



UOVS-SASOL-BIBLIOTEK 0280801



11104455080122000019

HIEROP TOEGEFLEEN IS AG ONDER
GEEN OMWANDELINGE UIT DIE
BIBLIOTEK VERWIDDER WORD NIE

ISOLERING EN KARAKTERISERING VAN
'N AMINOPEPTIDASE VAN DIE TERMIET,
TRINERVITERMES TRINERVOIDES
(Sjöstedt).

deur

Michiel Christiaan van der Westhuizen

VERHANDELING

voorgelê ter gedeeltelike vervulling
 van die vereistes vir die graad

M.Sc. in die NATUURWETENSKAPPE

in

ENTOMOLOGIE

in die

DEPARTEMENT van DIERKUNDE/ENTOMOLOGIE

108068
 aan die

UNIVERSITEIT van die ORANJE-VRYSTAAT

Studieleier: Prof. P.H. Hewitt

Medestudieleier: Prof. P.J. du Toit

NOVEMBER 1979

Univerzita J. A. Komenského v Bratislave
16-06-1980
Klasifik. číslo: 1695.736.04.19.20
No. 280801
M. J. STREK

[Faint, illegible text in a rectangular box]

INHOUDSOPGAWE

BLS.

BEDANKINGS	i
AFKORTINGS EN SIMBOLE	ii
OPGAAF VAN FIGURE	iv
OPGAAF VAN TABELLE	viii
<u>HOOFSTUK 1</u> INLEIDING	1
<u>HOOFSTUK 2</u> EKSPERIMENTELE PROSEDURES	
2.1 Materiaal	3
2.2 Chemikalieë	3
2.3 Algemene prosedures gebruik	4
2.4 Proteïenbepalings	4
2.5 Aktiwiteitsbepalings van ensieme	5
2.5.1 Aminopeptidase	5
2.5.2 Ariel-beta-glukosidase	6
2.5.3 Sellulase	6
2.6 Voorbereiding van harse vir kolomchromatografie	7
2.6.1 Anioonuitruilingsharse	7
2.6.1.1 DEAE-sellulose	7
2.6.1.2 DEAE-Sephadex	8
2.6.2 Katioonuitruilingsharse (CM-Sephadex)	8
2.6.3 Sephadex G-200 jelchromatografie	9
2.7 Bepaling van die lokaliteit van aminopeptidase	9
2.8 Suiweringsprosedure	11
2.8.1 Ekstraksie van ensiem uit termiete (stap 1)	11
2.8.2 Ammoniumsulfaatfraksionering (stap 2)	11
2.8.3 Anioonuitruilingschromatografie	12
2.8.3.1 DEAE-sellulose: 0 - 0,4 M NaCl-gradiënt (stap 3)	12
2.8.3.2 DEAE-sellulose: 0 - 0,25 M NaCl-gradiënt (stap 4)	13
2.8.3.3 DEAE-Sephadex: 0 - 0,25 M NaCl-gradiënt (stap 5)	13

	<u>BLS</u>
2.8.4	Sephadex G-200-chromatografie (stap 6) 17
2.8.5	Katioonuitruilingschromatografie (stap 7) 18
2.8.6	Sephadex G-200-jelchromatografie (stap 8) 18
2.8.7	Samevattend 21
2.9	Homogeniteitsbepalings 21
2.9.1	Poliakriëlamiedjëlelektroforese 21
2.9.1.1	Analitiese poliakriëlamiedjëlelektroforese 21
2.9.1.2	SDS-poliakriëlamiedjëlelektroforese 24
2.9.2	Jelfiltrasiestudies met Sephadex G-200 25
2.10	Bepaling van chemiese eienskappe van ensiem - kinetiese studies 25
2.10.1	Substraatspesifisiteit en effek van pH- variasie 25
2.10.2	Invloed van verskillende buffers en buffer- konsentrasies 26
2.10.3	Invloed van verskillende konsentrasies soute en EDTA 27
2.10.4	Kinetiese studies met verskillende sub- strate 27
2.10.5	Temperatuurstudies 27
2.10.6	Inhibisiestudies 27
2.10.7	Hidrolise van tripeptiede 28
 <u>HOOFSTUK 3</u> RESULTATE EN BESPREKING	
3.1	Voorlopige ondersoeke 29
3.1.1	Lokaliteit van aminopeptidase 29
3.1.2	Voorlopige ondersoeke en suiweringsprose- dure 29
3.2	Suiwerheid en fisiese eienskappe van die ensiem 30
3.2.1	Elektroforetiese studies 30
3.2.1.1	Analitiese poliakriëlamiedjëlelektroforese 30
3.2.1.2	SDS-poliakriëlamiedjëlelektroforese 32
3.2.2	Jelfiltrasiestudies op Sephadex G-200 35
3.3	Chemiese eienskappe van aminopeptidase 37
3.3.1	Substraatspesifisiteit en die effek van pH-variasie 37

	<u>BLS.</u>	
3.3.2	Invloed van verskillende buffers en buffer= konsentrasies	41
3.3.3	Invloed van verskillende konsentrasies soute en EDTA	41
3.3.4	Algemene kinetiese eienskappe	45
3.3.5	Temperatuurstudies	47
3.3.6	Inhibisiestudies	47
3.3.7	Hidrolise van tripeptiede	50
3.4	Bespreking	50
3.5	Opsomming	54
BYVOEGSEL 1		57
BYVOEGSEL 2		58
BYVOEGSEL 3		59
BYVOEGSEL 4		60
BYVOEGSEL 5		61
BYVOEGSEL 6		63
<u>HOOFSTUK 4</u>	LITERATUUROPGAWE	64

BEDANKINGS

Die outeur wil graag proff. P.H. Hewitt en P.J. du Toit bedank vir die nuttige advies en kritiek, asook vir prof. R. van Pletzen vir die hulp met die taalgebruik in die verhandeling.

Graag wil ek ook my dankbetuiging uitspreek teenoor die Universiteit van die O.V.S. vir die geleentheid wat my gegun is om hierdie studie te onderneem.

Vir Wilma en GJ wil ek graag sê baie dankie vir al die aanmoediging en geduld tydens die studie en opskryf van die verhandeling.

Laastens wil ek 'n woord van dank aan Hom uitspreek, wat vir die sukses van hierdie studie verantwoordelik was.

AFKORTINGS EN SIMBOLE

a	Stokes radius, cm
Ala-naftielamied	DL-alanien-beta-naftielamied
ADH	Gis-alkoholdehidrogenase
BAPA	N-bensoiel-DL-arginien-p-nitroanilied
BSA	Beesserumalbumien
cm	Sentimeter
cm ³	Kubieke sentimeter
COOH-end	Karboksiterminale end
Cyt c	Sitochroom c
D	Diffusiekoëffisiënt, cm ² /sek
Dalton	Eenheid vir molekulêre massa
DEAE	Diëtielaminoëtielgroep
dm ³	Kubieke desimeter
DMSO	Dimetielsulfoksied
E	log(1000v/T)
Ea	Aktiveringsenergie, J
EDTA	Etileendiamientetra-asynsuur
Entropie-eenheid	kal/°K/mol
F	T ln(v/T)
Filter nr.54	Verskaf ligpad met golflengte van 520 - 580 nm
g	Gravitasiekonstante, gram
Gly-Gly-Leu	Glisielglisielleusien
Gly-Gly	Glisielglisien
Gly	Glisien
h	Hoogte in cm
H	Entalpie, J
i	Inhibeerderkonsentrasie, M
J	Joule
kJ	Kilojoule
kal	Kalorie
kcal	Kilokalorie
Leu-Gly-Gly	Leusielglisielglisien
Leu-Gly	Leusielglisien
Leu	Leusien
Leu-p-nitroanilied	Leusien-p-nitroanilied

log	Logaritme tot die grondtal 10
ln	Natuurlike logaritme
Lys	Lisien
Lys-p-nitroanilied	Lisien-p-nitroanilied
M	Molariteit
mg	Milligram
min	Minuut
MM	Molekulêre massa
mM	Millimolaar
mm	Millimeter
mm ³	Kubieke millimeter
mV	Millivolt
<u>n</u>	1,3
NH ₃ -end	Aminoternale end
Nipheglu	2-nitrofeniel-beta-D-glukopiranosied
nm	Nanometer
Q ₁₀ -waarde	Faktor waarmee reaksiesnelheid toeneem by n styging van 10°C
Rf*	Afstand wat proteïen vanaf oorsprong migreer het/afstand wat bromofenolblou vanaf oorsprong migreer het
Rf	Relatiewe afstand beweeg indien die oplossingse middelfront as 1 geneem word
RNase	Ribonuklease
s	Substraatkonsentrasie, M
S	Entropie, J/°K/mol
SDS	Natriumdodesielsulfaat
sek	Sekonde
<u>t</u>	Tyd, minute
T	°K
TEMED	NNN'-N'-tetrametieleetileendiamien
v	Reaksiesnelheid, ensimatiese aktiwiteit, µmol substraat verwerk/min/cm ³
Ve	Eluëringsvolume
V _o	Uitsluitingsvolume
ZTNE	N-karbobensoksi-L-tirosien-p-nitrofeniel-ester
µM	Mikromolaar

OPGAAF VAN FIGURE

FIGUUR

BLS.

- 1 Skets van die spysverteringskanaal van T. triner-voides werkers. 10
- 2 Die chromatografie van aminopeptidase op n 2,2 cm x 60 cm DEAE-sellulose kolom met n NaCl-gradiënt van 0 - 0,4 M in 1 dm³ 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15. 14
- 3 Die chromatografie van ariel-beta-glukosidase op n 2,2 cm x 60 cm DEAE-sellulose kolom met n NaCl-gradiënt van 0 - 0,4 M in 1 dm³ 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15 14
- 4 Die chromatografie van sellulase op n 2,2 cm x 60 cm DEAE-sellulose kolom met n NaCl-gradiënt van 0 - 0,4 M in 1 dm³ 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15 15
- 5 Die chromatografie van aminopeptidase op n 2,2 cm x 53 cm DEAE-sellulose kolom met n NaCl-gradiënt van 0 - 0,25 M in 1 dm³ 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15 15
- 6 Die chromatografie van ariel-beta-glukosidase op n 2,2 cm x 53 cm DEAE-sellulose kolom met n NaCl-gradiënt van 0 - 0,25 in 1 dm³ 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15. 16
- 7 Die chromatografie van aminopeptidase op n 1,9 cm x 28 cm DEAE-Sephadex kolom met n NaCl-gradiënt van 0 - 0,25 M in 1 dm³ 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15. 17

FIGUUR

BLS.

