

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อลำเลียง  
ในต้นยางพารา

Biochemical Process in Latex Vessel Plugging  
of *Hevea brasiliensis*

โดย

วิจิตรวาทน์ วิจิตรสุพรรณกุล  
จิรพงศ์ วิจิตรสุพรรณกุล  
จุฑามาศวณิก ภานิตกมล  
นายนแก้ว เจริญวิจิตรพร  
\*อมรรณมาศ วิเศษศรี

ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
\* มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

๒๕๕๑

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยาง  
ในต้นยางพารา

Biochemical Process in Latex Vessel Plugging  
of *Hevea brasiliensis*

โดย

รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล

\*ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล

ปิยะเกรณ์ ภาณุกุล

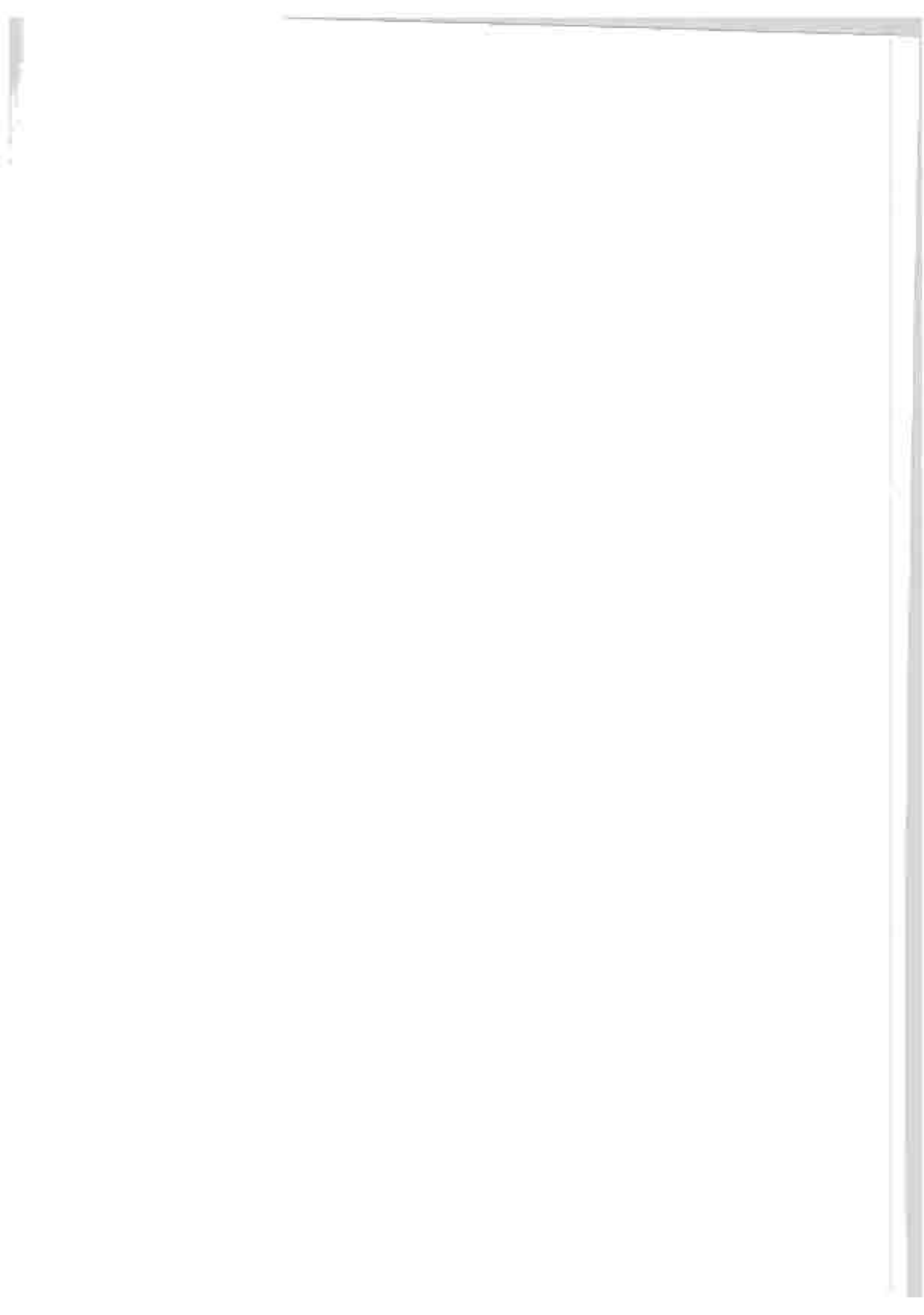
นพแก้ว เจริญพิพากร

\*กมลชนก รักเสรี

ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

\* มหาวิทยาลัยมหิดล



## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ยววิวิจัย รุ่นที่ 1) และ จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นเวลา 3 ปีตั้งแต่ 1.ค. 2537 ถึง  
30 พ.ค. 2540

ไปเป็นคิวโนน ทำให้เพิ่มโอกาสในการเกิด เซมิ-คิวโนน และ active oxygen species ได้มากขึ้นอีก แต่หากในขณะนั้นมี สปีสตรพตัวอื่นๆ เช่น ฟีนอลที่อยู่ในซี-ซีรีม มาแข่งขันกับสปีสตรพคิวโนน ก็อาจทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มคิวโนน จากเซมิ-คิวโนน ลดลง การทำงานของเปอร์ออกซิเดสและ ไลโปพีนออกซอกซิเดส ไม่ว่าจะใช้สปีสตรพตัวใดก็ตาม จะมีผลในการลดปริมาณ  $H_2O_2$  และ  $O_2$  ลง ตามลำดับ นอกจากนี้คณะวิจัยยังพบว่าทั้งปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกถั่วของไม้ยาง ที่ได้จาก การกรีด และปริมาณสารฟีนอลใน ซี-ซีรีมของน้ำยาง จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของที่ได้ต่อ ครั้งกรีด โดยมีค่าประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.76 และ 0.91 ตามลำดับ

เมื่อถูกออกซิเดสจะทำให้ถูกออกซิไดส์ (oxidized) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์เป็นแอลคิลที่บริเวณหน้า งามของของออกซิไดส์ออกซิไดส์ ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง (การเกาะจับ) โดยเฉพาะของออกซิไดส์กับอนุภาคยางนี้ ไม่ได้เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ แต่เกิดจากการที่ receptor site ของออกซิไดส์ สามารถ recognize กลุ่ม โกลโคโปรตีนบนโปรตีน (rubber particle-oxidized binding protein, RP-LBP) ที่มีของอนุภาคยาง ทำให้เกิดการเกาะจับกันและรวมกันเป็น กลุ่มก้อนซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการอุดตันในท่อน้ำยางได้ โดยเราสามารถเห็นลักษณะการเกาะกลุ่ม ของอนุภาคยางดังกล่าวได้ จากการทดลองนำออกซิไดส์ที่แยกและผ่านวิฤทธิได้จาก ผลิตภัณฑ์ของ ออกซิไดส์มาผสมกับอนุภาคยาง ในสภาพธรรมชาติเมื่อถูกออกซิไดส์แล้ว จากผลของการออกซิไดส์จะ แยกออกอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวภายในท่อน้ำยาง ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าใน ส่วนที่เป็นของเหลวตัว ก่อตัว จะมีโกลโคโปรตีน (cytosol-oxidized binding protein, C-LBP) อีกชนิดหนึ่ง ที่สามารถเกาะ จับจำเพาะกับออกซิไดส์ ได้เช่นกัน ดังนั้นจะเห็นว่าทั้ง RP-LBP และ C-LBP จะต้องแข่งขันกัน เกาะจับจำเพาะกับออกซิไดส์ และการจับกันระหว่าง RP-LBP ของอนุภาคยางกับออกซิไดส์ เท่านั้น ที่จะ นำไปสู่การเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มก้อน เพื่ออุดขวางการไหลของน้ำยาง นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับ C-LBP ในซี-ซีรีมของน้ำยาง มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของที่ได้ต่อครั้งกรีด โดยมีค่าประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.91

นอกจากนี้วิฤทธิและลักษณะคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของ ท่อน้ำยางทั้งที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ซึ่งได้แก่ NAD(P)H คิวโนน รีดักเตส, เปอร์ออกซิเดส กับ ไลโปพีนออกซอกซิเดส และที่ไม่ใช่เอนไซม์ แต่ก่อให้เกิดหรือยับยั้งการเกิดของน้ำยางเกาะกลุ่มของ อนุภาคยางซึ่งได้แก่ ออกซิไดส์, RP-LBP และ C-LBP ที่พอจะสรุปได้มีดังนี้:

NAD(P)H คิวโนน รีดักเตส (QR) สามารถเตรียมได้ B-serum ที่ได้จากกรรมวิธี bottom fraction ที่ได้จากสารเป็นเยื่อที่นำยางสดไปผ่านขั้นตอน freeze-thaw จากการทำ IEF พบว่ามี QR หลายชนิด โดยมีค่า pI เท่ากับ 4.6, 5.0, 6.2, 6.7 และ 7.4 โดยชนิดที่มีค่า pI เท่ากับ 6.2 จะมีปริมาณ QR แยกตัวที่สูงสุด โดยมีค่า  $M_r$  จากการทำ SDS-PAGE ประมาณ 57 kD QR มีความสามารถในการยับยั้ง การเกิดของสารชนิด p-benzoquinone>menadiolone>plumbagin>juglone>duroquinone

ตามลำดับ โดยพบว่า dicumaryl มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ QR ส่วน pH ในการทำงานที่  
เหมาะสมที่สุดคือ 8 โดย QR สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH จากช่วง 6-10 และ ทนอุณหภูมิ  
ได้สูงถึง 70°C

เปอร์ออกซิเดส สามารถเตรียมได้จากเปลือกขนของไม้ยางที่ถูกฉีกออกจนขาวกริดขาว และ  
พบว่าเปอร์ออกซิเดสนี้สามารถหักงัวที่เปลี่ยน ฟีนอลจาก จี-ซีรีนในน้ำยาง ให้กลายเป็นโพลีฟีนอล  
เราสามารถทำให้เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ได้โดยการแยกผ่าน คอลัมน์ โดยอาศัยคุณสมบัติทางขนาด  
สภาพการมีประจุ และการเกาะจับจำเพาะของแอนไอน์ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วปรากฏว่าเปอร์ออกซิเดส มี  
ค่า  $M_r$  จากการทำให้ SDS-PAGE และน้ำหนักโมเลกุลรวม จากการแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยขนาด เท่า  
กับ 50 kD มีค่า pI เท่ากับ 3.5 และ การทำงานที่เหมาะสมที่ pH 5.4, ค่า  $K_m$  ต่อ สับสเตรท  
o-dianisidine และ  $H_2O_2$  เท่ากับ 20 และ 18.6  $\mu M$  ตามลำดับ ค่า  $K_i$  ของตัวยับยั้ง KCN และ  $NaN_3$   
เท่ากับ 34 และ 41  $\mu M$  ตามลำดับ

โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO) สามารถเตรียมได้ B-serum ที่ได้จากการนำ bottom fraction ที่ได้  
จากการปั่นแยกน้ำยางสดไปผ่านขั้นตอน freeze-thaw โดยนำสารละลายที่ได้จากการละลายพลาสมา  
B-serum ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ไปผ่านรีซูร์คัลคอลัมน์ CM-Sepharose จะได้  
PPO I และ PPO II โดยมีค่า  $M_r$  ที่ได้จากการทำให้ SDS-PAGE เท่ากับ 32 และ 34 kD ตามลำดับ และ  
มีค่า pI เท่ากันคือ 9.3 โกลบูลูลินทั้งสองทำงานได้ดีในช่วง pH 5-8 โดยมีอุณหภูมิในการทำงานที่  
เหมาะสมอยู่ในช่วง 35-40°C และทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60°C เมื่อใช้ dopamine และ L-dopa เป็น  
สับสเตรท PPO-I ให้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 2.08 และ 9.33 mM ส่วน PPO-II ให้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 2.12 และ  
4.76 mM ตามลำดับ

ลูทอยดิน สามารถเตรียมได้จากอนุภาคลูทอยด์ ซึ่งแยกได้จากส่วนของ bottom fraction ที่ได้  
จากการปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยการนำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน แล้ว นำ  
ตะกอนที่ได้ไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 0.2% Tris-HCl pH 8.0 บำบัดสารตกค้างที่ได้ไปผ่านรีซูร์คัลคอลัมน์  
โดยการแยกผ่านคอลัมน์ไอออนิก และ DEAE-Sepharose พบว่าลูทอยดินมีค่า  $M_r$  ที่ได้จากการทำให้ SDS-  
PAGE เท่ากับ 17 kD และ น้ำหนักโมเลกุลรวมจากการแยก โดยอาศัยขนาดประมาณ 276 kD  
ลูทอยดินสามารถทำให้อนุภาคนางเกาะกันเป็นกลุ่มได้ และตัวลูทอยดินเองยังสามารถทำให้มีด  
เหล็กแดงจาก กระดาษ หรือ หมู และกลุ่มได้ด้วย จึงมีคุณสมบัติเป็นเหล็ก ซึ่งความสามารถในการทำ  
ให้มีสีแดงตามผลตกตะกอนนี้จะถูกยับยั้งโดยโกลโคโปรตีนหลายชนิด คือ fetuin, asialofetuin,  
ovotransferrin, concanavalin, asialomucin ส่วน  $\alpha_2$ -acid glycoprotein หรือ น้ำตาลดีบุกหรือหมู่สายตัวจะไม่  
สามารถทำการยับยั้งดังกล่าวได้ ในทางตรงกันข้าม การเกาะจับของอนุภาคนางที่อุณหภูมิเย็นน้ำโค  
ลูทอยดิน จะสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย fetuin แต่ ไม่ถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลดีบุก concanavalin ลูทอยดิน  
สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60°C และทนต่อความเป็นกรดด่างได้ดี ตั้งแต่ช่วง pH จาก 5-10

**RP-LBP** สามารถแยกได้จากชั้นบนสุดหรือชั้นของยางที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยแยกตามความหนาแน่น zone 2 ซึ่งเป็นชั้นยางด้านที่สัมผัสกับชั้นของ C-serum ซึ่งมีลักษณะคล้ายวุ้นสีขาวใส ไปทำปฏิกิริยาโดยการผ่านการล้างด้วย isotonic buffer หลังจากนั้นทำการสระกับ คีวอ 0.2% Triton X-100 ป่าสารที่สะกัดได้ไปลดทอนด้วยอะซิโตน แล้วนำตะกอนที่ละลายได้ ไปอุ่นในน้ำเดือด 2 นาที แล้วปั่นแยกเอาส่วนใสไปทำปฏิกิริยาคัดโดยการแยกผ่านคอลัมน์ โดยอาศัยข้อแตกต่างของขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นเป็นประจุที่แตกต่างกับของโปรตีน พบว่า RP-LBP ที่ทำปฏิกิริยาได้ มีค่า  $M_r$  ที่ได้จากกราฟทำ active PAGE และ SDS-PAGE เท่ากับ 120 และ 145 kD ตามลำดับ มีค่า pI เท่ากับ 3.4 และค่า pI ที่เหมาะสมกับการทำงานในช่วง 5-8 โดยสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 60°C ได้เกินกว่า 30 นาที RP-LBP สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่าย ที่เหนียวมาไว้เกิดขึ้นโดยดูหยดคั้น โดยสามารถยับยั้งได้ประสิทธิภาพสูงสุดหรือใช้ความเข้มข้นโปรตีนได้ต่ำสุด เมื่อเทียบกับโกลโคโปรตีนจากแหล่งอื่นๆที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์โคเลสเตอรอลเอสเทอเรสยังการทำงานของ RP-LBP

**C-LBP** สามารถแยกได้จากชั้นของส่วนใสในชั้นกลาง (ซี-ซีรัม) ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยสามารถนำไปทำปฏิกิริยาได้ ด้วยการลดทอนด้วยกลีเซอรอลในนีโอเพกซ์เฟส แล้วแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยข้อแตกต่างของขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นเป็นประจุที่แตกต่างกับของโปรตีน พบว่า C-LBP มีค่า  $M_r$  ที่ได้จากกราฟทำ SDS-PAGE เท่ากับ 40 kD และมีน้ำหนักโมเลกุลรวมจากการแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยขนาดประมาณ 204 kD มีค่า pI เท่ากับ 4.7 โดยสามารถทนความร้อนเป็นกรดต่ำได้ถึงต่ำกว่า pH 6-10 และ ทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 30°C C-LBP สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางและเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่เหนียวมาไว้เกิดขึ้นโดยดูหยดคั้น โดยพบว่า โคเลสเตอรอลเอสเทอเรสยังการทำงานดังกล่าวของ C-LBP ได้ ส่วนของติดวุ้นกันที่พบกับ RP-LBP นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณ C-LBP ในน้ำยางจะมี ความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณน้ำยางที่ได้ต่อครั้งการคัด

โดยสรุปกระบวนการเพาะเลี้ยงที่มีผลเกี่ยวข้องกับการหลุดล่อนของน้ำยางในชั้นกลางพบว่าในชั้นแรกเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างสารพิษออกซิเจนเพื่อไปทำลายเสถียรภาพของเมมเบรนของอนุภาคที่ถูกยัดทำให้ดูหยดคั้นตก นั่นเกิดไปเกิดจากที่ดูหยดคั้นซึ่งไหลออกมาจากเมมเบรนของดูหยดคั้นถึงการแตก ไปทำให้น้ำที่เหนียวติดกันในการจับกันเฉพาะกับโกลโคโปรตีนบนผิวอนุภาคยาง (RP-LBP) ก่อให้เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขัดขวางการไหลของน้ำยางและเกิดการอุดตันของท่อน้ำยางในที่สุด กลุ่มสารที่เกี่ยวข้องทั้งหมดนี้รวมเป็น coagulating factors ในทางกลับกันจะมีกลุ่มสารที่ทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factors ซึ่งได้แก่ เปอร็อกซิเดสและฟีนอกซีในซี-ซีรัม ที่ส่งผลต่อการลดการเกิดสารพิษออกซิเจน และโกลโคโปรตีน (C-LBP) ในซี-ซีรัม ที่ไปขัดขวางการเกาะกลุ่มระหว่างดูหยดคั้นกับอนุภาคยาง โดยพบว่าปริมาณ anti-coagulating factors เหล่านี้จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งการคัด ซึ่งสมควรจะพัฒนาให้เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพในการไหลของน้ำยางในการคัดเอื้อและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไป

# Biochemical Process in Latex Vessel Plugging of *Hevea brasiliensis*

Rapepun Wittawatwankul, \*Dhirayee Wittuwannakul, Piyaporn Pusitkul, Nopphakaeew

Chireonthipakorn and \*Karnolichusok Ruksee

Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai.

\*Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok

\*\*\*\*\*

## Abstract

Rubber latex is a viscous white liquid synthesized and stored in latex vessel. Besides a major liquid cytosol (C-serum) content in rubber latex, various suspended particles, in decreasing quantities, are rubber particles, lutoids and Frey-Wyasing complex, respectively. Rubber tapping was performed by making cuts across latex vessels. The rubber tree has a mechanism to minimize its metabolite lost due to tapping by forming plug at the tapping site in order to retard latex flow. An early electron microscopic study revealed the presence of rubber particles and lutoid debris at the plugging site to impede latex flow. Our present study on the biochemical process in latex vessel plugging of *Hevea brasiliensis* suggests the involvements of two cooperative processes. One is enzymatic dependent leading to lutoid binding and another is non-enzymatic dependent involving specific aggregation between rubber particles and lutoid membrane debris.

Upon tapping, the opening end of latex vessel is exposed to atmospheric  $O_2$  which in turn promotes activities of several oxidases leading to production of active oxygen species including superoxide ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ ) and  $H_2O_2$ . These active oxygen species will cause lutoid membrane damage. The process may begin with reduction of quinone into semi-quinone by the NAD(P)H oxidase or NAD(P)H quinone reductase on lutoid membrane. In the presence of  $O_2$ , the semi-quinone can auto-oxidize into quinone by producing  $O_2^-$ . The reaction between  $O_2^-$  with surrounding  $H_2O_2$  results in formation of  $OH^\cdot$  (Fenton & Haber-Weiss reaction). The  $OH^\cdot$  will cause damage to the unsaturated double bond of fatty acid in lutoid membrane and lead to membrane breakage. Consequently, peroxidase and polyphenol oxidase in latex cytosol will utilize  $H_2O_2$  and  $O_2$ , respectively to oxidize hydroquinone substrate into its corresponding quinone product, hence increasing further chance on semi-quinone and active oxygen species production. However, opposite outcome may also

occur if there are other substrates such as C-serum phenols competing with hydroquinone for these enzymes. Whichever substrate is utilized, the reactions catalyzed by peroxidase and polyphenol oxidase will result in decreasing  $H_2O_2$  and  $O_2$  contents, respectively. Accordingly, we found direct correlations between level of bark peroxidase and C-serum phenols with rubber yield per tapping,  $r=0.76$  and  $0.91$ , respectively.

The bursting of luteoid will lead to an exposure of lutoidin, possessing lectin activity, on its membrane. The lutoidin will agglutinate particle particles. The aggregation of rubber particles is a non-enzymatic process involving recognition of glycoprotein (rubber particle-lutoidin binding protein, RP-LBP) on rubber particle by its receptor site on the lutoidin. These specific bindings led to rubber plug formation in latex vessel to retard flow. The agglutination of rubber particles can be demonstrated *in vitro* by mixing lutoidin, purified from luteoid membrane with rubber particles. In the *in vivo* situation, after luteoid breakage its membrane debris remained suspending in latex cytosol where another glycoprotein that can bind to lutoidin (cytosol lutoidin binding protein, C-LBP) was also found. Therefore, it is seen that both RP-LBP and C-LBP will have to compete for lutoidin binding and only with the former that rubber particle aggregation can be formed to impede latex flow. Accordingly, the level of C-LBP is directly proportional to rubber latex yield per tapping, with  $r=0.97$ .

The results obtained from purification and characterizations of proteins involved in latex vessel plugging on the enzymatic process including NAD(P)H quinone reductase, peroxidase and polyphenol oxidase and the non-enzymatic process leading to rubber particle aggregation including lutoidin, RP-LBP and C-LBP can be summarized as follows:

NAD(P)H quinone reductase (QR) was prepared from B-serum, obtained from bottom fraction of ultracentrifuged fresh latex, by repetitive freeze-thawing. Upon REP, several QRs were found with pIs of 4.6, 5.0, 6.2, 6.7 and 7.4. The most dominant form of QR possessed pI value of 6.2 and  $M_r$  of 57 kD upon SDS-PAGE. Different substrate specificities on QR were detected as follows: *p*-benzoquinone>menadiolone>plumbagin>juglone>duroquinone, respectively. Dicumarol was found to inhibit QR activity. Optimum pH was observed at 8 while pH stability ranging from 6-10. QR is heat stable up to 70 °C.

Peroxidase was prepared from excised *Hevea* bark strips obtained after tapping. The bark peroxidase was capable to convert phenols isolated from C-serum fraction of centrifuged latex into polyphenolic forms. The peroxidase was purified to homogeneity by size exclusion, ion exchange and affinity chromatography. SDS-PAGE and gel filtration chromatography

indicates that purified peroxidase is composed of a single polypeptide of  $M_r$  50 kD. The enzyme has a  $pI$  of 3.5. The  $K_m$  values for *o*-dianisidine and  $H_2O_2$  were 20 and 18.6  $\mu M$ , respectively, and the  $K_i$  values for KCN and  $NaN_3$  for these substrates were 10  $\mu M$  and 2.7 mM, respectively.

Polyphenol oxidase (PPO) was prepared from B-serum by repetitive freeze-thawing of bottom fraction obtained from ultracentrifuged fresh latex. The B-serum was subjected to acetone precipitation and the solubilized precipitate was further purified through CM-Sephurase column. Two PPO were obtained, PPO-I and PPO-II with  $M_r$  under SDS-PAGE of 32 and 34 kD, respectively. Both PPOs possess  $pI$  of 9.3 and have optimum pH and temperature ranging from 5-8 and 33-40°C, respectively. They are heat up to 60°C. The  $K_m$  values of PPO-I for dopamine and L-dopa are 2.08 and 8.33 mM, respectively while those for PPO-II are 2.12 and 4.76 mM, respectively.

Lutoidin was isolated from liquid (bottom) fraction of centrifuged rubber latex under acetone precipitation. Lutoidin was extracted from the acetone precipitate in buffer containing 0.2% Triton X-100 and purified to homogeneity after chain and DEAE-Sephurase column. The  $M_r$  upon SDS-PAGE is 17 kD with native  $M_r$  obtained by gel filtration of 276 kD. It is able to agglutinate rubber particles and erythrocytes from either rabbit or mouse. The hemagglutination or lectin activity of lutoidin can be inhibited by several glycoproteins such as fetuin, asialofetuin, ovomucoid, mucin, asialomucin but not  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, mono- or di-saccharides. Similarly, the ability of lutoidin in inducing rubber particle aggregation was also inhibited by fetuin but not monosaccharide like GlcNAC. Lutoidin is heat stable up to 60°C and its pH stability ranging from 5-10.

RP-LBP was isolated from rubber layer obtained after ultracentrifugation of fresh latex. The zone 2 of rubber layer facing aqueous C-serum phase with white jelly-like appearance was isolated and washed with isotonic buffer. RP-LBP was then extracted in the presence of 0.2% Triton X-100. Acetone precipitation was performed on the extract and resultant pellet was solubilized and dipped in boiling water for 2 min. RP-LBP was further purified from supernatant obtained after heat-treatment by passing through gel filtration and ion exchange column chromatography. Purified RP-LBP possessed  $M_r$  of 120 and 24.5 kD upon native PAGE and SDS-PAGE, respectively. The  $pI$  value was determined to be 5.4 while pH optimum ranging from 5-8. It could stand heat at 60°C for more than 30 min. The RP-LBP

was able to inhibit hemagglutination induced by lectodin with highest binding efficiency since its concentration required for inhibition was lowest in comparison with other glycoprotein inhibitors used under the same study. In addition, the lectodin binding capacity of RP-LBP was abolished upon chitinase treatment.

C-LBP was purified from C-serum fraction in middle aqueous phase obtained after ultracentrifugation of fresh latex. The purification procedure involved ammonium sulfate fractionation, gel filtration and ion exchange column chromatography. Purified C-LBP possessed  $M_r$  of 40 kD upon SDS-PAGE. The native molecular weight obtained after gel filtration was 204 kD. The pI value was around 4.7 while a broad range of pH stability was observed from 6-10. It is heat stable up to 50°C. Purified C-LBP could inhibit both rubber particle aggregation and hemagglutination induced by the lectodin. These inhibitions are, however, abolished with pre-treatment of C-LBP with chitinase, similar to that observed with RP-LBP. Moreover, a direct correlation between latex C-LBP level and rubber latex yield per tapping was also found.

In conclusion, the biochemical process in latex vessel plugging of *Hevea brasiliensis* begins with the production of active oxygen species by a group of oxidase enzymes. These destructive active oxygen species then causes luteal membrane destabilization leading to an exposure of haemolysins. The haemolysins, also possessed lectin activity, will agglutinate rubber particles by binding specifically with glycoproteins (RP-LBP) on rubber particle surface. The aggregate thus formed will impede or eventually cease latex outflow. Overall compounds involved in this process are functioning as coagulating factors. On contrary, there is also a group of anti-coagulating factors such as peroxidase and C-serum phenol playing role in reducing the amount of active oxygen species and C-serum glycoprotein (C-LBP) which competes with RP-LBP in binding with lectodin in forming rubber particle aggregate. It was found that the levels of these anti-coagulating factors are directly and highly correlated to the amount of latex yield per tapping. Hence, the anti-coagulating factors should be applied as potential markers in characterization and selection of better-yield rubber clones.

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมของท่อน้ำยางในต้นยางพารา  
รพีพรรณ วิถีจิตสุวรรณกุล, \*จิรัช วิถีจิตสุวรรณกุล, ปิยาภรณ์ ภาณุสกุล, นพแก้ว เจริญพิทักษ์

และ \*กมลชนก รักเสรี

ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

\*ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล

#### บทคัดย่อ

น้ำยางเป็นของเหลวสีขาวที่ดูดซึมและบรรจุอยู่ภายในท่อน้ำยาง นอกจากส่วนของของเหลวใส (C-secreta) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักแล้ว น้ำยางจะประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กต่าง ๆ จำนวนมากไปหาประโยชน์ คือ อนุภาคยาง, อนุภาคลูทอยด์ (lutein) และ แพรโรทีนซึ่งคอมเพล็กซ์การเกิดโดยเนื้อเยื่อท่อน้ำยางจะทำให้มีน้ำยางไหลออกมามากขึ้น ดังนั้นจะมีวิธีการยับยั้งการดูดซึมของน้ำยางดังกล่าว โดยการกระตุ้นให้เกิดการดูดซึมบริเวณปลายท่อน้ำยางที่ดูดซึม การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า บริเวณดูดซึมปลายท่อน้ำยางดังกล่าวจะมีลักษณะดูดซึมที่ประกอบด้วยอนุภาคยางและจากอนุภาคลูทอยด์ที่เคลือบด้วยไขมันเป็นกลุ่มก้อน เพื่อศึกษาถึงการไหลของน้ำยาง ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ากระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมของท่อน้ำยางในต้นยางพารา น่าจะเกิดขึ้นได้จาก การประสานงานระหว่างการทำงานของกระบวนการผลิต 2 กระบวนการ คือ กระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อของเหลวภายในท่อน้ำยางของต้นยาง ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการของอนุภาคลูทอยด์ และ กระบวนการที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของต้นยาง ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ต้นยางทำให้เกิดการกระตุ้น ระหว่างของลูทอยด์ที่เคลือบด้วยไขมัน

การวิจัยเพื่อเปิดท่อน้ำยางเพื่อให้น้ำยางไหลออกมามากขึ้น จะทำให้บริเวณปลายท่อน้ำยางที่ดูดซึมมีลักษณะการดูดซึมของ  $O_2$  ที่ได้รับจากอากาศจะส่งผลกระตุ้นการทำงานของต้นยางของต้นยางที่ดูดซึมออกซิเจนจากอากาศที่ดูดซึมได้มี  $active\ oxygen\ species$  ซึ่งได้แก่  $superoxide\ (O_2^-)$ ,  $hydroxyl\ radical\ (OH)$  และ  $H_2O_2$  โดย  $active\ oxygen\ species$  เหล่านี้ จะร่วมกับน้ำยางและของเหลวของต้นยางของลูทอยด์ โดยเริ่มจาก เอนไซม์ NAD(P)H ออกซิเดส หรือ NAD(P)H คิวโนน รีดักเตส ที่เมแทบอลิซึมของลูทอยด์ จะรีดิวซ์สปีชีส์คิวโนน ไม่เป็น ไฮโดรคิวโนน และ เซมิ-คิวโนน ซึ่ง เซมิ-คิวโนน นี้สามารถให้  $O_2$  ออกซิไดส์คิวโนนเป็นเป็น คิวโนน โดยจะให้  $O_2^-$  และหากในขณะนั้นมี  $H_2O_2$  อยู่ด้วย  $O_2^-$  ก็จะทำปฏิกิริยากับ  $H_2O_2$  เกิด  $OH$  ขึ้น (ปฏิกิริยา Fenton & Haber-Weiss) ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายโครงสร้างไขมันในเนื้อเยื่อ ที่เมแทบอลิซึมของลูทอยด์ ส่งผลให้ลูทอยด์แตก ในขณะเดียวกันเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโกลีฟีนออกซิเดส ที่อยู่ในส่วนของของเหลว ซี-ซีรีน ในน้ำยางก็จะอาศัยการใช้  $H_2O_2$  และ  $O_2$  ตามลำดับ ในการออกซิไดส์ สปีชีส์คิวโนน ให้เกิด

## สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ	หน้า
บทกึ่งย่อ	
1. บทนำ	1
2. วิธีทำการทดลอง	4
2A) <i>Enzymatic process</i>	4
วิธีการทดลองร่วม	
2A.a) การเตรียมและแยกส่วนน้ำยาง	4
2A.b) การพ่นน้ำยางด้วยเครื่องพ่น	4
2A.c) การหาค่า isoelectric point	5
2A.d) การหาผลของ pH และ อุณหภูมิ	5
2A.e) การทำ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	5
2A.f) การหาปริมาณโปรตีน	5
วิธีการทดลองแยก	
2A.1) <i>NAD(P)H quinone reductase (QR)</i>	6
2A.1.1) QR assay QR	6
2A.1.2) การทำบริสุทธิ์ QR	6
2A.1.2.1) การสกัดและทำบริสุทธิ์ QR	6
2A.1.2.1.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B	6
2A.1.2.1.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B	6
2A.1.2.1.3) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200	6
2A.2) <i>Peroxidase (POD)</i>	7
2A.2.1) การ assay POD ทำได้ 2 วิธี คือ	7
2A.2.1.1) Colorimetric assay	7
2A.2.1.2) Spectrophotometric assay	7
2A.2.2) การสกัดและทำบริสุทธิ์ POD จากเปลือกไม้ยาง	7
2A.2.2.1) การเตรียมสารสกัดจากเปลือกไม้ยาง	7
2A.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ peroxidase จากสารสกัดจากเปลือกไม้ยาง	7
2A.2.2.2.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100	7
2A.2.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Cellulose	7

	หน้า
<b>2B) Non-enzymatic process</b>	12
<b>2B.1) Lutoidin</b>	12
2B.1.1) IT assay lutoidin	
2B.1.1.1) Hemagglutination assay	12
2B.1.1.2) Rubber particle agglutinin assay	12
2B.1.2) IT assay ตัวอื่นยังการทำงานของลูทอยดิน	13
2B.1.2.1) Hemagglutination inhibition (H.I.) assay	13
2B.1.2.2) Rubber particle agglutination inhibition (RP.I.) assay	13
2B.1.3) การสกัดและฟอกวีสุทธ์ลูทอยดินจากอนุภาคลูทอยด์	13
2B.1.3.1) การสกัดลูทอยดินจากน้ำยาง	13
2B.1.3.2) การฟอกวีสุทธ์ลูทอยดิน	13
2B.1.3.2.1) การฟอกวีสุทธ์โดย chitin-beads-binding	13
2B.1.3.2.2) การฟอกวีสุทธ์โดย ion exchange chromatography	14
2B.1.4) การหา native molecular weight ของลูทอยดิน	14
<b>2B.2) RP-LBP ( rubber particle-lutoidin binding protein)</b>	14
2B.2.1) IT assay RP-LBP	14
2B.2.2) การสกัดและฟอกวีสุทธ์ RP-LBP จากอนุภาคยาง	14
2B.2.2.1) การสกัด RP-LBP จากอนุภาคยาง	14
2B.2.2.2) การฟอกวีสุทธ์ RP-LBP	15
2B.2.2.2.1) การฟอกวีสุทธ์โดยกรดอะซิติกและกลั่นด้วย acetone	15
2B.2.2.2.2) การฟอกวีสุทธ์โดย heat-treatment	15
2B.2.2.2.3) การฟอกวีสุทธ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE- Sepharcl	15
<b>2B.3) C-LBP ( C-serum-lutoidin binding protein)</b>	15
2B.3.1) IT assay C-LBP	15
2B.3.2) การแยกและฟอกวีสุทธ์ C-LBP จาก C-serum	15
2B.3.2.1) การฟอกวีสุทธ์โดยผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300	15
2B.3.2.2) การฟอกวีสุทธ์โดยผ่านคอลัมน์ CM-Sephacryl 6B	16

	หน้า
3. ผสมสารทดสอบ	17
3A) Enzymatic process	17
3A.1) NAD(P)H quinone reductase (QR)	17
3A.2) Peroxidase (POD)	23
3A.3) Polyphenol oxidase (PPO)	33
3A.4) การสกัดสาร phenols ใน C-serum	41
3A.5) การสกัดสาร quinone จาก bottom fraction	45
3B) Non-enzymatic process	49
3B.1) Lutoidin	49
3B.2) RP-LBP	58
3B.3) C-LBP	67
4. จัดวิเคราะห์	77
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	79
6. บรรณานุกรม	80
7. ภาคผนวก	81

