

ลักษณะสมบัติของเปอร้ออกซิเดสในหัวมันสำปะหลัง

Manihot esculenta Crantz หลังการเก็บเกี่ยว

นายธรากรณ์ สอนวัฒนา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0386-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 1994.553 X

**CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE IN POST-HARVESTED
CASSAVA *Manihot esculenta* Crantz TUBERS**

Mr. Thakorn Sornwatana

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology**

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0386-2

Thesis title CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE IN POST-HARVESTED CASSAVA *Manihot esculenta* Crantz TUBERS

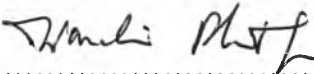
By Mr. Thakorn Sornwatana

Program Biotechnology


Thesis Advisor Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.

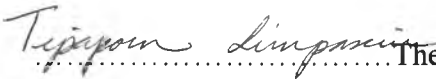
Thesis Co-advisor Professor Montri Chulavatnatol, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

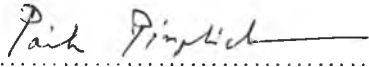

.....Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

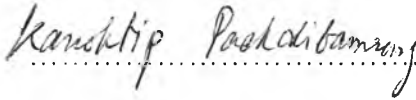
THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)


.....Thesis Co-Advisor
(Professor Montri Chulavatnatol, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)


.....Member
(Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

ฐากรณี สอนวัฒนา: ลักษณะสมบัติของเปอร์ออกซิเดสในหัวมันสำปะหลัง *Manihot esculenta* Crantz หลังการเก็บเกี่ยว (CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE IN POST-HARVESTED CASSAVA *Manihot esculenta* Crantz. TUBERS) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์, อ. ที่ปรึกษา ร่วม: ศ. ดร. มนตรี จุฬาวัฒนทล, 108 หน้า, ISBN 974-03-0386-2

เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในพืช ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของส่วนประกอบต่างๆ ในเซลล์ โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสับสเตรท ได้ทำการสกัดเปอร์ออกซิเดสจากเนื้อของหัวมันสำปะหลังที่เก็บไว้ 7 วัน และทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 40-80% ตามด้วย affinity คอลัมน์โดยใช้ concanavalin A และเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) บนคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ ซี-200 (Sephadex G-200) ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 16 เท่า และมี specific activity เท่ากับ 560 U/mg มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 105 กิโลดาลตัน วิเคราะห์จากคอลัมน์เจลฟิลเตรชันและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 กิโลดาลตัน จากผลการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE จึงสรุปได้ว่าโมเลกุลของเอนไซม์นี้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย จากการวิเคราะห์โดย isoelectrofocusing gel พบว่าเอนไซม์นี้มี 5 รูปแบบ ซึ่งมีค่า pi เท่ากับ 5.1, 5.2, 5.4, 5.8 และ 6 เอนไซม์นี้เป็นไกลโคไลโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงและมีฮีมเป็นส่วนประกอบเนื่องจากพบ Soret band ในสเปกตรัมของเอนไซม์ที่ 398 นาโนเมตร เอนไซม์นี้มีความทนทานต่อ pH ในช่วงที่กว้างคือ 4 ถึง 11 มี pH ที่เหมาะสมคือ 5 และอุณหภูมิที่เหมาะสม 60°C เอนไซม์จะมีแอกติวิตีเหลือประมาณ 80% เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อตัดคาร์โบไฮเดรตออกบางส่วนด้วย 3% TFMS เอนไซม์นี้จะเหลือคาร์โบไฮเดรตอยู่ประมาณ 50% โดยน้ำหนัก เอนไซม์ที่ถูกตัดคาร์โบไฮเดรตออกบางส่วนจะมีความทนทานต่อ pH และอุณหภูมิลดลง และมีความเข้มข้นของโปรตีนที่ pi 5.1, 5.2, 5.8, 6 ลดลง และโปรตีนที่ pi 5.3 เพิ่มขึ้น เปอร์ออกซิเดสจากเนื้อมันสำปะหลังสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ H₂O₂, DAB, guaiacol, o-dianisidine, pyrogallol และ syringaldazine เป็นสับสเตรท เอนไซม์ที่ถูกตัดคาร์โบไฮเดรตออกบางส่วน มีค่า K_m ของสับสเตรททุกตัวลดลง ยกเว้น syringaldazine