- 8 Die chromatografie van aminopeptidase op n 2,2 cm x 90 cm Sephadex G-200 kolom met 0,15 M KCl-oplossing. 19
- 9 Die chromatografie van aminopeptidase op n 2,2 cm x 60 cm CM-Sephadex kolom met 0,016 M Na-sitraatfosfaatbuffer, pH 6,40. 19
- 10 Die chromatografie van aminopeptidase op n 2,2 cm x 90 cm Sephadex G-200 kolom met 0,15 M KCl-oplossing. 20
- 11 Vloeidiagram van die isolasie van aminopeptidase vanuit T. trinervoides werkers en larwes. 23
- 12 Densitogram verkry met behulp van analitiese poliakriëlamiedjelelektroforese. 31
- 13 Densitogram verkry met behulp van SDS-poliakriëlamiedjelelektroforese. 33
- 14 Bepaling van die molekulêre massa van aminopeptidase met behulp van SDS-poliakriëlamiedjelelektroforese. 34
- 15 Bepaling van die molekulêre massa van aminopeptidase met behulp van Sephadex G-200-jelfiltrasiestudies. 34
- 16 Bepaling van die diffusiekoëffisiënt van aminopeptidase met behulp van Sephadex G-200-jelfiltrasiestudies. 36
- 17 Bepaling van die Stokes radius van aminopeptidase met behulp van Sephadex G-200-jelfiltrasiestudies. 36

FIGUUR

BLS.

27	Bepaling van die entalpie en entropie van aktivering van aminopeptidase in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0.	48
28	Bepaling van die entropie van aktivering van aminopeptidase in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0.	49
29	Die invloed van temperatuur op die stabiliteit van aminopeptidase in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0.	49
30	Produkinhibisie van aminopeptidase met lisien in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5. $1/v$ versus i .	51
31	Produkinhibisie van aminopeptidase met lisien in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5. s/v versus i .	51
32	Produkinhibisie van aminopeptidase met lisien in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5. $1/v$ versus $1/s$.	52
33	Bepaling van die Michaeliskonstante van Lys-p-nitroanilied as substraat deur gebruik te maak van die skynbare K_m -waardes soos verkry uit figuur 32. i versus K_m .	52
34	Skeiding en identifisering van hidrolitiese produkte met behulp van dunlaagchromatografie.	53

OPGAAF VAN TABELLE

<u>TABEL</u>	<u>BLS</u>
1 Opgesomde resultate van die suiweringsprosedure ter verkryging van die aminopeptidase ensiem vanuit <u>T. trinervoides</u> .	22
2 Opgesomde resultate van die suiweringsprosedure van aminopeptidase ensiem vanuit <u>T. trinervoides</u> en die uitskakeling van ariel-beta-glukosidase.	22
3 Spesifieke aktiwiteit en verspreiding van aminopeptidase in <u>T. trinervoides</u> werkers.	29
4 Verspreiding van aminopeptidase na voorlopige ammoniumsulfaatfraksionering.	30
5 Fisiese konstantes van aminopeptidase, geïsoleer uit <u>T. trinervoides</u> .	37
6 Substraatspesifisiteit van aminopeptidase. Hidrolise van verskillende substrate in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5.	40
7 Vergelyking van ensimatiese hidrolise van verskillende substrate by optimum pH-waardes in 0,02 M Tris-HCl-buffer.	40
8 Chromatografiese skeiding en identifisering van die produkte na die hidrolise van tripeptiede deur aminopeptidase.	53

HOOFSTUK 1

1 INLEIDING

By insekte, net soos by die hoër diere, is die spysverteringskanaal primêr met die vertering en absorpsie van voedsel gemeid. Verskillende gedeeltes van die dermkanaal is by verskillende aspekte van hierdie funksies betrokke. In sommige insekte, spesifiek die vloeistofvoerders, mag vertering ekstern plaasvind voordat die voedsel ingeneem word, deurdat die verteringsensieme in die voedsel ingespuet is. Oor die algemeen vind vertering egter intern plaas, hoofsaaklik in die middelderm. In hierdie sone van die spysverteringskanaal word die meeste hidrolitiese ensieme dan ook geproduseer (Chapman, 1971).

Verteringsensieme breek die meeste polimeriese makromolekule in die voedsel na meer eenvoudige verbindings af, om absorpsie moontlik te maak. Die meeste koolhidrate word na monosakkariede gehidroliseer, maar by die meerderheid van insekte is daar geen ensiem wat instaat is om sellulose, wat dikwels in die dieet teenwoordig is, af te breek nie. Die insekte wat onder andere sellulose as voedselbron gebruik, veral die termiete en houtvretende kakkerlakke, huisves mikro-organismes wat dikwels 'n rol speel by sellulose-vertering. Proteïene word na polipeptiede afgebreek. Dit word algemeen aanvaar dat polipeptiedvertering in die middelderm of agterderm plaasvind. Dit is nie bekend of dit in die lumen of epiteelselle van die spysverteringskanaal, of in beide, plaasvind nie. Die moontlikheid dat dit in die ruimte tussen die peritrofiese membraan of in die ruimte tussen die intima en die epiteellaag van die spysverteringskanaal plaasvind, is ook nie uitgesluit nie. Vette mag onveranderd of in sommige gevalle as vry vetsure en gliserol geabsorbeer word. Al die ensieme vervul hierdie aktiwiteite optimaal binne 'n beperkte pH- en temperatuurgebied (Chapman, 1971).

Insekte produseer 'n hele reeks proteolitiese ensieme. 'n Tripsienagtige proteïenase word in die middelderm geproduseer, wat

verantwoordelik is vir die afbreek van proteïene na peptone en polipeptiede. Daar kom ook verskillende tipes peptidasas, nl. karboksipolipeptidasas wat die peptiedketting vanaf die -COOH-end aanval, aminopolipeptidasas wat die ketting vanaf die -NH₂-end aanval en dipeptidasas wat alle dipeptiedes hidroliseer, voor (Bursell, 1970; Chapman, 1971 en House, 1974).

Die teenwoordigheid van aminopeptidasas is al in heelwat insekte bewys (Day en Waterhouse, 1953; Gilmour, 1961 en Wigglesworth, 1965). Volgens beskikbare literatuur is daar nog geen insek-aminopeptidase geïsoleer nie. Op grond hiervan en as 'n toevoeging tot die reeds bekende ensieme soos ariel-beta-glukosidase (Potts en Hewitt, 1972 en Hewitt, Retief en Nel, 1974), trehalase (Retief en Hewitt, 1973) en sellulase (Potts en Hewitt, 1973, 1974a en 1974b), geïsoleer uit die grasdraertermiet Trinervitermes trinervoides (Sjöstedt) (Nasutitermitinae), is besluit om 'n studie aangaande die aminopeptidase van hierdie insek te loods.

HOOFSTUK 2

EKSPERIMENTELE PROSEDURE

2.1 Materiaal

T. trinervoides-kolonies is in die omgewing van Bloemfontein (O.V.S.) versamel. Slegs die werkers en larwes van hierdie grasdraertermiet is in die ondersoek gebruik.

2.2 Chemikalieë

Die onderstaande verbindings is gebruik. Hierdie en alle ander chemikalieë van n verskeidenheid handelsmerke was analities suiwer.

<u>Reagens</u>	<u>Bron</u>
DL-alanien-beta-naftielamied	ICN Pharmaceuticals
Alkoholdehidrogenase	Merck
Amidoswart	Merck
Ammoniumpersulfaat	BDH
Akriielamied	BDH
Beesserumalbumien	Seravac
N-bensoïel-DL-arginien-p-nitroanilied	ICN Pharmaceuticals
Blou dekstraan	Sigma
Bromofenolblou	BDH
CM-Sephadex (C-25)	Pharmacia
DEAE-Sephadex (A-25)	Pharmacia
Diëtielaminoëtielsellulose (DE-52)	Whatman
Dimetielsulfoksied	BDH
Etileendiamientetra-asynsuur	BDH
Glisielglisiel-L-leusien	ICN Pharmaceuticals
Glisielglisien	BDH
N-glisiel-L-leusien	BDH
Glisien	BDH
Hammersten kaseïen	ICN Pharmaceuticals

<u>Reagens</u>	<u>Bron</u>
N-karbobensoksi-L-tirosien-p-nitrofenielester	ICN Pharmaceuticals
"Kenacid blue R"	BDH
Kieseljel 60F ₂₅₄	Merck
L-leusielglisielglisien	NBCo
DL-leusien	BDH
L-leusien-p-nitroanilied	BDH
DL-lisien monowaterstofchloried	BDH
L-lisien-p-nitroanilied	ICN Pharmaceuticals
2-merkaptoëtanol	BDH
NN-metileenbisakrieland	BDH
Molekulêre massamerkers	BDH
Natriumdodesielsulfaat	BDH
2-nitrofeniel-beta-D-glukopiranosied	BDH
NNN'N'-tetrametieletileen-diamien	BDH
Ovalbumien	Miles
Ribonuklease	Seravac
Sephadex G-200	Pharmacia
Sitochroom c	BDH

2.3 Algemene prosedures gebruik

Tensy anders vermeld is alle stappe tydens die isoleringsprosedure en ander ondersoeke van die ensiem by 4°C uitgevoer. Na afloop van elke suiwingstap is n monster getrek vir ensiemaktiwiteits- en proteïenkonsentrasiebepalings. Van hierdie monster is ook vir analitiese jelelektroforese gebruik.