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ QR ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B	19
2. Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ QR ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B	19
3. Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ QR ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200	20
4. การตั้งชื่อการทำงานของ QR โดย dicumarol	20
5. ผลของ pH ต่อการเกิดสีของ QR	21
6. ความเสถียรของ pH ของ QR	21
7. ความเสถียรของอุณหภูมิของ QR	22
8. การทำ isoelectric focusing gel electrophoresis ของ QR	22
9. ค่าสัมประสิทธิ์การสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ POD จากเปลือกยาง กับปริมาณน้ำยางหรือยางผงที่ได้ต่อครั้งกวน	25
10. การตั้งชื่อผลิตภัณฑ์ของ เปรมา หลังการทำ semi-SDS PAGE	25
11. Chromatographic profile ของสารสกัด POD ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100	26
12. Chromatographic profile ของการทำบริสุทธิ์ POD ผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose	26
13. Chromatographic profile ของการทำบริสุทธิ์ POD ผ่านคอลัมน์ Coe. A-Sepharose	27
14. SDS-PAGE ของ POD ที่ได้จากหลังการทำบริสุทธิ์	27
15. ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log$ molecular weight กับ partition coefficient ( $R_m$ ) ของโปรตีนมาตรฐานกับ POD	28
16. การทำ isoelectric focusing gel electrophoresis ของ POD	28
17. การเปรียบเทียบผลของ pH ต่อการเกิดสีของ POD จากเปลือกไม้ยาง และ horseradish	29
18. การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการเกิดสีของ POD จากเปลือกไม้ยางและ horseradish	28
19. การหา $K_m$ ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อซับสเตรต <i>o</i> -diaminodiphenol	30
20. การหา $K_m$ ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อซับสเตรต $H_2O_2$	30

รูปที่	หน้า
21. กราฟ $K_m$ ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อตัวยับยั้ง KCN	31
22. กราฟ $K_m$ ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อตัวยับยั้ง $\text{NaN}_3$	31
23. สเปกตรัมที่ scan จากช่วง UV-Visible ของ C-serum ที่ได้จาก treatment ต่างๆ	32
24. Chromatographic profile ของ PPO บนคอลัมน์ CM-Sepharose	35
25. SDS-PAGE ของ PPO ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ	35
26. ผลการทำ Isoelectric focusing gel electrophoresis ของ PPO	36
27. ความเสถียรต่อ pH ของ PPO-I, -II	37
28. ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ PPO-I, -II	37
29. ค่าของ pH ที่มีค่านอกวิถีของ PPO-I, -II	38
30. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอมพลิจูดของ PPO-I, II	38
31. กราฟ $K_m$ ของ PPO-I ต่อสปีตเตรท dopamine	39
32. กราฟ $K_m$ ของ PPO-I ต่อสปีตเตรท L-dopa	39
33. กราฟ $K_m$ ของ PPO-II ต่อสปีตเตรท dopamine	40
34. กราฟ $K_m$ ของ PPO-II ต่อสปีตเตรท L-dopa	40
35. GC chromatogram ของ C-serum phenol	42
36. HPLC chromatogram ของ สารละลายมาตรฐาน phenols กับ C-serum phenol	43
37. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ C-serum phenol ของน้ำยาง กับปริมาณน้ำยางหรือเฮกซ์ที่ใส่ต่อครั้งกรีด	44
38. UV-Visible spectroscopic scans C-serum phenol เป็น <i>in vivo</i> substrate ของ PPO	44
39. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ quinone และ QR ใน bottom fraction ที่ได้จาก centrifuged latex กับปริมาณยางที่ใส่ต่อครั้งกรีด	46
40. UV/Vis. spectrum scan ของ active quinone fraction	47
41. กราฟคุณสมบัติของ quinone คือการแตกของอนุภาคลูทอยด์ และ การเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง	48
42. Chromatographic profile ของลูทอยด์บนคอลัมน์ DEAE-Sepharose	53
43. SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน	53
44. ความสัมพันธ์ระหว่าง Stokes's radius กับ inverse error function ของ [1- partition coefficient] ของโปรตีนมาตรฐานกับลูทอยด์	54

รูปที่	หน้า
45 การทดสอบการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางโดยดูทอยคิน	55
46 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางโดยดูทอยคิน	56
47 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางโดยโปรตีนอื่นๆที่ไม่ใช่ดูทอยคิน	56
48 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของดูทอยคิน	57
49 ความเสถียรต่อ pH ของดูทอยคิน	57
50 Chromatographic profile ของ RP-LBP บนคอลัมน์ Sepharose 6B	60
51 Chromatographic profile ของ RP-LBP บนคอลัมน์ DEAE-Sepharcel	60
52 ผลการหาค่า native $M_r$ ของ RP-LBP จากการหาค่า PAGE	61
53 SDS-PAGE ของ RP-LBP ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์	62
54 SDS-PAGE ของ RP-LBP ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ โดยย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R, Fuchsin 100, Alcian blue	63
55 ผลการหาค่า isoelectric focusing gel electrophoresis ของ RP-LBP	64
56 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ RP-LBP	65
57 ความเสถียรต่อ pH ของ RP-LBP	65
58 ผลของความเข้มข้นของ chitinase ในการยับยั้งความสามารถของ RP-LBP	66
59 Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ C-LBP คอลัมน์ Bio-Gel P-300	69
60 Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ C-LBP คอลัมน์ DEAE-Sepharcel	69
61 SDS-PAGE ของ C-LBP ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์	70
62 ความสัมพันธ์ระหว่าง log molecular weight กับ partition coefficient ( $K_{av}$ ) ของโปรตีนมาตรฐานกับ C-LBP	71
63 ความเสถียรต่อ pH ของ C-LBP	72
64 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ C-LBP	72
65 ความสามารถของ C-LBP ต่อการยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดสีพืชแดงโดยดูทอยคิน	73
66 ความสามารถของ C-LBP ต่อการยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคนวมโดยดูทอยคิน	74

รูปที่	หน้า
67 ผลของความเข้มข้นของ chitinase ในการยับยั้งความสามารถของ C-LBP	75
68 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ C-LBP จาก C-serum ในน้ำขางกับปริมาณคราบน้ำขางที่ได้คั่วครั้งกรด	76

	หน้า
2B) <i>Non-enzymatic process</i>	12
2B.1) <i>Iutoidin</i>	12
2B.1.1) <i>IT assay iutoidin</i>	12
2B.1.1.1) <i>Hemagglutination assay</i>	12
2B.1.1.2) <i>Rubber particle agglutination assay</i>	12
2B.1.2) <i>IT assay ด้วยวิธีการทำงานของรูทอยด์</i>	13
2B.1.2.1) <i>Hemagglutination inhibition (H.I.) assay</i>	13
2B.1.2.2) <i>Rubber particle agglutination inhibition (RP.I.) assay</i>	13
2B.1.3) <i>การสกัดและทำปฏิกิริยารูทอยด์จากอนุภาครูทอยด์</i>	13
2B.1.3.1) <i>การสกัดรูทอยด์จากเนื้อเยื่อ</i>	13
2B.1.3.2) <i>การทำปฏิกิริยารูทอยด์</i>	13
2B.1.3.2.1) <i>การทำปฏิกิริยาโดย chain-batch-binding</i>	13
2B.1.3.2.2) <i>การทำปฏิกิริยาโดย ion exchange chromatography</i>	14
2B.1.4) <i>การหาค่า native molecular weight ของรูทอยด์</i>	14
2B.2) <i>RP-LBP (rubber particle-lutoidin binding protein)</i>	14
2B.2.1) <i>IT assay RP-LBP</i>	14
2B.2.2) <i>การสกัดและทำปฏิกิริยา RP-LBP จากอนุภาครูทอยด์</i>	14
2B.2.2.1) <i>การสกัด RP-LBP จากอนุภาครูทอยด์</i>	14
2B.2.2.2) <i>การทำปฏิกิริยา RP-LBP</i>	15
2B.2.2.2.1) <i>การทำปฏิกิริยาโดยการลดหย่อนด้วย acetone</i>	15
2B.2.2.2.2) <i>การทำปฏิกิริยาโดย heat-treatment</i>	15
2B.2.2.2.3) <i>การทำปฏิกิริยาโดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharcel</i>	15
2B.3) <i>C-LBP (C-serum-lutoidin binding protein)</i>	15
2B.3.1) <i>IT assay C-LBP</i>	15
2B.3.2) <i>การสกัดและทำปฏิกิริยา C-LBP จาก C-serum</i>	15
2B.3.2.1) <i>การทำปฏิกิริยาโดยผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300</i>	15
2B.3.2.2) <i>การทำปฏิกิริยาโดยผ่านคอลัมน์ CM-Sepharose 6B</i>	16

## 1. บทนำ

การทำสวนยางพาราเป็นอาชีพหลักของเกษตรกรภาคใต้ และบางจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการศึกษาในปี พ.ศ. 2534 ประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกยางทั้งหมด 11.2 ล้านไร่ ในจำนวนนี้ พื้นที่ 9.7 ล้านไร่อยู่ใน 14 จังหวัดภาคใต้ โดยสงขลามีพื้นที่ปลูกยางมากที่สุด (1.7 ล้านไร่) ในปี พ.ศ. 2534 ประเทศไทยสามารถผลิตยางได้เป็นอันดับที่หนึ่งของโลก โดยสามารถนำเงินตราเข้าประเทศได้เกือบสามหมื่นล้านบาท การปลูกยางเป็นการสร้างสวนป่าชนิดหนึ่งที่ช่วยรักษาสภาพสิ่งแวดล้อม และให้ผลตอบแทนในระยะเจริญเติบโตในรูปของน้ำยางเมื่อเริ่มตัดอายุให้ผลตอบแทนแล้ว ชาวสวนก็ยังสามารถตัดไม้ขายเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรมทำเฟอร์นิเจอร์ได้ยิ่ง ปัจจุบันมีเกษตรกรที่มีอาชีพทำสวนยางอยู่ประมาณแปดแสนครัวเรือน และกรรมกรที่ทำงานอยู่ในโรงงานอุตสาหกรรมที่เชื่อมโยงกับยางและไม้ยางพาราอีกเป็นจำนวนมาก จึงสมควรส่งเสริม การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ยางให้สามารถให้ผลผลิตสูงขึ้น เพื่อให้เกษตรกรทำสวนยางเป็นอาชีพที่ยั่งยืน เพื่อเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรซึ่งจะนำไปสู่การรักษาสภาพแวดล้อมที่ชาว และเพิ่มรายได้ให้แก่ประเทศชาติ ทั้งในรูปของผลผลิตยางดิบ และผลิตภัณฑ์จากยางและ ไม้ยางพารา

การศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี (biochemical marker) ในการคัดเลือกรูปแบบยางพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงตั้งแต่ระดับต้นกล้าน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีและเพื่อป้องกันการสูญเสียรายได้ของเกษตรกรอันเนื่องมาจากการปลูกต้นยางที่ให้ผลผลิตต่ำได้วิธีหนึ่ง ทั้งนี้ เพราะยางเป็นพืชที่ให้ผลผลิตในระยะกรีนฮาว (20-25 ปี) การเริ่มต้นด้วยต้นกล้ายางที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงตั้งแต่เริ่มลงมือปลูก จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด

โดยธรรมชาติใบแก่ของยางจะถูกสร้างขึ้นและเก็บไว้ในรูปของสารแขวนลอยภายในท่อลำเลียงบริเวณเปลือกด้านในถัดจากเนื้อเยื่อบริเวณเปลือกหุ้ม (cambium) ของต้นยาง ท่อลำเลียงบริเวณเปลือกของด้านในทั้งหมดจะเชื่อมโยงต่อกันเป็นระบบท่อลำเลียงเปลือกด้านในของต้นยาง ในการกวัดยางแต่ละครั้งของใบมีดกรีดยางจะเฉือนผ่านท่อลำเลียงที่อยู่บริเวณเปลือกกรีด ทำให้ให้น้ำยางภายในท่อลำเลียงถูกดันด้วยแรงดันของสารละลายที่อยู่ในท่อไซโทเลมมาโดยเร็วในระยะต้นๆ แล้วค่อยๆ ชั่วลงจนหยุดไหลในที่สุด

หลังจากการกวัดยางโดยใช้มีดกรีดยางเฉือนเปลือกยางขาดเพื่อคัดผ่านท่อลำเลียงทำให้อาณัติของท่อลำเลียงที่มีการอุดตันจะถูกกรีดทิ้งไปพร้อมกับเปลือกที่หลุดออกมา เมื่อท่อลำเลียงถูกมีดของจะทำให้น้ำยางที่อยู่ภายในท่อได้ขับบริเวณกรีดไหลออกมา โดยเฉลี่ยจะกินพื้นที่บริเวณท่อลำเลียง (drainage area) ที่อยู่ใต้บริเวณกรีดประมาณ 2 ฟุต หลังจากที่ดินยางได้รับการทำให้เกิดบาดแผลหนึ่งจากการกรีด ต้นยางจะมีวิธีตอบสนองเพื่อยับยั้งการสูญเสียลำเลียงในท่อ โดยก่อให้เกิดกระบวนการสมานแผลโดยการสร้างสารอุดต้นขึ้นที่บริเวณปลายท่อที่ถูกกรีด ประสิทธิภาพในการทำให้เกิดอุดต้นของต้นยางแต่ละต้นจะไม่เท่ากัน ดังนั้นปริมาณน้ำยางที่ได้ต่อครั้งกรีดจะได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาไหลของน้ำยางหลังกรีด ดังนั้นเกิดการอุดต้นบริเวณ

ปลายท่อที่ถูกกรีดให้เปิดออกเร็ว ก็จะหยุดการไหลเร็ว และทำให้ได้น้ำยางน้อย ในทางตรงข้าม ด้านที่เกิดการอุดตันบริเวณปลายท่อที่ถูกกรีดให้เปิดออกช้า ก็จะหยุดการไหลช้า และทำให้ได้น้ำยางมาก

น้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ ๆ จะประกอบไปด้วยส่วนต่างคล้าย ๆ กับไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่เจริญงอก โดยจะมีส่วนที่เป็นอนุภาคแขวนลอยอยู่ในน้ำยาง ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 2 ชนิด คือ ส่วนที่เป็นอนุภาคยาง (rubber particles) ซึ่งคิดเป็น 30-40% ของปริมาณรวม กับส่วนที่เป็นอนุภาคจุลชีพ ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยผนังเมมเบรน

จากรายงานการทดลองกรีดยางด้านเดียวกัน โดยเว้นระยะเวลากรีดออกเป็นช่วง ๆ ในวันเดียว จะพบว่าลักษณะกราฟที่สาคได้ระหว่างอัตราการไหลของน้ำยางกับช่วงระยะกรีดแต่ละครั้งจะขึ้นลงสลับกันไปแบบขั้นบันได (stepped flow curve) โดยอัตราการไหลของน้ำยางจะถูกขลอให้ช้าลงโดยการสร้างสารอุดตันบริเวณปลายท่อน้ำยาง [1] จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า บริเวณจุดคั่นที่ปลายท่อน้ำยางจะมียางที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนอุดอยู่และจะพบยางที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนหนาแน่นต่างกันไป บริเวณปลายท่อน้ำยางที่อุดตันด้วย โดยจะพบชิ้นส่วนของอนุภาคจุลชีพที่สลายแล้วปนอยู่ในยางที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนด้วย [2]

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับตัวบ่งชี้ถึงความไม่เสถียร (rusting index) ของ latex โดยพบว่าหากอนุภาคจุลชีพในน้ำยางมีความเสถียรน้อย จะทำให้ท่อน้ำยางเกิดการอุดตันเร็ว และได้ปริมาณผลผลิตยางน้อยด้วย [3,4] ภายใน latex เองจะมีเอนไซม์ที่สามารถใช้  $O_2$  ในการออกซิไดส์ NADH คือเอนไซม์ NADH- $O_2$ -reductase ปฏิริยาที่ถูกรังโดยเอนไซม์ NADH- $O_2$ -reductase จะให้  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  และ  $OH^-$  ซึ่งเป็นพิษต่อผนังเซลล์โดยนำปฏิกิริยาไปก่อเกิดการสลายของไขมันในเมมเบรนของจุลชีพ ส่งผลให้จุลชีพแตก [5] นอกจากนั้น ผลการศึกษโดย Waitait et al. [6] Viljoen et al. [7] และ Lim et al. [8] ชี้แนะว่า quinone น่าจะเป็นตัวกลางร่วมในปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ NADH- $O_2$ -reductase เพราะในส่วนของกลิ่นกลอด หรือจุลชีพ ที่ได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสด จะมีทั้ง ubiquinone และ plastoquinone เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย จึงอาจเรียกเอนไซม์ NADH- $O_2$ -reductase ว่า NADH quinone reductase

ยางพันธุ์ที่นิยมปลูกในปัจจุบันได้มาจากการดัดแปร ซึ่งจะเห็นว่ายางค้อต่าพันธุ์ดีแต่ละต้นประกอบไปด้วยต้นยาง 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนของดอกยาง ถ้าพันธุ์ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนของลำต้น พันธุ์ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนของดอกยางได้มาจากการเพาะเมล็ด ยางพารา ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสายพันธุ์ใด เพราะในสภาพธรรมชาติยางพาราเป็นพืชผสมข้ามต้น ส่วนพันธุ์ที่ทำหน้าที่เป็นส่วนของลำต้นเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งมีได้แก่พันธุ์ KREM 600 และ GT1

การที่ต้นยางค้อต่าพันธุ์ดีแต่ละต้นประกอบด้วย 2 สายพันธุ์นี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตยางค้อต่าพันธุ์กรีดมีระดับความแปรปรวนที่ค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเป็นมาจากสาเหตุความ

สามารถในการเข้ากัน ได้ของลักษณะพันธุ์ที่ประกอบกันขึ้นเป็นต้นกล้าตรงต่อค่านั้น ๆ ในสวนยางพันธุ์ที่ให้ผลผลิตแล้วพบว่าต้นที่ให้ผลผลิตสูงให้ผลผลิตคิดเป็นน้ำหนักยางแห้งสูงกว่าต้นที่ให้ผลผลิตต่ำถึง 5-6 เท่าตัวต่อครั้งกรีต และจำนวนต้นที่ให้ผลผลิตสูงมีอยู่ไม่ถึง 20% ของต้นยางทั้งหมด หากมีวิธีคัดเลือกเฉพาะต้นกล้าต่อค้ำที่ให้ผลผลิตสูงไปปลูกก็จะทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมาก [9]

ต้นยางที่ให้ผลผลิตสูงคือต้นยางที่มีความสามารถในการไหลได้นานเมื่อถูกกรีตพร้อมทั้งมีความสามารถในการสร้างน้ำยางทดแทนน้ำยางที่ถูกกรีตออกไปในครั้งก่อน ได้ดีเพราะฉะนั้นการศึกษาวิจิตถึงตัวบ่งชี้ศักยภาพการให้ผลผลิตยางพารา จึงต้องประกอบด้วยตัวบ่งชี้ด้านความสามารถในการสร้างน้ำยางควบคู่ไปกับการไหลได้ดี

ข้อมูลที่ศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวบ่งชี้ด้านความสามารถในการสร้างน้ำยางพาราจะมีหลายรูปแบบได้แก่ น่าจะเป็นเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่อยู่ในวิถีชีวสังเคราะห์ยาง (9-14) แต่สำหรับตัวบ่งชี้ด้านความสามารถในการไหลนั้นยังไม่มีข้อมูลเพียงพอที่จะสรุปได้ งานวิจัยเรื่องนี้จึงประสงค์ที่จะศึกษาเกี่ยวกับ กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับของฟ่อน้ำยาง เพื่อค้นหาตัวบ่งชี้ด้านความสามารถในการไหลของน้ำยาง

## 2. วิธีการทดลอง

ได้แยกการศึกษาวิธการทำการทดลอง ถึงกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดต้นของ  
ท่อน้ำยาง ออกเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ [enzymatic process  
(2A)] และที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ [non-enzymatic (2B) process] โดย

2A.) Enzymatic process ครอบคลุมการศึกษาถึง

- 2A.1) NAD(P)H quinone reductase ใน bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex
- 2A.2) Peroxidase ขบวนการเลือกไม้ยางที่ได้จากการกรีต
- 2A.3) Polyphenol oxidase ใน bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex
- 2A.4) การศึกษาสาร phenols ใน C-serum
- 2A.5) การศึกษา quinone จาก bottom fraction

2B.) Non-enzymatic process ครอบคลุมการศึกษาถึง

- 2B.1) ลูทอยดีน (luteidin) จากอนุภาคลูทอยด์ของ bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex
- 2B.2) โปรตีนที่เกาะจับจำเพาะกับลูทอยดีนจากอนุภาคน้ำยาง (rubber particle-luteidin binding protein, RP-LBP) ใน rubber fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex
- 2B.3) โปรตีนที่เกาะจับจำเพาะกับลูทอยดีนจาก C-serum (C-serum - luteidin binding protein, C-LBP) ที่แยกได้จาก centrifuged latex

โดยมีรายละเอียดของวิธีการทดลองดังนี้-

### 2A.1 Enzymatic process

#### วิธีการทดลองร่วม

##### 2A.a) การเตรียมและแยกส่วนน้ำยาง

การเตรียมน้ำยางสดทำได้โดยการกรีดชาน้ำยางสดๆจากต้น โดยทำการรองรับน้ำยางลงใน  
ถุงพลาสติกที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง โดยเริ่มเก็บน้ำยางหลังจากปล่อยทิ้งไว้ให้ไหลออกประมาณ 15  
นาทีหลังการกรีด นำน้ำยางไปแยกส่วนโดยปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 59,000  
g เป็นเวลา 45 นาที น้ำยางจะแยกออกเป็น 3 ส่วนคือ ชั้นบนสุดเป็นชั้นของสีขาวประกอบด้วย  
อนุภาคน้ำยาง ชั้นกลางเป็นชั้นของเหลวใส (C-serum) และชั้นล่างสุดหรือชั้นก้นหลอดคือชั้น  
ประกอบด้วยอนุภาคลูทอยด์

## 2A.b) การหาค่าน้ำหนักของต่อครั้งกรด

นำน้ำยาที่กริดได้จากแต่ละต้นไปวัดปริมาตรแล้วนำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  จนแห้งสนิท (ทดสอบโดยนำไปชั่งจนได้น้ำหนักคงที่) แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนัก

## 2A.c) การหาค่า isoelectric point

ค่า isoelectric point สามารถหาได้จากการนำไปโปรตีนไปทำ isoelectric focusing ใน 5% polyacrylamide gel ที่มี 2% Bio-Lyte pH range 3-10 ampholyte โดยใช้เครื่องมือ Mini BE Cell (Biorad) โดยเพิ่มระดับต่างศักย์ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และใช้โปรตีนที่มีค่า pI มาตรฐานมาใช้ในการเปรียบเทียบ

## 2A.d) การหาผลของ pH และ อุณหภูมิ

ผลของ pH และ อุณหภูมิที่มีต่อโปรตีน สามารถทำได้โดยนำไปโปรตีนที่ต้องการศึกษาไป incubate ที่ระดับ pH ต่างๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นปรับสภาพให้เหมือนกัน แล้วจึงนำไปหาแยกตัวดีของโปรตีนนั้นๆต่อไป

## 2A.e) การทำ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

การทำ SDS-PAGE ใช้ตามวิธีของ Laemmli [15] โดยใช้ Coomassie brilliant blue R ในการย้อมโปรตีน ด้วย Fuchsin หรือ Alcian blue ในการย้อม โกลโคโปรตีน

การทำ semi-SDS-PAGE เพื่อแยกแอกติวิตีของเอนไซม์นั้น ที่ใช้วิธีเดียวกันกับการย้อม sample ที่ใช้ load จะไม่มี SDS และไม่ต้องการการต้ม และเมื่อ run electrophoresis เสร็จแล้วจะทำการชะ SDS ออกจากแผ่นเจล โดยนำไปจุ่มแช่ใน 2M ของสารละลาย isopropanol ก่อนนำไปทำการย้อมหาแอกติวิตีของเอนไซม์นั้นๆ

การวัด non-denaturing PAGE เพื่อน้ำหนักโมเลกุลรวม ตามวิธีใน Sigma Tech. Bulletin No. MKR-137 (1986) ทำโดย run PAGE ในสภาพที่ไม่มี SDS โดยใช้โปรตีนมาตรฐาน ที่รู้ค่าน้ำหนักโมเลกุลในการเปรียบเทียบน้ำหนักที่ได้จากการ run PAGE โดยใช้แผ่นเจล ที่มีระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คำนวณค่า  $R_f$  ของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นของผล แล้วนำค่า  $R_f$  ของโปรตีนแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นของผลต่างๆ ไปหาค่า  $\log$  จากสูตร  $100 \log (R_f \times 100)$  นำค่าอันเรจที่ได้ไปเขียนกราฟโดยให้แกน Y เป็นค่าความเข้มข้นที่ได้จากสูตร และแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของผล ก็จะได้ค่า slope จากนั้นจึงเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง slope กับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานแต่ละชนิด และนำค่า slope ของโปรตีนที่ต้องการหาไปหาค่าน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานต่อไป

## 2A.f) การหาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนสามารถหาได้โดยใช้วิธีของ Lowry et al. [16]

## วิธีการทดลองแยก

### 2A.1) NAD(P)H quinone reductase (QR)

#### 2A.1.1) การ assay QR

การทำ spectrophotometric assay ของ QR ใช้ปริมาตรรวมทั้งสิ้น 1 mL โดยมี 5 mM menadione, 20 mM NADH และ เอนไซม์ อย่างละ 10  $\mu$ l รวมอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 โดยดูค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงของ NADH ที่  $A_{340}/min$

#### 2A.1.2) การทำบริสุทธิ์ QR

##### 2A.1.2.1) การสกัดและทำบริสุทธิ์ QR

ได้เริ่มการสกัด QR โดยนำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่รอบเพียว 59,000g เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นของ bottom (lutoid) fraction เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ QR โดยนำไปตกตะกอนด้วย acetone 1:9 (w/v) แล้วนำส่วนของตะกอนไปละลายในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 แล้วนำไปตกตะกอนด้วย เกลือ  $(NH_4)_2SO_4$  ระหว่างช่วงความเข้มข้น 20-60% ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ปริมาตร 3 mL หลังจากนั้นก็นำไปทำบริสุทธิ์ต่อไปโดยการแยกผ่านคอลัมน์ต่างๆตามลำดับดังนี้:

##### 2A.1.2.1.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B

นำสารละลายตะกอนที่ได้หลังจากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือ  $(NH_4)_2SO_4$  ปริมาตร 3 mL ไป load ลงบน คอลัมน์ Sepharose 6B ขนาด  $1.5 \times 113$  cm. แล้วจะโดยการผ่าน บัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ลงไปโดยใช้อัตราการไหล 18 mL/min พร้อมทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 1 mL

##### 2A.1.2.1.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B

รวบรวมสารละลายที่เป็น peak fraction ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.2.1. ไป load เพื่อ bind กับ DEAE-Sepharose CL-6B ในคอลัมน์ขนาด  $2.7 \times 7$  cm แช่ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการล้างส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ เดิมจนค่า  $A_{280}$  เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind ออก โดยการใช้น้ำบัฟเฟอร์เค็มเติมเกลือ NaCl ด้วยความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.4 N NaCl และตามด้วยเกลือ NaCl ด้วยความเข้มข้น 0.4 N NaCl ผสมอยู่ โดยใช้อัตราการไหล 18 mL/min พร้อมทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 1.8 mL

##### 2A.1.2.1.3) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200

รวบรวมสารละลายที่เป็น peak fraction ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.2.2. ไป load ลงบน คอลัมน์ Sephadex G-200 ขนาด  $1.5 \times 82$  cm. แล้วจะโดยการผ่าน บัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ลงไปโดยใช้อัตราการไหล 11 mL/hr. พร้อมทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 1.1 mL

## 2A.2) Peroxidase (POD)

### 2A.2.1) การ assay POD ทำได้ 2 วิธี คือ

2A.2.1.1) ทำโดยใช้วิธี colorimetric assay ขอบ Shannon et al. [17] โดย assay mixture จะประกอบด้วย 0.5% o-dianisidine, 0.1 ml ของ 0.1 M  $H_2O_2$  ในบัฟเฟอร์ 0.05 M NaOAc, pH 5.4 โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 3 ml ทำการวัดผลผลิตของ POD โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 460 nm. เอนไซม์แอคตวิตี 1 หน่วยคือจำนวนเอนไซม์ที่ต้องใช้สำหรับการเกิดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ 460 nm จำนวน 0.1 O.D./min

2A.2.1.2) ทำโดยใช้วิธี spectrophotometric assay โดย assay mixture จะประกอบด้วย 10  $\mu$ l (4 $\mu$ g) ของ POD บริสุทธิ์ 0.5 ml ของ C-serum phenol, 50  $\mu$ l ของ 0.1 M  $H_2O_2$  ใน 0.05 M ของบัฟเฟอร์ NaOAc (pH 5.4) โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 0.56 ml. วัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงโดยการ scan ช่วงคลื่นตั้งแต่ 200-650 nm.

### 2A.2.2) การสกัดและทำบริสุทธิ์ POD จากเปลือกไม้ยาง

#### 2A.2.2.1) การเตรียมสารสกัดจากเปลือกไม้ยาง

นำเปลือกไม้ยางที่ได้จากการกรีดยางใหม่ๆ ไปล้างด้วยน้ำที่ต้มจนเดือดจนหมด แล้วนำเปลือกที่ไม่มียางติดอยู่ออกแล้วไปล้างให้สะอาด นำเปลือกไม้ยางที่ผ่านการล้างแล้วจำนวน 1.8 kg ไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Waring blender โดยใช้บัฟเฟอร์ 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 (buffer A). นำ homogenate ที่ได้ไปกรองผ่าน cheese cloth เพื่อขจัดเปลือกที่เหลืออกทิ้ง และนำน้ำสกัดสีน้ำตาลที่ได้ไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 20,000g เป็นเวลา 60 min. นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี ultrafiltration (Amicon, 10,000 MW cut-off).

#### 2A.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ POD จากสารสกัดจากเปลือกไม้ยาง

##### 2A.2.2.2.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

นำสารสกัดเข้มข้นที่ได้จากข้อ 2A.2.2.1 ปริมาตร 1 ml. ไป load ลงบนคอลัมน์ Sephadex G-100 (1.8 x 6 cm.) ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย buffer A แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์คั้นที่อัตราการไหล 20 ml/hr. เก็บ fraction ขนาด (1 ml.) ลงในหลอดเพื่อนำไป assay หา POD แล้วรวบรวมหลอดบริเวณ peak fractions ไปทำบริสุทธิ์ต่อ

##### 2A.2.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Cellulose

นำ peak fraction ที่รวบรวมได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 ไป dialyze แล้ว load ลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose (2 x 14 cm.) ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย buffer A แล้วทำการล้างด้วยและชะด้วยบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ที่ความเข้มข้น 0.1 M ผสมอยู่ด้วย ที่อัตราการไหล 15 ml/hr. เก็บ fraction ขนาด (1 ml.) ลงในหลอด เพื่อไป assay หา POD แล้วรวบรวมหลอดบริเวณ peak fractions ไปทำบริสุทธิ์ต่อ

### 2A.2.2.3) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Concanavalin A-Sepharose 4B

นำ peak fraction ที่รวบรวมได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose ไป dialyze แล้ว load ลงในคอลัมน์ Con A-Sepharose 4 B (1 x 5 cm.) ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย buffer A แล้วทำการล้างด้วยและชะด้วยบัฟเฟอร์ที่มี mannose ที่ความเข้มข้น 0.2 M ผสมอยู่ด้วย เก็บ fraction ขนาด (1 ml.) ลงในหลอดทดลองเพื่อนำไป assay หาผลของที่มีต่อกิจกรรมของ peroxidase

### 2A.2.3) การหา น้ำหนักโมเลกุลรวมของ POD

นำ POD ที่ทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Con A-Sepharose 4 B ไป load ลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 (1 x 90 cm.) ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย buffer A แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ เดิมที่อัตราความเร็ว 12 ml/hr. เก็บ fraction ขนาด (1.5 ml.) ลงในหลอดทดลอง เพื่อนำไป วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm พร้อมกับ assay หา POD โดยใช้ lysozyme, pepsin, ovalbumin และ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลรวม

### 2A.2.4) การหาค่า $K_m$

ทำการหาค่าคงที่ Michaelis ของ POD ที่มีต่อซับสเตรต *o*-diaminidine และ  $H_2O_2$  โดย incubate POD บริสุทธิ์ปริมาณ 10  $\mu$ g กับ *o*-diaminidine ที่ความเข้มข้นต่างๆตามที่ได้ บ่งไว้กับ  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้นคงที่และเกินพอ หรือ ทำแบบ vice versa ถ้า  $K_m$  หาได้จาก double reciprocal plots ระหว่างผลควัตถุของอินไฮกับที่ความเข้มข้นของซับสเตรต

### 2A.2.5) การหาค่า $K_i$

ทำจากสารละลาย assay mixture ที่ประกอบด้วย 10  $\mu$ g ของเปอร์ออกซิเดสที่ บริสุทธิ์ กับ *o*-diaminidine, ตัวยับยั้ง KCN หรือ  $NaNO_2$  ที่ความเข้มข้นต่างๆตามที่ได้บ่งไว้กับ  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้นคงที่และเกินพอ โดยทำการหาค่า  $K_i$  ของตัวยับยั้ง จาก Dixon plot

## 2A.3) Polyphenol oxidase (PPO)

### 2A.3.1) assay PPO

แอกติวิตีของ PPO วัดแปลงตามวิธีของ Gonzalez et al. (18) โดยใช้ dopamine เป็นซับสเตรต Incubation mixture ประกอบด้วย 1 ml ของสารละลาย 5 mM dopamine ใน บัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 และ 10  $\mu$ l ของ PPO sample. โดยวัดการเปลี่ยน dopamine เป็น dopaminexluome ที่  $A_{460}$  หน่วยหนึ่งของแอกติวิตีของ PPO มีค่าเท่ากับปริมาณ PPO ที่ทำให้  $A_{460}$  มีค่าเพิ่มขึ้นที่ .001 OD/min

### 2A.3.1) การทำปฏิกิริยา polyphenol oxidase (PPO)

#### 2A.3.2.1) การสกัด PPO

นำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 59,000g เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นของ bottom fraction (90 กรัม) ไปสกัด B-serum โดยทำผ่านกระบวนการ freeze-thaw ที่อุณหภูมิ -60 °C และ 25 °C ทำ 3 ครั้ง แล้วนำไปปั่นแยกเอาส่วนของ supernatant (B-serum) ที่ 10,000 rpm, 20 นาที จากนั้นนำ B-serum ไปแยกส่วนโดยการตกตะกอนด้วย acetone โดยรวบรวมเอาโปรตีนที่ตกตะกอนได้ในช่วงความเข้มข้น acetone 30-50% ไปละลายในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 แล้วนำไปทำปฏิกิริยาคัด

#### 2A.3.2.2) การทำปฏิกิริยาโดย ion exchange chromatography

นำสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้จากข้อ 2A.3.2.1 ไป load เพื่อ bind กับ CM-Sepharose ในคอลัมน์ขนาด 2.5x24 cm แล้วทำการล้างส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl pH 7 จนค่า  $A_{280}$  เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะล้างเกลือ NaCl 0.1 M ที่ผสมอยู่กับบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7 จนค่า  $A_{280}$  เข้าใกล้ศูนย์และชะต่อด้วยเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0.3 M ที่ผสมอยู่กับบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7 โดยใช้อัตราไหล 26 ml/hr แยกเก็บ fraction ละ 2 ml. รวมรวม peak fractions ที่ได้การสีออกมาขึ้นต่อไป

