การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจากกะหล่ำปลี

ชะอรทิพย์ แย้มด้วง[1] สมบัติ คงวิทยา[2] สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ[1,3] และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ[3,4*]

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110
[2] กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพมหานคร 10400
[3] หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110
[4] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110
E-mail: surasakl@swu.ac.th

รับบทความ: 12 มีนาคม 2553 ยอมรับตีพิมพ์: 12 พฤษภาคม 2553

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแหล่งที่ให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผัก 10 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ ผักกาดขาว แตงกวา บร็อกคอลี่ มะเขือเปาะ แครอท ผักบุ้ง ฟักทอง ถั่วฝักยาว และกะหล่ำปลี โดยการนำตัวอย่างสกัดเอนไซม์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7.0 และติดตามแอคทิวิตีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสด้วย 4-อะมิโนแอนทิไพรีน ฟีนอล และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 นาที พบว่า สารสกัดหยาบจากกะหล่ำปลีให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุดเท่ากับ 234.52 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำกะหล่ำปลีสกัดหยาบตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80, และ 80 – 100 ตามลำดับ พบว่า การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 60 – 80 ให้แอคทิวิตีสูงสุดเท่ากับ 1432.65 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นใช้ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 20 – 80 ตกตะกอนเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส พบว่า ให้ผลผลิตร้อยละ 58.50 และความบริสุทธิ์ 3.82 เท่า มีค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 7.0 และ 40°ซ ตามลำดับ ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส K_m และ V_{max} เท่ากับ 125 μM and 17.2 μmol/min.mg protein ตามลำดับ

คำสำคัญ: เพอร์ออกซิเดส พืชผัก กะหล่ำปลี การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

Characterization of Partial Purified Peroxidase from Cabbage

Chaontip Yamduang[1] Sombat Kongwithtaya[2] Somkiat Phornphisutthimas[1,3] and Surasak Laloknam[3,4*]

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

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

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

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

E-mail: surasakl@swu.ac.th

Abstract

This research aimed to screen the peroxidase sources from ten vegetables, tomato, Chinese white cabbage, cucumber, broccoli, eggplant, carrot, morning glory, pumpkin, yard long bean, and cabbage. The samples were extracted by 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 the crude extract from cabbage had the highest peroxidase activity, 234.52 units/mg protein. After precipitation with ammonium sulfate saturated at percentage ranges of 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80, and 80 – 100, the highest peroxidase activity, 1432.65 units/mg protein, was in a range of 60 – 80%. 20 – 80% of saturated ammonium sulfate was selected to precipitate peroxidase from the cabbage crude extract. The enzyme yield and purity were 58.50% and 3.82 folds, respectively. The optimum pH and temperature of peroxidase were 7 and 40°C, and peroxidase kinetics as K_m and V_{max} were 125 μM and 17.2 μmol/min.mg protein, respectively.

Keywords: Peroxidase, Vegetable, Cabbage, Ammonium sulfate precipitation

บทนำ:

เพอร์ออกซิเดส (Peroxidases) (E.C.1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่เร่งสลายสับเสตรตโดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น ด้วยสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ การบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบฟีนอลิก และ การสังเคราะห์สารอะโรมาติก (Agostini et al., 1997; Hammerschmidt et al., 1982)

แหล่งที่พบเพอร์ออกซิเดสมีทั่วไปในจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช (Kim and Yoo, 1996; Yamada et al., 1987; Welinder, 1992; Dunford, 1999; Zamocky, 2004; Habetha and Bosch, 2005; Cavalier-Smith, 2004) มีรายงานพบเพอร์ออกซิเดสใน Horseradish root tubers และเซลล์ขนรากของแครอท โดยเฉพาะใน Horseradish root tubers มีการนำไปผลิตเพอร์ออกซิเดสในระดับอุตสาหกรรม (Welinder, 1992; Dunford, 1999; Saitou et al., 1991) ดังนั้นน่าจะมีความเป็นได้ที่พืชชนิดอื่นๆ สามารถผลิตเพอร์ออกซิเดสได้ และพืชชนิดนั้นพบมากในท้องถิ่นทำให้เพิ่มมูลค่าของพืชชนิดนั้น และสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบทางชีวภาพเพื่อหาสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างที่ต้องการได้ (Alpeeva et al., 2005; Gaspar, 2000)

