T136876

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง S_1-subsite ของเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ด้วยสับสเตรทสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของพารา-ไนโตรอะนิไลด์ โดยทำการแยกน้ำยางจากผลดิบมะละกอสายพันธุ์แขกดำ พร้อมทำการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยสารละลาย 2,2′-dipyridyl disulphide (2PDS) อิ่มตัว เมื่อทำการแยกเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Fast protein liquid chromatography (FPLC) โดยใช้คอลัมน์ HiLoad 26/10 SP-Sepharose HP และนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าปาเปนบริสุทธิ์มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน จากนั้นทำการสังเคราะห์สับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์ของพารา-ไนโตรอะนิไลด์ ได้แก่ *N*-Ac-L-Phe-Gly-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Leu-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Arg-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Phe-*p*NA และ *N*-Ac-L-Phe-Glu-*p*NA จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย thin-layer chromatography, optical rotation, nuclear magnetic resonance, mass spectroscopy และ elemental analysis พบว่าสับสเตรทที่สังเคราะห์ขึ้นมีความบริสุทธิ์สูง เมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะบริเวณ S_1-subsite ของปาเปนบริสุทธิ์โดยวิธีทางจลศาสตร์ พบว่า k_{cat}/K_m ของ *N*-Ac-L-Phe-Gly-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Leu-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Arg-*p*NA และ *N*-Ac-L-Phe-Phe-*p*NA มีค่าเท่ากับ 269.77, 1367.00, 1469.37 และ 473.49 $M^{-1}.S^{-1}$ ตามลำดับ ส่วน *N*-Ac-L-Phe-Glu-*p*NA ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบได้ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจสอบแอคติวิตีกับเอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นอิ่มตัว พบว่ามีแอคติวิตีเท่ากับ 0.05 dA_{410}/min แสดงให้เห็นว่าบริเวณ S_1-subsite ของ active site ของเอนไซน์ปาเปนบริสุทธิ์มีคุณสมบัติค่อนข้าง broad specificity

The aim of the work presented in this thesis was to study active site at S_1-subsite position of purified papain with synthesized *p*-nitroanilide derivative substrates. Papain was extracted from the latex of the unripe papaya fruits (*Carica papaya* L.). It was mixed with saturation 2,2′-dypyridyl disulphide (2PDS) immediately for antiautolysis. Papain was purified by the fast protein liquid chromatography (FPLC) with a Hiload 26/10 SP-Sepharose HP column and showed only one band on SDS-PAGE, with a low molecular mass of purified papain was estimated at 29 kilo-daltons. The *p*-nitroanilide derivative substrate, *N*-Ac-L-Phe-Gly-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Leu-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Arg-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Phe-*p*NA and *N*-Ac-L-Phe-Glu-*p*NA were synthesized in our laboratory and proved to be pure forms by thin-layer chromatography, optical rotation, nuclear magnetic resonance, mass spectroscopy and elemental analysis. The kinetic study showed that the k_{cat}/K_m of purified papain toward *N*-Ac-L-Phe-Gly-*p*NA, *N*-Ac-L-Phe-Leu-*p*NA, *N*-Ac-L-Arg-Phe-*p*NA and *N*-Ac-L-Phe-Phe-*p*NA were 269.77, 1367.00, 1469.37 and 473.49 $M^{-1}.S^{-1}$, respectively, except *N*-Ac-L-Phe-Glu-*p*NA whereas papain activity toward saturated *N*Ac-L-Phe-Glu-*p*NA at 0.05 dA_{410}/min. The result reveals the broad specificity of S_1-subsite pocket located inside the active site of papain.