### 2A.4) การศึกษาสาร phenols ใน C-serum

#### 2A.4.1) การเตรียมสาร phenols

นำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 59,000g เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นของ C-serum ปริมาตร 60 ml ไปปรับ pH เป็น 12 ด้วย 1 N NaOH แล้วนำไปปั่นแยกที่ 5,000 rpm, 20 min โดยแยกเอาส่วนของ supernatant แล้วสกัด non-policolic phenols ออกด้วย chloroform โดยใช้ chloroform ในปริมาณที่เท่ากัน (1:1, v/v) แยกเอาส่วนชั้นบน (aqueous phase) ไปปรับ pH เป็น 2 ด้วย 6 M HCl แล้วนำไปปั่นแยกที่ 5,000 rpm, 20 นาที โดยแยกเอาส่วนของ supernatant แล้วสกัด phenols ด้วย chloroform โดยใช้ chloroform ในปริมาณที่เท่ากัน (1:1, v/v) แยกเอาส่วนชั้นล่าง (organic phase) ไประเหยเอา chloroform ออกแล้วละลายสาร phenols ที่เหลือด้วย methanol เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อว่าประกอบด้วย phenols ชนิดใดบ้าง หรือ บัฟเฟอร์ 50 mM NaOAc, pH 5.4 สำหรับนำไปใช้เป็นสปีดตัวในการ assay PPO ในน้ำยาง และ POD ในเปลือกชา

#### 2A.4.2) การวิเคราะห์ชนิดของ phenols ด้วย HPLC

นำสารละลาย C-serum phenol ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.1 และสารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย phenols 4 ชนิดคือ p-cummaric acid, hydroxy benzoic acid, gallic acid and

caffeic acid ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.5 mg/ml, ปริมาตร 5  $\mu$ l ไป inject เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ ODS reversed-phase ขนาด 25 cm  $\times$  2.0 mm ใช้สารละลาย methanol/acetonitrile (30/70, v/v) เป็นตัวชะด้วยอัตราความเร็ว 0.2 ml/min

#### 2A.4.3) การวิเคราะห์ชนิดของ phenols ด้วย GC

นำสารละลาย C-serum phenol ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.1 และสารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย phenols 19 ชนิดใน methanol ปริมาตร 100  $\mu$ l ไปทำ trimethylsilyl derivization โดยนำไม่หยดกับ 10  $\mu$ l N,N-bis(trimethylsilyl)acetamide แล้วนำไปอบที่ 60  $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไป inject เข้าเครื่อง GC โดยใช้คอลัมน์ BP-1, 25 m, ID 0.25 mm, ที่อุณหภูมิคงที่ 280  $^{\circ}$ C [ โดยเริ่มแรกตั้งอุณหภูมิที่ 150  $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นค่อยๆเพิ่ม (5  $^{\circ}$ C/ นาที) เป็น 280  $^{\circ}$ C] ใช้ He (head pressure 45kPa) เป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) ใช้ flame ionization detector เป็นตัวตรวจวัดที่ 280  $^{\circ}$ C

#### 2A.4.4) การทดสอบ C-serum phenol กับความเป็น *in vivo* substrate ขอบ

##### 2A.4.4.1) PPO จากน้ำยาง

เตรียม incubation mixture ที่ประกอบด้วย 500  $\mu$ l ของ C-serum phenol ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ 50 mM NaOAc, pH 5.4, 250  $\mu$ l ของ 50 mM NaOAc, pH 5.4, 150  $\mu$ l ของ 1 M  $MgCl_2$  และ 100  $\mu$ l ของ PPO ที่ได้จาก peak tube ของการทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ CM-Sephacose หลังจากผสมสารต่างๆใน cuvette สำหรับทำ assay เรียบร้อยแล้ว นำไป scan ดูค่า absorbance ในช่วงคลื่น 200-600 nm ทั้งที่ และในช่วง 10, 20 และ 40 นาทีถัดไป

##### 2A.4.4.2) POD จากเปลือกยาง

เตรียม incubation mixture ประกอบด้วย 500  $\mu$ l ของ C-serum phenol ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ 50 mM NaOAc, pH 5.4, 100  $\mu$ l ของ 0.1 M  $H_2O_2$  และ 10  $\mu$ l (4  $\mu$ g) ของ POD ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเปลือกยางหลังจากผสมสารต่างๆใน cuvette สำหรับทำ assay เรียบร้อยแล้ว นำไป scan ดูค่า absorbance ในช่วงคลื่น 200-600 nm ทั้งที่

#### 2A.5) การศึกษา quinone จาก bottom fraction

##### 2A.5.1) การแยกและทำบริสุทธิ์ quinone

นำ bottom (lutoid) fraction ที่ได้จากทำน้ำมันแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ผกัด้วย hexane (1:1; v/v) 3 ครั้ง รวบรวมชั้น hexane ที่สกัดได้ไปล้างด้วย 50% MeOH 2 ครั้ง เติมน sodium sulfate ลงไป แล้วนำ solvent ที่สกัดได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ละลายสารด้วย MeOH แล้วนำทำบริสุทธิ์ต่อโดยอาศัยการแยกบนแผ่น silica gel (TLC) โดยใช้สารละลาย  $CHCl_3$ :hexane (80:20; v/v) เป็นตัวชะ ( Barr and Crane [19]) ที่ทำการ spot ที่แยก

และเห็นได้ได้แสง uv ทั้ง 7 spot ด้วย MeOH เพื่อนำไปทำ active quinone fraction เพื่อใช้เป็น  
สปีดเรทของ QR

2A.5.2.) อิทธิพลของ quinone ต่อการแตกของลูทอยด์กับการจับกลุ่มของอนุภาคยาง

2A.5.2.1) การเตรียมอนุภาคลูทอยด์ (intact luteoid)

นำ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสด ไปล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ isotonic buffered saline (IBS) ซึ่งประกอบด้วย 0.9% NaCl ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 โดยนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 10,000xg, 4 °C, เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอน intact luteoid ไปเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ IBS ในอัตราส่วน 1:5 (w/v) ก่อนใช้ในการทดลอง

2A.5.2.2) การเตรียมอนุภาคยาง (intact rubber particle, RP)

นำชิ้นอนุภาคยางที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสด ตามบริเวณด้านล่างถัดจากชั้น C-serum ไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ IBS จำนวน 3 ครั้ง โดยการปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 xg, 4°C, เป็นเวลา 10 นาที นำชิ้นบนของอนุภาคยางไปเจือจางให้ได้ค่า  $A_{600} = 0.8$  ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

2A.5.2.3) การทดสอบอิทธิพลของ quinone ต่อการแตกของลูทอยด์กับจับกลุ่มของอนุภาคยาง

ทำโดยการเตรียม reaction mixture A, B และ C ในบัฟเฟอร์ IBS ปริมาตรรวม 45  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วยสารละลายอนุภาคลูทอยด์ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.2.1) 20  $\mu$ l, 0.14 mM NADH 10  $\mu$ l และ บัฟเฟอร์ IBS (A) หรือมีการใส่สารละลาย quinone ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.1) ปริมาตร 5 และ 10  $\mu$ l ลงไปใบ (B) และ (C) ตามลำดับ โดยผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตาม 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายอนุภาคยางที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.2.2 ลงไป 5  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอีก 10 นาที ผสมสารละลายสีด้วย Fuchsin ลงไปให้เข้ากัน แล้วดูดใส่ใน hematocrit tube จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง hematocrit microfuge เพื่อทำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางบริเวณด้านบนของหลอดพร้อมกับการทาสีไปของอนุภาคลูทอยด์บริเวณก้นหลอด โดยดูจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 300 เท่า

2A.5.2.4) การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ quinone และ QR กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักยางแห้งที่ได้ต่อครั้งกรีด

2A.5.2.4.1) ทำการกรีดและเก็บน้ำยางจากยางพันธุ์ RRIM600 แยกต้นจำนวน 9 ต้น จนหมดไหล ทำการวัดปริมาณครั้นยาง และน้ำหนักยางแห้งที่ได้ของแต่ละต้น โดยคิดเป็นค่าครั้งกรีด

2A.5.2.4.2) การวัดปริมาณ quinone นั้น ทำการสกัด quinone จากน้ำยางที่ได้มา จากต้นยางแต่ละต้น เช่นเดียวกับข้อ 2A.4.1 แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 302 nm

2A.5.2.4.3) การวัดปริมาณ QR ทำโดยนำ bottom fraction จากยางแต่ละต้น ไปผ่านขั้นตอน freeze-thawed 2-3 ครั้ง แล้วปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนใสไปวัดแยกตัววัดของเอนไซม์ โดยใช้ dichlorophenol-indophenol (DCPIP) เป็นสับสเตรท โดยมี incubation mixture (1.6 ml) ประกอบด้วย 10  $\mu$ l NADH (20 mM), 1ml ของ 60  $\mu$ M DCPIP ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris, pH 8.0 และ 10-50  $\mu$ l ของ QR sample โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่  $\lambda_{620}$

## 2B.) Non-enzymatic process

### 2B.1) Lutoidin

#### 2B.1.1) HT assay lutoidin

##### 2B.1.1.1) Hemagglutination assay (H.A.)

การวัดแอกทีวิตีของลูตอยดิน สามารถวัดได้จากการดูการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงซึ่งเตรียมได้โดยการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงของเลือดกระต่าย แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่มีปริมาณ NaCl ผสมอยู่ 9.5% จำนวน 3 ครั้ง ทำการ assay การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) โดยใช้ U-microtiter plate ที่อุณหภูมิห้อง โดยไปลดสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 50  $\mu$ l ลงในหลุมบนแผ่นไมโครไทดเดอร์ นำสารสกัดลูตอยดินไปทำ serial dilution 1:2 ที่หลุมดังกล่าวตามลำดับ แล้วใส่สารละลายเม็ดเลือดเข้มข้น 2% ลงไปหลุมละ 50  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. แล้วจึงอ่านค่าไทดเดอร์ (titer) ซึ่งถือค่าส่วนที่ได้จากการอ่านเชิงขงหลุมสุดท้ายที่สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

##### 2B.1.1.2) Rubber particle agglutinin assay (RPA.)

แอกทีวิตีของลูตอยดินสามารถวัดได้จาก การทดสอบความสามารถของลูตอยดินในการทำให้อนุภาคยางเกาะกลุ่ม สามารถทำได้โดยการนำอนุภาคยาง (rubber particles) ใน rubber fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge ไปทำ อ้างด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่มีปริมาณ NaCl ผสมอยู่ 9.5% จำนวน 3 ครั้ง ทำการ assay การเกาะกลุ่มของอนุภาคยางในหลอด hematocrit ที่อุณหภูมิห้อง โดยไปลดสารละลายอนุภาคยางปริมาตร 50  $\mu$ l ลงบนแผ่น parafilm นำสารสกัดลูตอยดินปริมาตร 50  $\mu$ l หยดลงไปพร้อมผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง หยดสารละลาย Fuchsin (1 gm. ในสารละลาย 10% ethanol) ปริมาตร 5  $\mu$ l ลงไปพร้อมผสมให้เข้ากัน แล้วดูไว้ในหลอด hematocrit แล้วจึงนำไป centrifuge เพื่อแยกชั้นยางด้วยเครื่อง hematocrit centrifuge เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้ก็ด้วยชุดทรานส์กัมเมซาย 300 เท่า พร้อมเปรียบเทียบกับ control

## 2B.1.2) *PAF assay* ตัวบ่งชี้การทำงานของลูทอลิน:

### 2B.1.2.1) *Hemagglutination inhibition (H.I.) assay*

แอนติบอดี H.I. สามารถวัดได้จากการดูการยับยั้งเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงซึ่งเตรียมได้โดยการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงของเลือดกระต่าย แล้วล้างด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่มีปริมาณ NaCl 0.5% จำนวน 3 ครั้ง ทำการ assay H.I. ทำโดยใช้ U-microtiter plate ที่อุณหภูมิห้อง โดยป้อนสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 50  $\mu$ l ลงในหลุมบนแผ่นไมโครไคลเตอร์ นำลูทอลินไปทำเจือจางด้วย buffer A ให้ได้ค่าไคลเตอร์เป็น 2 ตามวิธี hemagglutination assay ในข้อ 2B.1.1 โดยใช้ลูทอลินที่ความเข้มข้นดังกล่าวปริมาณ 25  $\mu$ l ผสมกับสารละลายตัวบ่งชี้ต่างๆ เช่น fetuin, asialofetuin, mucin, asialomucin, ovomucoid, glucose, galactose, mannose, fucose, arabinose, raffinose, GlcNAc, ManNAc, GalNAc, Chitosan dimer, chitosan trimer, Gal 1 $\rightarrow$ 6 GlcNAc, Gal 1 $\rightarrow$ 3 GlcNAc, 3'NeuNAc-Lac, 5'NeuNAc-Lac,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, chitinase, C-LLBP หรือ RP-LLBP ที่เจือจางปริมาณ 25  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1/2 ชม. แล้วใส่สารละลายเม็ดเลือดเข้มข้น 2% ลงไปหลุมละ 50  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อีก 1 ชม. หลุมที่ไม่สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ ถือว่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวบ่งชี้ที่สามารถทำให้เกิด การยับยั้ง 100% ของการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

### 2B.1.2.2) *Rubber particle agglutination inhibition (RP.I.) assay*

ทำเหมือนข้อ 2B.1.2 ยกเว้นทำการ incubate ลูทอลินกับตัวบ่งชี้ก่อนการนำไปทดสอบขั้นตอน RPA assay

## 2B.1.3) การสกัดและทำบริสุทธิ์ลูทอลินจากขนนกทูแคน

### 2B.1.3.1) การสกัดลูทอลินจากขนนก

นำขนนกสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 59,000g เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นของ bottom fraction (10 กรัม) ไปผสมกับ acetone โดยใช้อัตราส่วน 1:3 (W/V) ส่วนเพื่อให้เกิดการตกตะกอน แยกตะกอนโดยการปั่นแยก (10,000 rpm, 10 min) แล้ว นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่มี 0.2% Triton X-100 แล้วนำสารละลายที่ได้ไปขจัด Triton X-100 ออกโดย incubate กับ SM2 (Biorad) ในอัตราส่วน 10:1 (v/w) เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นแยกเอาส่วนใสหรือสารสกัดลูทอลิน

### 2B.1.3.2) การทำบริสุทธิ์ลูทอลิน

#### 2B.1.3.2.1) การทำบริสุทธิ์โดยการทำ chitin-beads-binding

นำสารสกัดลูทอลินไป bind กับ chitin ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ล้าง โปรตีนส่วนที่ไม่ bind กับไคตินออกด้วยบัฟเฟอร์เดิม (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) จากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind กับไคตินออกโดยการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มีเกลือ

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.5 M) ผสมอยู่ หลังจากนั้นทำการชะดูทอยคิน ออกโดยการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 0.2% Triton X-100 ผสมอยู่

#### 2B.1.3.2.2) การทำบริสุทธิ์โดย ion exchange chromatography

นำสารละลายดูทอยคิน ที่เตรียมได้จากข้อ 2B.1.3.2.1 ไป incubate กับ SM2 เพื่อขจัด Triton X-100 แล้วนำไป load เพื่อ bind กับ DEAE-Sepharose ในคอลัมน์ ขนาด  $1.4 \times 2.5$  cm. แล้วทำการล้างส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ เดิมจนค่า  $A_{280}$  เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind ออกโดยใช้บัฟเฟอร์เดิมแต่มีเกลือ NaCl (0.5 M) ผสมอยู่ หลังจากนั้นทำการชะดูทอยคิน ออกโดยการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 0.2% Triton X-100 ผสมอยู่ โดยใช้อัตราการไหล 1.5 ml/hr แยกเป็น fraction ละ 1 ml.

#### 2B.1.4) การหาค่า native molecular weight ของดูทอยคิน

ทำโดยวิธีหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเมมเบรนโปรตีน ตามวิธีของ Nalecz et. al. [20] โดยนำดูทอยคินหรือทั้งโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักรวมในบัฟเฟอร์ที่มี 0.1% Triton X-100 อยู่ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 แยกผ่านลงใบคอลัมน์ Sepharose 6B ขนาด  $1.2 \times 65$  cm มี bed volume 80 ml ด้วยอัตราการไหล 2 ml/hr โดยแยกเป็น fraction ละ 2 ml ทำการหาความสัมพันธ์กันระหว่าง Stokes's radius กับ inverse error function ของ [1-partition coefficient] ของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อหาพื้นที่น้ำหนักดูทอยคิน

### 2B.2) RP-LBP ( rubber particle-lutoidin binding protein)

#### 2B.2.1) RP assay RP-LBP

ทำเหมือนข้อ 2B.1.2) RP assay ด้วยยัง lutoidin โดยให้ RP-LBP เป็นตัวจับ

#### 2B.2.2) การสกัดและทำบริสุทธิ์ RP-LBP จากอนุภาคยาง

##### 2B.2.2.1) การสกัด RP-LBP จากอนุภาคยาง

นำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 50,000g เป็นเวลา 45 นาที นำชั้นบนสุดหรือชั้นของยางไปแยกเอาเฉพาะบริเวณ zone 2 ซึ่งเป็นชั้นยางด้านที่สัมผัสกับชั้นของ C-scrum ซึ่งมีลักษณะคล้ายวุ้นสีขาวใส ไปทำการล้าง 2-3 ครั้งด้วย isotonic buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.9% NaCl ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ทำการแยกชั้นยางที่ล้างทุกครั้งโดยวิธี ultracentrifugation หลังจากนั้นนำมาสกัดด้วยปริมาณ 5 เท่าของ 0.2% Triton X-100 โดยทำการสกัดนานข้ามคืนแล้วปั่นแยกเพื่อเอาส่วนใสที่สกัดได้

### 2B.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ RP-LBP

#### 2B.2.2.2.1) การทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย acetone

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2B.2.2.1 ไปตกตะกอนด้วย acetone โดยใช้น้ำสารละลายเป็น 2 เท่า ที่  $4^{\circ}\text{C}$  แล้วปั่นแยกเอาตะกอนไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4

#### 2B.2.2.2.2) การทำบริสุทธิ์โดย heat-treatment

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2B.2.2.1 ไปเข็นน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนใส

#### 2B.2.2.2.3) การทำบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE- Sephacel

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2B.2.2.2 ไป load คอลัมน์ bind กับ DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด  $1.8 \times 8 \text{ cm}$  แล้วทำการล้างส่วนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ เดิมจนค่า  $A_{280}$  เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind ออกโดยการใช้น้ำบัฟเฟอร์เดิม หลังจากนั้นทำการชะ RP-LBP ออกโดยการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมแต่มีเกลือ NaCl (0.3 M) ผสมอยู่ โดยใช้อัตราการไหล  $12 \text{ ml/hr}$  แยกเป็น fraction ละ 2 ml.

### 2B.3) C-LBP (C-serum-lutoidin binding protein)

#### 2B.3.1) การ assay C-LBP

กำหนดมีข้อ 2B.1.2) การ assay ด้วยวิธี lutoidin โดยใช้ C-LBP เป็นตัว กับข้อ

#### 2B.3.2) การแยกและทำบริสุทธิ์ C-LBP จาก C-serum

นำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว  $59,000 \times$  เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นส่วนใสชั้นกลาง cytosol หรือ C-serum ปริมาตร 100 ml. ไปตกตะกอนด้วยเกลือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (70-85%) ละลายตะกอนด้วย 50 mM sodium acetate, pH 5.4 แล้วตกตะกอนด้วย acetone ที่  $4^{\circ}\text{C}$  (1/2 v/v) แยกตะกอนการปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แล้วนำไปละลายด้วย 50 mM sodium acetate, pH 5.4 จากนั้นนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไปด้วยการแยกผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300 และ CM-Sephacrose 6B ตามลำดับ

#### 2B.3.2.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300

นำสารละลายตะกอนที่ได้หลังจากขั้นตอนการตกตะกอนด้วย acetone ปริมาตร 3 ml. ไป load ลงบน คอลัมน์ Bio-Gel P-300 ขนาด  $1.5 \times 105 \text{ cm}$  แล้วชะโดยการผ่านบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate, pH 5.4 ลงไปโดยใช้อัตราการไหล  $12.5 \text{ ml/hr}$  พร้อมทั้งทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 3 ml.

### 2B.3.2.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel

รวบรวมสารละลายที่เป็น peak fraction ที่เตรียมได้จากข้อ 2B.3.2.1 ไป load เพื่อ bind กับ DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด 2.4x12 cm. แล้วทำการล้างส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ เคนจนค่า  $A_{280}$  เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind ออกโดยการไล่บัฟเฟอร์เค้นด้วยเกลือ NaCl ผสมอยู่ในระดับความเข้มข้น 0.1 M NaCl แล้วตามด้วย 0.2 M NaCl โดยให้อัตราการไหล 15 ml/hr พร้อมทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 2 ml.

### 3. ผลการทดลอง

ได้ทำการแยก ผลการทดลองการศึกษาถึงกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับของ: พืชน้ำยาง ออกเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ [enzymatic process (3A)] และที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ [non-enzymatic (3B) process] โดย

#### 3A) Enzymatic process การแยกตามการศึกษาถึง

3A.1) NAD(P)H quinone reductase ใน bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex

3A.2) Peroxidase จากเปลือกไม้ยางที่ได้จากการกรีด

3A.3) Polyphenol oxidase ใน bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex

3A.4) การศึกษาสาร phenols ใน C-serum

3A.5) การศึกษาสาร quinone จาก bottom fraction

#### 3B) Non-enzymatic process การแยกตามการศึกษาถึง

3B.1) ลูทอยดิน (luteodin) จากอนุภาคลูทอยด์จาก bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex.

3B.2) โปรตีนที่เกาะจับจำเพาะกับลูทอยดินจากอนุภาค 14 (rubber particle-luteodin binding protein, RP-LBP) ใน rubber fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex.

3B.3) โปรตีนที่เกาะจับจำเพาะกับลูทอยดินจาก C-serum (C-serum - luteodin binding protein, C-LBP) ที่แยกได้จาก centrifuged latex

โดยมีรายละเอียดของผลการทดลองดังนี้:

#### 3A.) Enzymatic process

##### 3A.1) NAD(P)H quinone reductase (QR)

สามารถหามวลที่ QR ได้ 87 กิโล (ตารางที่ 1) โดยอาศัยขั้นตอนมาตรฐานทางชีวเคมีคือ การสกัดละอองด้วย acetone, ammonium sulfate, การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B (รูปที่ 1), DEAE-Sepharose CL-6B (รูปที่ 2) แล้วตามด้วยด้วย Sephadex G-200 gel filtration (รูปที่ 3) โดยจากการทำ SDS-PAGE ค่า  $M_r$  ของ QR ที่ได้ประมาณ 57 kD โดย QR มีความจำเพาะต่อ สปีสเซอร์หลายชนิด ตามลำดับดังนี้ p-benzoquinone>menadione>plumbagin>juglone>duroquinone ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยพบว่า dicumarol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ QR (รูปที่ 4) ส่วน pH ในการทำงานที่เหมาะสมที่สุดคือ 8 (รูปที่ 5) โดย QR สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH จาก ช่วง 6-10 (รูปที่ 6) และ ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C (รูปที่ 7) จากการทำ IEF ของสารละลาย QR จากละอองที่ได้หลังการสกัดด้วย acetone พบว่ามี QR หลายชนิด โดยมีค่า pI เท่ากับ 4.6, 5.0, 6.2, 6.7 และ 7.4 (รูปที่ 8)

## ตารางที่ 1

## ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ QR จากอนุภาคสโตรมา

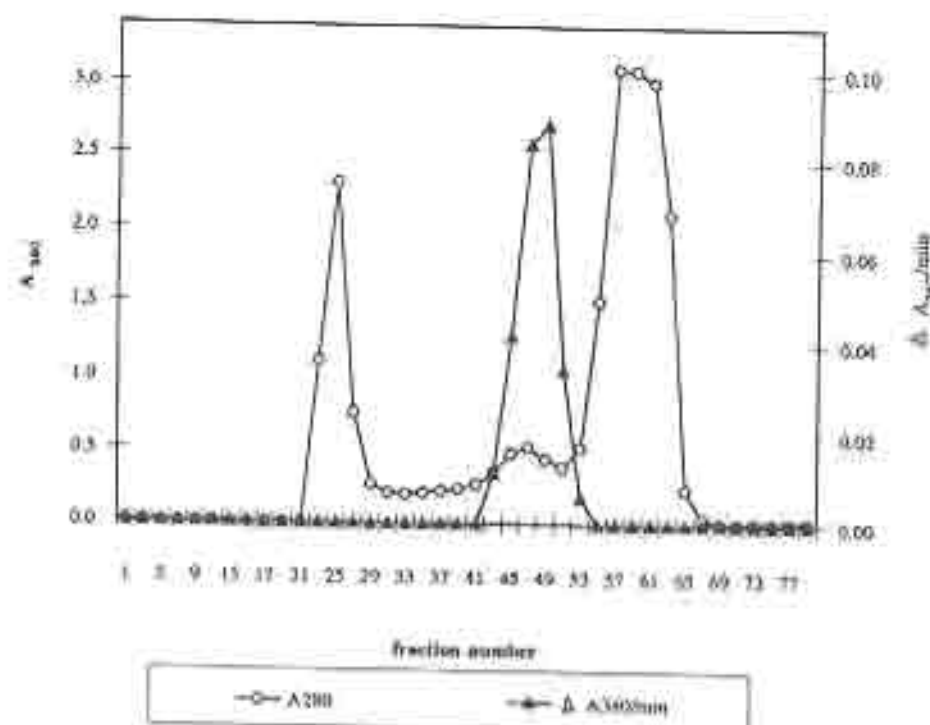
Step	Total protein (mg)	Total activity (unit*)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Acetone ppt.	825.0	6280	7.6	100	1
AmSO <sub>4</sub> ppt.	318.0	5537	17.4	88	2
Sephärose 6B	33.1	4743	143.2	76	19
DEAE-Sephärose- CL-6B	5.9	2911	489.3	46	64
Sephadex G-200	4.1	2701	658.9	43	87

\* One unit of NADH quinone reductase activity was defined as the amount of enzyme required to decrease a change in absorbance of 0.1 at 340 nm per min.

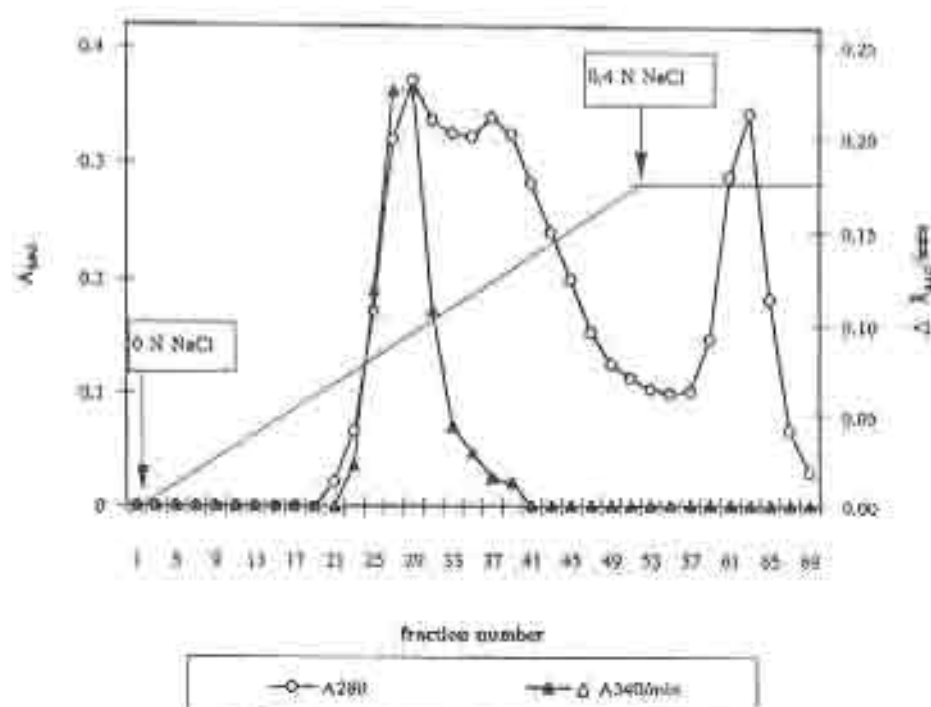
## ตารางที่ 2

## ความจำเพาะของ QR ที่มีต่อลิโปพาท

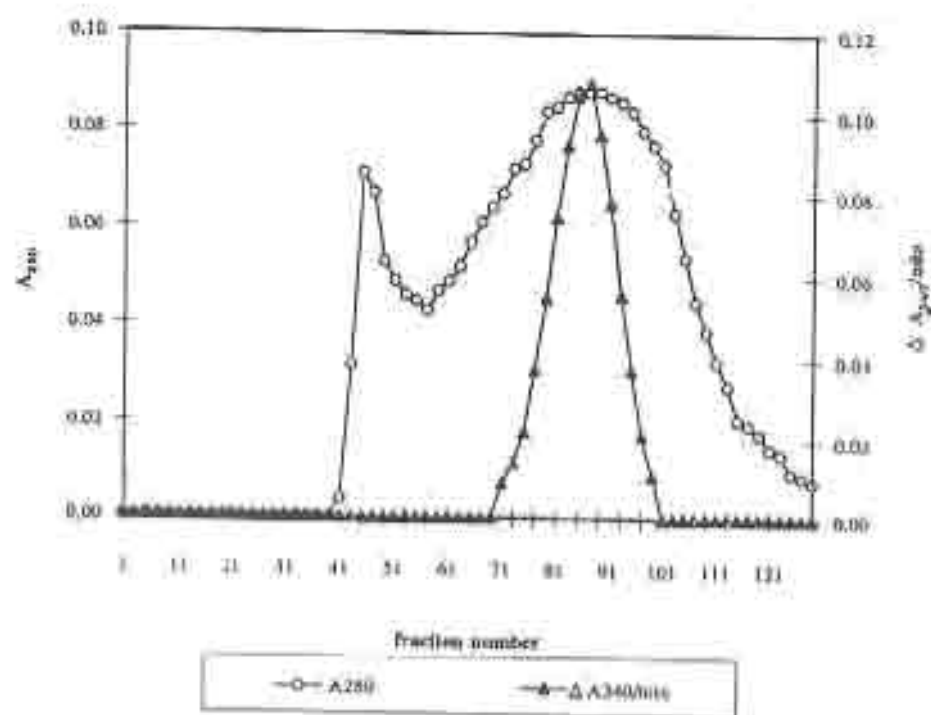
Substrate	Relative activity (%)
Menadiione	100
p-Benzoquinone	122
Duroquinone	78
Juglone	98
Lawsonone	0
Plumbagin	99



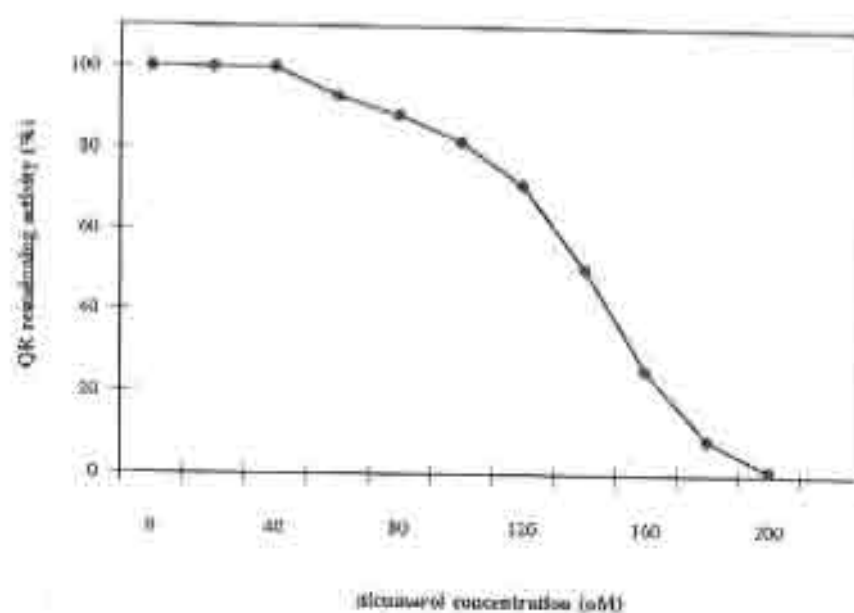
รูปที่ 1 Chromatographic profile จากการทำปฏิกิริยา QR ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B



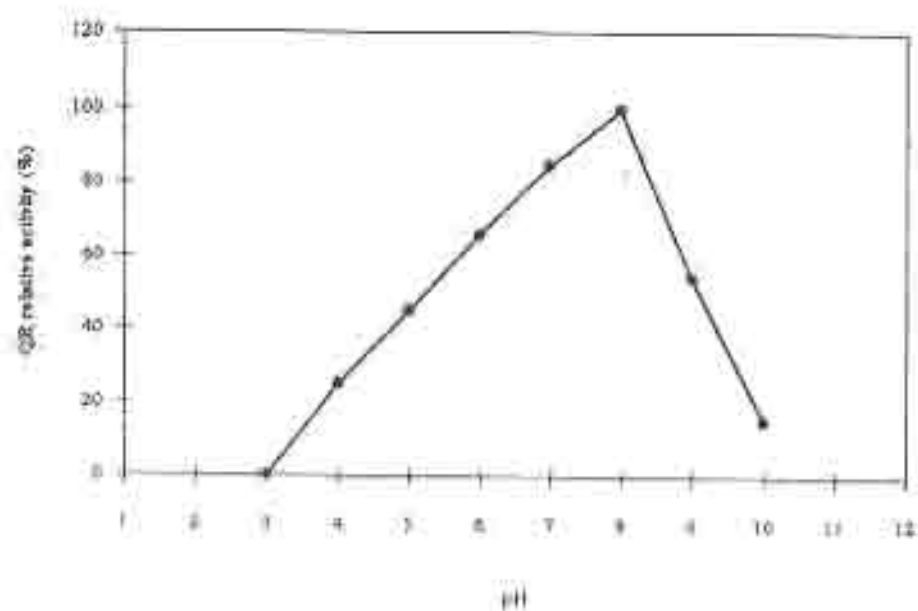
รูปที่ 2 Chromatographic profile จากการทำปฏิกิริยา QR ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B



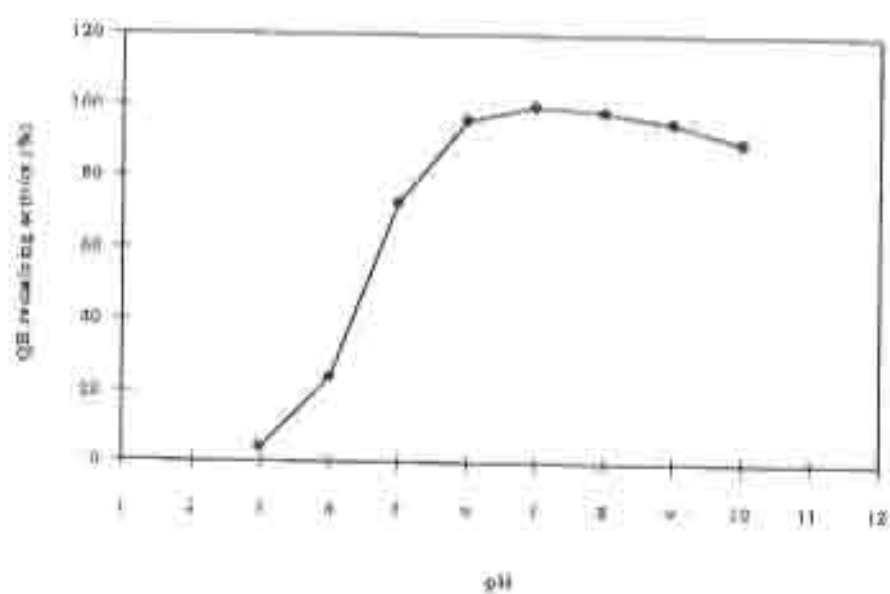
รูปที่ 3 Chromatographic profile ของการทำบริสุทธิ์ QR ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200



