

3A.4) การศึกษาสาร phenols ใน C-serum

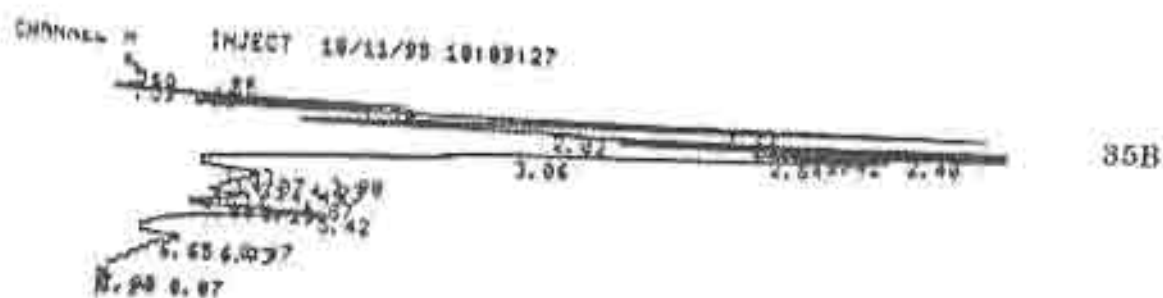
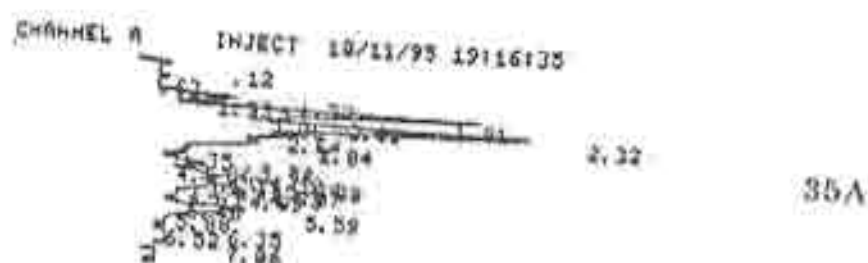
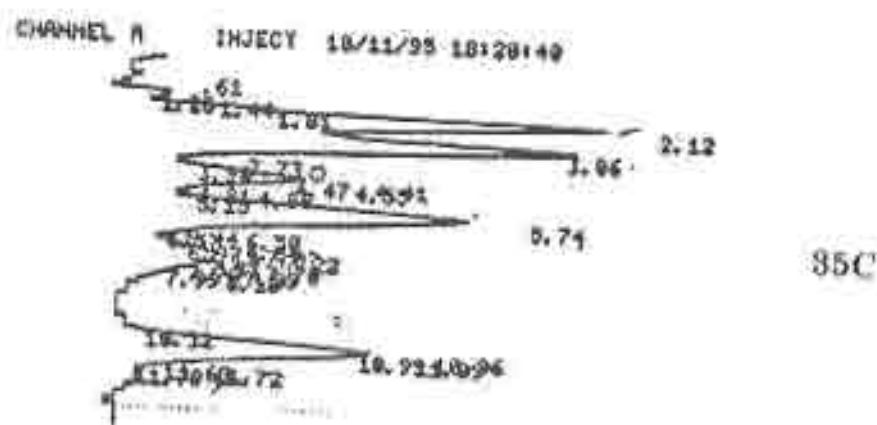
จากการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram ของ C-serum phenol ที่เตรียมได้จากน้ำยางที่สกัดได้ในเดือนตุลาคม และ ธันวาคม (รูปที่ 35A, B) กับ สารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย phenols 4 ชนิดคือ *p*-cumaric acid, hydroxy benzoic acid, gallic acid และ caffeic acid (รูปที่ 35C) ปรากฏว่าไม่สามารถบอกได้ว่า C-serum phenol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

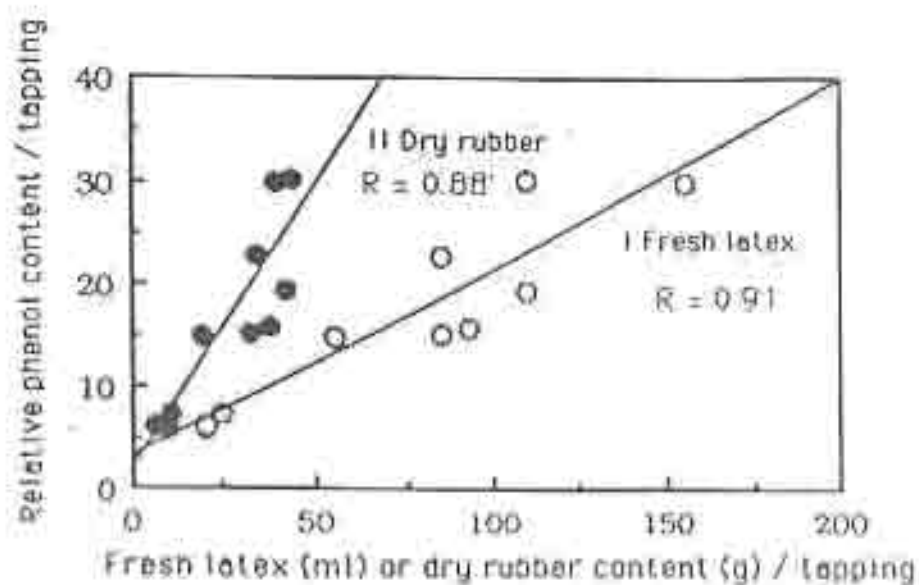
ค่าประสิทธิสัมสัมพันธ์สัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร C-serum phenol กับปริมาณน้ำยาง หรือ น้ำหนักยางแห้งที่ได้ต่อครั้งสกัด อยู่ในระดับสูง 0.9 และ 0.88 ตามลำดับ (Fig. 37)

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)

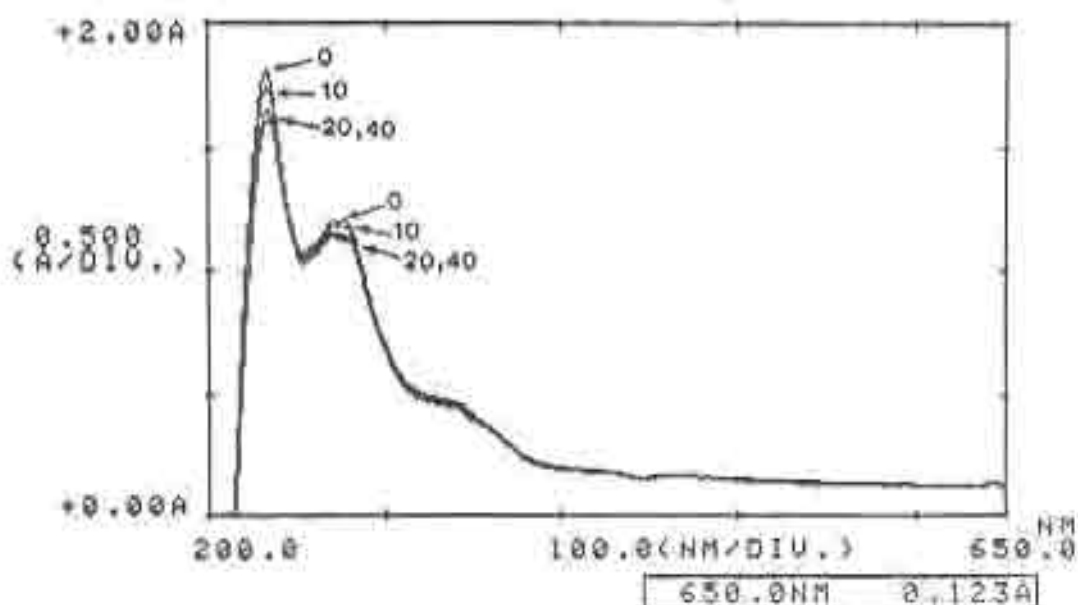
ผลการทดสอบ C-serum phenol กับความเป็น *in vivo* substrate ของ POD จากเปลือกยาง จะเห็นได้จาก absorption profile ที่ scan จากช่วงคลื่น 200-600 nm (รูปที่ 23) ปรากฏว่าค่า A_{280} มีค่าลดลงหลังจากปฏิกิริยาเริ่มขึ้น โดย ทำให้ อัตราส่วน A_{260}/A_{280} มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีเกิดการ oxidation ของ 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 ที่ความ
18 ขมิต (รูปที่ 35C)



รูปที่ 37 ทำเส้นประดัดที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ C-serum phenol ของน้ำยาง กับปริมาณน้ำยางหรือยางแห้งที่ได้ต่อครั้งกรีด



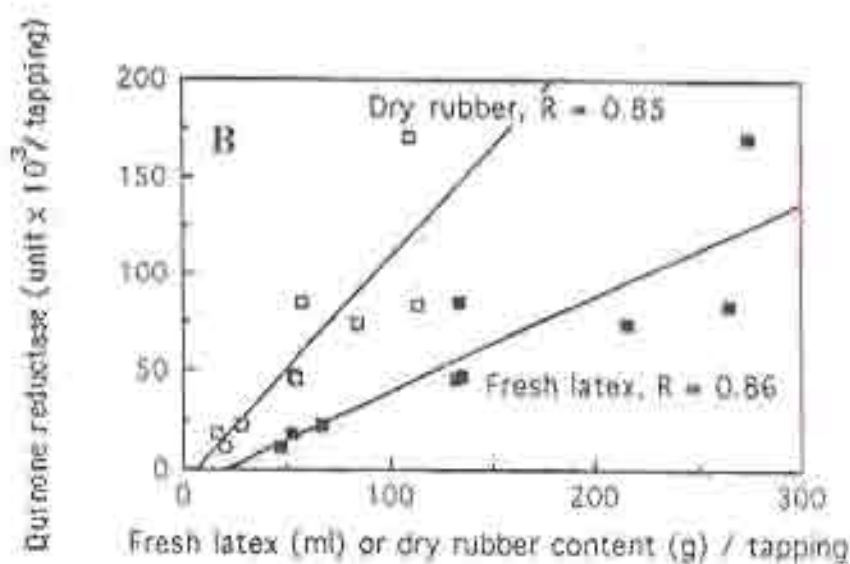
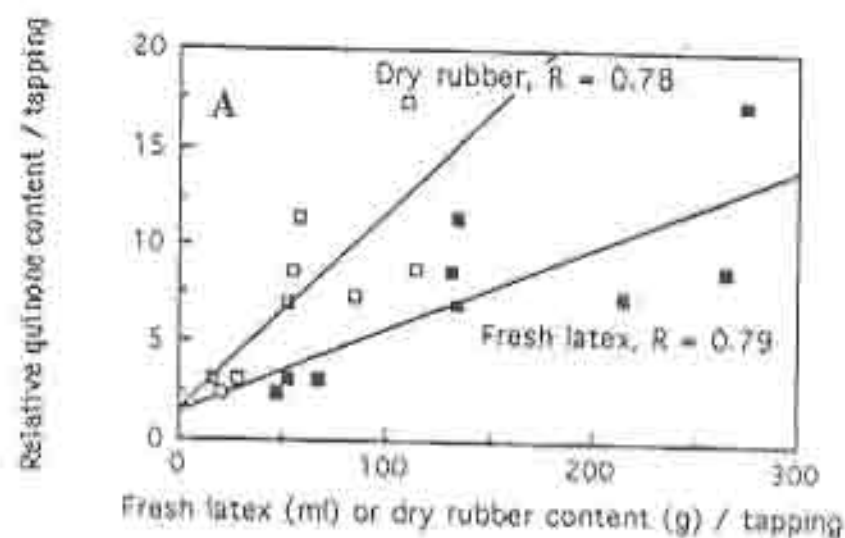
รูปที่ 38 UV-Visible spectroscopic scans หลังจากปฏิบัติกริยาเริ่มขึ้น 0, 10, 20 และ 40 นาทีตามลำดับ ที่ได้จากการใช้ C-serum phenol เป็น *in vivo* substrate ของ PPO ที่ทำบวฤทธิ์ได้จากน้ำยาง

