "Beta-1,3-glucanase in the rhizophere and on plant roots." Developments in Soil Science. 8 : 301-306.

Tahiri-Alaoui, A., Dumus, E. and Gianinazzi, S. 1990. "Detection of PR-b proteins in tobacco roots infected with chalara elegans". Plant. Mol. Biol. 14 (5) : 869-871.

Takagi, M. O. and Shinshi, H. 1990."Structure and expression of a tobacco β-1,3-glucanase gene." Plant. Molecular. Biology. 15 : 941-946.

Tangarone, B., Royer, J. C. and Nakas, J. P. 1989. "Purification and characterization of endo-1,3-β-D-glucanase from Trichoderma longibrachiatum." Applied Environ. Microbiology. 55 (1) : 177-184.

Van-Den B. M., Bauw, G., Castresana, C., Van, M. M. and Vandekerckhors, J. 1989. "Characterization of vacuolar and extracellular β-1,3-glucanase of tobacco ; Evidence for a strickly compartmentalized plant defense system." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (8) : 2673-2677.

Van-de-Rhee, M. D., Lemmers, R. and Bol, J. F. 1994. "Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic beta-1,3-glucanase genes."Plant-Mol.-Biol. 1993. 21 (3) : 451-461.

Varghese, J. N., Garrett, T. P. J., Colman, P. M., Chen, L., Hoj, P. B. and Fincher, G. B. 1994. "Three-dimensional structures of two plant β-glucan endohydrolases with distinct substrate specificities." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 : 2785-2789.

Verburg, J. G. and Huynh, Q. K. 1991. "Purification and characterization of antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*" Plant. Physiol. 95 : 450-455.

Wurzburg, O. B. 1987." Modified starches properties and uses. "Third Printing. pp.14-16.

Xu, P., Wang, J. and Fincher, G. B. 1992. "Evolution and differential expression of the β-glucan endohydrolases encoding gene family in barley, (*Hordeum vulgare*). Gene."120 :157-165.

Yoshikawa, M., Takeuchi, Y. and Horino, D. 1990. "A mechaism for ethylene-induced disease resistance in soybean ; Enhanced synthesis of an elicitor-releasing factor β-1,3- endoglucanase." Physiol. Mol. Plant. Pathol. 37 (5) : 367-376.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอาภรณ์ สันตะโร
วัน เดือน ปี เกิด	4 มีนาคม 2500

วุฒิทางการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การศึกษาบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา	2523