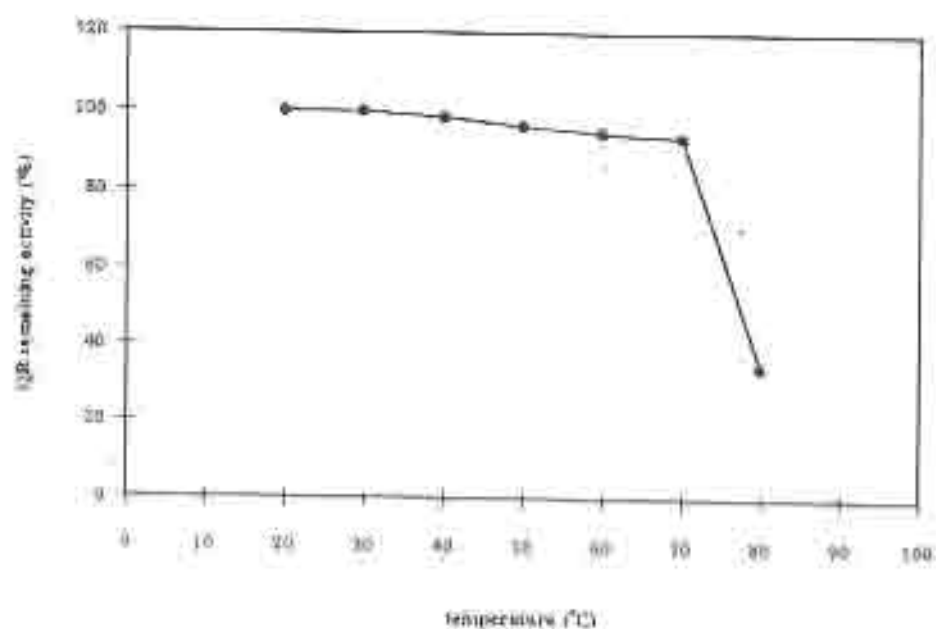
รูปที่ 4 การยับยั้งการทำงานของ QR โดย dicumareol



รูปที่ 5 กราฟของ pH ที่ออกฤทธิ์ได้ของ QR



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ของ pH ของ QR



รูปที่ 7 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ QR



รูปที่ 8 การทำ isoelectric focusing gel electrophoresis ของ QR ที่ได้จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วย acetone

### 3A.2) Peroxidase (POD)

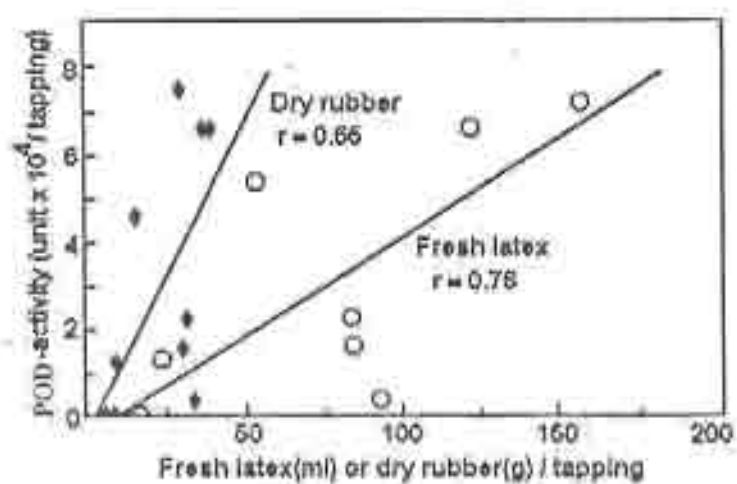
พบว่าปริมาณ POD ที่สกัดได้จากเปลือกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้ง  
 กว้าง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.76 และ 0.65 ตามลำดับ (รูปที่ 9) และยังพบว่า  
 ปริมาณ POD ที่มีในเปลือกต่อหน่วยน้ำหนักจะสูงกว่าที่มีอยู่ในส่วนของ C-serum และ B-serum ที่ได้  
 จากน้ำยางมาก (รูปที่ 10) การทำอิเล็กโตรโฟเรซิส POD ตามตารางที่ 3 โดยอาศัยการแยกผ่านคอลัมน์  
 Sephadex G-100 (รูปที่ 11), DEAE-cellulose (รูปที่ 12), ConA-sepharose 4B (รูปที่ 13) ค่าที่ได้  $M_r$   
 จากการทำ SDS-PAGE (รูปที่ 14) และน้ำหนักโมเลกุลรวม จากการแยกผ่านคอลัมน์ Sephadex G-  
 100 (รูปที่ 15) เท่ากับ 50 kD จากการทำ IEF (รูปที่ 16) พบว่าได้ค่า pI เท่ากับ 3.5 และ การทำงาน  
 ที่อุณหภูมิ คือ pH 5.4 (รูปที่ 17) และทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 40°C (รูปที่ 18) ค่า  $K_m$  ต่อ  
 ซับสเตรต *o*-dianisidine และ  $H_2O_2$  เท่ากับ 20 and 18.6  $\mu M$  (รูปที่ 19,20) ตามลำดับ ค่า  $K_i$  ของตัว  
 ยับยั้ง KCN และ  $NaN_3$  เท่ากับ 34 and 41  $\mu M$  (รูปที่ 21,22) ตามลำดับ เมื่อนำ C-serum phenols ไป  
 ใช้เป็นซับสเตรตของ POD ร่วมกับ  $H_2O_2$ , product ของปฏิกิริยาที่ได้จะมีค่า O.D.เพิ่มขึ้นสูงขึ้นจาก  
 เดิมในช่วงความยาวคลื่น 280 และที่ 420-440 nm (รูปที่ 23)

## ตารางที่ 3

## ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ POD

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit* $\times 10^4$ )	Specific activity (unit $\times 10^4$ /mg)	Yield (%)
Bark extract	1,980	30	1.15	100
Sephadex G-100	175	25	14.3	83
DEAE-Cellulose	3.3	7	200	23
Con. A-Sepharose 4B	0.9	3.6	397	12

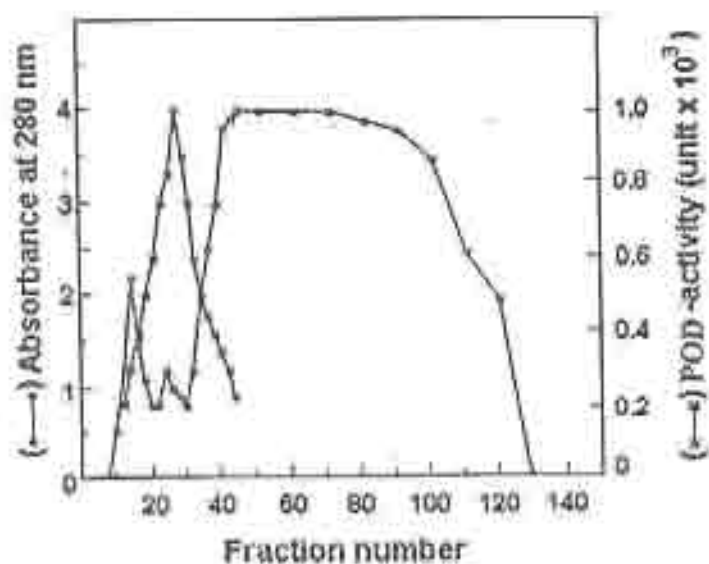
\*One unit activity was defined as the amount of enzyme required to produce a change in absorbance of 0.1 at 460 nm per min.



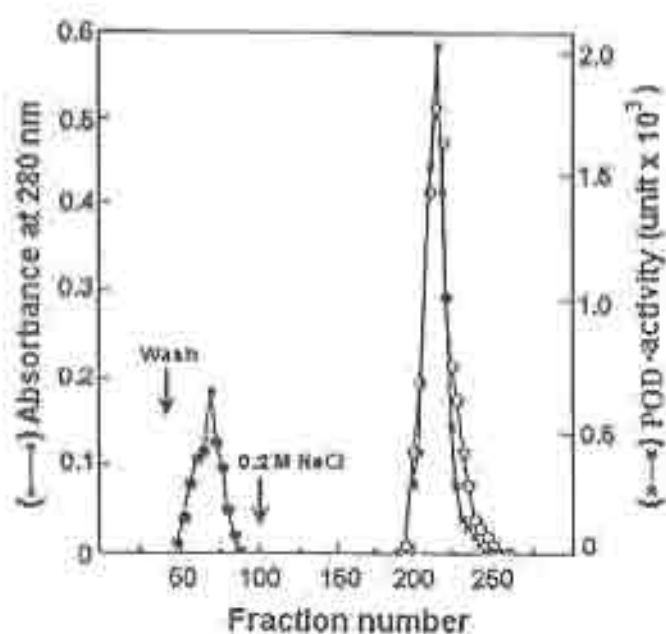
รูปที่ 9. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ POD จากผลัดขนาน  
กับปริมาณคาน้ำยางหรือยางแห้งที่ได้ต่อครั้งกรีด



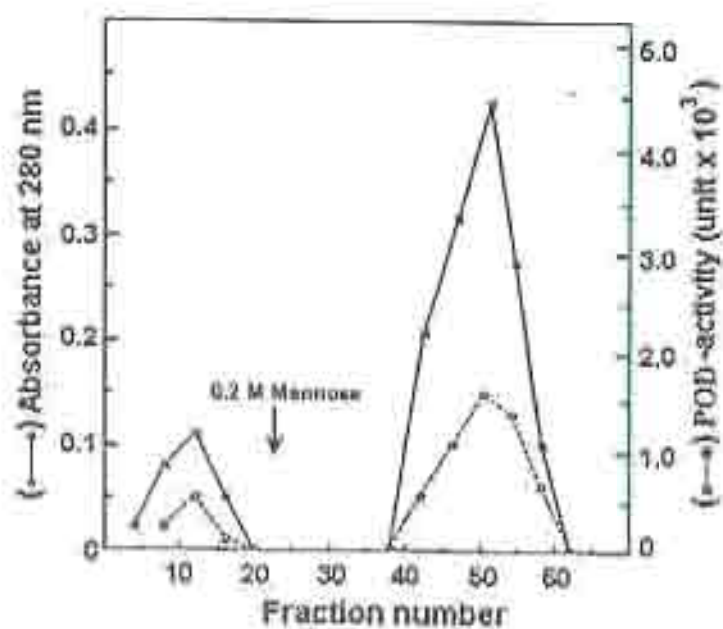
รูปที่ 10. การย้อมแอ็คติวิตีของ POD หลังการทำให้ semi-SDS PAGE จากสารสกัด  
โดยใช้คาน้ำยางหรือยางแห้งที่ต่างกัน A&B, จากเปลือกไม้ยาง, C&D,  
จาก B-serum และ E&F, จาก C-serum



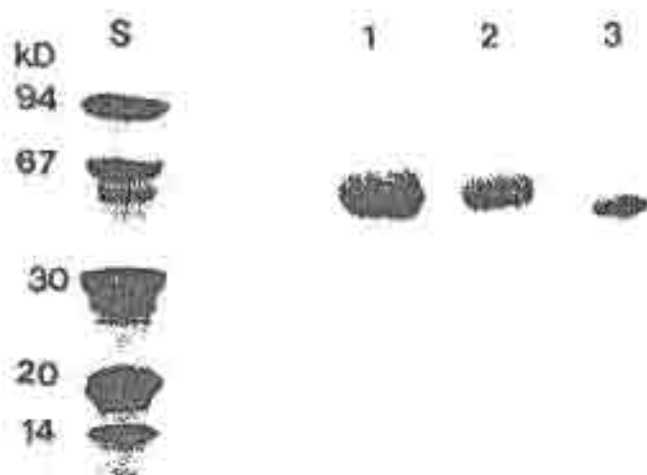
รูปที่ 11. Chromatographic profile ของสารสกัด POD ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100



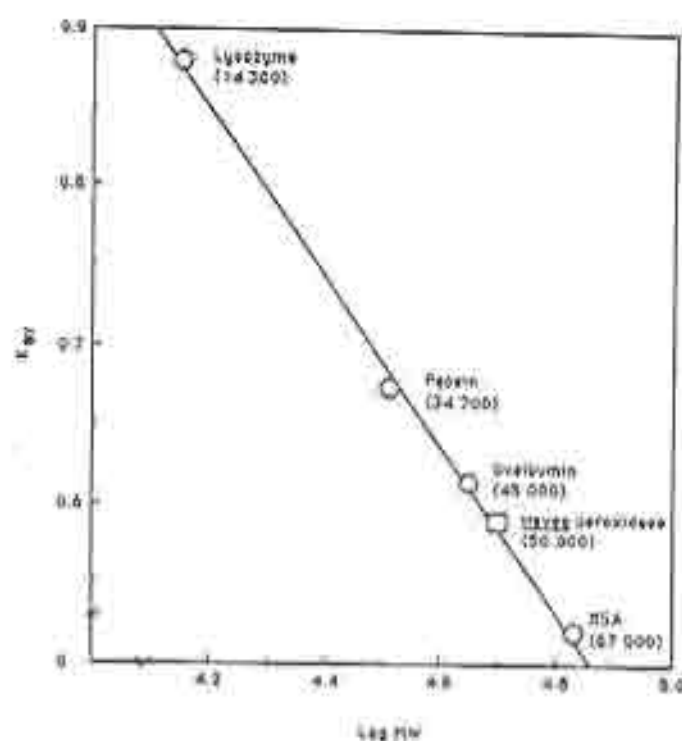
รูปที่ 12. Chromatographic profile ของสารสกัด POD ผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose



รูปที่ 13. Chromatographic profile ของการแยกบริสุทธิ์ POD ผ่านคอลัมน์ Con. A-Sepharose



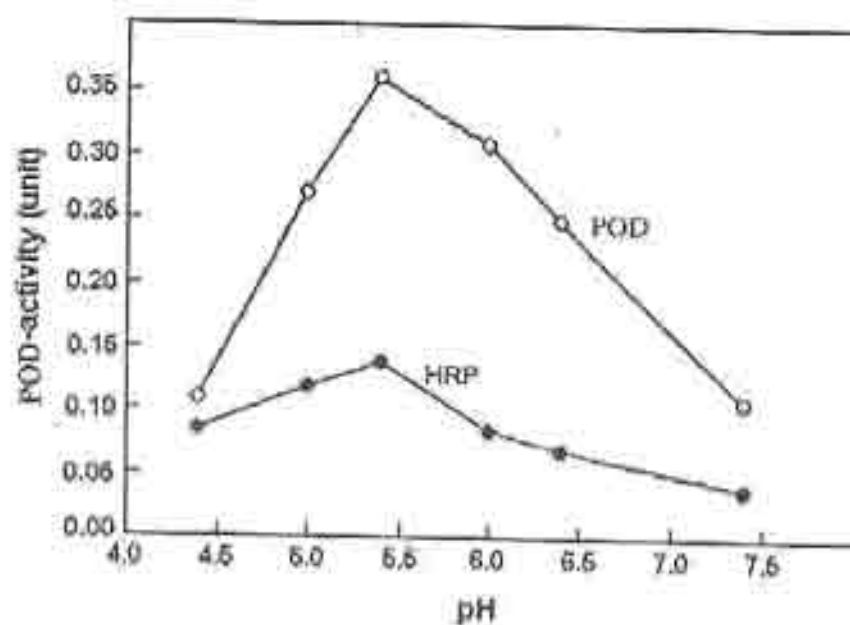
รูปที่ 14. SDS-PAGE ของ POD ที่ได้จากหลังการบำบัดวิธี



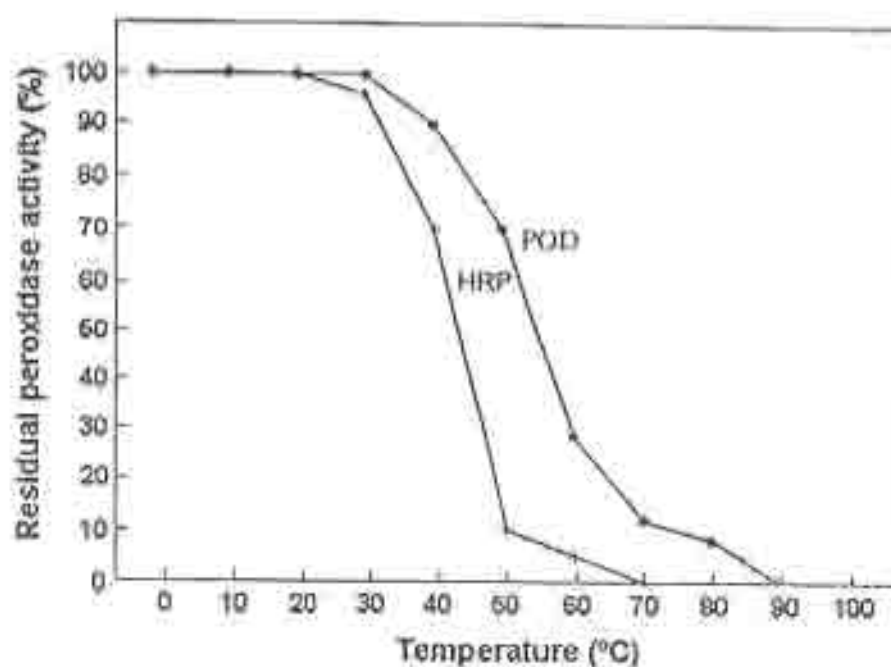
รูปที่ 15. ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\log$  molecular weight กับ partition coefficient ( $K_{av}$ ) ของโปรตีนมาตรฐานกับ POD จากเปลือกไม้ยาง ที่ถนอมวิธีสุกแล้ว โดยทำการแยกผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100



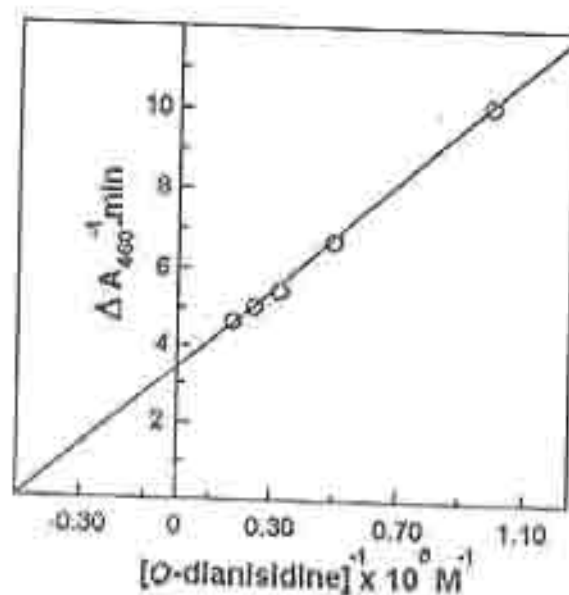
รูปที่ 16. การทำ isoelectric focusing gel electrophoresis ของ POD โดย lane S และ H คือ โปรตีน pI มาตรฐาน และ POD จากเปลือกไม้ยาง ตามลำดับ



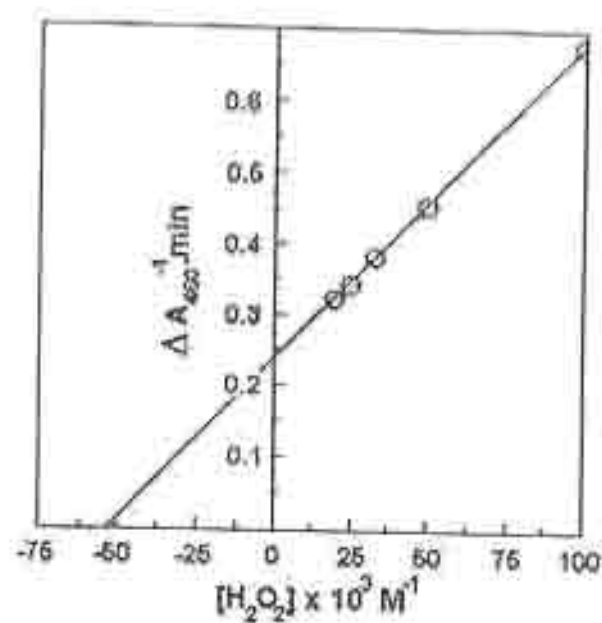
รูปที่ 17. การเปรียบเทียบผลของ pH ต่อแอกติวิตีของ POD จากเปลือกไม้ไผ่ และ horseradish (HRP)



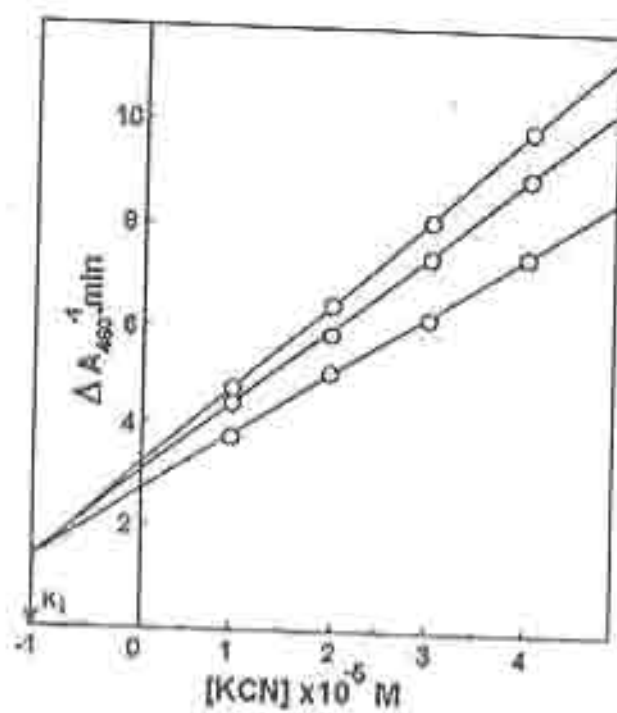
รูปที่ 18. การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ POD จากเปลือกไม้ไผ่ และ horseradish (HRP)



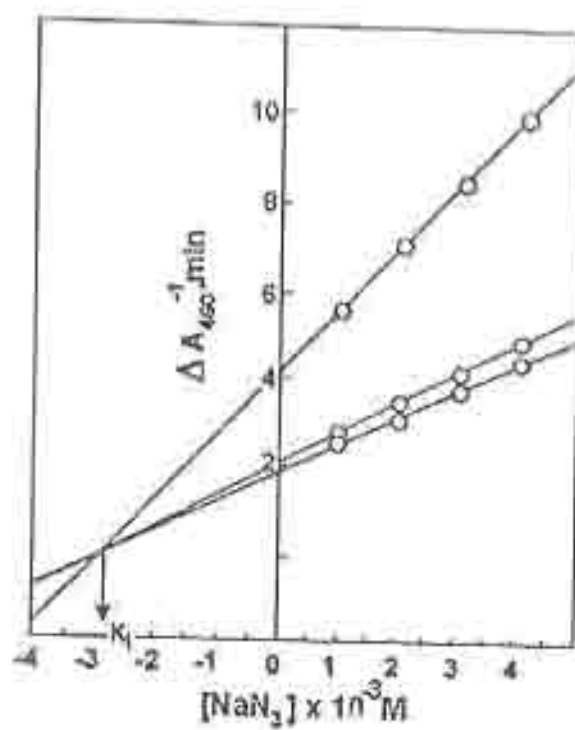
รูปที่ 19. การหา  $K_m$  ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อซับสเตรต *o*-danisidine



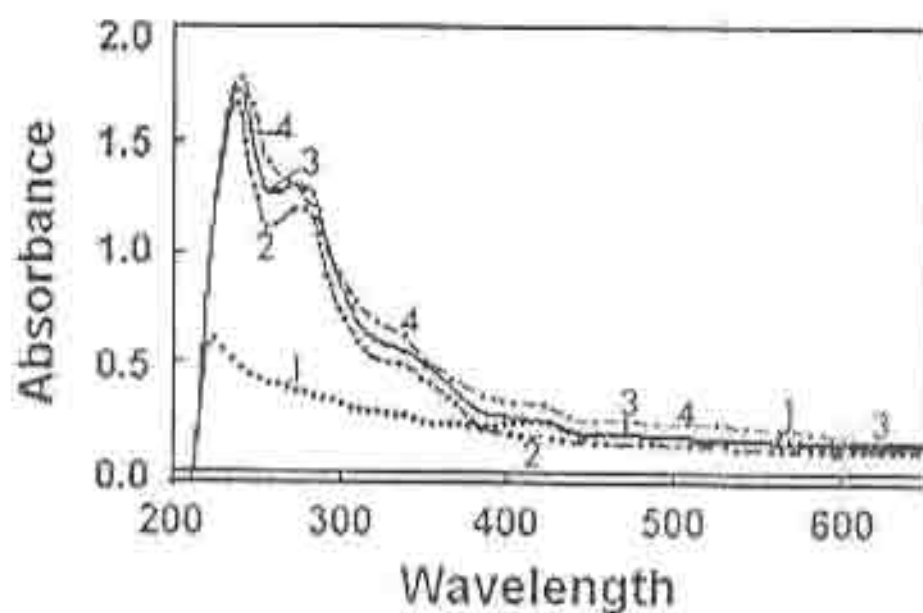
รูปที่ 20. การหา  $K_m$  ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อซับสเตรต  $H_2O_2$



รูปที่ 21. การหา  $K_i$  ของ POD จากปลิงไม้ยาง HBP ต่อตัวยับยั้ง KCN



รูปที่ 22. การหา  $K_i$  ของ POD จากปลิงไม้ยาง HBP ต่อตัวยับยั้ง  $\text{NaN}_3$



รูปที่ 23 สเปกตรัมที่ scan จากช่วง UV-Visible 100-600 nm ของ C-serum ที่ได้รับ treatment ต่างๆ

1. POD จากเปลือกไม้ขาว
2. C-serum phenol
3. POD จากเปลือกไม้ขาว + C-serum phenol
4. POD จากเปลือกไม้ขาว + C-serum phenol +  $H_2O_2$

### 3A.3) Polyphenol oxidase (PPO)

PPO ที่เตรียมได้จาก B-serum ที่ได้จากการนำ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสดไปผ่านชั้นลน freeze-thaw โดยนำสารละลายที่ได้จากการละลายตะกอน B-serum ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ไปทำบนวิธีที่ผ่านคอลัมน์ CM-Sepharose (ตารางที่ 4, รูปที่ 24) จะได้ PPO-I (70%) และ PPO-II (30%) โดยมีค่า  $M_r$  ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 32 และ 34 kD (รูปที่ 25) ตามลำดับ ทั้ง PPO-I และ PPO-II มีค่า  $pI$  เท่ากันคือ 9.3 (รูปที่ 26) มีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 5-8 (รูปที่ 27) และต่ออุณหภูมิสูงถึง 60°C (รูปที่ 28) พบว่าสับ โดพามีน pH และ อุณหภูมิในการทำงานที่เหมาะสมอยู่ที่ pH 7 (รูปที่ 28) และอุณหภูมิในช่วง 35-40°C (รูปที่ 30) ตามลำดับ PPO-II มีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด พบว่าลำดับนี้  $\text{dopamine} > \text{L-dopa} > \text{catechol} > \text{catechin}$  ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อใช้ dopamine และ L-dopa เป็นสับสเตรท PPO-I ให้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 2.08 และ 8.33 mM (รูปที่ 31,32) ส่วน PPO-II ให้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 2.12 และ 4.76 mM (รูปที่ 33, 34) ตามลำดับ

## ตารางที่ 4

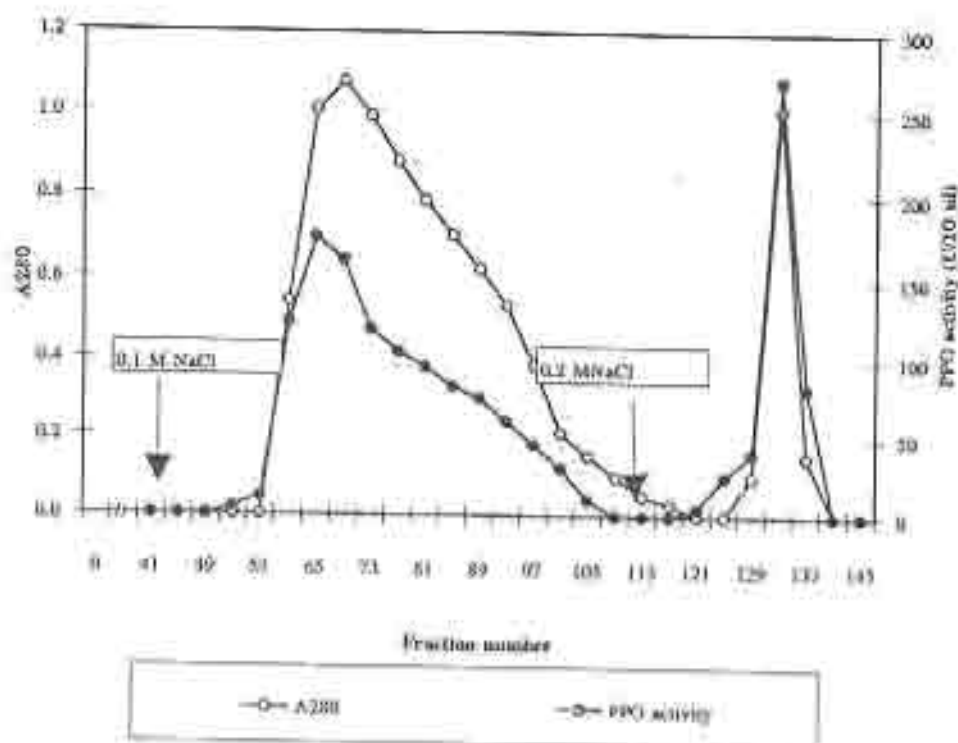
## ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ PPO

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	12,717	603,250	222	100	1
Acetone ppt.	634	3,627,000	5,721	601	26
CM-Sepharose					
PPO-I	100	1,977,360	19,774	328	89
PPO-II	18	860,430	47,802	143	215

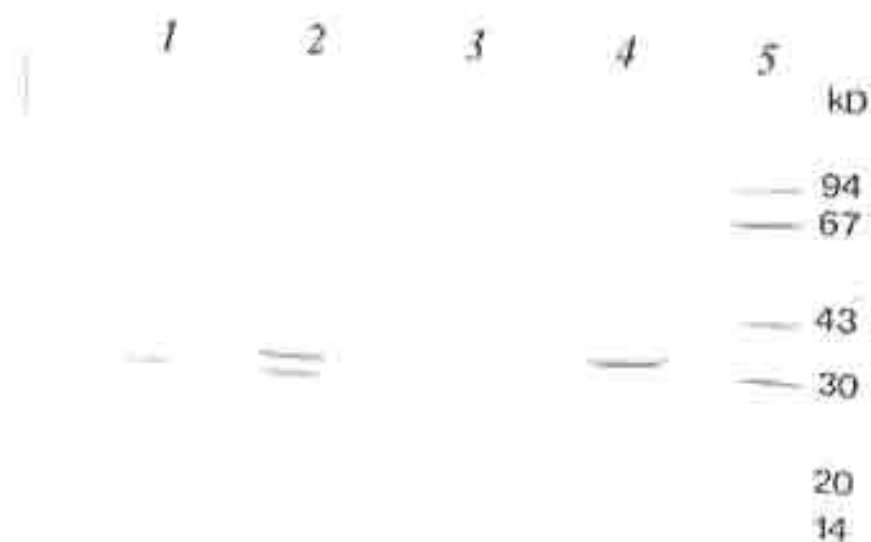
## ตารางที่ 5

## ความจำเพาะของ PPO-II ที่มีต่อสารปฏิกิริยา

Substrate	[S] (mM)	Activity (unit)	Relative activity (%)	Assay wavelength (nm)
Dopamine	5	214	100	460
L-dopa	5	121	57	475
Catechol	5	102	48	410
Catechin	5	37	17	380



รูปที่ 24 Chromatographic profile ของ PPO บนคอลัมน์ CM-Sepharose



รูปที่ 25 SDS-PAGE ของ PPO ที่ได้จากหลังการทำไวรัส

Lane 1 = B-serum      Lane 2 = 30-50% acetone pellet fraction  
 Lane 3 = PPO-I      Lane 4 = PPO-II  
 Lane 5 = standard protein markers

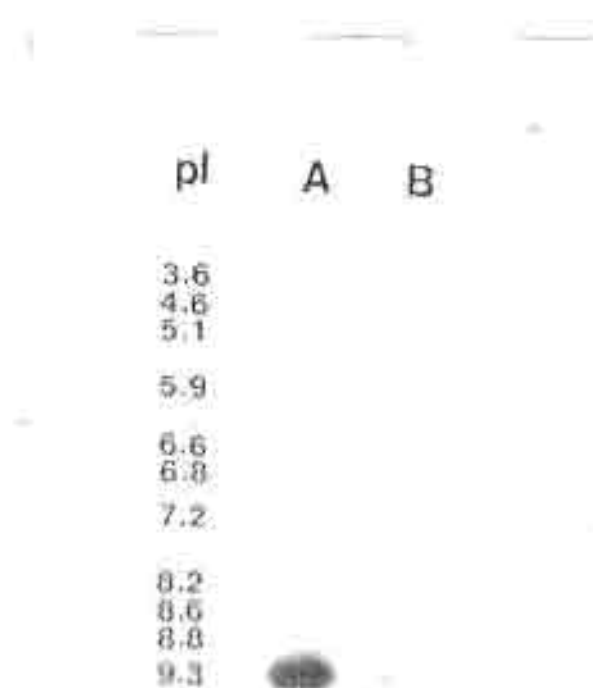
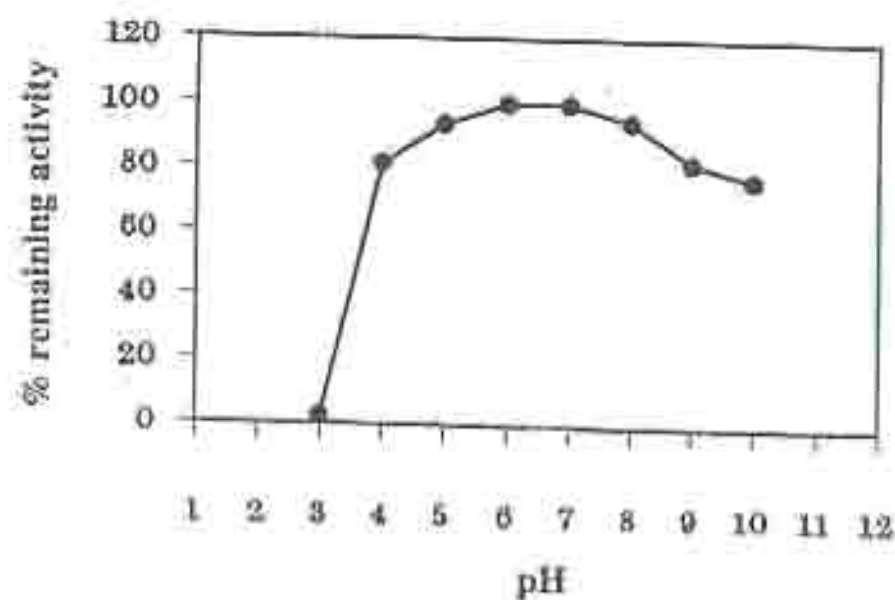
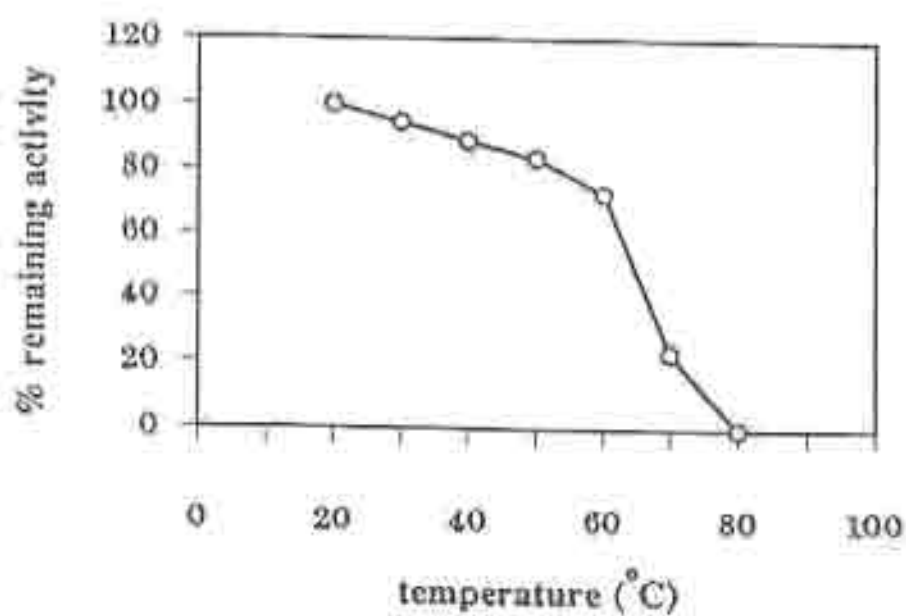


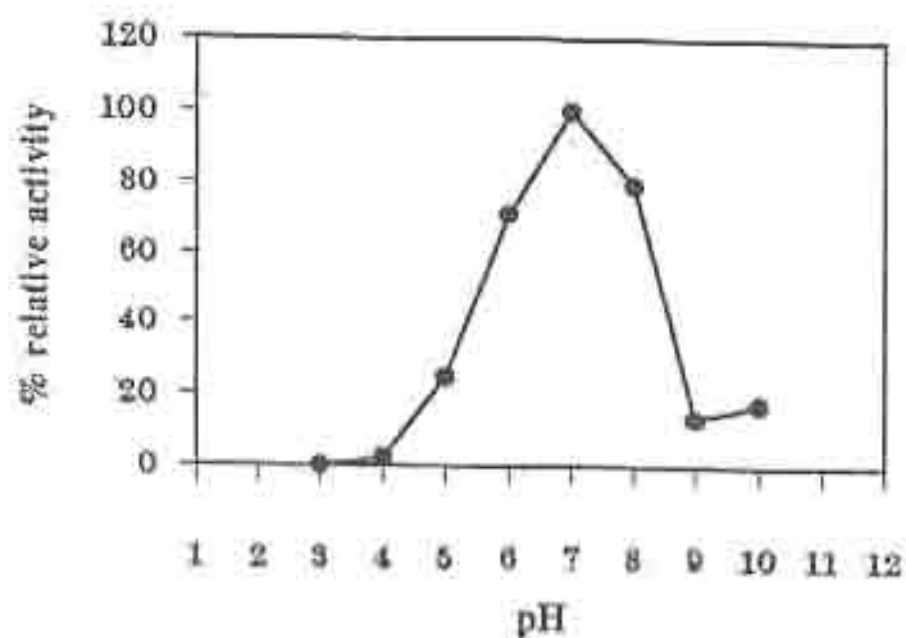
Рис. 26. Изоэлектрическое фокусирование геля электрофореза М04 PPO-I (A) и М04 PPO-II (B).