8A.5) การศึกษาสาร quinone จาก bottom fraction

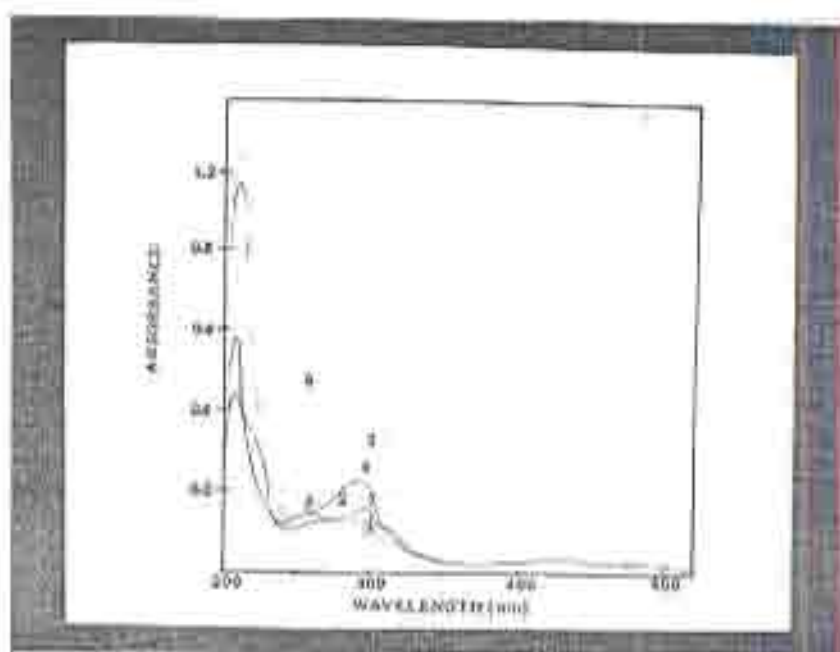
รูปที่ 39 จะเห็นว่า ปริมาณ quinone หรือ QR กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักยางแห้ง ที่ได้ต่อครั้งมีความสัมพันธ์กัน โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างปริมาณ quinone กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักยางแห้งที่ได้ต่อครั้งมีค่าเท่ากับ 0.79 หรือ 0.78 ตามลำดับ (รูปที่ 39A) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณ 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 λ_{max} ที่ประมาณช่วงคลื่น 215 และ 300 nm (spectrum # 3 รูปที่ 40)

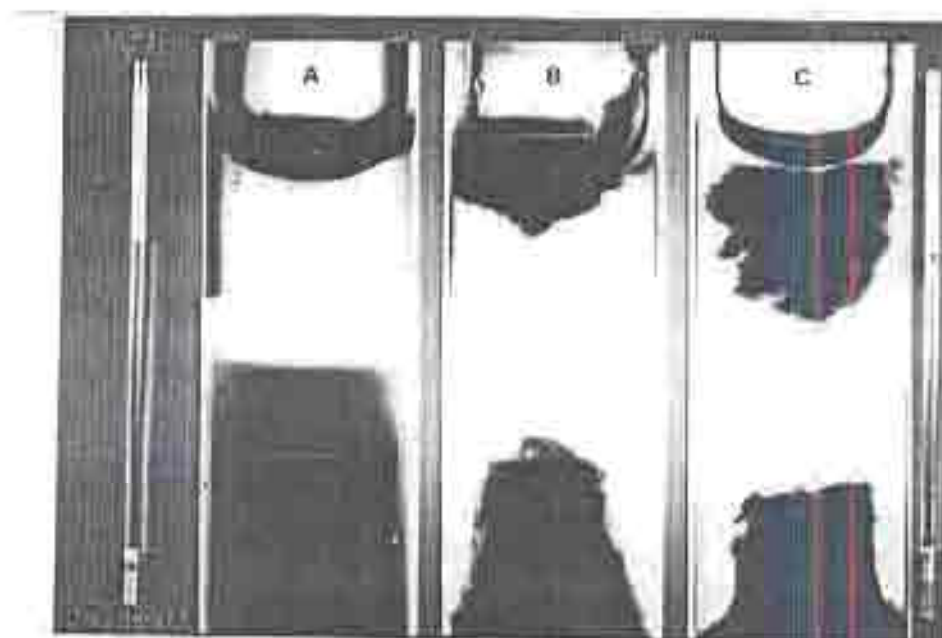
จากผลการทดลองอิทธิพลของ quinone ต่อการแยกของดูทอยด์กับสารจับกลุ่มของอนุภาคยาง ในรูปที่ 41 จะเห็นว่าใน reaction mixture A ซึ่งประกอบด้วยสารละลายอนุภาคดูทอยด์และอนุภาคยาง หลังการทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาแล้วนำไปเป็นแยกด้วย bentonite microcentrifuge จะเห็นปริมาณอนุภาคดูทอยด์ในชั้นล่างสุด (bottom) เหลืออยู่มากที่สุด ส่วนชั้นอนุภาคยางในชั้นบนสุด (top) จะเหลือน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับ reaction mixture B และ C ซึ่งมี quinone และ NADH ผสมอยู่ด้วย โดยชั้นอนุภาคดูทอยด์ใน reaction mixture C ซึ่งมีปริมาณ quinone ผสมอยู่มากกว่า จะเหลืออยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ reaction mixture B ซึ่งมีปริมาณ quinone ผสมอยู่น้อยกว่า ในขณะที่ ชั้นอนุภาคยางใน reaction mixture C จะมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับ reaction mixture B ทั้งนี้จะเป็นเพราะชั้นกับปริมาณ quinone ซึ่งเป็นสปีสตรของ QR ของอนุภาคดูทอยด์ที่ต่าง ส่งผลให้ระดับการกักกันของอนุภาคต่างกัน ปริมาณดูทอยด์ที่ตกเนื่องจากคั่งแน่นบนเบรดดูทอยด์ด้วย 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)
บริสุทธิ์จากอนุภาคไขมัน



รูปที่ 4) การทดสอบอิทธิพลของ quinone ต่อการแตกของอนุภาคลูทอยด์ และการเกาะกลุ่มของอนุภาคชน โดยลูทอยด์ที่แตกจะเปิดโอกาสให้อิเล็กโตรนบนเมมเบรนของลูทอยด์เปลี่ยนไปให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคชน หลังจากเป็นเหตุด้วยสารจากอนุภาควีเอที จะแยกชั้นลอยขึ้น ไปอยู่ชั้นบน ส่วนลูทอยด์ที่เหลือและไม่แตกจะลุดตะกอนอยู่ชั้นล่าง โดยดูจากแถบของลูทอยด์ที่กว้างขนาด 300 เท่า

A = อนุภาคลูทอยด์ + NADH + อนุภาคชน

B = อนุภาคลูทอยด์ + quinone (5 μ l) + NADH + อนุภาคชน

C = อนุภาคลูทอยด์ + quinone (10 μ l) + NADH + อนุภาคชน

3B.) Non-enzymatic process

3B.1) Lutoidin

ผลการเตรียมและทำบริสุทธิ์ลูทอยดินจากอนุภาคลูทอยด์ (ตารางที่ 6) ซึ่งแยกได้จากส่วนของ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยการนำไปตกตะกอนด้วย acetone แล้ว นำตะกอนที่ได้ไปล้างแล้วสกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 0.2% Triton X-100 นำสารสกัดที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยการแยกผ่านคอลัมน์โบโลน และ DEAE-Sephacel (รูปที่ 42) พบว่าลูทอยดินมีค่า M_r ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 17 kD (รูปที่ 43) และสามารถย้อมติดด้วย Fuchsin ที่ใช้ในการย้อมไกลโคโปรตีน และ น้ำหนักโมเลกุลรวมจากผลการแยก โดยอาศัยขนาดประมาณ 276 kD (รูปที่ 44) ลูทอยดินสามารถทำให้อนุภาคแขวนเกาะกันเป็นกลุ่มได้จากการทดสอบปรากฏว่าลูทอยดินสามารถเกาะจับกับโปรตีนบนอนุภาคยางโดยการเหนี่ยวนำให้อนุภาคแขวนเกาะกันเป็นกลุ่มได้ และสามารถย้อมอนุภาคยางที่เกาะกลุ่มได้ด้วยวิธีย้อม glycoprotein โดยที่ Fuchsin ย้อมติดได้ดีกว่า Alcian blue 8GX (รูปที่ 45) โดยที่ปริมาณอนุภาคยางที่เกาะกลุ่มจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการดำเนินปฏิกิริยา (รูปที่ 46) โดยที่โปรตีนอื่นๆ (BSA, fetuin และ C-serum protein) นอกเหนือจากลูทอยดิน ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้ (รูปที่ 47) นอกจากนี้ตัวลูทอยดินเองยังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก กระด้าง หรือ หยุบ เกาะกลุ่มได้ด้วย จึงมีคุณสมบัติเป็นแอลคิน ซึ่งความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งโดยไกลโคโปรตีนหลายชนิด คือ fetuin, asialofetuin, ovomucoid, mucin, และ hen egg yolk (ตารางที่ 7) ส่วน α_1 -acid glycoprotein หรือ น้ำตาลเตี้ยวหรืออยู่หลายตัวจะไม่สามารถทำการยับยั้งดังกล่าวได้ (ตารางที่ 8) ในทำนองเช่นกัน การเกาะจับของอนุภาคยางที่ถูกเหนี่ยวนำโดยลูทอยดิน จะสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย fetuin แต่ไม่ถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลเตี้ยว GlcNAc ลูทอยดินสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึงถึง 60°C (รูปที่ 48) และทนต่อความเป็นกรด่างได้ดี ตั้งแต่ช่วง pH 3-10 (รูปที่ 49) โดยลูทอยดินมีค่า 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

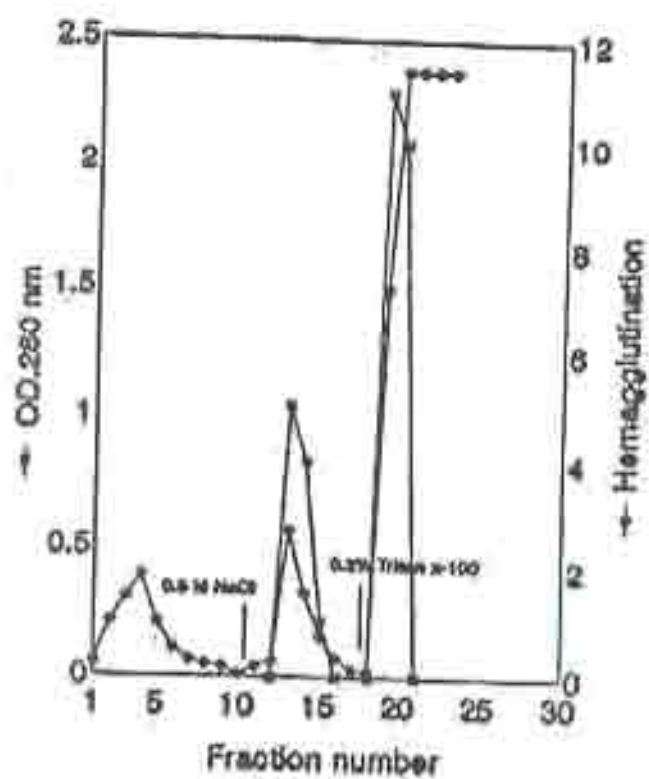
ผลของตัวยับยั้งไกลโคโปรตีนต่อความสามารถในการเกาะน้ำให้
เมื่อเล็กลดลงกระด้าเกาะกลุ่มของบูทอลิน

