สรุปและวิจารณ์

1. เอนไซม์เป้าหมายของ PI จากเซลล์แขวนลอยยางพารา

เชื้อก่อโรคจะผลิตเอนไซม์ protease ออกมาเพื่อจู่โจมพืช สำหรับ serine protease แบ่งออกเป็นสามกลุ่มใหญ่ๆ คือ trypsin-like, chymotrypsin-like และ subtilisin-like ในขณะเดียวกันพืชก็ผลิต PI ออกมาเพื่อเข้าไปจับและยับยั้งการทำงานของ protease นั้นๆ (Valueva and Mosolov, 2004) แม้ว่างานวิจัยชิ้นนี้ยังไม่ได้ศึกษารายละเอียดของ protease จากเชื้อ *P. palmivora* แต่ PI จากเซลล์แขวนลอยยางพารามีความจำเพาะต่อ subtilisin และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* ได้ จึงเป็นไปได้ว่าหนึ่งในเอนไซม์ protease ที่ผลิตโดยเชื้อ *P. palmivora* คือ subtilisin-like และการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* ที่ลดลง น่าจะผ่านการยับยั้ง protease ดังกล่าว

Hermosa และคณะ (2006) ตรวจพบ PI จากหัวมันฝรั่งที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin Sritanyarat และคณะ (2006) พบว่า PI จากน้ำยางพารายับยั้ง subtilisin สูงที่สุด รองลงมาคือ trypsin แต่ไม่ยับยั้ง chymotrypsin ซึ่ง PIs ดังกล่าวอาจมีบทบาทในการต่อต้าน pathogens และ herbivores เพราะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อยางพาราถูกกรีดมากขึ้น ขณะที่ Mónica และคณะ (1999) สกัดแยก cystatin (cystein proteases inhibitor) จากเมล็ดเกาลัด (chestnut) พบว่าให้ผลการยับยั้ง cystein proteases และยังสามารถยับยั้ง protease ที่มาจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ด้วย

2. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง $CuSO_4$ กับเซลล์แขวนลอยยางพารา

เมื่อนำเซลล์ไปปรับสภาพใน MES buffer ก่อนการกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ พบว่าส่วนใหญ่ของโปรตีนรวมและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสถูกกักเก็บไว้ภายในเซลล์ ในขณะที่ PI ถูกส่งออกนอกเซลล์มากกว่าการกักเก็บไว้ภายในเซลล์ แสดงว่า PI เป็นโปรตีนที่พืชใช้ในการป้องกันตนเอง แบบออกมาตั้งรับการจู่โจมของ pathogens หรือ stress ต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อม

การกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วย $CuSO_4$ ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 20, 40, 80 และ 160 µM พบว่า 20 µM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการศึกษา PI จากเซลล์แขวนลอยยางพารา เมื่อนำความเข้มข้นที่ได้คือ 20 µM มาศึกษาผลของเวลา โดยการ

กระตุ้นที่เวลาต่างๆ 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 และ 96 ชม. ทั้งตะกอนเซลล์ และส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์พบแอคติวิตีของ PI สูงสุดเมื่อบ่มทิ้งไว้ 48 ชม. ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเกิดจาก stress ของการเขย่าเพียงอย่างเดียว พบ PI แอคติวิตีสูงสุดที่เวลา 64 ชม. ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเขย่าเป็น stress แบบไม่รุนแรงจึงมีการปลดปล่อย PI ออกมาช้ากว่าการกระตุ้นด้วย $CuSO_4$

Jouili และ Ferjani (2003) ศึกษาผลของการกระตุ้นต้นทานตะวันด้วย 50 µM $CuSO_4$ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า $CuSO_4$ ส่งผลให้ระดับเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกของ phenylpropanoid pathway มีปริมาณเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดสด้วย

3. การทำบริสุทธิ์ PI

ผู้วิจัยพบว่าการตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วยอะซิโตนจะได้แอคติวิตีของ PI สูงที่สุดในช่วงความเข้มข้น 70-90% ขณะที่การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 40-60% ให้แอคติวิตีของ PI สูงที่สุด การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตยังมีแถบโปรตีนปนเปื้อนมากกว่าการตกตะกอนด้วยอะซิโตน (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) แต่ อะซิโตนทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติค่อนข้างมาก เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ตัวอย่างจากส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ เพราะมีโปรตีนปนเปื้อนในปริมาณต่ำแต่มีแอคติวิตีของ PI ค่อนข้างสูงมาศึกษาการทำบริสุทธิ์ต่อไป โดยนำตัวอย่างส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์หลังกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ 20 µM เป็นเวลา 48 ชม. มาลงคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B โดยไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนหรือเกลือแอมโม เนียมซัลเฟต ตรวจพบแอคติวิตีของ PI เมื่อชะด้วยเกลือความเข้มข้น 0.06 M (ตัวอย่างจากหลอดที่ D45-60) เมื่อ pool มาทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Native-preparative gel electro-phoresis และวิธี SDS-preparative gel electrophoresis พบว่าหลอดที่ N91-111 และ S95-105 มีแอคติวิตีของ PI ตามลำดับ หลังจากแยกด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE ในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์ (มี 2-mercaptoethanol) และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งมีขนาดโมเลกุล 25 kDa คิดเป็นปริมาณโปรตีน 3.14×10^{-3} mg/g เซลล์แขวนลอย ดังนั้น PI ที่เตรียมได้เป็นโปรตีนซึ่งไม่มีหน่วยย่อยที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และเมื่อเปรียบเทียบกับชื่อเรื่องของโครงการวิจัย ผู้วิจัยสามารถเตรียม PI ได้บริสุทธิ์กว่าที่คาดไว้

