รายงานการวิจัย

เรื่อง

เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์ เอ ซินเทส ในน้ำยางพารา และการประยุกต์ใช้

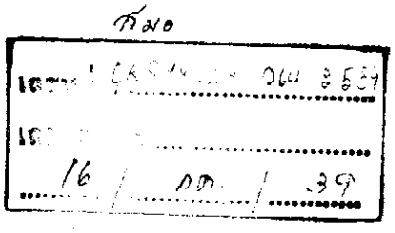
3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase in *Hevea brasiliensis* and its possible application

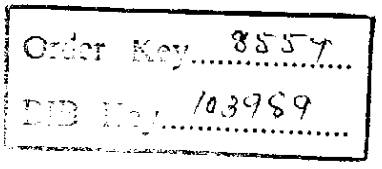
โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วัลลี สุวจิตตานนท์

และ

สุรีย์ พีรภูติ





ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนงบประมาณปี 2537 - 2538.

บทคัดย่อ

การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ HMG CoA synthase ซึ่งสังเคราะห์ Hydroxymethyl glutargy Coenzyme A จาก acetyl CoA และ acetoacetyl CoA ในยางพารา ที่ศึกษาโดยวิธีใช้สารกัมมันตรังสี ^{14}C acetyl CoA ช่วย โดยติดตามดูการเกิด ^{14}C-hydroxymethyl glutaryl CoA พบเอนไซม์นี้ในน้ำยางพารามากกว่าในใบยาง และเมื่อแยกน้ำยางพาราออกเป็นส่วน ๆ จะพบเอนไซม์ในส่วนของ C-serum และส่วนก้นหลอด (bottom fraction) โดยเอนไซม์นี้ใน C-serum มีปริมาณมากกว่าเอนไซม์ส่วนอื่นๆ เอนไซม์นี้ใน C-serum มีความเสถียรที่ -70°C สามารถเก็บไว้ได้นาน ปัจจัยที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ไอออนของโลหะ. p-chloromercuribenzoate และ dithiothreitol สารที่จับกับไอออนที่อยู่ในโลหะจะช่วยทำให้ความว่องไวของเอนไซม์สูงขึ้น เอนไซม์นี้ทั้งในใบยางและน้ำยาง serum จะมีระดับขึ้นลงตามช่วงเวลาของวันได้ ซึ่งข้อมูลของเอนไซม์นี้ในส่วนของพืชยืนต้น เช่น ยางพารายังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

แม้ว่าจะมีปัจจัยที่มีผลต่อเอนไซม์ไฮดรอกซิล กลูตาริล โคเอนไซม์เอ ซินเทส ในยางพารา แต่ก็ยังพบว่าความว่องไวของเอนไซม์นี้และปริมาณเนื้อยางในน้ำยางพาราที่ได้จากการกรีดยาง มีความสัมพันธ์กันโดยตรง กล่าวคือเมื่อพบความว่องไวของเอนไซม์สูง ปริมาณเนื้อยางก็จะสูงด้วย และความสัมพันธ์นี้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) + 0.81 แสดงว่าเอนไซม์นี้น่าจะมีบทบาทควบคุมการสังเคราะห์ยาง

การแยกเอนไซม์ HMG CoA synthase ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยใช้วิธีทางชีวเคมี เช่น CM cellulose จับโปรตีนอื่น ๆ ออก การแยกเอนไซม์โดยใช้ gel filtration chromatography และ DEAE cellulose ion exchange chromatography พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น แต่ก็ยังมีโปรตีนอื่นปน และความว่องไวของเอนไซม์ไม่สูงขึ้นมากนัก หากนำโปรตีนนี้ไปแยกโดยใช้ polyacrylamide gel แล้วนำเฉพาะส่วนที่มีความว่องไวไปศึกษาโดยใช้ SDS PAGE จะพบว่าเอนไซม์นี้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น และมีน้ำหนักโมเลกุล 44,700 ดัลตัน หากหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นี้ในสภาพที่ยังไม่บริสุทธิ์โดยวิธี gel filtration จะมีน้ำหนัก 54,900 ดัลตัน เอนไซม์ HMG CoA synthase นี้ถูกทำให้เสื่อมสภาพทางธรรมชาติได้ง่าย

Abstract

3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase) activity in rubber (*Hevea brasiliensis*) latex and in fractions obtained by centrifugation were determined using a radiochemical method. The enzyme was found in both C-serum and bottom fraction, but most was in the C-serum. *Hevea brasiliensis* leaves showed very low enzyme activity. HMG-CoA synthase in C-serum was found to be free of HMG-CoA lyase. The enzyme in C-serum was stable at -70^{0}. The formation of HMG-CoA did not depend on a supply of exogenous acetoacetyl-CoA, and the rate of formation was increased as the concentration of acetyl-CoA was increased. The K_m for acetyl-CoA was 9 mM. The enzyme in C-serum was inhibited by several divalent cations, p-chloromercuribenzoate and dithiothreitol. Diurnal variation of the activity of the enzyme in both C-serum and extracts of leaves was observed. A positive correlation between the enzyme activity and the rubber content of the latex (correlation coefficient of + 0.81) suggests that the enzyme regulates the synthesis of rubber in the latex.

Purification of HMG CoA synthase using general biochemical procedure such as CM cellulose, gel filtration and DEAE cellulose chromatography results in removal of other proteins. However, the enzyme was only partially purified and the specific activity was not increased as much as it should be. This probably due to the fact that the enzyme is very sensitive to various denaturating agents. Purified enzyme could only be obtained by extracting the enzymatic active band from nondenaturating PAGE. The molecular weight of the enzyme determined using SDS PAGE was 44,700 dalton where- as the molecular weight obtained from gel filtration was 54,900 dalton.