Agricultural Sci. J. 37 : 5 (Suppl.) : 30-33 (2006) ว. วิทย. กษ. 37 : 5 (พิเศษ) : 30-33 (2549)

การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนของผลลำไยพันธุ์ดอหลังได้รับโอโซน โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟรีซีส

Protein patterns changes of longan fruit cv. “Daw” after ozonation by SDS-PAGE Method

ศรัณยา เพ่งผล[1] กานดา หวังชัย[2] และ พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์[2]

Sarunya Pengphol[1], Kanda Whangchai[2] and Pheravut Wongsawad[2]

Abstract

To study the protein patterns changes from the peel of longan fruit cv. “Daw” after ozone fumigation compared with sulfurdioxide (SO_2) fumigation and control then stored at 5 °C for 2 weeks. The soluble proteins were extracted with Tris-HCl buffer 0.5 M pH 7.5 and SDS 1.5% (w/v) and determined by 10% SDS-PAGE. The result showed that the number of bands and band intensity of longan fruit treated with both SO_2 fumigation and control were different between before and after storage. There showed 11 bands that identified by the Gel Logic 100 imaging system from all treatments on the first day of storage at molecular weight 468.5, 382.0, 301.7, 224.7, 129.0, 65.7, 60.3, 49.9, 24.4, 17.2 and 11.5 kDa. On the second week of storage, the protein bands at molecular weight 60.3, 49.9, 22.4, 17.2 and 11.5 kDa were not presented in the SO_2 treatment and control. However there were not showed any changes of the number protein bands of longan peel with ozone treatment after storage.

Key words : proteins, longan, ozone

บทคัดย่อ

การศึกษารูปแบบของโปรตีนจากเปลือกผลลำไยพันธุ์ดอหลังจากการรมด้วยโอโซน โดยเปรียบเทียบกับการรมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และ ชุดควบคุมแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยการสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ที่มี SDS 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายอยู่ แล้วแยกโปรตีนที่สกัดได้โดยวิธี เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนด้วยเครื่อง Gel Logic 100 imaging system จากการทดลอง พบว่า ในวันเริ่มต้นของการเก็บรักษามีแถบโปรตีนที่เห็นได้ชัดเจน 11 แถบ ของทุกชุดการทดลองโดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 468.5, 382.0, 301.7, 224.7, 129.0, 65.7, 60.3, 49.9, 24.4, 17.2 และ 11.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จำนวนแถบของโปรตีนของชุดการทดลองที่ไม่ได้รม (ชุดควบคุม) และ ที่รมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ลดลง โดยจะไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60.3, 49.9, 22.4, 17.2 และ 11.5 กิโลดาลตัน ในขณะที่การรมด้วยโอโซน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะและจำนวนแถบโปรตีนมากนักหลังการเก็บรักษา

คำสำคัญ โปรตีน ลำไย โอโซน

คำนำ

เนื่องจากปัญหาสำคัญในการส่งออกลำไยคือมีอายุการเก็บรักษาสั้นมาก จึงมีการรมผลลำไยด้วยก๊าซ SO_2 ซึ่งก๊าซนี้มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และยังเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการฟอกสี และการใช้โอโซนในการควบคุมโรคเน่าและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลลำไยให้นานขึ้น เมื่อพืชได้รับความเครียดบางอย่าง ทำให้พืชสามารถปรับกลไกป้องกันตนเอง โดยการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่าง ๆ เช่นผลลำไยมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนเมื่อได้รับความร้อน (ศิริโสภา, 2546) โดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่าง ๆ คุณภาพของผลลำไย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนของผลลำไยหลังจากรมด้วยก๊าซโอโซนระหว่างการเก็บรักษาซึ่งงานวิจัยทางด้านนี้ยังมีการศึกษา

[1] สาขาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[1] Postharvest Technology Institute, Chiangmai University, Chiang Mai 50200

[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[2] Department of Biology, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiang Mai 50200

น้อยมากในพืชหลังการเก็บเกี่ยว ข้อมูลที่ได้นี้เพื่อนำโอโซนมาใช้ในการทดแทนการรมด้วยก๊าซ SO_2 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการยับยั้งหรือลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนผลลำไย รวมทั้งทำให้คุณภาพของลำไยเป็นที่ยอมรับเพื่อการส่งออกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำเปลือกลำไยมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งให้ได้น้ำหนักตัวอย่างละ 3 กรัม มาบดร่วมกับ extraction buffer SDS 1.5% (W/V), β-mercaptoethanol 10% (W/V), Tris-HCl, pH 7.5, (0.5 M) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ในโกร่งที่แช่ไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C โดยบดร่วมกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที รินเอาเฉพาะส่วนที่ใสเก็บไว้ในหลอด Eppendorf แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 °C สำหรับใช้ทดสอบในลำดับต่อไป