ตำลึง (*Coccinia grandis* Linn) เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae ตำลึง (Ivy gourd) เป็นพืชท้องถิ่นที่พบได้ง่ายและมีรายงานพบเพอร์ออกซิเดสในผักตำลึง (Sombat et al., 2010) การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อคัดแยกผักที่มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส และทำการเลือกผักที่ให้แอคทิวิทีสูงสุดเพื่อไปทำการศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสต่อไป

ผัก 10 ชนิด ที่ใช้ในการคัดแยกเพอร์ออกซิเดส ได้แก่ มะเขือเทศ ผักกาดขาว แตงกวา บร็อกคอลี่ มะเขือเปาะ แครอท ผักบุ้ง ฟักทอง ถั่วฝักยาว และกะหล่ำปลี โดยการทำสกัดหยาบแล้วตามด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นทำการศึกษาสมบัติบางประการของเพอร์ออกซิเดส ได้แก่ อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา และค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์

วิธีดำเนินการวิจัย

***วัสดุและอุปกรณ์*:** ทำการซื้อผักจากตลาดในท้องถิ่น ได้แก่ มะเขือเทศ ผักกาดขาว แตงกวา บร็อกคอลี่ มะเขือเปาะ แครอท ผักบุ้ง ฟักทอง ถั่วฝักยาว และกะหล่ำปลี Ammonium sulfate, sodium chloride and Sephadex G-25 ซื้อจาก Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ, USA) และ Comassie brilliant blue G-250, 4-aminoantipyrine (4-AAP) and hydrogen peroxide (H_2O_2) ซื้อจาก Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดอยู่ในระดับ analytical grade.

***ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากผัก*:** นำตัวอย่างผักที่ใช้ในการศึกษาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วชั่งน้ำหนักสด 100 กรัม สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางประมาณ 4 ชั้น แล้วนำส่วนใสซึ่งเป็นเอนไซม์สกัดหยาบเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าเริ่มทำการทดลอง

***การหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส และปริมาณโปรตีน*:**

แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสใช้วิธีการ colrimetric method (Wright and Nicell, 1999) ส่วนผสมในการหาแอคทิวิทีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 2 mM 4-AAP, 2 mM phenol, 4 mM hydrogen peroxide และ 1.0 g/l Triton X-100 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 นาที ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติมสารสกัดหยาบเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS-spectrophotometer Model Jenway 6405 (Jenway, UK). 1 ยูนิตของเพอร์ออกซิเดส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับ 1 ไมโครโมล ของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ Comassie brilliant blue G-250 method ตามวิธีของ Bradford โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน (Bradford, 1976)

การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต:

นำสารสกัดหยาดกะหล่ำปลีมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเริ่มต้นมีแอคทิวีของเพอร์ออกซิเดส 234.52 U/mg protein ทำการกรองเอนไซม์สกัดหยาบแล้วเซนตริฟิวก์ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm/min เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°ซ และทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้นร้อยละอิ่มตัวที่ 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80, และ 80 – 100 จากนั้นทำการเซนตริฟิวก์แล้วนำตะกอนที่ได้ไปกระจายใน 50 mM phosphate buffer pH 7.0 และ นำเกลือออกโดยใช้ Sephadex G25 จากนั้นทำการหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

***การหาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดส และจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดส*:**

นำเพอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำมาทำการหาพีเอชที่เหมาะสมในช่วง 4 – 14 และอุณหภูมิที่เหมาะสม 4 – 100°ซ ตามลำดับ จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรตเป็นฟีนอลจากนั้นหาค่า Lineweaver–Burk plot for K_m and V_{max}

ผลการวิจัย และการอภิปรายผล

***การคัดแยกแหล่งผลิตเพอร์ออกซิเดสจากผัก*:**

ทำการสกัดเพอร์ออกซิเดสจากผัก 10 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ ผักกาดขาว แตงกวา บร็อกคอลี่ มะเขือเปาะ แครอท ผักบุ้ง ฟักทอง ถั่วฝักยาว และกะหล่ำปลี โดยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Phosphate buffer, pH 7.0 แล้วทำการวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส พบว่า ผักทุกชนิดมีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส (ไม่แสดงผลการทดลอง) โดยกะหล่ำปลีให้แอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสสูงสุด 234.52 units/mg protein.