Alle buffers tensy anders vermeld is volgens Gomori (1955) voorberei. Al die lineêre krommes is statisties volgens Spiegel (1972) gepas.

2.4 Proteïenbepalings

Die spektrofotometriese 280 nm; 260 nm metode van Warburg en

Christian (Layne, 1957) is deurgaans gebruik om die proteïen-konsentrasie te bepaal. Vir die standaardisering van hierdie metode is van 'n 2 % BSA-oplossing gebruik gemaak.

2.5 Aktiwiteitsbepalings van ensieme

2.5.1 Amino-peptidase

Lys-p-nitroanilied is as substraat by die roetine aktiwiteitsbepalings (Barman, 1969) van amino-peptidase gebruik. Die finale konsentrasie van verbindings in die oplossing was 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5 en dié van die substraat 3 mM. Ensiembetwattende oplossings is sodanig verdun dat 'n aktiwiteit van tussen 0,001 en 0,003 eenhede* gehandhaaf is.

'n Tipiese aktiwiteitsbepaling is soos volg uitgevoer: Die gedistilleerde water, ensiem- sowel as die buffer- en substraatoplossing is vooraf vir 10 minute in 'n warmbad by 30°C gehou. In die kuvet is 300 mm³ gedistilleerde water, 1 cm³ 0,03 M buffer-, 100 mm³ substraat- en laastens die ensiemoplossing (finale volume 1,5 cm³) bymekaar gevoeg en deeglik gemeng. Die toename in absorbansie by 405 nm is met 'n Beckman Model 24 spektrofotometer, toegerus met 'n Shandon (Auto-graph S) registreerder, bepaal. Die verwysingsel was soortgelyk, met die verskil dat die ensiem weggelaat is, of andersins soos aangedui. Hidrolise van ander aminosuur-p-nitroaniliede is onder identiese eksperimentele toestande soos hierbo genoem, gevolg. Die snelheid van amino-peptidase-gekataliseerde hidrolise van ZTNE en Ala-naftielamied is onderskeidelik volgens Barman (1969) en Lee, Larue en Wilson (1971) bepaal.

Die gevormde produkte na die hidrolise van die tripeptiede Leu-Gly-Gly en Gly-Gly-Leu is geïdentifiseer deur van dunlaagchromatografie gebruik te maak. Hierdie skeidings is op kieseljel 60F₂₅₄-chromatografiese plate met n-butanol(60), ysasynsuur(15) en gedistilleerde water(25) (Smith en Feinburg,

* 'n Eenheid ensiemaktiwiteit is die hoeveelheid ensiem wat 1 µmol substraat per minuut na produkte omskakel.

1965) as mobiele fase uitgevoer. Na hidrolise is die verskillende produkte deur middel van dunlaagchromatografie geskei en met behulp van Gly, Leu, Gly-Gly, Gly-Leu, Leu-Gly-Gly en Gly-Gly-Leu as standarde geïdentifiseer. Aminosure en peptiede is deur middel van 'n 0,2% ninhidrien-spuitreagens in asetoon sigbaar gemaak.

2.5.2 Ariel-beta-glukosidase

Ariel-beta-glukosidase-aktiwiteit (Barman, 1969) is met nipheglu as substraat bepaal. Die finale konsentrasie van die substraat was 3 mM in 'n 0,02 M Na-sitraatfosfaatbuffer met 'n pH van 6,4.

Presies dieselfde metode soos beskryf in 2.5.1 is gevolg om die aktiwiteit van die ensiem te bepaal, buiten dat die verandering in absorpsie by 400 nm toegepas is.

2.5.3 Sellulase

Vir die bepaling van sellulase-aktiwiteit is karboksimetiel-sellulose, soos voorgestel deur Potts en Hewitt (1973), as substraat gebruik. Hierdie metode van relatiewe aktiwiteitsbepaling is die aangepaste metode van dié van Bernfeld (1955). Die substraatoplossing was 'n 1% oplossing van karboksimetiel-sellulose in 0,02 M Na-sitraatfosfaatbuffer, pH 5,6.

Nadat 1 cm³ van die ensiemoplossing vir 30 minute met 2 cm³ van die gebufferde substraatoplossing by 30°C geïnkubeer is, is die reaksie gestop deur die byvoeging van 2 cm³ van die dinitrosalisielsuur reagens (Potts en Hewitt, 1973). Die mengsel is vir 5 minute in kokende water verhit, onder lopende kraanwater afgekoel en na 7 cm³ met gedistilleerde water verdun. Die kleurintensiteit van die bruin oplossing is fotometries met 'n Klett-Summerson kolorimeter (nr. 54 filter) bepaal. 'n Verwysingsoplossing is deur die vermenging van die oplossings in die volgorde ensiem, dinitrosalisielsuur en laastens substraat, voorberei. Die toename in kleurintensiteit van die inkubasieloplossing teenoor die verwysingsoplossing is 'n funksie van die hoeveelheid reduserende groepe deur die ensiem vrygestel.

Die aktiwiteitsbepalings van ariel-beta-glukosidase en sellulase is hoofsaaklik gebruik om die verspreiding van hierdie ensieme na kolomchromatografie te kon vasstel en vir die identifisering van die ooreenstemmende proteïensones na elektroforese.

2.6 Voorbereiding van harse vir kolomchromatografie

2.6.1 Anioonuitruilingsharse

2.6.1.1 DEAE-sellulose

Vir die voorbereiding van die DEAE-sellulose (DE-52) is die aanwysings van die vervaardiger, soos hieronder uiteengesit, gevolg:

Ongeveer 150 g voorafgeswelde DEAE-sellulose is in 900 cm³ CO₂-vrye 0,1 M Tris-HCl-buffer (pH 8,15) gesuspendeer en toegelaat om vir 'n periode van 24 uur te staan. Die oordeckende buffer is gedekanteer en die anioonuitruiler is onmiddellik in dieselfde volume 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15, geher-suspendeer. Na sedimentering van die hars is die oordeckende vloeistof verwyder en die pH sowel as konduktiwiteit daarvan bepaal. Bogenoemde prosesse van suspendering, dekantering, pH- en konduktiwiteitsbepalings is herhaal totdat die pH en konduktiwiteit van die oordeckende vloeistof ooreengestem het met dié van die wasmiddel.

Fyn deeltjies is soos volg uit die hars verwyder: Voorafgeswelde DEAE-sellulose is gesuspendeer in die buffer om 'n suspensie van 1 g hars per 6 cm³ buffer te gee. Nadat die suspensie vir 'n bepaalde tyd (\underline{t}), bereken vanaf die formule $\underline{t} = \frac{nh}{v}$, toegelaat is om te sedimenteer, is die oordeckende vloeistof met die fyner deeltjies afgesuig.

* \underline{t} = tyd in minute, \underline{h} = die hoogte van die suspensie in 'n geskikte houër in cm en \underline{n} is 'n faktor van 1,3.

n Kolom, 2,2 cm in deursnee en 60 cm lank, is onder gravitasie met die geëkwilibreerde anioonuitruilingshars gepak. Die kolom is teen n vloeitempo van 21 cm^3 per uur met dieselfde buffer geloog, totdat die pH en konduktiwiteit van die uitvloei dieselfde was as dié van die buffer aangewend op die kolom.

2.6.1.2 DEAE-Sephadex:

Die DEAE-Sephadex, A-25, is op n soortgelyke wyse soos deur Du Toit (1974) beskryf, behandel. Voldoende tyd is toegelaat vir maksimale uitsetting van die anioonuitruiler in gedistilleerde water. Daarna is die hars op n filter drooggesuig, in 0,5 M NaOH (1 g droë anioonuitruiler per 12 cm^3 oplossing) gesuspendeer en vir n verdere 30 minute gelaat. Die hars is daarna 2 maal met dieselfde volume 0,5 M NaOH en daarna met gedistilleerde water gewas, totdat die filtraat n pH van 8,0 vertoon het. Hierdie hars is in 0,5 M NaCl-oplossing (1 g droë anioonuitruiler per 12 cm^3 oplossing) gesuspendeer en vir 60 minute gelaat voordat dit op n sinterglastregter nog drie maal met dieselfde volume NaCl-oplossing gewas is. Daarna is die hars met gedistilleerde water gewas, totdat die konduktiwiteit van die filtraat dieselfde was as dié van die gedistilleerde water.

Nadat al die water afgesuig is, is die hars gesuspendeer in n volume 0,02 M Tris-HCl-buffer (pH 8,15) om n suspensie van 1 g droë ionuitruiler per 12 cm^3 buffer te verskaf. Die fyn deeltjies is verwyder soos in 2.6.1.1 beskryf, terwyl dieselfde prosedure vir die pak en ekwilibrering van die kolom gevolg is.

2.6.2 Katioonuitruilingsharse (CM-Sephadex)

Vir die voorbereiding van die CM-Sephadex, C-25, is die prosedure van die vervaardiger gevolg. Hierdie hars is net soos die anioonuitruilers toegelaat om voor gebruik te swel in gedistilleerde water. Nadat die water afgesuig is, is die hars gesuspendeer in 500 cm^3 0,5 M NaOH, geroer vir 20 minute en nog drie maal met 500 cm^3 hoeveelhede NaOH gewas. Daarna

is die hars met gedistilleerde water gewas totdat die pH van die filtraat 8,0 was. Die hars is, na suspensie in 500 cm³ 0,5 M NaCl-oplossing, vir 60 minute gelaat voordat dit nog drie maal met dieselfde volume NaCl-oplossing gewas is. Na hierdie behandeling is die hars met gedistilleerde water gewas totdat die konduktiwiteit van die wasmiddel en filtraat dieselfde was. Die fyn deeltjies is verwyder en die hars is in die natriumvorm onder gravitasie gepak. Daarna is die kolom geëkwilibreer deur dit te loog met 0,016 M Natriumfosfaatbuffer, pH 6,40.

