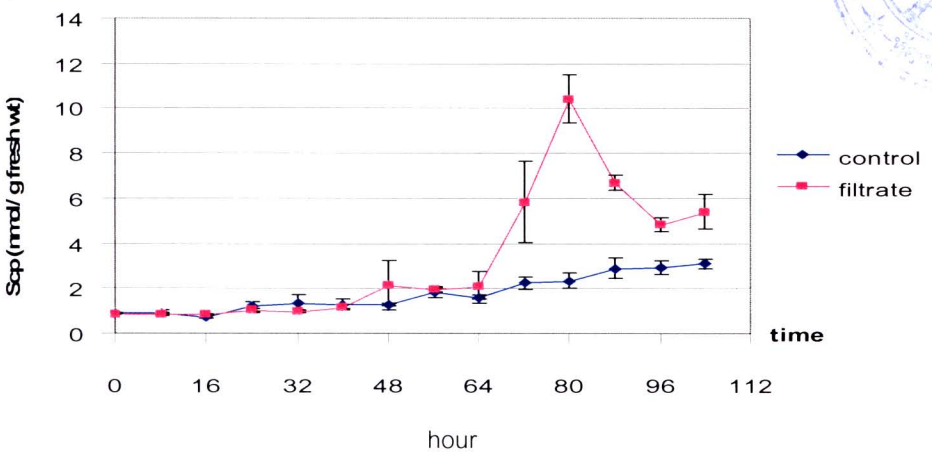
ผลการทดลอง

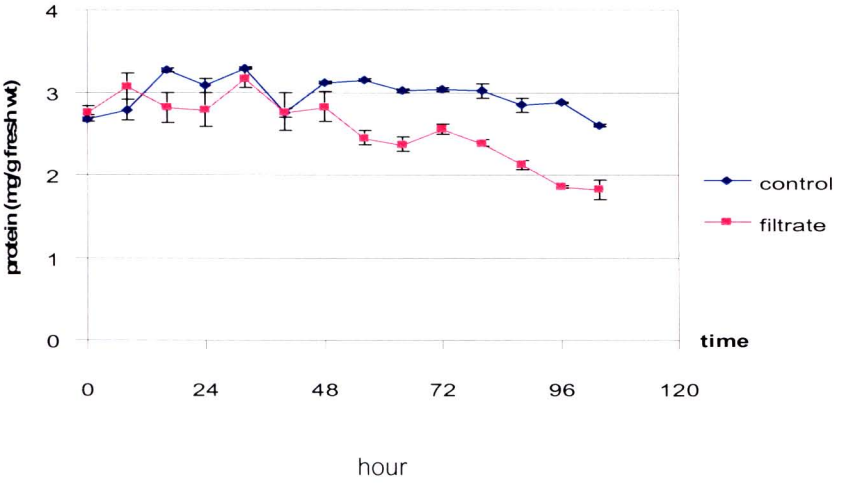
1. ผลการทดสอบความสมบูรณ์ของเซลล์แขวนลอยยางพาราที่เตรียมได้

นำเซลล์แขวนลอยยางพาราที่เตรียมได้ มาปรับสภาพใน MES buffer เป็นเวลา 6 ชม. ก่อนทดสอบกับ culture filtrate ซึ่งมีปริมาณโปรตีนรวม คิดเป็น 0.3 µg ต่อ 1 g เซลล์แขวนลอย แยกตะกอนเซลล์ออกจาก MES buffer เมื่อครบ 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชม. นำ MES buffer ของแต่ละ time point ไปวัดปริมาณของ Scp ด้วยวิธี spectrofluorometry ส่วนสารสกัดที่ได้จากตะกอนเซลล์นำไปวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ Scp เป็น substrate จึงมีชื่อจำเพาะว่า Scp peroxidase (S-POD) และใช้ guaiacol เป็น substrate จึงมีชื่อจำเพาะว่า guaiacol peroxidase (G-POD) ผลการทดลองพบว่าเซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้สามารถตอบสนองต่อ culture filtrate ได้ดี เซลล์ถูกกระตุ้นให้มีการสร้าง Scp และปลดปล่อยออกมาใน MES buffer จำนวนมาก โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 48 ชม. และผลิตได้สูงสุดที่ 80 ชม.หลังจากการกระตุ้น (รูปที่ 6)

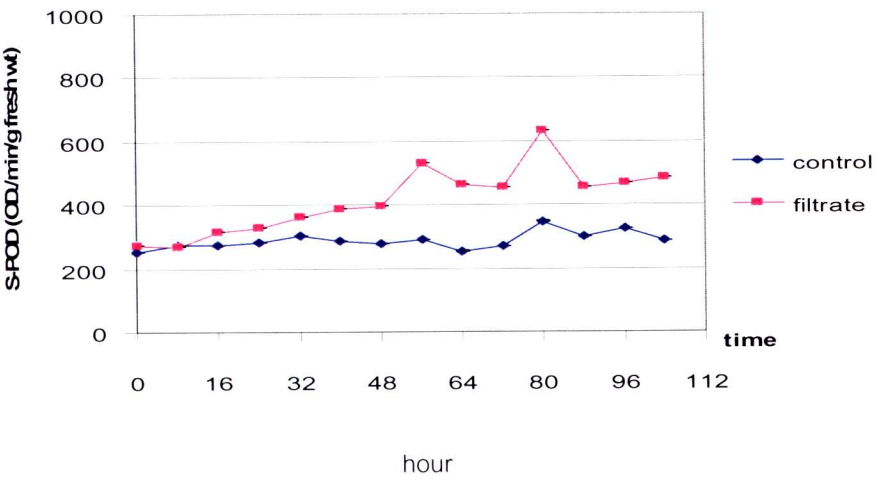
ในการวัดปริมาณโปรตีนรวม พบว่ามีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง หลังจากทดสอบด้วย culture filtrate (รูปที่ 7) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีโปรตีนบางชนิดถูกส่งออกมานอกเซลล์ (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) เพื่อตอบสนองต่อสารที่มากระตุ้น นอกจากนี้หากปริมาณของ culture filtrate ที่ใช้มีปริมาณสูงเกินไป จนเกิดการรั่วของไซโตพลาสมและโปรตีนบางส่วนก็จะทำให้ปริมาณโปรตีนที่วัดได้ภายในเซลล์มีค่าลดลง สำหรับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสถูกกระตุ้นให้มีการสร้างในปริมาณที่สูงกว่าชุดควบคุม แต่มียอด peak ที่เวลาแตกต่างกันขึ้นกับ substrate ที่เลือกใช้ในการทดลอง รูปที่ 8 แสดงค่า S-POD ซึ่งมี kinetics สัมพันธ์กับการสังเคราะห์ Scp ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของ Scp ซึ่งนอกจากมีฤทธิ์ทำลายเชื้อโรคที่มาบุกรุกแล้ว ยังมีพิษต่อเซลล์พืชด้วย จึงต้องกำจัดออกไปด้วยเอนไซม์จำเพาะ (S-POD) ซึ่งเลือกใช้ Scp เป็น substrate ส่วนรูปที่ 9 แสดงค่า G-POD ซึ่งมียอด peak ที่ไม่สัมพันธ์กับการสังเคราะห์ Scp เพราะเอนไซม์ชนิดนี้เลือกใช้ guaiacol เป็น substrate



