Received: Dec 29, 2022 **Revised:** May 15, 2023 **Accepted:** May 31, 2023

การสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสและทำให้บริสุทธิ์จากผักกระเฉดน้ำ
PEROXIDASE EXTRACTION AND PURIFICATION FROM WATER MIMOSA

ภัสราวดี เผ่าจินดา[1] เกวลิน วงศ์โถง[2] นันทวดี เนียมนุ้ย[3] ปราณปริยา สุนีย์[4] แพร สายบัวแดง[5]
วชรพร เชื้อบุญ[6] สุดารัตน์ ช้างสาร[7] อัฐพันธ์ หมอช้าง[8] วรัญญา อิ่มประสิทธิชัย[9]
[1-8]สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
[9]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช
Patsarawadee Paojinda[1] Kevalin Vongthoung[2] Nunthawadee Niamnuy[3] Pranpiya Sunee[4]
Phaer Saibuadaeng[5] Watchalaporn Cheuaboon[6] Sudarat Changsan[7] Atthapan Morchang[8]
Waranya Imprasittichai[9]
[1-8]Medical Technology Program, Faculty of Science and Technology,
Bansomdejchaopraya Rajabhat University
[9]Department of Basic Medical Science, Faculty of Medicine Vajira hospital,
Navamindradhiraj University
E-mail: Patsarawadee.pa@bsru.ac.th

บทคัดย่อ

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้านไม่ว่าเป็นด้านการแพทย์ เกษตรกรรม หรืออุตสาหกรรม ซึ่งเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสามารถพบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากรากของฮอร์ทเรดิชที่นำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำ ผักท้องถิ่นของประเทศไทย โดยแยกส่วนในการศึกษา 4 ส่วน (ใบ ลำต้น นมและราก) สกัดโดยใช้ 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเอนไซม์มาแยกหาความบริสุทธิ์โดยใช้ความเข้มข้นของ NaCl ที่ 0.0 M และ 0.1 M ใน 20 mM Tris-HCl pH 7.2 ด้วย DEAE-Sepharose column และหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี SDS-PAGE ผลการศึกษาพบว่า มีเพียงส่วนประกอบของผักกระเฉดน้ำบริเวณใบและลำต้นเท่านั้นที่พบ activity ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยจะพบกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากที่สุด ที่ 0.0 M NaCl และพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสในรูปแบบซับยูนิตเดี่ยวเท่ากับ 32.3 ± 2 kDa (n=5) นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์แสดงออกถึงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์จากเงาะ ต้อยติ่ง และผักบุ้งไทย ในปริมาณ 5 กรัมเท่ากันที่ตีพิมพ์เผยแพร่มาก่อนหน้านี้ถึง 50-5,000 เท่า เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากผักกระเฉดน้ำเป็นการพบ “กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด” (perfect total activity enzyme)

คำสำคัญ: การสกัด, การทำให้บริสุทธิ์, เพอร์ออกซิเดส, ผักกระเฉดน้ำ, กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

Abstract

Peroxidase is an enzyme used extensively in a variety of fields including medicine, agriculture and industry. It can be found in animals, plants and microorganisms. At present, the application of peroxidase is from horseradish roots, which are imported from abroad at a high cost. The objective of this research was to extract peroxidase from 4 parts (leaf, stem, white tissue, and root) of the water mimosa (*Neptunia oleracea Lour*), a local Thai vegetable. Peroxidase was extracted by using 20 mM Tris-HCl buffer, and pH 7.2 at 4 $^{\circ}$C. Subsequently, the enzyme was purified by using NaCl concentrations of 0.0 M and 0.1 M in

20 mM Tris-HCl pH 7.2 with a DEAE-Sepharose column. The molecular weight was calculated with the SDS-PAGE method. The study results showed that peroxidase activity was found only in the leaf and stem of water mimosa with the ideal total enzyme activity of peroxidase at 0.0 M NaCl. The molecular weight of peroxidase in a single subunit was approximately 32.3 ± 2 kDa (n=5), and the perfect total enzyme activity was found. In comparison with the enzymes from rambutan (*Nephelium lappaceum Linn*), popping pod (*Ruellia tuberosa*), and water morning glory (*Ipomoea aquatica Ipomoea aquatica*) at an equal amount of 5 grams, as in previous publications at 50-5,000 folds, the peroxidase enzyme extracted from water mimosa was revealed to possess the "perfect total activity enzyme".