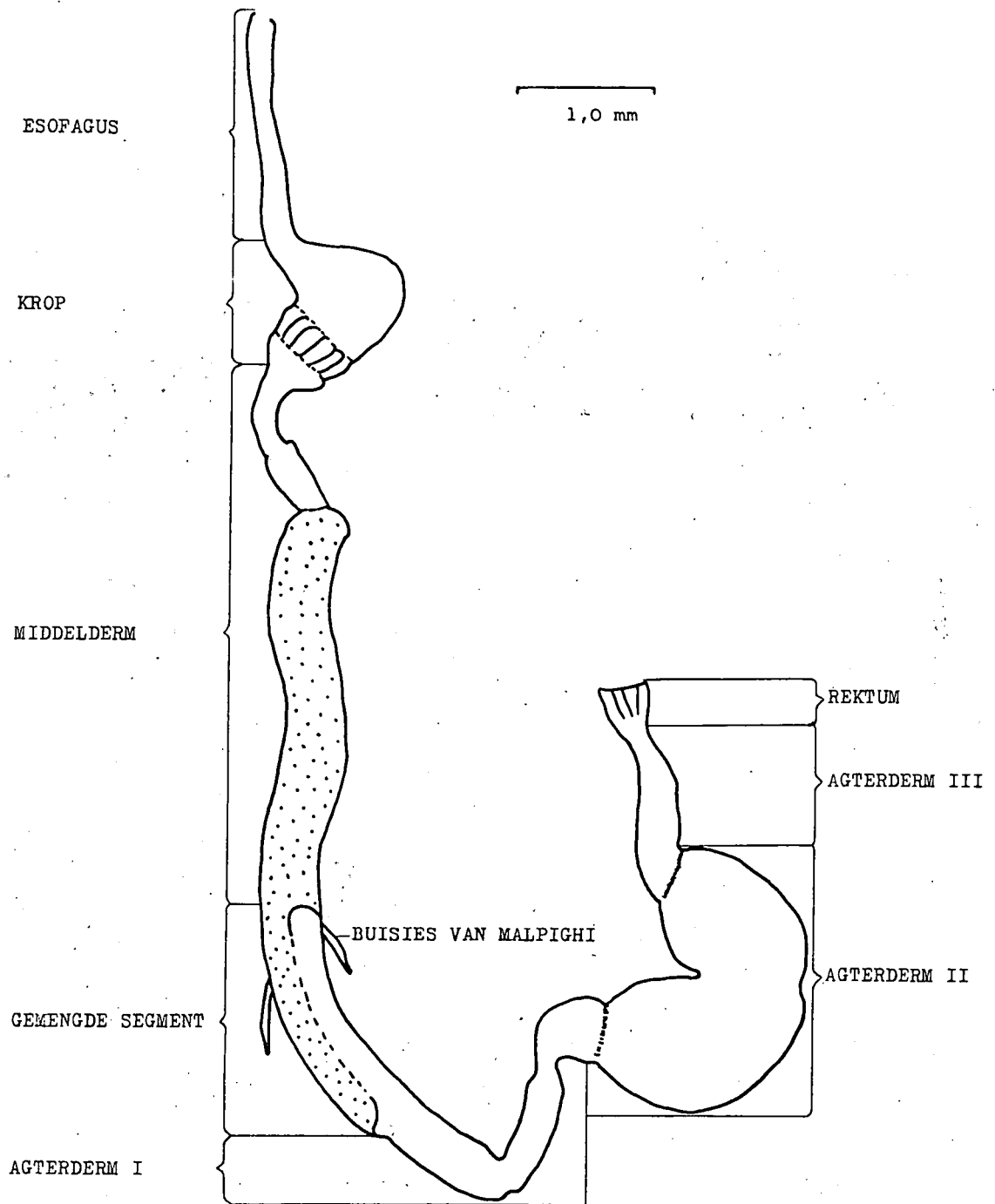
2.6.3 Sephadex G-200 jelchromatografie

Die hars is volgens voorskrif toegelaat om te swel in 0,15 M KCl-oplossing en deeglik gewas met dieselfde oplossing. Daarna is 'n kolom met afmetings van 2,2 cm in deursnee en 90 cm lank onder gravitasie gepak en met die KCl-oplossing geloog om ewilibreering te bewerkstellig.

2.7 Bepaling van die lokaliteit van aminopeptidase

Die morfologie van die spysverteringskanaal van T. trinervoides word in figuur 1 aangetoon. Tien T. trinervoides werkers is by 4°C afgekoel. Die spysverteringskanale van die termiete is versigtig verwyder en opgesny om die volgende weefsels te gee: Voorderm, middelderm, gemengde segment, agterderm 1 en agterderm 2 en 3. Met die verdeling van die spysverteringskanale is vermenging tussen die spysverteringskanaalinhoud van die voorderm, middelderm, gemengde segment en agterderm 1 so ver moontlik verhoed.

Elke weefseltipe van die 10 termiete is saam gegropeer en in 'n Potter-Elvehjem in 5 cm³ 0,03 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5, gehomogeniseer. Daarna is die homogenaat teen 20 000 g vir 30 minute by 4°C gesentrifugeer en die oordeckende vloeistof deur glaswol gefiltreer om van die lipiede ontslae te raak. Proteïen- en aminopeptidase-aktiwiteitsbepalings is op elk van die ekstraksies uitgevoer.



FIGUUR 1: Skets van die spysverteringskanaal van T. trinervoides werkers.

2.8 Suiweringsprosedure

2.8.1 Ekstraksie van ensiem uit termiete (stap 1)

Honderd vyf-en-twintig gram gevriesde termiete is in n aanvangsvolume van 600 cm^3 0,9% NaCl-oplossing vir 10 minute in n "Waring blender" teen maksimum omwentelings gehomogeniseer om die termiete in klein brokstukke op te sny. Daarna is die homogenaat vir n verdere 10 minute in n "Ultra Turrax" tot n pasta gehomogeniseer. Die finale volume van die homogenaat was $1,25 \text{ dm}^3$ om n ongeveer tien maal verdunning ($10 \text{ cm}^3/\text{g}$ nat termiete) van die weefsels te verskaf. Nadat die homogenaat vir 8 uur stadig by 4°C geroer is, is die growwer materiaal verwyder deur dit deur agt diktes voorafbenatte kaasdoek te filtreer. Die filtraat is teen 20 000 g vir 45 minute gesentrifugeer, waarna die oordekkende vloeistof deur glaswol gefiltreer is.

n Verdere ekstraksie is soos bo beskryf, op die materiaal wat op die kaasdoek agtergebly het tesame met die neerslag in die sentrifugeerbuis, uitgevoer. Vanweë die lae aminopeptidase-aktiwiteit in hierdie fraksie is dit nie by die aanvanklike ensiemoplossing gevoeg nie.

Die proteïenekstrak (ru-ekstrak) is teen 2 veranderings van 25 dm^3 gedistilleerde water, met 4 uur tussenposes, gedialiseer. Ensimatiese aktiwiteits- en proteïenkonsentrasiebepalings is op die ru-ekstrak uitgevoer en het gedui op 12,426 g proteïen, 219,00 aminopeptidase-eenhede en 641,35 ariel-beta-glukosidase-eenhede in totaal.

2.8.2 Ammoniumsulfaatfraksionering (stap 2)

Ammoniumsulfaatfraksionering is soos deur Di Jeso (1968) uiteengesit, gebruik. Voorlopige ondersoeke (sien tabel 4) het daarop gedui dat die beste resultate by n 30% versadigingspeil van ammoniumsulfaat verkry word.

Na aanleiding van die voorafgaande ondersoek is die proteïen-

oplossing vanaf stap 1 soos volg behandel:

Verpoeierde ammoniumsulfaat (212,5 g) is stadig, terwyl goed geroer is, by n volume van $1,25 \text{ dm}^3$ ru-ekstrak gevoeg totdat n versadigingspeil van 30% bereik is. Die oplossing is vir 2 uur by 4°C laat staan en toe vir 30 minute teen 20 000 g uitgeswaai.

Die gesedimenteerde proteïene (fraksie 1) is in n minimum volume gedistilleerde water opgelos terwyl die bovloeistof (fraksie 2) deur glaswol gefiltreer is. Albei hierdie oplossings is teen vyf veranderings van 25 dm^3 gedistilleerde water gedialiseer oor n periode van 30 uur. Nadat albei oplossings teen 20 000 g vir 45 minute gesentrifugeer is, is proteïen- en aktiwiteitsbepalings op beide die fraksies uitgevoer. Omrede die aminopeptidase-aktiwiteit in fraksie 1 as onbeduidend beskou is, is slegs die opgeloste proteïene in fraksie 2 gevriesdroog.

2.8.3 Anioonuitruilingschromatografie

Met die suiwing van die aminopeptidase is van drie verskillende anioonuitruilingschromatografiese tegnieke gebruik gemaak, waarvan twee op DEAE-sellulose en een op DEAE-Sephadex uitgevoer is.

2.8.3.1 DEAE-sellulose: 0 - 0,4 M NaCl-gradiënt (stap 3)

Die gevriesdroogde proteïene uit stap 2 (9,244 g) is opgelos in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15 en is teen twee veranderings van 2 dm^3 van dieselfde buffer oor n periode van 8 uur gedialiseer. Hierdie proteïenoplossing het 202,72 eenhede aminopeptidase en 580,44 eenhede ariel-beta-glukosidase bevat. Die gedialiseerde proteïenoplossing is op n kolom van 2,2 cm deursnit by 60 cm lank gepomp en geloog totdat n absorbansie van minder as 0,1 by 280 nm verkry is. n Vloeitempo van 21 cm^3 per uur is gehandhaaf en fraksies van 10 - 11 cm^3 elk is opgevang. Daarna is die kolom met n NaCl-gradiënt van 0 - 0,4 M in bogenoemde buffer oor n volume van 1 dm^3 ontwikkel.

Proteïenkonsentrasie- sowel as ensiemaktiwiteitsbepalings is op die fraksies uitgevoer en word weerspieël in figure 2, 3 en 4. Figure 3 en 4 is weergegee om slegs die verspreiding van ariel-beta-glukosidase en sellulase na hierdie chromatografiese skeiding sigbaar te maak. Fraksies 36 - 56 is gekombineer en teen drie veranderings van 3 dm^3 gedistilleerde water elk, oor 'n periode van 12 uur, gedialiseer.