ภาควิชา
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา..... 2544

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272266823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: CASSAVA / PEROXIDASE / POST-HARVEST

THAKORN SORNWATANA : CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE IN POST-HARVESTED CASSAVA *Manihot esculenta* Crantz. TUBERS. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. TIPAPORN LIMPANESI, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: PROF. MONTRI CHULAVATNATOL, Ph.D. 108 pp. ISBN 974-03-0386-2

Peroxidase (EC 1.11.1.7) is an ubiquitous plant enzyme that catalyzes the oxidation of cellular components by H_2O_2 . A peroxidase was purified from the parenchyma of cassava roots stored for 7 days by 40-80% ammonium sulfate precipitation followed by Concanavalin A Sepharose 4B and Sephadex G-200 columns respectively. The enzyme was purified 16 fold with a specific activity of 560 U/mg. The native molecular weight of the enzyme was found to be 105 kD by gel filtration and the subunit molecular weight was estimated to be 54 kD by SDS-PAGE, indicating a homodimer form of the enzyme. The purified enzyme was separated into 5 forms on isoelectric focusing gel with pI's 5.1, 5.2, 5.4, 5.8 and 6. The enzyme was a glycoprotein with high content of carbohydrate and showed sores band at 398 nm. The enzyme was stable in broad pH range of 4-11 with optimum pH at 5 and optimum temperature at 60°C. The enzyme retained about 80% of its activity during incubation at temperature upto 50°C for 4 hr. Partial deglycosylation of the enzyme with 3% TFMS reduced about 50% carbohydrate w/w. The partial deglycosylated enzyme showed decrease in pH and temperature stability, reduce intensity of pI's 5.1, 5.2, 5.8, 6 bands and appearance of a new band at pI 5.3. The cassava parenchyma peroxidase catalyzed the oxidation of the following substrates: H_2O_2 , DAB, guaiacol, *o*-dianisidine, pyrogallol and syringaldazine. Partial deglycosylated enzyme showed a decrease in the K_m of all the substrates except syringaldazine.

Program Biotechnology

Student's signature.....*Thakon Sornwatana*.....

Field of study Biotechnology

Advisor's signature.....*Tipaporn Limpinesi*.....

Academic year 2001

Co-advisor's signature.....*Montri Chulavatnatol*.....

ACKNOWLEDGMENT



I would like to express my deepest appreciate and gratitude to my advisor, Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, and Co-advisor, Professor Montri Chulavatnatol, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis.

My gratitude is also extended to Associate Professor Piamsook Pongsawadi, Associate Professor Piroh Pinphanichakarn and Dr. Kanoktip Packdibamrung for serving as thesis committee.

A Grant to Professor Montri Chulavatnatol from the National Science and Technology Development Agency(NSTDA) and Graduate School of Chulalongkorn University supported this research.

My appreciation is also express to Dr. Thidarat Eksitthikul, Dr. Nuanchawee Wetprasit and Miss Panpaka Chalermisrachai for their helpful and comments.

My special thanks to Mrs. Thitika Vajrodaya for her typing and her kind understanding.

Sincere thanks are extended to all members in the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, especially the member in room B.303 and Program of Biotechnology and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their assistant and friendship.

Finally, I wish to express my deepest gratitude to my family for their supporting, infinite love and understanding.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS	xvi
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
1.1 Cassava	1
1.2 Physiological deterioration in cassava	2
1.3 Peroxidase	3
1.3.1 Ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11).....	4
1.3.2 Classical peroxidase	7
1.4 Cassava peroxidase	10
1.5 Peroxidase reactions	14
1.6 Application of peroxidases	17
1.6.1 Peroxidase-conjugated antibody for enzyme- linked immunosorbant assay (ELISA)	17

	Page
1.6.2 Electronmicroscopic staining	17
1.6.3 Enzyme coupled assays	18
1.7 Deglycosylation of peroxidase	19
1.8 Aim of thesis	20
II MATERIALS AND METHODS.....	21
2.1 Plant materials	21
2.2 Chemicals.....	21
2.3 Equipments.....	23
2.4 Preparation of crude cassava parenchyma peroxidases.....	23
2.5 Purification of cassava parenchyma peroxidase	23
2.5.1 Ammonium sulfate precipitation.....	23
2.5.2 Concanavalin A-Sepharose 4B column chromatography	24
2.5.3 Sephadex G-200 column.....	25
2.6 Protein determination.....	25
2.7 Assay of peroxidase activity using DAB.....	26
2.8 Gel electrophoresis.....	26
2.8.1 Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	26
2.8.2 Non-denaturing gel electrophoresis.....	27