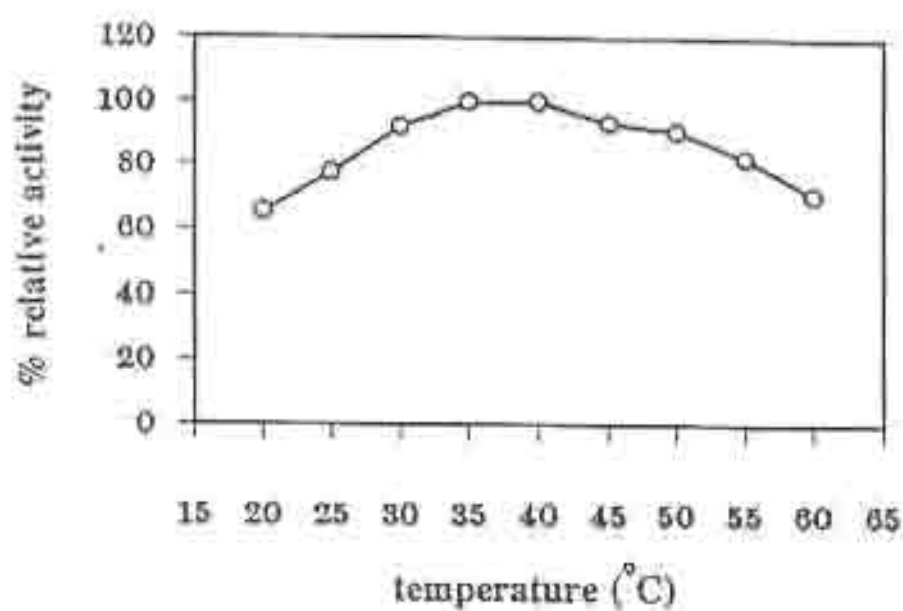
รูปที่ 27 ความเสถียรต่อ pH ของ PPO-1, -II



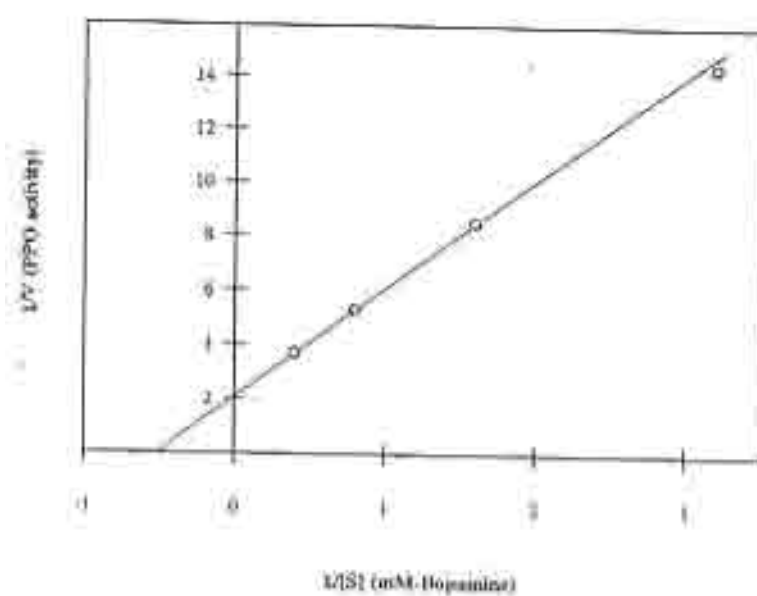
รูปที่ 28 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ PPO-1, -II



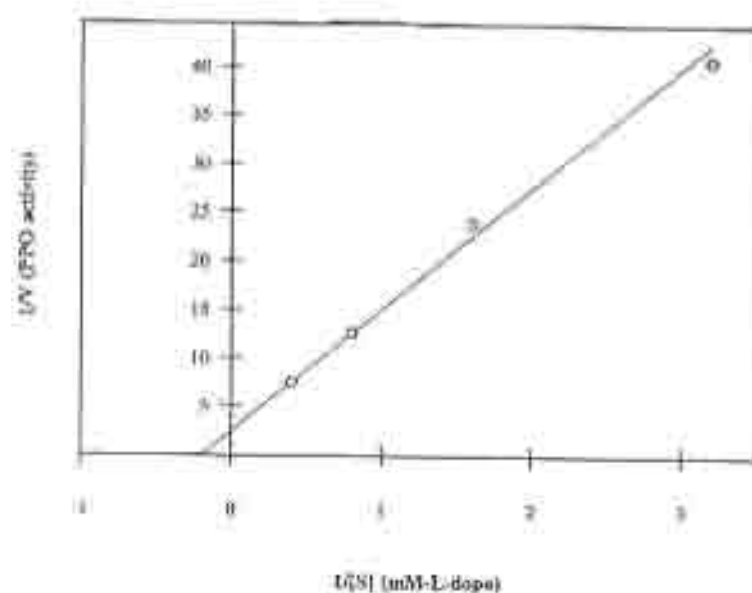
รูปที่ 39 ผลของ pH ที่มีต่อผลผลิตของ PFO-L II



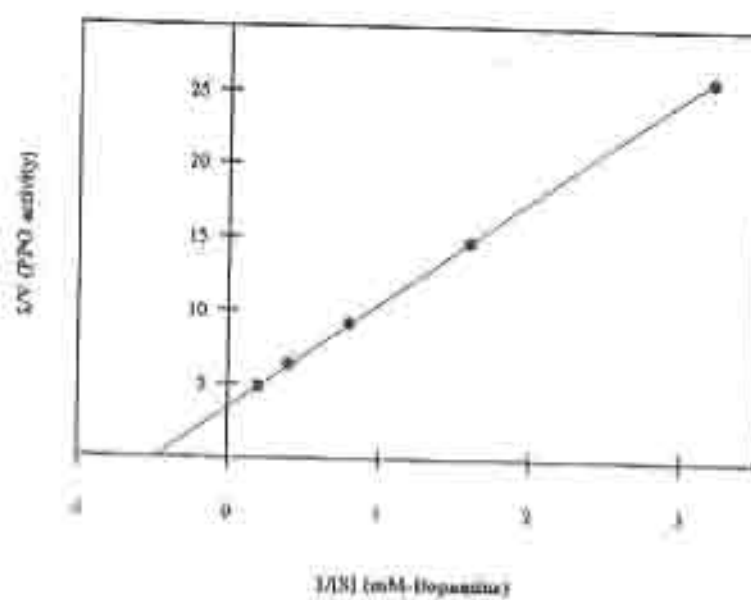
รูปที่ 39 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อผลผลิตของ PFO-L II



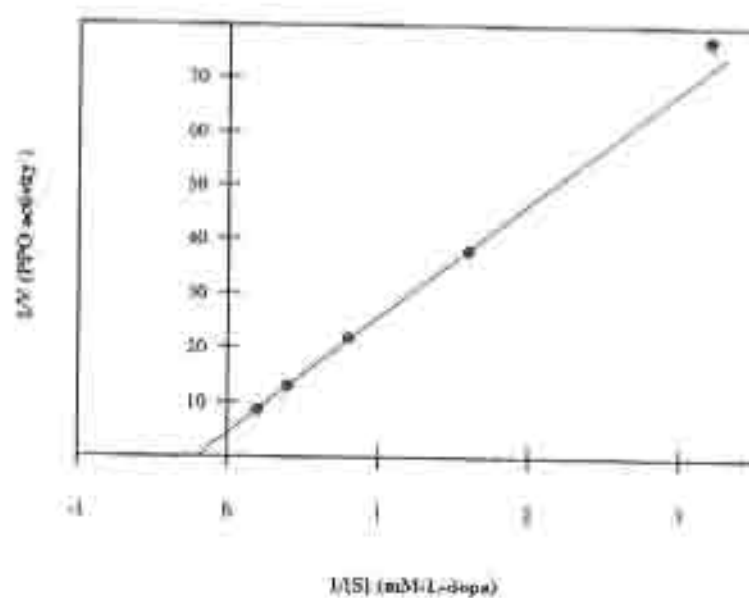
รูปที่ 31 การหา  $K_m$  ของ PPO-1 ต่อสารตั้งต้น dopamine



รูปที่ 32 การหา  $K_m$  ของ PPO-1 ต่อสารตั้งต้น L-dopa



รูปที่ 33: การหา  $K_m$  ของ PPO-II ต่อสับสเตรท dopamine



รูปที่ 34: การหา  $K_m$  ของ PPO-II ต่อสับสเตรท L-dopa

#### 3A.4) การศึกษาสาร phenols ใน C-serum

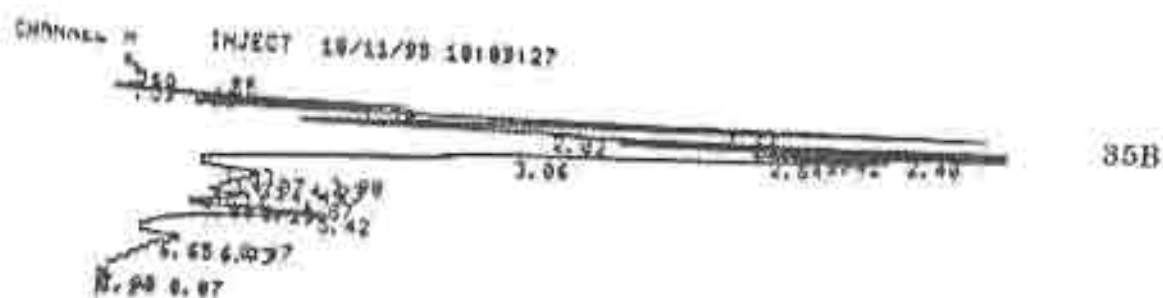
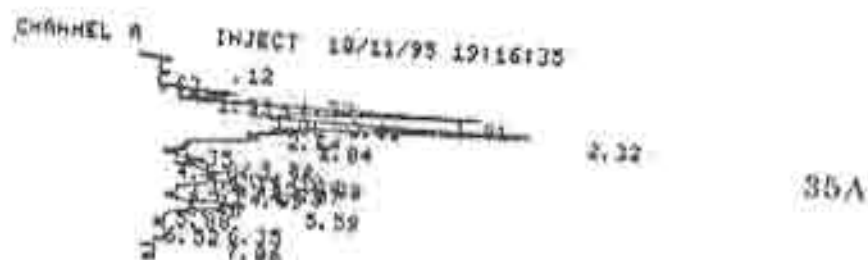
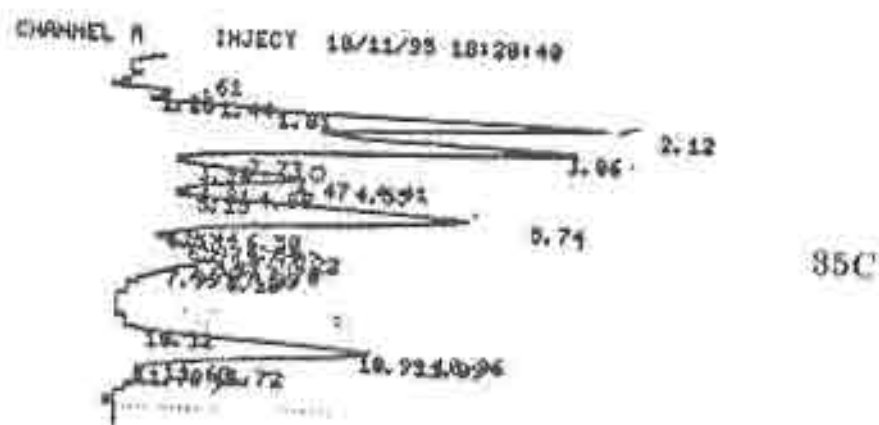
จากการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram ของ C-serum phenol ที่เตรียมได้จากน้ำยางที่สกัดได้ในเดือนตุลาคม และ ธันวาคม (รูปที่ 35A, B) กับ สารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย phenols 4 ชนิดคือ *p*-cumaric acid, hydroxy benzoic acid, gallic acid และ caffeic acid (รูปที่ 35C) ปรากฏว่าไม่สามารถบอกได้ว่า C-serum phenol เป็นชนิดอะไร ชนิดของ C-serum phenol ทั้งของเดือนตุลาคม และ ธันวาคมคล้ายคลึงกันแต่ปริมาณในเดือนธันวาคมมีมากกว่า

จากการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram ของ C-serum phenol ที่เตรียมได้จากน้ำยางที่สกัดได้ในเดือนตุลาคม และ ธันวาคม (รูปที่ 36A, B) กับ สารละลายมาตรฐาน phenols จำนวน 19 ชนิด (รูปที่ 36C) ผลปรากฏว่า C-serum phenol ที่เตรียมได้จากน้ำยางที่สกัดได้ในเดือนตุลาคม และ ธันวาคม ประกอบด้วย phenols 3 ชนิดคล้ายคลึงกันเพียงแต่มีระดับปริมาณในเดือนธันวาคมมีมากกว่า และไม่สามารถบอกได้ว่า C-serum phenol เป็นชนิดอะไรบ้างเช่นกัน แต่ที่น่าจะเป็น simple phenol

ค่าประสิทธิสัมสัมพันธ์สัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร C-serum phenol กับปริมาณน้ำยาง หรือ น้ำหนักยางแห้งที่ได้ต่อครั้งสกัด อยู่ในระดับสูง 0.9 และ 0.88 ตามลำดับ (Fig. 37)

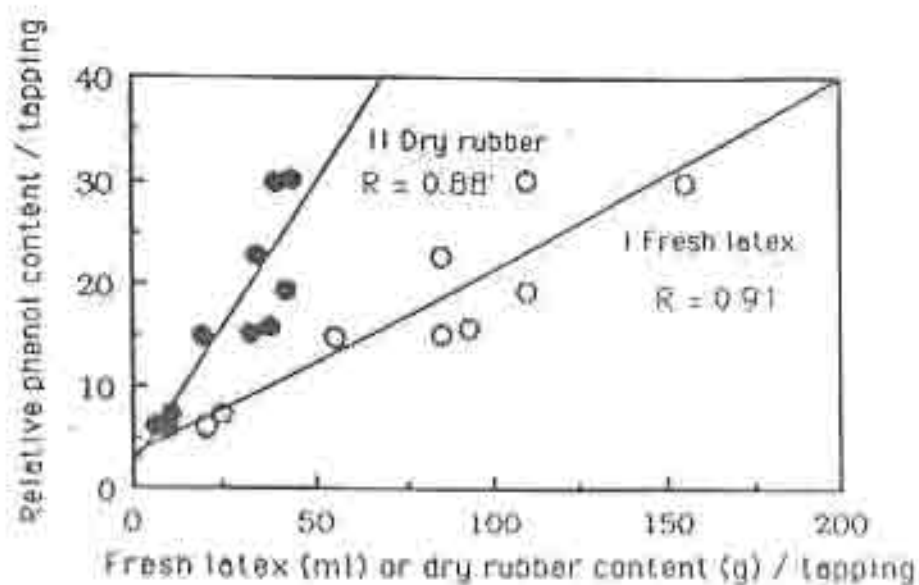
ผลการทดสอบ C-serum phenol กับความเป็น *in vivo* substrate ของ PPO จากไม้ยี่สิบ จะเห็นได้จาก absorption profile ที่ scan จากช่วงคลื่น 200-600 nm (รูปที่ 38) ปรากฏว่าค่า  $A_{280}$  มีค่าลดลงหลังจากปฏิกิริยาเริ่มขึ้น 10, 20 และ 40 นาทีตามลำดับ โดย ทำให้ อัตราส่วน  $A_{260}/A_{280}$  มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีเกิดการ oxidation ของ C-serum phenols ขึ้น (Iiyama, 1994)

ผลการทดสอบ C-serum phenol กับความเป็น *in vivo* substrate ของ POD จากเปลือกยาง จะเห็นได้จาก absorption profile ที่ scan จากช่วงคลื่น 200-600 nm (รูปที่ 23) ปรากฏว่าค่า  $A_{280}$  มีค่าลดลงหลังจากปฏิกิริยาเริ่มขึ้น โดย ทำให้ อัตราส่วน  $A_{260}/A_{280}$  มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีเกิดการ oxidation ของ C-serum phenols ขึ้น [21] และมีการเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสงช่วง 420-450 nm อันเนื่องมาจาก polymerized phenol [22]

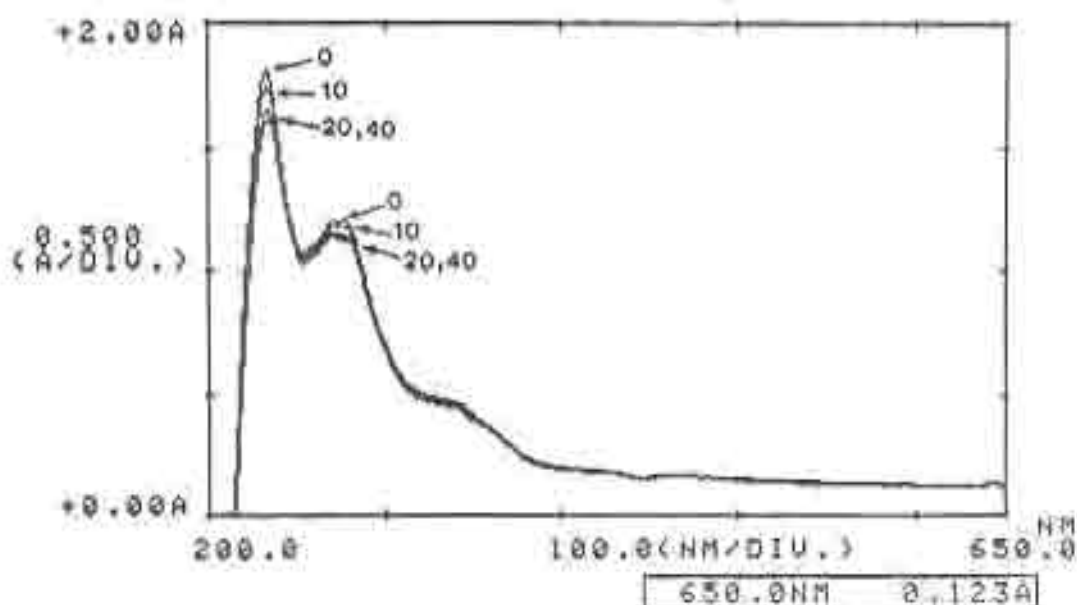


รูปที่ 35 GC chromatogram ของ C-serum phenol ที่เตรียมได้จากน้ำยางที่กรีดได้ในเดือน  
ตุลาคม และธันวาคม (รูปที่ 35 A และ B ) กับสารละลายมาตรฐาน phenols จำนวน  
18 ชนิด (รูปที่ 35C )





รูปที่ 37 ทำเส้นประสัมพันธ์อันดับหนึ่งระหว่างปริมาณ C-serum phenol ของน้ำยาง กับปริมาณน้ำยางหรือยางแห้งที่ได้ต่อครั้งกรีด



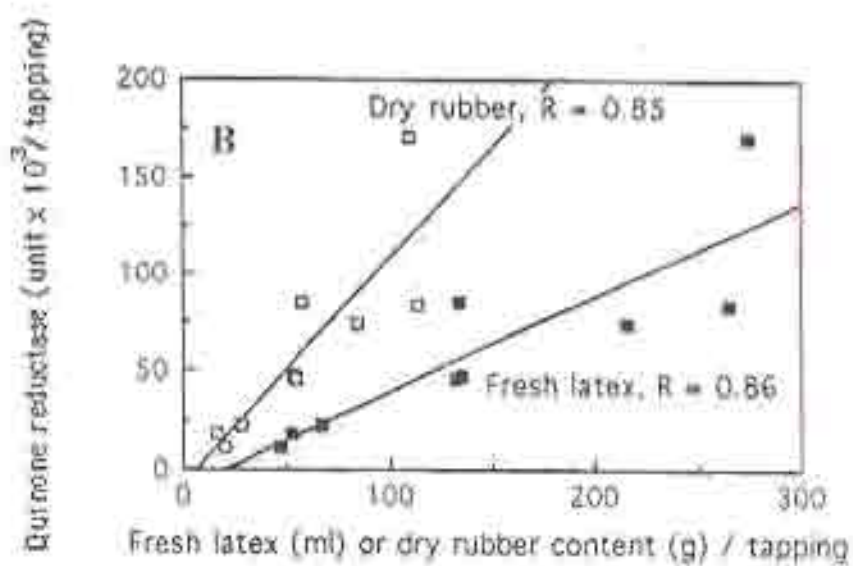
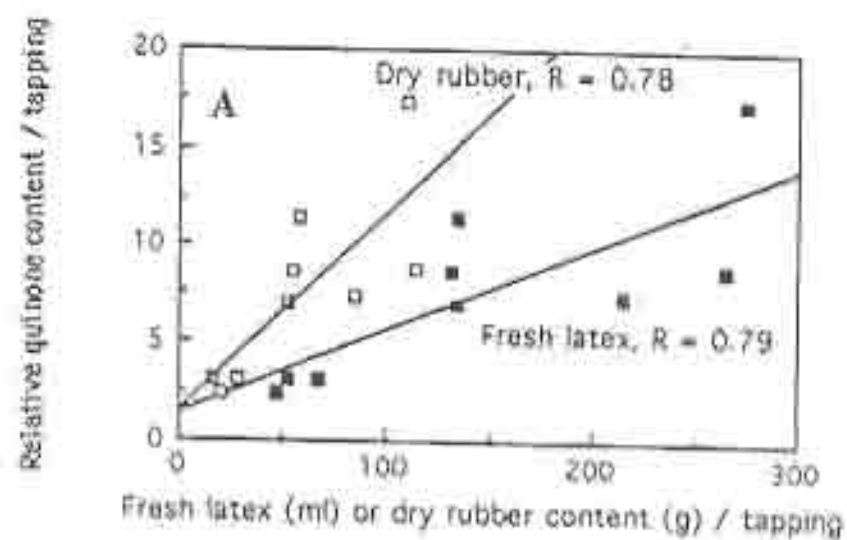
รูปที่ 38 UV-Visible spectroscopic scans หลังจากปฏิบัติกริยาเริ่มขึ้น 0, 10, 20 และ 40 นาทีตามลำดับ ที่ได้จากการใช้ C-serum phenol เป็น *in vivo* substrate ของ PPO ที่ทำบริเวณนี้ได้จากน้ำยาง

### 8A.5) การศึกษาสาร quinone จาก bottom fraction

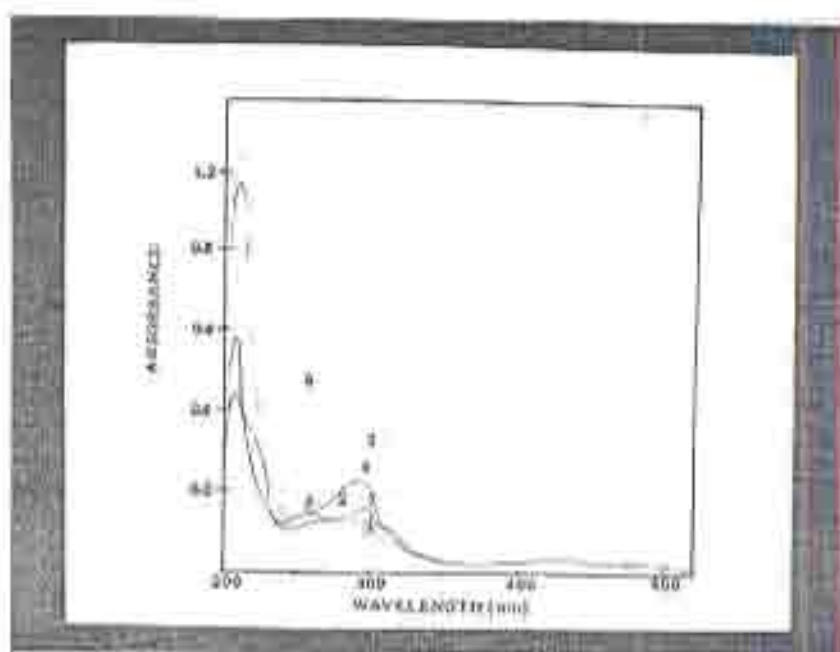
รูปที่ 39 จะเห็นว่า ปริมาณ quinone หรือ QR กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักยางแห้ง ที่ได้ต่อครั้งมีความสัมพันธ์กัน โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) ระหว่างปริมาณ quinone กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักยางแห้งที่ได้ต่อครั้งมีค่าเท่ากับ 0.79 หรือ 0.78 ตามลำดับ (รูปที่ 39A) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณ QR กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักยางแห้งที่ได้ต่อครั้งมีค่าเท่ากับ 0.86 หรือ 0.85 ตามลำดับ (รูปที่ 39B)

จากการใช้วิธีของ Barr และ Crane สกัด quinone แล้วนำบริสุทธิ์ต่อโดยอาศัยการแยกบนแผ่น silica gel (TLC) แยกได้ 7 spots และเมื่อจะ spot ด้วย MeOH เพื่อนำไปหา active quinone fraction โดยนำการใช้ทดสอบการเป็นสปีสตรของ NADH quinone reductase ปรากฏว่ามี spot เดียวที่เป็น active quinone fraction ที่สามารถเป็นสปีสตรของ NADH quinone reductase โดยจาก UV/Vis. spectrum scan ของ active quinone fraction ดังกล่าวมี  $\lambda_{max}$  ที่ประมาณช่วงคลื่น 215 และ 300 nm (spectrum # 3 รูปที่ 40)

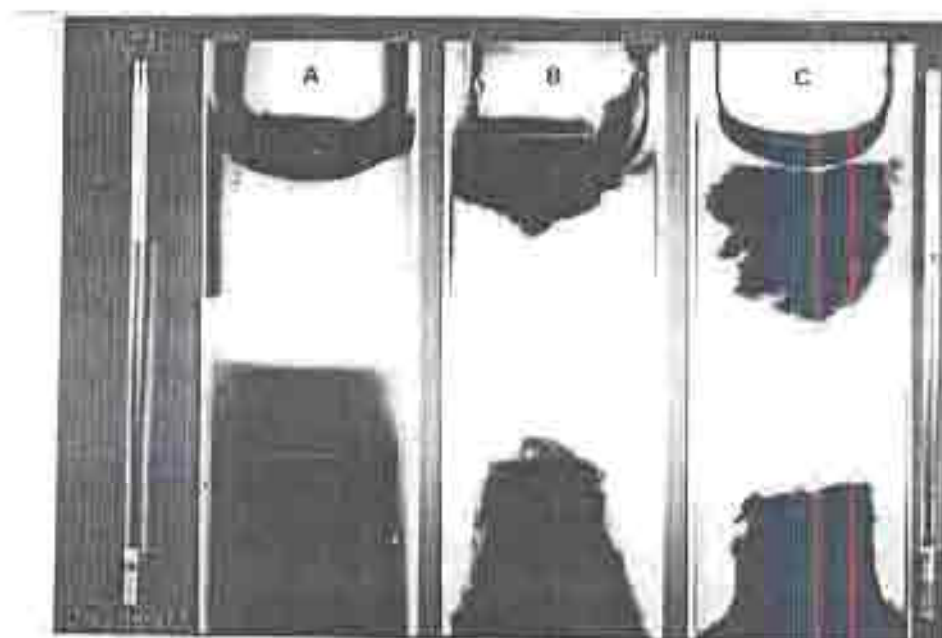
จากผลการทดลองอีกวิธีหนึ่งของ quinone คือการแยกของดูทอยด์กับสารจับกลุ่มของอนุภาคยาง ในรูปที่ 41 จะเห็นว่าใน reaction mixture A ซึ่งประกอบด้วยสารละลายอนุภาคดูทอยด์และอนุภาคยาง หลังการทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาแล้วนำไปเป็นแยกด้วย benatocrit microcentrifuge จะเห็นปริมาณอนุภาคดูทอยด์ในชั้นล่างสุด (bottom) เหลืออยู่มากที่สุด ส่วนชั้นอนุภาคยางในชั้นบนสุด (top) จะเหลือน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับ reaction mixture B และ C ซึ่งมี quinone และ NADH ผสมอยู่ด้วย โดยชั้นอนุภาคดูทอยด์ใน reaction mixture C ซึ่งมีปริมาณ quinone ผสมอยู่มากกว่า จะเหลือน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ reaction mixture B ซึ่งมีปริมาณ quinone ผสมอยู่น้อยกว่า ในขณะที่ ชั้นอนุภาคยางใน reaction mixture C จะมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับ reaction mixture B ทั้งนี้จะเป็นเพราะชั้นกับปริมาณ quinone ซึ่งเป็นสปีสตรของ QR ของอนุภาคดูทอยด์ที่ต่าง ส่งผลให้ระดับการกำหนดของอนุพันธ์ต่างกัน ปริมาณดูทอยด์ที่แตกเนื่องจากคั่นบนบนอนุภาคทำด้วยด้วย  $O_2$  ซึ่งเป็น product ที่ได้จากการทำงานของ QR จึงต่างกันด้วย



รูปที่ 39 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ quinone (A) และ QR (B) ใน bottom fraction ที่ได้จาก centrifuged latex กับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งกรีต



รูปที่ 40 UV-Vis. spectrum scan ของ active quinine fraction (0.5 mg/ml)  
บริสุทธิ์จากอนุภาคอุทกยัค



รูปที่ 4) การทดสอบอิทธิพลของ quinone ต่อการแตกของอนุภาคลิวทอยด์ และการเกาะกลุ่มของอนุภาคชน โดยลิวทอยด์ที่แตกจะเปิดโอกาสให้อิเล็กตรอนบนเมมเบรนของลิวทอยด์เปลี่ยนไปให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคชน หลังจากเป็นเหตุด้วยกระบวนการข้างต้นนี้ จะแยกกันลอยขึ้น ไปอยู่ชั้นบน ส่วนลิวทอยด์ที่เปลี่ยนและไม่แตกจะลอยอยู่ชั้นล่าง โดยดูจากแถบของลูทอรรณิกาดังขยาย 300 เท่า

A = อนุภาคลิวทอยด์ + NADH + อนุภาคชน

B = อนุภาคลิวทอยด์ + quinone ( 5  $\mu$ l ) + NADH + อนุภาคชน

C = อนุภาคลิวทอยด์ + quinone ( 10  $\mu$ l ) + NADH + อนุภาคชน

### 3B.) Non-enzymatic process

#### 3B.1) Luteoidin

ผลการเตรียมและทำบริสุทธิ์ลูเทอยดินจากอนุภาคลูเทอยด์ (ตารางที่ 6) ซึ่งแยกได้จากส่วนของ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยการนำไปตกตะกอนด้วย acetone แล้ว นำตะกอนที่ได้ไปล้างแล้วสกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 0.2% Triton X-100 นำสารสกัดที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ต่อไปโดยการแยกผ่านคอลัมน์น้ำไลลีน และ DEAE-Sephacel (รูปที่ 42) พบว่าลูเทอยดินมีค่า  $M_r$  ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 17 kD (รูปที่ 43) และสามารถย้อมติดด้วย Fuchsin ที่ใช้ในการย้อมไกลโคโพรตีน และ น้ำหนักโมเลกุลรวมจากผลการแยก โดยอาศัยขนาดประมาณ 276 kD (รูปที่ 44) ลูเทอยดินสามารถทำให้อนุภาคยางเกาะกันเป็นกลุ่มได้จากการทดสอบปรากฏว่าลูเทอยดินสามารถเกาะจับกับโปรตีนบนอนุภาคยางโดยการเหนี่ยวนำให้อนุภาคยางเกาะกันเป็นกลุ่มได้ และสามารถย้อมอนุภาคยางที่เกาะกลุ่มได้ด้วยวิธีย้อม glycoprotein โดยที่ Fuchsin ย้อมติดได้ดีกว่า Alcian blue 8GX (รูปที่ 45) โดยที่ปริมาณอนุภาคยางที่เกาะกลุ่มจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการดำเนินปฏิกิริยา (รูปที่ 46) โดยที่โปรตีนอื่นๆ เช่น BSA, fetuin และ C-serum (protein) นอกเหนือจากลูเทอยดิน ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้ (รูปที่ 47) นอกจากนี้ตัวลูเทอยดินเองยังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก กระด้าง หรือ หยุบ เกาะกลุ่มได้ด้วย จึงมีคุณสมบัติเป็นแอลคิน ซึ่งความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งโดยไกลโคโปรตีนหลายชนิด คือ fetuin, asialofetuin, ovomucoid, mucin, asialomucin (ตารางที่ 7) ส่วน  $\alpha_1$ -acid glycoprotein หรือ น้ำตาลเตี้ยหรืออยู่หลายตัวจะไม่สามารถทำการยับยั้งดังกล่าวได้ (ตารางที่ 8) ในทำนองเช่นกัน การเกาะจับของอนุภาคยางที่ถูกเหนี่ยวนำโดยลูเทอยดิน จะสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย fetuin แต่ไม่ถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลเตี้ย GalNAc ลูเทอยดินสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึงถึง  $60^\circ\text{C}$  (รูปที่ 48) และทนต่อความเป็นกรด่างได้ดี ตั้งแต่ช่วง pH 3-10 (รูปที่ 49) โดยลูเทอยดินมีค่า pI เป็นกรดประมาณ 5.1

ตารางที่ 6

ขั้นตอนการบำบัดไวรัสที่ดูดยชนิดจากอนุภาคดูดยอด

Step	Total protein (mg)	HA (titer)	Specific activity (titer/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Latoidia extract	15.8	819,200	20,739	100	1.0
Chitin batch-binding	0.29	184,320	80,139	22.5	3.9
DEAE-Sephadose	0.20	266,240	204,800	32.5	9.9