Om die suiwerheid van die proteïenoplossing te bepaal, is na hierdie en alle hieropvolgende suiweringsstappe van analitiese poliakrielamiedjelelektroforese gebruik gemaak. Die proteïenoplossing was na die derde suiweringsstap vry van sellulase-aktiwiteit en het 2,684 g proteïene, 111,38 eenhede aminopeptidase en 14,94 eenhede ariel-beta-glukosidase bevat.

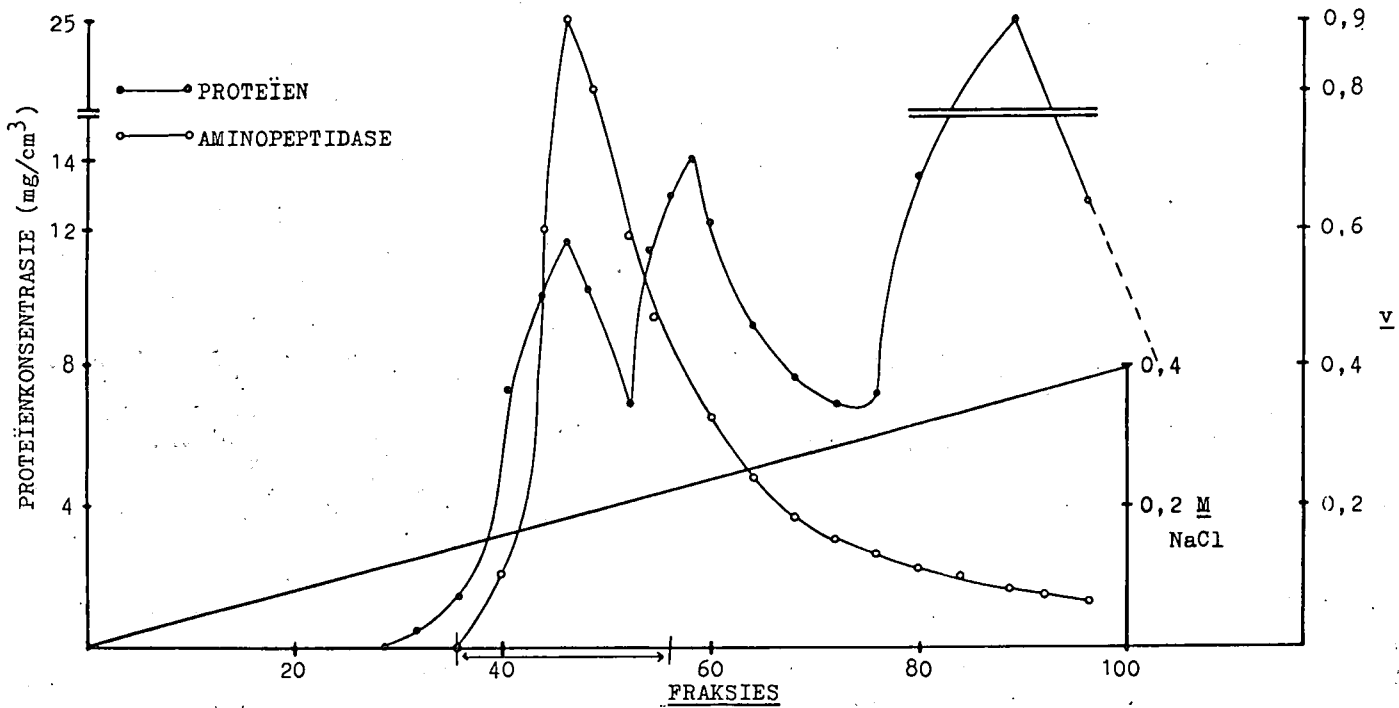
2.8.3.2 DEAE-sellulose: 0 - 0,25 M NaCl-gradiënt (stap 4)

Die gevriesdroogde monster van stap 3 is in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15, opgelos. Daarna is dit aan dieselfde proses van dialise, soos tevore by die eerste chromatografiese skeiding bespreek, onderwerp en op 'n 2,2 cm by 53 cm DE-52-kolom gepomp. Die kolom is oornag met dieselfde buffer teen 'n vloeitempo van 21 cm^3 per uur geloog en daarna is 'n 0 - 0,25 M NaCl-gradiënt in 'n volume van 1 dm^3 van bogenoemde buffer oor die kolom aangewend.

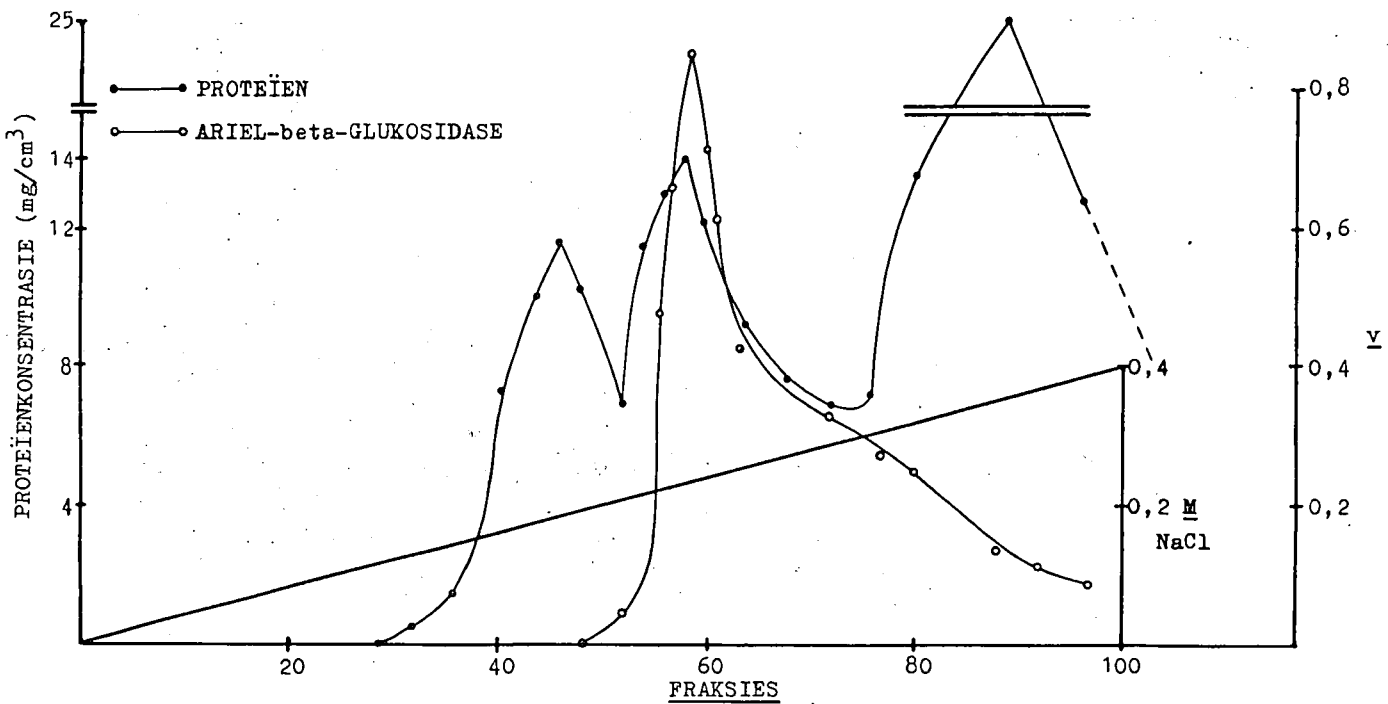
In figure 5 en 6 word die resultate van die proteïenkonsentrasie- en aktiwiteitsbepalings op die versamelde 10 cm^3 fraksies weergegee. Fraksies 45 tot 68 is gekombineer en na dialise teen $2 \times 2 \text{ dm}^3$ gedistilleerde water, gevriesdroog. Die gekombineerde fraksies het 'n totaal van 836 mg proteïene, 83,12 eenhede aminopeptidase en 3,86 eenhede ariel-beta-glukosidase bevat.

2.8.3.3 DEAE-Sephadex: 0 - 0,25 M NaCl-gradiënt

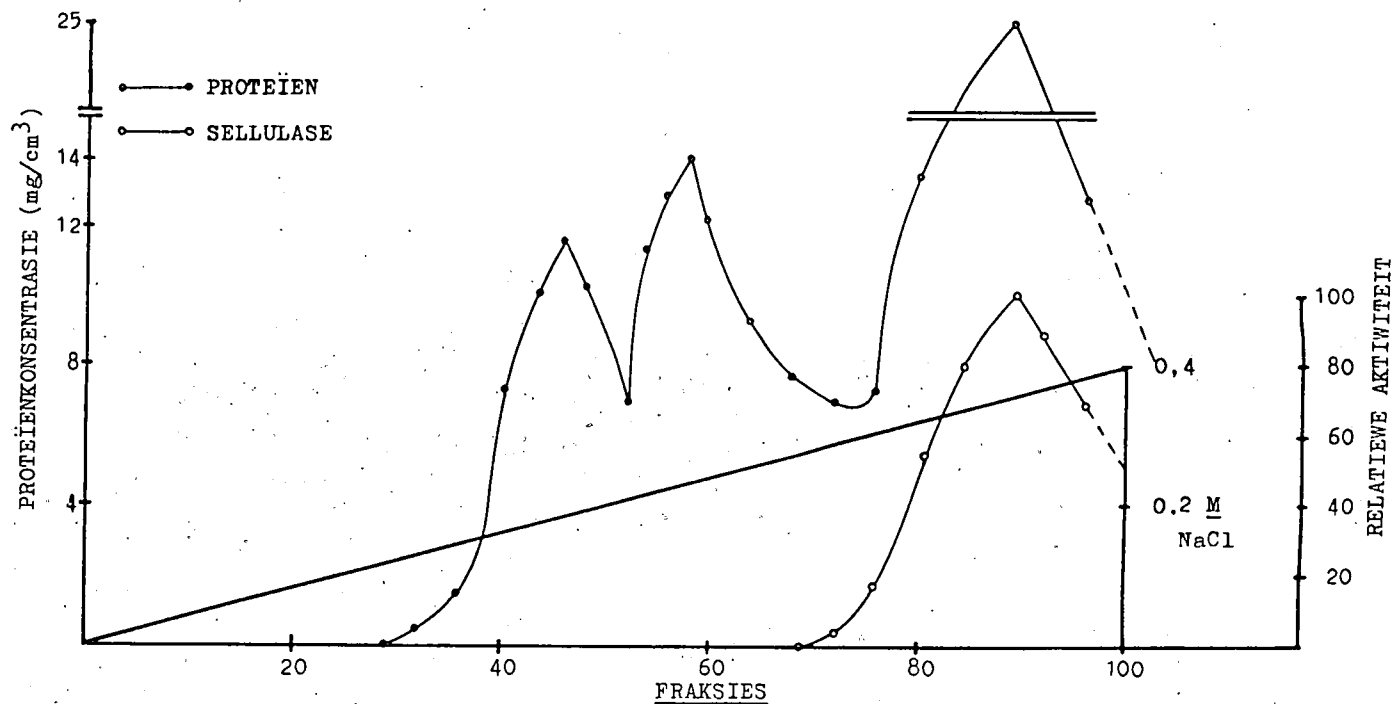
'n DEAE-Sephadex (A-25) kolom, 1,9 cm x 28 cm, is in hierdie geval gebruik. Die gevriesdroogde monster vanaf stap 4 is opgelos in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,15 en teen twee veranderings van 2 dm^3 hoeveelhede van dieselfde buffer vir 8



