



**COMPARATIVE STUDY OF α -HYDROXYNITRILE LYASES
FROM DIFFERENT TISSUES OF CASSAVA**

KRITTAYA PETCHPOUNG

With compliments
of
บัณฑิตเอกพงศ์ทวี ม. มนต์

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1998

ISBN 974-661-336-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
200
1998

3836500 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

KEY WORD : α -HYDROXYNITRILE LYASE/CASSAVA/MODIFICATION

KRITTAYA PETCHPOUNG : COMPARATIVE STUDY OF α -HYDROXYNITRILE LYASES FROM DIFFERENT TISSUES OF CASSAVA.
THESIS ADVISOR: MONTRI CHULAVATNATOL, Ph.D., JISNUSON SVASTI,
Ph.D. 96 p. ISBN 974-661-336-7

In the cyanogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.), α -Hydroxynitrile lyase (HNL) catalyses the dissociation of acetone cyanohydrin derived from linamarin into acetone and toxic hydrogen cyanide. The purified HNL from young cassava leaf showed a specific activity of 46.84 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ while that from cassava stem had a specific activity of 4.90 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. The purification steps consisted of 60-80% ammonium sulfate precipitation, followed by gel filtration chromatography using a Sephacryl S-300 column and anion-exchange fast protein liquid chromatography using a Q-Sepharose column. The native molecular weight of HNL from young leaf was found to be 125,000 by using Sephadex G-200 column but that of the enzyme from stem was found to be 89,000. The subunit molecular weight was estimated to be 30,000 by SDS-PAGE for both young leaf and stem enzymes. Therefore, HNL from young leaf was homotetrameric but HNL from stem was homotrimeric. Modifications of arginine, cysteine, histidine, serine and tryptophan residues of HNL each caused a nearly complete loss of the enzyme activity. However, modifications of carboxyl, lysine and tyrosine each caused less loss of the HNL activity than the losses due to modification of other residues. In addition, glycine ethyl ester which was used in the carboxyl residue modification was inhibitory to HNL activity by itself. The loss of activity due to the modifications of arginine and serine residues was reduced in the presence of a competitive inhibitor. These data suggest that arginine and serine are important in catalytic site of HNL. Since HNLs from cassava leaf, stem and petiole are similarly affected by each modifying reagent, their active sites should have the same residues.

3836500 SCBC/M : MAJOR : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

KEY WORD : อัลฟา-ไฮดรอกซีไนโตรไลเอส/มันสำปะหลัง/การตัดแปลง

กฤตยา เพชรผึ้ง : การเปรียบเทียบเอนไซม์ อัลฟา - ไฮดรอกซีไนโตรไลเอสจากเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของมันสำปะหลัง (Comparative study of α -hydroxynitrile lyases from different tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) อาจารย์ที่ปรึกษา : มนตรี จุฬาวัฒนทล Ph.D., ชัยณูสรร สวัสดิวัตน์ Ph.D. 96 หน้า ISBN 974-661-336-7

อัลฟา - ไฮดรอกซีไนโตรไลเอส (HNL) เร่งการแตกตัวของอะซีโตนไฮยาโนไฮดรินที่ได้จากกลีนามารินไปเป็นอะซีโตนและไฮโดรเจนไฮยาโนด์ ซึ่งเป็นพิษในกระบวนการไฮยาโนจีนีซิสในมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เอนไซม์ HNL ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์จากใบอ่อนของมันสำปะหลังมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 46.84 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ขณะที่เอนไซม์นี้จากลำต้นมันสำปะหลังมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 4.90 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ประกอบด้วย การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 60-80% อิมัตตามด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีบนคอลัมน์เซฟพลริลเอส-300 และ FPLC โดยใช้คอลัมน์ anion exchange Q-Sepharose จากการใช้คอลัมน์เซฟเพดจ์จี-200 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ HNL จากใบอ่อนเป็น 125,000 แต่เอนไซม์จากลำต้นเป็น 89,000 น้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยโดยใช้ SDS-PAGE ถูกประมาณว่าเท่ากับ 30,000 ทั้งในเอนไซม์จากใบอ่อนและลำต้น ดังนั้นเอนไซม์ HNL จากใบอ่อนประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่เอนไซม์จากลำต้นประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย การตัดแปลงในแต่ละกลุ่มอาร์จินีน ฮิสเตอีน ฮิสติดีน ซีรีน และทริปโตเฟน ในเอนไซม์ HNL ก่อให้เกิดการลดลงของเกือบสมบูรณ์ของแอกทิวิตีของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามการตัดแปลงกลุ่มคาร์บอกซิล ไลซีนและไทโรซีน ก่อให้เกิดการลดลงของเอนไซม์ HNL น้อยกว่าการตัดแปลงของกลุ่มอื่น ๆ นอกเหนือจากนั้น ไกลซีนเอซิลเอสเทอร์ ซึ่งถูกใช้ในการตัดแปลงกลุ่มคาร์บอกซิล ยังเป็นตัวยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์ HNL ด้วยตัวของมันเองอีกด้วย การลดลงของแอกทิวิตีเนื่องจากการตัดแปลงของแต่ละกลุ่มอาร์จินีน และซีรีนถูกทำให้ลดลงในขณะที่มีตัวยับยั้งแบบแข่งขัน ข้อมูลนี้เสนอว่าอาร์จินีนและซีรีนมีความสำคัญในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ HNL โดยเหตุที่แต่ละสารตัดแปลงมีผลต่อเอนไซม์ HNL จากใบ ลำต้น และก้านใบของมันสำปะหลังเหมือน ๆ กัน เพราะฉะนั้นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของมันควรจะมียูนิทเหมือน ๆ กัน