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต:

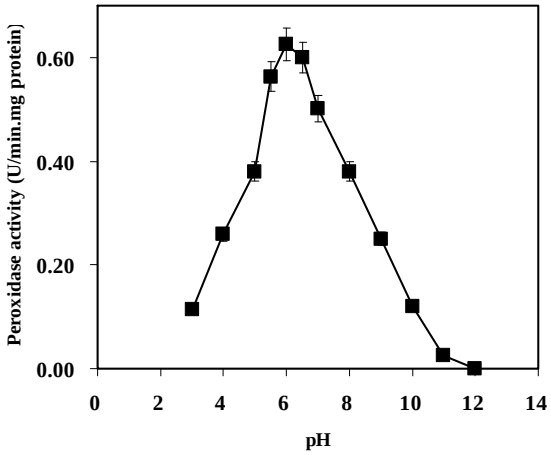
เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจากกะหล่ำปลีนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย ammonium sulfate ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80, and 80 – 100 พบว่าช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60 – 80 ให้แอคทิวิทีสูงสุด 1432.65 units/mg protein และ ช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวที่เลือกใช้ในการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนคือความเข้มข้นอิ่มตัว ammonium sulfate precipitation ร้อยละ 20 – 80 (ตาราง 1)

ตาราง 1 ตารางการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของกะหล่ำปลี

Step	Yield (%)	Specific activity (units/mg protein)	Purity (fold)
Crude	100	234.52	1.00
0 – 20 % $(NH_4)_2SO_4$	5.11	124.76	0.53
20 – 40 % $(NH_4)_2SO_4$	27.19	756.39	3.23
40 – 60 % $(NH_4)_2SO_4$	30.68	953.22	4.06
60 – 80 % $(NH_4)_2SO_4$	33.22	1432.65	6.10
80 – 100 % $(NH_4)_2SO_4$	3.80	119.42	0.51
20 – 80 % $(NH_4)_2SO_4$	58.50	895.87	3.82

***พีเอชที่เหมาะสม*:**

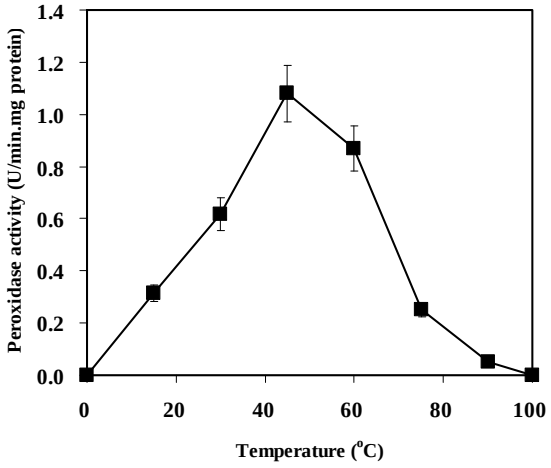
ทำการหาพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำปลีที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วย Ammonium sulfate precipitant peroxidase พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา คือ พีเอช 7.0 และมีช่วงพีเอชที่กว้างคือ 5.5 – 8.5 แสดงดังภาพที่ 1 ผลการทดลองเป็นแบบเดียวกับที่เคยมีรายงานในเพอร์ออกซิเดสใน ข้าว มะเขือเทศ ถั่วเหลือง มะพร้าว และสตรอเบอรี่ (Sessa and Anderson, 1981; Ito et al., 1991; Jen et al., 1980; Civello et al., 1995; Mujer et al., 1983)



