การสกัดและทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากข้าวเหนียวดำไทยสายพันธุ์ลืมผัว

สุณัฐชา ปิยะมิ่ง[1,2] สุกัญญา มหาธีรานนท์[1] และ ลลิดา แชงค์[1*]

[1]ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]สหสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[*]lalida_shank@yahoo.com

บทคัดย่อ

เปอร์ออกซิเดสในพืช จัดอยู่ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช รวมถึงมีการนำมาประยุกต์อย่างหลากหลาย นอกจากนี้เปอร์ออกซิเดสยังมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดสีน้ำตาลที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์และการลดลงของคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งเป็นปัจจัยในการเปลี่ยนแปลงหลังการเก็บเกี่ยว อีกทั้งการเก็บรักษาข้าวและธัญพืช ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการสกัดและกระบวนการที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากข้าวเหนียวดำไทยสายพันธุ์ลืมผัว ซึ่งเป็นข้าวที่กำลังได้รับความนิยมในการบริโภคในภาคเหนือของประเทศไทย เพื่อการศึกษาสมบัติต่อไป การทดลองเริ่มจากการงอกเมล็ดข้าวลืมผัวเป็นเวลา 7 วัน ตามด้วยการสกัดเมล็ดข้าวงอก แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย 2 กระบวนการ ได้แก่ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 และการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค แล้วจึงทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวก (Toyopearl CM-650) ทดสอบแอกทิวิตีของเปอร์ออกซิเดสโดยใช้ไกวอะคอลเป็นซับสเตรต และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด ซึ่งพบว่าแอกทิวิตีจำเพาะของเปอร์ออกซิเดสหลังการทำบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการที่ใช้การตกตะกอนด้วยเกลือและการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาคมีค่าเท่ากับ 12.97 และ 0.65 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่การทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวกจากทั้ง 2 กระบวนการ แสดงถึงเปอร์ออกซิเดส 2 ไอโซไซม์หลัก ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกเช่นเดียวกัน

คำสำคัญ: เปอร์ออกซิเดส ข้าวลืมผัว การทำบริสุทธิ์

Extraction and purification of peroxidase from Thai black glutinous rice (*Oryza sativa* L. cv. Luem Pua)

Sunutcha Piyaming[1,2], Sugunya Mahatheeranont[1], and Lalida Shank[1,*]

[1]*Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University*

[2]*Interdisciplinary Program in Biotechnology, Graduate School, Chiang Mai University*

**lalida_shank@yahoo.com*

Abstract

Plant peroxidases are classified as oxidoreductases which play important roles in several plant metabolic processes and are also useful in many applications. Peroxidase is involved in enzymatic browning and decrease in nutritional value that are the limiting factors for post-harvest change and shelf-life of various rice and cereals. Therefore, optimum conditions for extraction and purification of peroxidase from Thai Black Glutinous Rice (Oryza sativa L. cv. Luem Pua) which is a popularly consumed variety in Northern Thailand were investigated for future characterization. The rice seeds were germinated for 7 days, followed by crude enzyme extraction. The extract was further separated using two different processes including ammonium sulfate precipitation at 80% saturation and aqueous two-phase extraction. Toyopearl CM-650 cation exchange chromatography was selected for Luem Pua rice peroxidase purification. Peroxidase activity was assayed using guaiacol as a substrate, while protein content was determined using Bradford assay. Results showed specific activity of purified peroxidase obtained by ammonium sulfate precipitation and aqueous two-phase extraction of 12.97 and 0.65 unit/mg protein, respectively. Elution chromatographic profiles of two purification procedures showed similar pattern revealing two major cationic peroxidase isozymes.