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

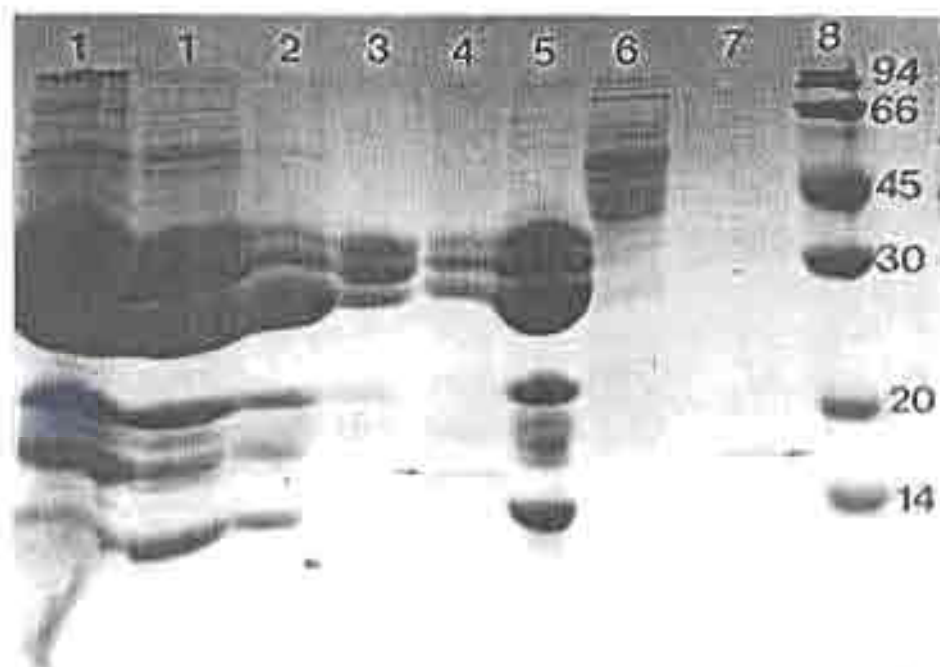
ตารางที่ 8

การโน้ตเตรพชนิดต่างๆที่ไม่สามารถจับกับบูทอลินน้ำให้
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
α_1 -acid glycoprotein	5 mg/ml



รูปที่ 42 Chromatographic profile ของจุลหอยคันบนคอลัมน์ DEAE-Sepharose



รูปที่ 43 SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์

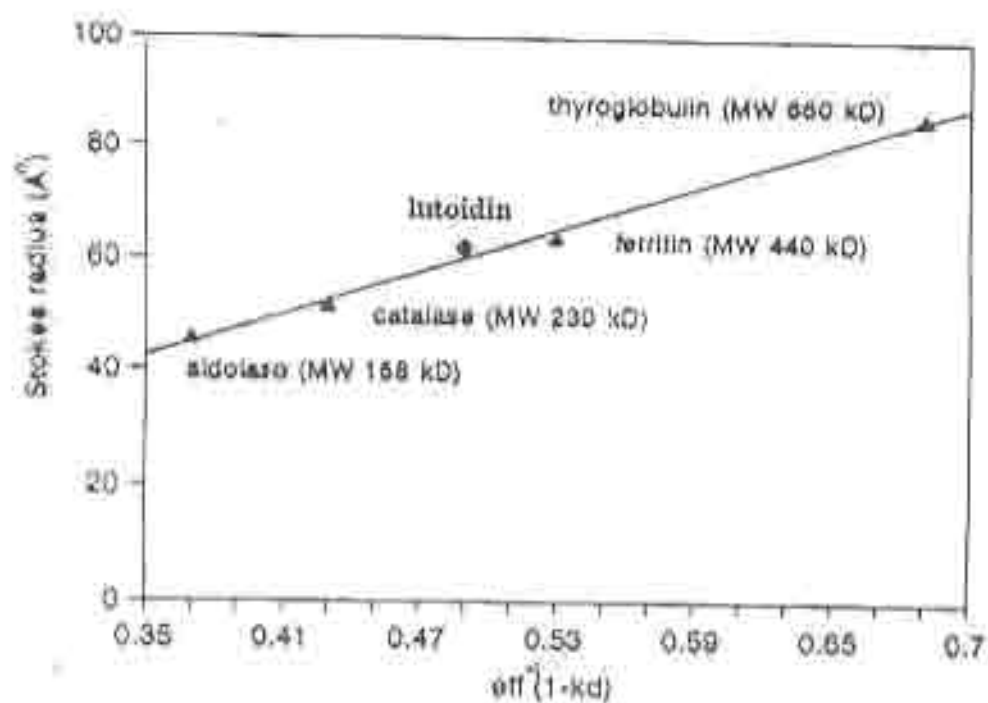
1 = total extract ; 2 = unbound fraction from chitin batch-binding;

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

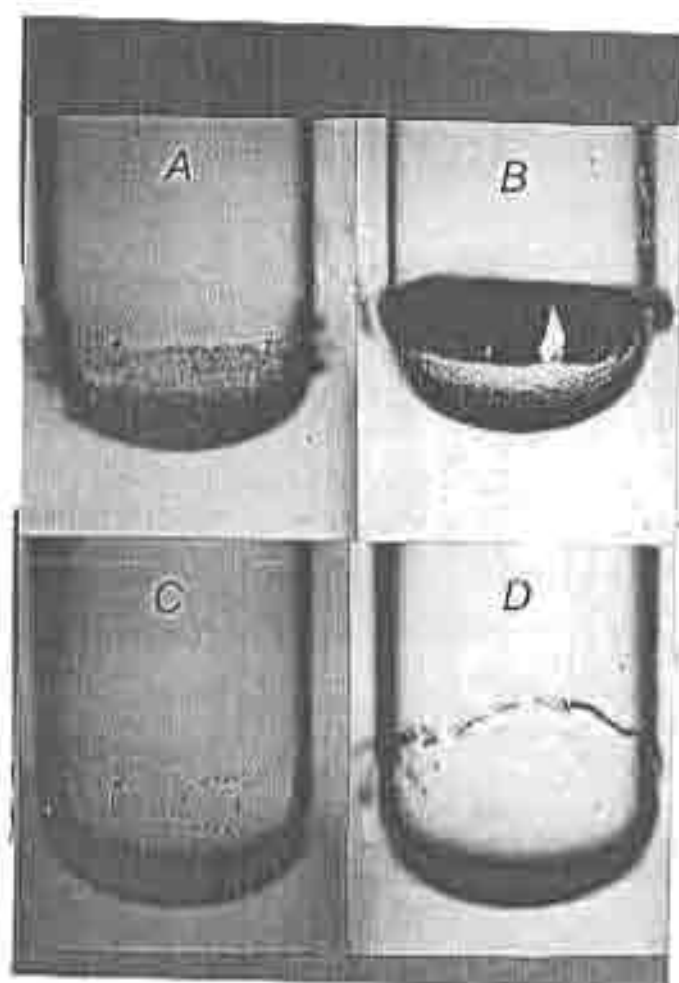
5 = unbound fraction from DEAE-Sepharose column;

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

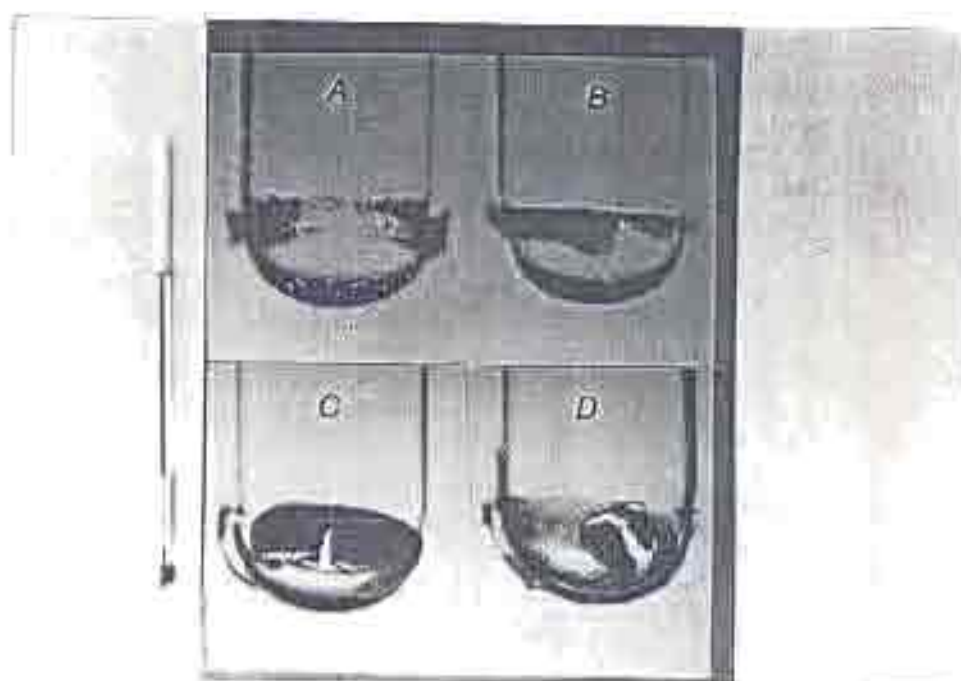
8 = standard protein markers,



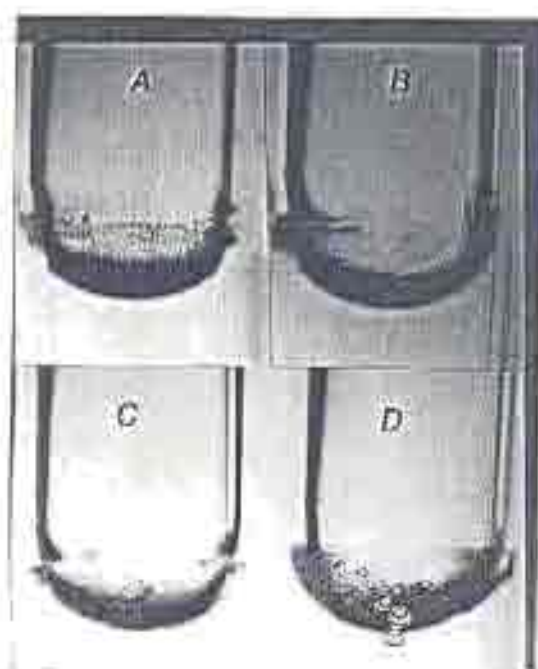
รูปที่ 44 ความสัมพันธ์ระหว่าง Stokes's radius กับ inverse error function ของ $(1 - \text{partition coefficient})$ ของโปรตีนมาตรฐานกับ จุดยอดคั่นที่ผ่านวิธีขึ้นแล้ว โดยการแยกผ่าน
คอลัมน์ Sepharose 6B



รูปที่ 45 การทดสอบการเกาะน้ำลายบนรากฟันของอนุภาคยางโดยจุลยคตินโดยใช้ระยะเวลา
ทำ ปฏิบัติ 30 นาที แล้วย้อมอนุภาคยางด้วย Fuchsin (A&B) หรือ Alcian blue 8GX
(C&D) โดยดูจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 300 เท่า
A,C = อนุภาคยาง + บัฟเฟอร์; C,D = อนุภาคยาง + จุลยคติน (1.8 μ g)



รูปที่ 46 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคขาวโดยซูบทยลีน (1.8 μg) โดยใช้ระยะเวลาทำปฏิกิริยา 0, 10, 20 และ 40 นาทีดังในรูป A,B,C และ D ตามลำดับ โดยดูจากก้นของหลอดรวรสน้ำถึงขยาย 300 เท่า



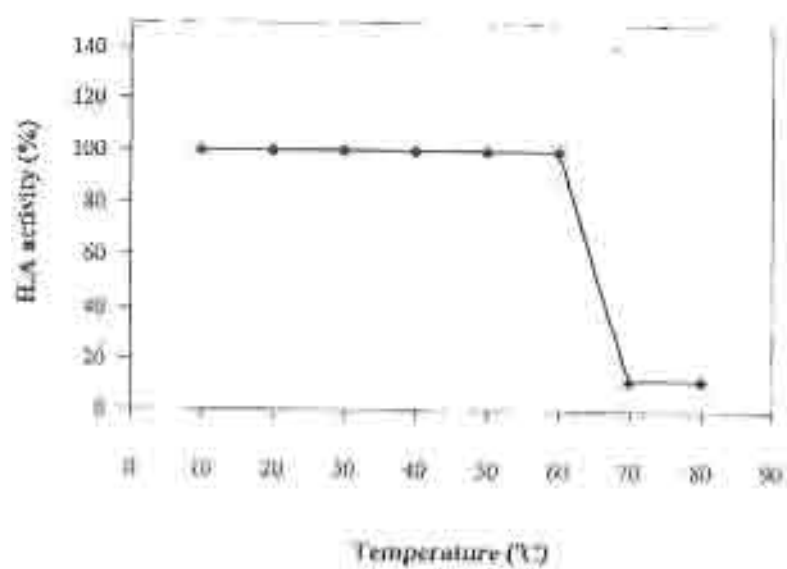
รูปที่ 47 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคขาวโดยโปรตีนอื่นๆที่ไม่ใช่ซูบทยลีน โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยา 30 นาที โดยดูจากก้นของหลอดรวรสน้ำถึงขยาย 300 เท่า