Keywords: extraction, purification, peroxidase, water mimosa, perfect total activity enzyme

บทนำ

เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เป็นเอนไซม์ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติ เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสใช้ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันต่างๆ พบว่าในกระบวนการทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้น Peroxidase มีบทบาทสำคัญในหลายด้าน และเป็นเอนไซม์ที่พบได้มากตั้งแต่จุลินทรีย์สำหรับสัตว์มีบทบาทที่แตกต่างกันไปในแต่ละสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่จะกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาการออกซิเดชันโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่ง peroxidase จะเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่สามารถพบได้ในสัตว์ และพืช ในพืชสามารถจำแนก Peroxidase ได้ 3 class (Class I, II และ Class III) ดังนี้ เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในกลุ่มที่ 1 (class I peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเซลล์พืช แบคทีเรีย และรา (intracellular) ได้แก่ เอนไซม์ microbial cytochrome C peroxidase, (EC 1.11.1.5) bacterial-catalase peroxidase (EC 1.11.1.6) และ ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสกลุ่มที่ 2 (class II peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) พบในเชื้อรา รวมถึงเอนไซม์ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) (EC 1.11.1.14) และแมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Mn 2^{+} dependent peroxidase) (EC 1.11.1.13) และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสกลุ่มที่ 3 (class III peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ หรือถูกขนส่งไปยังแวคิวโอล (vacuole) (ฐิติกร พรหมบรรจง และคณะ, 2562 และ Chauhan et al., 2020) ปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา โดยเฉพาะทางด้านการแพทย์และอุตสาหกรรม เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมีบทบาทสำคัญในการเข้ามาช่วยการตรวจวิเคราะห์และการตรวจวินิจฉัยโดยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสไม่ได้มีประโยชน์ทางด้านการวินิจฉัยหรือการวิจัยทางการแพทย์เพียงด้านเดียว แต่เป็นเอนไซม์ที่มีความนิยมใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมจากโรงงานพลาสติกและเรซิน โรงงานสิ่งทอ โรงงานผลิตเยื่อกระดาษ และยังมีการใช้ในกระบวนการของอาหาร เครื่องดื่ม และเภสัชกรรม รายงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศก่อนหน้านี้มีผู้วิจัยทำการศึกษาเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สามารถสกัดได้จากพืชต่าง ๆ มากมาย พบว่าความแตกต่างระหว่าง peroxidase isozyme ของสายพันธุ์ถั่วเขียวที่คัดเลือกจากสายพันธุ์ VC 1973 A. โดยวิธี Horizontal Agar Gel Thin Layer Method ด้วยเครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส มีปริมาณเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากน้อยแตกต่างกันในส่วนต่าง ๆ ของพืช (ราก ลำต้น ใบ ทั้งต้น และใบเลี้ยง) จากรายงานวิจัยยังชี้ว่าส่วนของใบเลี้ยงพบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากที่สุด (ปนัดดา แย้มเกตุ, 2530) ต่อมาการศึกษาแยกเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสลายของ H_2O_2 ให้กลายเป็น H_2O พร้อมทั้งออกซิไดส์สารที่เป็นสับสเตรทจากใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 (*Hevea brasiliensis*) ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วย DEAE-Sephacal, Sephadex G-75 และ Con A-Sepharose ตามลำดับ พบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์ถึง 122 เท่า (พัชรากร รัตนภูมี, 2542) ได้มีการสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสและทำให้บริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วเหลือง ใช้เทคนิคการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตและทำให้บริสุทธิ์ด้วย ion exchange chromatography พบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ยังไม่ผ่านกระบวนการใดมีกิจกรรมเอนไซม์ 17.29 U/mL และ 1.586 U/mL เมื่อผ่านเทคนิคการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตและทำให้บริสุทธิ์ด้วย ion exchange chromatography พบกิจกรรมเอนไซม์ 12.85 U/mL และเมื่อผ่าน DEAE-cellulose column กิจกรรมของเอนไซม์ 18 U/mL (Alyas F & Zia M.A., 2002) รายงานวิจัยได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากต้อยติ่งกับผักบุ้งไทย พบว่าสารละลายตัวอย่างจากผักบุ้งไทยมีปริมาณเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากกว่าสารละลายตัวอย่างจากต้อยติ่ง เท่ากับ 12.1053 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชื่นสุมณ ยิ้มถิน และสาโรจน์ ยิ้มถิน, 2555) รายงานวิจัยต่างประเทศเปรียบเทียบการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์เพอร์ออก