Keywords: peroxidase, Luem Pua rice, purification

1. บทนำ

ข้าวเหนียวดำไทยสายพันธุ์ลืมผัว (*Oryza sativa* L. cv. Luem Pua) เป็นข้าวเหนียวท้องถิ่น พบครั้งแรกที่อำเภอพบพระ จังหวัดตาก เมล็ดข้าวเหนียวชนิดนี้มีสีม่วงเข้ม อุดมไปด้วยสารอาหารและสารต้านอนุมูลอิสระที่มีส่วนช่วยในการป้องกันโรคต่างๆ ข้าวเหนียวลืมผัวเมื่อหุงสุกแล้วจะมีกลิ่นหอมเป็นลักษณะเฉพาะ ทำให้ความนิยมในการบริโภคข้าวเหนียวชนิดนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในภาคเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่ (Patomchaiviwat et al., 2015)

เปอร์ออกซิเดส (POD: EC 1.11.1.7) จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide: H_2O_2) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน พบเอนไซม์นี้ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในพืชชั้นสูง ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการทางเมแทบอลิซึมต่างๆ เช่น กระบวนการป้องกันตัวเองของพืช (Defense mechanism) และกระบวนการเกิดสีน้ำตาลของสารประกอบฟีนอลิกที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ (Enzymatic browning) ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของผลผลิตทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว รวมถึงการเก็บรักษาผลผลิตดังกล่าว และการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ อีกด้วย (Marquez et al., 2008 และ Wu et al., 2014) นอกจากนี้เปอร์ออกซิเดสซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนนั้น ได้ถูกนำมาประยุกต์อย่างแพร่หลาย ทั้งในเชิงการวิเคราะห์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านการแพทย์ และอุตสาหกรรม เช่น การใช้เปอร์ออกซิเดสสำหรับการกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (Srinivas et al., 1999)

เปอร์ออกซิเดส จัดเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะหลังการเก็บเกี่ยวของเมล็ดข้าวและธัญพืช ซึ่งจะส่งผลต่อการเก็บรักษาและการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากข้าวและธัญพืชนั้นๆ อีกทั้งข้าวเหนียวลืมผัวยังประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะแอนโทไซยานิน (Anthocyanins) ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และยังเป็นสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเปอร์ออกซิเดส โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์พืชเป็นตัวรับอิเล็กตรอนของปฏิกิริยา ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารอาหารและสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงสีของเมล็ดข้าวดังกล่าวได้ ปัจจุบันจึงมีงานวิจัยต่างๆ ที่ศึกษาสมบัติของเปอร์ออกซิเดสและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Norkaew et al., 2017) การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสเพื่อการหาสมบัติของเอนไซม์ในพืชต่างๆ นั้น สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคและกระบวนการที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับสมบัติของเอนไซม์ในพืชแต่ละชนิด โดยในปัจจุบันพบเปอร์ออกซิเดสจากพืชที่มีค่าจุดสะเทินไฟฟ้า (Isoelectric point: pI) อยู่ในช่วง 3.5 ถึง 9.5 ประกอบไปด้วยไอโซไซม์ที่มีสมบัติแตกต่างกัน ทั้งไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิเป็นลบ (Anionic isozyme) และไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก (Cationic isozyme) (Boeuf et al., 2000) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดและหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากข้าวเหนียวดำไทยสายพันธุ์ลืมผัว เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ชนิดนี้ที่สกัดได้ในข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวงอก

ทำความสะอาดตัวอย่างเมล็ดข้าวเปลือกลืมผัวด้วยสารละลาย 1% (v/v) Sodium hypochlorite เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นล้างเมล็ดข้าวเปลือกดังกล่าวด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI water) และนำเมล็ดข้าวเปลือกนี้มาเพาะงอกบนกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 1 °C)

2.2 การสกัดเปอร์ออกซิเดสจากข้าวงอก

นำเมล็ดข้าวงอกที่เพาะได้เป็นเวลา 7 วัน มาแกะเปลือกออก แล้วสกัดข้าวงอกด้วย 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ซึ่งมี 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVP) และ 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) เป็นส่วนประกอบ โดยมีอัตราส่วนปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดต่อน้ำหนักข้าวงอกเท่ากับ 2 : 1 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองด้วยผ้าขาวบาง และนำสารละลายที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ เรียกสารละลายนี้ว่าสารสกัดหยาบ (Crude extract)

2.3 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80

ละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ในสารสกัดหยาบ จนได้ความอิ่มตัวร้อยละ 80 และรอให้ละลายดีในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายนั้นไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนโปรตีนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง และนำไปละลายใน 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) จากนั้นทำไดอะไลซีสเพื่อกำจัดเกลือออกจากสารละลาย ในถุงไดอะไลซีสที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 12,000-14,000 ดาลตัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ดังกล่าว ทุก 3 ชั่วโมง รวม 3 ครั้ง

