28 MAR 1990

SOME STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF LINAMARASE FROM CASSAVA (*Manihot esculenta* CRANTZ.)

PENNAPA KISAMANONTA

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

อักษรนิทานการ
IN
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1989

13924

ชื่อวิทยานิพนธ์ คุณสมบัติทางโครงสร้างบางประการของเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง

ผู้วิจัย เพ็ญนภา กิษามานนท์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

มนตรี จุฬาวัฒนทล, Ph.D.

ภิญโญ พานิชพันธ์, Ph.D.

ม.ร.ว. ชัยณสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D.

บุรชัย สนธยานนท์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 2 มิถุนายน พ.ศ. 2532

บทคัดย่อ

ไอโซไซม์สามชนิดของเอนไซม์ลินามาเรสที่สกัดจากก้านใบของมันสำปะหลัง มี pI 4.3, 3.3 และ 2.9 จากการศึกษาคุณสมบัติทางโครงสร้างและการจับกันของหน่วยย่อย โดยย่อยด้วยโปรทีเอสชนิดต่างๆ พบว่าไม่ถูกย่อยด้วยโปรทีเอสชนิดต่างๆ คือ ทริปซิน โปรเนส เทอร์โมไลซิน ปาเปน สับทิลิซิน คลอลาจิเนส และโบรมิเลน แต่จะถูกย่อยด้วยทริปซิน โปรเนส และเทอร์โมไลซิน หลังจากทำให้เสียสภาพโดยความร้อน วิเคราะห์ผลิตผลที่ได้จากการย่อยโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าให้ชิ้นส่วนย่อยที่คล้ายคลึงกัน แสดงให้เห็นว่าไอโซไซม์ทั้งสามชนิดประกอบด้วยสารโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน ทำการศึกษาปริมาณไลซีนที่เป็นองค์ประกอบของไอโซไซม์ทั้งสามชนิดทั้งที่อยู่ในสภาพธรรมชาติและที่เสียสภาพธรรมชาติ โดยทำปฏิกิริยากับ TNBS พบว่าไอโซไซม์ pI 4.3 มีปริมาณไลซีนเท่า กับ 179 และ 199 โมลไลซีน/โมลไอโซไซม์ตามลำดับ เมื่อศึกษาปริมาณของไลซีนของ ไอโซไซม์ทั้งสองชนิดที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ โดยใช้ปฏิกิริยาเดียวกันนี้ แต่มีตัวยับยั้งแบบแข่งขันอยู่ด้วย พบว่าปริมาณไลซีนไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของไอโซ- ไซม์เหล่านี้มีไลซีนเป็นองค์ประกอบอยู่บริเวณด้านนอก แต่ไม่พบเป็นองค์ประกอบของโครง สร้างส่วนที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา เมื่อผ่านไอโซไซม์ทั้งสามชนิดลงใน Con A-Sepharose column พบว่าไอโซไซม์ทั้งสามชนิดค้างติดอยู่ในคอลัมน์ แสดงว่าเป็นสารประกอบ ไกลโคโปรตีน

Copyright by Mahidol University

การศึกษาคุณสมบัติการจับกันระหว่างไอโซไซม์ทั้งสามชนิดที่ถูกดัดแปลงโดย TNBS กับ anti-linamarase serum พบว่าสามารถจับได้กับไอโซไซม์ pI 4.3 และ 3.3 แต่ไม่สามารถจับกับไอโซไซม์ทั้งสามชนิดที่ทำให้เสียสภาพโดยความร้อน การศึกษาคุณสมบัติการแตกตัวเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ลินามาเรส โดยทำปฏิกิริยากับกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ พบว่า เอนไซม์ลินามาเรสสามารถแตกตัวเป็นหน่วยย่อย และสูญสิ้นสภาพการเร่งปฏิกิริยา เมื่อนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับ SDS ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที พบว่าสามารถคงทนต่อ SDS ความเข้มข้นสูงถึง 20% การวิเคราะห์ไอโซไซม์ทั้งสามชนิดด้วย SDS-PAGE ที่มีความเข้มข้นของ SDS สูงถึง 1% พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อย หลายหน่วยที่มีขนาดแตกต่างกัน และจากการศึกษาคุณสมบัติการแตกตัวเป็นหน่วยย่อยโดยใช้ความร้อน พบว่าไอโซไซม์ทั้งสามชนิดจะแตกตัวเป็นหน่วยย่อยและสูญเสียสภาพการเร่งปฏิกิริยา ในขณะที่ β-mercaptoethanol ไม่ให้ผลดังกล่าว

Copyright by Mahidol University

Thesis Title: Some structural characteristics of linamarase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)

Name: Pennapa Kisamanonta

Degree: Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Montri Chulavatnatol, Ph.D.

Bhinyo Panijpan, Ph.D.

M.R. Jisnuson Svasti, Ph.D.

Burachai Sonthayanon, Ph.D.

Date of Graduation 2 June B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

Three isozyme of cassava petiole linamarase were used in two types of studies: structural study and subunit interaction study. Native isozymes were insensitive to the following proteases: trypsin, pronase, thermolysin, papain, subtilisin, collagenase and bromelain. After denaturation, they became sensitive to trypsin, pronase and thermolysin and yielded similar proteolytic fragments suggesting a similar protein chain among the isozymes. Using TNBS to modify lysine residues, the native and denatured forms of the isozyme pI 4.3 were found to have 179 and 199 mole lysines/mole isozyme respectively. Similarly, the native and denatured forms the isozyme pI 2.9 contained 88 and 100 moles/mole respectively. In the presence of a competitive inhibitor, the numbers of modified lysines of the native isozymes were not changed. The data indicated that most

Copyright by Mahidol University

lytic site. The isozymes were probably glycoproteins since they can be retained by a Con A-Sepharose column. The anti-linamarase serum was able to recognize the modified isozymes except isozyme pI 2.9 but could not recognize the heat-denatured isozymes. Guanidine hydrochloride dissociated the enzyme into smaller forms and caused inactivation also. Complete inactivation was observed by 3M GuHCl. However, the isozymes were stable in SDS up to 20% at room temperature for 30 min. In SDS-PAGE containing 1% SDS, active forms of different sizes were found. Treatment with β -mercaptoethanol did not dissociate the enzyme into subunits but heat treatment caused the dissociation and the complete loss of the activity.

Copyright by Mahidol University