ซิเดสจากเมล็ดแอปเปิลและส้ม ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตและ ion-exchange chromatography พบว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากเมล็ดส้มมีความบริสุทธิ์ 17.17 เท่า และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากเมล็ดแอปเปิลมีความบริสุทธิ์ถึง 6.82 เท่า หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE-cellulose chromatography เมื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสด้วย Sephadex G-75 column พบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากเมล็ดส้มและแอปเปิลมีความบริสุทธิ์ 30.64 และ 8.34 เท่า ตามลำดับ เห็นได้ว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้ดีที่สุดจึงเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมได้ (Zia, M.A. et al., 2011) จากรายงานวิจัยข้างต้นได้มีรายงานว่าพบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้ในหลากหลายชนิดของพืช ทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาหาเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำที่เป็นผักท้องถิ่นของประเทศไทย เนื่องจากผักกระเฉดน้ำจะเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่มีน้ำขัง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะภูมิประเทศของประเทศไทย (พืชเกษตร, 2559) แม้ในปัจจุบันจะมีรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มาจากเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเป็นการตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค โดยนำเทคโนโลยีเอนไซม์มาช่วยในการผลิต ส่งเสริมพัฒนาที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของภาคอุตสาหกรรม การแพทย์ งานตรวจวิเคราะห์ ไบโอเซนเซอร์ และการศึกษาทางพันธุวิศวกรรม (วีระ ปิยธีรวงศ์, 2563) แต่ยังคงมีข้อจำกัดเกี่ยวกับคุณสมบัติของตัวเอนไซม์เอง เช่น ความเสถียร (ความคงตัว) ความบริสุทธิ์ และกิจกรรมของเอนไซม์

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำ เพื่อเป็นการเพิ่มทางเลือกของแหล่งผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผักกระเฉดน้ำที่พบได้เป็นจำนวนมากและเจริญเติบโตได้ง่ายในประเทศไทย เพื่อนำมาเป็นแนวทางพื้นฐานองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีเอนไซม์ในการนำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์และสามารถนำไปพัฒนางานวิจัยต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสกัดและแยกเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำ
2. เพื่อทำให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำบริสุทธิ์

วิธีดำเนินการวิจัย

การเลือกตัวอย่างผักกระเฉดน้ำ

เลือกตัวอย่างผักกระเฉดน้ำ *(Neptunia oleracea Lour.)* จากแผงผัก ตลาดย่านฝั่งธนบุรี กรุงเทพมหานคร

การเตรียมตัวอย่างผักกระเฉดน้ำ

แยกส่วนประกอบผักกระเฉดน้ำ (ใบ ลำต้น ราก และนม) โดยไม่ต้องทำการล้างทำความสะอาดแบ่งใส่ลงในห่อฟอยล์ น้ำหนัก 10 กรัมต่อ 1 ห่อฟอยล์ จำนวนส่วนประกอบละ 3 ห่อฟอยล์เพื่อการทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) และนำไปแช่ที่ -70 องศาเซลเซียส (°C) นาน อย่างน้อย 24 ชั่วโมง (overnight)

การสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉด

ชั่งผักกระเฉด 5 กรัม (ใบ ลำต้น ราก และนม) สกัดด้วยสารละลาย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บดด้วยโกร่งจนเป็นละเอียดเนื้อเดียวกันและนำไปแยกส่วนใสโดยวิธีการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใส (supernatant) เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส โดยสารละลายส่วนนี้จะเก็บเป็นส่วนของ crude enzymes และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

การแยกหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสโดยวิธี DEAE-Sepharose chromatography

นำ crude enzymes แยกหาความบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 5 เท่าของความจุคอลัมน์ ปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วยสารละลาย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 ปริมาตร 5 เท่าของความจุคอลัมน์ และควบคุมอัตราการไหลด้วยสารละลาย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 ประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ชะเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้น NaCl ต่าง ๆ (0.0 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M และ 0.4 M) ปริมาตร 3 เท่าของความจุคอลัมน์ จากนั้นเก็บตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ fraction ละ 500 ไมโครลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส

การแยกโปรตีนโดยวิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

นำ โปรตีนแต่ละ fraction ผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 8:1 ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสด้วย 12% polyacrylamide gel โดยใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ 60 นาที ย้อมเจลด้วยสี coomassie brilliant blue R250 นำมาวิเคราะห์ผลของน้ำหนักมวลโมเลกุลโดยผ่านเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ (Gel documentation) (Sambrook et al., 1989)

การหาปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างโปรตีนเพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากผักกระเฉดน้ำวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง Nanodrop 2000c spectrophotometer ใช้ปริมาณสารสะลายโปรตีน 2 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง/ครั้ง ค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร (Desjardins et al., 2009)

การหากิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสด้วยวิธีการของ Miranda et al. (1995) ในสารผสมปฏิกิริยาปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร (40 mM guaiacol, 8 mM H_2O_2 , 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 และเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 470 nm กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่มีความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น ในเวลา 1 นาที (Miranda et al., 1995)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานในรูปค่าเฉลี่ย (mean) จากการทดสอบ 3 ซ้ำ (triplicate) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

ผลการวิจัย

การเตรียมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำ

การเตรียมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสโดยนำผักกระเฉดน้ำมาจากตลาดสด เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร โดยทำการแยกสกัดด้วย 20 mM Tris-HCl pH 7.2 จากส่วนประกอบของผักกระเฉดน้ำ 4 ส่วน ได้แก่ ใบ ลำต้น นม และราก และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Total activity) ปริมาณโปรตีน (Total Protein) และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Specific activity) พบว่าส่วนประกอบของผักกระเฉดน้ำ 4 ส่วน มีเพียงส่วนใบ และลำต้นของผักกระเฉดน้ำเท่านั้นที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยส่วนของใบจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากที่สุดเท่ากับ 17458.5 IU/L รองลงมาคือ ลำต้น นม และราก มีกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 4827.0, 87.2 และ 84.2 IU/L ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนเพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำพบในทุกส่วนของผักกระเฉดน้ำแต่จะมีมากที่สุดในส่วนประกอบของใบเท่ากับ 11.0 mg/ml และพบในส่วนประกอบของลำต้น นม และราก เท่ากับ 2.5, 2.5 และ 1.4 mg/ml ตามลำดับ และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำจะมีสูงที่สุดในบริเวณส่วนประกอบของลำต้นเท่ากับ 70.3 units/mg protein และมีค่าที่ลดลงมาตามลำดับในส่วนประกอบราก ใบ และนม เท่ากับ 58.3, 53.1 และ 34.8 units/mg protein (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในการสกัดหยาบจากส่วนประกอบของผักกระเฉดน้ำ

ส่วนประกอบของผักกระเฉดน้ำ	Total Activity (IU/L)	Total Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg protein)
ใบ	17458.5 $\pm$ 0.05	11.0	53.1
ลำต้น	4827.0 $\pm$ 0.17	2.5	70.3
นม	87.2 $\pm$ 0.02	2.5	34.8
ราก	84.2 $\pm$ 0.16	1.4	58.3

