

**HYDROXYNITRILE LYASE FROM CASSAVA TUBERS**

**SUWATCHARA LEELAMANEEPPONG**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2003**

**ISBN 974-04-3361-8**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

เอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรไลเอสจากหัวมันสำปะหลัง (HYDROXYNITRILE LYASE FROM CASSAVA TUBERS)

สุวัชรรา ลีลามณีพงศ์ 4136805 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : มนตรี จุฬาวัดทนทล, Ph.D., ม.ร.ว. ชัยณัฐสร สวัสดิวัฒน์, Ph.D.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรไลเอส (Hydroxynitrile lyase, HNL, EC 4.1.2.37) ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเนื้อเยื่อ parenchyma ในหัวมันสำปะหลังและนำมาศึกษาสมบัติของเอนไซม์ เอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรไลเอสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน มีค่า  $K_m$  สำหรับ acetone cyanohydrin เท่ากับ 14.04 mM ค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 5.5 แต่เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 40°C เอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรไลเอสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสูญเสียแอกทิวิตี้อย่างสมบูรณ์ในกรณีที่มีสาร phenylmethanesulfonyl fluoride ที่ความเข้มข้น 2 mM ในปฏิกิริยา ผลการทดลองนี้สนับสนุนว่า ซีรีนเป็นกรดอะมิโน ที่มีความสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ นอกจากนี้ เอนไซม์ยังสามารถถูกยับยั้งด้วยสาร 2-mercaptoethanol, iodoacetic acid และ N-ethylmaleimide ซึ่งข้อมูลนี้เสนอว่าน่าจะมี ซิสเตอีนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ การเติมหรือการโคอะไลซิสเอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรไลเอสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย สาร EGTA หรือ EDTA สามารถเพิ่มแอกทิวิตีของเอนไซม์ แอกทิวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยสารกลุ่มเมธิล ไอออน เช่น แคลเซียม, โคบอลต์, แมกนีเซียม, ทองแดงและสังกะสี สารอะซีโตน, สารในกลุ่มแอลกอฮอล์ (butanol, 2-methyl-2-butanol, isobutanol, octanol) และสารในกลุ่มอัลดีไฮด์ (acetaldehyde, butyraldehyde, benzaldehyde, 2-methylbenzaldehyde) ถูกพบว่าสามารถยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรไลเอสได้เช่นกัน

77 หน้า ISBN 974-04-3361-8

**HYDROXYNITRILE LYASE FROM CASSAVA TUBERS**

SUWATCHARA LEELAMANEEPONG 4136805 SCBC/M

M.Sc.(BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: MONTRI CHULAVATNATOL, Ph.D., M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D.

**ABSTRACT**

Hydroxynitrile Lyase (HNL, EC 4.1.2.37) was partially purified from parenchyma tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) tubers and its characteristics were observed. Partially purified HNL has a  $K_m$  for acetone cyanohydrin of 14.04 mM. The optimum pH of the enzyme activity was 5.5 but the enzyme was most stable at pH 6.0. The optimum temperature was 40°C. Partially purified HNL completely lost its activity in the presence of 2 mM phenylmethane sulfonyl fluoride. The result supported the idea that serine is an important residue for catalysis of this enzyme. The enzyme was also inhibited by 2-mercaptoethanol iodoacetic acid and N-ethylmaleimide, suggesting the possible presence of cysteine at the active site. Addition of or dialysis against EGTA and EDTA of partially purified HNL caused an activation of the enzyme activity. The enzyme activity was inhibited in the presence of a metal ion, respectively, calcium, cobalt, magnesium, copper or zinc. Acetone, alcohols (butanol, 2-methyl-2-butanol, isobutanol, octanol) and aldehydes (acetaldehyde, butyraldehyde, benzaldehyde, 2-methylbenzaldehyde) were found to inhibit HNL activity.

**KEY WORDS : HYDROXYNITRILE LYASE / CASSAVA / TUBER**

77P. ISBN 974-04-3361-8