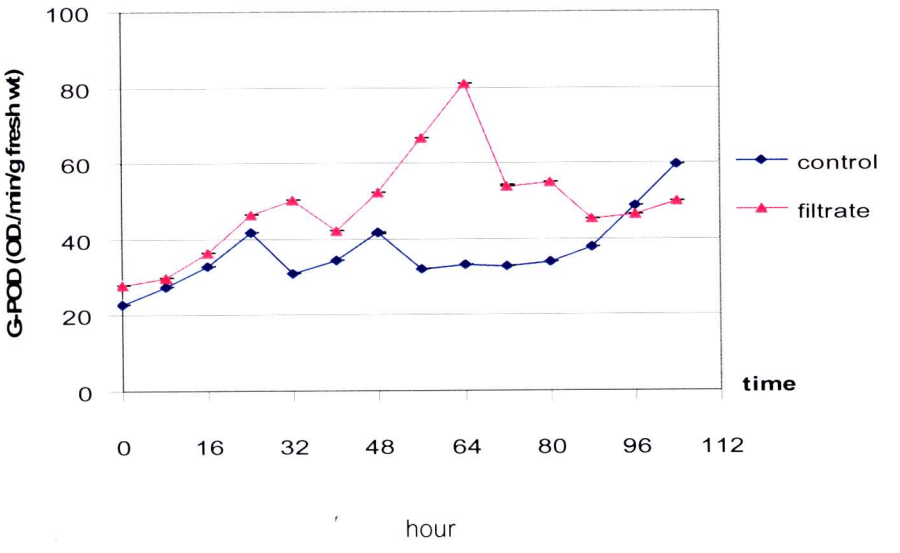
รูปที่ 6 ปริมาณข่อง Scp หลังจากเซลล์แขวนลอยยางพาราถูกกระตุ้นด้วย culture filtrate ความเข้มข้น 0.3 µg ต่อ 1 g เซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชม



รูปที่ 7 ปริมาณของโปรตีนรวมหลังจากเซลล์แขวนลอยยางพารา ถูกกระตุ้นด้วย culture filtrate ความเข้มข้น 0.3 µg ต่อ 1 g เซลล์แขวนลอยเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชม.



รูปที่ 8 ปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังจากเซลล์แขวนลอยยางพารา ถูกกระตุ้นด้วย culture filtrate เมื่อใช้ Scp เป็น substrate

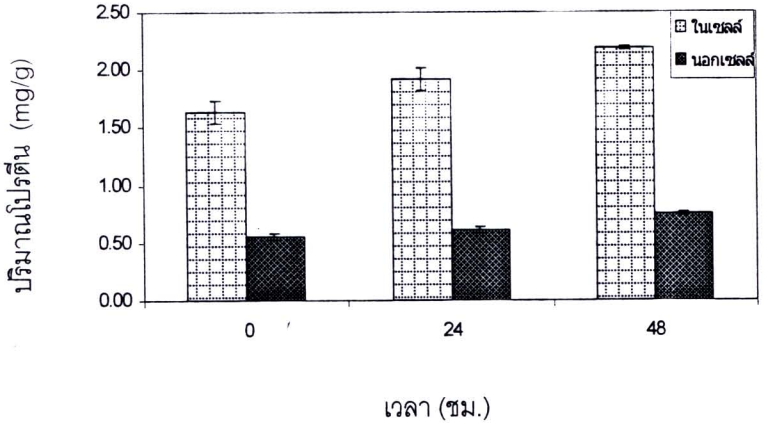


รูปที่ 9 ปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังจากเซลล์แขวนลอยยางพารา ถูกกระตุ้นด้วย culture filtrate เมื่อใช้ guaiacol เป็น substrate

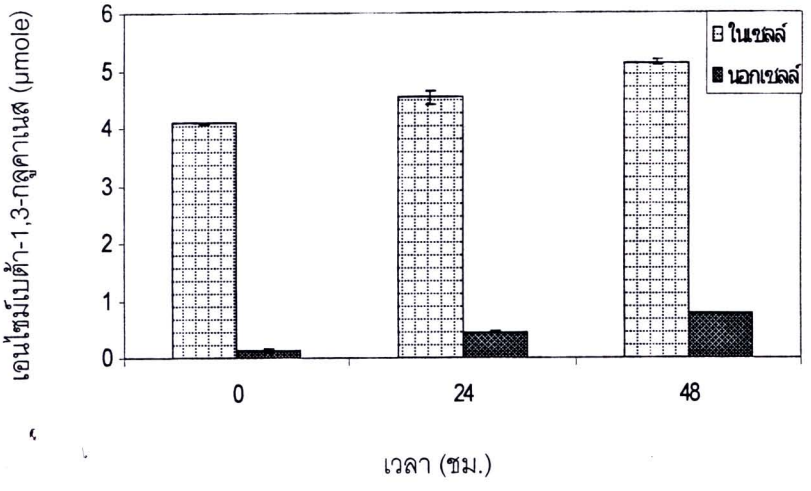
2. การสังเคราะห์ PR-proteins ในเซลล์แขวนลอยยางพารา