โปรตีนที่ละลายได้ในเปลือกผลลำไยพันธุ์ดอถูกนำมาหารูปแบบของแถบโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE ที่มีความเข้มข้นของ acrylamine เท่ากับ 10 % ระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองคือ สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.0083 โมลาห์ พีเอช 8.3 ที่มีไกลซีน 0.192 โมลาห์ และ SDS 0.1 % (Laemmli, 1970X ซึ่งสามารถสังเกตแถบของโปรตีนที่แยกได้แต่ละแถบจากแถบสีน้ำเงินที่เกิดจากการย้อมสีของโปรตีนโดยใช้สารละลาย coomassie brilliant blue R- 250 ความเข้มข้น 0.1 % ที่มี methanol 50 % และ acetic acid 10 % และนำแผ่นเจลจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีนไปถ่ายภาพ และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้เครื่อง Gel Logic 100 imaging system

ผลและวิจารณ์

เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละแถบด้วยเครื่อง Gel Logic 100 imaging system พบว่า มีแถบของโปรตีนที่เห็นได้ชัดเจน 6 แถบเหมือนกันในทุกกรรมวิธี ซึ่งเมื่อนำไปหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในวันที่ 0 พบว่ามีแถบโปรตีนทั้งหมด 11 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 11.5 - 468.5 กิโลดาลตัน และเมื่อเก็บรักษานาน 2 สัปดาห์ ทุกกรรมวิธี พบว่า มีจำนวนแถบโปรตีน 10 แถบ โดยมีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลที่เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนในวันที่ 0 สำหรับการรมด้วยอากาศ ที่เก็บรักษานาน 2 สัปดาห์นั้นมีจำนวนแถบโปรตีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ได้รม) และชุดการทดลองที่รมโอโซน พบว่ามีจำนวนแถบโปรตีน 12 แถบ โดยมีจำนวนแถบโปรตีนไม่เปลี่ยนแปลงมากนักทั้งลักษณะและจำนวนแถบโปรตีน (Figure 1 and Table 1) ซึ่งโอโซนที่ใช้เวลาในการรมนาน 60 นาที อาจจะไม่ได้ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่บริเวณเปลือก แต่โอโซนมีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนเปลือกผลเท่านั้น (Whangchai *et al.,* 2005) สำหรับชุดการทดลองที่รมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์หลังการเก็บรักษานาน 2 สัปดาห์นั้น พบว่ามีจำนวนแถบโปรตีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในวันเริ่มต้นเช่นเดียวกันการศึกษาของ ศิริโสภา (2546) พบว่าการใช้ความร้อนมีผลทำให้แถบโปรตีนในเปลือกลำไยน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 วัน พบจำนวนแถบโปรตีน 18 แถบ ไม่เปลี่ยนแปลงในทุกกรรมวิธี ส่วนการศึกษาของ Sabehat และคณะ (1996) ที่รายงานว่าผลมะเขือเทศที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง มีการสังเคราะห์ Heat Shock Proteins (HSPs) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 18 - 21 กิโลดาลตัน และพบว่าผลมะเขือเทศที่ได้รับอุณหภูมิดังกล่าวแสดงอาการสะท้านหนาวน้อยกว่าผลมะเขือเทศชุดควบคุม จึงเชื่อว่า HSPs ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เหมือน molecular chaperone ที่จับกับโปรตีนที่เสียสภาพเนื่องจากสภาพเครียดต่าง ๆ แล้วทำให้เกิดการรวมตัวสร้างเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์อีกครั้ง เช่นเดียวกับ Woolf *et al.,* (1995) รายงานว่าผลสาลี่ที่ได้รับอุณหภูมิสูงจะมีการสังเคราะห์ Heat shock Proteins (HSPs) ลดลงโดยไปทำให้ mRNA เกิดการสลายตัว ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลง ส่วนวีรพล (2546) ทำการศึกษาแถบโปรตีนในการแช่มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียสนาน 30, 45, 60 และ 75 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า มีแถบโปรตีนที่เห็นชัดเจนจำนวน 36 แถบในทุกกรรมวิธี แต่ผลมะม่วงที่แช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 60 และ 75 นาที มีแถบโปรตีนหลักน้อยกว่าชุดควบคุม 1 แถบ และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 วัน ไม่พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16.06 - 16.36 กิโลดาลตัน ในทุกกรรมวิธี ซึ่งคาดว่าการได้รับอุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้เกิดการสลายตัวหรือเปลี่ยนรูปของโปรตีนบางชนิด (Ferguson *et al.,* 1994)

