ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เอ็นโดไคติเนสและเอ็กโซไคติเนสจากน้ำยางพารา
ผู้เขียน	นายปัณณวิชช์ สุขประเสริฐ
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2548

บทคัดย่อ

การศึกษาเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสใน bottom fraction membrane (BFM) ของ น้ำยางพารา โดยเตรียมจากส่วนของ bottom fraction ภายหลังจากการปั่นแยกน้ำยาง แล้วมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C และ นำมาละลายที่อุณหภูมิ 37°C (4-5 ครั้ง) เพื่อทำให้ lutoid body แตก จากนั้นนำมาปั่นแยกด้วยความเร็วสูงอีกครั้งเพื่อให้ได้ส่วนตะกอนที่เรียกว่า BFM นำ BFM ที่ได้มาล้างเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนต่างๆ ให้ออกจาก membrane ด้วย isotonic buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4 ที่มี 0.9% NaCl) และนำมาสกัดต่อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Acetate ที่มี 0.2% Triton-X-100 (BFM-X)

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสในน้ำยางพาราพันธุ์ต่างๆ (RRIM600, RRIT251, PB311 และ BPM-24) พบว่าในน้ำยางพาราพันธุ์ RRIT251 มีการทำงานของเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสสูงกว่าในน้ำยางพาราพันธุ์ PB311, RRIM600 และ BPM-24 ตามลำดับ แต่ในการทดลองเพื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนส จะเลือกใช้น้ำยางพาราพันธุ์ RRIM600 แทนน้ำยางพาราพันธุ์ RRIT251 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองนี้สูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากยางพาราพันธุ์ RRIM600 เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันเป็นอย่างมากเพราะเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตหรือน้ำยางพาราสูงที่สุด

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนส โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟี (CM-Sepharose และ Sephadex G-75 ตามลำดับ) พบว่าเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนส มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 26 และ 3 เท่า ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์เอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสด้วยวิธี SDS-PAGE และ activity staining (zymogram) ยังแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสมีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากันคือประมาณ 30 กิโลดาลตัน และเพื่อที่จะแยกเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสให้ออกจากกันจึงการประยุกต์ใช้วิธี isoelectric focusing (IEF) โดยอาศัยความต่างกันของ pI ซึ่งจากการทดลองพบว่า เอนไซม์เอนโดไคติเนส และ เอกโซไคติเนส มีค่า pI เท่ากับ 9.5 และ 9.3 ตามลำดับ

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสต่อ pH และอุณหภูมิ พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสอยู่ที่ช่วง pH ระหว่าง 4-6 และมีค่าการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองสูงสุดอยู่ที่ pH 5 แต่ในขณะที่ความสามารถในการทนต่อ pH ของเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสอยู่ในช่วง pH ระหว่าง 3-7 และค่อยๆ ลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น อีกทั้งจากการศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสพบว่าอยู่ที่ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-45°C และจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ในขณะที่ความสามารถในการทนต่อความร้อนของเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสจะอยู่ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-75°C นอกจากนี้เมื่อศึกษาถึง kinetic parameters ของเอนไซม์ทั้งสองพบว่า Km และ Vmax ของเอนไซม์เอนโดไคติ เนสมีค่าเท่ากับ 99.73 μM 666 unit/ml (เมื่อใช้ 4-Methylumbelliferyl-*N-N'-N''*-acetyl-β-D-glucosaminide เป็นสับสเตรท) ในขณะที่ Km และ Vmax ของเอนไซม์เอกโซไคติเนสมีค่าเท่ากับ 0.61 mM และ 526 unit/ml ตามลำดับ (เมื่อใช้ 4-Methylumbelliferyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide เป็นสับสเตรท)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนทั้ง 10 ตัว ทางด้านปลาย N ของเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสกับเอนไซม์ไคติเนสที่ได้จาก พืช และจุลินทรีย์ต่างๆ พบว่าไม่มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกันในลำดับของกรดอะมิโน ยกเว้นเพียงเอนไซม์เอกโซไคติเนส ซึ่งจะมีความคล้ายคลึงกับ Hevamine หรือเอนไซม์เอนโดไคติเนสในส่วนของ B-serum จากน้ำยางพาราประมาณ 50% ดังนั้นเอนไซม์เอนโดไคติเนสและเอกโซไคติเนสที่แยกได้จาก BFM ในน้ำยางพาราอาจถูกจัดเป็นสมาชิกใหม่ในกลุ่มของเอนไซม์ไคติเนส

