268

การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา

Purification and Characterization of β-1,3-glucanase from *Hevea brasiliensis*

อาภรณ์ สันตะโร

Ahporn Suntaro

เลขหมู่ QK896 .O64 2538 ฉ 1
เลขทะ
/ 18 ก.ค. 2538

Order Key 4456
BIB Key 77919

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2538

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา

ผู้เขียน นางสาวอาภรณ์ สันตะโร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ตรวจพบในเกือบทุกส่วนของต้นยาง ได้แก่ ใบ, เปลือก, ราก, ซี-ซีรั่มและบี-ซีรั่ม แต่มีปริมาณไม่เท่ากัน บี-ซีรั่ม ได้จากออร์แกเนลล์ในน้ำยางซึ่งเรียกว่า ลูทอยด์ จากการศึกษาพบว่า ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส มีประมาณ 1,500-2,000 ยูนิต/น้ำยางสด 1 ลิตร และพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีปริมาณสูงมาก อาจเป็นเพราะภาวะกดดันจากการกรีดให้เกิดบาดแผลของเปลือกบริเวณลำต้น เพื่อเก็บผลผลิตน้ำยางสด หรือถูกกระทำด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรล ซึ่งชาวสวนใช้สำหรับเพิ่มผลผลิต เอนไซม์ชนิดนี้ทำให้บริสุทธิ์ได้ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และ แบบจำเพาะเจาะจงกับ Con A agarose ได้ ในบี-ซีรั่มของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII ปริมาณโปรตีนที่ได้หลังจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เท่ากับ 3.8 % และ 1.3 % ค่าความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 70.2 % และ 16.8 % ตามลำดับ

จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ พบว่าทั้งสองไอโซไซม์เป็นโปรตีนสายเดียวและเป็นโปรตีนเบสมีค่า pI มากกว่า 8.3 จัดเป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรต p-nitrophenyl-β-D-glucoside ได้ และสามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินาริน และ ซี-เอ็ม พาไคแมน ซึ่งสับสเตรต ทั้งสองชนิดเป็นโพลิเมอร์น้ำตาลกลูโคสที่มีพันธะเป็น β-1,3-glycosidic linkages แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตพัสทิวแลน ซึ่งไม่มีพันธะดังกล่าว ไอโซไซม์ GI และ GII มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้ถึง 60 องศาเซลเซียส มีความว่องไวสูงที่ช่วงอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส และมีค่าความว่องไวสูงสุดที่ pH 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ สำหรับในยูนิเวอร์ซัลบัฟเฟอร์ ไอโซไซม์ GI และ GII มีค่าความว่องไวสูงสุด ที่

pH 5.0 และ pH 6.0 ตามลำดับ และพบว่า GII มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนและเป็นเอนไซม์ที่มี polysaccharide binding site เป็นน้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลแมนโนส

จลนศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อศึกษาโดยใช้ลามินารินเป็นสับสเตรต ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2-1.4 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใน 0.1 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 5.0 พบว่าค่า K_m เอนไซม์ GI และGII เท่ากับ 1.25 มก/มล และ 1.33 มก./มล. ตามลำดับ สำหรับค่า V_{max} เท่ากับ 0.153 $A_{540/min}$ และ 0.142 $A_{540/min}$ ตามลำดับ ค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29.5 และ 33.1 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และเท่ากับ 31.6 และ 34.7 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE

สำหรับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในบีซีรั่มของยางพาราพันธุ์ GT1 พบว่ามีค่าความว่องไวของเอนไซม์สูงกว่าในพันธุ์ RRIM 600 ถึง 2 เท่า แต่สังเกตแถบโปรตีนจากการศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าในยางพันธุ์ GT1 มี GII เพียงแถบเดียว หลังจากที่ยางพาราทั้งสองพันธุ์ ถูกทาหน้ายางด้วยสารเคมีเร่งน้ำยางอิเทรลความเข้มข้น 2.5 % ในน้ำมันปาล์มมีผลทำให้ปริมาณน้ำยางเพิ่มขึ้นโดยพบว่าปริมาณน้ำยางเพิ่มขึ้นต่อครั้งกรีดเป็น 1.3 เท่าในยางพันธุ์ RRIM 600 และ 2 เท่าในยางพันธุ์ GT1 ซึ่งทำให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำยางด้วยคือ 2.5 เท่า ในยางพันธุ์ RRIM 600 และ 3 เท่าในยางพันธุ์ GT1 เมื่อเปรียบเทียบจากปริมาณของน้ำยางจำนวน 1 ลิตรเท่ากัน

Thesis Title Purification and Characterization of β-1,3-glucanase from *Hevea brasiliensis*

Author Miss Ahporn Suntaro

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1994

Abstract

β-1,3-Glucanase was studied in latex of RRIM 600 rubber clone. It was detected in many parts of rubber trees such as latex (C-serum and B-serum), leaves and root. B-serum was prepared from organelles called lutoids. It contains high level of β-1,3-glucanase activity ca.1,500-2,000 units/liter of latex. The enzyme was purified from B-serum by ion-exchange and affinity chromatography on CM-cellulose and Con A-agarose columns, respectively. The percent yields of GI and GII are 3.8 and 1.3 and the percent recoveries are 70.2 and 16.8 respectively.

The two isozymes, revealed under SDS-PAGE and gel filtration to be monomeric proteins. They are basic proteins with pI higher than 8.3. The enzymes effectively hydrolysed laminarin and CM-pachyman but they did not hydrolysed pustulan and the other glucans. Therefore, the enzymes are specific to only β-1,3-glycosidic linkage.

They are classified as endo-β-1,3-glucanase because they failed to hydrolyse p-nitrophenyl β-D-glucoside substrate. Both isozymes are relatively heat stable which remain fully active up to 60 °C. The temperature optimum are 35-40 °C. The pH stability of two isozymes are 4.0-9.0 and pH optimum are 4.5 and 5.0 respectively. GII is a glycoprotein containing glucose and/or mannose as carbohydrate moiety, because of its strong binding property to Con A column.

Kinetic analyses with laminarin 0.2-1.4 mg./ml. as substrate indicate appearent K_m values of 1.25 mg./ml. (GI), 1.33 mg./ml. (GII) and V_{max} of 0.153 $A_{540/min}$ and 0.142 $A_{540/min}$ respectively. The two isozymes are monomeric proteins.

Their molecular weights are 29.5 and 33.1 kD when determined by gel filtration and are 31.6 and 34.7 kD when determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The level of enzyme β-1,3-glucanase in B-serum of GT1 was found to be two times higher than that of B-serum of RRIM 600. The number of isozymes was also different. There were two isozymes, GI and GII, in RRIM 600 but only GII detected in GT1. The study on effect of ethylene indicated that this plant hormone induced the actively level of β-1,3-glucanase in rubber trees. The resulted indicated that it increases of glucanase activities up to 2.5 fold in RRIM 600 and 3 fold in GT1, respectively.