การทำให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำบริสุทธิ์

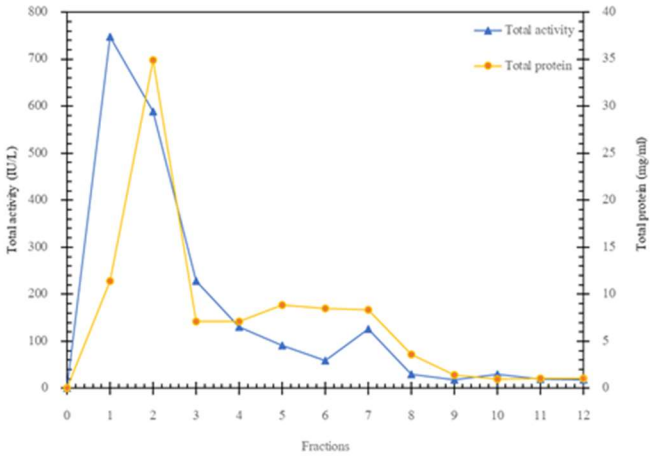
การทำให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ในส่วนประกอบจากผักกระเฉดน้ำที่ได้กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสูงสุดใน 2 ส่วน คือ ใบ และลำต้น โดยการผ่าน DEAE-Sepharose chromatography ผลการทำให้เอนไซม์

บริสุทธิ์แสดงในตารางที่ 2 พบว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสส่วนใบของผักกระเฉดน้ำที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงแต่ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างมากที่ความเข้มข้น 0.0 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.2 เมื่อเทียบกับ crude enzyme คือ 16315.8 IU/L แต่ที่ความเข้มข้น 0.1 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.2 พบกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมาก เหลือเพียง 1210.8 IU/L ส่วนใบของผักกระเฉดน้ำมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 6042.9 และ 93.1 units/mg protein ที่ 0.0 และ 0.1 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.2 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.8 เท่า สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้จากส่วนใบของผักกระเฉดน้ำ ร้อยละ 93.5 ที่ 0.0 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.2 (ภาพที่ 1)

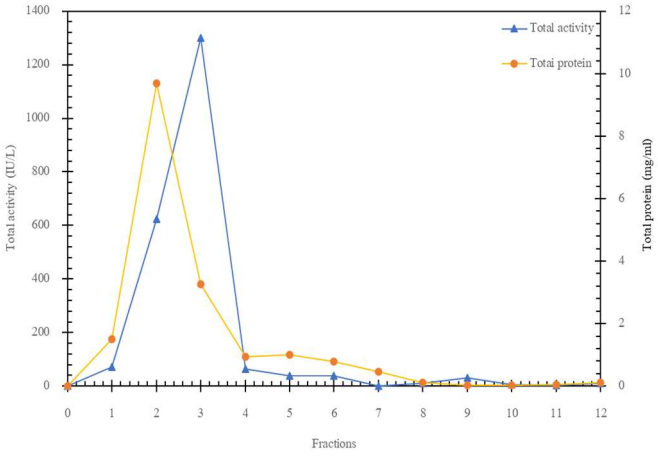
เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสส่วนลำต้นของผักกระเฉดน้ำที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นที่ 0.0 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.2 เมื่อเทียบกับ crude enzyme คือ 12383.4 IU/L แต่ที่ ความเข้มข้น 0.1 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.2 พบกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมาก เหลือเพียง 594.0 IU/L (ภาพที่ 2) และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 10319.5 และ 5940.0 units/mg protein ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.9 และ 2.8 เท่า สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้จากส่วนลำต้นของผักกระเฉดน้ำ ร้อยละ 256.5 และ 12.3 ที่ 0.0 และ 0.1 M NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การทำให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จากใบและลำต้นของผักกระเฉดน้ำ

Fraction	Total Activity (IU/L)		Total Protein (mg/ml)		Specific activity (units/mg protein)		Fold purification		%Recovery	
	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น	ใบ	ลำต้น
Crude enzyme	17458.5	4827.0	11.0	2.3	1587.1	2098.7	1.0	1.0	100.0	100.0
DEAE-Sepharose - 0.0 M NaCl	16315.8	12383.4	2.7	1.2	6042.9	10319.5	3.8	4.9	93.5	256.5
DEAE-Sepharose - 0.1 M NaCl	1210.8	594.0	13.0	0.1	93.1	5940.0	0.1	2.8	6.9	12.3



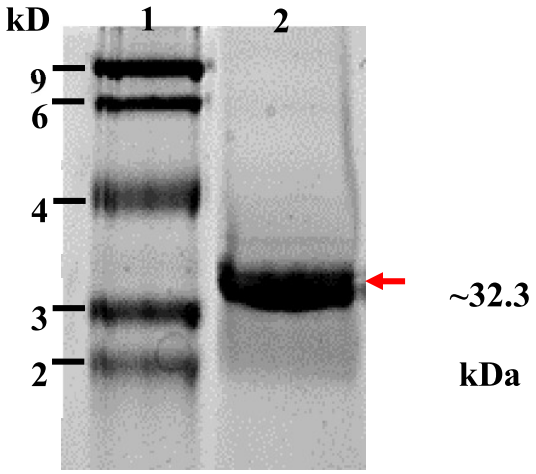
ภาพที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากใบผักกระเฉดน้ำที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sepharose column



ภาพที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากลำต้นผักกระเฉดน้ำที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sepharose column

การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำ

น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight; MW) ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากใบผักกระเฉดน้ำที่ได้จากการแยกความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสโดยวิธี Ion exchange chromatography ชนิด anionic exchange (Diethylaminoethy-Sepharose column (DEAE-Sepharose)) โดยวิธี SDS-PAGE นำแผ่นที่ย้อมโปรตีนเพอร์ออกซิเดสมาเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพันธ์กับโปรตีนมาตรฐาน (Low range molecular mass markers) ถ่ายภาพ SDS-PAGE gel ด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bio-Rad) พร้อมคำนวณน้ำหนักโมเลกุลโดยผ่านโปรแกรม Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad) พบว่าเมื่อผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ bands โปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับโปรตีนเพอร์ออกซิเดสจะค่อย ๆ หลุดออกไป และปริมาณความหนาของ Bands บางลง ที่น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากใบผักกระเฉดน้ำในรูปแบบซับยูนิตเดี่ยว (monomer) เท่ากับ 32.3 $\pm$ 2 (n=5) กิโลดัลตัน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จากผักกระเฉดน้ำ: Lane 1: โปรตีนบอกขนาด (Low range molecular mass markers), Lane 2: peroxidase protein in water mimosa

สรุปผลอภิปรายและข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ผักกระเฉดน้ำในการสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสามารถพบได้ในพืชหลายชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเพอร์ออกซิเดสในรูปแบบ monomeric form เท่ากับ 32.3 ± 2 kDa (n=5) พบว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงมากกว่า 30-60 kDa (Khatun et al 2012) ชี้ให้เห็นว่าสามารถสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้จากผักกระเฉดน้ำ โดยน้ำหนักโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสจากใบผักกระเฉดน้ำมีค่าใกล้คียงกับเพอร์ออกซิเดสจากผักกาดหอม (*Lactuca sativa L.*) 35 kDa (Hu et al 2012) ผักร็อคเก็ต (*Eruca vesicariasbsp. Sativa*) 34 kDa (Nadaroglu et al 2013) ต้นชา (*Camellia sinenis*) 34.5 kDa (Kvaratskhelia et al 1997) จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบของส่วนต่าง ๆ จากผลเงาะ และพบมากที่สุดในเมล็ดของเงาะ (สมบัติ คงวิทยา และคณะ, 2553) นอกจากนี้มีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากต้นต้อยติ่งและผักบุ้งไทย พบปริมาณของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในต้นต้อยติ่งมากกว่าผักบุ้งไทย (ชื่นสุมณ ยิ้มถิน และสาโรจน์ ยิ้มถิน, 2555) และเมื่อทำการเปรียบเทียบในน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัมเท่ากัน แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากผักกระเฉดน้ำ พบกิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส มากกว่าเงาะ ต้อยติ่งและผักบุ้งไทยถึง 50-5,000 เท่า เป็นการพบ “กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด” (perfect total activity enzyme)