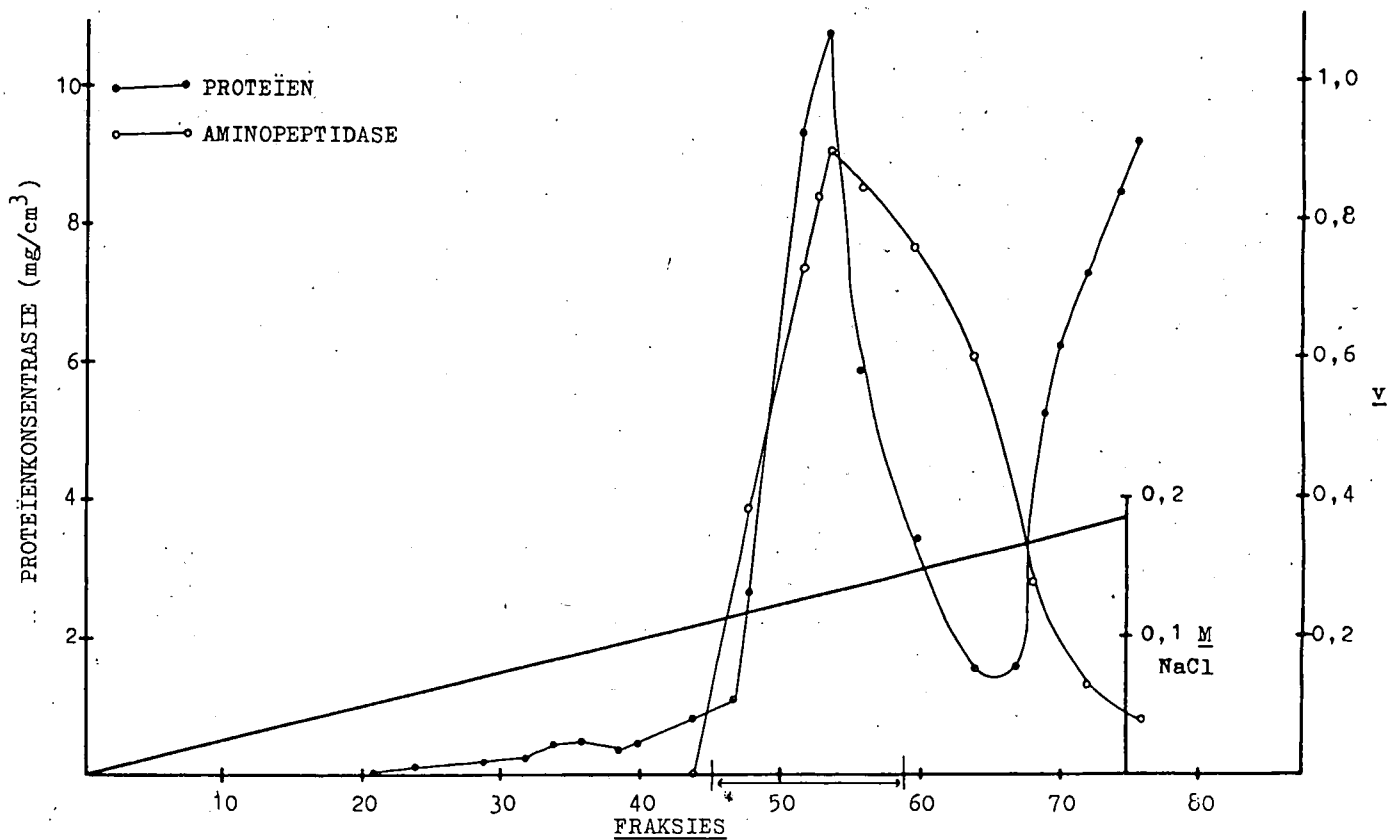
FIGUUR 2: Die chromatografie van aminopeptidase op 'n 2,2 cm x 60 cm DEAE-sellulose kolom. 'n Lineêre gradiënt soos aangedui. Monster vanaf stap 2. Fraksies soos aangedui is versamel en vir verdere suiwing gebruik. \bar{v} = μ mol substraat verwerk/min/cm³.



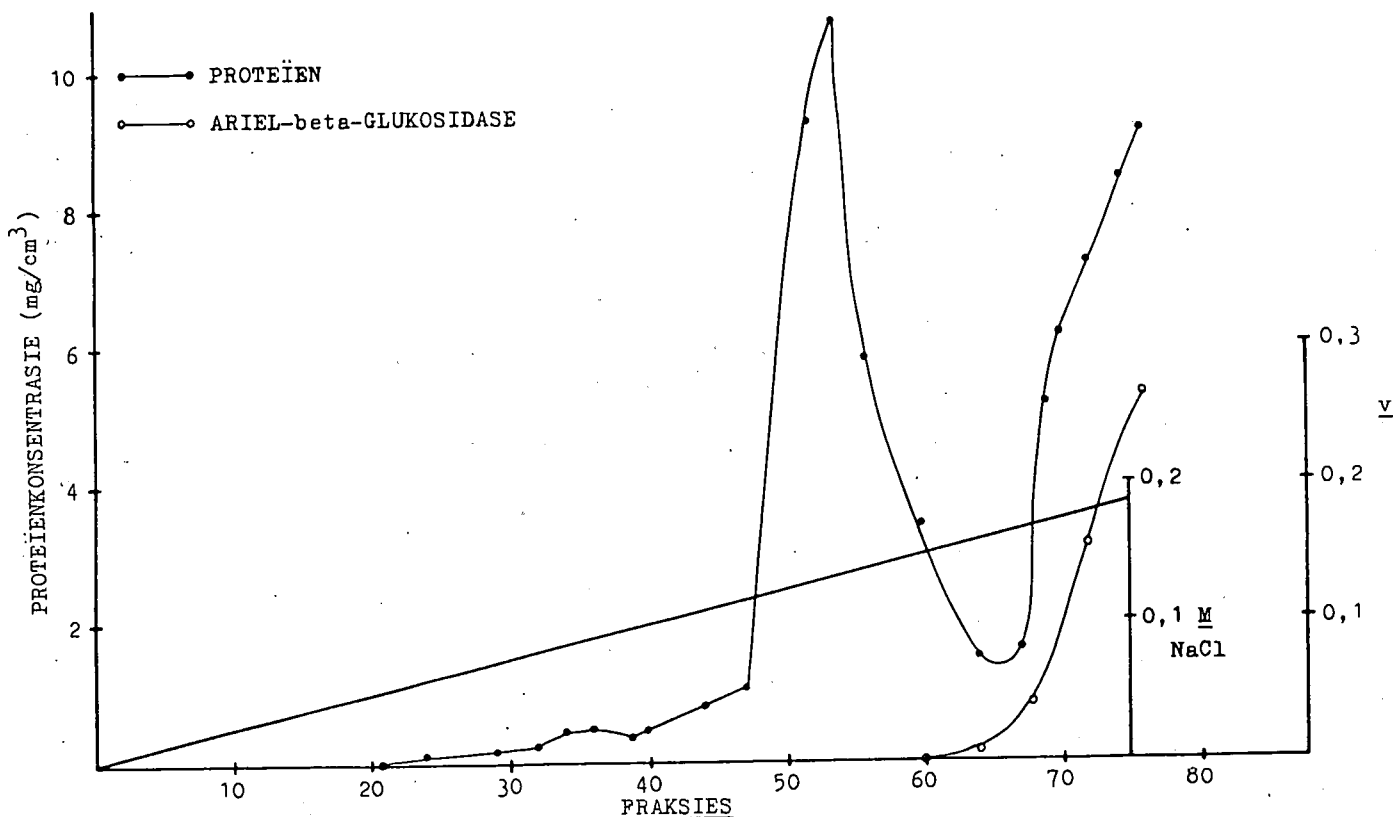
FIGUUR 3: Die chromatografie van ariel-beta-glukosidase op 'n 2,2 cm x 60 cm DEAE-sellulose kolom. 'n Lineêre gradiënt soos aangedui. Monster vanaf stap 2. \bar{v} = μ mol substraat verwerk/min/cm³.



FIGUUR 4: Die chromatografie van sellulase op 'n 2,2 cm x 60 cm DEAE-sellulose kolom. 'n Lineêre gradiënt soos aangedui. Monster vanaf stap 2.



