0466

รายงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติและการประยุกต์ใช้เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา

Characterization and Application of Peroxidase(s) from *Hevea brasiliensis* leaves

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลี สุวจิตตานนท์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนงบประมาณปี 2543

PSU
เลขหมู่ QK898.P47 W35 2000 c.1
Bib Key 31215

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้แยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส นี้เร่งปฏิกิริยา การสลาย H_2O_2 ให้เป็น H_2O พร้อมทั้งออกซิไดซ์ สารที่เป็น สับสเตรตอื่นๆ) จากใบยางพารา ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยการแยกโดยการใช้คอลัมน์ DEAE Sephacel ตามด้วย Sephadex G -75 และ Con A Sepharose ตามลำดับ เมื่อทำการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ แล้วพบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ เพิ่มขึ้นถึง 122 เท่าของเอนไซม์ที่สกัดได้ในตอนเริ่มต้น โดยมีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 0.16 เป็น 19.4 μkat/mg protein

เปอร์ออกซิเดสในใบยางพารามีหลายไอโซไซม์ แต่เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จากการศึกษาโดย ND-PAGE และ SDS-PAGE แล้วย้อมความว่องไวของเอนไซม์พบว่ามี 3 ไอโซไซม์ น้ำหนักโมเลกุล ที่ได้จากการศึกษาโดยใช้ SDS-PAGE คือ 85,000, 120,000 และ 125,000 ดัลตัน แต่น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการศึกษาโดย ND-PAGE คือ 85,000, 125,000 และ 140,000 ดัลตัน ตามลำดับ แต่เมื่อนำเปอร์ออกซิเดส ที่แยกได้ไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดย เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีผ่าน Sephadex G-150 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลรวม 2 ขนาดคือ 204,000 และ 215,000 ดัลตัน แม้ว่าจะพบว่าเปอร์ออกซิเดสมีถึง 3 ไอโซไซม์แต่เมื่อนำไปหา isoelectric point พบว่ามี ค่า pI 3.6

เอนไซม์ที่แยกได้เป็นไกลโคโปรตีน ย้อมติดด้วยสี อัลเซียน บลู และ ฟุกซิน - ซัลไฟต์ เมื่อนำไปวัดความสามารถในการดูดกลืนแสง พบว่าดูดแสงที่ 403 นาโนเมตร แสดงว่ามีกลุ่มฮีมอยู่ในโมเลกุลของเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา

เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 5.4 และเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิ 70°C หากอุ่นเอนไซม์ ให้อุณหภูมิสูงขึ้นถึง 70°C นานถึง1 ชั่วโมงความว่องไวของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยไม่ถึง 20% เอนไซม์นี้มีความคงตัวพอควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และ 4°C ได้เป็นเวลา 3 เดือนโดยที่ความว่องไวไม่ลดลง

เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราสามารถใช้สับสเตรตได้หลายตัวโดยจะมีความจำเพาะกับ *o*-dianisidine มากว่า ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid] และ pyrogallol เพราะมีค่า Km น้อยที่สุด โดยมีค่า Km 0.22, 3.03 mM และ 6.60 mM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า Km ของเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารากับ H_2O_2มีค่า 2.56 mM เมื่อเทียบกับ Km 0.22 mM ของ o-dianisidine

$CaCl_2$ 200 mM, $MgCl_2$, EDTA 50 mM และ SDS 0.1 mM กระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ได้สูงสุดโดยความว่องไวจะเพิ่มขึ้น 120, 50, 25, 30 % ตามลำดับ ขณะที่ KCN, NaN_3, DTT, *p*-CMB ที่ความเข้มข้น 1mM, 100 mM,10 mM,100 mM ตามลำดับ สามารถยับยั้งความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสได้ถึง 100%

Peroxidase in *Hevea brasiliensis* leaves

Wallie Suvachittanont and Patcharakorn Ratanapumee

Biochemistry department, Faculty of Science,

Prince of Songkla University,

Hat yai, Songkla, Thailand, 90112

Peroxidase from *Hevea brasiliensis* leaves was purified and characterized

Key words; *Hevea brasiliensis*, *Euphorbiaceae*, peroxidase, rubber trees

Peroxidase was isolated from *Hevea brasiliensis* leaves. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation followed by DEAE-Sephacel ion exchange chromatography, gel filtration on Sephadex G-75 and con A-Sepharose column chromatography. The enzyme was about 122 fold purified. The specific activity was increased from 0.16 to 19.4 μkat/mg protein. The purified peroxidase showed 3 bands in polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturating condition as detected by protein and activity staining. The M_r of the peroxidase were 85,120 and 125 kDa as determined by SDS-PAGE. It has a M_r of 204 kDa determined by gel filtration. These peroxidases are acidic with a pI of 3.6. The isolated peroxidases are glycoprotein as detected by fucshin-sulfite and alcian blue staining. The A at 403 nm of the enzyme indicates the presence of heme part of the enzyme. Peroxidase purified from *Hevea brasiliensis* leaves has an optimum pH for its activity at 5.4. The enzyme activity increases with the

increasing temperature up to 70°. It is a stable enzyme which can be kept at -20 ° and 4 ° for 3 months without losing the activity. K_m values of the purified enzyme for *o*-dianisidine, ABTS, pyrogallol and H_2O_2 were 0.22, 3.03, 6.60, and 2.56 mM respectively. Substances such as $CaCl_2$ (200mM), $MgCl_2$ (50 mM), EDTA(50mM), and SDS(0.1mM) increase the activity of the enzyme while KCN,(1mM) NaN_3, (100mM), DTT(10mM), and *p*-CMB(100mM) completely inhibit the activity.