2.1 ผลกระทบจากการเขย่าเลี้ยงต่อการสังเคราะห์ PR-proteins

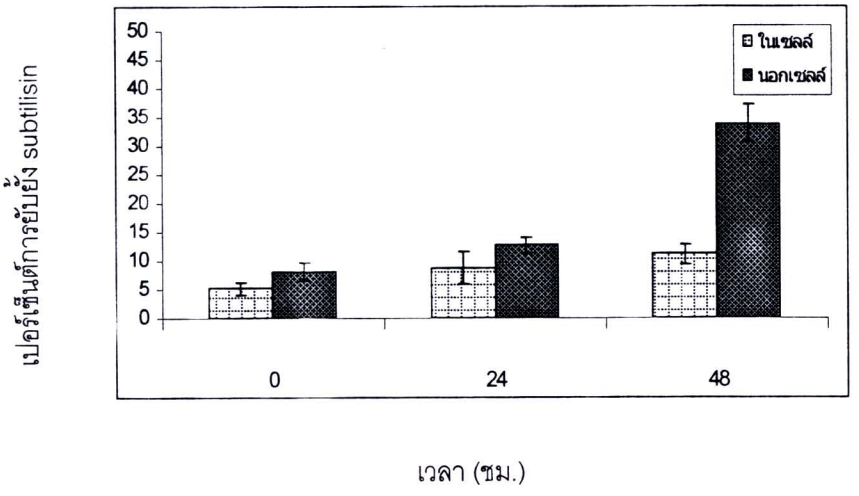
จากการศึกษาเบื้องต้นในข้อ 1 พบว่าการเขย่าเลี้ยงใน MS media เป็นเวลา 24 ชม.ทำให้มีการผลิตโปรตีนรวมในเซลล์แขวนลอยเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตั้งต้นที่ 0 ชม. แต่การปรับสภาพโดยการเขย่าเลี้ยงใน MES buffer ทำให้การผลิตโปรตีนรวมเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ผู้วิจัยจึงเลือกเขย่าเลี้ยงใน MES buffer เพื่อปรับสภาพก่อนทดสอบการกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ โดยนำเซลล์แขวนลอยอายุ 14 วัน จำนวน 2.5 g ใน 5 ml ของ MES buffer มาทดลองเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชม. หลังจากแยกตะกอนเซลล์ออกจาก MES buffer นำทั้งสองส่วนไปวัดปริมาณโปรตีนรวม (รูปที่ 10) กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (รูปที่ 11) และ แอคติวิตีของ PI (รูปที่ 12) โดยเลือกใช้ protease ชนิด subtilisin ผลการทดลอง (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ) พบว่าทั้งในส่วนของตะกอนเซลล์และใน MES buffer ที่ 48 ชม. มีการผลิตโปรตีนรวม เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ PI สูงกว่าที่ 0 และ 24 ชม. แม้ว่าจะมีการเพิ่มขึ้นของ PR-proteins ดังกล่าว แต่ระดับยังไม่สูงมากนัก จึงสามารถใช้ MES buffer ในการปรับสภาพเซลล์ก่อนการทดสอบด้วย $CuSO_4$ และเมื่อพิจารณาในส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ (ใน MES buffer) พบว่าเฉพาะ PI เท่านั้นที่มีการส่งออกมานอกเซลล์มากกว่าที่กักเก็บไว้ภายในเซลล์



รูปที่ 10 ปริมาณโปรตีนรวมภายในเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อย้ายเลี้ยงใน MES buffer ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ



รูปที่ 11 ปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสภายในเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อย้ายเลี้ยงใน MES buffer ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ

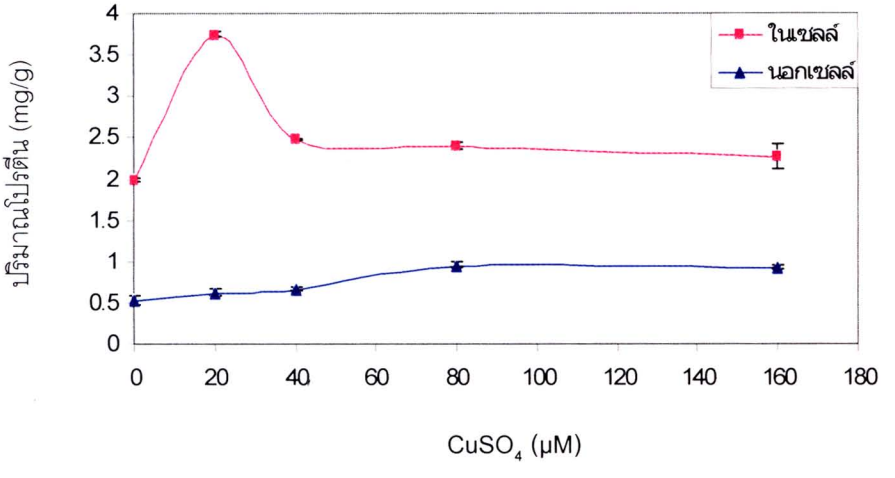


รูปที่ 12 แอคติวิตีของ PI (ต่อ subtilisin) ภายในเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อย้ายเลี้ยงใน MES buffer ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ

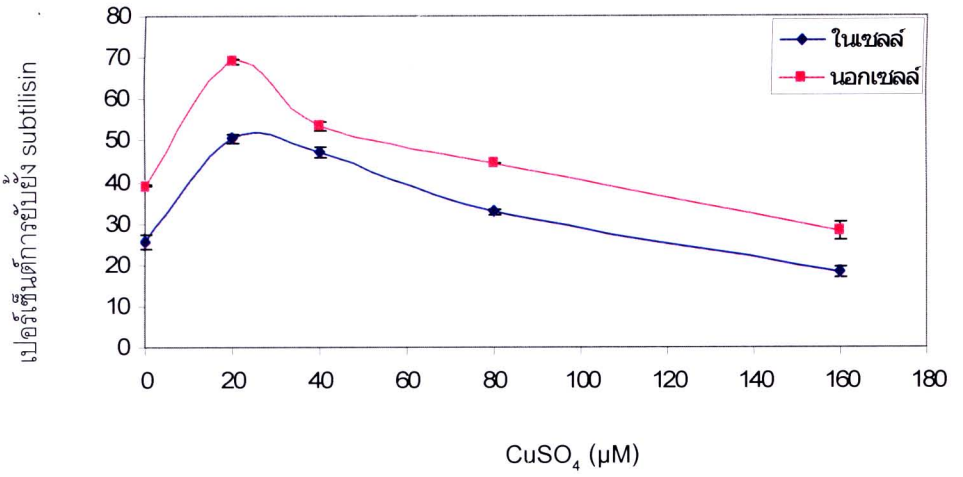
2.2 ผลของ $CuSO_4$ ต่อการสังเคราะห์โปรตีนรวมและ PI

ต่อมาผู้วิจัยได้นำเซลล์แขวนลอยอายุ 14 วัน จำนวน 2.5 g ใน 5 ml ของ MES buffer มาบ่มด้วยสารละลาย $CuSO_4$ ความเข้มข้นต่างๆ 0, 10, 20, 40 80 และ 160 µM เป็นเวลา 1 ชม. แล้วย้ายเซลล์แขวนลอยมาเลี้ยงใน MES buffer ซึ่งไม่มี $CuSO_4$ อีก 47 ชม. (รวมเป็น 48 ชม.) จากนั้นแยกตะกอนเซลล์ออกจาก MES buffer นำแต่ละส่วนไปวัดปริมาณโปรตีนรวม และแอคติวิตีของ PI ในการยับยั้ง subtilisin (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ) พบว่าความเข้มข้นของ $CuSO_4$ ที่สามารถชักนำให้เซลล์แขวนลอยมีการสังเคราะห์โปรตีนรวม และ PI เพิ่มขึ้นสูงสุด คือ 20 µM (รูปที่ 13 และ 14)

