29 OCT 1999

CHARACTERIZATION OF CASSAVA ROOT PROTEINS : ALBUMIN AND GLOBULIN

JARIYA SUKHAPAN

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1999

ISBN 974-662-906-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

43124 e.1

3936081 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : MAJOR PROTEIN / CASSAVA
MANIHOT ESCULENTA CRANTZ

JARIYA SUKHAPAN : CHARACTERIZATION OF CASSAVA ROOT PROTEINS : ALBUMIN AND GLOBULIN. THESIS ADVISORS : MONTRI CHULAVATNATOL, Ph.D., JISNUSON SVASTI, Ph.D. 111 p. ISBN 974-662-906-9

Globulin, the major protein band from cortex of cassava root, was purified by using ammonium sulfate fractionation, gel filtration, and ion exchange chromatography. The subunit MW determined by SDS-PAGE of cassava globulin was 67 kDa, and its native MW estimated by gel filtration was larger than 1,500 kDa. It was glycoprotein containing 31.2% (w/w) neutral sugar. Under non-denaturing conditions, the globulin appeared as a ladder pattern consisting of more than 6 bands in PAGE. Globulin had pI values of 4.6. Electrophoresis of the globulin in triton-acid-urea gel showed a single band, suggesting that the globulin consisted of a single peptide chain. Its amino acid composition revealed that the sum of acidic amino acids (Asx and Glx) was about two times greater than the sum of basic amino acids. (Lys, Arg and His). Moreover, hydrophobic amino acids (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe and Tyr) made up close to 50% at the total amino acids of the globulin.

Among the activity tests performed, the globulin had only linamarase activity with Km values for linamarin, p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside and p-nitrophenyl-β-D-fucopyranoside similar to those of the cortex linamarase.

Albumin, the major protein band from cassava root parenchyma, was purified by using ammonium sulfate fractionation, hydrophobic interaction chromatography, and gel filtration chromatography. By hydrophobic interaction chromatography, the albumin was separated into albumin I and albumin II. The subunit MW determined by SDS-PAGE of both albumins was 22 kDa. The native MW of albumin I was 232 kDa and that of albumin II was 250 kDa, as estimated by gel filtration.

Both albumin I and II were glycoproteins containing 23% and 6.9% (w/w) neutral sugar, respectively. Under non-denaturing electrophoresis, albumin I and II each showed a single band. Each had pI value of 5.4. Analysis of the albumins by electrophoresis in Triton-acid-urea gel showed that albumin I and albumin II each gave two major bands and two minor bands. This result indicated that each albumin consisted of more than one type of subunits of different hydrophobicity. Both albumins showed similar amino acid compositions. Also, in each case, the sum of basic amino acids was about two-thirds of that of acidic amino acids and the sum of hydrophobic amino acids was approximately 40% of the total amino acids.

Each albumin showed no activity under the assays for lectin, linamarase, chitinase, proteinase, or trypsin inhibitor.

3936081 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

จริยา สุขะปาน : การศึกษาสมบัติของโปรตีนอัลบูมินและกลอบูลินจากหัวมันสำปะหลัง (CHARACTERIZATION OF CASSAVA ROOT PROTEINS ALBUMIN AND GLOBULIN). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : มนตรี จุฬาวัฒนทล Ph.D., ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์ Ph.D., 111 หน้า. ISBN 974-662-906-9

กลอบูลิน ซึ่งเป็นโปรตีนหลักจากส่วนเปลือกของหัวมันสำปะหลัง นำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยเจลฟิลเตรชั่น (gel filtration) และโครมาโตกราฟีแบบแลกไอออน ผลการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่า โปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67 kDa และโดยเจลฟิลเตรชั่น พบว่า ขนาดโมเลกุลในภาวะที่ไม่เสียสภาพของกลอบูลินนั้นใหญ่กว่า 1,500 kDa กลอบูลินเป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นกลาง 3.12% โดยน้ำหนัก กลอบูลินให้รูปแบบของแถบโปรตีนเป็นลักษณะขั้นบันไดบน PAGE ในสภาวะไม่เสียสภาพ และจากการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนบน Triton-acid-urea-PAGE พบว่าได้แถบของโปรตีนเพียง 1 แถบ จากผลการทดลองให้ข้อเสนอแนะว่า กลอบูลินประกอบด้วยโพลีเปปไทด์เพียง 1 ชนิด มีค่า pI เท่ากับ 4.6 ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนพบว่า กลอบูลินมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นกรดสูงประมาณ 2 เท่าของที่มีแขนงข้างเป็นเบส และมีกรดอะมิโนชนิด hydrophobic เกือบ 50% ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

กลอบูลินมีแอคทิวิตี้ของลินามาเรส โดยมีค่า Km ของลินามาริน, p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, p-nitrophenyl-β-D-fucopyranoside ใกล้เคียงกันกับเอนไซม์ลินามาเรสที่สกัดจากส่วนเปลือกของหัวมันสำปะหลัง

อัลบูมินซึ่งเป็นโปรตีนหลักจากส่วนเนื้อของหัวมันสำปะหลัง นำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยโครมาโตกราฟีแบบ hydrophobic interaction และเจลฟิลเตรชั่น (gel filtration) อัลบูมินแยกออกเป็นโปรตีน 2 ชนิด คือ อัลบูมิน I และอัลบูมิน II ผลการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่าอัลบูมินทั้งสองมีแถบของโปรตีนที่เด่นชัดในตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22 kDa และโดยเจลฟิลเตรชั่น พบว่า อัลบูมิน I มีขนาดของโมเลกุลในภาวะที่ไม่เสียสภาพประมาณ 232 kDa ส่วน อัลบูมิน II มีขนาดประมาณ 250 kDa อัลบูมิน I และอัลบูมิน II เป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นกลาง 23% และ 6.9% ตามลำดับ อัลบูมินทั้งสองให้รูปแบบของโปรตีนเพียงแถบเดียวบน PAGE ในสภาวะไม่เสียสภาพ และจากการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนบน Triton-acid-urea-PAGE พบว่า อัลบูมินทั้งสองให้รูปแบบของโปรตีนที่เหมือนกัน คือ ได้โปรตีนแถบเข้ม 2 แถบ และโปรตีนแถบบาง 2 แถบ จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า อัลบูมินประกอบด้วยโพลีเปปไทด์มากกว่า 1 ชนิด ที่มี hydrophobicity ต่างกัน ทั้งอัลบูมิน I และ II มีค่า pI เท่ากับ 5.4 เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนพบว่าอัลบูมินทั้งสองชนิดประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งชนิดและสัดส่วนที่คล้ายกัน อัลบูมินมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นเบสประมาณ 2 ใน 3 ของกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นกรด และมีกรดอะมิโนชนิด hydrophobic เกือบ 40% ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

อัลบูมินทั้งสองชนิดไม่มีแอคทิวิตี้ของเลคติน ลินามาเรส ไคตินเนส โปรติเนส และตัวยับยั้งทริปซิน