29 SEP 1994

STUDY OF CHITINASE AND β-(1,3)-GLUCANASE ENZYMES

IN THE RUBBER LATEX

JUNTIRA PUNYA

2

ธิสินันทนาการ

จาก

"มหาวิทยาลัยมหิดล"

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(BIOCHEMISTRY)

IN

Copyright by Mahidol University

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1994

26054

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเอ็นไซม์ไคติเนสและเบต้า(1,3)กลูคาเนสในน้ำยางพารา

ผู้วิจัย จันทิรา ปัญญา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล , Ph.D

ประหยัด โกมารทัต , Ph.D

รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล , Ph.D

วันที่สำเร็จการศึกษา 5 กรกฎาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเอ็นไซม์ในบี-ซีรั่มของ lutoid particle ของน้ำยางพาราที่ถูกปั่นแยกด้วยความเร็วสูงพบว่ามีเอ็นไซม์ไคติเนสและเบต้า-(1,3)-กลูคาเนสอยู่ จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ทั้งสองโดยเตรียม คอลลอยด์-ไคติน จากเปลือกกุ้งมาใช้เป็นสับสเตรทในการวัดการทำงานของเอ็นไซม์ไคติเนส ไคติเนสในบี-ซีรั่มมี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงแคบ ระหว่าง 4 - 5.5 โดยที่การทำงานสูงสุดจะวัดได้ที่ pH 5.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ของเอ็นไซม์นี้จะอยู่ระหว่าง 45 - 55 ^{o}C และที่ อุณหภูมิ 50 ^{o}C เอ็นไซม์จะทำงานได้สูงสุด ไคติเนสมีความทนต่อ pH ได้ในช่วง pH ระหว่าง 4 - 10 และสามารถทนต่อความร้อนได้ถึง 70 ^{o}C ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไคติเนสเป็นเอ็นไซม์ที่สามารถทนต่อความร้อนได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าเอ็นไซม์เบต้า-(1,3)-กลูคาเนสก็เป็นเอ็นไซม์ที่สามารถทนต่อความร้อนได้ปานกลาง เพราะกลูคาเนสสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 60 ^{o}C กลูคาเนสมีช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงแคบเช่นเดียวกับไคติเนสคือระหว่าง pH 5 - 6 โดยจะทำงานได้สูงสุดที่ pH 5.0 จากการศึกษาคุณสมบัติทางไคเนติกของเอ็นไซม์ทั้งสองพบว่า บี-ซีรั่มไคติเนสจะมีค่า Km เท่ากับ 25 mM ของไคติน ในขณะที่ไคติเนสที่แยกบริสุทธิ์มีค่า Km เท่ากับ 17 mM ของไคติน สำหรับเอ็นไซม์ กลูคาเนสใน บี-ซีรั่มมีค่า Km เท่ากับ 40 mM ของลามินาริน

Copyright by Mahidol University

ในการแยกบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์ทั้งสอง โดยวิธีโครมาโตกราฟีที่ใช้ CM-cellulose พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสประกอบด้วย 3 isozymes ส่วนกลูคาเนสพบว่ามีอยู่เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ในการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ไคติเนสทั้ง 3 isozymes คือ CM I , CM II และ CM III พบว่าทั้ง 3 isozyme มีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากันคือประมาณ 26 กิโลดาลตันโดยที่แต่ละ isozyme มีค่า pI ที่ 9.3 , 9.7 , และ 9.8 ตามลำดับ

จากการศึกษาคุณสมบัติการต่อต้านเชื้อรา ของเอ็นไซม์และโปรตีนในบี-ซีรั่ม พบว่าบี-ซีรั่ม ซึ่งมีเอ็นไซม์ไคติเนสและเบต้า-(1,3)-กลูคาเนสอยู่นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่นำมาทดสอบทั้ง 6 ชนิดได้ ในขณะที่ซี-ซีรั่มและเอ็นไซม์ไคติเนสที่แยกบริสุทธิ์แล้ว สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่นำมาทดสอบได้เพียง 3 ชนิดเท่านั้น สำหรับไคโตแซนซึ่งเป็นสารที่รู้จักกันดีว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ ก็ถูกนำมาทดสอบในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ สารละลายไคโตแซน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่นำมาทดสอบได้เกือบทั้งหมดยกเว้นเชื้อ *Sporotrichum pulveruluetium* และผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงแนวทางในการนำเอา บี-ซีรั่ม ของน้ำยางพาราไปประยุกต์ในด้านต่างๆได้มากขึ้น

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Study of Chitinase and β-(1,3)-Glucanase Enzymes in the Rubber Latex

Name Juntira Punya

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisor Committee

Dhirayos Wititsuwanakul ,Ph.D.

Prayad Komaratat ,Ph.D.

Rapepun Wititsuwanakul, Ph.D.

Date of Graduation 5 July B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

The chitinase and β-(1,3)-glucanase enzyme were detected and found in B-serum prepared from lutoid particles of centrifuged rubber latex. Both enzyme in B-serum were characterized in this study. Colloidal chitin prepared from prawn shell was used as substrate in the chitinase assay. The chitinase enzyme had a narrow range of pH optimum between 4 - 5.5 with the maximum activity at pH 5.0. The temperature optimum was found between 45 - 55 $^{\circ}$ C with maximum activity at 50 $^{\circ}$ C. The enzyme was found to be stable in the pH range of 4 - 10. The chitinase was stable to the heat treatment up to 70 $^{\circ}$ C , indicating this was a heat stable enzyme. The β-(1,3)-glucanase enzyme was also found to be moderately heat stable protein. The thermal stability of the glucanase was up to 60 $^{\circ}$ C heat treatment. It also had a narrow range of pH optimum between 5 - 6 with the maximum activity at pH 5.5. Temperature optimum for the β-(1,3)-glucanase enzyme activity was found as a wide range between 40 - 60 $^{\circ}$ C. Kinetics parameters of Km values of chitinase was 25 mM chitin for the B-serum enzyme and 17 mM chitin for the fractionated purified chitinase. The Km value of 40 mM laminarin was found for the B-serum β-(1,3)-glucanase enzyme.

Copyright by Mahidol University

Fractionation and purification of the enzymes were carried out using CM-cellulose chromatography. The chitinase was found to consist of 3 different isoenzymes by CM-cellulose chromatography while the β-(1,3)-glucanase showed only a single enzyme activity peak. The three chitinases , designated as CM I , CM II and CM III , were fractionated and characterized. All the three chitinase isozymes had the same molecular weight of 26 kD. The pI values for chitinase isozymes were 9.3 , 9.7 and 9.8 for CM I , CM II and CM III , respectively.

Antifungal activities of the enzymes and protein in B-serum were carried out in this study. The B-serum containing both the chitinase and β-(1,3)-glucanase activities was effective on growth inhibition in the antifungal activity assays. All the six tested fungi were inhibited by the B-serum. Fractionated purified chitinase and C-serum showed growth inhibition on three of fungi tested. Chitosan which was well known as fungal growth inhibitor was used as a reference to this antifungal study. The chitosan solution showed growth inhibition on all the tested fungi except *Sporotrichum pulveruluetium*. These studies suggested an opportunity for potential application of the latex B-serum on many different aspects.

Copyright by Mahidol University