-5 AUG 1999

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE ISOZYMES OF CASSAVA LINAMARASE

KANNIKA SERMSUVITAYAWONG

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

With compliments
of
ปรีชา กาวิโกศัย ม.มหิดล

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright by Mahidol University

310730

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ลินามาเรสจาก มันสำปะหลัง

ผู้วิจัย กรรณิกา เสริมสุวิทยวงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D.

มนตรี จุฬาวัฒนพล, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา

28 พฤษภาคม พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

จากการศึกษาโครงสร้างของลินามาเรสที่ถูกสกัดและทำให้บริสุทธิ์จากส่วนของก้านใบ ลำต้นและเปลือกของราก พบว่าลินามาเรสมีขนาดโมเลกุลในภาวะที่ไม่เสียสภาพประมาณ 600,000-2,000,000 ดาลตันโดยโครมาโตกราฟีในเซฟาโรส 4บี และเมื่อใช้ SDS กับความร้อนทำให้เสียสภาพหน่วยย่อยมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 63,000 ดาลตันโดย SDS-PAGE โครงสร้างของลินามาเรสจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 แหล่งในภาวะที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วยกรดและยูเรียทั้งที่มีและไม่มี triton X-100 ร่วมปรากฏเป็นแถบโปรตีนเพียง 1 แถบในตำแหน่งเดียวกัน จากผลการทดลองให้ข้อเสนอแนะว่าลินามาเรสประกอบด้วยโพลีเปปไทด์เพียง 1 ชนิด

การศึกษาโครงสร้างของลินามาเรสโดยอิเลคโตรโฟเรซิสในสภาวะไม่เสียสภาพ พบว่า ลินามาเรสให้รูปแบบของแถบโปรตีนและเอนไซม์ เป็นจำนวนมากกว่า 6 แถบในโพลีอะครีลาไมด์และรูปแบบนี้ไม่พบเมื่อศึกษาโดยอิเลคโตรโฟเรซิสบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตที่ไม่มี sieving effect นอกจากนี้รูปแบบของแถบโปรตีนและเอนไซม์ที่พบบน PAGE ในสภาวะไม่เสียสภาพยังปรากฏกับลินามาเรสที่สกัดใหม่ๆด้วย ผลการทดลองเสนอแนะว่าลินามาเรสสามารถจับกลุ่มเป็นโมเลกุลหลายๆขนาดและภาวะการจับกลุ่มนี้อาจพบในมันสำปะหลังในธรรมชาติ เมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่าการจับกลุ่มของหน่วยย่อยของลินามาเรสมักเป็นจำนวน

Copyright by Mahidol University

คู่เช่น 4, 6, 8, 10 เป็นต้น และการแตกตัวและรวมตัวของกลุ่มเหล่านี้เป็นกลุ่มที่เล็กลงหรือใหญ่เกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อยในอิเลคโตรโฟเรซิสบนอะครีลาไมด์ใน 2 ทิศทางที่ทำมุมฉากกัน ข้อมูลที่ได้จากการแยกลินามาเรสที่จับกลุ่มเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และที่จับกลุ่มเป็นโมเลกุลขนาดเล็กโดยโครมาโตรกราฟีในเซฟาโรส 4บี และจากการแสดงถึงผลกระทบของยูเรียต่อภาวะการจับกลุ่มของลินามาเรสให้ข้อเสนอแนะว่าลินามาเรสอาจต้องจับกลุ่มในขนาดที่พอเหมาะเพื่อก่อให้เกิดความจำเพาะต่อลินามารินซึ่งเป็นสารตั้งต้นธรรมชาติ

เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของไอโซไซม์ทั้ง 3 ชนิดที่ปรากฏในโครมาโตรโฟกัสซิ่งได้นำลินามาเรสจากเนื้อเยื่อ 3 แหล่งไปวิเคราะห์โดยไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่งในอากาโรส พบว่าลินามาเรสที่บริสุทธิ์จากส่วนก้านใบและลำต้นให้แถบโปรตีนที่มี pI 4.6 และจากส่วนเปลือกของรากให้แถบโปรตีนอยู่ชิดกัน 2 แถบซึ่งมี pI 4.5-4.6 ผลการวิเคราะห์ไอโซไซม์ 3 ชนิดที่แยกด้วยโครมาโตรโฟกัสซิ่งที่ pH 4.3, 3.3 และ 2.9 โดยไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่งปรากฏว่าไอโซไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีรูปแบบของแถบโปรตีนที่ pI เดียวกัน ในการศึกษาเพิ่มเติมในภาวะไม่เสียสภาพโดย PAGE ให้ข้อเสนอแนะว่ารูปแบบที่พบในโครมาโตรโฟกัสซิ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของลินามาเรสที่มีการจับกลุ่ม

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางกรดอะมิโนพบว่าลินามาเรสจากก้านใบ ลำต้น และเปลือกของรากประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งชนิดและสัดส่วนที่คล้ายกัน นอกจากนั้นปริมาณของกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นกรดมีปริมาณสูงประมาณ 2 เท่าของที่มีแขนงข้างเป็นเบสซึ่งสอดคล้องกับ pI ของลินามาเรสซึ่งอยู่ในช่วงกรด และปริมาณของกรดอะมิโนชนิด hydrophobic นั้นมีปริมาณเกือบ 50% ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

Copyright by Mahidol University

Thesis Title THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE ISOZYMES OF CASSAVA LINAMARASE

Name Kannika Sermsuvitayawong

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Jisnuson Svasti, Ph.D.

Montri Chulavatnatol, Ph.D.

Date of Graduation 28 May B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

Purified linamarase (EC.3.2.1.21) from cassava petiole, stem and root cortex were shown to have native M_r of 600,000 - 2,000,000 on Sepharose 4B chromatography. Structure was analysed by electrophoresis under both denaturing and non-denaturing conditions. Linamarase from all three sources showed subunit M_r of about 63,000 after denaturation by 1% SDS and heat. Analysis of the enzyme in acid-urea gels and triton-acid-urea gels showed that linamarase gave the same single band for enzyme from three sources, suggesting linamarase consisted of a single peptide chain.

On isoelectric focusing in agarose gels without denaturing agent, linamarase from petiole and stem gave one major (pI 4.6) band, while linamarase from root cortex gave a double band (pI 4.5-4.6). Under non-denaturing conditions, the purified linamarase appeared as a ladder pattern with more than 6 active bands in alkaline PAGE but failed to show a ladder pattern, appearing as a single broad band in cellulose acetate electro-

Copyright by Mahidol University

phoresis. Since the latter has no sieving effect, these results suggested that linamarase is present as aggregates with various MW sizes. The presence of a ladder pattern in fresh extract was confirmed and suggested the possibility that such aggregates existed in vivo, with the prominents forms consisting of even subunit numbers, namely 4, 6, 8, 10 and larger multiples. On 2 dimensional non-denaturing PAGE, stem linamarase showed little interconversion of aggregated forms. Data obtained from the partial separation of high MW forms and low MW forms on Sepharose 4B chromatography and demonstration of effect of urea on linamarase aggregates suggest that existence of linamarase aggregates of appropriate size are needed for improved specificity towards linamarin.

Re-evaluation of the different forms eluted at different pH (pH 4.3, 3.3 and 2.9 on chromatofocusing showed no diff- isoelectric focusing, suggesting that all three forms may have the same pI. In addition, the pattern obtained on non-denaturing PAGE suggested that the different chromatofocusing forms may be due to the differences in aggregate size.

Amino acid analysis showed no difference between linamarase from the three tissues. The composition showed that the content of acidic amino acids (Glx + Asx) was double the content of basic amino acids (Lys + Arg + His), consistent with the enzyme's low pI. Furthermore, the content of hydrophobic amino acids (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Tyr) was high and approached 50 % of the total amino acids.

Copyright by Mahidol University