สารสกัดหยาบของส่วนประกอบผักกระเฉดน้ำ (ใบ ลำต้น นมและราก) พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนสูงที่สุดในใบ จากการศึกษาคาดว่าการพบกิจกรรมของเอนไซม์ในบริเวณใบในปริมาณที่สูงเนื่องจากใบเป็นส่วนที่มีความสำคัญสำหรับพืชในการสังเคราะห์ด้วยแสง รับออกซิเจน และสร้างอาหารให้กับพืช สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ได้ทำการสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากถั่วเขียว และพบเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเฉพาะส่วนของใบเลี้ยงถั่วเขียวเท่านั้น (ปนัดดา แย้มเกตุ, 2530) และยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงใน horseradish root และขิง (Miranda et al., 1995; Mohamed et al., 2020) เป็นที่ทราบว่า horseradish เป็นพืชล้มลุก เมืองหนาว ลำต้นสั้น มีระบบรากแก้วที่พองโต เรียกว่าหัว ไว้เก็บสะสมอาหาร เช่นเดียวกับขิง โดยรากแก้วของ horseradish และขิง เปรียบเสมือนใบของต้นผักกระเฉดน้ำจึงสนับสนุนว่ากิจกรรมเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่พบในผักกระเฉดน้ำสูงที่สุดเนื่องจากใบเป็นส่วนประกอบสำคัญและทำหน้าที่สำคัญเพื่อให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ ขั้นตอนทำให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์โดย DEAE-Sepharose column เป็นคอลัมน์ชนิด Ion-exchange Chromatography ที่จะอาศัยความแตกต่างของประจุโมเลกุล และใช้ NaCl เป็นตัวจับกับโปรตีนเพื่อชะโปรตีนออกมา ในการศึกษาครั้งนี้เห็นได้ว่า ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ได้จากทั้งส่วนประกอบของใบและลำต้นเพิ่มมากขึ้นกว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สกัดหยาบ แสดงให้เห็นว่า DEAE-Sepharose column ที่นำมาใช้ทำให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักกระเฉดน้ำบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีนหรือเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในผักกระเฉดน้ำได้ดี เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากผักกระเฉดน้ำมีประจุลบอ่อนและเป็นโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้สามารถชะโปรตีนออกมาได้ที่ความเข้มข้นของเกลือที่ต่ำหรือไม่ใช้ความเข้มข้นของเกลือเลย

การศึกษาวิจัยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในใบผักกระเฉดน้ำยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์มาก่อน อย่างไรก็ตามมีการรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากพืชชนิดอื่น ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบ ผล และรากของพืชจะสามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ถือได้ว่าเป็นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสของเอนไซม์สกัดหยาบจากใบผักกระเฉดน้ำที่ใหม่ ซึ่งสามารถนำองค์ความรู้เป็นแนวทางพื้นฐานองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีเอนไซม์ในการนำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์และสามารถนำไปพัฒนางานวิจัยต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ประจำปีงบประมาณ 2564 และความอนุเคราะห์สถานที่อุปกรณ์เครื่องมือจากสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

เอกสารอ้างอิง

[1] ฐิติกร พรหมบรรจง, ธนากรณ์ ดำสุด, และ สุวรรณา ผลใหม่. (2562). *การศึกษาและทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบางส่วนที่สกัดจากเปลือกแตงโม และการทดสอบประสิทธิภาพในการสลายสีย้อม*. วิจัยทุนสนับสนุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

[2] Chauhan V., Kumari V., & Kanwa. (2020). Comparative Analysis of Amino acid Sequence Diversity and Physiochemical Properties of Peroxidase Superfamily. *Journal of Protein Research & Bioinformatics*, *2*(1), 1-8.

[3] ปนัดดา แย้มเกตุ. (2530). *การศึกษาความแตกต่างระหว่าง peroxidase isozyme ของสายพันธุ์ถั่วเขียวที่คัดเลือกจากสายพันธุ์ VC 1973 A.* (วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[4] พัชรากร รัตนภูมี. (2542). *เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพารา*. (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

[5] Alyas, F., & Zia, M. A. (2002). Extraction and Purification of Peroxidase from Soybean Seeds. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences (Pakistan), 39*(4), 326-329.

[6] ชื่นสุมณ ยิ้มถิน และ สาโรจน์ ยิ้มถิน. (2555). *การเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากต้อยติ่งและผักบุ้งไทย*. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

[7] Zia, M. A., Kousar, M., Ahmed, I., Iqbal, H. M. N., & Abbas, R. Z. (2011). Comparative Study of Peroxidase Purification from Apple and Orange Seeds. *African Journal of Biotechnology, 10*(33), 6300-6303.

[8] พืชเกษตร. (2559). *ผักกระเฉด (water mimosa).* สืบค้นจาก https://link.bsru.ac.th/ioq

[9] วีระ ปิยธีรวงศ์. (2563). *หลักการและการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเอนไซม์*. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

[10] Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)* (2 ed., Vol. 3). Cold spring harbor laboratory press.

[11] Desjardins, P., Hansen, J. B., & Allen M. (2009). Microvolume Protein Concentration Determination Using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *Journal of Visualized Experiments,* 33, 1-14.

[12] Miranda, V. M., Lahore, F. H., & Cascone O. (1995). Horseradish peroxidase extraction and purification by aqueous two-phase partition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53(2), 147-154.

[13] Mohamed, I., Khonezy, E., Ahmed M. A., Mahmoud, F. D., Afaf, S. F., & Saleh A. M. (2020). Purification and Characterization of Cationic Peroxidase from Ginger (Zingiber Officinale). *Bulletin of the National Research Centre*, 44(11), 2-9.

[14] Khatun, S., Ashraduzzaman, M., Karim, M. R., Pervin, F., Absar, N., & Rosma, A. (2012). Purification and Characterization of Peroxidase from *Moringa Oleifera* L. Leaves. *Bioresources, 7*(3), 3237-3251.

[15] Hu, Y., Wu, J., Luo, P., & Mo, Y. (2012). Purification and Partial Characterization of Peroxidase from Lettuce Stems. *African Journal of Biotechnology,* 11(11), 2752-2756.

[16] Nadaroglu, H., Çelebi, N., Demir, N., & Demir, Y. (2013). Purification and Characterization of a Plant Peroxidase from Rocket (*Eruca vesicaria sbsp*. Sativa) (Mill.) (syn. *E. sativa*) and Effects of Some Chemicals on Peroxidase Activity in Vitro. *African Journal of Agricultural Research,* 8(21), 2520-2528.

[17] Kvaratskhelia, M., Winkel, C., & Thorneley, R. N. (1997). Purification and Characterization of a Novel Class III Peroxidase Isoenzyme from Tea Leaves. *Plant physiology,* 114(4), 1237-1245.

[18] สมบัติ คงวิทยา, อริสรา อรกุล, เบญจวรรณ ช่อชู, ปณิตา วงษ์คำ, ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ, สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, และคณะ. (2553). การตรวจหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในผลเงาะ. *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้,* 2(2), 97-101.

Translated Thai References

[1] Prombanchong, T., Damsud, T., & Pholmai, S. (2019). *Study and Purification of Some Peroxidase Enzymes Parts Extracted from Watermelon Rind and Dye Dissolution Efficiency Test.* Research grants, Rajamangala University of Technology Srivijaya.

[3] Yamket, P., et al. (1987) *A study on the Pattern of Peroxidase Isozyme in Sublines of VC 1973 a Mungbean Line.* [Bachelor's thesis, Kasetsart University]. Kasetsart University, Bangkok.

[4] Patcharakorn Rattanapumee. (1999). *Peroxidase in Hevea brasiliesis leaves*. [Master's thesis, Prince of Songkla University]. Prince of Songkla University, Songkla.

[6] Chuensumon Yimthin_Saroj Yimthin. (2012). *A Comparision of Peroxidase from Minnieroot and Swamp Cabbge.* Research and Development Institute, Rajamangala Univerity of Technology Suvarnabhumi.

[8] Puechkaset. (2016). *Water mimosa.* Retrieved from https://link.bsru.ac.th/ioq

[9] Piyatheerawong, W. (2020). *Principles and applications of enzyme technology.* KKU Printing House.

[18] Kongwithtaya, S., Orakul, A., Chochu, B., Wongcom, P., Kachensuwan, C., Phornphisutthimas, S., et al. (2014). Detection of Peroxidase from Rambutan Fruit. *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*, 2(2), 97-101.