การตรวจหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในผลเงาะ

สมบัติ คงวิทยา[1] อริสรา อรกุล[4] เบญจวรรณ ช่อชู[4] ปณิตา วงษ์คำ[4] ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ[2] สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ[2,3] และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ[3,4*]

[1] กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพฯ 10400

[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110

[3] หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110

[4] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110

*E-mail : surasakl@swu.ac.th

รับบทความ: 12 มีนาคม 2553 ยอมรับตีพิมพ์: 12 พฤษภาคม 2553

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาแหล่งที่ให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในผลเงาะ ได้แก่ เปลือก เนื้อ และเมล็ด โดยการนำตัวอย่างสกัดเอนไซม์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7.0 และติดตามแอคทิวิตีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสด้วย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน ฟีนอล และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ทุกส่วนของผลเงาะมีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส สารสกัดหยาบจากเมล็ดให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุดเท่ากับ 234.52 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามด้วยส่วนของเปลือกและเนื้อ ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุดเท่ากับ 206.37 และ 148.26 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากเงาะทั้ง 3 ส่วน หาค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดส พบว่า พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมของส่วนเมล็ด เท่ากับ 8.5 และ 45°ซ ส่วนเนื้อ เท่ากับ 8.5 และ 45°ซ และส่วนเปลือก 5.5 และ 45°ซ ตามลำดับ จากผลการศึกษาอธิบายได้ว่าทุกส่วนของเงาะมีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสและมีสมบัติแตกต่างกัน

คำสำคัญ: เพอร์ออกซิเดส เงาะ อุณหภูมิ และพีเอชเหมาะสม

Detection of Peroxidase from Rambutan Fruit

Sombat Kongwithtaya[1] Arisara Orakul[4] Benjawan Chochu[4] Panita Wongcom[4] Chaiyasad Kachensuwan[2] Somkiat Phornphisutthimas[2,3] and Surasak Laloknam[3,4*]

[1] Department of Science Service, Ministry of Science and Technology, Bangkok 10400, Thailand

[2] Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

[3] Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

[4] Department of General Science, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

*E-mail : surasakl@swu.ac.th

Abstract

This research aimed to detect the peroxidase sources from rambutan fruit part, peel, white edible flesh, and seed. The samples were extracted by using phosphate buffer, pH. 7.0. The extracts were measured the peroxidase activity using a mixture of 4-aminoantipyrine, phenol and hydrogen peroxide and incubated at 30°C for 10 minutes. The result showed that all crude extracts from rambutan fruit had the peroxidase activity. The seed crude extract showed the highest peroxidase activity, 234.52 units/mg protein. The white edible flesh and peel crude extracts had peroxidase activity as 206.37 and 148.26 units/mg protein, respectively. The optimum temperature and pH of all crude extracts were also determined. The optimum pH and temperature of peroxidase of crude extracts from seed were 8.5 and 45°C, from white edible flesh were 8.5 and 45°C, and from peel were 8.5 and 45°C, respectively. These results suggested that all parts of rambutant fruit had peroxidase activity, but the kinds of peroxidase are different.

Keywords: Peroxidase, Rambutan, Optimum temperature, Optimum pH

บทนำ

เพอร์ออกซิเดส (Peroxidases) (E.C.1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการสลายซับสเทรตโดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น ใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (ชื่นสุมณ ยิ้มถิ่น, 2548) และออกซิไดส์ซับสเทรตที่ให้อิเล็กตรอน ได้แก่ ฟีนอล อะโรมาติกเอมีน และกรดแอสคอร์บิก (Vernwal et al., 2006) เพอร์ออกซิเดสแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ (1) prokaryote peroxidase (2) secretory fungal peroxidase และ (3) secretory plant peroxidase (O'Brien, 2000) ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเพอร์ออกซิเดส เพอร์ออกซิเดสพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่น แบคทีเรีย สัตว์ และพืช (Cavalier-Smith, 2004; Dunford, 1999; Kim and Yoo, 1996; Habetha and Bosch, 2005; Yamada et al., 1987; Welinder, 1992; Zamocky, 2004)