ตารางที่ 7

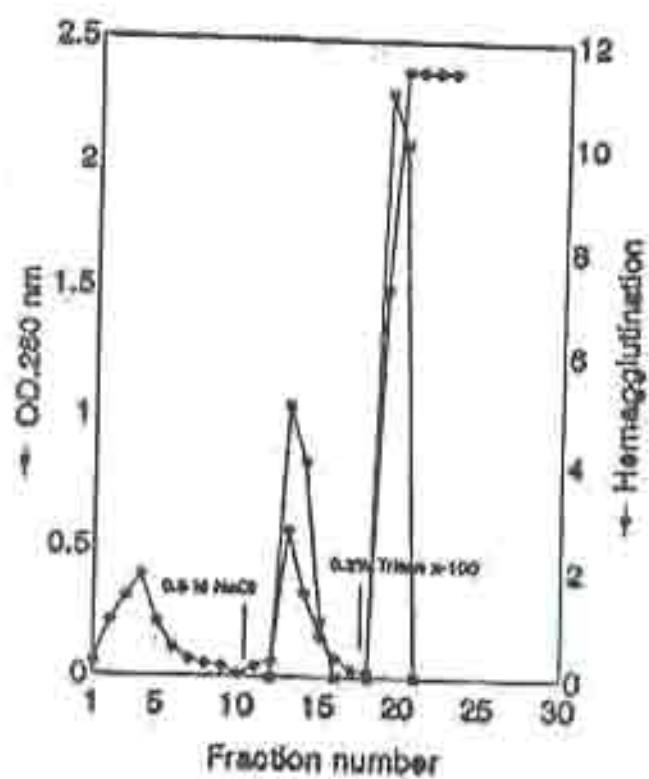
ผลของตัวยับยั้งไกลโคโปรตีนต่อความสามารถในการเกาะน้ำให้  
เมื่อเล็กลดลงกระด้าเกาะกลุ่มของบูทอลิน

Inhibitor	Min. concn. for 100% inhibition (mg/ml)
Fetuin	0.625
Asialofetuin	1.25
Mucin	0.625
Asialomucin	2.50
Ovomucoid	2.50
RP-LBP	0.20

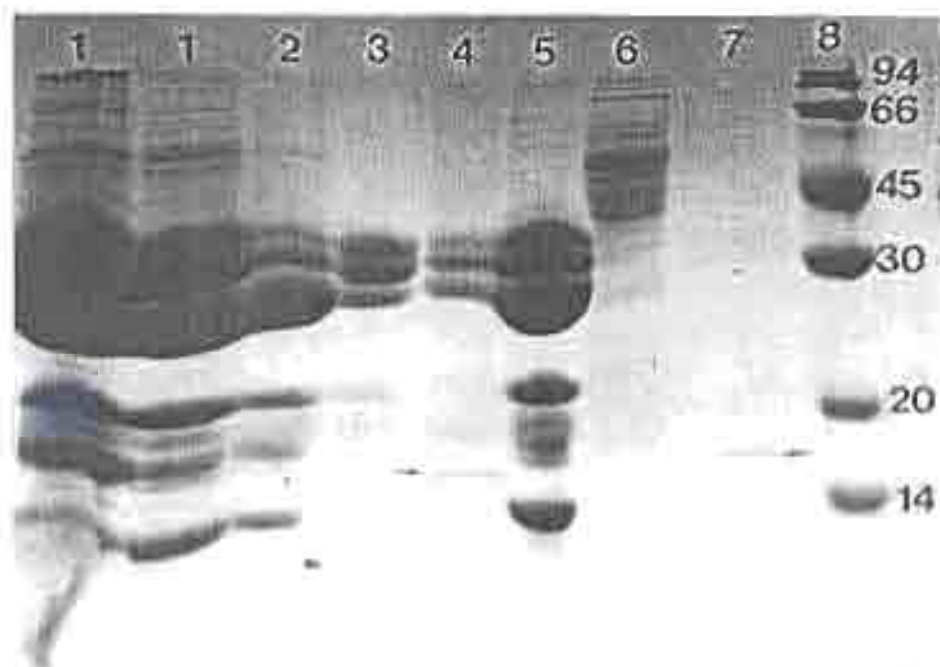
ตารางที่ 8

การโน้มน้าวชนิดต่างๆที่ไม่สามารถจับกับบูทอลินน้ำให้  
เมื่อเล็กลดลงกระด้าเกาะกลุ่มของบูทอลิน

Carbohydrate	Concentration
Glucose, Galactose, Mannose, Fucose, arabinose	200 mM
Raffinose, GlcNAc, ManNAc, GalNAc	100 mM
Chitosan dimer, chitosan trimer	5 mg/ml
Gal 1→6 GlcNAc, Gal 1→3 GlcNAc	2 mg/ml
3'NeuNAc-Lac, 5'NeuNAc-lac	2 mg/ml
$\alpha_1$ -acid glycoprotein	5 mg/ml



รูปที่ 42 Chromatographic profile ของจุลหอยคืบบนคอลัมน์ DEAE-Sepharose



รูปที่ 43 SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์

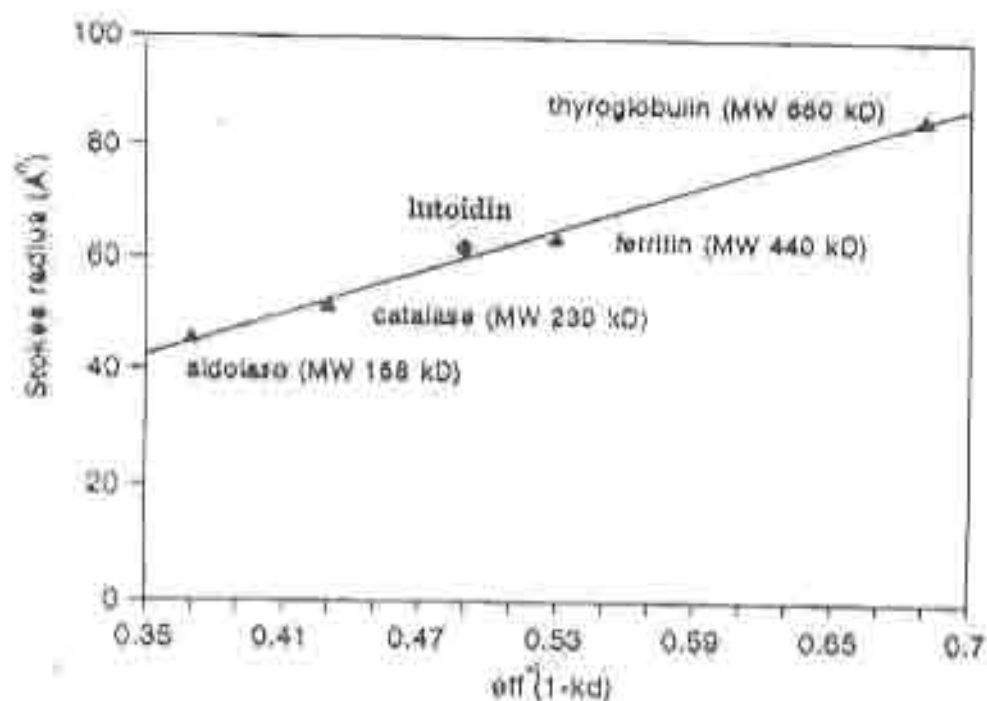
1 = Intolisin extract ;                      2 = unbound fraction from chitin batch-binding;

3, 4 = eluted protein fraction from chitin batch-binding @ 0.5 M NaCl  
and 0.2% Triton X-100, respectively;

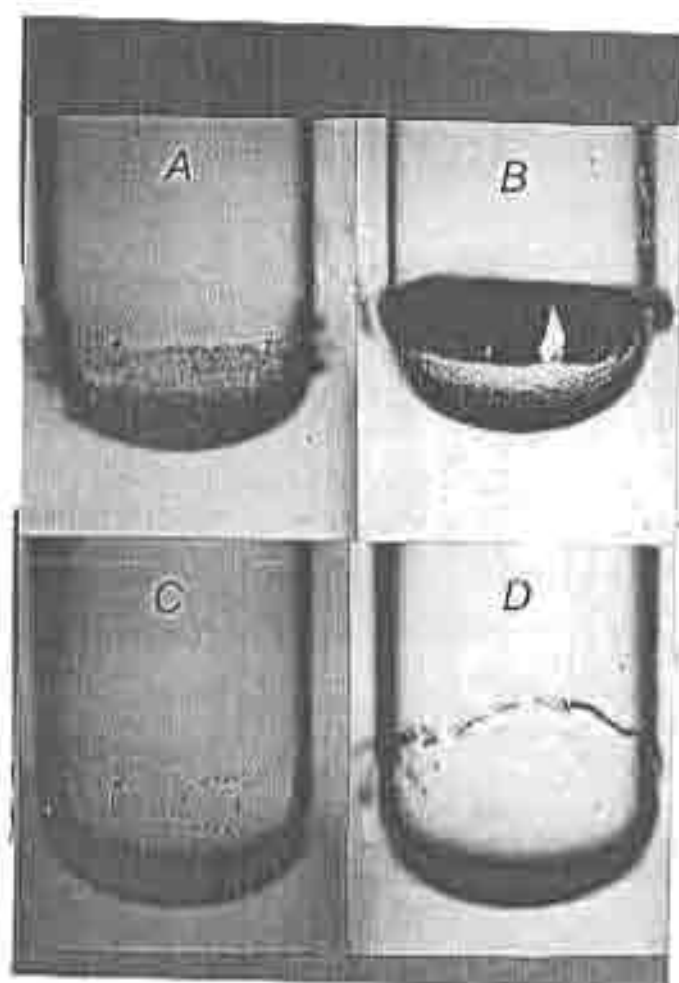
5 = unbound fraction from DEAE-Sepharose column;

6, 7 = eluted protein fraction from DEAE-Sepharose column @ 0.5 M NaCl  
and 0.2% Triton X-100, respectively;

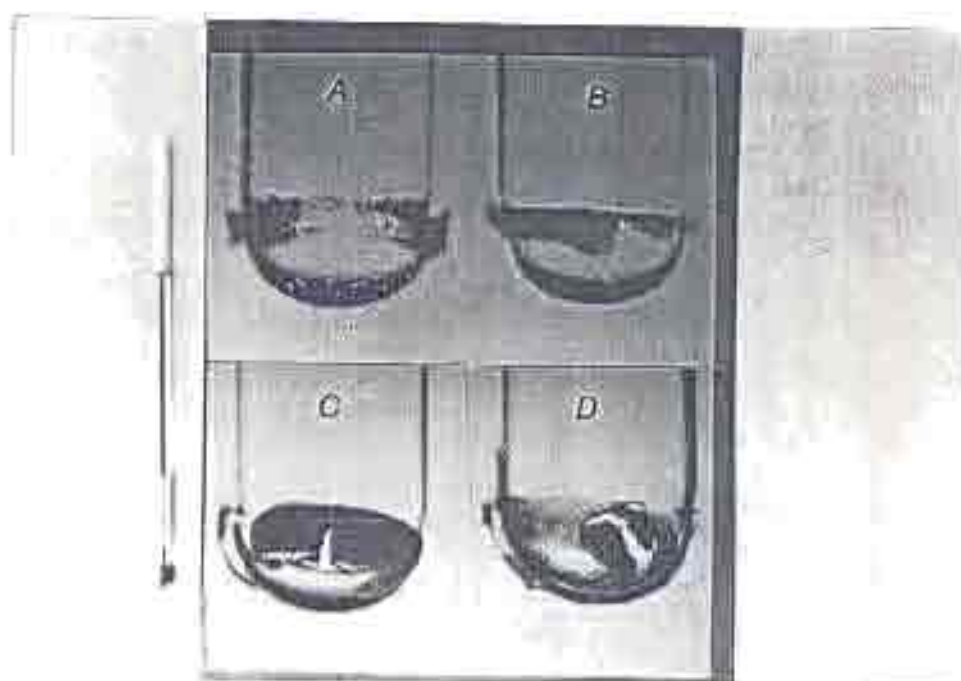
8 = standard protein markers,



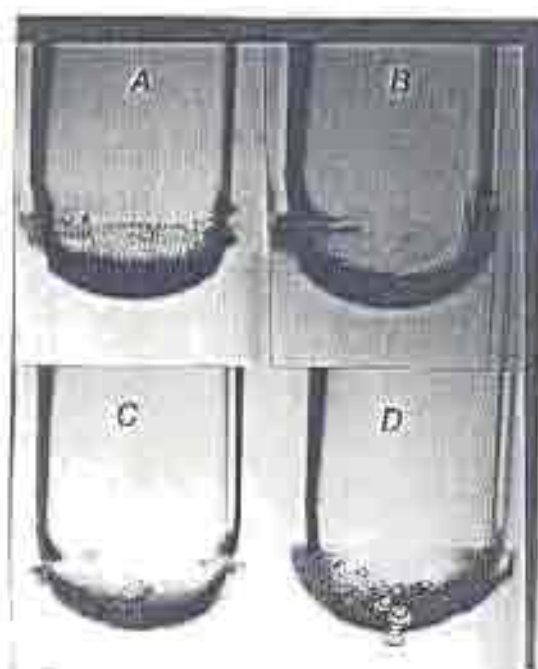
รูปที่ 44 ความสัมพันธ์ระหว่าง Stokes's radius กับ inverse error function ของ  $(1 - \text{partition coefficient})$  ของโปรตีนมาตรฐานกับ จุดยอดคั่นที่ผ่านวิธีขึ้นแล้ว โดยการแยกผ่าน คอลัมน์ Sepharose 6B



รูปที่ 45 การทดสอบการเกาะน้ำความเข้มข้นของอนุภาคยางโดยดูรอยยับโดยใช้ระยะเวลา  
ทำ ปฏิบัติ 30 นาที แล้วย้อมอนุภาคยางด้วย Fuchsin (A&B) หรือ Alcian blue 8GX  
(C&D) โดยดูจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 300 เท่า  
A,C = อนุภาคยาง + น้ำฟอสเฟต; B,D = อนุภาคยาง + ชitosin (1.8 µg)



รูปที่ 46 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคขาวโดยยูทอยลีน (1.8  $\mu\text{g}$ ) โดยใช้ระยะเวลาทำปฏิกิริยา 0, 10, 20 และ 40 นาทีดังในรูป A,B,C และ D ตามลำดับ โดยดูจากก้นของจุลทรรศน์กำลังขยาย 300 เท่า



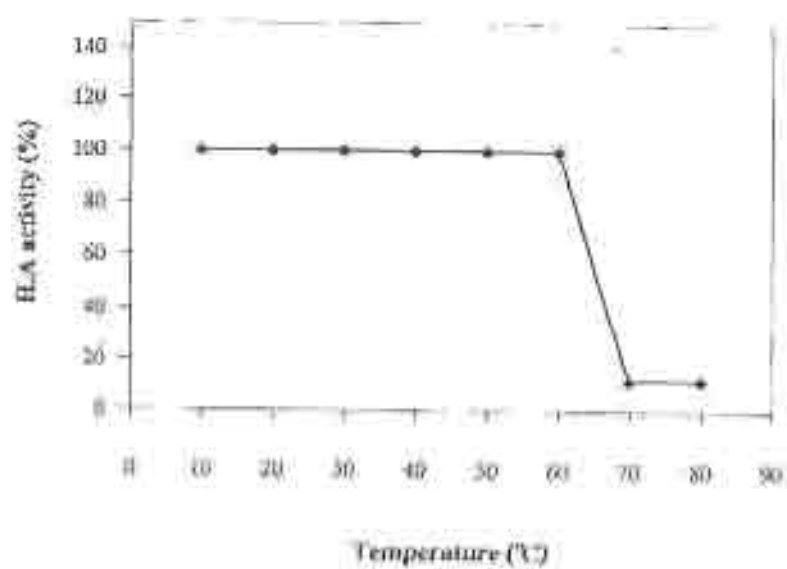
รูปที่ 47 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคขาวโดยโปรตีนอื่นๆที่ไม่ใช่ยูทอยลีน โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยา 30 นาที โดยดูจากก้นของจุลทรรศน์กำลังขยาย 300 เท่า

A= อนุภาคขาว + บัฟเฟอร์

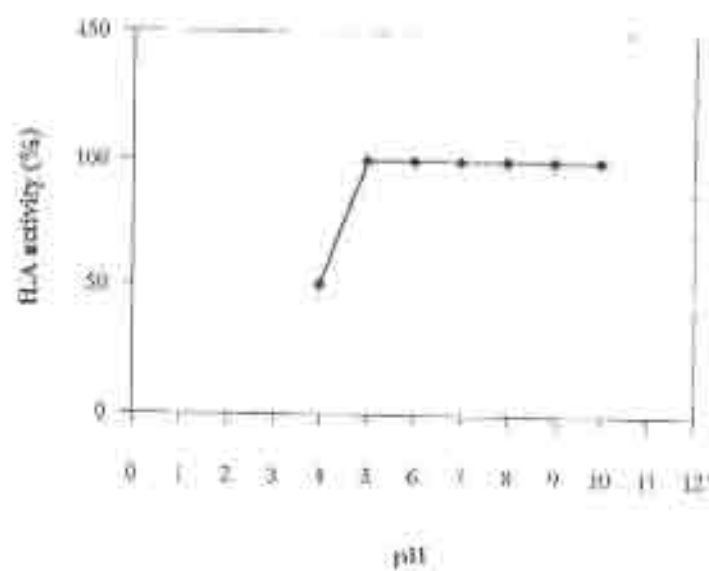
B= อนุภาคขาว + BSA (10  $\mu\text{g}$ )

C= อนุภาคขาว + ferritin (2.5  $\mu\text{g}$ )

D= อนุภาคขาว + C-serum protein (8  $\mu\text{g}$ )



รูปที่ 48 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์



รูปที่ 49 ความเสถียรต่อ pH ของเอนไซม์

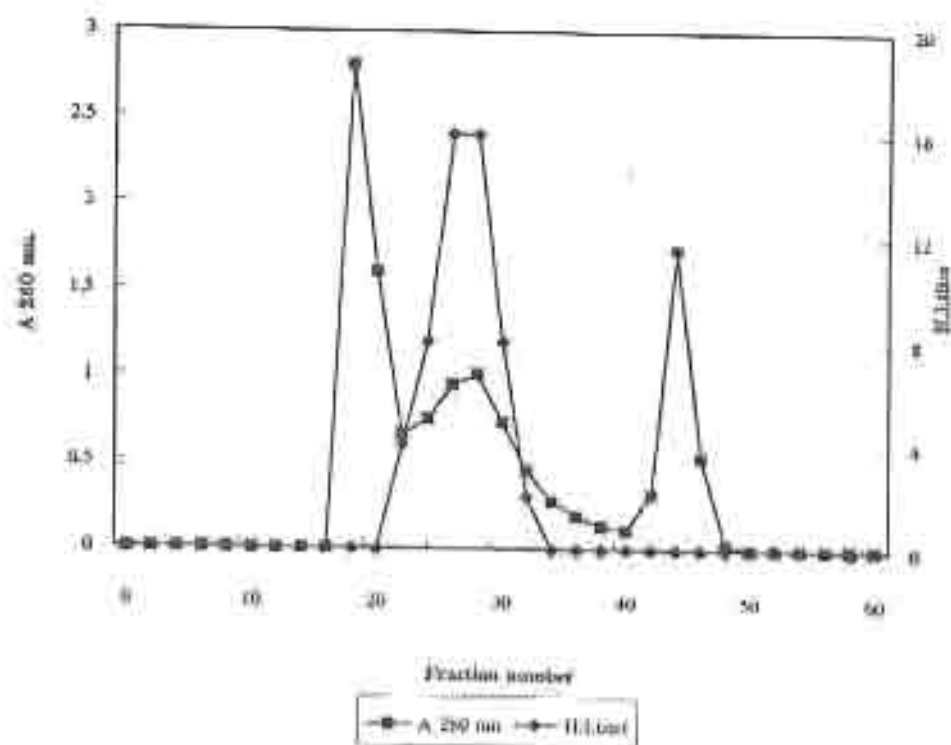
### SB.2) RP-LBP

จากการเตรียมและทำบริสุทธิ์ RP-LBP (ตารางที่ 9) โดยใช้ส่วนของหางที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยแยกเอาเฉพาะบริเวณ zone 2 ซึ่งเป็นชั้นยางด้านที่สัมผัสกับชั้นของ C-serum ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับสีขาวใส ไปทำบริสุทธิ์โดยการผ่านกระดาษด้วย isotonic buffer หลังจากนั้นทำการสกัด ด้วย 0.2% Triton X-100 นำสารที่สกัดได้ไปตกตะกอนด้วย acetone แล้วนำตะกอนที่ละลายได้ ไปอุ่นในน้ำเดือด 2 นาที แล้วเป็นแยกเอาส่วนใสไปทำบริสุทธิ์ด้วยการแยกผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B (รูปที่ 50) และ DEAE Sepharose (รูปที่ 51) พบว่า RP-LBP ที่ทำบริสุทธิ์ได้ มีค่า  $M_r$  ที่หาได้จากการทำ native และ SDS-PAGE เท่ากับ 120 และ 24.5 kD (รูปที่ 52,53) พบว่าสามารถย้อมติดสี Fuchsin หรือ Alcian blue ที่ใช้ในกาวย้อม โกลโคโปรตีน (รูปที่ 54) มีค่า pI เท่ากับ 5.4 (รูปที่ 55) และมีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 5-8 (รูปที่ 56) โดยสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 60°C (รูปที่ 57) ได้นานกว่า 30 นาที RP-LBP สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่าย ที่เหนียวนำไปก่อขึ้นโดยจากยาลดเงิน โดยสามารถยับยั้งได้ประสิทธิภาพสูงสุดหรือใช้ความเข้มข้นโปรตีนได้ต่ำสุด เมื่อเทียบกับโกลโคโปรตีนจากแหล่งอื่นๆที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ chitinase สามารถยับยั้งการทำงานของ RP-LBP (รูปที่ 58)

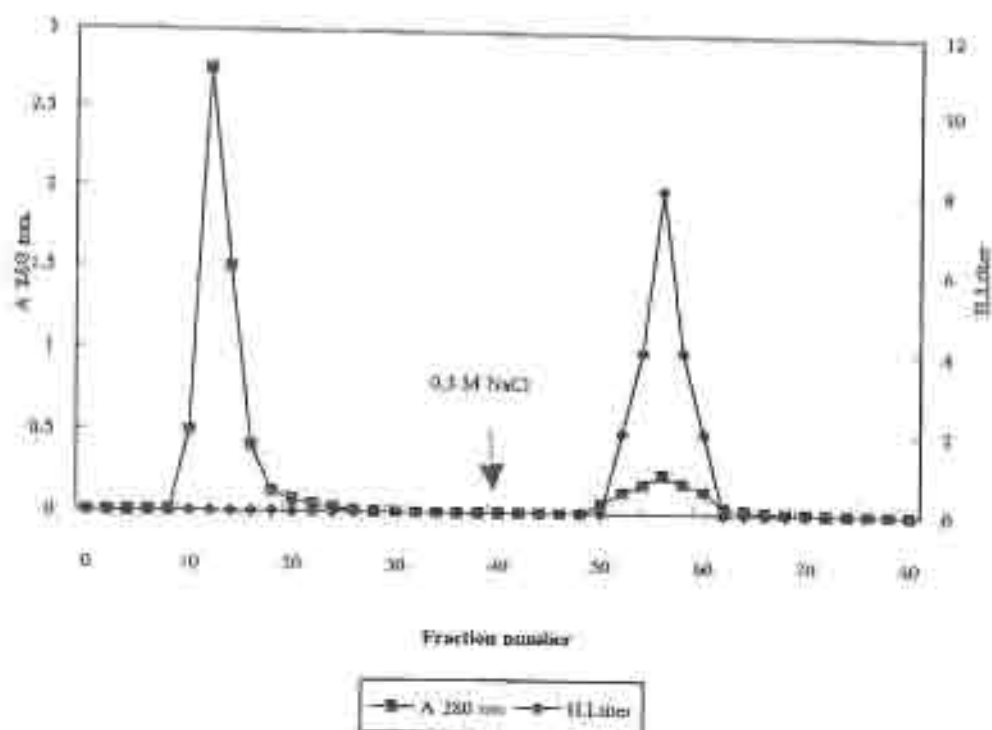
## ตารางที่ 9

## ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ RP-LBP

Step	Total protein (mg)	H.L. (titer)	Specific activity (titer/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	57	17,920	312	100	1.0
Boiled treatment	24	8,320	345	46	1.1
Sephacose 6B	17	10,240	571	57	1.8
DEAE-Sephacel	2	1,600	727	9	2.3



รูปที่ 50 Chromatographic profile 904 RP-LBP บนคอลัมน์ Sepharose 6B



รูปที่ 51 Chromatographic profile 904 RP-LBP บนคอลัมน์ DEAE-SeptraCel

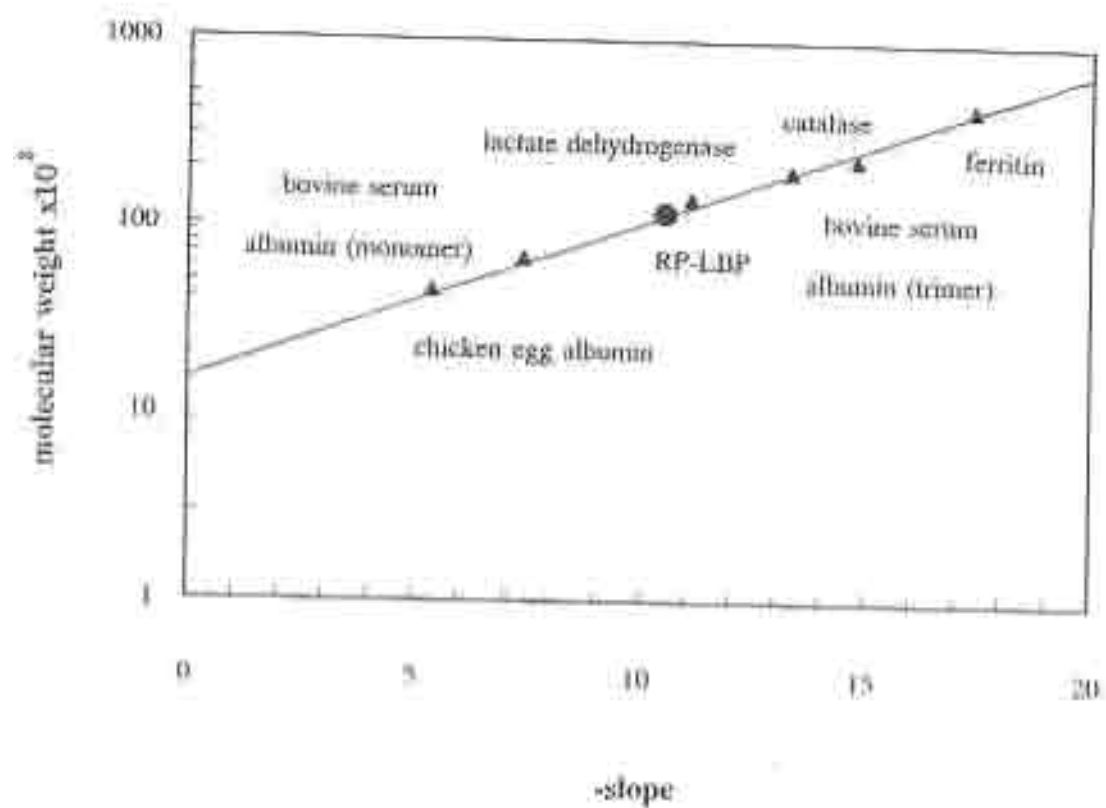
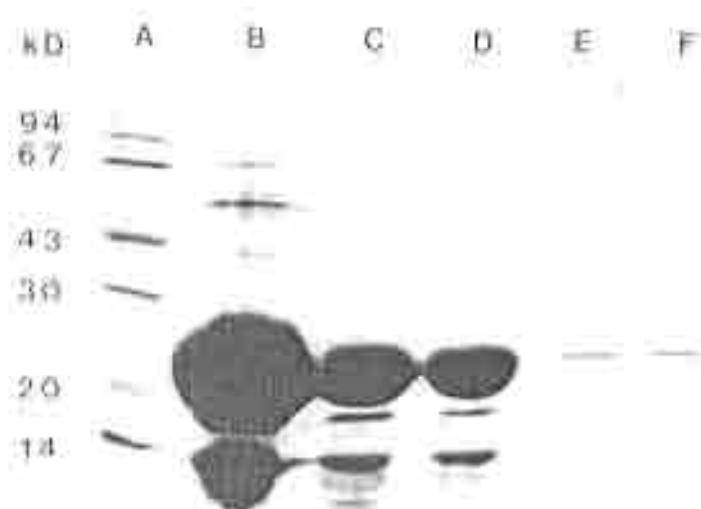


Figure 1. Relationship between native  $M_r$  and RP-LBP subunit  $M_r$ . PAGE



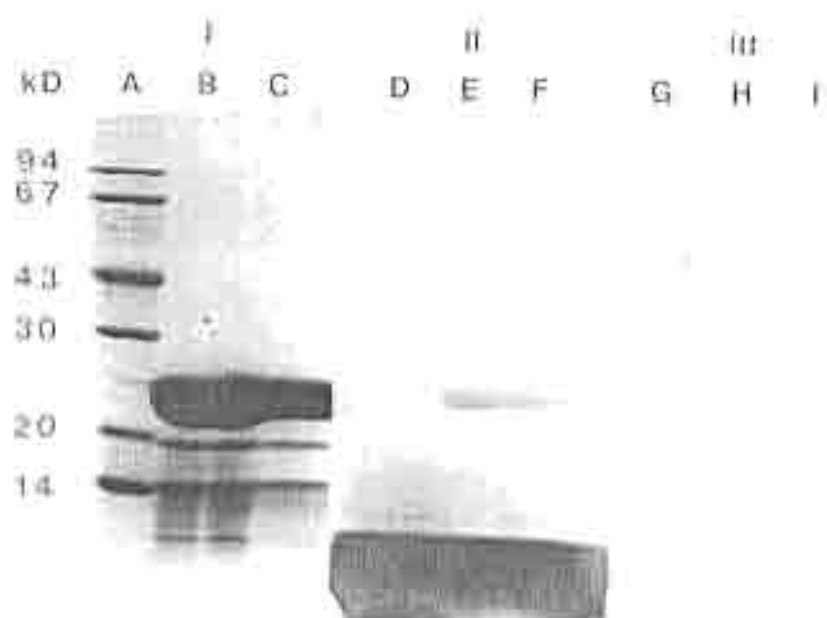
รูปที่ 53 SDS-PAGE ของ RP/LBP ที่ได้จากเมล็ดทุเรียน

A = Standard marker

B = Crude extract

C,D = Fraction obtained after boiled treatment

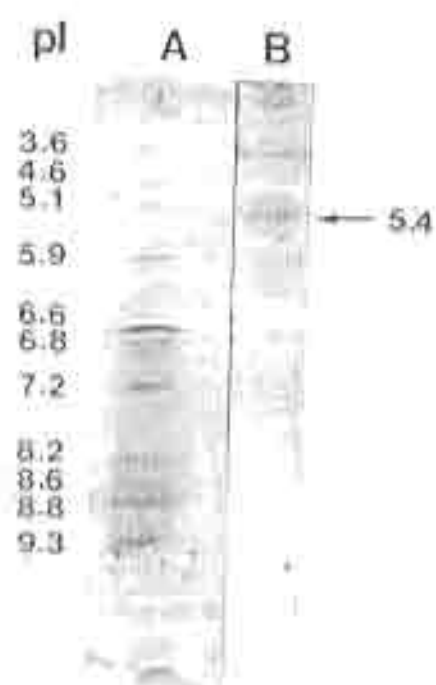
E,F = DEAE-Sepharose peak fraction



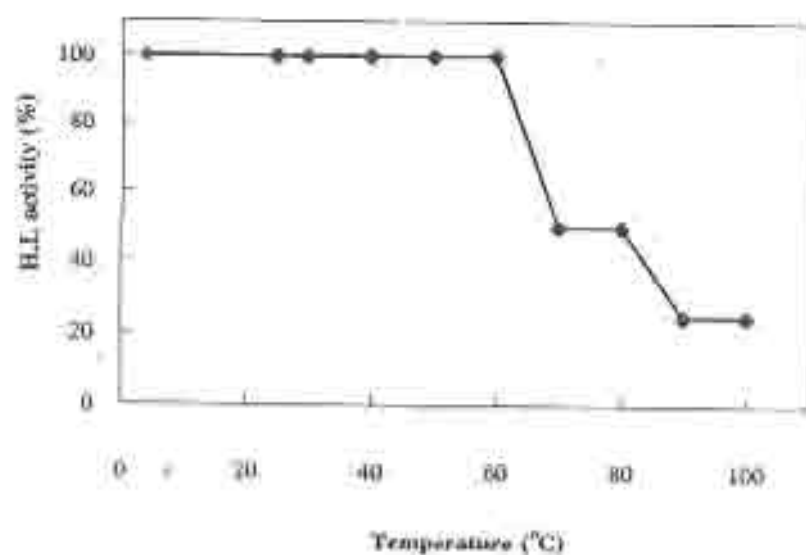
รูปที่ 34 SDS-PAGE ของ RP-LBP ที่ได้จากสารห่านวิสุทธิ โดยย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R ที่ใช้ในสารย้อมโปรตีน (I) และ Fastin (II) หรือ Alcian blue (III) ที่ใช้สำหรับย้อมไกลโคโปรตีน

A, D, G = Standard marker

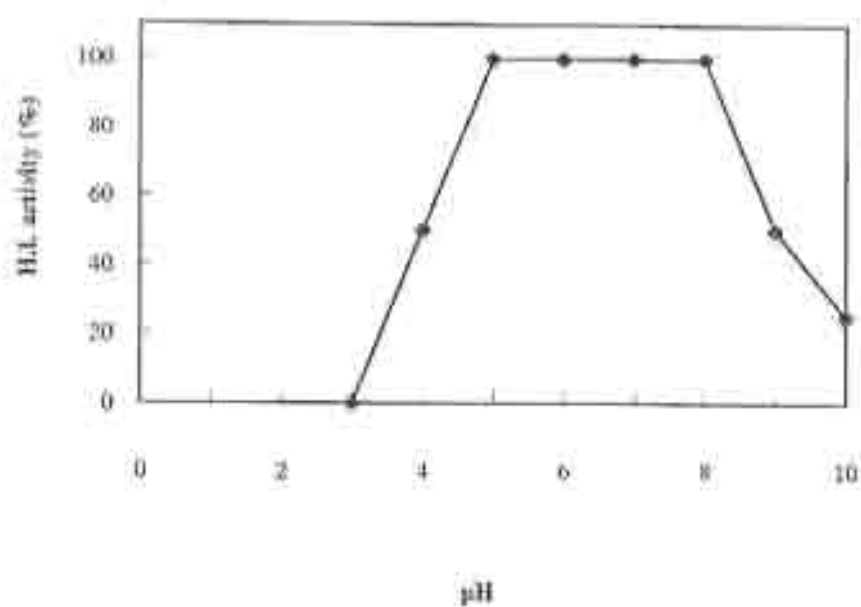
B, C ; E, F ; H, I = Fraction obtained after boiled treatment



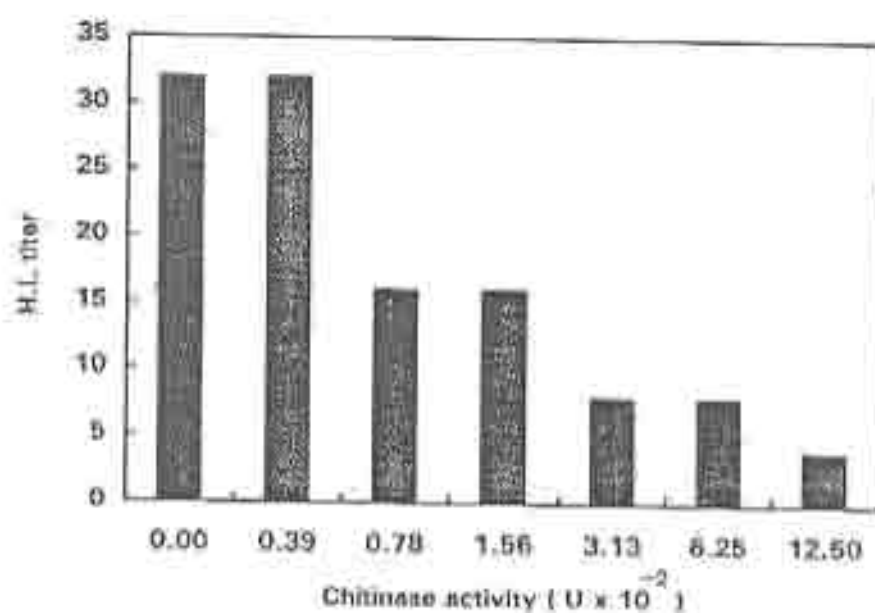
ပုံ ၅၅ ကာကွယ် isoelectric focusing gel electrophoresis ၁၀၄ RP-LBP