2.4 การแยกเปอร์ออกซิเดสด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค (Aqueous two-phase partitioning)

2.4.1 การหาสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค

ละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol: PEG) 6000 น้ำหนัก 2.40 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟต น้ำหนัก 0.75 กรัม ในสารสกัดหยาบ ปริมาตร 8.00 มิลลิลิตร โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) น้ำหนัก 0.00, 0.10, และ 0.20 กรัม ลงในสารละลายผสมที่ 1, 2, และ 3 ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรรวมสุดท้ายของสารละลายเป็น 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นรอให้สารละลายผสมเกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 1 °C) บันทึกปริมาตรของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่าง และนำสารละลายทั้งสองวัฏภาคไปทดสอบแอกทิวิตีของเปอร์ออกซิเดส แล้วจึงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของการแยกวัฏภาค (Partition coefficient: K) ดังสมการที่ (1)

$$\text{Partition coefficient (K)} = \frac{A_t}{A_b} \qquad (1)$$

โดย A_t หมายถึง แอกทิวิตีของเอนไซม์ในวัฏภาคบน (unit/ml) และ A_b หมายถึง แอกทิวิตีของเอนไซม์ในวัฏภาคล่าง (unit/ml)

2.4.2 การแยกเปอร์ออกซิเดสด้วยระบบน้ำสองวัฏภาคด้วยสัดส่วนที่เหมาะสม

ละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล 6000 น้ำหนัก 24.00 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟต น้ำหนัก 7.50 กรัม ในสารสกัดหยาบ ปริมาตร 80.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรรวมสุดท้ายของสารละลายผสมเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยสารสกัดหยาบ จากนั้นรอให้สารละลายดังกล่าวเกิดการแยกชั้นที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 1 °C) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงแยกทั้งสองวัฏภาคออกจากกัน นำวัฏภาคล่างซึ่งมีเปอร์ออกซิเดสไปทำไดอะไลซีส ในถุงไดอะไลซีสที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 12,000-14,000 ดาลตัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ดังกล่าว ทุก 3 ชั่วโมง รวม 3 ครั้ง

2.5 การวิเคราะห์เปอร์ออกซิเดสด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

นำสารสกัดข้าวลืมผัว ซึ่งผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนทีฟพอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Native polyacrylamide gel electrophoresis: Native-PAGE) ในพอลิอะคลิลาไมด์เจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ 100 โวลต์ โดยมี Horseradish peroxidase (HRP) และ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารควบคุมเชิงบวกและลบ ตามลำดับ จากนั้นนำเจลดังกล่าวมาบ่มในสารละลาย 160 mM Guaiacol และ 80 mM Hydrogen peroxide ใน 0.05 M Citrate-phosphate buffer (pH 7.0 และ pH 4.0 สำหรับเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค ตามลำดับ) เพื่อสังเกตการปรากฏแถบสีส้มของ Tetraguaiacol ก่อนย้อมในสารละลาย Coomassie brilliant blue R-250 ต่อไป

2.6 การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสด้วยเทคนิคทางโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

2.6.1 โครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนลบ (Anion exchange chromatrography)

หยอดสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำไดอะไลซีส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose anion exchange chromatography ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 เซนติเมตร และความสูงของเรซิน 24.0 เซนติเมตร ซึ่งมีอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ใน 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 8.0) ที่มีช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.2 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายที่ชะได้จำนวน 40 หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร และนำสารละลายที่เก็บได้จากคอลัมน์ทั้งหมดไปหาแอกทิวิตีของเปอร์ออกซิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (Gong et al., 2015)

2.6.2 โครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวก (Cation exchange chromatrography)

หยอดสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำไดอะไลซีส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ Toyopearl CM-650 cation exchange chromatography ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร และความสูงของเรซิน 17.0 เซนติเมตร ซึ่งมีอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ใน 0.1 M Sodium acetate buffer (pH 5.0) ที่มีช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 0.8 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายที่ชะได้จำนวน 30 หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เก็บได้จากคอลัมน์ทั้งหมดไปหาแอกทิวิตีของเปอร์ออกซิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (Gong et al., 2015)