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่พบในพืช เช่น ตำลึง มะเขือ-เทศ ผักกาดขาว แตงกวา บร็อกคอลี่ มะเขือเปาะ แครอท ผักบุ้ง ฟักทอง ถั่วฝักยาว กะหล่ำปลี มันสำปะหลัง และยางพารา (ชะอรทิพย์ แย้มด้วง และคณะ, 2553; ฐากรณ์ สอนวัฒนา, 2544; พัชรากร รัตนภูมี, 2542; Kongvitthaya et al., 2010) เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้มาจากรากพืชที่มีหัวใต้ดินฮอร์สเรดิช (horseradish root tuber) (Saitou et al., 1991; linder, 1992; Dunford, 1999)

สำหรับประเทศไทยเอนไซม์ชนิดนี้ยังมีการนำเข้าจากต่างประเทศจึงทำให้เสียค่าใช้จ่ายของต้นทุนการผลิตสูง เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ ด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ อาหาร เภสัชกรรม และสิ่งแวดล้อม ประโยชน์ทางด้านอาหาร เครื่องดื่ม เภสัชกรรม ใช้ในการกำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งบางชนิด รวมทั้งการบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบฟีนอล และการตรวจหา

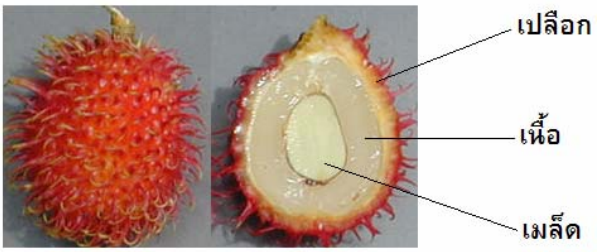
สารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ที่สารพวกต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงเป็นส่วนหนึ่งในการทำ ELIZA ซึ่งเป็นกระบวนการตรวจสอบการวัดทางชีวภาพ (Agostini et al., 1997; Alberti and Klibanov, 1981; Alpeeva et al., 2005; Flock et al., 1999; Gaspar, 2000; Hammerschmidt et al., 1982; Weng et al., 1991; Wu et al., 1999)

พืชส่วนใหญ่มีปฏิกิริยาสีน้ำตาล (browning reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิยาที่เกิดจากสารประกอบฟีนอลิกในพืชออกซิไดส์กับอากาศโดยการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเพอร์ออกซิเดส (Kamuf et al., 2003; Richard-Forget and Gauillard, 1997) ดังนั้นจึงเป็นการสังเกตเบื้องต้นได้อย่างง่ายว่า พืชมีเอนไซม์ชนิดนี้ เงาะซึ่งเป็นผลไม้อีกชนิดหนึ่งที่นิยมรับประทานสูงและปลูกมากในภาคตะวันออกของประเทศไทย ในฤดูการเก็บเกี่ยวจะมีผลเงาะออกเป็นจำนวนมาก ทำให้ผลผลิตเงาะมีจำนวนมากกว่าความต้องการบริโภค จึงนำเงาะไปแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่า ได้แก่ ทำเงาะกระป๋อง แปรรูปเป็นอาหารหวานอื่น ๆ ส่วนที่ใช้ประโยชน์ ได้แก่ เนื้อเงาะที่ใช้รับประทาน ทำให้มีส่วนเหลือทิ้งที่มิได้นำไปใช้ประโยชน์ คือ ส่วนของเปลือกและเมล็ดเงาะ ซึ่งเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเช่นเดียวกันเมื่อทิ้งให้สัมผัสกับอากาศ เปลือกและเมล็ดเงาะอาจมีเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อให้เงาะเป็นแหล่งของเพอร์ออกซิเดส โดยแยกศึกษาในส่วนเปลือก เนื้อ และเมล็ดของเงาะ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของเงาะต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การสารสกัดหยาบจากผลเงาะ: นำตัวอย่างเงาะที่ซื้อจากตลาดในท้องถิ่นมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และแยกออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนเปลือก เนื้อ และเมล็ด (ภาพที่ 1) ชั่งน้ำหนักสดของตัวอย่างแต่ละส่วน 100 กรัม นำไปสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางประมาณ 4 ชั้น และนำส่วนใสซึ่งเป็นเอนไซม์สกัดหยาบมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าเริ่มทำการทดลอง

การหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส และปริมาณโปรตีน: แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสใช้วิธีการ colorimetric method (Wright and Nicell, 1999) ส่วนผสมในการหาแอคทิวิทีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 2 mM 4-aminoantipyrine (4-AAP), 2 mM phenol, 4 mM hydrogen peroxide และ 1.0 g/l Triton X-100 (สารเคมีทั้งหมดที่ใช้เป็น analytical grade ซื้อจาก Fluka, Switzerland) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 นาที ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติมสารสกัดหยาบเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS-spectrophotometer Model Jenway 6405 (Jenway, UK) และคำนวณยูนิตของเอนไซม์ โดย 1 ยูนิตของเพอร์ออกซิเดส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะทดลอง จากนั้นปริมาณโปรตีนโดยใช้ Comassie brilliant blue G-250 (Fluka, Switzerland) ตามวิธีของ Bradford โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (Bradford, 1976)



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของผลเงาะที่ใช้ในการศึกษา

การหาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดส: นำเพอร์ออกซิเดสจากตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนมาทำการหาพีเอชที่เหมาะสม 3 ค่า ได้แก่ 5.5, 7.0 และ 8.5 เพื่อเป็นแนวทางในการเตรียมเอนไซม์สกัดหยาบจากส่วนประกอบของเงาะ และศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 4, 10, 25, 30, 45, 60, 80 และ 100°ซ ตามลำดับ โดยการบ่มตัวอย่างในขณะทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนที่จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS-spectrophotometer Model Jenway 6405 (Jenway, UK)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การคัดแยกแหล่งผลิตเพอร์ออกซิเดสจากส่วนต่าง ๆ ของเงาะ:

จากการสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากส่วนประกอบของผลเงาะ 3 ส่วน ได้แก่ เปลือก เนื้อ และเมล็ด ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 และวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส พบว่า ส่วนประกอบของ

เงาะทั้ง 3 ส่วนมีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส (ตาราง 1) โดยเมล็ดให้แอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสสูงสุดเท่ากับ 234.52 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ เปลือก และเนื้อ มีแอคทิวิทีเท่ากับ 206.37 และ 148.26 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

ตาราง 1 แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบจากส่วนประกอบของเงาะ

ส่วนประกอบของเงาะ	แอคทิวิทีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
เปลือก	148.26
เนื้อ	206.37
เมล็ด	234.52

***พีเอชที่เหมาะสม*:**

จากการหาพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส จากสารสกัดหยาบที่สกัดมาจากส่วนประกอบต่าง ๆ ของเงาะ พบว่า ส่วนประกอบของเงาะทุกส่วนมีเอนไซม์เพอร์-ออกซิเดสที่ทำงานได้ที่พีเอช 5.5, 7 และ 8.5 ให้ (ตาราง 2)

ตาราง 2 แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจากส่วนประกอบต่างๆ ของเงาะที่อุณหภูมิต่างกัน

ส่วนประกอบของเงาะ	แอคทิวิทีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)		
	พีเอช 5.5	พีเอช 7.0	พีเอช 8.5
เปลือก	154.26	131.64	89.21
เนื้อ	87.14	174.81	194.21
เมล็ด	156.27	217.48	236.47

ตาราง 2 แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สกัดหยาบได้จากส่วนเปลือกให้แอคทิวิทีที่พีเอช 5.5 สูงกว่า 7.0 และ 8.5 ในขณะที่เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจากเนื้อและเมล็ดจากส่วนเนื้อและเมล็ดให้แอคทิวิทีที่พีเอช 8.5 สูงกว่า 7.0 และ 5.5 พีเอชที่เหมาะสมของเพอร์ออกซเดสสกัดหยาบจากส่วนเปลือกคือ 5.5 สำหรับส่วนเนื้อและเมล็ดเป็น 8.5 ดังนั้นเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่พบในผลเงาะจึงมีมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งอาจเป็นไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) ตามรายงานของ Mujer et al. (1983) พบไอโซเอนไซม์ของเพอร์ออกซิเดสในมะพร้าว โดยทั่วไปเพอร์อออกซิเดสจากพืชมีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5 – 8.5 ขึ้นอยู่กับแหล่งที่ทำการสักเอนไซม์ (ชะอรทิพย์ แย้มด้วง และคณะ, 2553; Civello et al., 1995; Ito et al., 1991; Jen et al., 1980; Mujer et al., 1983; Sessa and Anderson, 1981)

