Thesis Title Purification of Glycyl Endopeptidase from Papaya (*Carica papaya* L.) Latex and Catalysis of Solid-to-Solid Peptide Synthesis

Author Mr. Phanuphong Chaiwut

Degree Doctoral of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pawinee Kanasawud	Chairperson
Prof. Peter J. Halling	Member
Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Member
Lect. Dr. Lalida Shank	Member

ABSTRACT

Preparation of proteases from papaya peels for investigation of the presence of glycyl endopeptidase was carried out by extracting the peels with water. Enzymes in the peel crude extract were precipitated with 70% (v/v) ethanol and 57.61% proteolytic yield was obtained. The peel proteases consisted of papain, chymopapain, two new proteases and aromatic compounds, but did not contain glycyl endopeptidase as papaya latex. Glycyl endopeptidase then had to be purified from fresh papaya latex by using aqueous two-phase system (6% PEG-15% $(NH_4)_2SO_4$), in which total papain was separated in PEG phase. Chymopapain and caricain were precipitated out from salt phase with 11.3% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$. The clear solution part was then used for precipitating out chitinase by adding 20% (w/v) NaCl. Finally, glycyl endopeptidase was precipitated by further addition of NaCl up to 33% to the solution after separating chitinase. The obtained glycyl endopeptidase had 93.47% purity. The enzyme possessed 20 units/mg enzyme powders and the optimal pH and temperature were at 7.5 and 60°C, respectively. It effectively hydrolysed Boc-Ala-Ala-Gly-pNA but not DL-BAPNA. Its activity was not inhibited by chicken egg-white cystatin. This

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

enzyme was composed of reversibly inactive form which assisted to retain the activity at 75% after storing at 40°C for 25 h.

Glycyl endopeptidase was able to catalyse solid-to-solid Z-Gly-Phe-NH_2 synthesis at 40°C. A small excess of acyl donor Z-Gly-OH improved both the initial rate and final yield, whereas the excess of nucleophiles H-Phe-NH_2 inhibited the reaction. Substrate millimolar ratio of 2:1 with 20 mg of both enzyme and solid cysteine produced the highest conversion of 75%. Solid cysteine improved both initial rate and final conversion, but solid EDTA did not affect the synthetic reaction. The coupling Z-Gly-OH with various amino acid amides or esters indicated that glycyl endopeptidase possessed specificity toward H-Tyr-OEt > H-Leu-NH_2 > H-Phe-NH_2 ~ H-Tyr-NH_2. In contrast, the enzyme could not catalyse the syntheses of Z-Gly-Asp-OBzl and Z-Gly-Pro-NH_2. Determination of parameters to improve peptide yield revealed that the rapid autolysis of enzyme was an important factor for terminating the reaction progresses.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทำบริสุทธิ์ไกลซิลเอนโดเพปทิเดสจากยางมะละกอ *(Carica papaya L.)* และการช่วยเร่งการสังเคราะห์เพปไทด์แบบของแข็งต่อของแข็ง

ผู้เขียน นายภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ภาวิณี คณาสวัสดิ์	ประธานกรรมการ
Prof. Peter J. Halling	กรรมการ
ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ
อ. ดร. ลลิดา แชงค์	กรรมการ

บทคัดย่อ

การเตรียมโปรติเอสจากเปลือกมะละกอเพื่อตรวจสอบว่ามีไกลซิลเอนโดเพปทิเดสหรือไม่ ทำโดยการสกัดเอนไซม์ออกจากเปลือกมะละกอแห้งด้วยน้ำ เอนไซม์ในสารละลายสิ่งสกัดจากเปลือกถูกตกตะกอนด้วยเอทานอล 70% โดยปริมาตร และให้ผลผลิตแอคติวิตีของโปรติเอส 57.61% โปรติเอสของเปลือกประกอบด้วยปาเปน ไคโมปาเปน โปรติเอสชนิดใหม่สองชนิดและสารประกอบอะโรมาติก แต่ไม่มีไกลซิลเอนโดเพปทิเดสดังเช่นในยางมะละกอ ไกลซิลเอนโด-เพปทิเดสจึงถูกทำบริสุทธิ์จากยางมะละกอสดโดยการสกัดสองวัฏภาค (6% พีอีจี – 15% แอมโมเนียมซัลเฟต) ซึ่งปาเปนทั้งหมดถูกแยกออกไปในชั้นของพีอีจี ไคโมปาเปนและคาริเคนถูกแยกออกจากชั้นของเกลือโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 11.3% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นสารละลายส่วนใสถูกใช้สำหรับตกตะกอนไคติเนสโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ 20% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในขั้นตอนสุดท้ายไกลซิลเอนโดเพปทิเดสถูกตกตะกอนโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเป็น 33% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในสารละลายที่ได้หลังจากแยกไคติเนส ไกลซิลเอนโดเพปทิเดสที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์ 93.47% เอนไซม์นี้มีแอคติวิตี 20 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์ มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 7.5 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สามารถไฮโดรไลส์ Boc-Ala-Ala-Gly-pNA ได้ดีแต่ไฮโดรไลส์ DL-BAPNA ได้น้อยมาก แอคติวิตี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งด้วยซีสเททินจากไข่ขาว เอนไซม์นี้ประกอบด้วยรูปแบบที่ถูกยับยั้งแอคติวิตีที่ผันกลับได้ซึ่งช่วยรักษาแอคติวิตีไว้ได้ 75% ภายหลังจากเก็บไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส 25 ชั่วโมง

ไกลซิลเอนโดเพปทิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Z-Gly-Phe-NH_2 ในระบบของแข็ง-ของแข็งที่ 40 องศาเซลเซียส การใช้เอซิลดอเนอร์ Z-Gly-OH มากเกินพอเล็กน้อยช่วยเพิ่มอัตราเร็วและผลผลิตสุดท้าย ในขณะที่การใช้นิวคลีโอไฟล์ H-Phe-NH_2 มากเกินพอยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา สับสเตรทในอัตราส่วนมิลลิโมลาร์ 2:1 ที่ใช้ร่วมกับเอนไซม์และของแข็งซีสเทอีนอย่างละ 20 มิลลิกรัม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ได้ 75% ของแข็งซีสเทอีนช่วยปรับปรุงทั้งอัตราเร็วและผลผลิตสุดท้าย แต่ของแข็ง EDTA ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์ การจับกันของ Z-Gly-OH กับเอไมด์หรือ เอสเทอร์ของกรดอะมิโนต่างๆ บ่งชี้ว่าไกลซิลเอนโดเพปทิเดส มีความจำเพาะต่อ H-Tyr-OEt > H-Leu-NH_2 > H-Phe-NH_2 ~ H-Tyr-NH_2 ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ไม่สามารถเร่งการสังเคราะห์ Z-Gly-Asp-OBzl และ Z-Gly-Pro-NH_2 การศึกษาปัจจัยที่จะช่วยปรับปรุงผลผลิตเพปไทด์พบว่าการสลายตัวอย่างรวดเร็วของเอนไซม์เองเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์หยุดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved