บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศไทย เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนที่มีความชื้นในอากาศค่อนข้างสูง จากสภาพอากาศดังกล่าวทำให้เกษตรกรประสบปัญหาจากเชื้อโรคต่างๆ เพราะการกรีดเอาน้ำยางมาใช้ประโยชน์จะเป็นช่องทางให้เชื้อโรคต่างๆ เข้าสู่ระบบท่อลำเลียงภายในลำต้น ทำให้เกิดโรคและได้ผลผลิตลดลง หรืออาจส่งผลให้ยางพาราตายได้

Phytophthora palmivora เป็น Oomycete ที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วง (leaf fall) และเส้นดำ (black stripe) ในยางพารา โรคดังกล่าวเป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรชาวสวนยางเป็นอย่างมาก เพราะเมื่อเกิดโรคแล้วทำให้ใบยางร่วงก่อนเวลาอันควร หน้ายางเสียหายจนไม่สามารถกรีดได้ ทำให้ผลผลิตลดลงซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมยางพาราในระดับประเทศ

พืชโดยทั่วไปมีกลไกการป้องกันและต่อต้านเชื้อโรค เพื่อให้พืชได้รับความเสียหายน้อยลง สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูง กลไกการป้องกันโรคของพืชมีหลายรูปแบบได้แก่ การป้องกันทางโครงสร้างก่อนเชื้อเข้าสู่พืช เช่น การมีขี้ผึ้งคลุมใบและผล การมีผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำและอาหารที่หนาและเหนียว, การป้องกันทางโครงสร้างหลังเชื้อเข้าสู่พืช เช่น การแตกปริของเนื้อเยื่อเพื่อป้องกันส่วนที่ดีจากบริเวณที่ติดเชื้อหรือบาดแผลที่เป็นโรค, การป้องกันที่เกิดจากการทำงานของเซลล์ เช่น การโป่งออกของเซลล์ชั้น epidermis และเซลล์ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis, การตายอย่างว่องไวของเซลล์ (hypersensitive cell death) โดยสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้ (necrosis) ตรงตำแหน่งที่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อโรค (Silva *et al.* 2002a), การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่พืชสร้างขึ้นและมีพิษต่อเชื้อโรค (antimicrobial) (Kuc',1995), การสังเคราะห์ลิกนิน (lignification) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลาม (Friend *et al.*, 1973) และการสังเคราะห์ pathogenesis-related proteins (PR-proteins) (Guest and Brown, 1997)

Pathogenesis–related proteins (PR-proteins) เป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค เพื่อป้องกันอันตรายให้กับตนเองจากการรุกรานของเชื้อโรคหรือจากการกดดันด้วยสารเคมี (chemical treatments) และฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมถึง

การกดดันจากการเกิดบาดแผล (wounding) และอิลิซิเตอร์ต่าง ๆ (Van Loon and Van Strien, 1999) PR-proteins ที่พืชสร้างขึ้นโดยส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ สามารถป้องกันเชื้อที่มีฤทธิ์ปานกลางถึงต่ำและไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคใด เอนไซม์เบต้า –1,3-กลูคาเนส และไคติเนสเป็น PR-proteins ที่มีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรคในพืช โดยการย่อยสลายผนังเซลล์ในส่วนที่เป็นเบต้า –1,3-กลูแคนและไคตินตามลำดับ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น PR- proteins ที่พืชสร้างขึ้นมาหลายไอโซไซม์เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ทำหน้าที่สร้างลิกนินเพื่อช่วยซ่อมแซมผนังเซลล์ โดยการโพลิเมอร์ไรซ์แอลกอฮอล์ 3 ชนิดคือ *para*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (Higuchi, 1985) นอกจากทำหน้าที่ในการสร้างลิกนินแล้ว บางไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสถูกสร้างขึ้นมาเพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเกิดจากกระบวนการออกซิเดทีฟเบิร์ท เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการต่อต้านเชื้อโรค นอกจากมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคแล้วยังมีพิษต่อเซลล์พืชด้วย protease inhibitor (PI) เป็น PR- proteins ซึ่งพบได้ในพืชหลายๆชนิด มีบทบาทหลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เก็บสะสมโปรตีน ควบคุมการทำงานของ endogenous proteases ป้องกันการบุกรุกด้วยแมลง หรือ microbial pathogens (Martinar rickauer *et al.*,1989) PI มีหลายกลุ่มแบ่งตามชนิดของ protease เช่น serine protease inhibitor, cysteine protease inhibitor และ soybean trypsin inhibitor PI ที่มีการศึกษากันมากในพืชจะเป็นกลุ่มที่ยับยั้ง serine protease ได้แก่ trypsin, chymotrypsin และ subtilisin Sritanyarat และคณะ (2006) ได้ทำบริสุทธิ์ PI จากน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM600 พบว่ามีขนาดเล็ก 14.8, 7.7 และ 7.5 kDa ตามลำดับ ทั้ง 3 form สามารถยับยั้งทั้ง trypsin และ subtilisin แต่ไม่ยับยั้ง chymotrypsin

อิลิซิเตอร์ (elicitor) คือสารซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองในพืช ได้แก่ ทำให้เกิด hypersensitive cell death ทำให้เกิดการสะสมไฟโตอเล็กซิน และ PR-proteins อิลิซิเตอร์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ไบโอติก (biotic) และ อไบโอติก (abiotic) สารที่มาจากเชื้อโรคหรือมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อก่อโรค จัดเป็นไบโอติกอิลิซิเตอร์ ส่วนอไบโอติกอิลิซิเตอร์ ได้แก่ รังสี UV และ ไอออนของโลหะหนัก ไบโอติกอิลิซิเตอร์จากเชื้อโรคต่างๆ พบว่ามีทั้งที่เป็นโพลีเปปไทด์ โพลีแซคคาไรด์ ไกลโคโปรตีน และไคโตแซน (Darvill and Albersheim, 1984) copper sulfate ($CuSO_4$) เป็นอไบโอติกอิลิซิเตอร์ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่างๆในพืช จากการทดสอบรากทานตะวันด้วย

$CuSO_4$ พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มขึ้นของไฟโตอเล็กซิน และระดับของ antioxidant enzyme เช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเกิดจากกระบวนการออกซิเดทีฟเบิร์ท และเพื่อการสังเคราะห์ลิกนิน (Jouili and El Ferjani, 2003) ดังนั้น $CuSO_4$ สามารถนำมาใช้ศึกษากลไกของกระบวนการต่อต้านโรคในพืชได้

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาถึงผลของ $CuSO_4$ ในการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ PR-proteins ในยางพารา จะมุ่งเน้นศึกษา PI ในกลุ่มของ serine protease inhibitor โดยเลือกใช้เซลล์แขวนลอยยางพาราพันธุ์ BPM-24 เป็น host ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $CuSO_4$ จะติดตามการเพิ่มขึ้นของโปรตีนโดยรวม (total protein), เอนไซม์เบต้า -1,3- กลูคาเนส และ PI ซึ่งเป็นตัวแทนของ PR-proteins ด้วย จากนั้นนำผลการศึกษาที่ได้มาใช้ในการติดตามระดับของ PI ที่เวลาต่างๆ ทำการ purify PI ให้มีความบริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติบางประการ เช่น ความจำเพาะต่อชนิดของ protease ความเสถียรต่อ pH และ อุณหภูมิ รวมทั้งตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* ด้วย

2. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณลักษณะของโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ ซึ่งแยกได้จากเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ถูกกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ โดยมีขอบเขตการวิจัยดังนี้

2.1 ทดสอบความสมบูรณ์ของเซลล์แขวนลอยยางพาราที่เตรียมได้ โดยการทดลองเหนี่ยวนำด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. palmivora* (culture filtrate) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในยางพารา แล้วติดตามการเพิ่มขึ้นของ Scopoletin (Scp) ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินของยางพารา รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของโปรตีนรวม และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

2.2 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $CuSO_4$ ที่สามารถเหนี่ยวนำเซลล์แขวนลอยยางพาราให้มีการสังเคราะห์ PR-proteins เพิ่มขึ้น ได้แก่ โปรตีนรวม, เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ PI

2.3 นำความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $CuSO_4$ จากข้อ 2.2 มาศึกษาอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของ PI โดยติดตามการสังเคราะห์ที่เวลาต่างๆ

2.4 ทำการแยก PI ให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ผ่านการกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ ตาม condition ที่เหมาะสมในข้อ 2.3

2.5 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของ PI บริสุทธิ์ เช่น ความจำเพาะต่อ protease ชนิดต่างๆ (trypsin, chymotrypsin และ subtilisin) ความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิ ตลอดจนความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในยางพาราคือ *P. palmivora*

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
05 ต.ค. 2555
249160

3. วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงคัลลัส

1.1 เลือกผลยางพาราพันธุ์ BPM-24 ที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์หลังจากผสมเกสรมาทำความสะอาด จนแน่ใจว่าผิวภายนอกสะอาดปราศจากเชื้อโรค

1.2 เปิดเปลือกผลออกเพื่อตัดแยกเมล็ดออกจากผล ต้องระวังอย่าให้เมล็ดอ่อนสัมผัสกับยางจากเปลือกผล เพราะจะทำให้เมล็ดอ่อนมีสีดำ และความสามารถในการเกิดคัลลัสลดลง

1.3 แบ่งเมล็ดออกเป็น 6 ส่วนเท่าๆกัน แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารที่ใช้ในการชักนำคัลลัสคืออาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS medium) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล sucrose 3%, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1 mg/l และ benzyladenine (BA) 1 mg/l ทำให้อาหารแข็งโดยการเติมวุ้นไฟตาเจล 0.15% (สมปอง และอรุณี, 2535)

1.4 เลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพาราในอาหารสูตรชักนำคัลลัสในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25-27°C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ทำการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรใหม่เพื่อเพิ่มขนาดของคัลลัสทุก 4 สัปดาห์

2. การเตรียมเซลล์แขวนลอยยางพารา

ย้ายคัลลัสในข้อ 1.4 ไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำเซลล์แขวนลอย วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26 ± 4 °C ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายเลี้ยงเซลล์ในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 14 วัน ในการย้ายเลี้ยงปรับความหนาแน่นของเซลล์แขวนลอยให้ได้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 1.0 ml ในอาหารปริมาตร 30 ml ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 125 ml นำไปเขย่าเลี้ยงด้วยวิธีการข้างต้น ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์หลังการย้ายเลี้ยงทุกวันจนครบ 7 วัน นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต

3. การเตรียม culture filtrate จากเชื้อ *P. palmivora*

เลี้ยงเชื้อ *P. palmivora* บนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ที่ 25-27°C เป็นเวลา 4 - 5 วัน ตัดเชื้อ *P. palmivora* บนอาหาร PDA บริเวณที่กำลังเจริญเติบโตด้วย

cork borer ลงในอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth) โดยใช้เชื้อ 15 ชิ้นต่ออาหารเหลวปริมาตร 150 ml หลังจากนั้นนำไปเขย่าเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่ 25-27 °C เป็นเวลา 21 วัน เชื้อ *P. palmivora* จะค่อยๆ ผลิตอิลิซิเตอร์ออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ทุก 5 วันทำการตรวจหาโปรตีนรวมด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) ใน culture filtrate จะประกอบไปด้วยอิลิซิเตอร์อย่างน้อย 2 ชนิดคือ 10 kDa (อิลิซิติน) และ 75 kDa (จากผลการทดลองซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยปีงบประมาณ 2550-2551) การวิจัยครั้งนี้จะใช้ isolate No. KBNM 9 ซึ่งเคย identify แล้วด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ของ genus *Phytophthora* และผู้วิจัยเคยใช้เตรียมอิลิซิตินมาก่อน (Churngchow และ Rattarasarn, 2000)

4. **การทดสอบเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วย** culture filtrate

นำเซลล์แขวนลอยยางพาราจากข้อ 2 ซึ่งผ่านการปรับตัวโดยการเขย่าใน 10 ml ของ MES buffer (ประกอบด้วย 10 mM MES + 3% sucrose (w/v) + 5% (v/v) MS, pH 5.7) เป็นเวลา 6 ชม. มาทดสอบกับ culture filtrate ที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นนำทั้ง MES buffer และตะกอนเซลล์ มาติดตามการสังเคราะห์ Scp, โปรตีนรวม และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ณ เวลาต่างๆ ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของเซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้และความสามารถในการตอบสนองต่ออิลิซิเตอร์ต่างๆ

5. **การบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย** $CuSO_4$

หลังจากผ่านการปรับตัวโดยการเขย่าใน 10 ml ของ MES buffer เป็นเวลา 6 ชม. นำทั้ง MES buffer และตะกอนเซลล์ มาติดตามการสังเคราะห์โปรตีนรวม เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ PI เมื่อเขย่าต่อไปอีก 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อศึกษาผลของการเขย่าใน MES buffer ต่อระดับของ PR-proteins ก่อนการทดสอบด้วย $CuSO_4$ จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยยางพารา ซึ่งผ่านการปรับตัวใน 10 ml ของ MES buffer เป็นเวลา 6 ชม. มากระตุ้นด้วย $CuSO_4$ ความเข้มข้นต่างๆและติดตามระดับของโปรตีนรวม และ PI ณ เวลา 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ

6. **ศึกษาอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของ** PI

นำความเข้มข้นของ $CuSO_4$ ที่เหมาะสมในข้อ 5 มาใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพารา เก็บทั้ง MES buffer และตะกอนเซลล์มาติดตามการสังเคราะห์ PI ณ เวลาต่างๆ เพื่อศึกษาอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของ PI

7. **ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส**

วัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ Scp เป็น substrate ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Edwards และคณะ (1997) และใช้ guaiacol เป็น substrate ตามวิธีของ Perez และคณะ (2002)

8. **ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส**

วัดความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยใช้ laminarin เป็น substrate ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Burner, R. L. (1964)

9. **ศึกษาการสังเคราะห์** protease inhibitor (PI)

9.1 <u>การเตรียมสารสกัด PI</u>

นำเซลล์แขวนลอยชุดควบคุม และชุดทดลองที่บ่มด้วย culture filtrate หรือ $CuSO_4$ ใส่ในครก์ขนาดเล็ก เติมไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียด แล้วเติม 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.5 ซึ่งประกอบด้วย 0.5 % (w/v) polyethylene glycol และ 3% (w/v) PVP บดให้เข้ากัน ตักสารตัวอย่างที่บดได้ลงในกระบอกฉีดยา ซึ่งภายในมีสำลีบรรจุอยู่ คั้นเฉพาะน้ำ จากนั้นเซนตริฟิวจ์ แล้วเก็บสารละลายส่วนใส เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ หรือนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

9.2 <u>การหาปริมาณโปรตีนรวมจากสารสกัด</u>

วัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin)

9.3 <u>การทดสอบแอคติวิตีของ PI</u>

ทดลองยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin, chymotrypsin และ subtilisin โดยปิเปตสารสกัด PI ลงในหลอด eppendorf ซึ่งมีเอนไซม์ต่างๆ คือ trypsin, chymotrypsin และ subtilisin ตามลำดับ ปรับด้วย 20 mM Tris-HCl , pH 7.8 , 0.1 M $CaCl_2$ ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 600 µl วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติม 100 µl ของสารละลาย 1% azocasein (w/v) วางทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 10% trichloroacetic acid (TCA) ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml เขย่าให้เข้ากัน หลังจากเซนตริฟิวจ์ผสมสารละลายส่วนใส 400 µl กับ 600 µl ของ 0.5 M NaOH เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับค่าจากการย่อย 1% azocasein โดยเอนไซม์มาตรฐานแต่ละชนิดเมื่อไม่เติมสารสกัด PI

9.4 การ purify PI

นำสารสกัด PI ที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 80% จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายกลับใน 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5 แล้วนำไปไดอะไลซ์ใน buffer ชนิดเดียวกัน ทำการแยกตะกอนออกมาโดยการนำไปเซนตริฟิวจ์ นำสารละลายส่วนใสมาผ่านคอลัมน์ DEAE ซึ่ง equilibrate ด้วย 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1 ล้างคอลัมน์และทำการชะสารแบบ gradient ด้วย buffer เดิมที่มี 0-1 M NaCl นำโปรตีนที่มีแอคติวิตีของ PI สูงไปไดอะไลซ์ใน 0.1 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5 , 0.5 M NaCl จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ trypsin-sepharose (อาจเป็น chymotrypsin หรือ subtilisin ขึ้นกับผลการทดลองในข้อ 9.3 ว่า PI มีความจำเพาะกับ protease ชนิดใด) หลังจากล้างคอลัมน์ด้วย buffer ที่ใช้ในการ equilibrate แล้ว ทำการชะโปรตีนออกมาด้วย 0.5 M NaCl, pH 2.0 แล้วจึงนำสารที่ได้มาไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปศึกษาคุณลักษณะต่อไป

9.5 การทดสอบความจำเพาะต่อ protease ต่างๆ

การยับยั้งของ PI ต่อ trypsin และ chymotrypsin อาจทดสอบได้โดยใช้ substrate ซึ่งจำเพาะกว่า azocasein เช่น การยับยั้ง chymotrypsin ใช้ BTEE (*N*-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) เป็น substrate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 256 นาโนเมตร ส่วนการยับยั้ง trypsin ใช้ TAME (Nα-p-Tosyl-L-arginine methyl ester) เป็น substrate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 247 นาโนเมตร

9.6 pH stability

นำ PI บริสุทธิ์ มาตรวจหาความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง โดยการบ่มใน pH buffer 2-10 (สารมาตรฐานจากบริษัท Fluka) ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นนำมาหาแอคติวิตีของ PI ตามวิธีในข้อ 9.3 (โดยเลือกทดสอบกับ protease ซึ่งมีความจำเพาะกับ PI มากที่สุด)

9.7 Temperature stability

นำ PI บริสุทธิ์ มาตรวจหาความเสถียรต่ออุณหภูมิ โดยการบ่มที่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาแช่ในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นนำมาหาแอคติวิตีของ PI ตามวิธีในข้อ 9.3 (โดยเลือกทดสอบกับ protease ซึ่งมีความจำเพาะกับ PI มากที่สุด)