21 JUN 1994

CHEMICAL MODIFICATION OF CASSAVA LINAMARASE

PANTIPA SUBHASITANONT

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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

Copyright by Mahidol University

26743

ชื่อวิทยานิพนธ์ การดัดแปลงทางเคมีของเอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลัง
ผู้วิจัย พันทิพา สุภาษิตานนท์
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
มนตรี จุฬาวัฒนทล, Ph.D.
ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D.
บุรชัย สนธยานนท์, Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา 25 มีนาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

การดัดแปลงทางเคมีในเอนไซม์ลินามาเรส ที่สกัดจากก้านใบของมันสำปะหลังในสภาวะที่ไม่รุนแรง พบว่าเมื่อดัดแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนกลุ่มคาร์บอกซิล ทริปโตเฟน ฮิสติดีน ไทโรซีน และอาร์จินีนแล้ว เบต้ากลูโคซิเดสหรือลินามาเรส และเบต้าฟิวโคซิเดสแอคทิวิตี้จะสูญหายไป ส่วนการดัดแปลงกรดอะมิโนไลซีนมีผลต่อเบต้ากลูโคซิเดสหรือลินามาเรสเท่านั้น พบว่าการสูญเสียของแอคทิวิตี้ทั้งสองจะลดลง เนื่องจากการดัดแปลงกรดอะมิโนกลุ่มคาร์บอกซิล ทริปโตเฟน ฮิสติดีน เมื่อมีตัวยับยั้งแบบแข่งขันซึ่งในที่นี้ คือ เดลต้ากลูโคโนแลคโทนจับอยู่กับเอนไซม์ แต่เดลต้ากลูโคโนแลคโทนจะไม่มีผลต่อการสูญเสียของลินามาเรสแอคทิวิตี้ เมื่อทำการดัดแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนไทโรซีน ไลซีน และอาร์จินีน นอกจากนี้เดลต้ากลูโคโน-แลคโทน ยังลดการสูญเสียของเบต้าฟิวโคซิเดสแอคทิวิตี้เมื่อทำการดัดแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนไทโรซีน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการไดอะไลซิสแล้ว พบว่าการสูญเสียของเบต้าฟิวโคซิเดสแอคทิวิตี้นี้ไม่ลดลง จากข้อมูลเหล่านี้

Copyright by Mahidol University

แสดงให้เห็นว่ากลุ่มคาร์บอกซิล ทริปโตเฟน ฮิสติดีน มีส่วนเกี่ยวข้องอยู่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์โดยอิเลคโตรโฟเรซิสในสภาวะไม่เสียสภาพ เพื่อศึกษาถึงผลของการดัดแปลงทางเคมีที่มีต่อโครงสร้างของเอนไซม์ พบว่าการดัดแปลงกรดอะมิโนกลุ่มคาร์บอกซิล จะได้แถบของเอนไซม์ซึ่งเคลื่อนที่ได้ช้า เสนอแนะว่า ประจุลบของเอนไซม์อาจลดลง เนื่องจากการดัดแปลงกรดอะมิโนนี้ ส่วนการดัดแปลงทริปโตเฟนได้รูปแบบของแถบเอนไซม์เหมือนเดิม แต่เมื่อทำการดัดแปลงกรดอะมิโนฮิสติดีน ไทโรซีน และอาร์จินีน อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้ประจุลบสุทธิเพิ่มขึ้น หรืออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง ทำให้ประจุลบแสดงออกมาอยู่บริเวณด้านนอกมากขึ้น เป็นผลทำให้แถบของเอนไซม์เคลื่อนที่เร็วขึ้น

การทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของการดัดแปลงทางเคมี ที่มีต่อขนาดของโมเลกุลในเอนไซม์ลินามาเรส โดยใช้ Superose 6 column และ FPLC พบว่าหลังจากทำการดัดแปลงกรดอะมิโนกลุ่มคาร์บอกซิล ทริปโตเฟน ฮิสติดีน ไทโรซีน ไลซีน และอาร์จินีนแล้ว ขนาดของโมเลกุลยังคงอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับเอนไซม์ก่อนทำการดัดแปลง คือ อยู่ที่ขนาดของโมเลกุลระหว่าง 440,000 และ 2,000,000 แต่หลังจากทำการดัดแปลงไลซีนแล้ว พบเพียงการจับกลุ่มของหน่วยย่อยเป็นโมเลกุลขนาด 440,000 ดาลตัน แต่ไม่พบการจับกลุ่มของหน่วยย่อยเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่านี้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Chemical Modification of Cassava Linamarase
Name	Pantipa Subhasitanont
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisor Committee	
	Montri Chulavatnatol, Ph.D.
	Jisnuson Svasti, Ph.D.
	Burachai Sonthayanon, Ph.D.
Date of Graduation	25 March B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

Chemical modifications of linamarase from cassava petiole were carried out under mild conditions. Loss of β-glucosidase (linamarase) and β-fucosidase activities was observed when modifications were made on carboxyl, tryptophan, histidine, tyrosine and arginine residues. However, modification of lysine only affected the β-glucosidase (linamarase) but not β-fucosidase activity. The loss of both activities due to the modifications of carboxyl, tryptophan and histidine residues was reduced in the presence of a competitive inhibitor, δ-gluconolactone. However, δ-gluconolactone has no effect on the loss of linamarase activity due to the modification of lysine, arginine or tyrosine. In addition, δ-gluconolactone decreased the loss of β-fucosidase activity due to tyrosine modification. However, it showed no reduction on the loss of β-fucosidase activity after dialysis. These data suggested that carboxyl (aspartic and glutamic acids), tryptophan

Copyright by Mahidol University

and histidine residues were located at the active site of cassava linamarase.

By non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, effects of the chemical modifications on the enzyme structure were studied. The modification of carboxyl groups gave a smear of slow moving bands suggesting that the surface negative charges were reduced by the modification. Modification of tryptophan did not change the ladder-like pattern of bands in the gel. However, the modifications of histidine, tyrosine, lysine and arginine induced more net negative charges or structural changes to expose more negative charges on the enzyme and hence the enzyme bands that moved faster.

The effects of chemical modifications on the molecular size of linamarase were investigated using a Superose 6 column and FPLC. After modification of carboxyl, tryptophan, histidine, tyrosine, lysine or arginine residues, the molecular size of the enzyme remained in the same range as that of unmodified enzyme, MW = 440,000-2,000,000. However, after lysine modification, the large molecular aggregates were not found, only the aggregate of 440,000 was present.

Copyright by Mahidol University