



**SEPARATION, CHARACTERIZATION, AND SPECIFICITY
STUDY OF α -MANNOSIDASES FROM
*VIGNA UMBELLATA***

PATJARAPORN WONGVITHOONYAPORN

**With compliments
of**

Patjaraporn Wongvithoonyaporn

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1997

ISBN 974-589-112-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

๕๘๐๐๖
๒๒๙

SCBC/D 3231008 : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; Ph.D. (BIOCHEMISTRY)
 KEY WORD : HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY /
 MANNOSIDASE / SPECIFICITY / SYNTHESIS / *VIGNA*
UMBELLATA

PATJARAPORN WONGVITHOONYAPORN : SEPARATION,
 CHARACTERIZATION, AND SPECIFICITY STUDY OF α -MANNOSIDASES FROM
VIGNA UMBELLATA. THESIS ADVISOR : M.R. JISNUSON SVASTI Ph D., PICHIT
 TOSUKHOWONG Ph.D., YODHATHAI THEBTARANONTH Ph.D., RUDEE SURARIT
 Ph.D. 260 p. ISBN 974-589-112-6.

Two α -mannosidases (EC 3.2.1.24), I and II, were isolated from *Vigna umbellata* by dialysis against 0.02 M glycine-sodium hydroxide buffer, pH 10.0, then chromatographed on DEAE-cellulose, hydroxyapatite, CM-cellulose (NaCl gradient), Sephacryl HR S-300, and CM-cellulose (pH gradient) column. The native molecular weight of both isozymes is estimated to be 297 – 329 kDa, but pIs of form I are 5.03 – 5.34 while pIs of form II are 5.46 – 6.20. Optimal pH and temperature of both isozymes for assaying with *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside (*p*NP- α -Man) are at pH 4.2 and 60°C. The α -mannosidase activity from this source is lost after dialysis against 1 mM EDTA at acidic pH but not at neutral or alkaline pH. Zn²⁺ is the essential metal ion for its activity and can stabilise the enzyme activity when stored at acidic pH, while FeCl₂, FeCl₃, and MnCl₂ inhibit enzyme activity. The enzyme is stable at very broad pH and at temperature 30° – 40°C. Effect of swainsonine and 1-deoxymannojirimycin on both isozymes are similar in that both isozyme activities are completely inhibited by swainsonine but only by about 22 – 27 % by 1-deoxymannojirimycin. However, the α -mannosidase II has lower K_m than α -mannosidase I for both *p*NP- α -Man and Man α (1-2)Man. Study of specificity of both α -mannosidases from *Vigna umbellata* reveals that these enzymes are most specific towards Man α (1-2)Man in both hydrolysis and synthesis. However, the hydrolytic specificity towards Man α (1-3)[Man α (1-6)]Man of the two isozymes are different in that α -mannosidase II can produce Man α (1-3)Man more than Man α (1-6)Man, but vice versa for α -mannosidase I. Variation of synthesis conditions does not change the synthetic specificity which is towards Man α (1-2)Man. Optimal conditions for mannobiose synthesis of 0.5 U/ml *Vigna* α -mannosidase are 70 % (w/v) mannose incubated at 60°C and pH 4.0. In the presence of mannose (10 % – 80 % (w/v)) at temperature less than 50°C, pH 4.0 – 10.0, the *Vigna* α -mannosidase is more stable than without mannose.

SCBC/D 3231008 : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; ปร.ด. (ชีวเคมี)

ศัพท์สำคัญ : วิธีการโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวแบบที่มีประสิทธิภาพสูง /

แมนโนซิเดส / ความจำเพาะ / การสร้างน้ำตาล / *VIGNA UMBELLATA*

กัชรินทร์ วงศ์วิฑูรยาพร : การแยกและการศึกษาคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจาก *VIGNA UMBELLATA* (SEPARATION, CHARACTERIZATION, AND SPECIFICITY STUDY OF α -MANNOSIDASES FROM *VIGNA UMBELLATA*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ม.ร.ว. ชัยนุสรณ์ สวัสดิวัตน์, Ph.D., พิชิต โทสุโขวงศ์, Ph.D., ยอดทภัย เทพธรรานนท์, Ph.D., อุติ สุราฤทธิ, Ph.D. 260 หน้า. ISBN 974-589-112-6.

ทำการสกัดเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสสองชนิดจากถั่วแดง (*Vigna umbellata* (Ohwi & Ohashi) HC)) โดยวิธีการโคอะไลซ์กับบัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ค่าพีเอช 10.0 และวิธีการทางโครมาโตกราฟีด้วยดีไอเอซี-เซลลูโลส, ไฮดรอกซีเอปโปไทด์, ซีม-เซลลูโลส (โดยวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของกลีโคไซด์), เซฟาคริล เอช-อาร์ เอส-300, และซีเอ็ม-เซลลูโลส (โดยวิธีการเพิ่มค่าพีเอช) นำหนักโมเลกุลในรูปที่ทำงานได้ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าประมาณ 297 – 329 กิโลดาลตัน แต่ค่าพีไอของเอนไซม์ชนิดที่ I อยู่ที่ค่า 5.03 – 5.34 ขณะที่ค่าพีไอของเอนไซม์ชนิดที่ II อยู่ที่ค่า 5.46 – 6.20 ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการย่อยสลายสับสเตรทพารา-ไนโตรเฟนิล-อัลฟา-D-แมนโนไพแรนโนไซด์คือค่าพีเอช 4.2 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากถั่วแดงสูญเสียไปเมื่อโคอะไลซ์กับ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าพีเอชมีความเป็นกรด แต่ไม่พบการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชมีความเป็นกลางหรือเป็นด่าง Zn^{2+} เป็นไอออนโลหะที่มีความสำคัญต่อแอคติวิตีและยังสามารถทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์มีความเสถียรได้เมื่อเก็บเอนไซม์ที่ค่าพีเอชมีความเป็นกรด ในขณะที่ $FeCl_2$, $FeCl_3$, และ $MnCl_2$ จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงค่าพีเอชกว้างและที่อุณหภูมิ 30 – 40 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าตัวยับยั้งสเวนโซนินและ 1-คีออกซีแมนโนจิรีโมจีนให้ผลต่อเอนไซม์ทั้งสองคล้ายคลึงกันคือสเวนโซนินจะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองได้หมด ขณะที่ 1-คีออกซีแมนโนจิรีโมจีนจะยับยั้งได้ประมาณ 22 – 27 % ถึงอย่างไรก็ตามเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสชนิดที่ II มีค่า K_m สำหรับสับสเตรทพารา-ไนโตรเฟนิล-อัลฟา-D-แมนโนไพแรนโนไซด์และอัลฟา(1-2)-แมนโนไพไรโอสต่ำกว่าเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสชนิดที่ I จากการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสทั้งสองชนิดพบว่า เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความจำเพาะของทั้งการสร้างน้ำตาลและการสลายสับสเตรทต่ออัลฟา(1-2)-แมนโนไพไรโอสมากที่สุด แต่ความจำเพาะของการสลายสับสเตรทอัลฟา(1-3)และอัลฟา(1-6)-แมนโนไพไรโอสที่มีสาขาของทั้งสองเอนไซม์แตกต่างกันโดยที่เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสชนิดที่ II จะให้ผลผลิตเป็นอัลฟา(1-3)-แมนโนไพไรโอสมากกว่าอัลฟา(1-6)-แมนโนไพไรโอส แต่กลับกันสำหรับเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสชนิดที่ II การเปลี่ยนสภาวะการสร้างน้ำตาลจะไม่เปลี่ยนความจำเพาะของเอนไซม์ซึ่งมีต่ออัลฟา(1-2)-แมนโนไพไรโอส สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างแมนโนไพไรโอสของเอนไซม์ความเข้มข้น 0.5 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร คือ ในน้ำตาลแมนโนสที่ความเข้มข้น 70 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 4.0 ในสภาวะที่มีน้ำตาลแมนโนส (10 % – 80 % น้ำหนักต่อปริมาตร) และที่อุณหภูมิน้อยกว่า 50 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 4.0 – 10.0 แอคติวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากถั่วแดงจะมีความเสถียรมากกว่าในสภาวะที่ไม่มีน้ำตาลแมนโนส.