	Page
2.8.3 Isoelectrofocusing on polyacrylamide gel (IEF).....	28
2.8.4 Staining for peroxidase activity.....	29
2.9 Deglycosylation of cassava peroxidase.....	29
2.10 Determination of pH stability.....	29
2.11 Determination of optimal pH	30
2.12 Temperature stability.....	30
2.13 Optimal temperature.....	30
2.14 Spectral analysis.....	30
2.15 Carbohydrate determination.....	31
2.16 Glycoprotein staining.....	32
2.17 Determination of kinetic constants.....	32
2.18 Effects of urea.....	33
III RESULTS.....	34
3.1 Purification of peroxidase from cassava parenchyma.....	34
3.1.1 Ammonium sulfate precipitation.....	34
3.1.2 Concanavalin A Sepharose 4Bcolumn chromatography.....	34
3.1.3 Sephadex G-200 column chromatography.....	39
3.1.4 Non-denaturing and SDS-PAGE.....	39

	Page
3.2 Characterization of cassava parenchyma peroxidase.....	44
3.2.1 Determination of molecular weight.....	44
3.2.2 Determination of isoelectric protein (pI).....	44
3.2.3 Determination of carbohydrate content.....	49
3.2.4 UV-visible absorption spectrum.....	53
3.3 Partial deglycosylation of cassava peroxidase.....	53
3.4 Comparative characterization of native and partial deglycosylated cassava peroxidase.....	57
3.4.1 UV-VIS absorption spectrum.....	57
3.4.2 Mobility on ND-PAGE and SDS-PAGE.....	57
3.4.3 Isoelectric point (pI).....	57
3.4.4 Effect of urea.....	62
3.4.5 Optimum pH.....	62
3.4.6 pH stability.....	62
3.4.7 Optimum temperature.....	66
3.4.8 Temperature stability.....	66
3.4.9 Comparisons of kinetic constants.....	69

	Page
IV DISCUSSION.....	79
4.1 Purification of cassava peroxidase from cassava tubers.....	81
4.2 Characterization of purified cassava tuber peroxidase.....	81
4.2.1 Structural properties.....	82
4.2.2 Effect of pH and temperatures.....	84
4.2.3 Kinetic study of cassava tuber peroxidase.....	85
4.3 Characterization of partial deglycosylated peroxidase.....	86
4.3.1 Deglycosylation of purified cassava tuber peroxidase...	86
4.3.2 Comparative properties of native and partial deglycosylated cassava tuber peroxidase.....	87
V CONCLUSION.....	91
REFERENCES.....	93
APPENDIX A.....	100
APPENDIX B.....	104
APPENDIX C.....	106
APPENDIX D.....	107
BIOGRAPHY.....	108

LIST OF ABBREVIATIONS

%	percentage
°C	degree celsius
µg	microgram
µl	microlitre
A	Absorbance
<i>A. araucana</i>	<i>Araucaria araucana</i>
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic Acid)
APX	ascorbate peroxidase
BLP1	Barley leaf peroxidase
BSA	bovine serum albumin
cm	centimeter
Con-A	Concanavalin A Sepharose 4B
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNP-lysine	dinitrophenyl-lysine
g	gravitational acceleration
gm	gram
hr	hour
HRP	horseradish peroxidase
K _a V	partition coefficient
kD	kilodaton
K _m	Michaelis-Menten constant
MeOH	methanol
mg	milligram

min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
M _r	relative molecular weight
ND-PAGE	Non-denaturing polyacrylamide
nm	nanometer
OD	optical density
PAS	Periodic Acid-Schiff Reagent
pI	isoelectric point
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
PVPP	polyvinyl polypyrrolidone
PXP3	Poplar xylem
R _f	relative mobility
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine
TFMS	Trifluoromethanesulfonic acids
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
μM	micromolar
V	voltage
v/v	volume by volume
V _{max}	maximum velocity
w/v	weight by volume

