สถาบัน	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. บัณฑิตวิทยาลัย
ปี	2537
ระดับปริญญา	วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. วิทยาศาสตร์ (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
ชื่อนิสิต	อาภรณ์ สันตะโร
ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากยางพารา
อาจารย์	ผศ ดร นันทา เชิงเชาว์ รศ ดร รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล

บทคัดย่อ

เอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ตรวจพบในเกือบทุกส่วนของต้นยางได้แก่ ใบ, เปลือก, ราก, ซี-ซีรัมและบี-ซีรั่ม แต่มีปริมาณไม่เท่ากัน บี-ซีรั่มได้จากออร์แกเนลล์ในน้ำยางซึ่งเรียกว่า ลูทอยด์ จากการศึกษาพบว่า ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส มีประมาณ 1,500-2,000 ยูนิต/น้ำยางสด 1 ลิตรและพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีปริมาณสูงมาก อาจเป็นเพราะภาวะกดดันจากการกรีดให้เกิดบาดแผลของเปลือกบริเวณลำต้น เพื่อเก็บผลผลิตน้ำยางสด หรือถูกกระทำด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ซึ่งชาวสวนใช้สำหรับเพิ่มผลผลิต เอนไซม์ชนิดนี้ทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และแบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ได้ ในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII ปริมาณโปรตีนที่ได้หลังจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เท่ากับ 3.8 % และ 1.3% ค่าความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 70.2% และ 16..8% ตามลำดับ

จากคุณสมบัติการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ พบว่าทั้งสองไอโซไซม์เป็นโปรตีนสายเดียวและเป็นโปรตีนเบสมีค่า pI มากกว่า 8.3 จัดเป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเบต้า-1, 3-กลูคาเนส เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรต p-nitrophenyl-(...)-D-glucosidee ได้และสามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินารินและ ซี-เอ็ม พาไคแมน ซึ่งสับสเตรต ทั้งสองชนิดเป็นโพลิเมอร์ น้ำตาลกลูโคสที่มีพันธะเป็น (...)-1, 3 -glycosidic linkages แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตพัสทิวแลนซึ่งไม่มีพันธะดังกล่าว ไอโซไซม์ GI และ GII มีความเสถียรต่ออุณหภูมิมิได้ถึง 60 องศาเซลเซียส มีความว่องไวสูงที่ช่วงอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียสและมีค่าความว่องไวสูงสุดที่ pH 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ สำหรับในยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์ไอโซไซม์ GI และ GII มีค่า

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

จลนศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อศึกษาโดยใช้ลามินารินเป็นสับสเตรต ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2-1.4 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 0.5 พบว่าค่า Km เอนไซม์ GI และ GII เท่ากับ 1.25 มก./มล. และ 1.33 มก./มล. ตามลำดับ สำหรับค่า Vmax เท่ากับ 0.153 A540/min และ 0.142 A540/min ตามลำดับค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29.5 และ 33.1 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นและเท่ากับ 31.6 และ 34.7 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE

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