A= อนุภาคขาว + บีฟเพอร์

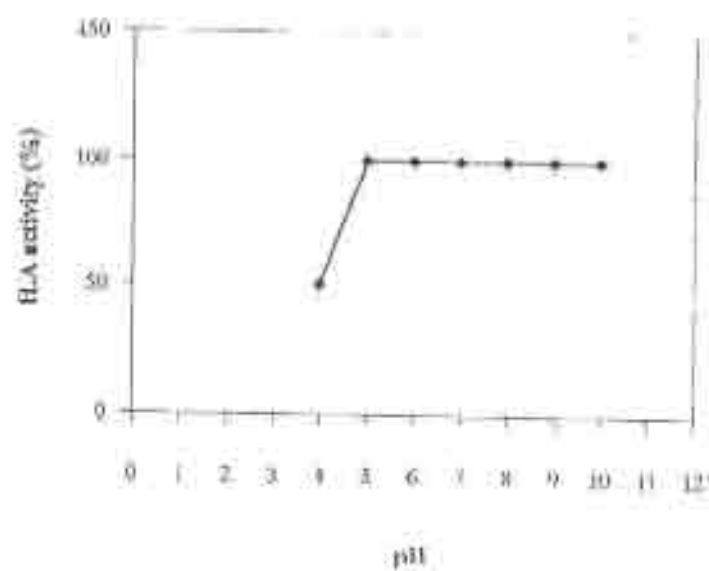
B= อนุภาคขาว + BSA (10 μg)

C= อนุภาคขาว + ferulic (2.5 μg)

D= อนุภาคขาว + C-serum protein (8 μg)



รูปที่ 48 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์



รูปที่ 49 ความเสถียรต่อ pH ของเอนไซม์

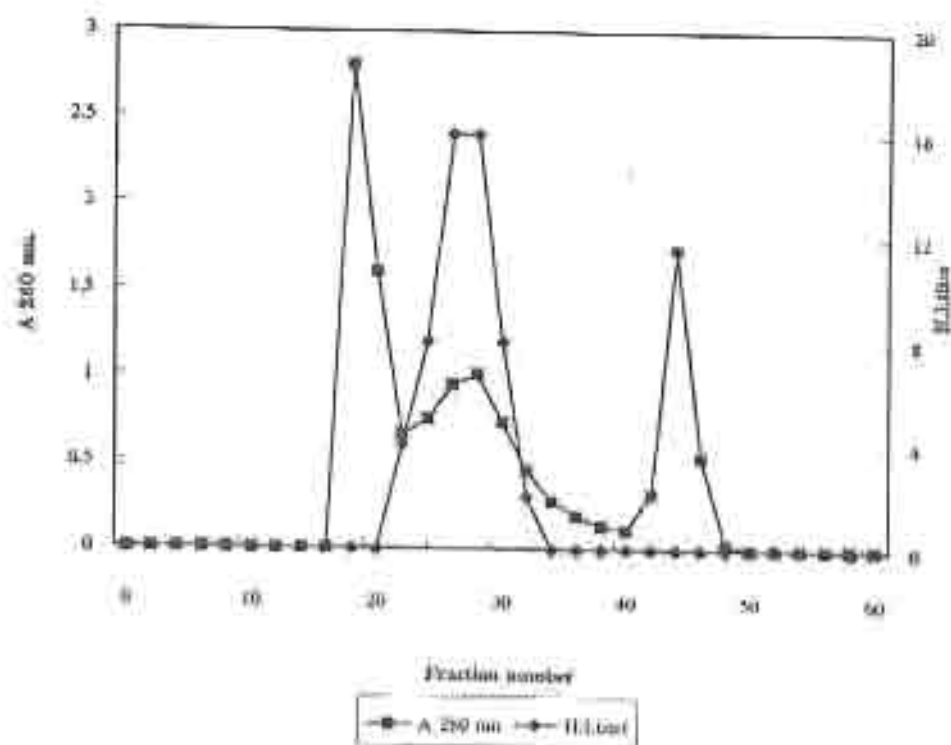
SB.2) RP-LBP

จากการเตรียมและทำบริสุทธิ์ RP-LBP (ตารางที่ 9) โดยใช้ส่วนของหางที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยแยกเอาเฉพาะบริเวณ zone 2 ซึ่งเป็นชั้นยางด้านที่สัมผัสกับชั้นของ C-serum ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับไข่ขาวใส ไปทำบริสุทธิ์โดยการผ่านกระดาษด้วย isotonic buffer หลังจากนั้นทำการสกัด ด้วย 0.2% Triton X-100 นำสารที่สกัดได้ไปตกตะกอนด้วย acetone แล้วนำตะกอนที่ละลายได้ ไปอุ่นในน้ำเดือด 2 นาที แล้วเป็นแยกเอาส่วนใสไปทำบริสุทธิ์ต่อ โดยการแยกผ่านคอลัมน์ 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 ที่เหนียวนำไปกักจับโดยจากคอลัมน์ โดยสามารถยับยั้งได้ประสิทธิภาพสูงสุดหรือใช้ความเข้มข้นโปรตีนได้ต่ำสุด เมื่อเทียบกับโกลโคโปรตีนจากแหล่งอื่นๆที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ chitinase สามารถยับยั้งการทำงานของ RP-LBP (รูปที่ 58)

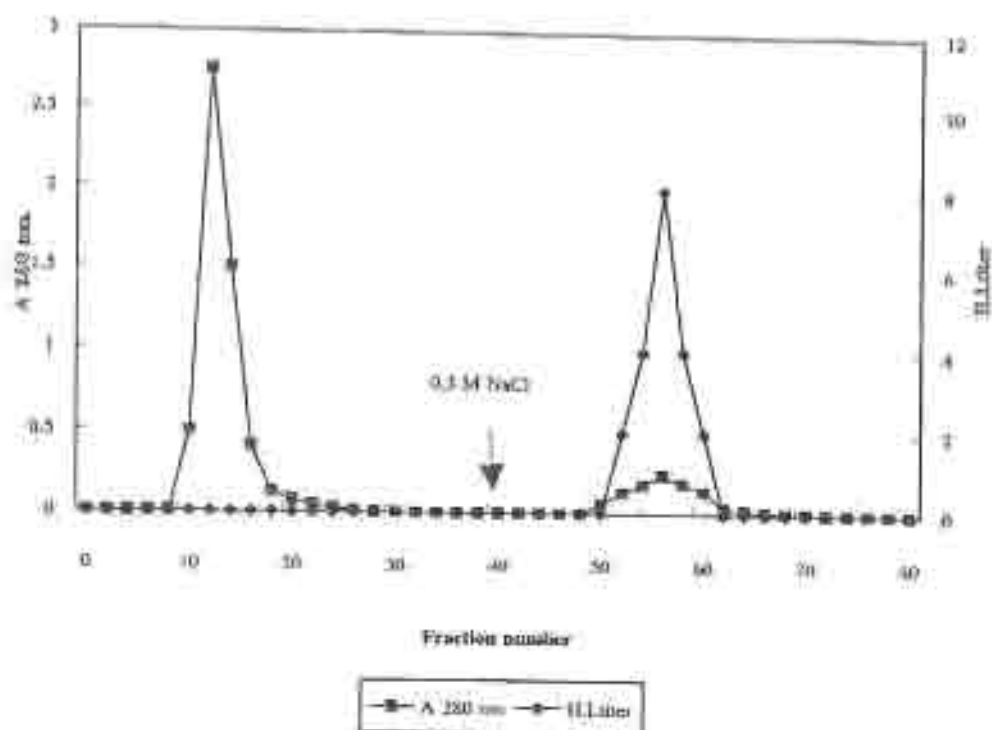
ตารางที่ 9

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
Sepharose 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

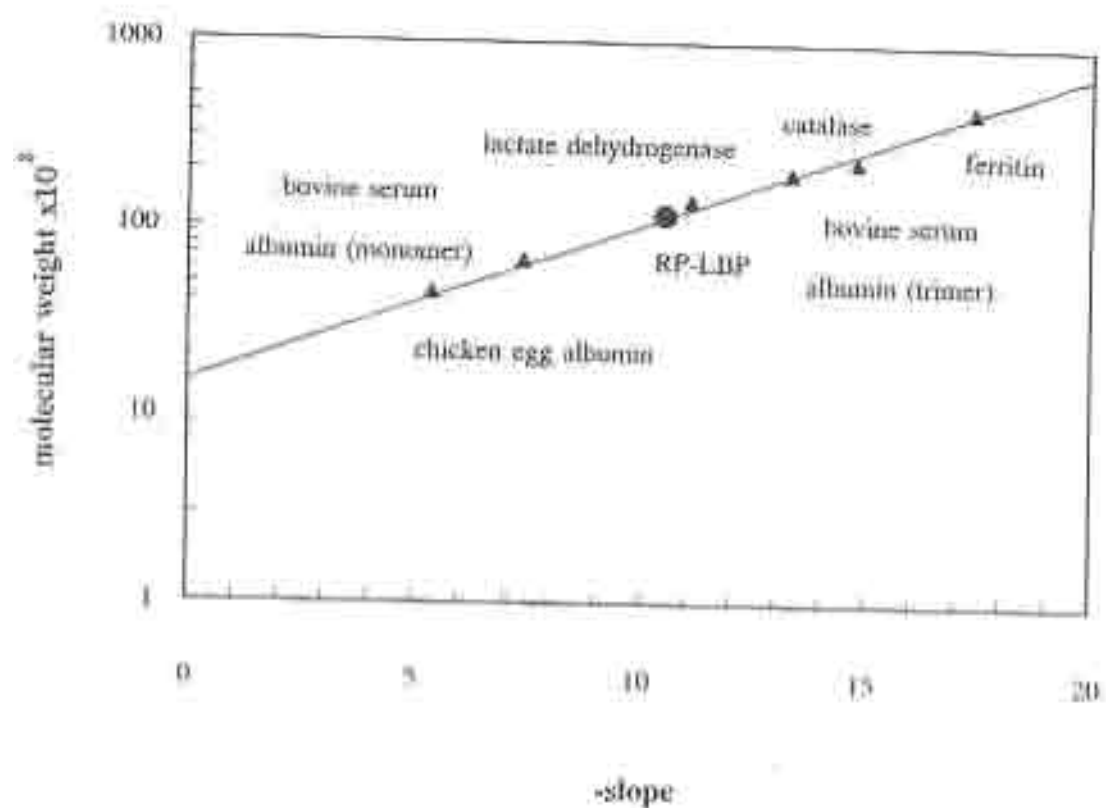
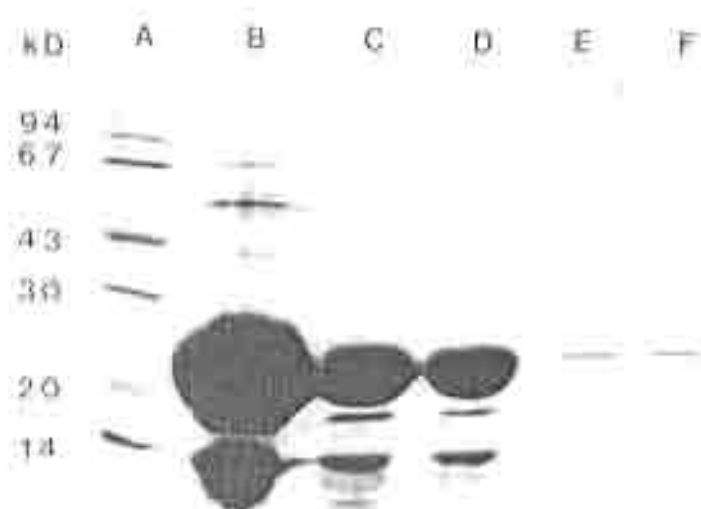