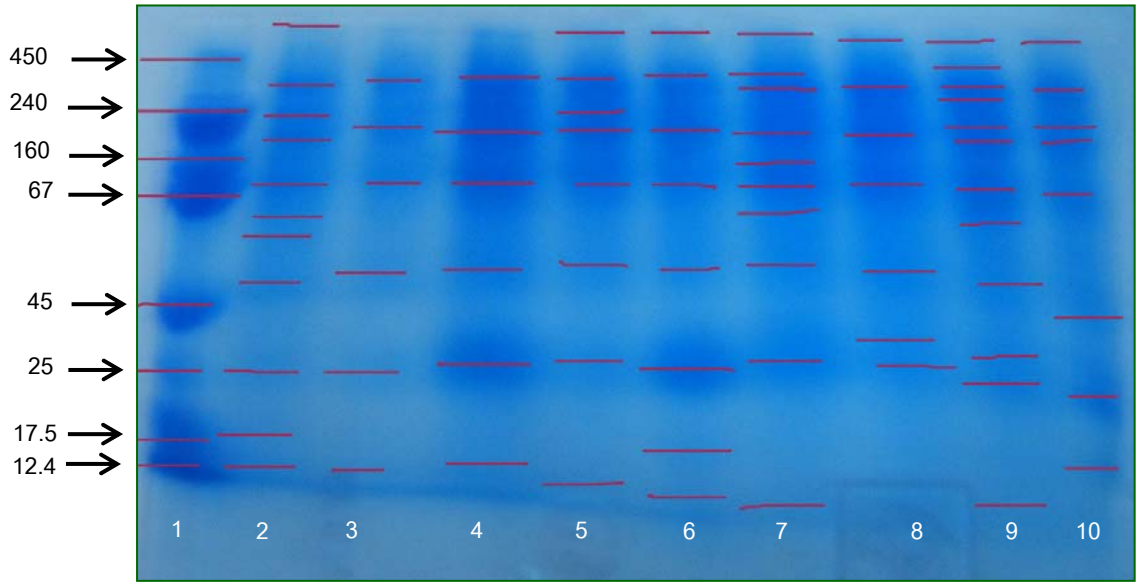

Figure 1 Each bands of protein which coomassie brilliant blue R-250 by SDS-PAGE from peel of longan fruit treated with gaseous ozone for 60 minuets compared with control, control (gas) and longan fruit treated with SO_2 fumigation and keep at 5 °C for 2 weeks.

No. 1 was standard of protein patterns
No. 2 was untreated at 0 day
No. 3 was untreated at 1 week
No. 4 was treated with gas fumigation at 1 week
No. 5 was treated with O_3 fumigation at 1 week
No. 6 was treated with SO_2 fumigation at 1 week
No. 7 was untreated at 2 weeks
No. 8 was treated with gas fumigation at 2 weeks
No. 9 was treated with O_3 fumigation at 2 weeks
No.10 was treated with SO_2 fumigation at 2 weeks

Table 1 Analysis of molecular weight by Gel Logic 100 imaging system showed major protein bands from peel of longan fruit treated with gaseous ozone for 60 minuets compared with control, control (gas) and longan fruit treated with SO_2 fumigation and keep at 5 ° C for 2 weeks.

Band	Prot.	0 day	1 week				2 weeks			
			Cont.	Cont. (gas)	O_3	SO_2	Cont.	Cont. (gas)	O_3	SO_2
	MW (kDa)	MW (kDa)	MW (kDa)	MW (kDa)	MW (kDa)	MW (kDa)	MW (kDa)	MW (kDa)	MW (kDa)	MW (kDa)
1	450	468.5	382.1	474.7	517.9	369.7	505.6	468.5	505.6	511.8
2	240	382.1	236.2	357.4	474.7	224.8	474.7	357.4	474.7	345
3	160	301.8	135.2	104.2	375.9	129	369.7	224.8	425.3	201.9
4	67	224.8	49.9	52.1	228.6	52.5	224.8	91.8	351.2	65.8
5	45	129	25	27.8	110.4	25.7	98	50.8	224.8	55.4
6	25	65.7	10	10	52.1	13.8	51.6	24.2	198.1	44.3
7	17.8	60.3			25.7	5.7	37.4	5.1	67	20
8	12.4	49.9			7.8		24.7		47.9	11.3
9		24.4					14.8		27.8	
10		17.3					5.9		21.7	
11		11.6							12.4	
12									3.8	

สรุป

การเปลี่ยนแปลงแถบโปรตีนของเปลือกผลลำไยไม่พบความแตกต่างมากนัก ทั้งก่อนและหลังการรมด้วยโอโซนเมื่อการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่แถบของโปรตีนของชุดที่ไม่ได้รม และที่รมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีจำนวนลดลง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

วีรพล โพธิ์สว่าง. 2546. ผลของการใช้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนระหว่างการเกิดอาการสะท้านหนาวของผล มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 190 หน้า.

ศิริโสภา อินขะ. 2546. ผลของการใช้ความร้อนต่อโปรตีนในเปลือกผลลำไยระหว่างการสะท้านหนาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 135 หน้า.

Ferguson, I.B., S. Lurie and J.H. Bowen. 1994. Protien synthesis and breakdown during heat shock of cultured pear (*Pyrus comunis* L.) cells. Plant Physiol. 104 : 1429 – 1437.

Sabehat, A., D. Weiss and S. Lurie. 1996. The correlation between heat-shock protein accumulation, persistence and chilling tolerance in tomato fruit. Plant Physiol. 110 : 531 – 537.

Whangchai, K., K. Saengnil, and J. Uthaibutra. 2005. Control of postharvest disease in longan fruit by ozone. Paper Presented at the 5th International Symposium. 6-11 June 2004. Verona. Italy. 109 pp.

Woolf , B.A., C.B. W atkins, J.H. Bowan, M. Lay-Yee, J.H. Maindonald and J.B. Ferguson. 1995. Reducing external chilling injury in stored 'Hass' avocados with dry heat treatments. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120 (6) : 1050 – 1056.