***อุณหภูมิที่เหมาะสม*:**

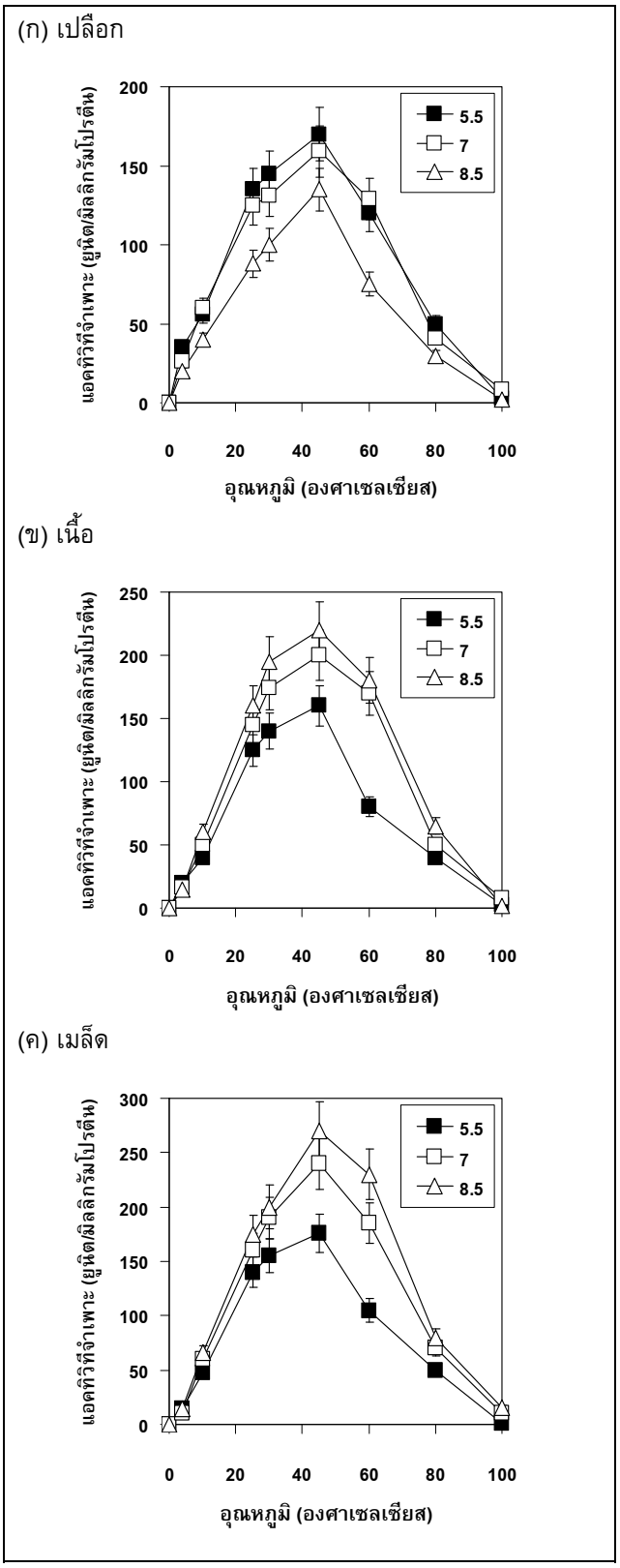
จากการรหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดสที่สกัดหยาบได้จากส่วนประกอบต่างๆ ของผลเงาะ ที่อุณหภูมิ 4, 10, 25, 30, 45, 60, 80 และ 100 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดสทุกส่วนของเงาะ (ภาพที่ 2) คือ 45°ซ และมีแอคทิวิทีในช่วงอุณหภูมิ 4°ซ และสูงถึง 80°ซ โดยจะมีแอคทิวิทีเหลืออยู่ร้อยละ 25 เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาในภาวะที่มีอุณหภูมิเหมาะสม ผลการทดลองเป็นแบบเดียวกับที่เคยมีรายงานในเพอร์ออกซิเดสในปาล์มน้ำมัน ฝ้าย สตรอเบอรี่ และมะพร้าว (Civello et al., 1995; Mujer et al., 1983; Triplett and Mellon, 1992) ผลเป็นเช่นนี้ เนื่องจากความร้อนทำลายสภาพของเอนไซม์ (ชะอรทิพย์ แย้มด้วง และคณะ, 2554; Vamos-Vigyazo, 1981)

