9 FEB 1993

GLYCOSIDASE ENZYMES IN THE CASSAVA

PHANNEE SAWANGAREETRAKUL

มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1992

Copyright by Mahidol University

21199

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์ไกลคอซิเดสในมันลำปะหลัง

ผู้วิจัย พรรณี สว่างอารีตระกูล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D.

มนตรี จุฬาวัฒนกล, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 4 ธันวาคม พ.ศ.2535

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนลำต้น และก้านใบในมันลำปะหลัง โดยไม่ผ่านขบวนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีเอนไซม์ไกลโคซิเดสซึ่งมีความสามารถในการย่อยสาร พาราไนโตรฟีนิล เบต้าโมโนไกลโคไซด์ ได้ดีกว่าพาราไนโตรฟีนิล อัลฟาโมโนไกลโคไซด์ แอคทิวิตี้ที่สำคัญที่พบจากทั้ง 2 เนื้อเยื่อในมันลำปะหลังคือ เบต้า กลูโคซิเดส, เบต้า นิวโคซิเดส และเบต้า กาแลคโตซิเดส ซึ่งพบว่ามีแอคทิวิตี้ที่ pH 6 สูงกว่า pH 4 และ pH 8 แอคทิวิตี้ของทั้ง 3 เอนไซม์ตกอยู่ในช่วง 35%-65% โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและมีแอคทิวิตี้ของเบต้า กาแลคโตซิเดสน้อยกว่าแอคทิวิตี้ของเบต้า กลูโคซิเดสและเบต้า นิวโคซิเดส ในส่วนก้านใบ, ลำต้น และเปลือกของราก

เอนไซม์ลินามาเรสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ของมันลำปะหลัง พบว่ามีขนาดโมเลกุลในสภาวะที่ไม่เสียสภาพประมาณ 600,000 ถึง 2,000,000 ดาลตัน โดยโครมาโตกราฟฟีในเซฟาโรส 4บี จากการแยกเอนไซม์ด้วยวิธี เจล ฟิลเตรชั่น พบว่ามีแอคทิวิตี้ของลินามาเรส, เบต้า กลูโคซิเดส, เบต้า นิวโคซิเดส และเบต้า กาแลคโตซิเดส อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันที่บริเวณส่วนน้ำหนักโมเลกุลสูง และมีขนาดโมเลกุลของหน่วยย่อยเท่ากับ 63,000 ดาลตัน จากการศึกษาด้วย SDS-PAGE นอกจากนี้ยังพบว่ามีแอคทิวิตี้ของเบต้า กาแลคโตซิเดสใน

Copyright by Mahidol University

ส่วนน้ำหนักโมเลกุลต่ำด้วย และไม่พบว่ามีหน่วยย่อยที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 63,000 จาก SDS-PAGE จากการศึกษาโดยอิเลคโตรโฟรีซิส ในสภาวะไม่เสียสภาพของเอนไซม์ที่แยกได้จากเซฟาโรส 4บี โครมาโตกราฟฟี ที่บริเวณน้ำหนักโมเลกุลสูง พบว่ามีรูปแบบของแถบเอนไซม์เบต้า กลูโคซิเดส, เบต้า นิวโคซิเดส และเบต้า กาแลคโตซิเดส เป็นจำนวนมากกว่า 6 แถบในโพลิอะคริลาไมด์ แต่เอนไซม์จากส่วนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แสดงเฉพาะแถบเอนไซม์เพียงแถบเดียวของเบต้า กาแลคโตซิเดสแอคทิวิตี้ ซึ่งเสนอแนะว่าเอนไซม์จากส่วนน้ำหนักโมเลกุลต่ำไม่ใช่เอนไซม์ลินามาเรส จากการตรวจด้วยวิธี PAS พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสจากทั้ง 3 เนื้อเยื่อเป็นไกลโคโปรตีน