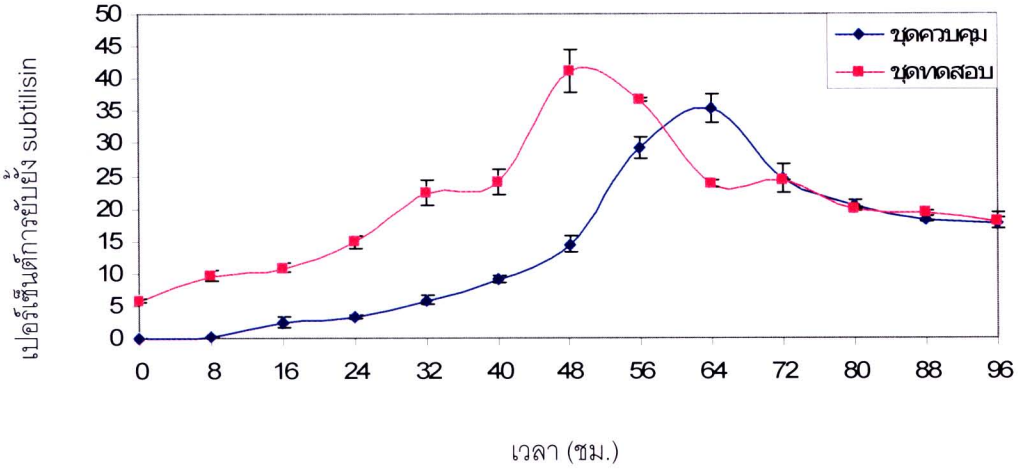
จากนั้นนำความเข้มข้นที่ได้คือ 20 µM มาศึกษาเวลาที่เหมาะสมโดยการกระตุ้นเป็นระยะเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 และ 96 ชม. แล้วเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 µM) (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ) พบว่าทั้ง PI ที่สร้างภายในเซลล์และที่ส่งออกนอกเซลล์ ให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 48 ชม.สำหรับชุดทดสอบ และสูงสุดที่เวลา 64 ชม.สำหรับชุดควบคุม (รูปที่ 15 และรูปที่ 16) แสดงว่าการเขย่าเซลล์แขวนลอย (ชุดควบคุม)



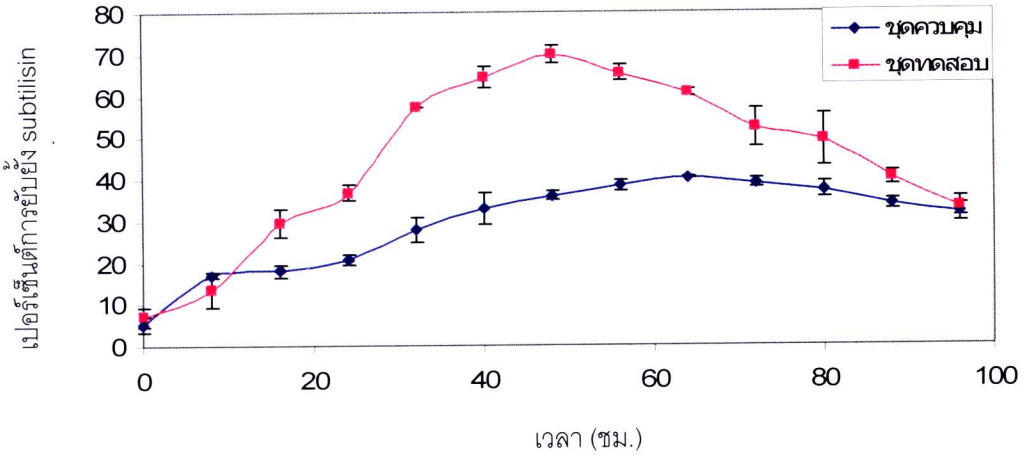
รูปที่ 13 ปริมาณโปรตีนรวมจากส่วนของตะกอนเซลล์ และส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลา 48 ชม. เมื่อกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 14 แอคติวิตีของ PI (ต่อ subtilisin) จากส่วนของตะกอนเซลล์ และส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลา 48 ชม. เมื่อกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 15 แอคติวิตีของ PI (ต่อ subtilisin) จากส่วนของตะกอนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ 20 µM ณ เวลาต่าง ๆ กัน ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุม

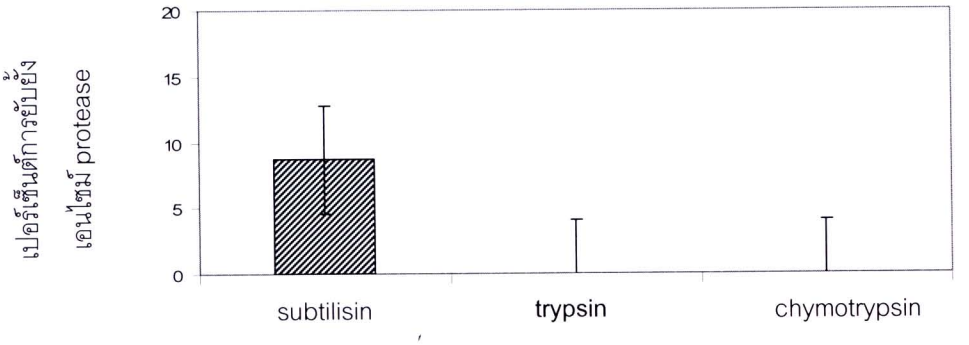


รูปที่ 16 แอคติวิตีของ PI (ต่อ subtilisin) จากส่วนที่ถูกส่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งผ่านการกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ 20 µM ณ เวลาต่างๆกัน ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุม

3. ผลการศึกษา PI ในเซลล์แขวนลอยยางพารา

3.1 ศึกษาความจำเพาะของ PI ในการเลือกจับกับเอนไซม์ protease เป้าหมาย

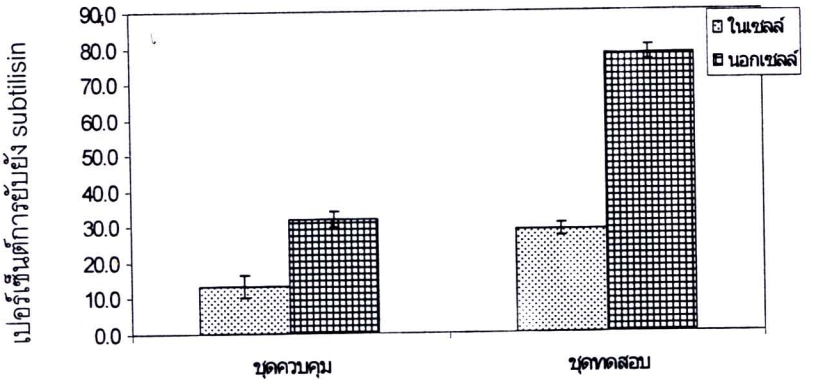
เมื่อนำเซลล์แขวนลอยยางพารา มาศึกษาความจำเพาะในการเลือกจับกับเอนไซม์ protease ชนิดต่างๆ ได้แก่ trypsin (0.4 µg), chymotrypsin (0.4 µg) และ subtilisin (0.9 µg), จำนวน µg ในวงเล็บเป็นปริมาณที่แต่ละเอนไซม์สามารถย่อย 1% azocasein (w/v) ได้ใกล้เคียงกัน และให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง O.D. ของกราฟมาตรฐาน จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยยางพารา ให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ subtilisin แต่ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 แอคติวิตีของ PI จากเซลล์แขวนลอยยางพารา ต่อเอนไซม์ protease ชนิดต่างๆ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

3.2 **การเตรียมสารตั้งต้นเพื่อใช้ในการ** purify PI

ผู้วิจัยมีความสนใจจะ purify PI ทั้งในส่วนของตะกอนเซลล์และในส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ แต่ในเบื้องต้นจะเลือก purify PI ในส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ก่อน เพราะมีแอคติวิตีสูงกว่าและมีโปรตีนรวมที่ปนเปื้อนต่ำกว่า ในการเตรียมสารตั้งต้นผู้วิจัยเลือกใช้ condition ที่ได้จากข้อ 2.2 คือทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย $CuSO_4$ 20 µM เป็นเวลา 48 ชม. พบว่าได้สารตั้งต้นที่มี PI สูงกว่าชุดควบคุมทั้งในส่วนของตะกอนเซลล์และในส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ประมาณ 2-3 เท่า (รูปที่ 18) จากนั้นนำเฉพาะส่วนที่อยู่นอกเซลล์ ไปทำบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาคุณลักษณะต่อไป



รูปที่ 18 แอคติวิตีของ PI ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากส่วนของตะกอนเซลล์และส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ เมื่อกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ 20 µM ที่เวลา 48 ชม.

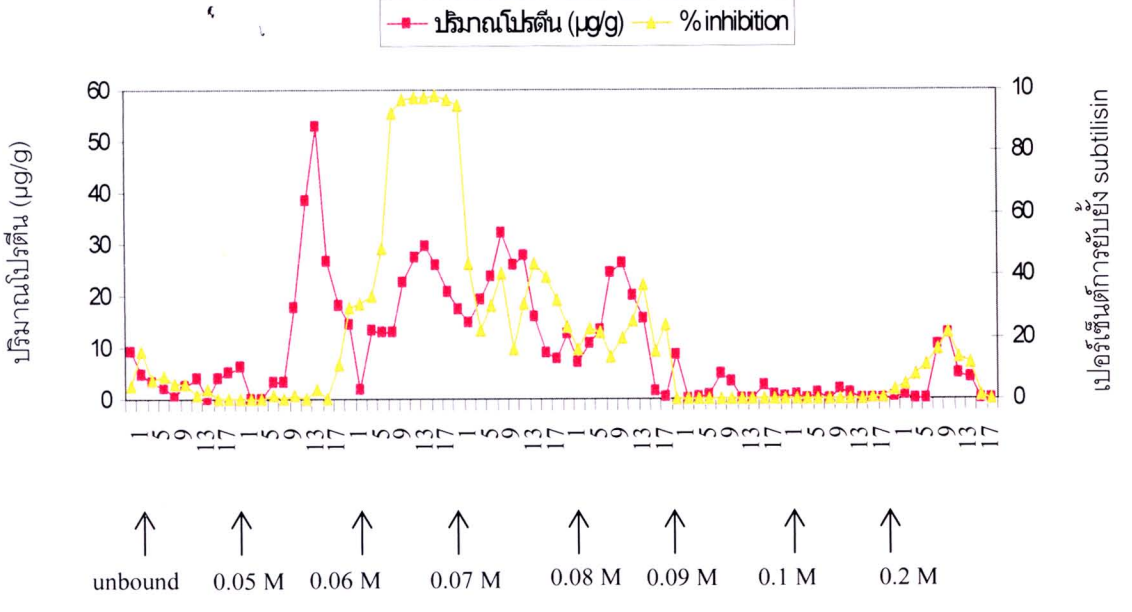
4. การทำบริสุทธิ์ PI

4.1 **ผลจากการผ่านคอลัมน์** ion exchange **แบบ** anionic

กรองเซลล์แขวนลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ 20 µM เป็นเวลา 48 ชม. นำ 400 ml ของส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์มาผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B ปริมาตรคอลัมน์ 25 ml ชะคอลัมน์ด้วยเกลือ NaCl 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 และ 0.2 M ใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 อัตราการไหล 0.5 ml ต่อนาที เก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml ตรวจพบโปรตีนที่ความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.06, 0.07, 0.08 และ 0.2 M โดยพบโปรตีนสูงสุด ที่ 0.05 M แต่พบแอคติวิตีของ PI สูงสุดที่ความเข้มข้นเกลือ 0.06 M (หลอดที่ D45-60, D หมายถึง DEAE-sepharose CL-6B) (รูปที่ 19) จึง pool สารตัวอย่างจากหลอดดังกล่าวไปทำบริสุทธิ์ต่อไป

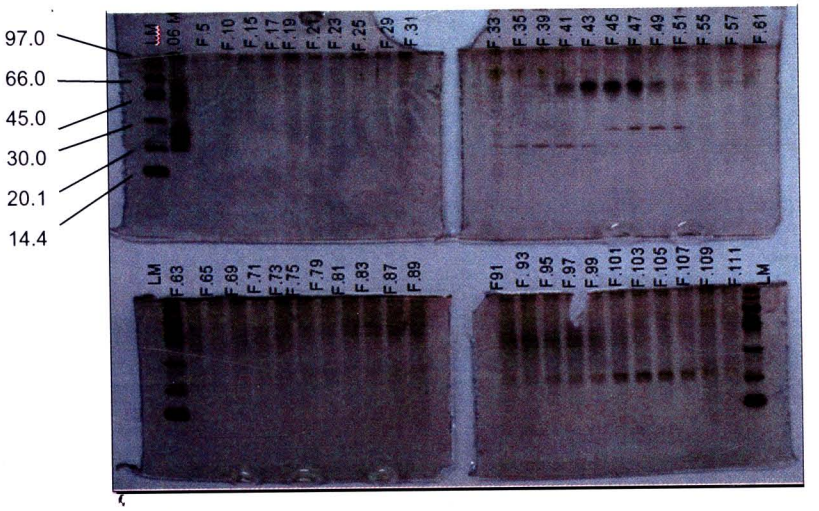
4.2 **การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี** Native-preparative gel electrophoresis

นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี ion-exchange (ตัวอย่างจากหลอดที่ D45-60) มาผ่านคอลัมน์แบบ Native-preparative gel electrophoresis ซึ่งมีความสูงของ stacking gel 2.5 ซม. และ separating gel 6 ซม. เก็บตัวอย่างโดยใช้อัตราการไหล 1 ml ต่อนาที และเก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml จากนั้นผสมตัวอย่างจากแต่ละหลอดๆละ 30 µl กับ dye 10 µl แล้ว load ลงเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบแถบโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 20

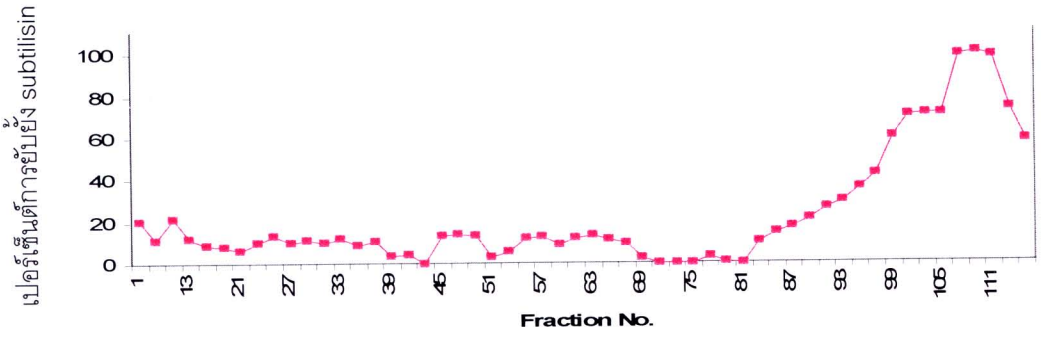


รูปที่ 19 ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของ PI หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B

เมื่อนำแต่ละ fraction ที่ผ่านการ purify ด้วยวิธี Native-preparative gel electrophoresis มาวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin พบว่าตั้งแต่หลอดที่ 91 ถึงหลอด 111 มีแอคติวิตีของ PI (รูปที่ 21) (N91-111, N หมายถึง Native-preparative gel electrophoresis) แต่ยังมีโปรตีนอื่นปะปนจึงต้องนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 20 แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Native-preparative gel electrophoresis หลังจาก load ลงเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท LM : low molecular weight ของบริษัท Amersham (14.4 - 97 KDa), F. : fraction number, 0.06 M : ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ ion-exchange และชะด้วยเกลือ 0.06 M (ตัวอย่างจากหลอดที่ D45-60)



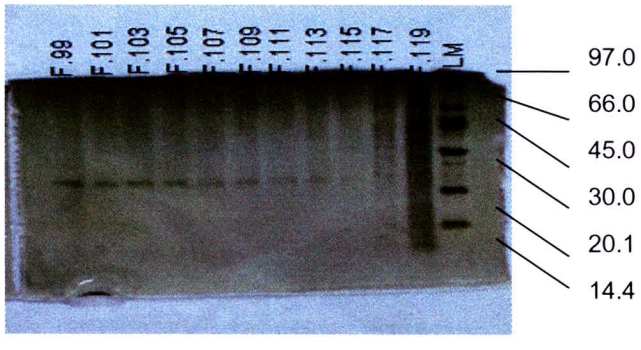
รูปที่ 21 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin จากตัวอย่างในแต่ละหลอดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แบบ Native-preparative gel electrophoresis

4.3 **การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี** SDS-preparative gel electrophoresis

นำตัวอย่างหลอดที่ N91 –111 (จากข้อ 4.2) ซึ่งให้ผลต่อการยับยั้ง subtilisin สูงมาผ่านคอลัมน์แบบ SDS-preparative gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกันกับวิธี Native-preparative gel electrophoresis จากนั้นนำตัวอย่างจากแต่ละ

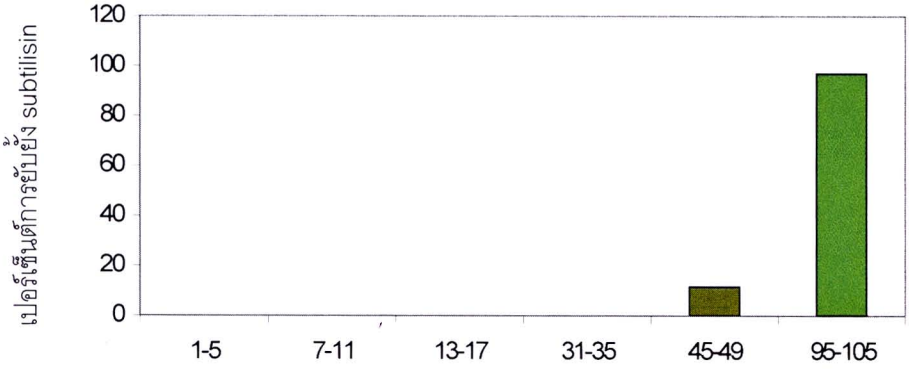
หลอด load ลงเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบแถบโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 22

สารตัวอย่างที่ได้จากการ purify ด้วยวิธีนี้มี SDS เป็นส่วนผสม ซึ่งจะรบกวนการวัดแอคติวิตีของ PI ในการกำจัด SDS ออกไป ต้อง pool รวมตัวอย่างจากแต่ละแถบโปรตีน คือหลอดที่ S1-5, S7-11, S13-17, S31-35, S45-49 และ S95-105 (S หมายถึง SDS- preparative gel electrophoresis) แล้วนำตัวอย่างที่ pool รวมกันจากแต่ละชุดมาเติม sucrose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4% จากนั้นนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน แล้วละลายกลับด้วยน้ำกลั่นและทดสอบการยับยั้ง subtilisin พบว่าตัวอย่างที่ pool รวมกันจากหลอดที่ S95-105 ให้ผลการยับยั้งสูงสุด (รูปที่ 23)