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ พบว่า ส่วนประกอบต่างๆ ของผลเงาะมีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสที่แตกต่างกันโดยส่วนเปลือกทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกรด สำหรับเนื้อผลและเมล็ดทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นเบส แต่เพอร์ออกซิเดสที่สกัดหยาบจากทั้ง 3 ส่วน สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชทั้ง 3 ค่าที่ทำการศึกษา อุณหภูมิที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดสที่สกัดหยาบจากทั้ง 3 ส่วนทำงานได้ดีที่ 45°ซ และทำงานได้ในช่วงพีเอช 4 และที่อุณหภูมิ 80°ซ ดังนั้น เงาะจึงเป็นแหล่งเพอร์ออกซิเดสที่น่าสนใจที่แหล่งหนึ่ง เนื่องจากแสดงแอคทิวิทีในทุกส่วนของผลเงาะ ดังนั้นจึงสามารถนำส่วนของเปลือกและเมล็ดซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งมาสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสได้เช่นเดียวกับที่กับเมล็ด *Araucaria araugana* ที่ Riquelme and Cardemil (1993) รายงานไว้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ และกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสนับสนุนสารเคมี เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย



ภาพที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสในส่วนประกอบต่างๆ ของเงาะ (ก) เปลือก (ข) เนื้อ และ (ค) เมล็ด

เอกสารอ้างอิง

ชะอรทิพย์ แย้มด้วง, สมบัติ คงวิทยา, สมเกียรติ พรพิสุทธิ-มาศ และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2553). การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจากกะหล่ำปลี. **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้**, 1(1): 28–34.

ชื่นสุมณ ยิ้มถิ่น. (2548). **การกำจัดสารประกอบฟีนอลโดยเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร**. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฐากรณ์ สอนวัฒนา. (2544). **ลักษณะสมบัติของเปอร์ออกซิเดสในหัวมันสำปะหลัง *Manihot esculenta* Crantz หลังการเก็บเกี่ยว**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรากร รัตนภูมี. (2542). **เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพารา**. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีวเคมี). สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aberti, N. B. and Klibanov, A. M. (1981). Enzymatic Removal of Dissolved Aromatics from Industrial Aqueous Effuent. **Biotechnol. Bioeng**. 11: 373–390.

Agostini, E., Medina, M.J., Silvia, R., Forchetti, M.D., and Tigier, H. (1997). Properties of anionic peroxiase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. **J. Agric. Food Chem.** 45: 596–598.

Alpeeva, I. S., Niculescu-Nister, M., Leon, J.C., Csoregi, E. and Sakharov, I.Y. (2005). Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. **Biosens. Bioelect.** 21: 742–748.

Bradford, M. (1976). A rapid method for the quantify-cation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248–254.

Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life, **Proc. Biol. Sci.** 271: 1251–1262.

Civello, P.M., Martinez, G.A., Chaves, A.R., and Anon, M.C. (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch): partial purification and determination of some properties. **J. Agric. Food Chem**. 43: 2596– 601.

Dunford, H.B. (1999). Heme peroxidase nomenclature, **Plant Peroxidase Newsl.** 13: 65–71.

Flock, C., Bassi, A. and Gijzen, M. (1999). Removal of Aqueous Phenol and 2-Chlorophenol with Purified Soybean Peroxidase and Raw Soybean Hulls. **J. Chem. Technol. Biotechnol**. 74: 303–309.