FIGUUR 5: Die chromatografie van aminopeptidase op 'n 2,2 cm x 53 cm DEAE-sellulose kolom. 'n Lineêre gradiënt soos aangedui. Monster vanaf stap 3. Fraksies soos aangedui is versamel en vir verdere suiwing gebruik. $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³.

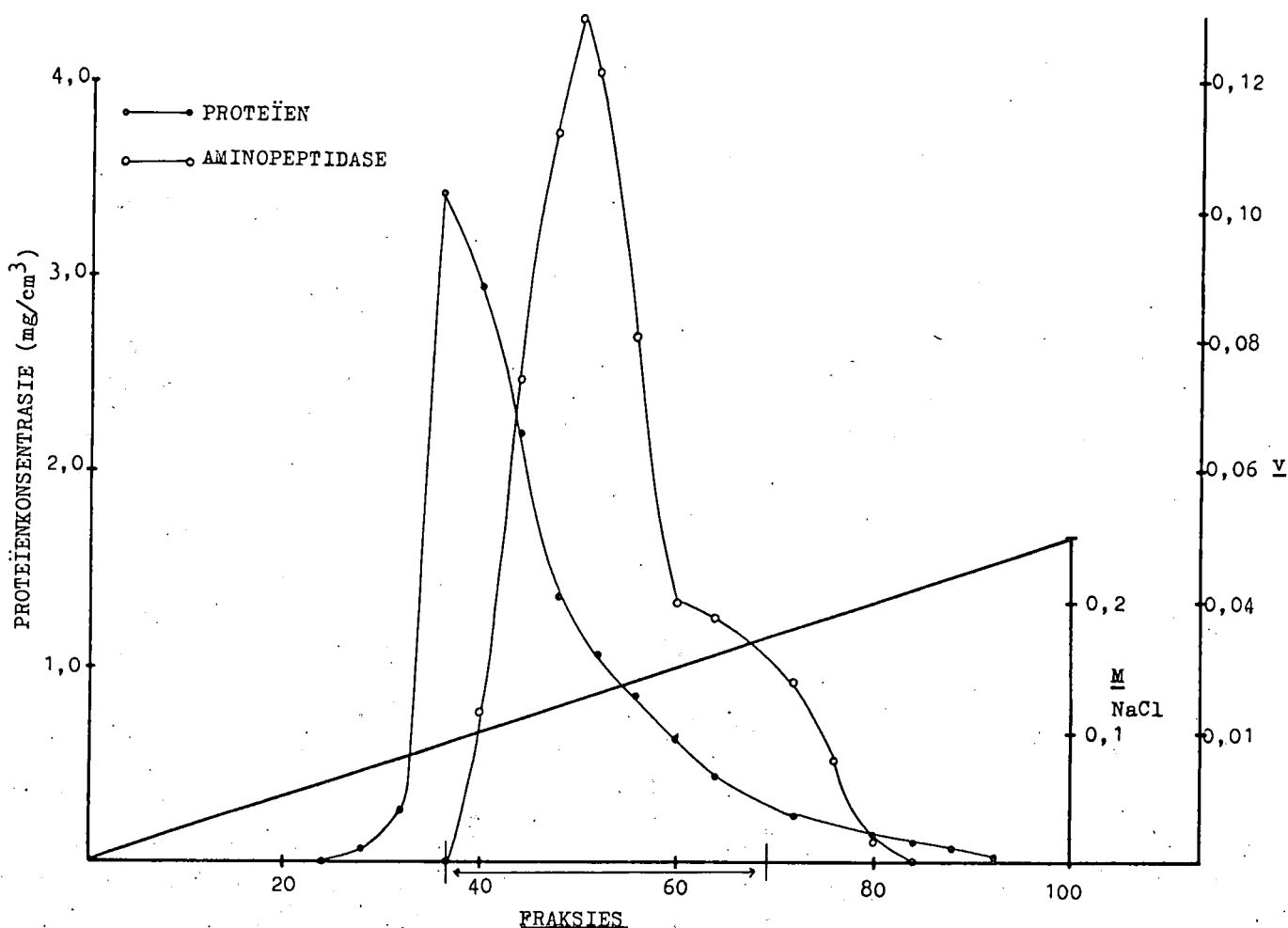


FIGUUR 6: Die chromatografie van ariël-beta-glucosidase op n 2,2 cm x 53 cm DEAE-sellulose kolom. n Lineêre gradiënt soos aangedui. Monster vanaf stap 3. $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³.

uur gedialiseer.

Die gedialiseerde proteïenmonster is op die kolom gepomp en oornag met die buffer teen n vloeytempo van 21 cm³ per uur geloog. Daarna is n NaCl-gradiënt van 0 tot 0,25 M met n volume van 1 dm³ aangewend. Fraksies van 10 cm³ hoeveelhede is opgevang waarop die nodige proteïen- en aktiwiteitsbepalings uitgevoer is. Figuur 7 gee n voorstelling van hoe dat die proteïene deur die NaCl-gradiënt verplaas is.

Fraksies 36 tot 64 is gekombineer, teen twee veranderings van 2 dm³ hoeveelhede gedistilleerde water oor n periode van 8 uur gedialiseer en gevriesdroog. Die fraksies het 487 mg proteïene, 74,84 eenhede aminopeptidase en 1,89 eenhede ariël-beta-glucosidase bevat.



FIGUUR 7: Die chromatografie van amino-peptidase op n 1,9 cm x 28 cm DEAE-Sephadex kolom. n lineêre gradiënt soos aangedui. Monster vanaf stap 4. Fraksies soos aangedui is versamel en vir verdere suiwing gebruik. $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³.

2.8.4 Sephadex G-200-chromatografie (stap 6)

Vir dié suiwingstap is n kolom van 2,2 cm deursnit by 90 cm lank gebruik. Die proteïenmonster is opgelos in n 0,15 M KCl-oplossing en teen twee veranderings van 1 dm³ elk van dieselfde oplossing, vir 8 uur gedialiseer.

Die proteïenoplossing is op die geëkwilibreerde kolom gepomp teen n vloeitempo van 21 cm³ per uur. Die kolom is teen dieselfde vloeitempo ontwikkel en fraksies van 10 cm³ elk is opgevang. Ensiembewattende fraksies is gekombineer, gedialiseer teen 2x 2 dm³ gedistilleerde water vir 8 uur en daarna gevriesdroog. Die gekombineerde fraksies, gekombineer soos

in figuur 8 aangedui, het 45 mg proteïene en 67,86 eenhede amino-peptidase bevat. Ensimatiese aktiwiteit, betreffende ariel-beta-glukosidase was kleiner as 0,01 eenhede/cm³ in hierdie 12 cm³ monster. n Opsomming van hierdie skeiding word weergegee deur die vloeddiagram in figuur 8.

2.8.5 Katioonuitruilingschromatografie (stap 7)

n CM-Sephadex C-25 kolom (2,2 x 60 cm) is voorberei soos vroeër (2.6.2) beskryf in 0,016 M Na-sitraatfosfaatbuffer, pH 6,40. Die kolom is geëkwilibreer deur buffer vir 24 uur teen 21 cm³ per uur deur te pomp.

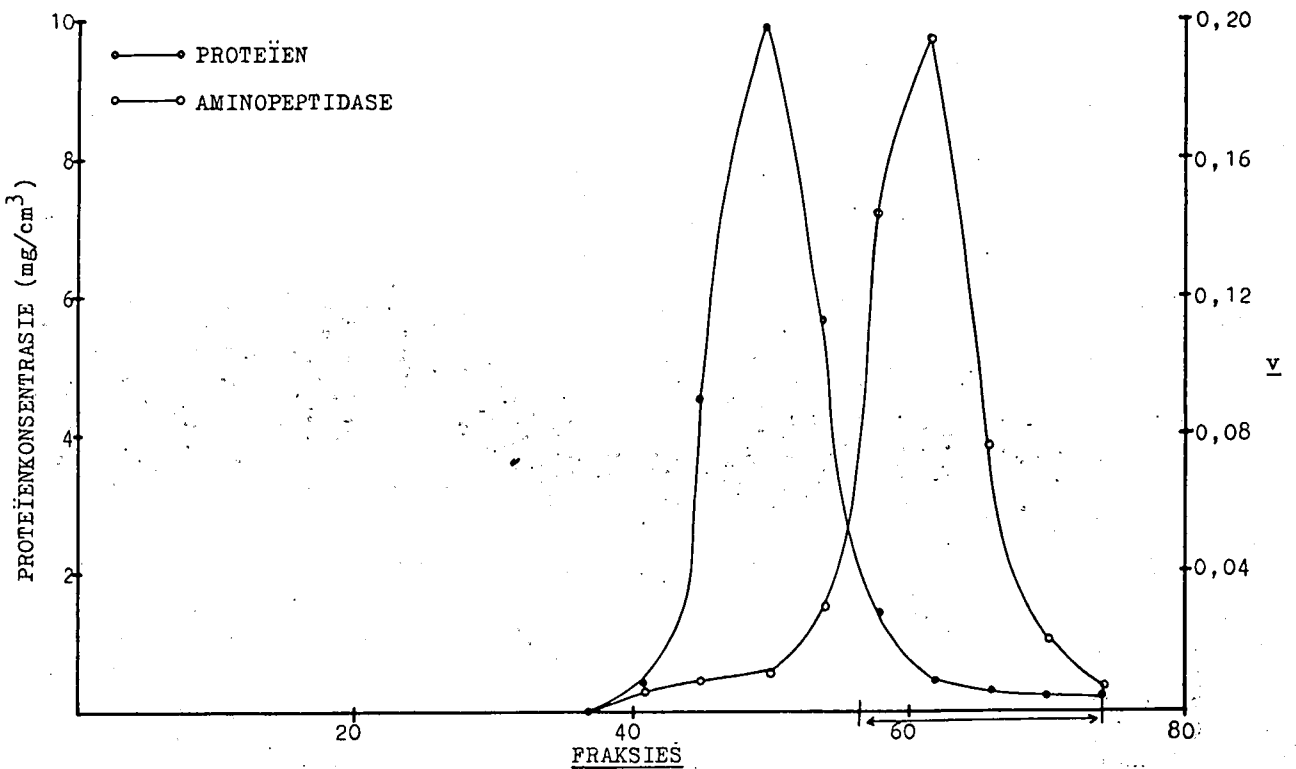
Al die proteïene, afkomstig vanaf stap 6, is in bogenoemde buffer opgelos en oornag daarteen gedialiseer. Die proteïenoplossing is op die kolom gepomp en die kolom is teen 21 cm³ per uur ontwikkel. Fraksies van 5 tot 6 cm³ elk is opgevang. Die amino-peptidase-fraksies soos aangedui in figuur 9, is gekombineer, teen gedistilleerde water (twee veranderinge, 2 dm³ per verandering) vir 8 uur gedialiseer en toe gevriesdroog. Die fraksies het 38 mg proteïene en 65,94 eenhede amino-peptidase bevat.