ภาพที่ 1 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

***อุณหภูมิที่เหมาะสม*:**

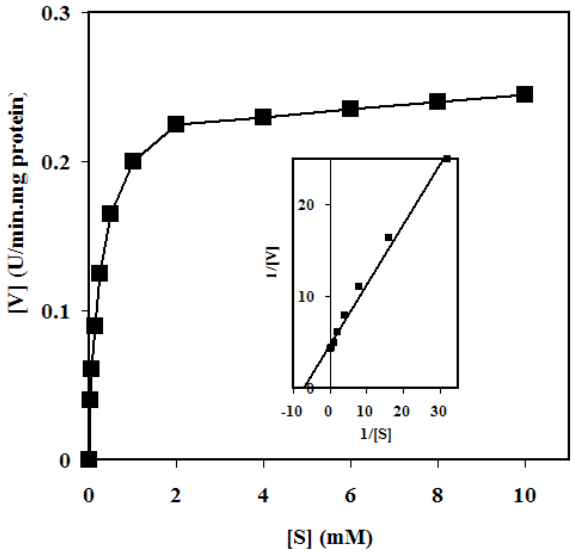
ทำการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำปลีที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วย Ammonium sulfate precipitant peroxidase พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา (ภาพที่ 2) คือ 40°ซ และมีแอคทิวิทีในช่วงอุณหภูมิ 10°ซ และสูงถึง 70°ซ โดยจะมีแอคทิวิทีเหลืออยู่ร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม ผลการทดลองเป็นแบบเดียวกับที่เคยมีรายงานในเพอร์ออกซิเดสใน ปาล์มน้ำมัน ฝ้าย (Triplett and Mellon, 1992) สตรอเบอรี่ (Civello et al., 1995) และมะพร้าว (Mujer et al., 1983) ผลการทดลองเป็นเช่นนี้เพราะความร้อนทำลายสภาพของเอนไซม์ (Vamos-Vigyazo, 1981)



ภาพที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

***จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำปลี*:**

ทำการหาจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำปลีโดยใช้ฟีนอลเป็นสับสเตรต (ภาพที่ 3) พบว่ามีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 125 μM and 17.2 μmol/min.mg protein ตามลำดับ มีรายงานค่า K_m ของเพอร์ออกซิเดสในลูกแพร์ และเมล็ด Araucaria มีความจำเพาะต่ำกว่ากะหล่ำปลี และใกล้เคียงกับผักตำลึง (Richard-Forget and Gauillard, 1997; Riquelme and Cardemil, 1993)



ภาพที่ 3 จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำปลี

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้พบว่ากะหล่ำปลีที่มีความบริสุทธิ์บางส่วนมีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุด และทำงานได้ดีที่พีเอช 7 อุณหภูมิที่เหมาะสม 40°ซ และมีความจำเพาะต่อฟีนอลสูง และทำการศึกษาเปรียบเทียบค่าต่างๆ ของเพอร์ออกซิเดสที่ไม่บริสุทธิ์ และบริสุทธิ์บางส่วน พบว่ามีค่าอุณหภูมิ พีเอช และค่าจลนศาสตร์ใกล้เคียงกัน (ไม่แสดงผลการทดลอง) ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์อาจจะใช้ในรูปเอนไซม์สกัดหยาบได้ และควรหาแหล่งเพอร์ออกซิเดสจากแหล่งอื่นๆ ต่อไป หรือ ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม ทั้งนี้เพื่อทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดเมื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมหรือใช้ในการเรียนการสอน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ สนับสนุนสารเคมี เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

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.

Brahmachari, H.D. and Augusti, K.T. (1963). Orally effective hypoglycemic principles from *Coccinia indica*. **J. Pharm. Pharmacol.**, 15, 411 – 412.

Brua, A.B. and Goswami, B.C. (1979). Carotenoides of *Cephalandra indica* (*Coccinia indica*). **Curr. Sci.**, 48, 630 – 632.

Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life, **Proc. Biol. Sci.**, 271, pp. 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 – 2601.

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

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. Biological. Chem.,** 55, pp. 2445 – 2454.

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

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

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.

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). Isoperoxidase in hairy roots and regenerated plants of horse radish (*Armoracia lapathifolia*). **Plant Sci.**, 75, pp. 195 – 201.

Satyavati, G.V., Raina, M.K., and Sharma, M. (1987). **Medicinal Plants of India, vol. 1.** Indian Council of Medical Research, New Delhi, 198 pp.

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

Siddiqui, I.A., Osman, S.M., Subbaram, M.R., and Achaya, K.T. (1973). Fatty acid components of seed fats from four plant families. **J. Oil Technol. Assoc. India**, 5, 8 – 9.

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.

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

Vaishnav, M.M. and Gupta, K.R. (1996). Ombuin 3-O-arabinofuranoside from *Coccinia indica*. **Fitoterapia**, 67, pp. 80.

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

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

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

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.