Figure 1. Relationship between native M_r and RP-LBP units. PAGE



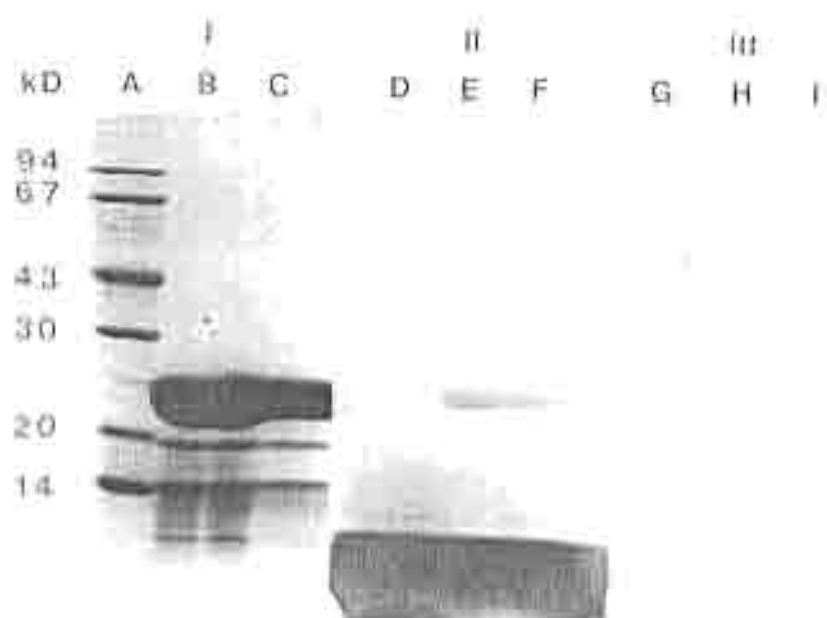
รูปที่ 53 SDS-PAGE ของ RP/LBP ที่ได้จากเมล็ดทุเรียน

A = Standard marker

B = Crude extract

C,D = Fraction obtained after boiled treatment

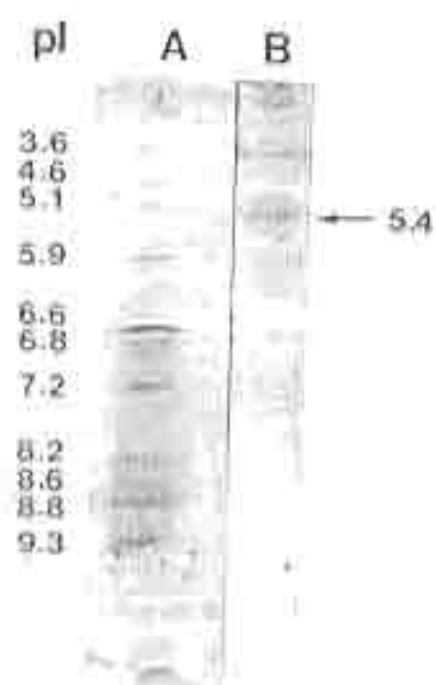
E,F = DEAE-Sepharose peak fraction



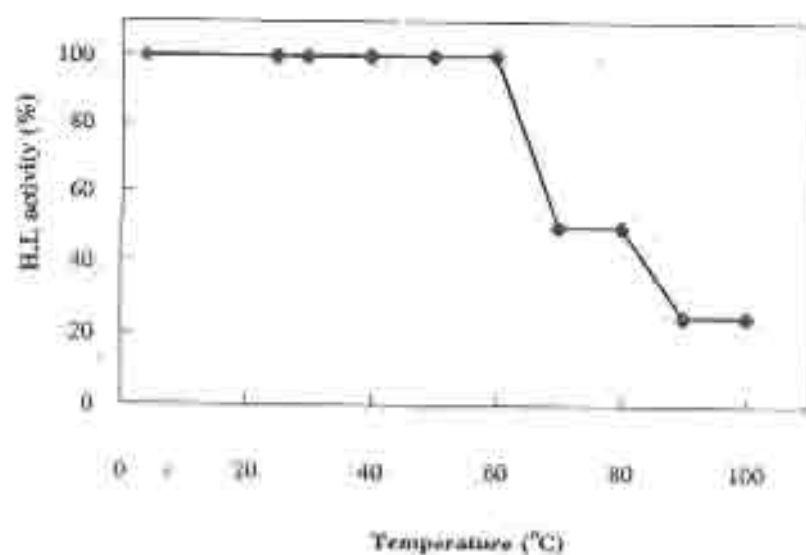
รูปที่ 34 SDS-PAGE ของ RP-LBP ที่ได้จากสารห่านวิสุทธิ โดยย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R ที่ใช้ในสารย้อมโปรตีน (I) และ Fastin (II) หรือ Alcian blue (III) ที่ใช้สำหรับย้อมไกลโคโปรตีน

A, D, G = Standard marker

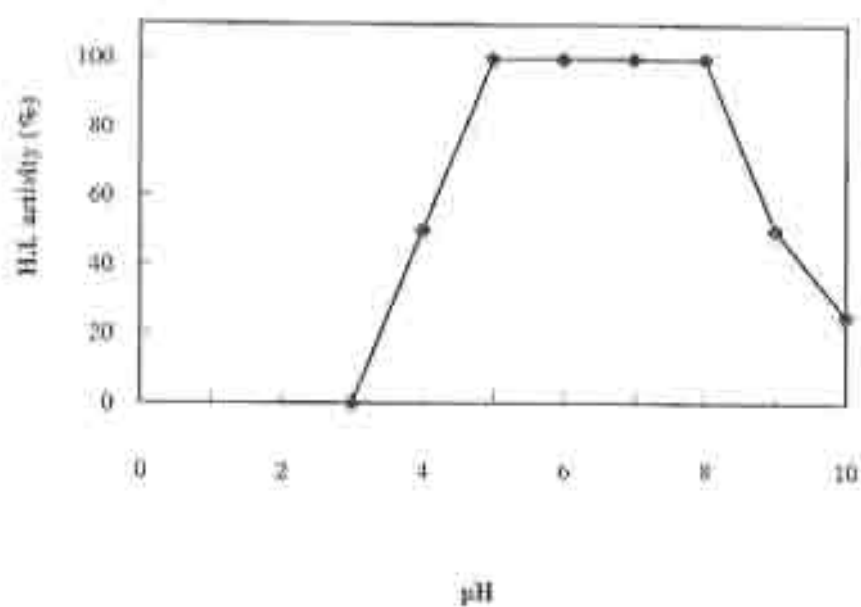
B,C ; E,F ; H, I = Fraction obtained after boiled treatment



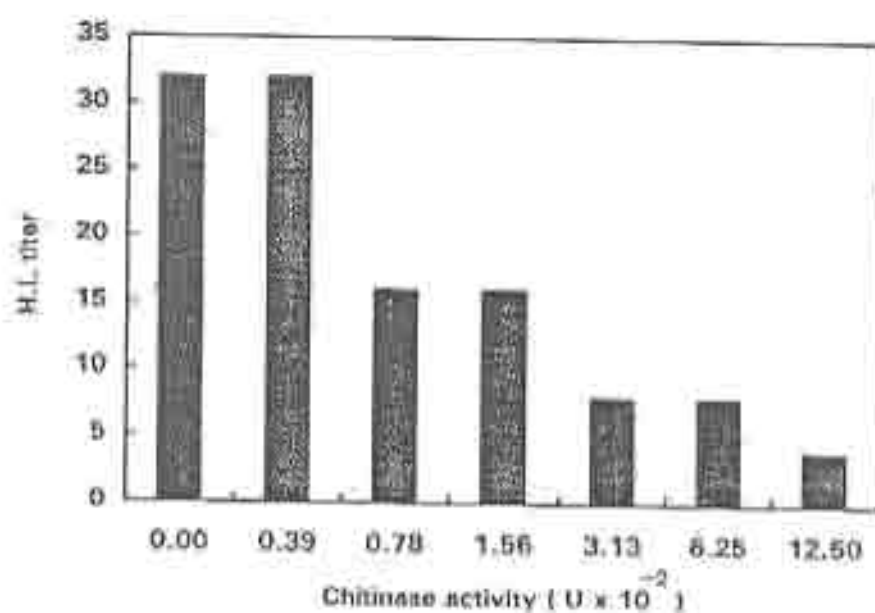
ပုံ ၅၅ ကာကွယ် isoelectric focusing gel electrophoresis ၁၀၄ RP-LBP



รูปที่ 56 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ RP-LBP



รูปที่ 57 ความเสถียรต่อ pH ของ RP-LBP



รูปที่ 58 ผลของความเข้มข้นของ chitinase ในตัวบ่งชี้ความรุนแรงของ RP-LBP ที่มีต่อการยับยั้งการเพิ่มของปริมาณแบคทีเรียในเนื้อเยื่อของกระดาด โดยดูโดยคตินจากอนุภาคจุลินทรีย์

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) และน้ำหนักโมเลกุลรวมจากการแยกผ่านคอลัมน์ไดอะอิลขนาดประมาณ 204 kD (รูปที่ 62) มีค่า pI เท่ากับ 4.7 โดยสามารถทนความเป็นกรดต่ำได้ถึงตั้งแต่ช่วง pH 5-10 (รูปที่ 63) และ ทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 50°C (รูปที่ 64) โดย C-LBP สามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่าย (รูปที่ 65) และ หนูขาว (รูปที่ 66) โดยหากนำ C-LBP ไปย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต (glycosidases) ชนิดต่างๆ (ตารางที่ 11) พบว่าหากย่อยด้วย chitinase ดูฤทธิ์ของความสามารถในการยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่ายโดย C-LBP จะถูกทำลายลง (รูปที่ 67) นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณ C-LBP ในน้ำจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของที่ได้ต่อกรัมถั่ว โดยมีส่วนประสิทธิผลสัมพันธ์เท่ากับ 0.97 (รูปที่ 68)

ตารางที่ 10

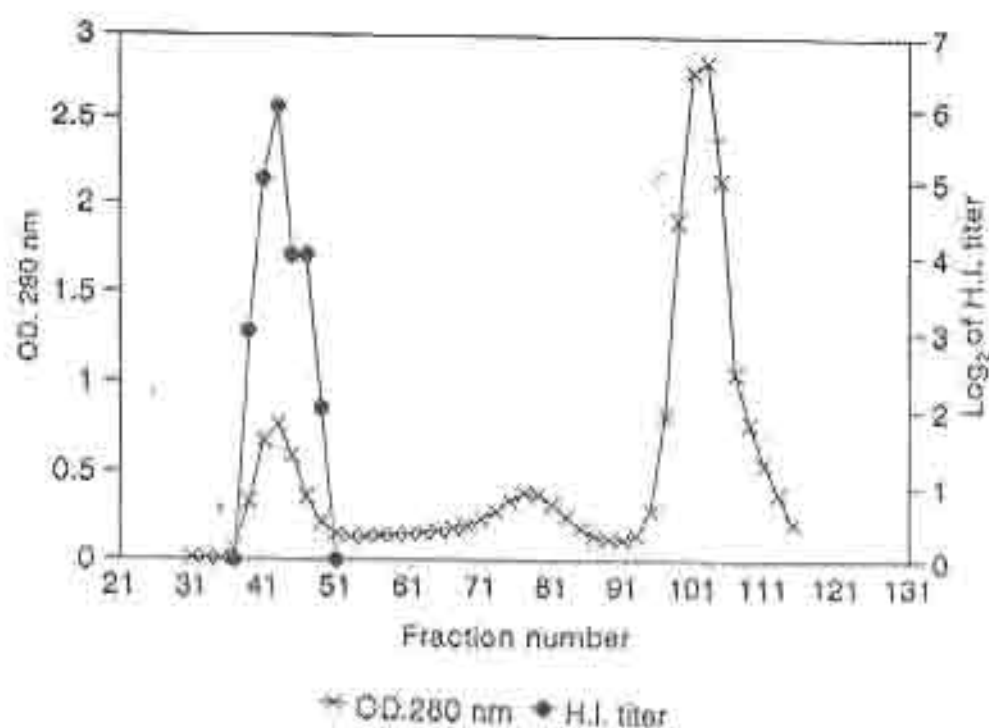
ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ C-LBP