Thesis Title	Characterization of *Hevea* Latex Endochitinase and Exochitinase
Author	Mr. Pannawich Sukprasirt
Major Programe	Biochemistry
Academic Year	2005

ABSTRACT

Both endo- and exochitinase were detected and found in bottom fraction membrane (BFM) of *Hevea* latex that prepared by repeat (4-5x) freeze-thawing at -20 and 37°C and be washed clean by centrifugation. BFM pellet was washed five times with isotonic buffer (50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 containing 0.9% NaCl) to remove contaminants and then washed BFM was solubilized with 0.2% Triton X-100 in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0 (called BFM-X) to extract 2 enzymes from membrane.

In prelim study, detection of chitinase activity in different rubber clones (RRIM600, RRIT251, PB311 and BPM-24) was determined in order to show the common presence of enzyme by tapping induction. These results found that the activity of endo- and exochitinase in RRIT251 clone was higher than that in other clones (PB311, RRIM600 and BPM-24). However, the latex of RRIM600 clone was chosen for all experiments of purification as it's the common clone in rubber plantation, which produced latex in high yield.

To further purify, BFM-X was subjected to CM-Sepharose and following Sephadex G-75 column chromatography. The result demonstrated that the specific activity of endo- and exochitinase was 26 and 3-fold, respectively. In addition, under SDS-PAGE and zymogram analysis of purified *Hevea* chitinases from Sephadex G-75 showed one band with chitinase activity, contained endo- and exochitinase, at a molecular mass of 30 kDa. As demonstrated from the results, several steps in the purification still showed both chitinases as the co-migrate proteins, be it by chromatography or SDS-PAGE. Therefore, the effective method for separating the two chitinase forms was based on the pI differences of the enzymes using the technique of isoelectric focusing (IEF). From the results of IEF analysis coupled with specific assay substrates, it was unequivocally found that the pH 9.3 protein was identified as exochitinase and the pH 9.5 protein was endochitinase.

After having a success in separation of purified two enzymes forms of the chitinase, the characterization and the kinetics parameters of two enzymes were studied. The optimal pH profiles of both chitinases having maximum activity were between pH 4-6 and then it sharply drops outside this range with the peak activity at pH 5 whereas pH stability of these enzymes were quite stable over a broad pH range of 3-7 and then declined at pH 7. With optimal temperature, the activity was then sharply dropped at above 45°C with hardly any activity detected at 55°C and above while the thermal stability of both endo- and exochitinase were quite stable heat stable at up to 75°C. Besides, the kinetics parameters (Km and Vmax) indicated that Km and Vmax values of endochitinaes found to be 99.73 μM and 666 unit/ml of 4-Methylumbelliferyl-*N-N'-N''*-acetyl-β-D-glucosaminide, respectively, while the Km and Vmax values of exochitinase were calculated to be 0.61 mM and 526 unit/ml of 4-Methylumbelliferyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide, respectively.

Moreover, the result from N-terminal (10 amino acids) revealed that endo-and exochitinase did not conserve homology with other chitinases (plant and microbe), except exochitinase was similar sequence homology to Hevamine or endochitinase in *Hevea brasiliensis* about 50% whereas endochitinase did not. All results could summarize that both enzymes, which had the chitinase enzyme properties as verified by the enzyme activity assays and unique characteristics as reported with several detailed criteria in this study, might be a new type in the large family of the chitinases.