LIST OF TABLES

Table	Page
1 Comparison between ascorbate peroxidases and classical peroxidases.....	8
2 Purification of peroxidase from cassava tubers.....	36
3 Carbohydrate content of cassava peroxidase.....	52
4 K_m and V_{max} of cassava tuber peroxidase for various substrates.....	76
5 Isozyme of peroxidase in various plant tissues.....	83
6 The K_m of plant peroxidase for various substrates.....	89

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Proposed model illustration H ₂ O ₂ scavenging under excess H ₂ O ₂ or stress condition	5
2 Scheme of dehydrogenative polymerization products of coniferyl alcohol	9
3 Cortex and parenchyma of cassava tuber.....	11
4 Chromatograms of peroxidase activity in cassava tubers.....	12
5 Peroxidase activity stain of non-denaturing-PAGE of cassava tubers (crude extracts).....	13
6 The reaction of peroxidase using selected substrates.....	15-16
7 The specific activity of peroxidase in the crude extract of cassava parenchyma and the fractions obtained by ammonium sulfate fractionation.....	35
8 Concanavalin A Sepharose chromatographic profile of 40-80% ammonium sulfate precipitated fraction of peroxidase from cassava root parenchyma.....	37
9 Concanavalin A Sepharose chromatographic profile of reloaded unbound protein peak.....	38
10 Sephadex G-200 chromatographic profile column of concentrated enzyme from Concanavalin A Sepharose column.....	40
11 Peroxidase activity stain of non-denaturing PAGE of each purified proteins of cassava parenchyma.....	41

Figure	Page
12 Peroxidase activity and protein stain of non-denaturing PAGE of purified protein from Sephadex G-200.....	42
13 Protein stain of SDS-PAGE of fraction from the purification of peroxidase from cassava parenchyma.....	43
14 Molecular weight calibration curve obtained from chromatography on Sephadex G-200 column.....	45
15 Molecular weight calibration curve obtained from SDS-PAGE.....	46
16 Isoelectrofocusing gel electrophoresis of purified peroxidase.....	47
17 Calibration curve of standard pI markers from isoelectrofocusing gel electrophoresis.....	48
18 PAS staining of purified peroxidase from cassava tubers.....	50
19 Total carbohydrate (CHO) of cassava peroxidase and horseradish peroxidase (HRP) by phenol-sulfuric acid method.....	51
20 UV-visible absorption spectrum of cassava peroxidase.....	54
21 Total activity of peroxidase from cassava parenchyma after partial deglycosylation by TFMS.....	55
22 Total carbohydrate (CHO) of peroxidase after partial deglycosylation with TFMS.....	56
23 UV-visible absorption spectrum of purified cassava parenchyma peroxidase.....	58
24 Peroxidase activity stain of mobility on ND-PAGE and SDS-PAGE.....	59
25 Isoelectrofocusing gel electrophoresis of native and partial deglycosylated peroxidase from cassava parenchyma.....	60

Figure	Page
26 Calibration curve of standard pI marker from isoelectric focusing gel electrophoresis.....	61
27 Effect of urea on native and deglycosylated cassava peroxidase.....	63
28 pH optimum of cassava parenchyma peroxidase.....	64
29 pH stability of cassava parenchyma peroxidase.....	65
30 Optimum temperature of purified cassava parenchyma peroxidase.....	67
31 Temperature stability of purified peroxidase isozyme A	68
32 H ₂ O ₂ saturation curve of peroxidase (A) and its Lineweaver-Burk Plot (B).....	70
33 DAB saturation curve of peroxidase (A) and its Lineweaver-Burk Plot (B).....	71
34 Guaiacol saturation curve of peroxidase (A) and its Lineweaver-Burk Plot (B).....	72
35 <i>o</i> -Dianisidine saturation curve of peroxidase (A) and its Lineweaver-Burk Plot (B).....	73
36 Pyrogallol saturation curve of peroxidase (A) and its Lineweaver-Burk Plot (B).....	74
37 Syringaldazine saturation curve of peroxidase (A) and its Lineweaver-Burk Plot (B).....	75
38 Coniferyl alcohol saturation curve of peroxidase.....	77
39 The absorption spectrum in coniferyl alcohol.....	78