2.7 การหาแอกทิวิตีของเปอร์ออกซิเดส (Peroxidase activity assay)

ผสม 4% Guaiacol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร กับ 1% Hydrogen peroxide ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 2,660 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอย่างต่อเนื่องทันที ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 1 °C) (Arnnok et al., 2010) โดยใช้โปรแกรม UV KinLab ของเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุม ซึ่งเตรียมจาก 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) นำค่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงซึ่งได้จากโปรแกรมดังกล่าวมาคำนวณหาแอกทิวิตีของเปอร์ออกซิเดส ดังสมการที่ (2) โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยของเปอร์ออกซิเดส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งการเกิด 1 ไมโครโมล ของ Tetraguaiacol ในเวลา 1 นาที

$$\text{Peroxidase activity (unit/ml)} = \frac{\Delta A \times V_t \times D_f}{t \times \varepsilon \times V_s \times S_f \times P} \qquad (2)$$

โดย $\Delta A/t$ หมายถึง ค่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงต่อนาที, V_t หมายถึง ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (ไมโครลิตร), D_f หมายถึง เท่าของการเจือจาง, ε หมายถึง ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (Molar extinction coefficient) ของ Tetraguaiacol ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 26.6 $mM^{-1}cm^{-1}$, V_s หมายถึง ปริมาตรของสารสกัดเอนไซม์ (ไมโครลิตร), S_f หมายถึง ค่าคงที่ทางปริมาณสารสัมพันธ์ (Stoichiometric factor) ซึ่งในกรณีนี้นิยามให้หนึ่งหน่วยของเปอร์ออกซิเดสเป็นการติดตามการเกิดของสารผลิตภัณฑ์ Tetraguaiacol ค่านี้จึงมีค่าเท่ากับ 1, และ P หมายถึง ความกว้างของคิวเวตต์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร (Ambatkar et al., 2014)

2.8 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford assay)

ผสมสารตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Bradford reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 1 °C) เป็นเวลา 2 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุม คำนวณหาปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) โดยเตรียมจากปริมาณโปรตีนมาตรฐานในช่วง 0.00 ถึง 0.04 มิลลิกรัม

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1 การหาสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการแยกเปอร์ออกซิเดสด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค

จากการทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการแยกเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากข้าวลืมผัว พบว่าสัดส่วนที่ประกอบด้วยพอลิเอทิลีนไกลคอล 24% และแอมโมเนียมซัลเฟต 7.5% ที่ไม่มี NaCl มีค่าสัมประสิทธิ์ของการแยกวัฏภาคต่ำที่สุด ซึ่งแสดงถึงการมีเปอร์ออกซิเดสในวัฏภาคล่างมากที่สุดเมื่อเทียบกับสัดส่วนอื่น ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 1 โดยแต่ละข้อมูลในตารางดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ของแต่ละชุดการทดลอง รวมทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง และตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงข้อมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

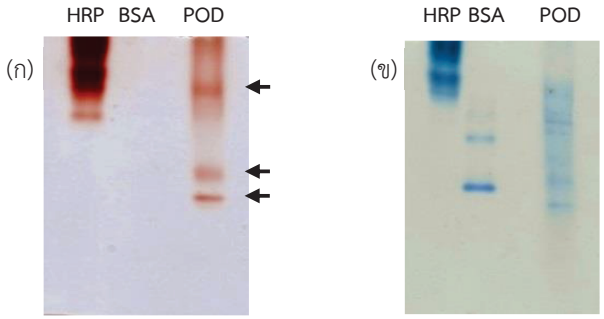
ตารางที่ 1 สัมประสิทธิ์การแยกวัฏภาคของสารละลายที่มีสัดส่วนต่างกัน

ร้อยละสัดส่วนของ PEG/$(NH_4)_2SO_4$/NaCl	ปริมาตรของวัฏภาคบน/ล่าง (มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีของวัฏภาคบน/ล่าง (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	สัมประสิทธิ์ของการแยกวัฏภาค
24/7.5/0	$7.43^{A}/2.57^{B}$	$0.2119^{A}/5.1403^{A}$	0.0415^{B}
24/7.5/1	$6.83^{B}/3.17^{A}$	$0.1970^{A}/3.2221^{B}$	0.0613^{B}
24/7.5/2	$7.03^{B}/2.97^{A}$	$0.2737^{A}/2.3180^{B}$	0.1169^{A}

