002242

CENTRAL LIBRARY
MIDOL UNIVERSITY

THE STUDIES OF URATE OXIDASE AND DIAMINE OXIDASE IN PLANTS

BY

UTAIWAN THAMRONGYOUTH
(B.Sc. IN BIOCHEMISTRY)

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

IN THE
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
OF
MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1987

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเอนไซม์ urate oxidase และ diamine oxidase ในพืช

ผู้วิจัย อุทัยวรรณ ธำรงยุทธ

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ดร.พิชิต โตสุโขวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.ภิญโญ พานิชพันธ์

ดร.พิณทิพ รื่นวงษา

วันที่สำเร็จการศึกษา 20 สิงหาคม 2530

บทคัดย่อ

Urate oxidase เป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในการหาปริมาณกรดยูริค ได้สำรวจเอนไซม์ในพืชหลายชนิดโดยการวัดการสลายตัวของกรดยูริคด้วยการวัดแสง และได้พบว่าพืช 2 ชนิด สลายกรดยูริคได้ คือ ถั่วงอกจากถั่วเหลืองมีปริมาณเอนไซม์สูงและมีจำนวนน้อยในมันแกว เมื่อวิเคราะห์โดยใช้วิธีวัด H_2O_2 ซึ่งเป็นผลิตผลจากเอนไซม์ ปรากฏว่าเอนไซม์นี้ไม่ขึ้นกับสับสเตรทยูเรต แต่ขึ้นกับ cadaverine ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่ urate oxidase แต่เป็น diamine oxidase

Diamine oxidase มีประโยชน์หลายอย่างโดยเฉพาะการหาปริมาณพวก diamine จึงศึกษาเปรียบเทียบ diamine oxidase จากถั่วงอกของถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับถั่วงอกจากเมล็ดถั่วลันเตา พบว่าขนาดโมเลกุลประมาณ 180,000 ดาลตัน เหมือนกัน สับสเตรท cadaverine ถูกออกซิไดส์อย่างรวดเร็วโดย diamine oxidase จากถั่วงอกของถั่วเหลือง ส่วน putrescine ถูกออกซิไดส์อย่างรวดเร็ว โดย diamine oxidase จากถั่วงอกของถั่วลันเตา diamine oxidase จากถั่วทั้งสองชนิด ถูกยับยั้งโดย diethyldithiocarbamate,

Copyright by Mahidol University

α,α'-dipyridyl และ phenylhydrazine diamine oxidase จากถั่วงอกของถั่วเหลือง และถั่วลันเตา มีช่วงอุณหภูมิที่คงทนได้ 0-45 องศาเซนติเกรด และอุณหภูมิที่เหมาะต่อการทำงานของ diamine oxidase จากถั่วงอกของถั่วเหลืองคือ 45 องศาเซนติเกรด และจากถั่วลันเตา 40 องศาเซนติเกรด pH ที่เหมาะสำหรับการทำงานที่ pH 7.5

สรุป diamine oxidase จากถั่วงอกของถั่วเหลืองและถั่วลันเตามีคุณสมบัติทางฟิสิคส์และชีวเคมีคล้ายกัน มีสมบัติเหมาะสมที่จะใช้เป็นเอนไซม์หาปริมาณ diamine ชนิดต่าง ๆ ได้ diamine oxidase จากถั่วเหลืองอาจจะได้เปรียบกว่าถั่วลันเตาในด้านความสะดวกและต้นทุนของการเพาะถั่วงอก

Copyright by Mahidol University

Thesis Title: The Studies of Urate Oxidase and Diamine Oxidase in Plants

Name: Utaiwan Thamrongyouth

Degree: Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee:

Pichit Tosukhowong, Ph.D. Major advisor

Bhinyo Panijpan , Ph.D.

Pintip Ruengwongsa, Ph.D.

Date of Graduation: August 20, 1987

ABSTRACT

Urate oxidase is useful in the enzymatic determination of uric acid. The source of this enzyme in various plants was investigated. Urate oxidase in various vegetable was assayed by using the decrease in absorbance of uric acid method and it was detected in two kinds of vegetables. High level of urate degrading activity was found in soybean seedlings, and a small amount in yam bean. By analysing the products of enzyme reaction, the urate degrading enzyme in soybean seedlings was not dependent on urate, but it was dependent on cadaverine. This result showed that urate degrading activity in soybean was not a urate oxidase but it was a diamine oxidase.

Diamine oxidase has several potential applications, especially in the determination of diamines. The only commercial source of diamine oxidase is pea diamine oxidase. The soybean diamine oxidase was

Copyright by Mahidol University

therefore studied in comparison to pea diamine oxidase. Soybean and pea diamine oxidase were partially purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-200 gel filtration. The specific activity of soybean diamine oxidase obtained was about 40 U/mg and 8 U/mg for pea diamine oxidase. Both enzyme have a similar size about 180,000 D as determined by Sephadex G-200 column chromatography. The enzyme activity for various substrates analoques were compared. Cadaverine was the compound most rapidly oxidized by soybean diamine oxidase. Putrescine was the compound most rapidly oxidized by pea diamine oxidase. Soybean and pea diamine oxidases both were strongly inhibited by diethyldithiocarbamate, α,α'-dipyridyl and phenylhydrazine. Apparent K_m values for cadaverine of soybean diamine oxidase was 46.5 μM and 77.3 μM for pea diamine oxidase. Both soybean and pea diamine oxidase was stable at temperature from 0 to 45^{o}C. The optimum temperature of soybean diamine oxidase was about 45^{o}C and that for pea diamine oxidase was 40^{o}C. The pH optimum was about pH 7.5 for both soybean and pea diamine oxidase.

It can be concluded that soybean diamine oxidase is similar to pea diamine oxidase in physical and biochemical properties. Soybean diamine oxidase may be more advantageous than pea diamine oxidase in that the source is readily available, higher specific activity in the crude homogenate. The disadvantage is that it has only about a half of enzyme activity per gram wet weight in comparison to pea diamine oxidase.

Copyright by Mahidol University