STUDY OF PROTEASE INHIBITOR IN RUBBER LATEX

WANNAPA SRITANYARAT

ขาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2000

ISBN 974-664-138-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
W 249 ล
2000
ค.2

44766 ค.2

4036426 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M. Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : PROTEASE INHIBITOR / PLANT DEFENCES / RUBBER LATEX / PROTEASE / *HEVEA BRASILIENSIS*
WANNAPA SRITANYARAT : STUDY OF PROTEASE INHIBITOR IN RUBBER LATEX. THESIS ADVISORS: DHIRAYOS WITITSUWANNAKUL Ph.D., RAPEPUN WITITSUWANNAKUL Ph.D. 145 p. ISBN 974-664-138-7

Protease inhibitors (PI) were detected in the latex of rubber trees (*Hevea brasiliensis*). The PI was located mainly in the C-serum by screening assays with pronase while only little activity could be detected in the B-serum. Characterization of the C-serum protease inhibitor indicated that it was a thermostable protein with a very strong heat stable property. The PI in C-serum (CS-PI) was precipitated out from other proteins at a high concentration of acetone (80-95% v/v) and designated as *Hevea* protease inhibitor (HPI). It was shown as a single protein band with a calibrated subunit MW of 5.5 kD upon SDS-PAGE analyses. Heating of this HPI in boiling water for 15 and 30 min resulted in almost no PI activity loss, indicating it is a very thermostable protein with low subunit MW nature. Screening experiments on different protease classes of HPI showed that HPI was the most effective inhibitor for pronase (57.59 % enzyme activity inhibition), followed by chymotrypsin, trypsin (18.05 % and 14.47 % enzyme activity inhibition, respectively). A weaker inhibitor on papain (7.39 % enzyme activity inhibition) was observed. On the contrary, very mild PI activity was found for thermolysin inhibition (4.61% enzyme activity inhibition) and no PI activity against pepsin and protease from *Aspergillus saitoi* was observed in this comparative study. The HPI was further purified by passing through the Sephadex G-75 column. Two protein peaks with PI activity were obtained and designated as HPI-1 and HPI-2 , respectively. Calibration for subunit MW determination showed both HPI-1 and HPI-2 possess the same MW of 5.5 kD upon SDS-PAGE. By gel filtration chromatography, the native MW of HPI-1 and HPI-2 were 20.8 kD and 11.7 kD, respectively. The results thus suggested that native HPI-1 existed as tetrahomomeric form and HPI-2 existed as dihomomeric form. The PI activity for both HPI-1 and HPI-2 after heating in boiling water for 30 min was decreased to 90% and 88% of the control inhibition, respectively. Both HPI-1 and HPI-2 have quite a broad range of pH stability. No effect or loss of the PI activity was observed between pH 3-11. However, their activities were rapidly decreased to 38% inhibition (HPI-1) and 50% inhibition (HPI-2) of the control level at pH 12. The pI values were determined to be 4.24 for HPI-1 and 4.17 for HPI-2, respectively.

Copyright by Mahidol University

4036426 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

วรรณภา ศรีธัญรัตน์ : การศึกษาตัวยับยั้งโปรตีเอสในน้ำยางพารา (STUDY OF PROTEASE INHIBITOR IN RUBBER LATEX). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล Ph.D., รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล Ph.D. 145 หน้า. ISBN 974-664-138-7

จากการศึกษา พบตัวยับยั้งโปรตีเอสในน้ำยางสดจากยางพารา (*Hevea brasiliensis*) โดยพบมากในส่วนของ C-serum ในขณะที่พบเป็นส่วนน้อยใน B-serum เมื่อศึกษาคุณสมบัติของตัวยับยั้งโปรตีเอสใน C-serum พบว่าทนความร้อนได้ดี ตัวยับยั้งโปรตีเอสใน C-serum ถูกแยกออกจากโปรตีนอื่นโดยวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตนที่เปอร์เซนต์ความเข้มข้นของอะซีโตนในระดับสูง (80-95% โดยปริมาตร) สารสกัดที่ได้เรียกว่า HPI ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 5.5 kD เมื่อทดสอบ HPI ที่ได้ หลังการแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 และ 30 นาที พบว่าความสามารถในการยับยั้งโปรตีเอสยังคงเดิม ดังนั้น HPI จึงเป็นโปรตีนที่ยับยั้งโปรตีเอสที่มีขนาดโมเลกุลของหน่วยย่อยที่เล็กและคงทนต่อความร้อนได้ดีมาก การทดสอบ HPI กับเอนไซม์โปรตีเอสหลายกลุ่ม พบว่า HPI สามารถยับยั้งเอนไซม์ต่างๆได้ดีจากมากไปหาน้อย ดังนี้ โปรเนส (57.59%), ไคโมทริปซิน, ทริปซิน (18.05% และ 14.47% ตามลำดับ), ส่วนการทดสอบกับปาเปอิน พบว่า HPI สามารถยับยั้งการทำงานได้เล็กน้อย (7.39%) ในขณะที่ HPI มีผลยับยั้งการทำงานของเทอร์โมไลซินน้อยมาก (4.61%) และไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเปบซินและโปรตีเอสจาก *Aspergillus saitoi* เลย เมื่อนำ HPI ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยการแยกผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 โดยอาศัยข้อแตกต่างของขนาดโมเลกุล พบว่ารูปแบบในสภาพธรรมชาติของ HPI น่าจะแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ HPI-1 และ HPI-2 โดยทั้งสองรูปแบบประกอบไปด้วยโปรตีนหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากันคือ 5.5 kD ส่วนน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากวิธีแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยข้อแตกต่างของขนาดโมเลกุล พบว่า HPI-1 และ HPI-2 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20.8 kD และ 11.7 kD ตามลำดับ จากข้อมูลที่ได้แสดงว่า รูปแบบสภาพธรรมชาติของ HPI-1 น่าจะประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยที่เหมือนกันอยู่ 4 หน่วยย่อย ส่วน HPI-2 เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 2 หน่วยย่อย พบว่าหลังผ่านการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที ความสามารถในการยับยั้งโปรตีเอสของ HPI-1 และ HPI-2 ลดลงเหลือ 90% และ 88% ตามลำดับ ทั้ง HPI-1 และ HPI-2 มีความคงทนต่อสภาวะกรด-ด่างอยู่ในช่วงที่กว้าง คือ pH 3-11 และความสามารถในการยับยั้งโปรตีเอส ของ HPI-1 และ HPI-2 ลดลงเหลือ 38% และ 50% ตามลำดับ ที่ pH 12 ค่า pI ของ HPI-1 และ HPI-2 มีค่าเท่ากับ 4.24 และ 4.17 ตามลำดับ

Copyright by Mahidol University