3.2 การวิเคราะห์เปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

3.2.1 การวิเคราะห์เปอร์ออกซิเดสจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ในกระบวนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าตะกอนโปรตีนที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมีน้ำหนักเบาและลอยอยู่เหนือสารละลาย ซึ่งยากต่อการเก็บตะกอนโปรตีนดังกล่าว อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสนั้น ปรากฏแถบสีส้มของ Tetraguaiacol ทั้งหมด 3 แถบ ซึ่งแสดงถึงเปอร์ออกซิเดสหลัก 3 ไอโซไซม์หลัก ดังแสดงในภาพที่ 1 (ก) ในขณะที่ภาพที่ 1 (ข) แสดงให้เห็นแถบของโปรตีนทั้งหมดในสารละลายและแถบของโปรตีนมาตรฐานซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของการย้อมด้วยซับสเตรตของเปอร์ออกซิเดส

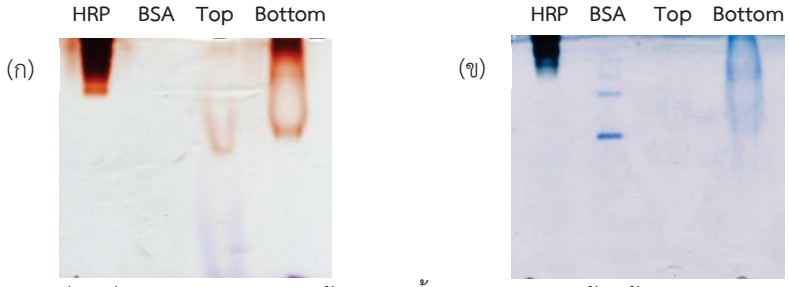


ภาพที่ 1 การวิเคราะห์เปอร์ออกซิเดสจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ก) ย้อมด้วย 160 mM Guaiacol และ 80 mM H_2O_2 ใน 0.05 M Citrate-phosphate buffer (pH 7.0) (ข) ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

3.2.2 การวิเคราะห์เปอร์ออกซิเดสจากการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค

การแยกเปอร์ออกซิเดสด้วยระบบน้ำสองวัฏภาคนั้น ให้สารละลายวัฏภาคล่างที่มีลักษณะเป็นสารละลายใส ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิกและสารสีต่างๆ ของเมล็ดข้าวถูกแยกให้อยู่ในวัฏภาคบน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการแยกวัฏภาคเท่ากับ 0.0447 โดยในการวิเคราะห์วัฏภาคบนและวัฏภาคล่างด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่าในวัฏภาคล่าง

(Bottom) ปรากฏแถบสีส้มของ Tetraguaiacol ชัดเจนกว่าในวัฏภาคบน (Top) ดังแสดงในภาพที่ 2 (ก) ในขณะที่ภาพ 2 (ข) แสดงให้เห็นแถบของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนทั้งหมดในสารละลาย

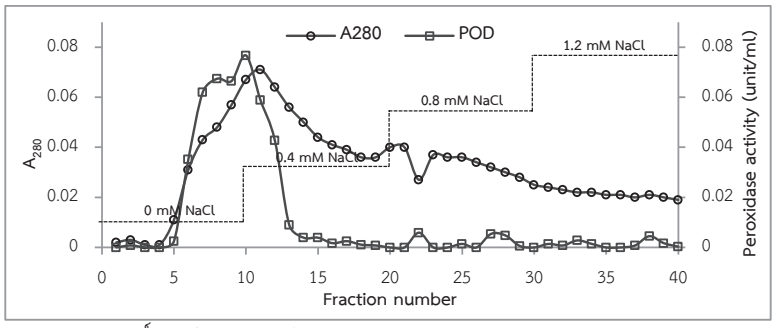


ภาพที่ 2 การวิเคราะห์เปอร์ออกซิเดสจากการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค (ก) ย้อมด้วย 160 mM Guaiacol และ 80 mM H_2O_2 ใน 0.05 M Citrate-phosphate buffer (pH 4.0) (ข) ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