Step	Total protein (mg)	H.I. (titer)	Specific activity (titer/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
AmSO ₄ 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

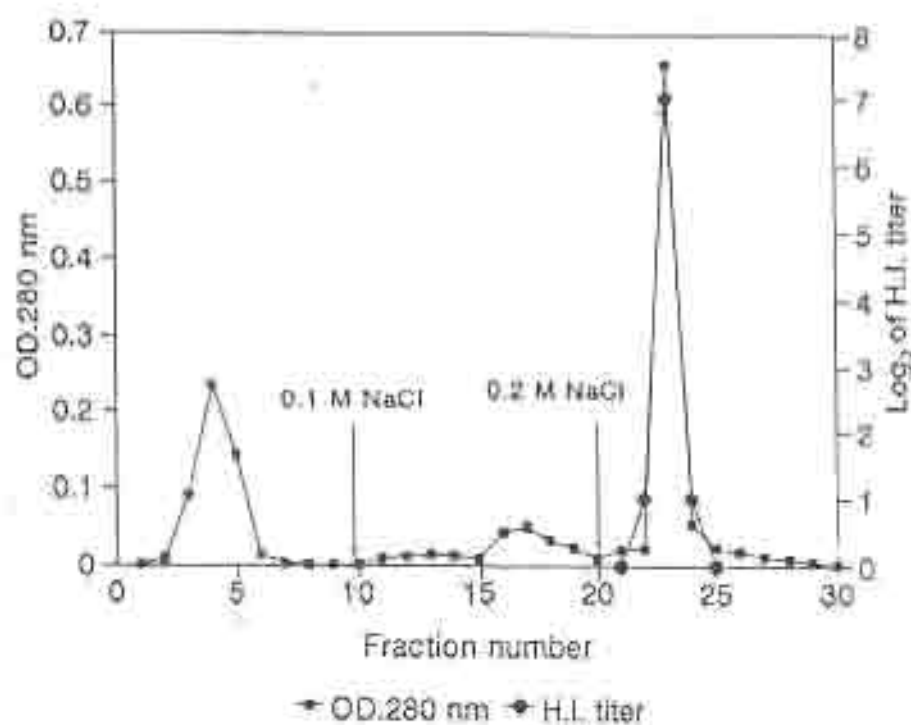
ตารางที่ 11

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

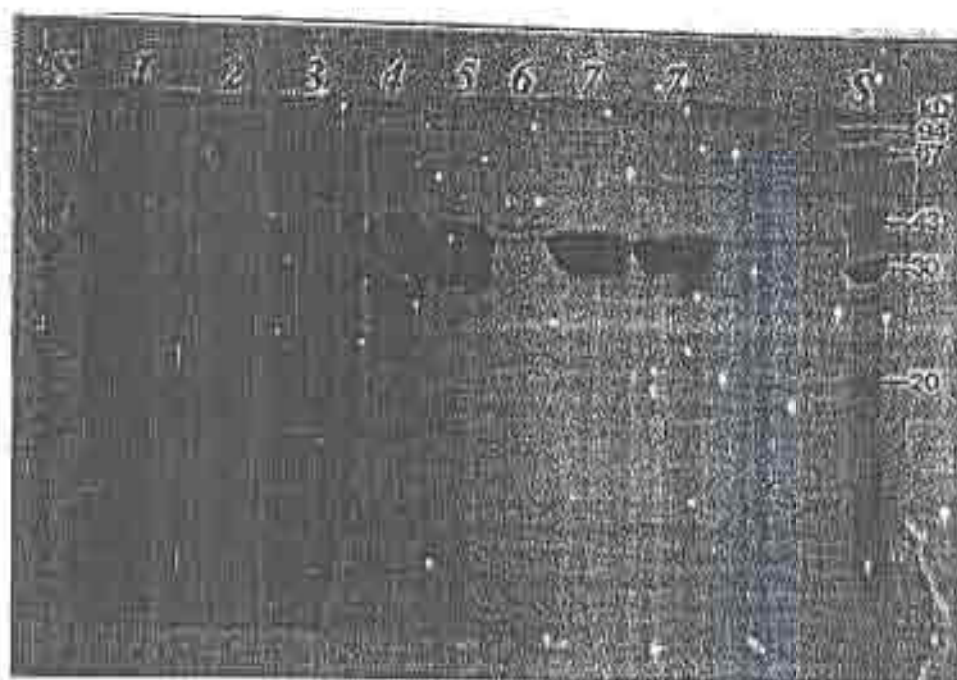
Glycosidases	Recovery H.I. activity (%)
Glucosidase (3 U)	100
Galactosidase (50 U)	100
Neuraminidase (0.25 U)	100
Chitinase (0.125 U)	25



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



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



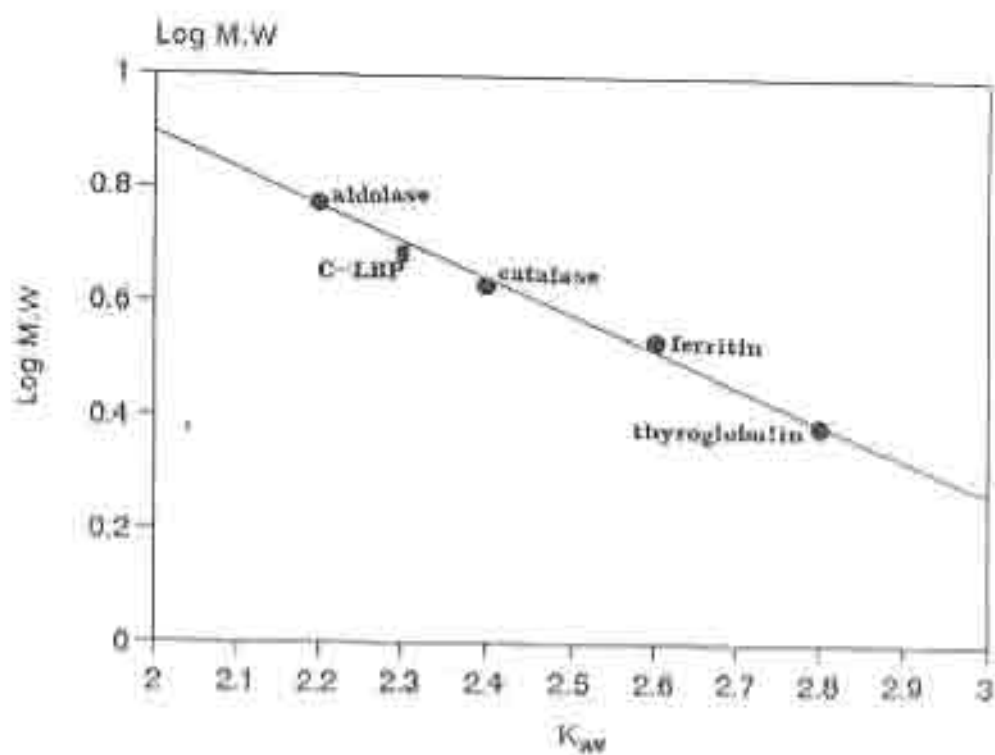
รูปที่ 61 SDS-PAGE ของ C-LBP ที่ได้จากการทำไวรัสไลเคนทำ gel 12.5% แล้วย้อมด้วย Coomassie blue R 250

S = Standard marker;

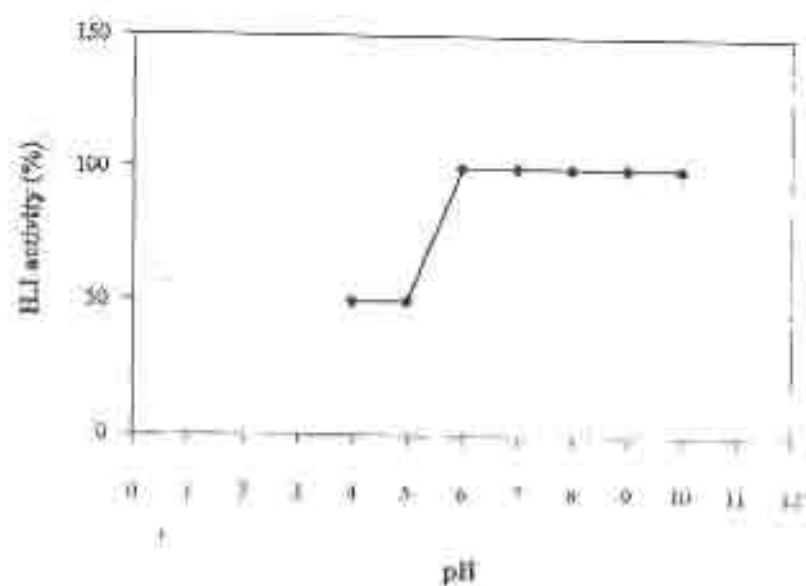
1, 2 & 3 = 40-55%, 55-70%, 70-85% AmSO_4 pellet fraction, respectively

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

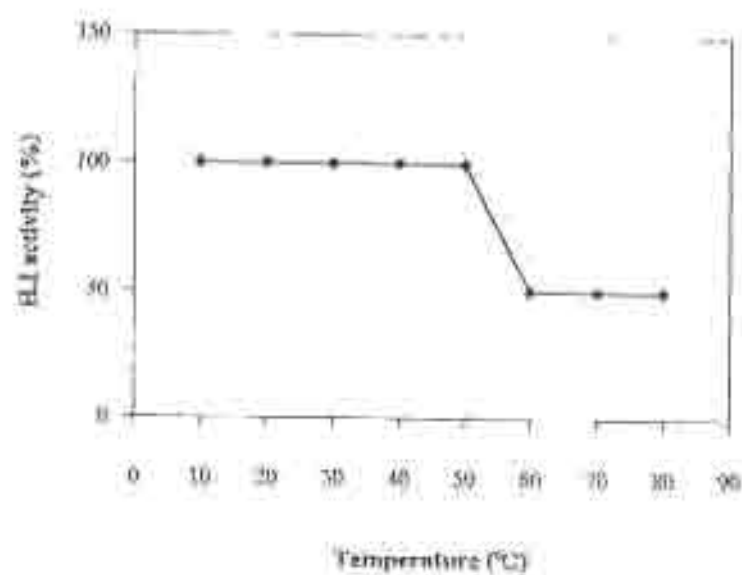
6 & 7 = Unbound fraction & Eluted fraction @ 0.2 M NaCl from DEAE-Sephacel, respectively



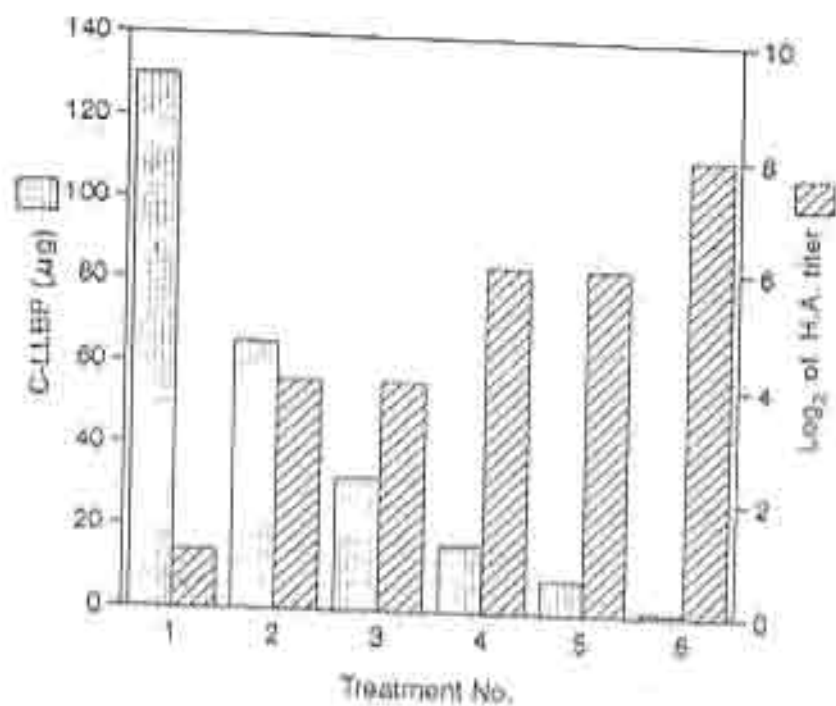
รูปที่ 62 ความสัมพันธ์ระหว่าง log molecular weight กับ partition coefficient (K_{av}) ของโปรตีนมาตรฐานกับ C-LBP ที่ทำบริสุทธิ์แล้ว โดยถาดคอลัมน์ชนิดนี้ Sepharose 6B



