CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM CASSAVA LEAVES

KANJANA SURIYAPROM

ที่ระลึกจาก
หอสมุดกลาง 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 974-664-247-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
K16ch
2000
c.2

44784 c.2

4136783 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M. Sc (BIOCHEMISTRY)
KEY WORD : PEROXIDASE, CASSAVA
KANJANA SURIYAPROM : CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM CASSAVA LEAVES. THESIS ADVISOR : MONTRI CHULAVATNATOL, Ph. D., M.R. JISNUSON SVASTI, Ph. D., NUANCHAWEE WETPRASIT, Ph.D. 94 p. ISBN 974-664-247-2

Peroxidase (EC 1.11.1.7) is an ubiquitous plant enyzyme that catalyzes the oxidation of cellular components by H_2O_2. A peroxidase was purified from the leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) 74 folds to a specific activity of 386 U/mg. The purification procedure consisted of 60-80% ammonium sulfate precipitation, followed by affinity chromatography using a concanavalin A Sepharose 4B column and gel filtration chromatography using a Sephadex G-200 column. The native molecular weight for the enzyme was found to be 112 kD by gel filtration and the subunit molecular weight was estimated to be 56 kD by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. So the enzyme was a homodimer. The isoelectric point of the purified enzyme was estimated by polyacrylamide isoelectrofocusing. It existed in two forms with pI values of 6.4 and 6.25. The enzyme contained a higher amount of the amino acids (GLX +ASX) than the basic amino acids. It was shown to be heme proteins with a Soret band at 404 nm. The enzyme was stable in a broad pH range of 4-11 and had a slightly acidic optimum pH of 6. An optimul temperature of the enzyme activity was 60°C. The enzyme retained about 70% of its activity during incubation at temperature upto 65°C for 24 hr. The cassava leaf peroxidase catalyzed the oxidation of the following substrates: coniferyl alcohol (K_m = 0.003 mM), o-dianisidine (K_m = 0.037 mM), quercetin (K_m = 0.054 mM), syringaldazine (K_m = 0.077 mM), 3,3'-diaminobenzidine (K_m = 0.022 mM), pyrogallol (K_m = 0.89 mM) and guaiacol (K_m = 5.52 mM). KCN, NaN_3 and thiourea were inhibitory to the enzyme.

Copyright by Mahidol University

4136783 SCBC/M: สาขาวิชา : ชีวเคมี; วท. ม. (ชีวเคมี)

กาญจนา สุริยะพรหม : การศึกษาคุณสมบัติของเปอร์ออกสิเดสในใบมันสำปะหลัง (CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM CASSAVA LEAVES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : มนตรี จุฬาวัฒนกล, Ph. D., ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, Ph. D., นวลฉวี เวชประสิทธิ์, Ph. D. 94 หน้า. ISBN974-664-247-2

เปอร์ออกซิเดสเป็นเอ็นไซม์ที่พบได้ทั่วไปในพืช ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของส่วนประกอบต่างๆในเซลล์ โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมด้วย ในการศึกษาได้ทำการสกัดเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสจากส่วนใบของต้นมันสำปะหลังและผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น 74 เท่า และมี specific activity เท่ากับ 386 U/mg ซึ่งประกอบด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 60-80% อิ่มตัวตามด้วย affinity คอลัมน์โดยใช้ concanavalin A และ เจล ฟิลเตรชั่น (gel filtration) บน คอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-200 (Sephaedx G-200). จากผลการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่า ได้แถบของโปรตีนในตำแหน่ง น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56 กิโลดาลตัน และ จาก คอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ พบว่า เอ็นไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 112 กิโลดาลตัน ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าโมเลกุลของเอ็นไซม์นี้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย จากการวิเคราะห์โดย polyacrylamide isoelectrophoresis พบว่าเอ็นไซม์นี้มี 2 รูปแบบซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 6.4 และ 6.25 เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสนี้ประกอบด้วยปริมาณของกรดอะมิโน GLX+ASX มากกว่าปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นด่าง ในการศึกษาหมู่โปรสเธติก พบว่า เอ็นไซม์นี้มี ฮีมเป็นส่วนประกอบ เนื่องจาก พบ Soret band ในสเปคตรัมของเอ็นไซม์ที่ 404 นาโนเมตร เอ็นไซม์นี้มีความทนทานต่อ pH ในช่วงที่กว้าง คือ 4 ถึง 11 และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 65 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมินี้เอ็นไซม์จะมีแอกติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 70% เอนไซม์มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอ็นไซม์คือ pH เท่ากับ 6 และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบมันสำปะหลังสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ดังต่อไปนี้ coniferyl alcohol (K_m = 0.003 mM), o-dianisidine (K_m = 0.037 mM), quercetin (K_m = 0.054 mM), syringaldazine (K_m = 0.077 mM), 3,3'-diaminobenzidine (K_m = 0.022 mM), pyrogallol (K_m = 0.89 mM) และ guaiacol (K_m = 5.52 mM) KCN, NaN_3 และ thiourea เป็นตัวยับยั้งแอกติวิตีของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสได้

Copyright by Mahidol University