ลินามาเรสถูกนำมาหาปริมาณคาร์โบไฮเดรทและกรดไซอาลิค พบว่ามีมากที่สุดในลินามาเรสจากเปลือกของราก เพื่อศึกษาโครงสร้างของไกลโคโปรตีนจากทั้ง 3 เนื้อเยื่อ ได้นำลินามาเรสไปทดลองตัดสายคาร์โบไฮเดรทออกจากโพลีเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ Peptide N-Glycosidase F พบว่าไม่มีผลต่อขนาดโมเลกุลของหน่วยย่อยในลินามาเรสจากทั้ง 3 เนื้อเยื่อ การตัดไซอาลิค แอซิดในลินามาเรสด้วยเอนไซม์นิวรามินิเดส จากแบคทีเรีย 2 ชนิด พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในขนาดและ pI ของลินามาเรสจากก้านใบ,ลำต้นและเปลือกของราก แต่มีผลบ้างต่อการจับกลุ่มของโมเลกุลของลินามาเรส ในการศึกษาแผนที่เปปไทด์ของลินามาเรส หลังจากการย่อยด้วยทริปซิน ทั้งโดยการแยกบนกระดาษด้วยกระแสไฟฟ้ากับโครมาโตกราฟฟี และการแยกโดยใช้ HPLC ก็พบว่า ลินามาเรสระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 3 มีแผนที่เปปไทด์เหมือนกันเป็นส่วนใหญ่ แต่มีความแตกต่างของจุดเปปไทด์ระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 3 ประมาณ 1 ถึง 3 เปปไทด์ ซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อไปว่าเป็นความแตกต่างในลำดับของกรดอะมิโน หรือในคาร์โบไฮเดรทที่ติดกับกรดอะมิโน ในการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนของลินามาเรสจากก้านใบ, ลำต้น และเปลือกของราก ทั้งที่มีและไม่มีการย่อยด้วยไซยาโนเจน โบรไมด์ พบว่ามีการ block ที่ปลายด้าน N ของกรดอะมิโนในลินามาเรส

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Glycosidase Enzymes in the Cassava

Name Phannee Sawangareetrakul

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisor Committee

Jisnuson Svasti, Ph.D.

Montri Chulavatnatol, Ph.D.

Date of Graduation 4 December B.E. 2535 (1992)

.

ABSTRACT

Cassava stem and petiole crude extract contained glycosidase enzyme with higher ability to hydrolyse PNP-β-monoglycosides than PNP-α-monoglycosides. Three major activity were found in both tissues are β-glucosidase, β-fucosidase and β-galactosidase, with higher activity being found at pH 6 than at pH 4 or pH 8. All three activities were precipitated in the 35%-65% saturated ammonium sulfate fraction, with β-galactosidase activity being lower than other enzyme in all tissues. Purified linamarase (EC.3.2.1.21) from cassava petiole, stem and root cortex were shown to have native Mr of about 600,000-2,000,000 on Sepharose 4B chromatography. Gel filtration showed that the high MW region possessed linamarase, β-glucosidase, β-fucosidase and β-galactosidase activities at the same position, and the subunit M_r of the enzyme was about 63,000 on SDS-PAGE. Another peak of β-galactosidase activity was found at the low molecular weight region, which did not contain a major band corresponding to M_r 63,000. Analysis of each fraction from Sepharose 4B chromatography on non-denaturing conditions showed ladder patterns for enzyme from the high MW region of all tissues, when stained for β-glucosidase, β-fucosidase and β-galactosidase activities. However, the pool from the low MW region gave a

Copyright by Mahidol University

single band staining only for β-galactosidase activity, suggesting that it is not linamarase enzyme. Linamarase from all three sources were glycoproteins. Root cortex linamarase had higher neutral sugar and sialic acid content than petiole and stem enzyme. Deglycosylation of linamarase with Peptide-N-Glycosidase F had no effect on size of linamarase from all three sources. Sialic acid removal by using neuraminidase from 2 sources caused no change in size and pI of linamarase from stem, petiole and root cortex, but had some effect on the extent of linamarase aggregation. Tryptic peptide mapping of linamarase both on paper and by HPLC showed similarities between enzymes from all three tissues, but each tissue also showed 1-3 distinctive peptides. Further structural analysis of these peptides will be required to determine whether these peptide differences are due to differences in amino acid sequence or glycosylation. Amino acid sequence analysis of linamarase from all three tissues with and without prior treatment with CNBr suggested that linamarase is blocked at the N-terminus.

Copyright by Mahidol University