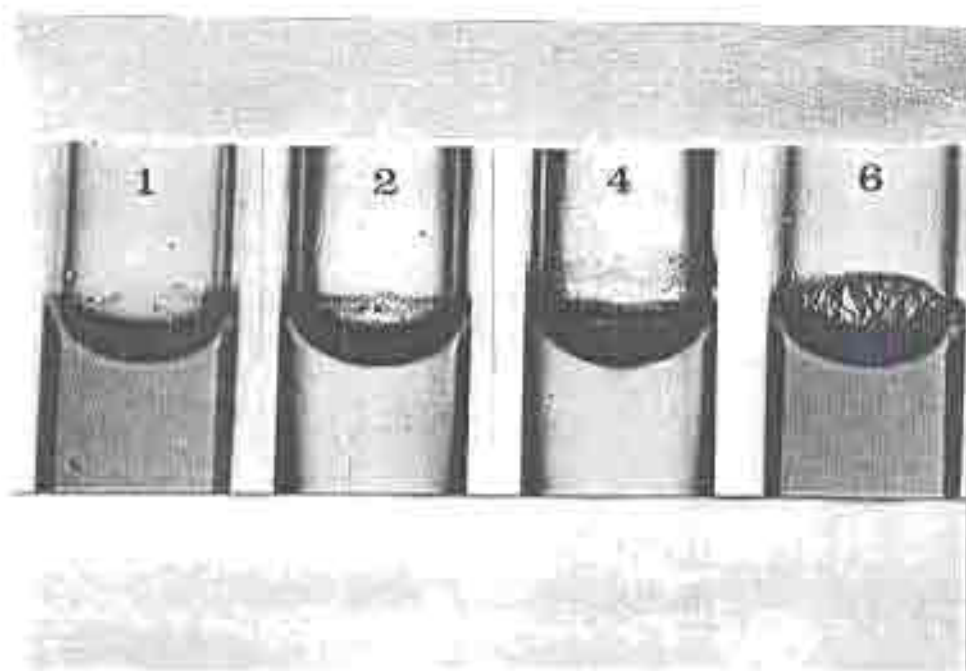
รูปที่ 63 ความเสถียรต่อ pH ของ C-LBP



รูปที่ 64 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ C-LBP



รูปที่ 65 ความสามารถของ C-LBP ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเกาะกลุ่มของ
เม็ดเลือดแดงของกระต่าย โดยดูรอยจันจากอนุภาคดูรอย



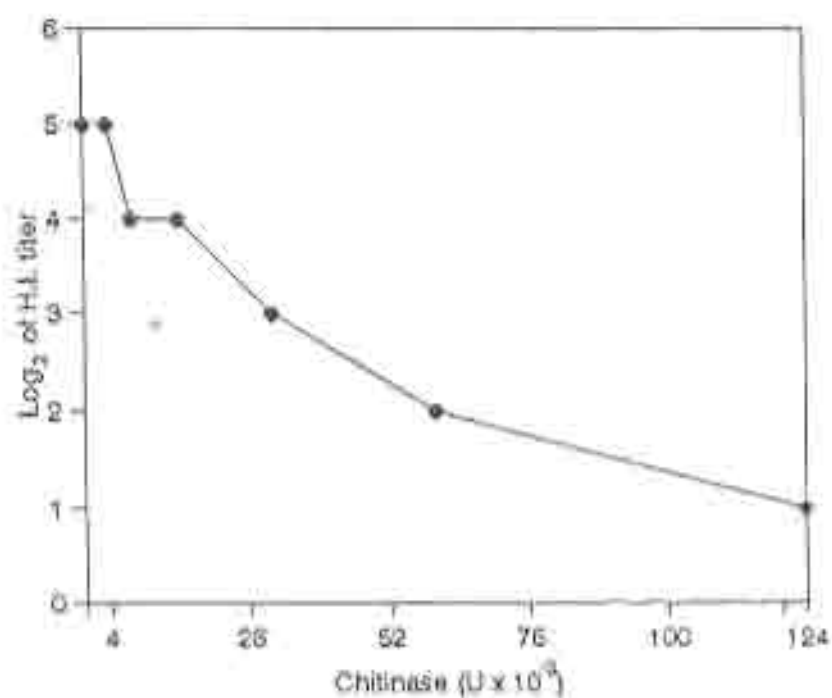
รูปที่ 66 ความสามารถของ C-LBP ต่อการจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของ
หนูขาวโดยดูการจับกัน

1 = C-LBP, 130 μg + เซลล์เม็ดเลือดแดง, 5 μg

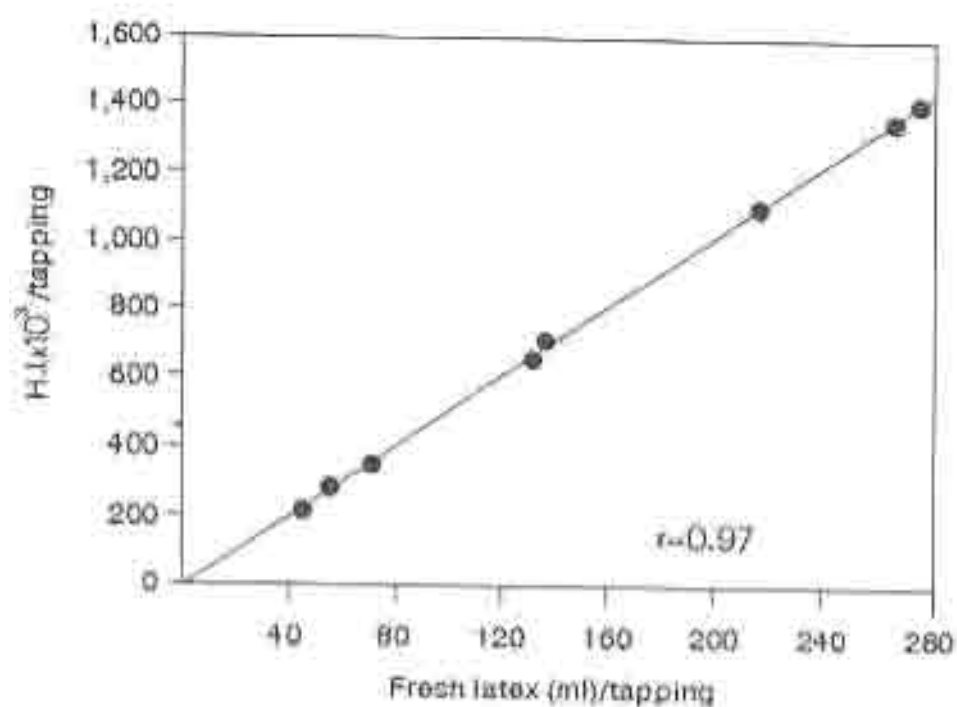
2 = C-LBP, 65 μg + เซลล์เม็ดเลือดแดง, 5 μg

4 = C-LBP, 16.25 μg + เซลล์เม็ดเลือดแดง 5 μg

6 = เซลล์เม็ดเลือดแดง, 5 μg



รูปที่ 67 ผลของความเข้มข้นของ chitinase ในการยับยั้งความรุนแรงของ C-1.BP ที่เกิดจากการยับยั้งการหนีตัวของไวรัสการเกาะก่อกำเนิดเชื้อแดงของกระด้างโดยดูหอยคันจากอนุภาคดูทอค์



รูปที่ ๘๘ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ C-LBP กับ C-oxalate ในน้ำยางกับปริมาณน้ำยางที่ได้ต่อครั้งกรีด

4. ข้อวิจารณ์

จากผลการทดลองศึกษาถึงกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับของท่อน้ำยาง ซึ่งแบ่งออกเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ (enzymatic process) และที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ (non-enzymatic process) นั้น การทดลองของกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ สามารถชี้ให้เห็นว่ามีไฮโดรเปอร์ออกไซด์คิวโนน ที่แยกได้จาก B-serum และ NAOH ลงไป ในสารละลายที่ประกอบด้วย intact luteal กับ อนุภาคยาง ปรากฏว่าเกิดการแตกของลูเทออล โดยจะเห็นจากของลูเทออลลอยขึ้นไปรวมกับอนุภาคยางเมื่อถูกปั่นแยก (รูปที่ 41) การที่ลูเทออลแตกนี้ น่าจะเกิดจากปฏิกิริยารีดิวซ์ไฮโดรเปอร์ออกไซด์คิวโนนจาก B-serum ที่รีดลงไป ไปเป็นไฮโดรคิวโนน อะโรมาติกคิวโนน โดย QR ที่ผสมกับลูเทออล โดย อนุมูลคิวโนนที่เกิดขึ้นสามารถใช้ O_2 ออกซิไดส์ตัวเองกลับไปเป็น คิวโนน โดยจะให้ O_2^- และ O_2^{2-} ที่จะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เกิด 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 ถ้าหากที่ส่งเสริมให้ยางไหลได้นานหรือหนืดหนืดทำให้เกิดการดูดซับข้าง หรือเป็น anti-coagulating factor ทั้งนี้มีผลการวิจัยสนับสนุนเพิ่มเติมข้อเสนออีกอย่าง คือการทำงานของ POD และ PPO โดยสามารถออกซิไดส์ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ C-serum phenol ให้เป็น polyphenol (รูปที่ 23,38) และในปฏิกิริยาการทำงานของ POD และ PPO จะใช้ H_2O_2 และ O_2 ร่วมด้วยตามลำดับ ทำให้เกิดโอกาสในการเพิ่มสารพิษออกซิเจนที่จะไปทำลายอนุมูลของลูเทออลลดลงไปด้วย

เมื่อลูเทออลแตกจะทำให้ลูเทออลที่ผสมกับของลูเทออลสามารถเหนียวน้ำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับอนุภาคยาง ทั้งนี้ได้รับการสนับสนุนโดยผลการทดลองที่พบว่าลูเทออลที่แตกและที่บริสุทธิ์ได้จากอนุมูลของลูเทออล (ตารางที่ 6, รูปที่ 43) นอกจากลักษณะที่เป็นผลดินในยาง

เหนียวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแล้ว (ตารางที่ 6) ยังสามารถเหนียวทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง (รูปที่ 45) ได้ด้วย จึงนำไปได้ว่าหลังจากการแตกของดูทอยด์แล้ว จะเกิดภาวะเหนียวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางกับดูทอยด์ดินที่ไคต์ตามบนผนังเมมเบรนของดูทอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับการสังเกตได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ Southern (1969) ที่พบว่าบริเวณดูตดินปลายท่อน้ำยางจะมีการก่อตัวของดินที่ประกอบด้วย อนุภาคยางกับเยื่อเมมเบรนของดูทอยด์ ซึ่งมีผลการทดลองที่ชี้ให้เห็นว่าก่อนดูตดินดังกล่าวไม่จำเป็นที่จะเกิดการเกิดขึ้นเสมอๆ ทั้งนี้เนื่องจากมีผลการทดลองสนับสนุนชี้ให้เห็นชัดเจนว่า RP-LBP ที่สกัดและทำบริสุทธิ์ได้จากอนุภาคยาง (ตารางที่ 9, รูปที่ 54) สามารถไปยับยั้งการทำงานของดูทอยด์ดินในการเหนียวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับของเม็ดเลือดแดง และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงเพราะสามารถยับยั้งได้ด้วยระดับความเข้มข้นที่ใช้ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับไกลโคโพรตีนที่สามารถทำการยับยั้งได้เช่นเดียวกับแหล่งอื่นๆ (ตารางที่ 6) จากผลวิจัยนี้อาจชี้แนะได้ว่า ดูทอยด์ดินน่าจะมี receptor site สำหรับให้ carbohydrate ligand ซึ่งอยู่บนไกลโคโพรตีนเกาะจับ RP-LBP ซึ่งยึดติดซึ่งใช้ยึดไกลโคโพรตีน (รูปที่ 54) อยู่ทีละหนึ่งของอนุภาคยางเกาะจับได้ ผลการวิจัยนี้ออกมาจะเป็นการค้นพบคุณสมบัติชนิดใหม่ของพืชแล้ว ยังเป็นการชี้ชัดถึงหน้าที่ใหม่ของดินอีกด้วย กล่าวคือ เมมเบรนเซลล์ของดูทอยด์ในน้ำยางทำหน้าที่เป็น coagulating factor ในการก่อให้เกิดการอุดตัน เพื่อมีขนาดแผ่นบริเวณปลายท่อน้ำยางที่ถูกอุดไว้