รูปที่ 56 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ RP-LBP



รูปที่ 57 ความเสถียรต่อ pH ของ RP-LBP



รูปที่ 58 ผลของความเข้มข้นของ chitinase ในถวียกถึงความสามารถของ RP-LBP ที่มีต่อการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสทางเพศสัมพันธ์ในเนื้อเยื่อของกระดาด โดยดูรอยคืบจากอนุภาคไวรัส

### 3B.3) C-LBP

สามารถทำบริสุทธิ์ C-LBP จาก C-serum ที่ได้จากกรีนแมงกิ้งก่าหางสด ได้ 13.7 เท่า (คนานนท์ 10) โดยอาศัยขั้นตอนมาตรฐานทางชีวเคมี คือ การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate และ acetone การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300 (รูปที่ 59) แล้วตามด้วย DEAE-Sephacel (รูปที่ 60) โดยจากการทำ SDS-PAGE (รูปที่ 61) พบว่า C-LBP ที่ทำบริสุทธิ์ได้มีค่า  $M_r$  เท่ากับ 40 kD (รูปที่ 61) และน้ำหนักโมเลกุลรวมจากการแยกผ่านคอลัมน์ไดอะลคิลขนาดประมาณ 204 kD (รูปที่ 62) มีค่า pI เท่ากับ 4.7 โดยสามารถทนความเป็นกรดค้างได้ตั้งแต่ช่วง pH 5-10 (รูปที่ 63) และ ทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 50°C (รูปที่ 64) โดย C-LBP สามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระด้าง (รูปที่ 65) และ ธนูภาคชาง (รูปที่ 66) โดยหากนำ C-LBP ไปย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต (glycosidases) ชนิดต่างๆ (ตารางที่ 11) พบว่าหากย่อยด้วย chitinase ดูฤทธิ์ของความสามารถในการยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระด้างโดย C-LBP จะถูกทำลายลง (รูปที่ 67) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ C-LBP ในน้ำจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของที่ได้ต่อครั้งกรีด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.97 (รูปที่ 68)

ตารางที่ 10

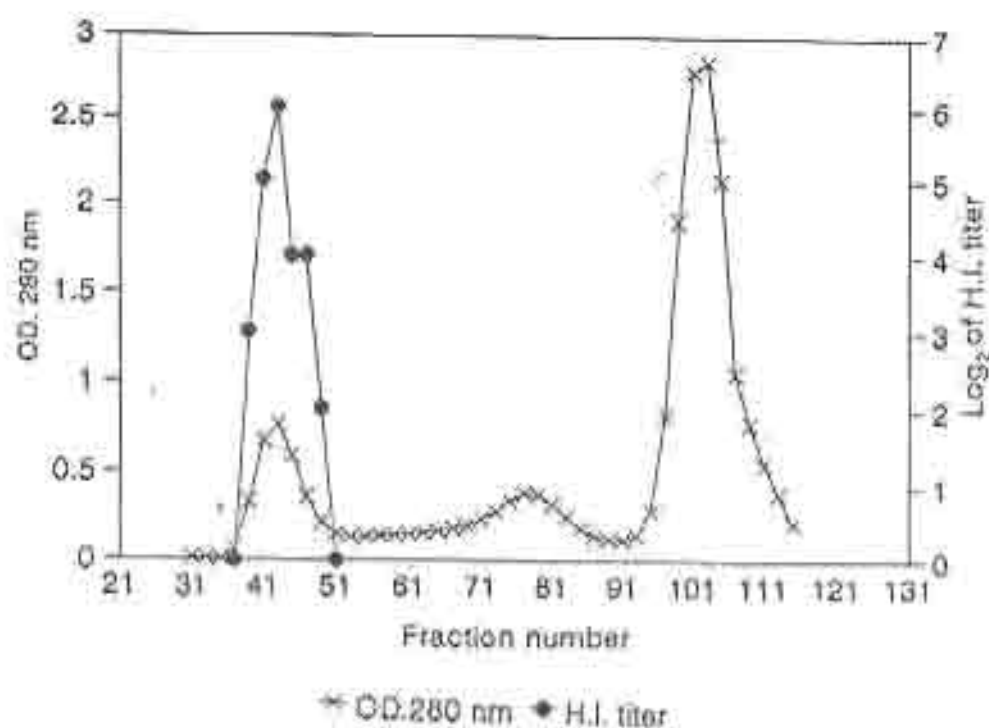
## ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ C-LBP

Step	Total protein (mg)	H.I. (titer)	Specific activity (titer/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
AmSO <sub>4</sub> ppt.	24.6	7680	312.2	100	1.0
Acetone ppt.	26.6	8960	366.8	116	1.1
Bio-Gel P-300	1.6	3200	2064.5	42	6.6
DEAE-Sepharcel	0.6	2560	4266.7	33	13.7

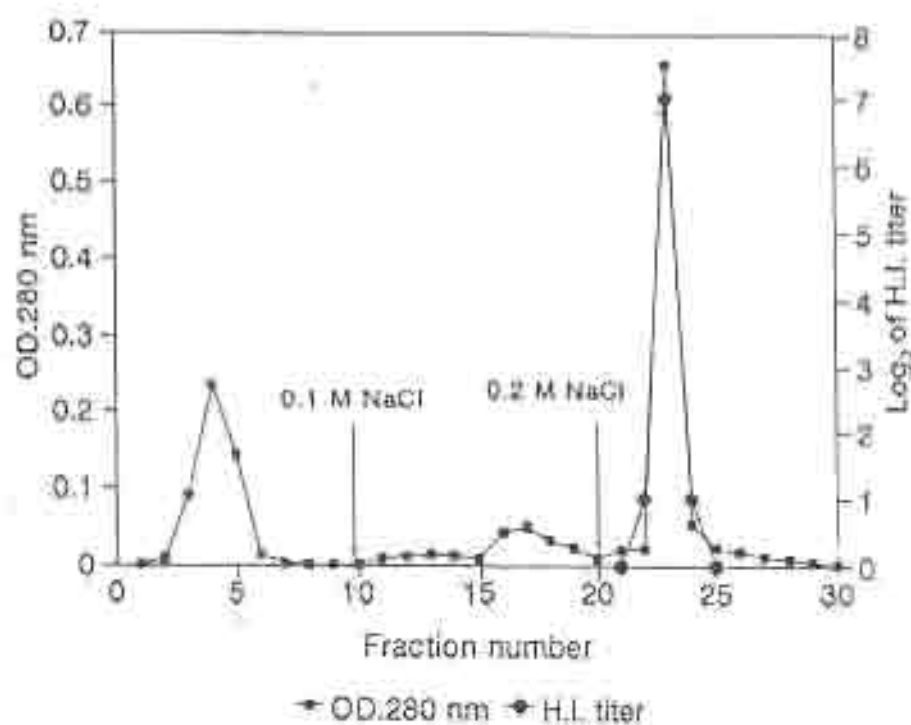
ตารางที่ 11

การทดสอบอิทธิพลของ glycosidases ชนิดต่างๆต่อการยับยั้งความสามารถของ C-LBP  
ที่มีต่อการจับกับวุ้นถวญที่กระบวนการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่าย โดยดูหอยล้น(H.I.)

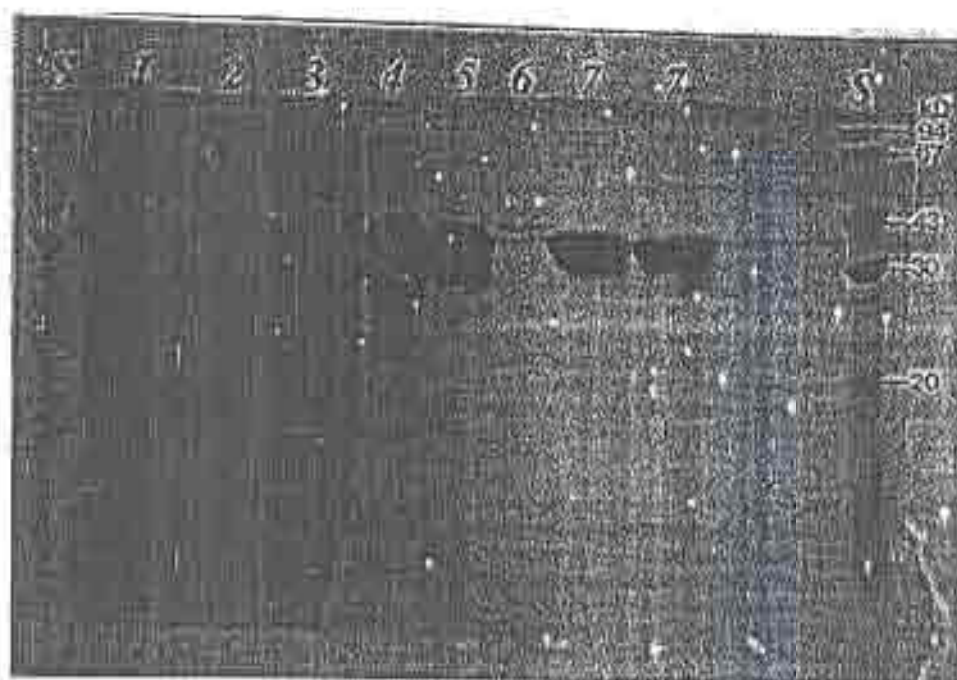
Glycosidases	Recovery H.I. activity (%)
Glucosidase (3 U)	100
Galactosidase (50 U)	100
Neuraminidase (0.25 U)	100
Chitinase (0.125 U)	25



รูปที่ 59 Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ C-LBP ผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300



รูปที่ 60 Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ C-LBP ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose



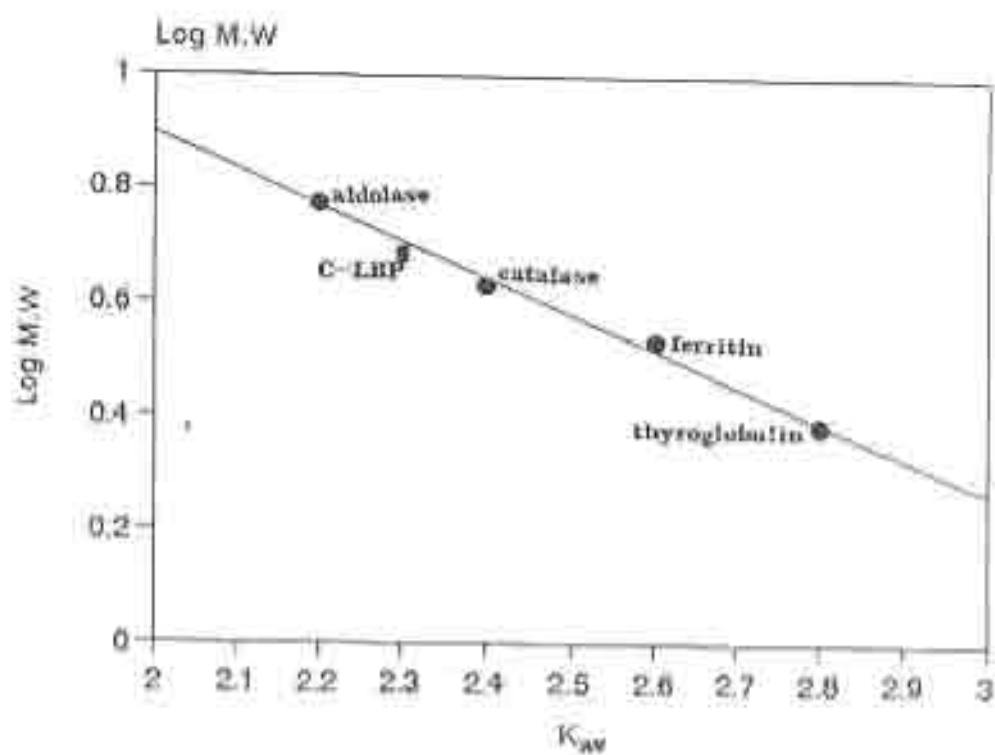
รูปที่ 61 SDS-PAGE ของ C-LBP ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ โดยการทำ gel 12.5% แล้วย้อมด้วย Coomassie blue R 250

S = Standard marker;

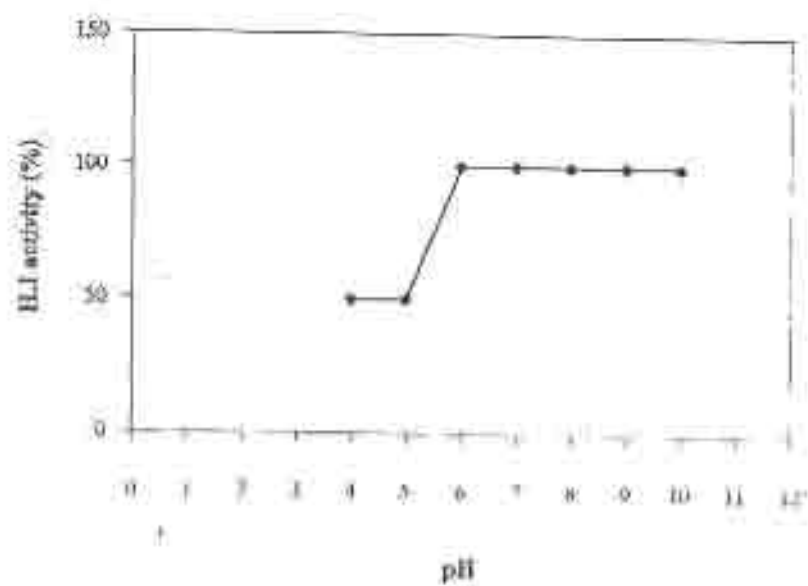
1, 2 & 3 = 40-55%, 55-70%, 70-85%  $\text{AmSO}_4$  pellet fraction, respectively

4 & 5 = Pooled peak fraction from BioGel P-150 & BioGel P-300, respectively

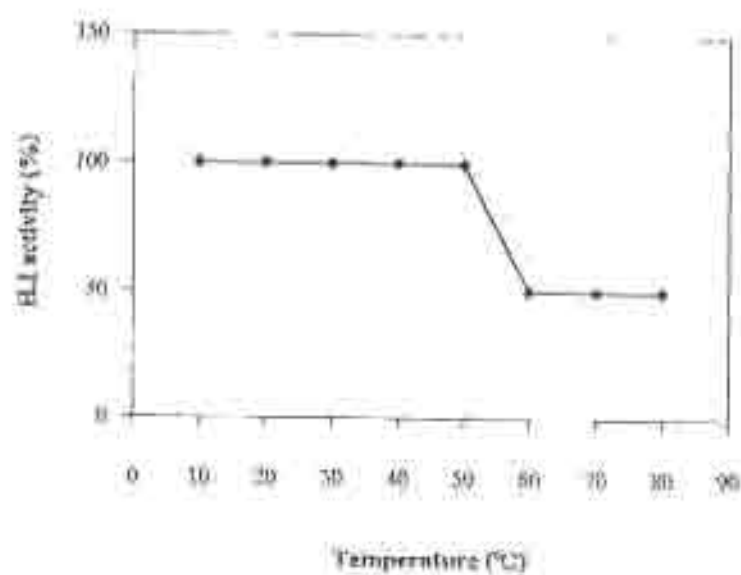
6 & 7 = Unbound fraction & Eluted fraction @ 0.2 M NaCl from DEAE-Sephacel, respectively



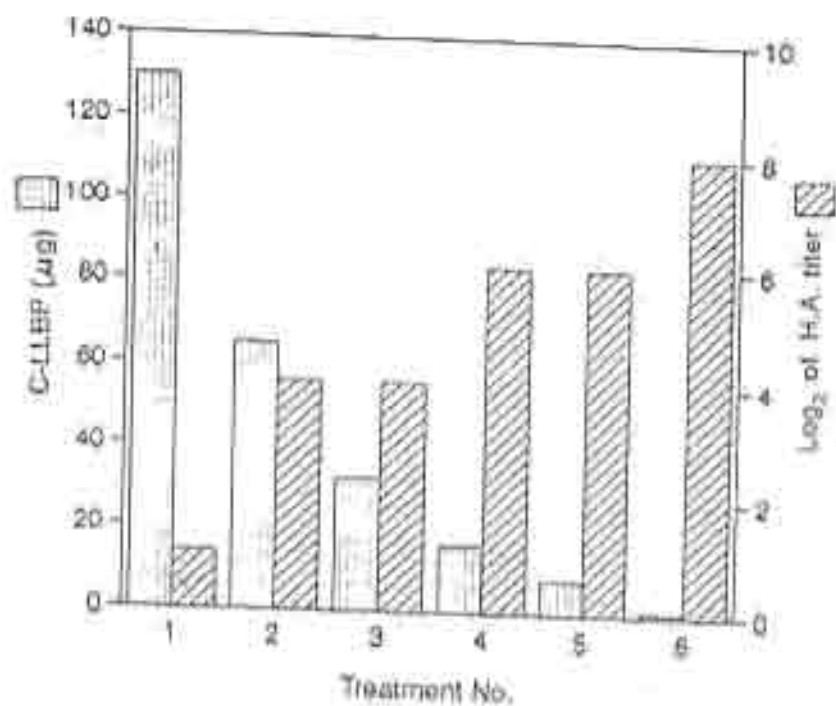
รูปที่ 62 ความสัมพันธ์ระหว่าง log molecular weight กับ partition coefficient ( $K_{av}$ ) ของโปรตีนมาตรฐานกับ C-LBP ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว โดยถาวรคอลัมน์คอลลัมน์ Sepharose 6B



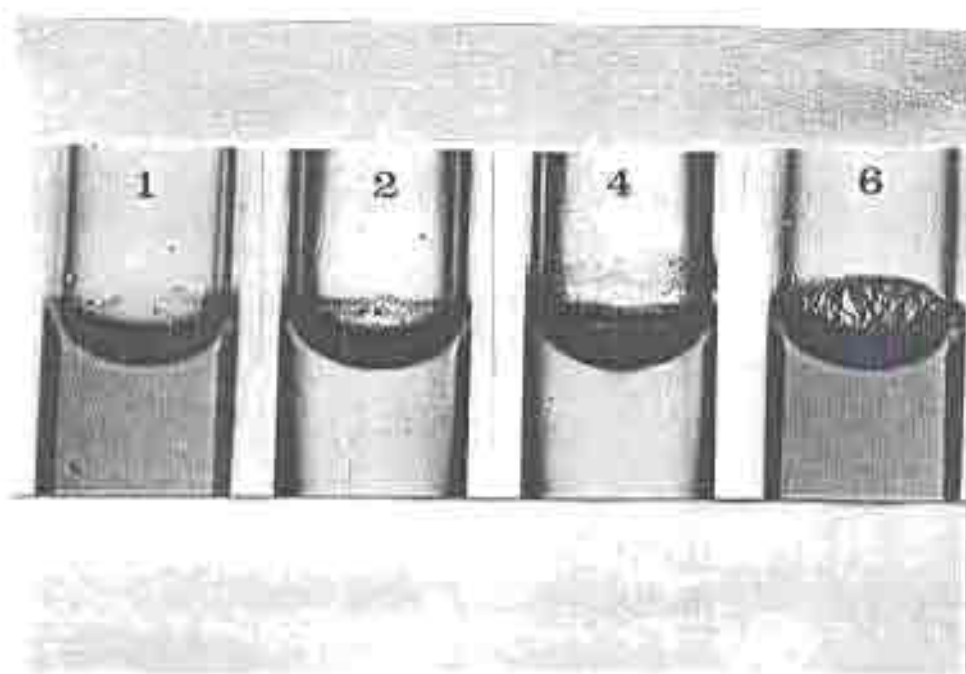
รูปที่ 63 ความเสถียรต่อ pH ของ C-LBP



รูปที่ 64 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ C-LBP



รูปที่ 65 ความสามารถของ C-LBP ต่อการยับยั้งการเพิ่มปริมาณการเกาะกลุ่มของ  
เม็ดเลือดแดงของกระต่าย โดยดูรอยจางจากอนุภาคดูทอยด์



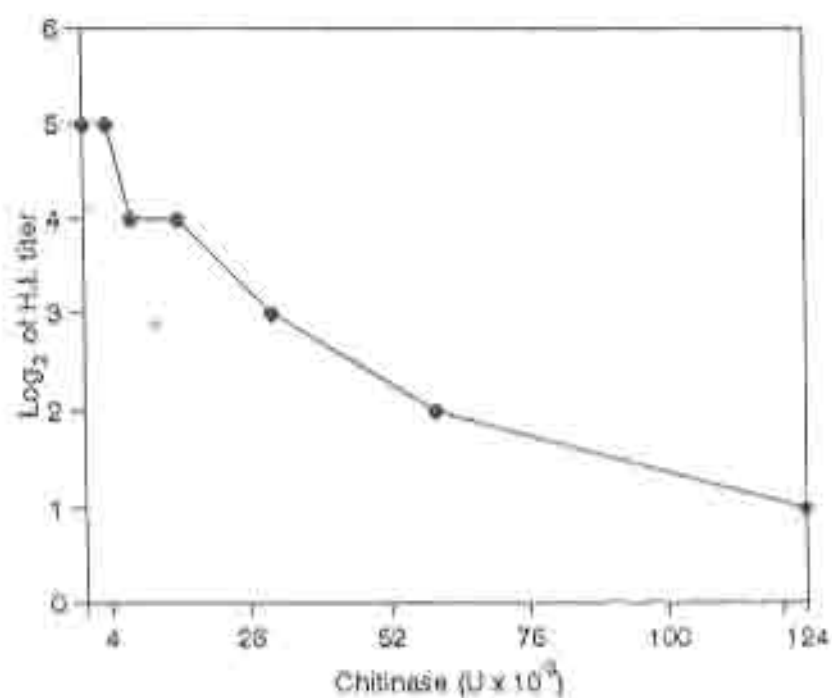
รูปที่ 66 ความสามารถของ C-LBP ต่อการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของ  
หนูขาวโดยดูการจับกัน

1 = C-LBP, 130  $\mu$ g + เซลล์เม็ดเลือดแดง, 5  $\mu$ g

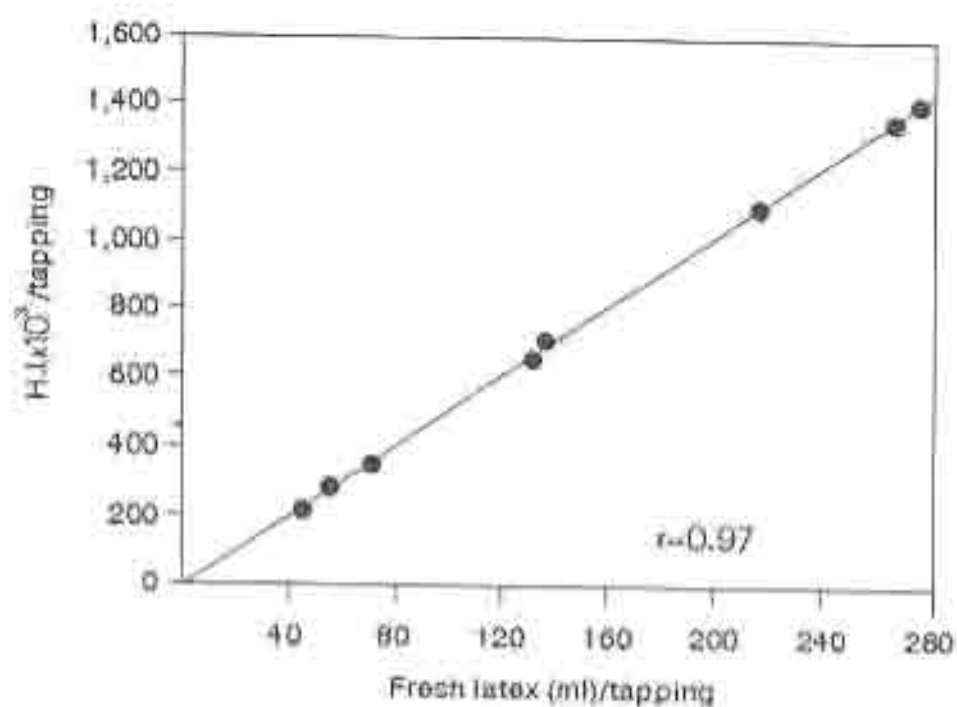
2 = C-LBP, 65  $\mu$ g + เซลล์เม็ดเลือดแดง, 5  $\mu$ g

4 = C-LBP, 16.25  $\mu$ g + เซลล์เม็ดเลือดแดง 5  $\mu$ g

6 = เซลล์เม็ดเลือดแดง, 5  $\mu$ g



รูปที่ 67 ผลของความเข้มข้นของ chitinase ในการยับยั้งความรุนแรงของ C-1.BP ที่มีต่อการยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรียในพืชด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



รูปที่ ๑๘ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ C-LBP กับ C-oxalate ในน้ำยางกับปริมาณน้ำยางที่ได้ต่อครั้งกรีด

#### 4. ข้อวิจารณ์

จากผลการทดลองศึกษาถึงกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับของท่อน้ำยาง ซึ่งแบ่งออกเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ (enzymatic process) และที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ (non-enzymatic process) นั้น การทดลองของกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ สามารถชี้ให้เห็นว่ามีไฮโดรเปอร์ออกไซด์คิวโนน ที่แยกได้จาก B-serum และ  $\text{NADH}$  ลงไป ในสารละลายที่ประกอบด้วย intact luteal กับ อนุภาคยาง ปรากฏว่าเกิดการแตกของลูเทออล โดยจะเห็นจากของลูเทออลลอยขึ้นไปรวมกับอนุภาคยางเมื่อถูกปั่นแยก (รูปที่ 41) การที่ลูเทออลแตกนี้ น่าจะเกิดจากปฏิกิริยารีดิวซ์ไฮโดรเปอร์ออกไซด์คิวโนนจาก B-serum ที่รีดลงไป ไปเป็นไฮโดรคิวโนน อะโรมาติกคิวโนน โดย QR ที่ผสมกับลูเทออล โดย อนุมูลคิวโนนที่เกิดขึ้นสามารถใช้  $\text{O}_2$  ออกซิไลส์ตัวเองกลับไปเป็น คิวโนน โดยจะให้  $\text{O}_2^-$  และ  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ที่จะทำปฏิกิริยากับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  เกิด  $\text{OH}^\cdot$  ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายโครงสร้างไขมันไม่อิ่มตัว ที่ผสมกับของลูเทออล ส่งผลให้ลูเทออลแตก การแตกของลูเทออลน่าจะเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับของท่อน้ำยาง Jacob et al (1985) ได้รายงานถึงจากค่าความสัมพันธ์ที่ตรงกันขึ้นระหว่างปริมาณการแตกของลูเทออล (bursting index) กับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งกรีด โดยมีค่าประสิทธิภาพสัมพันธ์ เท่ากับ 0.839 การศึกษาในทำนองเดียวกันพบความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างปริมาณ quinone และ QR ใน bottom fraction ที่ได้จาก centrifuged latex กับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งกรีด (รูปที่ 39) และอยู่ในระดับค่อนข้างสูง แต่การวัดปริมาณดังกล่าวต้องทำการวัดหลังจากการทำลายสภาพธรรมชาติของลูเทออลโดยทำให้แตกก่อน ดังนั้นจึงไม่สามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ใดๆได้ในสภาพธรรมชาติได้ ในทางตรงข้าม ผลที่ได้จากค่าประสิทธิภาพสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ POD ที่ได้จากเปลือกยาง และ สาร phenol จาก C-serum ในน้ำยาง กับปริมาณน้ำยาง หรือ น้ำหนักยางแห้งที่ได้ต่อครั้งกรีด ซึ่งได้ทำการวัดในสภาพธรรมชาติ ก็พบว่าอยู่ในระดับสูง (รูปที่ 9, 37) จากความสัมพันธ์นี้ จึงน่าจะเชื่อได้ว่าทั้ง POD และ C-serum phenol นี้ ถ้าหากที่ส่งเสริมให้ยางไหลได้นานหรือหนืดยางเกิดการดูดซับข้าง หรือเป็น anti-coagulating factor ทั้งนี้มีผลการวิจัยสนับสนุนเพิ่มเติมข้อเสนออีกอย่าง คือการทำงานของ POD และ PPO โดยสามารถออกซิไลส์ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ C-serum phenol ให้เป็น polyphenol (รูปที่ 23,38) และในปฏิกิริยาการทำงานของ POD และ PPO จะใช้  $\text{H}_2\text{O}_2$  และ  $\text{O}_2$  ร่วมด้วยตามลำดับ ทำให้เกิดโอกาสในการเพิ่มสารพิษออกซิเจนที่จะไปทำลายอนุมูลของลูเทออลลดลงไปด้วย

เมื่อลูเทออลแตกจะทำให้ลูเทออลที่ผสมกับของลูเทออลสามารถเหนียวน้ำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับอนุภาคยาง ทั้งนี้ได้รับการสนับสนุนโดยผลการทดลองที่พบว่าลูเทออลที่แตกและที่บริสุทธิ์ได้จากอนุมูลของลูเทออล (ตารางที่ 6, รูปที่ 43) นอกจากลักษณะที่เป็นผลดินในยาง

เหนียวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแล้ว (ตารางที่ 6) ยังสามารถเหนียวทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง (รูปที่ 45) ได้ด้วย จึงนำไปได้ว่าหลังจากการแตกของดูทอยด์แล้ว จะเกิดภาวะเหนียวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางกับดูทอยด์ชนิดที่ใดก็ตามบนผนังเมมเบรนของดูทอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับการสังเกตได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ Southern (1969) ที่พบว่าบริเวณดูทอยด์ปลายท่อน้ำยางจะมีการก่อตัวของชั้นที่ประกอบด้วย อนุภาคยางที่เกาะบนเมมเบรนของดูทอยด์ ซึ่งมีผลการทดลองที่ชี้ให้เห็นว่าก่อนดูทอยด์ดังกล่าวไม่จำเป็นที่จะมีการเกิดขึ้นมาเลยๆ ทั้งนี้เนื่องจากมีผลการทดลองสนับสนุนชี้ให้เห็นชัดเจนว่า RP-LBP ที่สกัดและทำบริสุทธิ์ได้จากอนุภาคยาง (ตารางที่ 9, รูปที่ 54) สามารถไปยับยั้งการทำงานของดูทอยด์ในการเหนียวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับของเม็ดเลือดแดง และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงเพราะสามารถยับยั้งได้ด้วยระดับความเข้มข้นที่ใช้ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับไกลโคโพรตีนที่สามารถทำการยับยั้งได้เช่นเดียวกับแหล่งอื่นๆ (ตารางที่ 6) จากผลวิจัยนี้อาจชี้แนะได้ว่า ดูทอยด์ชนิดนี้มี receptor site สำหรับให้ carbohydrate ligand ซึ่งอยู่บนไกลโคโพรตีนเกาะจับ RP-LBP ซึ่งยึดติดสิ่งที่ใช้เชื่อมไกลโคโพรตีน (รูปที่ 54) อยู่ทีละหนึ่งของอนุภาคยางเกาะจับได้ ผลการวิจัยนี้ออกมาจะเป็นการค้นพบคุณสมบัติชนิดใหม่ของพืชแล้ว ยังเป็นการชี้ชัดถึงหน้าที่ใหม่ของเมมเบรนอีกด้วย กล่าวคือ เมมเบรนเซลล์ของดูทอยด์ในน้ำยางทำหน้าที่เป็น coagulating factor ในการก่อให้เกิดการอุดตัน เพื่อมีขนาดแผ่นบริเวณปลายท่อน้ำยางที่ถูกอุดไว้

ในทางตรงข้าม ผลการทดลองในส่วนน้ำไซ (C-serum) ของน้ำยาง พบว่ายังมีไกลโคโพรตีนอีกชนิดหนึ่งคือ C-LBP ซึ่งหลังจากการทำบริสุทธิ์แล้ว (ตารางที่ 10, รูปที่ 61) พบว่ามีความสามารถยับยั้งการทำงานของดูทอยด์ในการเหนียวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง หรืออนุภาคยาง (รูปที่ 65, 66) C-LBP จึงน่าจะทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factor (protein) ที่ไปแย่งจับกับดูทอยด์บนเมมเบรนของดูทอยด์ ยับยั้งไม่ให้เกิดการจับกับอนุภาคยาง นอกจากนั้น ผลการทดสอบประสิทธิภาพสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ C-LBP กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักของยางที่ได้คือครีกรีวิต ที่อยู่ในกระบวนการ non-enzymatic process นี้พบว่าสัมพันธ์กันโดยตรงและอยู่ในระดับที่สูงมากที่สุด (0.97) (รูปที่ 37) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าประสิทธิภาพสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณ POB และ C-serum phenol กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักของยางที่ได้คือครีกรีวิต (รูปที่ 9, 17) ซึ่งก็เป็น anti-coagulating factor ในกระบวนการ enzymatic process ดังนั้นกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวเนื่องกับการอุดตันของท่อน้ำยางแบบ non-enzymatic น่าจะมีบทบาทสำคัญกว่า และน่าจะถูกกล่าวได้ว่า กระบวนการ enzymatic ที่ส่งผลให้ดูทอยด์แตกมาหาหรือบดเยื่อใยใด ก็ไม่น่าจะสำคัญไปกว่า บทบาทของ C-LBP ในน้ำยางซึ่งน่าจะเป็นตัวบ่งชี้และชี้ชัดว่า จะเกิดภาวะการอุดตันตัวกันระหว่าง จากเมมเบรนดูทอยด์กับอนุภาคยางเพื่อก่อให้เกิดการอุดตันได้เร็วหรือไม่โดยเฉพาะในระยะแรกเริ่มของกระบวนการ C-LBP จึงน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ที่เกี่ยวกับการอุดตันตัว หรือไหลไล่นานของน้ำยางที่สำคัญที่สุด

## 5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยเรื่องนี้พอจะสรุปได้ว่า กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมของน้ำยางในต้นยางพาราในขั้นแรกเกิดจากการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่สร้างสารฟีนอลออกซิเจนเพื่อไปทำลายเสถียรภาพของเมมเบรนของอนุภาคลูทอยด์ทำให้ลูทอยด์แตก ความรุนแรงหรือปริมาณการแตกของลูทอยด์เกี่ยวข้องกับบทบาทของเอนไซม์ออกซิเดสอื่นๆ ที่จะเสริมหรือลดปริมาณสารฟีนอลออกซิเจน ขึ้นมีต่อไปจะเกิดจากที่ลูทอยด์ ซึ่งโพลีฟีนอลจากเมมเบรนของลูทอยด์หลังการแตก ไปทำหน้าที่เหมือนเตาเงิน ในการจับจำเพาะกับโกลโคโปรตีน RP-LBP บนผิวอนุภาคยาง ก่อให้เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขัดขวางการไหลของน้ำยางและเกิดการอุดตันของท่อน้ำยางในที่สุด กลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดการอุดตันทั้งหมดนี้รวมเป็น coagulating factors ในทางกลับกันจะมีกลุ่มสารที่ทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factors ซึ่งได้แก่เปอร็อกซิเดสและฟีนอลในซี-ซีวัน ที่ส่งผลต่อการลดการเกิดสารฟีนอลออกซิเจน และ โกลโคโปรตีน C-LBP ในซี-ซีวันของน้ำยาง ซึ่งไปขัดขวางการเกาะกลุ่มระหว่างลูทอยด์กับอนุภาคยางปริมาณ anti-coagulating factors เหล่านี้ จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งกรีด ซึ่งสมควรจะพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพในการไหลของน้ำยางในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไป

งานวิจัยเรื่องนี้มีประโยชน์ที่จะใช้ C-LBP เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพการไหลของน้ำยาง (flow marker) สำหรับคัดเลือกยางพันธุ์ดี ซึ่งต้องมีคุณสมบัติในการไหลได้เก่ง นอกเหนือจากคุณสมบัติการสร้างยางได้เก่งแล้ว โดยน่าจะนำ flow marker นี้ไปจับคู่กับตัวบ่งชี้ศักยภาพความต้านทานในการสร้างน้ำยาง (synthetic marker) ซึ่งได้แก่เอนไซม์ HMG-CoA reductase โดยคณะผู้วิจัยได้รายงานสรุปผลไว้ก่อนแล้ว

## บรรณานุกรม

1. Milford, G.F.J., Paardekooper, E.C. and Ho, C.Y. (1969) *J. Rubb. Res. Inst. Malaysia* 21, 274.
2. Southorn, W.A. and Edwin, E.E. (1968) *J. Rubb. Res. Inst. Malaysia*, 20(4), 187.
3. Sherief, P.M. and Sethuraj, M.R. (1978) *Physiol. Plant.* 42, 351.
4. Jacob, J.L., Eschbach, J.M., Prevot, J.L., Roussel, D., Lacroite, R., Christin, H. and d'Anzac (1985) *Proc. Int. Rubber Conf.*, 43.
5. d'Anzac, J., Smier, C., and Christin, H. (1985) *Proc. Int. Rubber Conf.*, 102.
6. Wosilait, W.D. and Nason, A. (1958) *J. Biol. Chem.* 206, 255.
7. Viljoen, C.D., Cloete, F., Bates, D. P. and Kruger, H. (1983) *Phytochem.* 22(2), 363.
8. Lind, C., Hochstein, P. and Ernster, L. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 216(1), 175.
9. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D., Sothibandhu, R., Savachittanont, W. and Sukontat, W. (1988) *Proceedings of the IRDB Rubber Physiology and Exploitation Meeting, Paris, France* p. 161.
10. Witsuwannakul, R., (1985) *Experientia* 42, 44.
11. Witsuwannakul, R., and Liap, V. (1985) *The 11th Conference of Science and Technology of Thailand*, p. 254.
12. Chotechitpatworakul, W. (1987) *Master Thesis in Biological Sciences*, Prince of Songkla University.
13. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D. and Charoentlupakorn, N. (1993) *The 19th Conference on Science and Technology of Thailand*, p. 556.
14. Charoentlupakorn, N. (1994) *Master Thesis in Plant Science*, Prince of Songkla University.
15. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680.
16. Lewry, O.H., Roseborough, N.J., Furr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
17. Shannon, L.M., Kay, E. and Lew, J.Y. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2166.
18. Gonzalez, A., Sanchez Tames, R. and Rodriguez, R. (1991) *Physiol. Plant.* 83, 611.
19. Barr, R. and Crane, F.L. (1971) in *Methods in Enzymology* 23, 372.