3.3 การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสด้วยเทคนิคทางโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

3.3.1 การทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนลบ

การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสซึ่งได้จากกระบวนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 ด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose anion exchange chromatography พบว่าเปอร์ออกซิเดสถูกชะออกจากคอลัมน์พร้อมกับโปรตีนอื่น อีกทั้งยังถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนการเติมโซเดียมคลอไรด์เข้าสู่ระบบ แสดงให้เห็นว่าเปอร์ออกซิเดสไม่สามารถจับกับเรซินที่มีประจุบวกในคอลัมน์ได้ ดังแสดงในภาพที่ 3 จึงไม่เหมาะที่จะใช้โครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนลบในการทำบริสุทธิ์ตัวอย่างเปอร์ออกซิเดสนี้

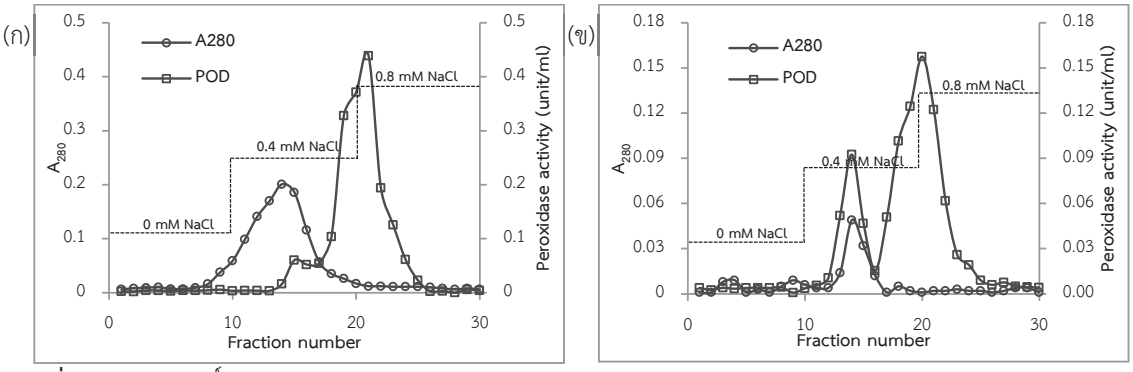


ภาพที่ 3 การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสด้วย DEAE-cellulose anion exchange chromatography

3.3.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวก

โครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวก (Toyopearl CM-650 cation exchange chromatography) ถูกนำมาใช้ทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นจาก 2 กระบวนการ ได้แก่ เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากกระบวนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 และเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค โดยพบว่าเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากทั้ง 2 กระบวนการ ถูกทำบริสุทธิ์ได้ด้วยคอลัมน์ดังกล่าวโดยการจับกับเรซินที่มีประจุลบและถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์เข้าสู่ระบบ ซึ่งทำให้พบเปอร์ออกซิเดส 2 ไอโซไซม์หลัก ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกเช่นเดียวกัน อีกทั้งไอโซไซม์หลักยังแยกออกจากโปรตีนส่วนมากในสารละลายอย่างชัดเจน

อีกด้วย ทั้งนี้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของโครมาโทรกราฟีของเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือมีค่ามากกว่าเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค ดังแสดงในภาพที่ 4 (ก) และ ภาพที่ 4 (ข) ตามลำดับ



ภาพที่ 4 การทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสด้วย Toyopearl CM-650 cation exchange chromatography (ก) เปอร์ออกซิเดสจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ข) เปอร์ออกซิเดสจากการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค

ตารางที่ 2 สรุปการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากข้าวเหนียวลืมผัวโดยใช้กระบวนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

กระบวนการ	แอกทิวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ร้อยละการกู้คืน
สารสกัดหยาบ	139.42	27.96	4.99	1	100
การตกตะกอนด้วยเกลือ	42.55	11.90	3.58	0.72	30.52
Toyopearl CM-650 column	7.91	0.61	12.97	2.60	5.67

ตารางที่ 3 สรุปการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากข้าวเหนียวลืมผัวโดยใช้กระบวนการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค

กระบวนการ	แอกทิวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ร้อยละการกู้คืน
สารสกัดหยาบ	472.59	352.18	1.34	1	100
ระบบน้ำสองวัฏภาค - วัฏภาคบน - วัฏภาคล่าง	 38.82 283.71	 45.39 114.14	 0.86 2.48	 0.64 1.85	 8.21 60.03
Toyopearl CM-650 column	15.13	23.25	0.65	0.48	3.20

จากการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสด้วยโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวก พบว่าเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 12.97 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.60 เท่า ในขณะที่เปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาคมีแอกทิวิตีจำเพาะหลังกระบวนการทำบริสุทธิ์เพียง 0.65 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 0.48 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่ากระบวนการที่ใช้การตกตะกอนด้วยเกลือนั้นให้เปอร์ออกซิเดสที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดในการเก็บเกี่ยวตะกอนโปรตีน ในขณะที่กระบวนการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาคนั้น สามารถแยกเอนไซม์ออกจาก

สารปนเปื้อนต่างๆ ในสารสกัดข้าวลืมผัวได้ โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในข้าวชนิดนี้ ซึ่งทำให้ง่ายต่อการจัดการสารละลายเอนไซม์ในกระบวนการทำบริสุทธิ์

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์เปอร์ออกซิเดสจากข้าวเหนียวดำไทยสายพันธุ์ลืมผัวซึ่งสกัดด้วย 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) โดยใช้ 2 กระบวนการเบื้องต้น คือการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 และการแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาค จากนั้นทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนบวก Toyopearl CM-650 ซึ่งการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ดังกล่าวจากทั้ง 2 กระบวนการ พบเปอร์ออกซิเดส 2 ไอโซไซม์หลัก ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามวิธีที่ใช้การตกตะกอนด้วยเกลือนั้นให้เปอร์ออกซิเดสที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าวิธีที่ใช้ระบบน้ำสองวัฏภาค ในขณะที่การแยกด้วยระบบน้ำสองวัฏภาคสามารถแก้ไขข้อจำกัดในการเก็บเกี่ยวตะกอนโปรตีนของสารสกัดจากข้าวลืมผัวได้ดีกว่าการตกตะกอนด้วยเกลือ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการสนับสนุนสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ อีกทั้งขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สำหรับการสนับสนุนงบประมาณในงานวิจัยนี้

6. เอกสารอ้างอิง

Ambatkar, M. & Mukundan, U. (2014). Calcium salts enhance activity and azo dye decolourisation capacity of crude peroxidase from *Armoracia rusticana.* **American Journal of Plant Sciences,** 5, 212-218.

Arnnok , P., Ruangviriyachai, C., Mahachai, R., Techawongstien, S., & Chanthai, S. (2010). Optimization and determination of polyphenol oxidase and peroxidase activities in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) pericarb. **International Food Research Journal**, 17, 385-392.

Boeuf, G., Bauw, G., Legrand, B., & Rambour, S. (2000). Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38(3), 217-224.

Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A., & Wang, W. (2015). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. **LWT – Food Science and Technology**, 60, 1095-1099.

Marquez, O., Waliszewski, K.N., Oliart, R.M., & Pardio, V.T. (2008). Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean. **LWT**, 41, 1372-1379.

Norkaew, O., Boontakham, P., Dumri, K., Noenplab, A.N.L., Sookwong, P., & Mahatheeranont, S. (2017). Effect of post-harvest treatment on bioactive phytochemicals of Thai black rice. **Food Chemistry**, 217, 98-105.

Patomchaiviwat, V., Piriyaprasarth, S., Chaisomboonphan, B., Limpoemwuttiporn, C., & Nuamnoi, P. (2015). Modification of starch extracted from black glutinous rice (*Oryza sativa* L. Variety Leum Pua) as Tablet Filler. **Advanced Materials Research**, 1060, 58-61.

Srinivas, N.D., Rashmi, K.R., & Raghavarao, K.S.M.S. (1999). Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration. **Process Biochemistry**, 35, 43-48.

Wu, J., Chen, J., Liu, W., Liu, C., Zhong, Y., Luo, D., Li, Z., & Huang, Z. (2014). Selective peroxidase inactivation of lightly milled rice by superheated steam. **Journal of Cereal Science**, 60, 623-630.