STUDY OF ENZYME PEROXIDASE IN *HEVEA* (NATURAL RUBBER) BARK TISSUES

WICHAYA THAMWANICH

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1995

TH
WH336
1995

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสในเปลือกยางพารา
ผู้วิจัย วิชยา ธรรมวณิช
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, Ph.D
ประหยัด โกมารทัต, Ph.D
รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล, Ph.D
วันที่สำเร็จการศึกษา 31 มีนาคม พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่พบในสารละลายสกัดจากเปลือกยาง เป็นโปรตีนที่ประกอบขึ้นด้วยเปปไทด์สายเดี่ยว เอนไซม์นี้ถูกสกัดให้บริสุทธิ์ได้โดยการแยกด้วย Sephadex G-100 คอลัมน์ และ DEAE-Cellulose คอลัมน์ หลังจากศึกษาคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์แล้ว พบว่าเอ็นไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45 กิโลดาลตัน สามารถทำงานได้ดีในภาวะ pH ประมาณ 5.5-8 และในอุณหภูมิประมาณ 25-45°C นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้สามารถ ทนทานต่อ pH ได้ถึง 8 และทนทานต่ออุณหภูมิได้ถึง 60°C เนื่องจากเอ็นไซม์ชนิดนี้เป็น เอ็นไซม์ที่มี Heme เป็นองค์-ประกอบ ดังนั้นสารไซยาไนด์และโซเดียมเอไซด์จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์ยังถูกยับยั้งได้โดยไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์ปริมาณสูงอีกด้วย

จากการศึกษาชนิดของ substrate ที่มีความจำเพาะต่อการทำปฏิกริยาของเอนไซม์พบ ว่าสาร 4-Aminoantipyrine (4-AA) เป็น substrate ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ตรวจสอบ การเกิดปฏิกริยาของเอนไซม์ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีความจำเพาะสูง ตัวสารมีความเสถียรสูง และ เป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดอันตราย

จากการศึกษาการเกิดปฏิกริยาของเอนไซม์ในสภาวะที่มีสารละลาย organic และสารละลาย Detergent ในความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ในภาวะที่มีสารละลาย Organic และสารละลาย Detergent ในปริมาณต่ำ และเอนไซม์นี้ยังมีความทนทานต่อ สารละลายแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ได้ดี ส่วนสารละลาย Detergent ที่มีผลต่อการทำงานของ เอนไซม์มากที่สุดคือ Sodium dodecyl sulfate (SDS).

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Study of Enzyme Peroxidase in *Hevea* (Natural Rubber) Bark Tissues

Name Wichaya Thamwanich

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisor Committee

Dhirayos Wititsuwanakul, Ph.D.

Prayad Komaratat, Ph.D.

Rapepun Wititsuwanakul, Ph.D.

Date of Graduation 31 March B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

A high active soluble peroxidase has been purified from *Hevea bark (Hevea brasiliensis*) by using 2-phase separation, Sephadex G-100 column and DEAE-cellulose column. At the final step, 185-fold purification and 16% yield of the enzyme was achieved. *Hevea* bark peroxidase is a glycoprotein with a molecular weight of 45,000 as determined by Sephadex G-100 column and SDS-PAGE.

Hevea bark peroxidase contains heme group as a prosthetic group. Therefore, it was inhibited by typical hemoprotein inhibitors KCN and NaN_3. It was also inhibited by high concentration of H_2O_2.

K_m values of *Hevea* bark peroxidase were 0.58 x 10^{-3} M for 2, 2-Azino-bis -(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 0.86 x 10^{-3} M for 4-Aminoantipyrine (4-AA), 1.67 x 10^{-3} M for 3, 3- Diaminobenzidine (DAB), 3.68 x 10^{-3} M for o-

Copyright by Mahidol University

phynalenediamine (OPD). K_m values for H_2O_2 of the enzyme were 0.15 x 10^{-3} M for ABTS, 0.25 x 10^{-3} M for OPD.

The enzyme was relatively stable at the temperature ≤ 60°C and in the range of pH 5.5 to pH 8.0. The optimal temperature of the enzyme was in the range of 25°C to 45°C and the optimum pH of the enzyme was in the range of pH 5 to pH 7.

Copyright by Mahidol University