20. Nalecz, K.A., Bolli, R. and Azzi, A. (1986) in *Membrane Proteins* (Azzi, A., Masotti, L. and Vecli, A. eds.) p.11, Springer-Verlag, New York.
21. Iiyama, K., Stone, R.A. and Micauley, B.J. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1538
22. Spiker, J.K., Crawford, D.L. and Thiel, E.C. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 518

# ภาพผนว

ผลงานจากโครงการวิจัยที่นำไปสู่ publication ในวารสารระดับนานาชาติมีดังนี้:

## 1) Publication ที่ตีพิมพ์แล้ว

- 1.1 Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D., Sattaysevana, B and Pasitkul, P. (1997) Peroxidase from *Hevea brasiliensis* bark: purification and properties. *Phytochemistry* 44 (3), 237

## 2) Publication ที่อยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript

- 2.1\* Witsuwannakul, R., Pasitkul, P., Witsuwannakul, D. and Stone B. (1998) Latoidin is rubber particle agglutinin in latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* (to be submitted)
- 2.2\* Witsuwannakul, D., Witsuwannakul, R. and Rukseree, K. (1998) Latoidin binding protein from rubber particle: purification and characterization. *Phytochemistry* (to be submitted)
- 2.3\* Pasitkul, P., Witsuwannakul, D. and Witsuwannakul, R. (1998) Anti-rubber particle agglutininin C-serum of *Hevea* latex. *Phytochemistry* (to be submitted)
- 2.4 Witsuwannakul, R., Charonthipakorn, N. and Witsuwannakul, D.(1998) Polyphenol oxidase from *Hevea* latex: purification and characterization. *Phytochemistry* (to be submitted)
- 2.5 Charonthipakorn, N., Witsuwannakul, D. and Witsuwannakul, R.(1998) NADH quinone reductase from *Hevea* latex: purification and characterization. *Phytochemistry* (to be submitted)

[\* To be submitted under series: Proteins involved in coagulation of natural rubber latex]



Pergamon

PII: S0031-9422(96)00487-6

Phytochemistry, Vol. 44, No. 2, pp. 83-90, 1997  
 Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd  
 Printed in Great Britain. All rights reserved  
 0031-9422/97 \$12.00 + 0.00

## PEROXIDASE FROM *HEVEA BRASILIENSIS* BARK: PURIFICATION AND PROPERTIES

RASEEUN WITTISAWANAKUL, EUBRAYOT WITTISAWANAKUL,\* BENJAMAZ SATTATTEWANA and PIYAPORN PASITREU

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkhro University, Huai-Yai 80112, Thailand; \*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

(Received in revised form 27 June 1996)

**Key Word Index**—*Hevea brasiliensis*; Euphorbiaceae; bark; peroxidase; purification; properties.

**Abstract**—A peroxidase (EC 1.11.1.7) has been isolated and purified from strips of bark from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). A positive correlation between bark peroxidase level and rubber yield per tapping was observed. High level of peroxidase was found in newly excised bark strips obtained after tapping. The peroxidase converted phenols isolated from the C-serum fraction of centrifuged latex to polyphenolic forms. The peroxidase was purified to homogeneity by size exclusion, ion exchange and affinity chromatography. Gel filtration chromatography and SDS-PAGE indicates that the purified peroxidase is composed of a single polypeptide of  $M_r$  50 000. The enzyme has a  $pI$  of 3.5. The  $K_m$  values for *o*-dianisidine and  $H_2O_2$  were 20 and 18.6  $\mu$ M, respectively, and the  $K_i$  values for KCN and NaN<sub>3</sub> for these substrates were 10  $\mu$ M and 2.7 mM, respectively. The possible role of the ethylene-inducible bark peroxidase in latex coagulation is discussed. Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd.

### INTRODUCTION

Peroxidases, which are widely distributed in plants [1], play major roles in the biosynthesis of cell wall polymers [2], are implicated in wound healing [3, 4] and may be involved in latex embolism [5] in defence against pathogen attack [6]. Plants contain several peroxidase isoenzymes whose pattern of expression is tissue-specific and developmentally regulated or responsive to environmental stimuli [7]. Wound-induced peroxidases have been studied in potato tubers and root tissues [8, 9].

In rubber production, latex is collected from the rubber tree by a tapping procedure which involves stripping the bark to gain access to the latex stored in the laticiferous vessels of the inner bark. This tapping process induces ethylene production [10]. One of the known consequences of ethylene production is the stimulation of the production of pathogenesis-related proteins, including enzymes. Here we report the characterization of a *Hevea* bark peroxidase, induced by wounding incurred during tapping, and its possible involvement in the regulation of rubber latex flow.

### RESULTS

The activity of *Hevea* bark peroxidase (HBP) is positively correlated with rubber latex yield per tapping (Fig. 1). Newly excised bark strips show a very high level of peroxidase activity per unit wet weight compared with that in the latex exudate collected after

excising the bark strip by tapping (Fig. 2). The peroxidases in the bark extract C- and B-sera were separated by PAGE under non-reducing condition and detected *in situ* by a chromogenic assay. One major and one minor band were found in the bark extract, and two weakly reacting peroxidase components were found in each of the C- and B-sera. One of these components had the same mobility as the major bark peroxidase (Fig. 2). The predominant peroxidase, accounting for >90% of HBP in the bark extract was purified to homogeneity (Table 1) by sequential chromatography on Sephadex G-100 (Fig. 3), DEAE-cellulose and Con A-Sepharose III. SDS-PAGE (Fig. 4) and gel filtration showed that the enzyme was a monomeric polypeptide with  $M_r$  of 50 000. The  $pI$  was determined to be 3.5

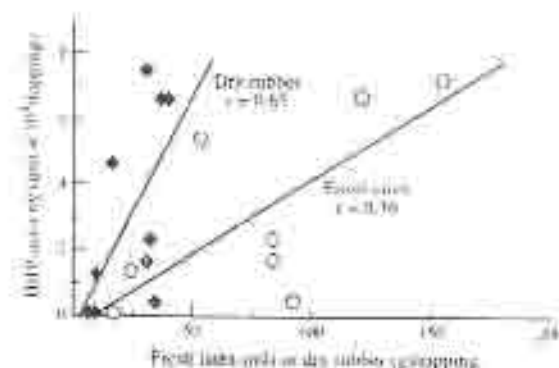


Fig. 1. Correlation between HBP level and rubber yield per tapping.



Fig. 3. Peroxidase activity staining gel (non-denaturing PAGE) of samples of equivalent wet wt. A and B, *Hevea* bark strips; C and D, B-seedling and E and F, C-seedling.

(Fig. 5). The  $K_m$ s of HBP for  $\alpha$ -diaminidine and  $H_2O_2$  were 70 and 18.6  $\mu$ M, respectively. The  $K_m$ s of HBP in the presence of KCN and NaN<sub>3</sub> were determined to be 10  $\mu$ M and 27 mM, respectively. When C-seedling phenols were used as substrates in the presence of  $H_2O_2$ , the reaction products showed an increase in  $\lambda$  around 260 nm (originally a minimum) and 420–440 nm above the control (Fig. 6).

#### DISCUSSION

The peroxidase isoenzymes in the bark strips excised during tapping were more abundant than those in the C- and B-seeds with a similar PAGE mobility. Other peroxidase isoenzymes different from those in the bark were additionally present in rubber latex. These differences in compartmentalization of the peroxidase iso-

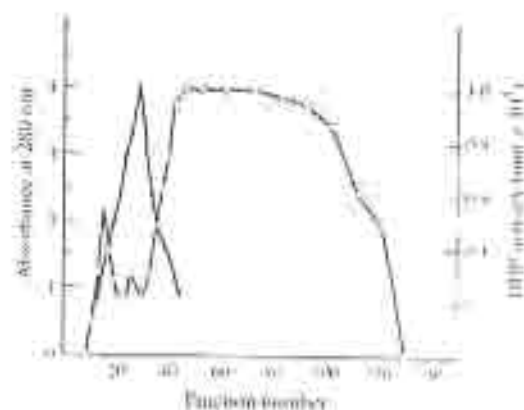


Fig. 4. SDS-PAGE of purified HBP and HBR. Lane 1 and 2 contained 100 and 50  $\mu$ g of HBP. Lane 3 contained 50  $\mu$ g of HBR (type VI).

zymes only suggest different in vivo functions for the peroxidases in the bark and latex.

The purified HBP consists of a single peptide with  $M_r$  of 50 000, similar to that reported for the peroxidase from *Euphorbia characias* latex [11] but higher than that determined for a number of other plant peroxidases [12–14]. The HBP and *E. characias* latex peroxidases have similar  $A_{460}$  values in the presence of KCN and NaN<sub>3</sub>.

In latex collection, the rubber tree is wounded every other day by excision of a 1–2 mm thick strip of bark, 0.5–1 cm deep and up to 15 cm long, which results in transverse opening of latex vessels located in the inner

Table 1. Purification protocol of HBP isoenzyme

Fraction	Total protein (mg)	Total activity ( $\mu$ A $\times 10^3$ )	Specific activity ( $\mu$ A $\times 10^3$ /mg)	Yield (%)
Bark extract	1980	90	1.15	100
Sephadex G-100	175	25	14.3	83
DEAE-Cellulose	3.5	3	200	33
Con A-Sephrose 4B	0.9	5.6	727	12

\*One unit activity was defined as the amount of enzyme required to produce a change in  $A$  of 0.1 at 460 nm per min.



Fig. 5. Isoelectric focusing gel electrophoresis of HBP. Lanes S and H represent standard of marker proteins and HBP respectively.

bark. Many biochemical changes follow this repetitive injury (tapping) and the ensuing wound healing. One of these biochemical responses is the induction of very high levels of HBP.

The positive correlation noted between HBP level and rubber latex yield suggests that the peroxidase may have an influence on the duration of latex flow. After tapping, latex exudes from the latex vessels in the phloem, which extend some 0.5 m below the tapping

site, before coagulation stops the flow. The rubber tree has a mechanism to minimize the loss of metabolic products by inducing formation of a large number of disjunct agglutinates, or floes, composed of degraded latex lipoids (membrane-bound organelles) and rubber particles to form caps which plug the ends of the wounded latex vessels [15]. The duration of latex flow is reported to be dependent on the integrity of the lumina [16]. The presence of an NADPH oxidoreductase (EC 1.6.99.2) which leads to formation of  $H_2O_2$ , lipoperoxide and hydroxyl free radicals has been reported in the lumina [17]. The release of these free radicals is claimed to be responsible for the peroxidative degradation of linoleic membrane lipids and hence an increase in latex membrane rupturing [17]. The HBP may have an  $H_2O_2$  reducing role, as has been suggested for certain bacterial peroxidases [18], with a consequent stabilizing effect on the latex membranes and this would tend to prolong the duration of latex flow in trees with peroxidase-rich bark. Our results may reveal the ability of HBP to convert latex C-serum phenols in the presence of added  $H_2O_2$  to products tentatively identified as polymerized phenols by the increase in  $A$  in the 320–440 nm region, similar to those observed in lignin peroxidase assays [19]. The major change in the 260–280 nm region with the increase in the ratio  $A_{260}$  to  $A_{280}$  suggests oxidative modification of phenolic compounds [20] probably by the action of peroxidase. An accumulation of phenolic polymers accompanied by an equally rapid and massive increase in the activity of a specific group of anionic peroxidases has been reported in soybean cotyledon tissue following treatment with *Phytophthora megasperma* L. sp. *Glycine* walt-glucan [21]. In the rubber tree, the application of ethrel has been shown to lead to a sharp increase in total latex phenols followed by a progressive increase up to 230% [22]. Thus HBP induced by tapping injury, could convert wound-in-

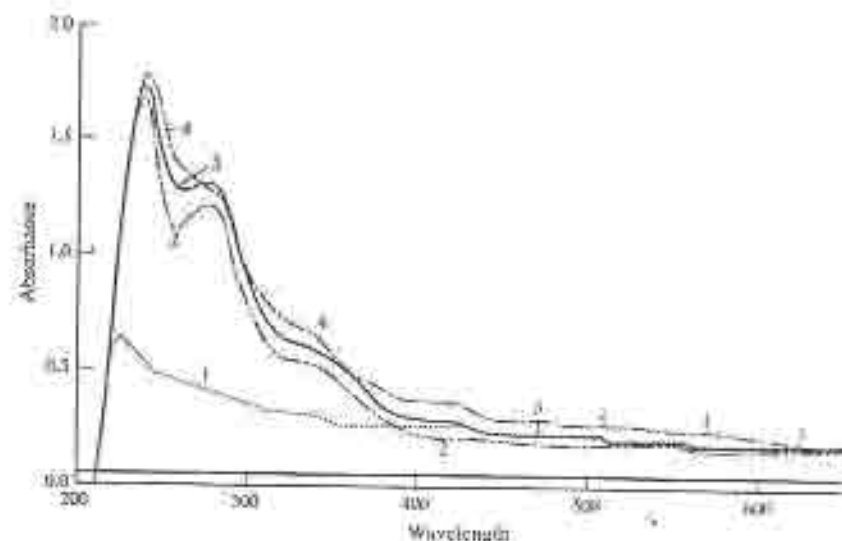


Fig. 6. UV-Visible spectroscopic scans of variously trapped C-sera: (1) HBP; (2) C-serum phenol; (3) HBP + C-serum phenol; (4) HBP + C-serum phenol +  $H_2O_2$ ; (5) HBP + C-serum phenol +  $H_2O_2$ .

luced latex phenols as substrates into phenolic polymers. These phenolic polymers may enhance latex coagulation due to associations with proteins. Thus the HBP may have opposing effects on latex flow.

#### EXPERIMENTAL

**Chemicals.** *o*-Dianisidine, lysozyme, pepsin, ovalbumin, bovine serum albumin, urea, DEAE-cellulose, Con A-Sepharose 4B and Sephadex G-100 were from Sigma.  $H_2O_2$  was from Merck. All other chemicals were of reagent grade.

**Collection and fractionation of latex.** Freshly tapped latex was collected in an ice-chilled beaker from regularly tapped trees of the RRIM 600 clone. The latex was fractionated by centrifugation as in ref. [23] to give a floating rubber fr., C-serum (latex zymol), and the latex (bottom) fr., respectively. H-serum was prepared by repeated freezing and thawing of the latex fr. and used as the source of the peroxidase.

**Dry rubber yield.** Fresh rubber latex obtained after each tapping was oven-dried at 65° to constant wt.

**C-Serum phenol preparation.** The C-serum fraction (60 ml) was adjusted to pH 12–13 with NaOH, centrifuged (15 000 g for 15 min). The supernatant fr. was kept and extracted with an equal vol. of  $CHCl_3$ . The  $CHCl_3$  phase containing phenolic compounds was collected, adjusted to pH 1 with HCl and extracted into  $CHCl_3$ . The organic fr. was collected, washed to dryness and the residue dissolved in 5 ml of peroxidase assay buffer.

**Bark collection.** Newly opened bark strips were collected after tapping, rubber wounds were removed and the string-free bark strips washed with  $H_2O$  and used immediately for extraction of peroxidase activity.

**Preparation of bark extract.** The washed bark (12 kg) was homogenized in 10 mM K-P<sub>i</sub> buffer, pH 7 (buffer A). The homogenate was filtered through cheese cloth to remove the bark debris and the crude bark extract separated as a clear dark-brown supernatant fr. by centrifugation at 20 000g for 1 hr. The extract was concentrated by ultrafiltration (Amicon, 10 000 MW cut-off).

**Sephadex G-100 chromatography.** The concentrated crude bark extract (1 ml) was loaded onto a Sephadex G-100 column (1.8 × 60 cm), previously equilibrated with buffer A and eluted with the same buffer at a flow rate of 20 ml hr<sup>-1</sup>. Frs (3 ml) were collected and assayed for peroxidase and peak frs pooled.

**DEAE-cellulose chromatography.** The concentrated enzyme fr. obtained from Sephadex G-100 chromatography was dialysed and loaded onto a DEAE-cellulose column (2 × 14 cm), previously equilibrated with buffer A at a flow rate of 15 ml hr<sup>-1</sup>. The column was washed with the same buffer. The enzyme was eluted with buffer A containing 0.1 M NaCl. Fractions (1 ml) were collected and assayed for peroxidase activity.

**Concanavalin A-Sepharose 4B affinity chromatography.** Peak frs from DEAE-cellulose chromatography were dialysed against buffer A and loaded onto a Con A-Sepharose 4-B column (1 × 5 cm), previously

equilibrated with buffer A. The enzyme was eluted with the same buffer containing 0.1 M mannose. Frs (1 ml) were collected for the determination of peroxidase activity.

**$M_r$  determination by Sephadex G-100 gel filtration.** The purified peroxidase obtained after Con A-Sepharose 4-B chromatography was loaded on a Sephadex G-100 column (1 × 90 cm), previously equilibrated with buffer A, at a flow rate of 12 ml hr<sup>-1</sup>. Frs (3 ml) were collected and their  $A_{280}$  nm and peroxidase activity measured. The column was separately calibrated using lysozyme, pepsin, ovalbumin and bovine serum albumin as  $M_r$  markers.

**Peroxidase assay. Colorimetric assay.** Peroxidase activity was determined by the method of ref. [24]. The assay mixture contained 0.5 ml of 0.05% *o*-dianisidine, 0.1 ml of 0.1 M  $H_2O_2$  in 0.05 M NaOAc buffer, pH 5.4 in a total vol. of 3 ml. Peroxidase activity was measured by the change of  $A$  at 460 nm at 30° due to *o*-dianisidine oxidation, using the assay mixture without enzyme as a blank. One unit of activity is defined as the amount of enzyme required to produce a change in  $A$  of 0.1 at 460 nm per min.

**Spectrophotometric assay.** The assay mixture contained 10  $\mu$ l (4  $\mu$ g) of purified HBP, 0.5 ml of C-serum phenol, 50  $\mu$ l of 0.1 M  $H_2O_2$  in 0.05 M NaOAc buffer, pH 5.4 in a total vol. of 0.50 ml. The spectrum of the reaction mixt. was obtained between 200 and 600 nm.

**$K_m$  determination.** Michaelis-Menten variation for the peroxidase substrates *o*-dianisidine and  $H_2O_2$  were determined by incubating 10  $\mu$ g of purified peroxidase with varying amounts of *o*-dianisidine along with fixed amounts of  $H_2O_2$  or vice versa. The  $K_m$  values were determined from double reciprocal plots of enzyme activity and substrate amount.

**$K_i$  determination.** The standard assay mixt. contained 10  $\mu$ g of purified peroxidase with varying amounts of *o*-dianisidine and KCN or NaBr, respectively. The  $K_i$  value for each inhibitor was obtained from a Dixon plot in which  $1/v$  was plotted against inhibitor concn.

**Isoelectric point of the purified HBP (7  $\mu$ g)** was determined by isoelectric focusing on 5% polyacrylamide gel with 2% buffering 3.0 M ampholytes in Model 111 Mini HP Cell (Bio-Rad). The potential difference was increased stepwise according to the manufacturer's instructions.

**SDS-polyacrylamide gel electrophoresis** was performed according to ref. [25]. For non-denaturing PAGE the same procedure was followed except that the equilibrated sample was loaded onto the gel. SDS was removed from the gel by soaking in 30% 2-ProOH solution for 30 min before dipping in peroxidase assay mixt. for activity staining.

**pI point** was determined by the method of ref. [26].

**Acknowledgements.**—We would like to thank Professor Bruce Stone for his critical reading of the manuscript. Financial support by the German Science and Research Foundation (DFG) and the German Research

## REFERENCES

1. Caspari, T., Freni, C., Thorpe, T. and Ciscernin, H. (1982) in *Peroxidase 1970-1980: A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants*, p. 1. University of Geneva Press, Geneva, Switzerland.
2. Hyatt, K., Lam, T. H. T., Mokke, P. J., Ng, K., Rhodes, D. J. and Stone, B. A. (1993) in *Storage Cell Wall Structure and Digestibility* (Jung, H. J., Buxton, D., Hartfield, R. and Ralph, J., eds), p. 621. American Society of Agronomy.
3. Espejo, K. E., Franceschi, V. R. and Kolantarky, P. E. (1986) *Plant Physiol.* **81**, 487.
4. Lagrimini, L. M. and Rothstein, S. (1987) *Plant Physiol.* **84**, 438.
5. Grubbow, H. J. and Langer-Schwarz, H. (1983) *Planta* **157**, 131.
6. Grubbow, H. (1981) in *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7 (Conn, E. R., ed.), p. 457. Academic Press, New York.
7. Lagrimini, L. M., Burkhardt, W., Mayer, M. and Rothstein, S. (1987) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7542.
8. Imazeki, H., Uchiyama, M. and Ohtani, I. (1968) *Agri. Biol. Chem.* **32**, 387.
9. Imazeki, H. (1970) *Plant Physiol.* **46**, 173.
10. Gwei, P., Wanshan, Y. and Shampung, Y. (1986) in *Proceedings of the 1986 Rubber Physiology and Exploitation Meeting* (Yanping, P. and Garwot, Z., eds), p. 39. Haimen, China.
11. Morris, G., Modin, R. and Knudsen, A. (1984) *Phytochemistry* **23**, 953.
12. Thomas, R. L. and Jen, J. J. (1980) *Prep. Biochem.* **10**, 581.
13. Devedgie, C. J., Rogers, S. J. and Hensley, R. (1984) *Phytochemistry* **23**, 723.
14. Sasaki, K., Iwakiwa, O., Fukusaki, T., Nakagawa, H., Kai, Y., Kakum, T., Yamashita, T., Kato, N. and Haruo, T. (1986) *J. Biochem.* **99**, 485.
15. Southern, W. A. (1968) *J. Rubber Res. Inst. Malaysia* **20**, 106.
16. Southern, W. A. and Edwin, E. H. (1968) *J. Rubber Res. Inst. Malaysia* **20**, 187.
17. D'Auzac, J. and Jacob, J. L. (1989) in *Physiology of Rubber Tree Latex* (D'Auzac, J., Jacob, J. L. and Christin, H., eds), p. 60. CRC Press, Florida.
18. Hochman, A. (1993) in *Plant Peroxidase: Biochemistry and Physiology* (Webb, K. G., Benveniste, S. K., Paul, C. and Goggin, H., eds), p. 111. University of Geneva Press, Geneva.
19. Spiker, J. K., Crawford, D. L. and Thig, E. L. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 518.
20. Hyatt, K., Stone, B. A. and Macaulay, H. J. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1538.
21. Gratton, M. and Gratton, T. L. (1991) *Plant Physiol.* **97**, 1643.
22. Coupe, M. and Christin, H. (1989) in *Physiology of Rubber Tree Latex* (D'Auzac, J., Jacob, J. L. and Christin, H., eds), p. 295. CRC Press, Florida.
23. Watanawandikul, R., Watanawandikul, H. and Sawannanont, P. (1989) *Phytochemistry* **29**, 1001.
24. Shannon, L. M., Key, E. and Lee, J. S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2166.
25. Linnadi, U. R. (1970) *Nature* **227**, 960.
26. Lacey, J. H., Roeschworth, N. J. Part, A. L. and Ransitt, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 269.

# ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. ชื่อ นางรพีพรรณ วิจิตรสุวรรณกุล

วัน เดือน ปีเกิด 7 มิถุนายน 2493

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

หน้าที่ปัจจุบัน อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และบัณฑิตวิทยาลัย โดยทำการสอน  
ระดับปริญญาตรี โทและ เอกของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทำวิจัยเกี่ยวกับ  
ชีวเคมีน้ำยางพาราโดยได้รับทุนสนับสนุนจากทั้งในและต่างประเทศ

## ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	สถานศึกษาและประเทศ
ปริญญาตรี*	2515	Univ. of Minnesota, USA
ปริญญาโท*	2518	Univ. of Minnesota, USA
ปริญญาเอก*	2520	Univ. of Minnesota, USA

(\* ด้วยทุนรัฐบาลไทย)

สาขาชำนาญการ ชีวเคมีของพืช โดยเฉพาะชีวเคมีน้ำยางพาราเกี่ยวกับเอนไซม์ในวิถี  
การสร้างโพลีเมอร์ยาง, การควบคุมการเริ่มต้นและหยุดสร้างของโพลีเมอร์ยาง, การชุด  
ต้นของพืชน้ำยาง, การคัดค้านโรคในยางพารา รวมทั้งโปรตีนที่เป็นต้นเหตุในการทำให้  
เกิดอาการแพ้ในน้ำยาง

รางวัลที่เคยได้รับ 2534 Taguchi Prize Award for outstanding young  
researcher in Biotechnology

2535 อาจารย์ตัวอย่างด้านการวิจัย  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2538 ได้รับการคัดเลือกเป็นผู้ที่มีผลงานวิจัยดีเด่น จากการ  
เสนอผลงานประจำปีที่ 1 ของเมธีวิจัย สกว. รุ่นที่ 1

2539 ได้รับการคัดเลือกเป็นผู้ที่มีผลงานวิจัยดีเด่น จากการ  
เสนอผลงานประจำปีที่ 2 ของเมธีวิจัย สกว. รุ่นที่ 1

### ประสบการณ์การทำงาน/การสอน

ตำแหน่งหน้าที่	จาก พ.ศ. ถึง พ.ศ.	ชื่อหน่วยงาน
อาจารย์	2520-2528	ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์	2528-2534	ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์
รองศาสตราจารย์	2534-ปัจจุบัน	ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์

### ผลงานทางวิชาการ

ประเภทวิจัย ที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติ

1. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D. and Sakulborirug, C.  
(1996) A fucilin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*)  
Phytochemistry 47(2), 163
2. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D., Santayayana, B. and Pasiikul, P.  
(1997) Petoxedose from *hevea brasiliensis* bark: purification and properties.  
Phytochemistry 44(2), 237.
3. Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T. Witsuwannakul, R. and  
Witsuwannakul, D. (1997) Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyl  
transferase activities in bottom fraction and C-serum from *Hevea* latex  
Phytochemistry 45(2), 261.
4. Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T. Witsuwannakul, R. and  
Witsuwannakul, D. (1997) Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea*  
latex. Phytochemistry 45(2), 267.
5. Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T. Witsuwannakul, R. and  
Chareonthipakorn, N. (1997) Structure of *in vitro* synthesized rubber from fresh  
bottom fraction of *Hevea* latex. Phytochemistry 45(2), 275.
6. Tanaka, Y., Eng, A.H., Orya, N., Nishiyama, N., Tangpakdee, J. Kawahara, S. and  
Witsuwannakul, R. (1996) Initiation of Rubber Biosynthesis in *Hevea brasiliensis*:  
characterization of initiating species by structural analysis. Phytochemistry 41(6), 1501
7. Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Witsuwannakul, R. and Chareonthipakorn, N. (1996)  
Possible mechanisms controlling molecular weight of rubbers in *Hevea brasiliensis*.  
Phytochemistry 42(2), 353.

8. Koyama, T., Witsuwannakul, D., Asawatretanakul, K., Witsuwannakul, R., Ohya N., Tanaka, Y., and Ogura, K. (1996) Isopentenyl diphosphate isomerase in rubber latex. *Phytochemistry* 43(4), 769.
9. Koyama, T., Asawatretanakul, K., Witsuwannakul, D., Witsuwannakul, R., and Ogura, K. (1995) Analysis of prenyltransferase reaction products from C-serum of *Hevea brasiliensis*. *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Sivast, J. et al. eds), pp. 608-612.
10. Asawatretanakul, K., Koyama, T., Witsuwannakul, D., Witsuwannakul, R., and Ogura, K. (1995) Characterization of *Hevea* isopentenyl diphosphate isomerase. *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Sivast, J. et al. eds), pp. 613-618.
11. Chungchow, N., Sultais, A. and Witsuwannakul, R. (1996)  $\beta$ -1,3-Glucanase isozymes from latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 39(3), 505.
12. Surachittanont, W. and Witsuwannakul, R. (1995) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase in *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 40(3), 767.
13. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D. and Suwanmanee, P. (1990) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 29(5), 1401.
14. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D. and Dantikong, S. (1993) *Hevea salmodulii*. Regulation of the activity of latex 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A Reductase. *Phytochemistry* 29(6), 1755.
15. Witsuwannakul, R. (1986) Diurnal variation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in latex of *Hevea brasiliensis* and its relationship to rubber content. *Experientia* 42, 44.

## 2 ชื่อ นายธีรยศ วิจิตรสุวรรณกุล

วัน เดือน ปีเกิด 10 กันยายน 2492

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

หน้าที่ปัจจุบัน อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และบัณฑิตวิทยาลัย โดยทำการสอนระดับปริญญาตรี โทและ เอกของมหาวิทยาลัยมหิดล และเป็นอาจารย์พิเศษของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำงานวิจัยส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับ ซิงเคมีน้ำ ขางพาราโดยได้รับทุนสนับสนุนจากทั้งในและต่างประเทศ

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	สถานศึกษาและประเทศ
ปริญญาตรี *	2516	Univ. of Wisconsin, USA
ปริญญาโท **	2519	Purdue University, USA
ปริญญาเอก **	2521	Purdue University, USA

(ด้วยทุน \*รัฐบาลไทย, \*\*David Ross fellow)

ประสบการณ์การทำงาน/การสอน

ตำแหน่งหน้าที่	จาก พ.ศ. ถึง พ.ศ.	ชื่อหน่วยงาน
อาจารย์	2521-2525	ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์	2525-2535	ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์
รองศาสตราจารย์	2535-ปัจจุบัน	ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์

สาขาชำนาญการ ซิงเคมีของพืช โดยเฉพาะชีวเคมีน้ำขางพาราเกี่ยวกับแอนไซม์ในวิถีการสร้างโกลีเมอไรซาย, การควบคุมการเริ่มต้นและหยุดสร้างของโกลีเมอไรซาย, การหยุดต้นของท่อน้ำยาง, การต่อต้านโรคในขางพารา รวมทั้งโปรตีนที่เป็นต้นเหตุในการทำให้เกิดอาการแพ้ในน้ำยาง

ผลงานทางวิชาการ

ประเภทวิจัย ที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติ

E. Witsuwannakul, R. Witsuwannakul, D. and Sakulborirug, C.

(1998) A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*)

Phytochemistry 47(2), 183.

2. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D., Sattaysevana, B. and Pasitkul, P. (1997) Peroxidase from *Hevea brasiliensis* bark: purification and properties. *Phytochemistry* 44(2), 237.
3. Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T., Witsuwannakul, R. and Witsuwannakul, D. (1997) Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyl transferase activities in bottom fraction and C-serum from *Hevea* latex. *Phytochemistry* 45(2), 261.
4. Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T., Witsuwannakul, R. and Witsuwannakul, D. (1997) Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea* latex. *Phytochemistry* 45(2), 267.
5. Koyama, T., Witsuwannakul, D., Asawatratanakul, K., Witsuwannakul, R., Oiya, N., Tanaka, Y., and Ogura, K. (1996) Isopentenyl diphosphate isomerase in rubber latex. *Phytochemistry* 43(4), 769.
6. Koyama, T., Asawatratanakul, K., Witsuwannakul, D., Witsuwannakul, R. and Ogura, K. (1998) Analysis of prenyltransferase reaction products from C-serum of *Hevea brasiliensis*. *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Svash, J. et al. eds), pp. 608-612.
7. Asawatratanakul, K., Koyama, T., Witsuwannakul, D., Witsuwannakul, R. and Ogura, K. (1996) Characterization of *Hevea* isopentenyl diphosphate isomerase. *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Svash, J. et al. eds), pp. 613-618.
8. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D. and Suwanmanee, P. (1990) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 29(5), 1401.
9. Witsuwannakul, R., Witsuwannakul, D. and Umrakong, S. (1993) *Hevea* calmodulin: Regulation of the activity of latex 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Phytochemistry* 29(6), 1755.
10. Chulavattanaol, M., Panyim, S. and Witsuwannakul, D. (1982) Comparison of phosphorylated proteins in intact rat spermatozoa from caput and cauda epididymis. *Biol. Reprod.* 26, 197.

11. Wititsuwannakul, D. and Kim, K.-H. (1979) Immunological studies of liver glycogen synthase. J. Biol. Chem. 254, 3662.
12. Wititsuwannakul, D. and Kim, K.-H. (1978) Mechanism of glycogenolytic action of cyclohexamide in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 1007.
13. Wititsuwannakul, D. and Kim, K.-H. (1977) Mechanism of Palmitoyl-coenzyme A inhibition of liver glycogen synthase. J. Biol. Chem. 252, 7812.
14. Wititsuwannakul, D. and Kim, K.-H. (1977) Effect of cyclohexamide on cyclic AMP level in rat epididymal fat tissue. Biochem. Biophys. Res. Comm. 75, 86.
15. Wititsuwannakul, D. and Kim, K.-H. (1977) Mechanism of glycogen synthase inhibition by palmitoyl-coenzyme A. Fed. Proc. (USA) 36, 775.

### 3. ชื่อ นางสาวปิยะภรณ์ ภาณุตกุล

วัน เดือน ปีเกิด 27 มีนาคม 2511

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ปี.ศ. ที่จบ	สถานศึกษาและประเทศ
ปริญญาตรี	2533	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา
ปริญญาโท*	2537	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ปริญญาเอก*	2537-ปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(\* ด้วยทุนเรียนตติศึกษาจากกระทรวง)

### ผลงานทางวิชาการ

ประเภทวิจัย ที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติ

1. Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Samyasevina, B. and Pasitkul, P.  
(1997) Peroxidase from *Nevea brasiliensis* bark: purification and properties

4. ชื่อ นายนพเก้า เจริญทิพากร  
วัน เดือน ปีเกิด 19 เมษายน 2511  
ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	สถานศึกษาและประเทศ
ปริญญาตรี	2533	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ปริญญาโท	2537	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ปริญญาเอก*	2537-ปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(\* ด้วยทุนบัณฑิตศึกษาจากสวทช.)

#### ผลงานทางวิชาการ

ประเภทวิจัย ที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติ

1. Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T., Wiltsuwannakul, H. and Chareonthipakorn, N. (1997) Structure of *in vitro* synthesized rubber from fresh pomon fraction of *Hevea* latex. *Phytochemistry* 45(2), 275.
2. Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Wiltsuwannakul, H. and Chareonthipakorn, N. (1998) Possible mechanisms controlling molecular weight of rubbers in *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 42(2), 353.

5. ชื่อ นางสาวกมลชนก ธิงพี  
วัน เดือน ปีเกิด 3 กรกฎาคม 2515  
ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	สถานศึกษาและประเทศ
ปริญญาตรี	2537	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ปริญญาโท	2537-ปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล