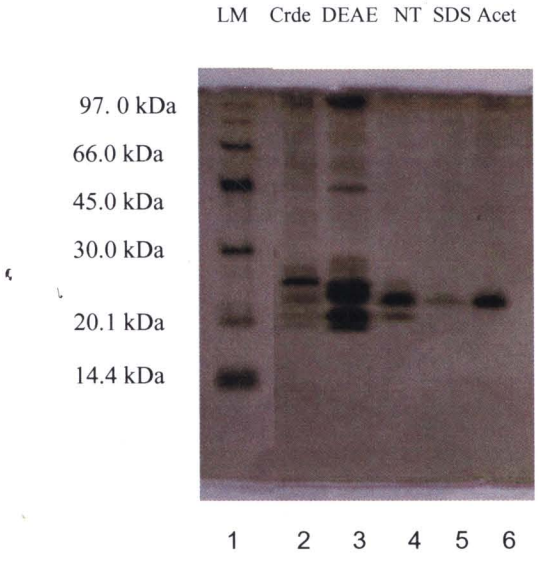
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 22 แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยวิธี SDS- preparative gel electrophoresis หลังจาก load ลงเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท LM : low molecular weight ของบริษัท Amersham (14.4 - 97 KDa)



รูปที่ 23 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin จากตัวอย่างหลอดที่ S1-5, S7-11, S13-17, S31-35, S45-49 และ S95-105 หลังผ่าน SDS-preparative gel electrophoresis

เมื่อนำโปรตีนจากแต่ละขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มาทดสอบแบบแผน โดย load ลงเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบว่าแถบโปรตีนลดลงไปในแต่ละขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์ จนเหลือแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวมีขนาดโมเลกุล 25 kDa (รูปที่ 24) คิดเป็นปริมาณโปรตีน 3.14 x 10^{-3} mg/g เซลล์แขวนลอย



รูปที่ 24 แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างแต่ละขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ หลังจากทำอิเลคโตรโฟริซิสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรทเมื่อ lane 1 : Low molecular weight ของบริษัท Amersham (14.4 - 97 kDa), lane 2 : crude extract, lane 3 : ตัวอย่างจากคอลัมน์ ion-exchange ที่ชะด้วยเกลือ 0.06 M, lane 4 : ตัวอย่างซึ่งผ่านคอลัมน์ Native-preparative gel electrophoresis, lane 5 : ตัวอย่างซึ่งผ่าน SDS-preparative gel electrophoresis และ lane 6 : ตัวอย่างจาก SDS-preparative gel electrophoresis หลังจากตกตะกอนด้วยอะซีโตน

5. การศึกษาคุณสมบัติของ PI บริสุทธิ์

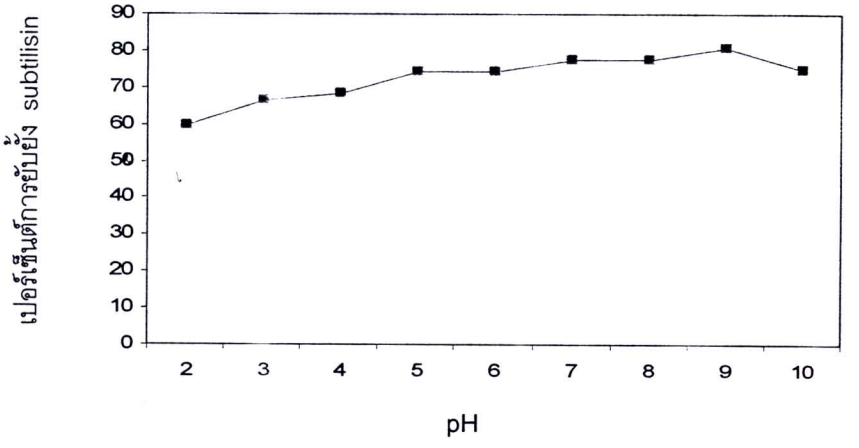
5.1 ศึกษาความคงตัวที่ pH ต่างๆ

เมื่อศึกษาความคงตัวของ PI บริสุทธิ์ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยใช้ PI ปริมาณ 0.314 µg ทดสอบยับยั้ง subtilisin พบว่า PI ค่อนข้างเสถียรทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นเบส (คงทนต่อ pH 2-10) แต่จะทำงานได้ดีกว่าในสภาวะที่เป็นเบส และทำงาน

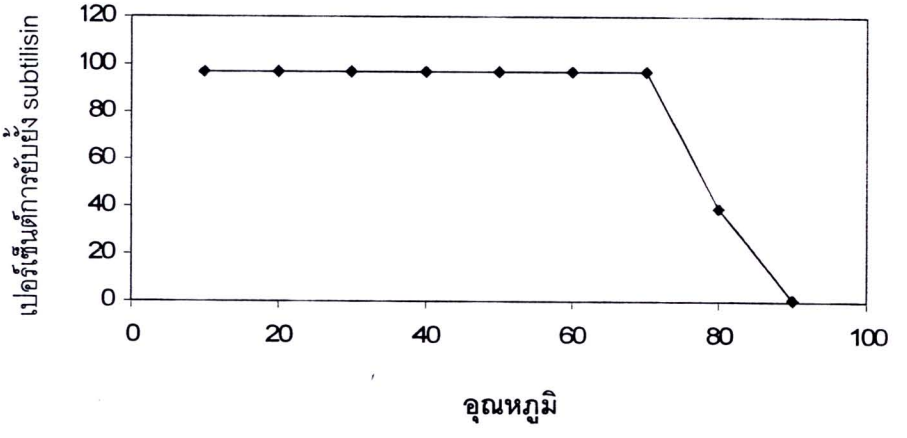
ได้สูงสุดที่ pH 9 (รูปที่ 25) แสดงว่า PI ที่ได้จากส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์แขวนลอยยางพารามีความคงทนต่อ pH และจะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส

5.2 ศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ

นำ PI บริสุทธิ์ 0.314 µg มาทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 °C พบว่า PI ที่ได้จากส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์แขวนลอยยางพาราสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70 °C (รูปที่ 26)



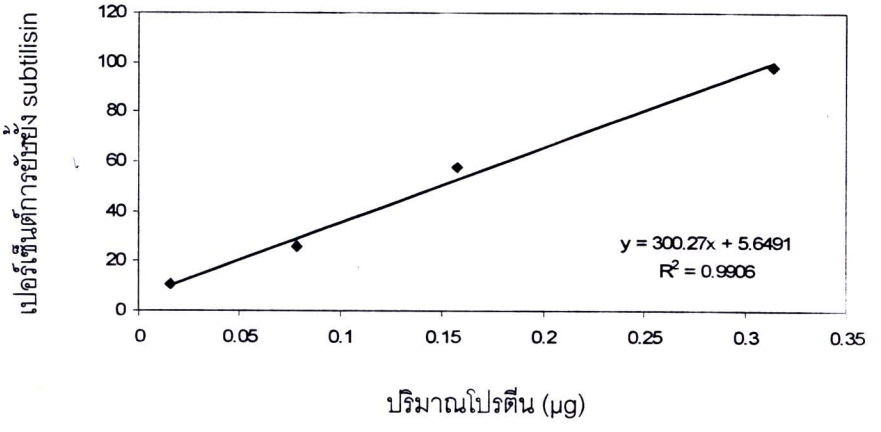
รูปที่ 25 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin ของ PI บริสุทธิ์ ที่ pH 2-10