ในทางตรงข้าม ผลการทดลองในส่วนซีรัม (C-serum) ของน้ำยาง พบว่ายังมีไกลโคโพรตีนอีกชนิดหนึ่งคือ C-LBP ซึ่งหลังจากการทำบริสุทธิ์แล้ว (ตารางที่ 10, รูปที่ 61) พบว่ามีความสามารถยับยั้งการทำงานของดูทอยด์ดินในการเหนียวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง หรืออนุภาคยาง (รูปที่ 65, 66) C-LBP จึงน่าจะทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factor (protein) ที่ไปแย่งจับกับดูทอยด์ดินบนเมมเบรนดูทอยด์ 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 และน่าจะกล่าวได้ว่า กระบวนการ enzymatic ที่ส่งผลให้ดูทอยด์แตกแยกหรือย่อยสลายใด ก็ไม่น่าจะสำคัญไปกว่า บทบาทของ C-LBP ในน้ำยางซึ่งน่าจะเป็นตัวบ่งชี้และชี้ชัดว่า จะเกิดการเกาะกลุ่มรวมตัวกันระหว่าง จากเมมเบรนดูทอยด์กับอนุภาคยางเพื่อก่อให้เกิดก้อนดูตดินได้เร็วหรือไม่โดยเฉพาะในระยะแรกเริ่มของกระบวนการ C-LBP จึงน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ที่เกี่ยวกับการอุดตันน้ำ หรือไหลไล่นานของน้ำยางที่สำคัญที่สุด

5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยเรื่องนี้พอจะสรุปได้ว่า กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมของท่อน้ำยางในต้นยางพาราในขั้นแรกเกิดจากการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่สร้างสารฟีนอลออกซิเจนเพื่อไปทำลายเสถียรภาพของเมมเบรนของอนุภาคลูทอยด์ทำให้ลูทอยด์แตก ความรุนแรงหรือปริมาณการแตกของลูทอยด์เกี่ยวข้องกับบทบาทของเอนไซม์ออกซิเดสอื่นๆ ที่จะเสริมหรือลดปริมาณสารฟีนอลออกซิเจน ขึ้นมีต่อไปจะเกิดจากที่ลูทอยด์ ซึ่งโพลีฟีนอลจากเมมเบรนของลูทอยด์หลังการแตก ไปทำหน้าที่เหมือนแคลซิน ในการจับจำเพาะกับไกลโคโปรตีน RP-LBP บนผิวอนุภาคยาง ก่อให้เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขัดขวางการไหลของน้ำยางและเกิดการอุดตันของท่อน้ำยางในที่สุด กลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดการอุดตันทั้งหมดนี้รวมเป็น coagulating factors ในทางกลับกันจะมีกลุ่มสารที่ทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factors ซึ่งได้แก่เปอร็อกซิเดสและฟีนอลในซี-ซีวัน ที่ส่งผลต่อการลดการเกิดสารฟีนอลออกซิเจน และไกลโคโปรตีน C-LBP ในซี-ซีวันของน้ำยาง ซึ่งไปขัดขวางการเกาะกลุ่มระหว่างลูทอยด์กับอนุภาคยางปริมาณ anti-coagulating factors เหล่านี้ จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งกรีด ซึ่งสมควรจะพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพในการไหลของน้ำยางในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไป

งานวิจัยเรื่องนี้มีประโยชน์ที่จะใช้ C-LBP เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพการไหลของน้ำยาง (flow marker) สำหรับคัดเลือกยางพันธุ์ดี ซึ่งต้องมีคุณสมบัติในการไหลได้เก่ง นอกเหนือจากคุณสมบัติการสร้างยางได้เก่งแล้ว โดยน่าจะนำ flow marker นี้ไปจับคู่ไปด้วยกับตัวบ่งชี้ศักยภาพความต้านทานในการสร้างน้ำยาง (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, B.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

RAPERUN WITTISAWANAKUL, EUBRAYOT WITTISAWANAKUL,* BENJAMAZ SATTATTEWANA and PIYAPORN PASITREEL

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 μ M, respectively, and the K_i values for KCN and NaN₃ for these substrates were 10 μ 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

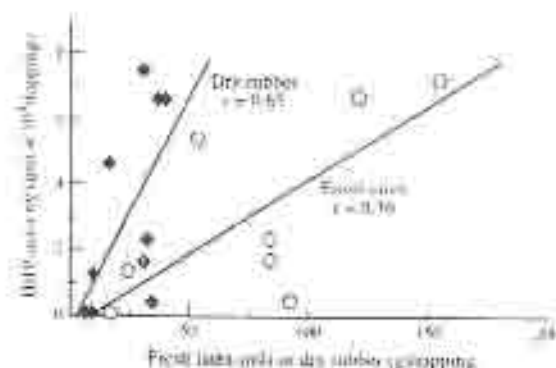


Fig. 1. Correlation between HBP level and rubber yield per tapping.



Fig. 3. Peroxidase activity staining gel (non-densitometric 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 HRP for α -diaminidine and H_2O_2 were 70 and 18.6 μ M, respectively. The K_m s of HRP in the presence of KCN and NaN₃ were determined to be 10 μ 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 λ 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-

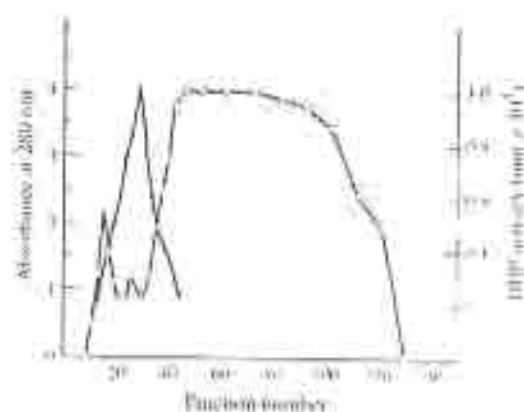


Fig. 4. SDS-PAGE of purified HRP and HRP. Lane 1 and 2 contained 100 and 50 μ g of HRP. Lane 3 contained 50 μ g of HRP type VI.

Fig. 4. SDS-PAGE of purified HRP and HRP. Lane 1 and 2 contained 100 and 50 μ g of HRP. Lane 3 contained 50 μ g of HRP type VI.

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

The purified HRP 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 HRP and *E. characias* latex peroxidases have similar A_{460} values in the presence of KCN and NaN₃.

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 HRP isoenzyme

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (μ A $\times 10^3$)	Specific activity (μ 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-Sepharose 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* wall 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-

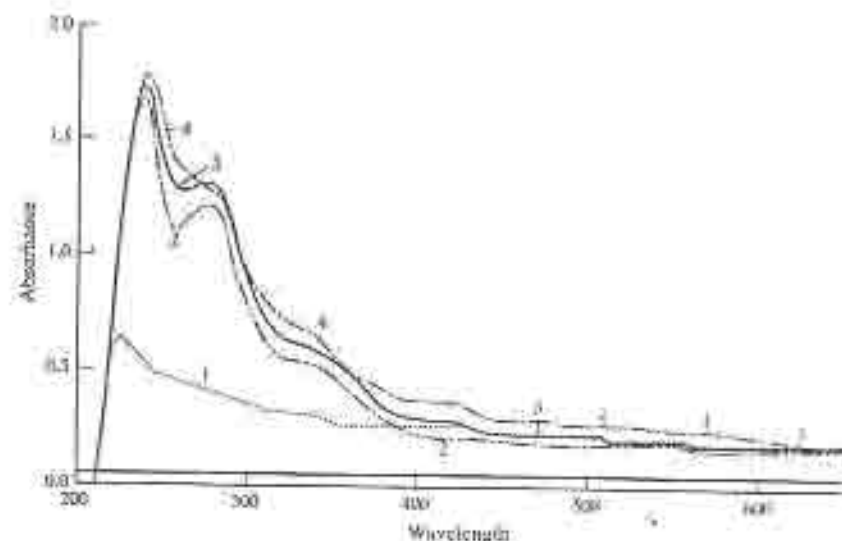


Fig. 6. UV-Visible spectroscopic scans of variously trapped C-sera: (1) HBP; (2) HBP + C-serum phenol; (3) HBP + C-serum phenol + H_2O_2 ; (4) HBP + C-serum phenol + H_2O_2 ; (5) HBP + C-serum phenol + H_2O_2 .

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 lysate), 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 assay.

Preparation of bark extract. The washed bark (12 kg) was homogenized in 10 mM K-P_i 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⁻¹. 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⁻¹. 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 4B 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 4B 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⁻¹. Frs (3 ml) were collected and their A at 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 μ l (4 μ g) of purified HBP, 0.5 ml of C-serum phenol, 50 μ 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 μ 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 μ 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 μ g) was determined by isoelectric focusing on 5% polyacrylamide gel with 2% loading buffer ampholytes in Model 111 Mini HEP 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 Institut für Chemie und Biologie (SFB 185/DAF, TRF and ARS) is gratefully

REFERENCES

1. Caspari, T., Fraw, C., Thorpe, T. and Cleeve, 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. Hyana, 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. Eneho, 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-Schwab, 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., Mower, 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 Shunping, Y. (1986) in *Proceedings of the IRRIS Rubber Physiology and Exploitation Meeting* (Yanping, P. and Carwac, Z., eds), p. 39. Haimen, China.
11. Davis, 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**, 116.
16. Southern, W. A. and Edwin, E. H. (1968) *J. Rubber Res. Inst. Malaysia* **20**, 187.
17. D'Azzaz, J. and Jacob, J. L. (1989) in *Physiology of Rubber Tree Latex* (D'Azzaz, 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., Hernandez, S. K., Paul, C. and Gopfer, 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. Hyana, K., Stone, B. A. and Macanley, H. J. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1538.
21. Gratton, M. and Gratton, T. L. (1991) *Plant Physiol.* **97**, 1641.
22. Long, M. and Christin, H. (1989) in *Physiology of Rubber Tree Latex* (D'Azzaz, 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., Kuschvengh, N. J. Part, A. L. and Rands, 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
ต้นของพอลิเมอร์ยาง, การสกัดสารโพลีเมอร์ยางพารา 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., Asawatreratanakul, K., Witsuwannakul, R., Ohya N., Tanaka, Y., and Ogura, K. (1996) Isopentenyl diphosphate isomerase in rubber latex. *Phytochemistry* 43(4), 769.
9. Koyama, T., Asawatreratanakul, 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. Asawatreratanakul, 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., Sunita, A. and Witsuwannakul, R. (1996) β -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 โดยทำการสอน
ระดับปริญญาตรี โทและ เอกของมหาวิทยาลัยมหิดล และเป็นอาจารย์พิเศษของบัณฑิต
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำงานวิจัยส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับ ซิงเคมีน้ำ
ยางพาราโดยได้รับทุนสนับสนุนจากทั้งในและต่างประเทศ

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 ชีวเคมีของพืช โดยเฉพาะชีวเคมีน้ำยางพาราเกี่ยวกับแอนไซม์ในวิถี
การสร้างโกลิเมอร์ยาง การควบคุมการเริ่มต้นและหยุดสร้างของโกลิเมอร์ยาง การหยุด
ต้นของท่อน้ำยาง การต่อต้านโรคในยางพารา รวมทั้งโปรตีนที่เป็นต้นเหตุในการทำให้
เกิดอาการแพ้ในน้ำยาง

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