Thomas และคณะ (1982) สกัดและทำบริสุทธิ์ PI จากใบมันฝรั่ง (*Lycopersicon esculentum* Mill) ที่ถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผล เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography และวิธี isoelectric focusing พบว่า PI ให้ผลการยับยั้ง chymotrypsin และ trypsin แต่ยับยั้ง trypsin ได้สูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งของ PI ระหว่างชุดทดลอง (ใบที่ถูกกระตุ้นให้เกิดบาดแผล) และชุดควบคุม (ใบที่ไม่ถูกกระตุ้น) พบว่า PI จากชุดทดลองให้ผลการยับยั้งสูงกว่าชุดควบคุม นั่นคือเมื่อพืชได้รับการกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผลส่งผลให้พืชผลิตโปรตีนต่างๆ รวมทั้ง PI เพิ่มขึ้นเพื่อใช้กำจัดสิ่งแปลกปลอม

Sritanyarat และคณะ (2006) สกัดแยก PI จาก C-serum ของน้ำยางพันธุ์ RRIM600 HPI-1, HPI-2a และ HPI-2b มีขนาดโมเลกุล 14,893 ± 10, 7757 ± 5, และ 7565 ± 5 Da ตามลำดับ HPI-1 ที่มีขนาด 14,893 ± 10 Da เมื่อทดสอบด้วยวิธี Tricine-SDS–PAGE ในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์ พบหน่วยย่อยขนาด 7 kDa ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ โดย PIs ที่แยกได้ยับยั้งทั้ง trypsin และ subtilisin แต่สามารถยับยั้ง subtilisin ได้สูงกว่า และไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง chymotrypsin

4. การศึกษาคุณสมบัติของ PI

เมื่อศึกษาความคงตัวของ PI บริสุทธิ์ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 พบว่าค่อนข้างเสถียรทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นเบส (คงทนต่อ pH 2-10) แต่จะทำงานได้ดีกว่าในสภาวะที่เป็นเบส และทำงานได้สูงสุดที่ pH 9 และเมื่อทดสอบความคงตัวของ PI ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C พบว่า PI บริสุทธิ์สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C

Seidl และคณะ (1978) ศึกษาความคงตัวของ subtilisin inhibitor (SI) ที่ทำบริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วดำ พบว่า SI ที่ได้มีขนาดโมเลกุล 10 kDa ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 90°C และทำงานได้ดีในช่วง pH 7-11 Mallikarjuna Rao และคณะ (1983) สกัดแยก PI จากหัว arrow root (*Maranta arundinaceae*) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้ง trypsin, chymotrypsin, enterokinase และ protease ที่เตรียมจากตับอ่อน พบว่ามีขนาด 12 kDa สามารถทนความร้อนได้ถึง 100 °C เป็นเวลา 60 นาที และคงทนต่อ pH ในช่วงกว้าง (pH 1.0-12.5)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

5. PI ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora*

เมื่อนำ PI บริสุทธิ์ 500 ng ผสมกับซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 5 x 10^4 ซูโอสปอร์/ml ในอัตราส่วน 4 : 1 คิดเป็นความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 µM พบการแตกของเซลล์จำนวนมากจึงเป็นไปได้ว่า PI ไปมีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อ *P. palmivora* และพบว่า PI มีผลยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์ คือในชุดทดสอบมีซูโอสปอร์ที่สามารถงอกได้ทั้งสมบูรณ์และไม่สมบูรณ์รวม 34% ในขณะที่ชุดควบคุมมีการงอกของซูโอสปอร์รวม 73% แม้ว่าซูโอสปอร์ในชุดทดสอบมากกว่า 30 % เกิด germination ได้ แต่เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA มีการยืดยาวของ mycelium น้อยมาก และขนาดของ necrosis หรือรอยโรคบนใบยางพาราก็ลดลงจนเกือบมองไม่เห็น ดังนั้นซูโอสปอร์มากกว่า 30 % ที่เกิด germination ได้อาจไม่มีความสมบูรณ์เพียงพอต่อการเจาะเข้าทำลายพืช หรือต้องใช้เวลานานขึ้น จนรวดเร็วไม่เพียงพอกับเวลาที่พืชสร้างเอนไซม์ต่างๆออกมาปกป้องตนเอง

Wang, S. และคณะ (2006) purify PI จากถั่วงอก พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านทั้งเชื้อรา, เชื้อแบคทีเรีย และเซลล์มะเร็ง โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ถึง 6 ชนิดได้แก่ *Physalospora piricola, Mycosphaerella arachidicola, Botrytis cinerea, Pythium aphanidermatum, Sclerotium rolfsii* และ *Fusarium oxysporum* ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ยับยั้งคือ *Staphylococcus aureus* โดยมีปริมาณของ PI ที่ให้ผลยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้เป็นครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) คือ 6.2 µM ส่วนความเข้มข้นที่ให้ผลการยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* คือ 0.23 µM และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโครงสร้างของเชื้อราด้วยวิธี Light microscopy พบการรั่วของผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งส่งผลให้เกิดการไหลของไซโตพลาสม

PI บริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากเซลล์แขวนลอยยางพารา เลือกจับ protease เป้าหมายชนิด subtilisin-like มีขนาดโมเลกุล 25 kDa และมีความคงทนต่อ pH และอุณหภูมิ รวมทั้งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* จากคุณลักษณะดังกล่าวทำให้มีความใกล้เคียงกับ PI ในกลุ่ม Kunitz และ Potato type I จึงมีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูงที่ PI จะจัดอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งในสองกลุ่มนี้ ทั้งนี้เพื่อการระบุผลที่แน่นอน ควรนำ PI ที่ได้ไปทดสอบหาลำดับกรดอะมิโนแล้วเทียบกับฐานข้อมูล เพื่อการระบุชนิดที่แน่นอนต่อไป