รูปที่ 26 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin ของ PI บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 °C

5.3 การยับยั้ง subtilisin ได้เป็นครึ่งหนึ่งของการยับยั้งทั้งหมด (IC_{50})

นำ PI บริสุทธิ์มาทดสอบหาปริมาณที่สามารถยับยั้ง subtilisin ได้เป็นครึ่งหนึ่งของการยับยั้งทั้งหมด (IC_{50}) โดยใช้ PI ปริมาณต่างๆ คือ 0.0157, 0.0785, 0.157 และ 0.314 µg พบว่า PI บริสุทธิ์ 0.167 µg ใน 600 µl (หรือ 6.68 pmole ใน 600 µl) สามารถยับยั้ง subtilisin ได้เป็นครึ่งหนึ่งของการยับยั้งทั้งหมด ดังนั้นค่า IC_{50} ของ PI ที่เตรียมได้คือ 11.13 nM (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 การยับยั้ง subtilisin ด้วย PI (µg) ปริมาณต่างๆ

5.4 ผลของ PI ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora*

ผลของ PI บริสุทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* ทำการศึกษาโดยการสังเกตการงอกของซูโอสปอร์ (germination) และการยืดยาวของ mycelium รวมทั้งการยับยั้งการเจาะเข้าทำลายใบยางพารา โดยผสม PI บริสุทธิ์ 500 ng กับซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 5 x 10^4 ซูโอสปอร์/ml ในอัตราส่วน 4:1 (ปริมาตรรวม 100 µl) คิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายของ PI เท่ากับ 5 µg/ml หรือ 0.2 µM และความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อคือ 1 x 10^4 ซูโอสปอร์/ml แล้วบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชม. ก่อนนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตการเกิด germination นับจำนวนเชื้อที่งอกได้แตกต่างกันเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่น พบว่า PI มีผลยับยั้ง เพราะซูโอสปอร์ส่วนใหญ่ไม่งอกพร้อมกับพบเศษเซลล์จำนวนมากคิดเป็น 66 % ซูโอสปอร์ที่งอกได้ปานกลางคือไม่เกิน 50 µm (รูปที่ 28) คิดเป็น 31 % และมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่การงอกเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ คือมีความยาวประมาณ 50-80 µm (รูปที่ 28) คิดเป็น 3 % ในขณะที่ชุดควบคุม

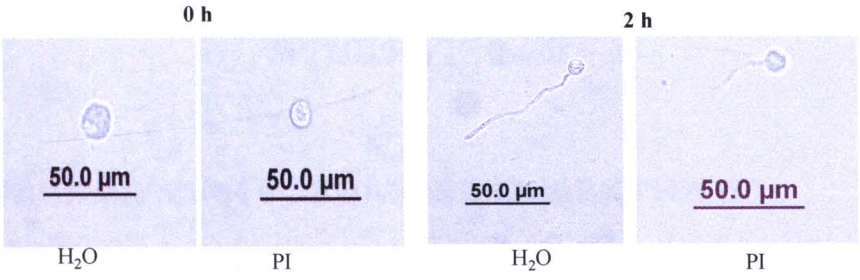
พบเศษเซลล์น้อย ซูโอสปอร์ที่ไม่งอกคิดเป็น 27 % ซูโอสปอร์ที่งอกได้ปานกลางคิดเป็น 36 % และที่การงอกของเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์คิดเป็น 37 % ดังแสดงในตารางที่ 7

การศึกษาการยืดยาวของ mycelium บนถาดอาหาร PDA พบว่า PI มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* อย่างชัดเจน (รูปที่ 29 a) ในตารางที่ 7 แม้ว่าซูโอสปอร์ในชุดทดสอบมากกว่า 30 % เกิด germination ได้ แต่เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA มีการยืดยาวของ mycelium น้อยมาก และเพื่อให้หยดซูโอสปอร์มีลักษณะกลม ผู้วิจัยจึงใช้วิธีหยดลงบนแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ดังนั้นผลการทดลองจากรูปที่ 29 a อาจทำให้เข้าใจผิดว่าในชุดที่มี PI ยังคงมีการยืดยาวของ mycelium ประมาณ 0.5 ซม. และเมื่อทดลองกับใบยางพาราพบว่าขนาดของ necrosis หรือรอยโรคก็ลดลงจนเกือบมองไม่เห็น (รูปที่ 29 b)

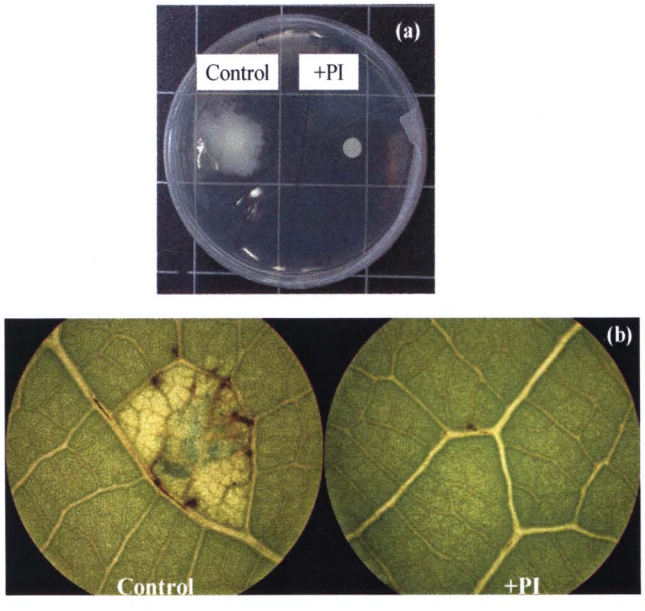
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบลักษณะการงอกของซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากบ่มด้วย PI เป็นเวลา 2 ชม.

ลักษณะของการงอก	**%การงอก**	
	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
ซูโอสปอร์ไม่งอก	27 %	66 %
ซูโอสปอร์งอกได้ปานกลาง	36 %	31 %
ซูโอสปอร์งอกได้สมบูรณ์	37 %	3 %

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง)



รูปที่ 28 แสดงการงอกของซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* เปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุม และชุดทดสอบ หลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชม. เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า



รูปที่ 29 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* เปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุม และชุดทดสอบ (a) หลังจากเลี้ยงไว้บน PDA เป็นเวลา 5 วัน (b) หลังจากวางบนใบยางพาราเป็นเวลา 2 วัน