Gaspar, S., Popescu, I.C., Gazaryan, I.G., Bautista, G., Ardila, G., Sakharov, I.Y., Mattiasson, B., and Csoregi, E. (2000). Biosensor based on novel plant peroxidases: a comparative study. **Electrochem. Acta** 46: pp. 255–264.

Habetha, M. and Bosch, T.C. (2005). Symbiotic Hydra express a plant-like peroxidase gene during oogenesis, **J. Exp. Biol.** 208 (Pt 11): 2157–2165.

Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M., and Kuc, J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiol. Plant Pathol.** 20: 73–82.

Ito, H., Hiraoka, N., Ohbayashi, A., and Ohashi, Y. (1991). Purification and chracterization of rice peroxidases. **Agric. Biol. Chem.** 55: 2445–2454.

Jen, J. J., Seo, A., and Flurkey, W.H. (1980). Tomato peroxidase: purification via hydrophobic chromatography. **J. Food Sci.** 45: 60–63.

Kamuf W, Nixon A, Parker O and Barnum GC, (2003). Overview of Caramel Colors. **Cereal Foods World** 42(2): 64–69. Available at: http://www.aaccnet.org/cerealfoodsworld/pdfs/W03-0205-01F.pdf

Kim, Y.H. and Yoo, J.J. (1996). Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. **Enzyme Microb. Technol.** 18: 531–535.

Kongvithtaya, S., Laloknam, S., and Chairote, G. (2010). **Characterization of ammonium precipitatant peroxidase from Ivy gourd.** Pure and Applied Chemistry International Conference 2010, Ubol Ratchathani University, Ubol Ratchathani.

Mujer, C.V., Mendoza, E.M.T., and Ramirez, D.A. (1983). Coconut peroxidase isoenzymes: isolation, partial purification and physiochemical properties. **Phytochem.** 22: 1335–1340.

O'Brien P. (2000). Peroxidase. **Chemico-Biological interactions**. 129: 113–139.

Richard-Forget, F.C. and Gauillard, F.A. (1997). Oxidation of chlorogenic acid, catechins and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: A possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. **J. Agric. Food Chem.** 45: 2472–2476.

Riquelme, A. and Cardemil, L. (1993). Peroxidases in the cell-walls of seeds and seedlings of *Araucaria araugana*. **Phytochem.** 31: 15–20.

Saitou, T., Kamada, H., and Harada, H. (1991). Iso-peroxidase in hairy roots and regenerated plants of horse radish (*Armoracia lapathifolia*). **Plant Sci.** 75: 195–201.

Sessa, D. J., and Anderson, R. L. (1981). Soybean peroxidase: purification and some properties. **J. Agric. Food Chem.** 29: 960–965.

Triplett, B. and Mellon, J.E. (1992). Purification and characterization of anionic peroxidases from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Sci.** 81: 147–154.

Vamos-Vigyazo, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Crit. Rev. Food Sci. Nutri**. 15: 49–127.

Vernwal S., Yadav R., and Yadav K. (2006). Purification of peroxidase from Solanum melongena fruit juice. **Indian J. Biochem. Biophys**. 43: 239–243.

Welinder, K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases, **Curr. Opin. Struct. Biol.** 2: 388–393.

Weng, Z., Handrick, X. M. and Maesmans, G. (1991). Immobilized peroxidase: a potential bioindicator for evaluation of thermal process. **J. Food Sci**. 56: 567–750.

Wright, H. and Nicell, J. A. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenol. **Biores. Technol**. 70: 69 – 79.

Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N. and Bewtra, J.K. (1999). Kinetic Model Aided Reactor Design for peroxidase-catalysed Removal of Phenol in the Presence of Polyethylene Glycol. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 74: 519–526.

Yamada, Y., Kobayashi, S., Watanabe, K. Q., and Hayashi, U. (1987). Production of horse radish peroxidase by plant cell culture. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 38: 31–39.

Zamocky, M. (2004). Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases, **Eur. J. Biochem.** 271: 3297–3309.