Elektroforetiese skeidings van die amino-peptidase-fraksie het net een proteïensone aangedui.

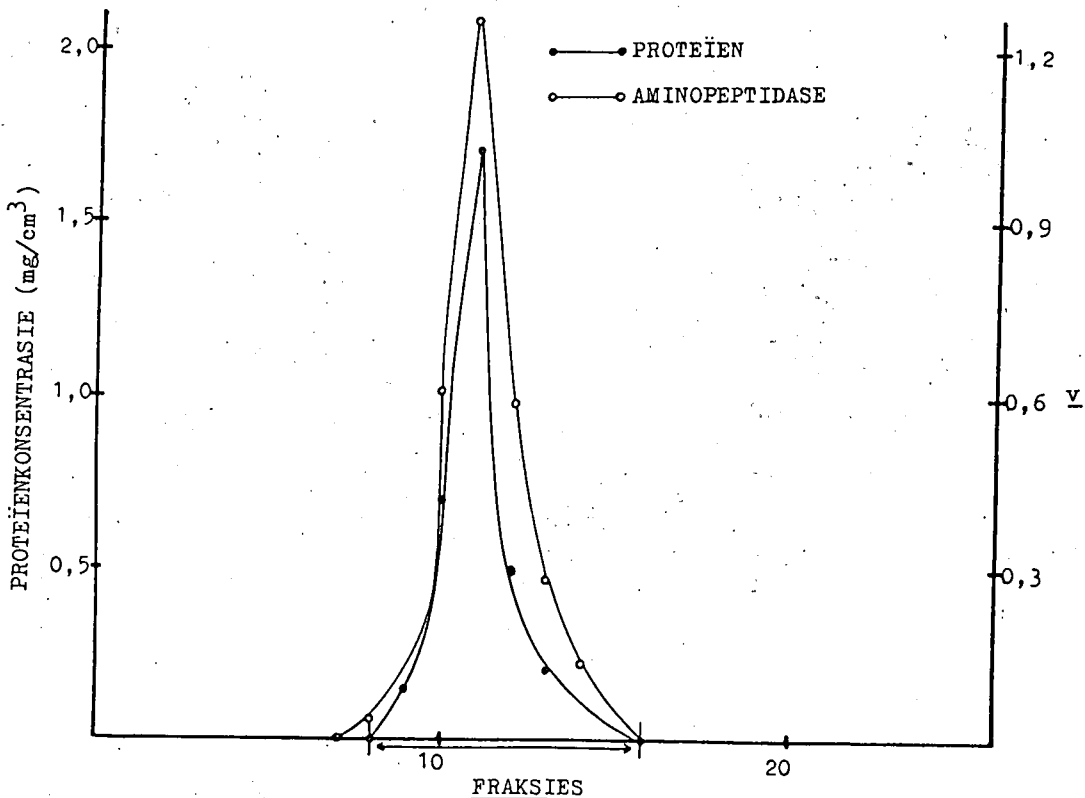
2.8.6 Sephadex G-200-jelchromatografie (stap 8)

Hierdie was die finale stap in die suiwing van die amino-peptidase-ensiem. Die prosedure was soortgelyk soos dié vroeër bespreek (2.8.4), behalwe dat hierdie kolom teen n vloeitempo van 9 cm³ per uur geloog is en fraksies van 2 tot 3 cm³ elk opgevang is. Die afmetings van die kolom was dieselfde as dié van die vorige G-200-kolom (2.8.4). Voordat die kolom gebruik is, is dit eers vir 48 uur lank geëkwilibreer met die 0,15 M KCl-oplossing teen n vloeitempo van 9 cm³ per uur.

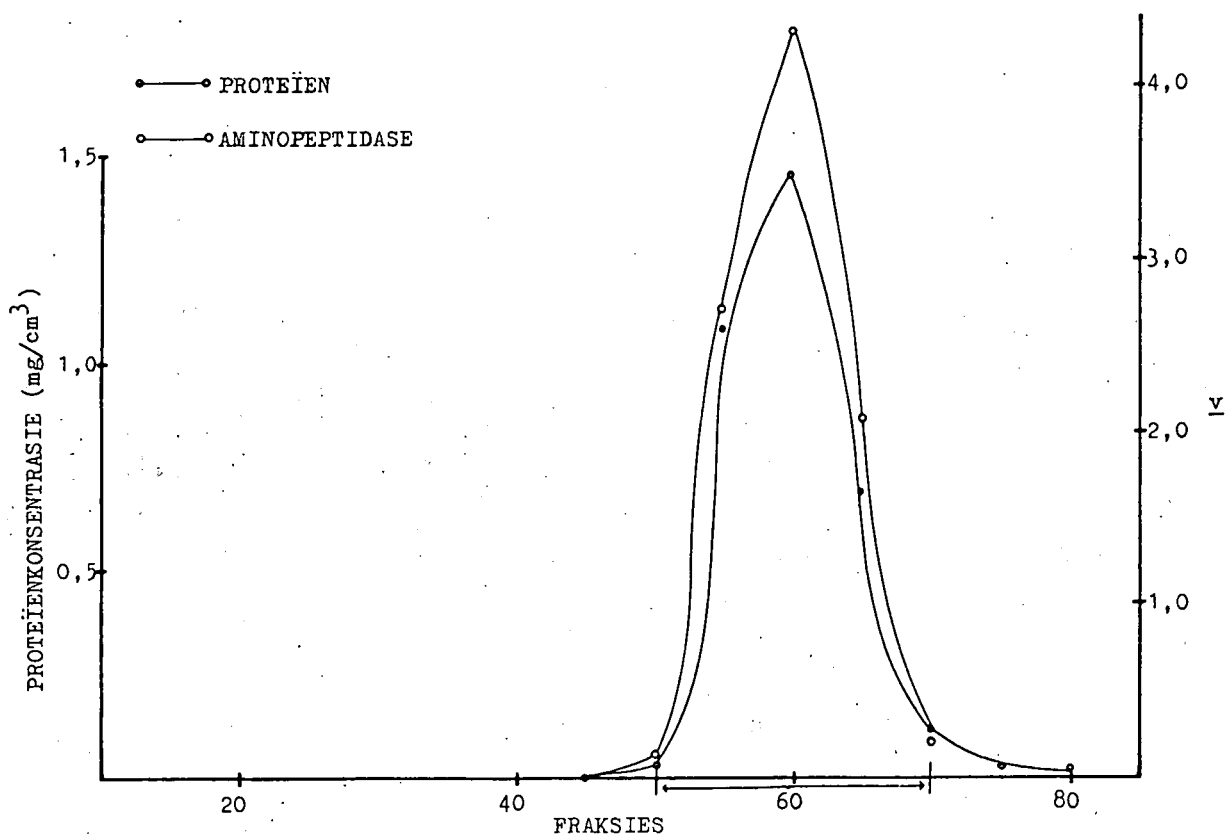
Die gevriesdroogde proteïene van stap 7 is opgelos in n 0,15



FIGUUR 8: Die chromatografie van aminopeptidase op n 2,2 cm x 90 cm Sephadex G-200 kolom. Monster vanaf stap 5. Fraksies soos aangedui is versamel en vir verdere suiwering gebruik. $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³.



FIGUUR 9: Die chromatografie van aminopeptidase op n 2,2 cm x 60 cm CM-Sephadex kolom. Monster vanaf stap 6. Fraksies soos aangedui is versamel en vir verdere suiwering gebruik. $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³.



FIGUUR 10: Die chromatografie van amino-peptidase op 'n 2,2 cm x 90 cm Sephadex G-200 kolom. Monster vanaf stap 7. Fraksies soos aangedui is gekombineer en verder ondersoek. $y = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³.

M KCl-oplossing en teen twee veranderings van 1 dm³ elk van dieselfde oplossing oor 'n periode van 8 uur gedialiseer. Daarna is die monster op die kolom gepomp en die kolom ontwikkel. Die vloei-diagram van hierdie stap word in figuur 10 weergegee.

Fraksies 51 tot 69 is gekombineer en gedialiseer teen drie veranderings van 2 dm³ gedistilleerde water elk vir 12 uur. Die gekombineerde fraksies het 36 mg proteïene en 62,47 eenhede amino-peptidase bevat wat 'n suiwing van 98,60-voud gee het.

Volgens analitiese poliakriëlamiedjielektroforese en jelfiltrasiestudies met Sephadex G-200 was die ensiem suiwer en is in hierdie toestand vir verdere studies gebruik.

2.8.7 Samevattend

Die resultate soos verkry uit die suiweringsprosedure word saamgevat in tabelle 1 en 2 en in die vloedidiagram (figuur 11).

2.9 Homogeniteitsbepalings

2.9.1 Poliakriëlamiedjielektroforese

2.9.1.1 Analitiese poliakriëlamiedjielektroforese:

Poliakriëlamiedjielektroforese word beskou as 'n ideale metode om die suiwerheid van proteïene te ondersoek (Gabriel, 1971). Van hierdie tegniek is dan ook tydens die suiweringsprosedure gebruik gemaak om die mate van suiwerheid van die ensiem te ondersoek.

Elektroforetiese skeidings van proteïene, verkry uit die suiweringsprosedure, is op 'n Shandon Model U77 elektroforese apparaat met 'n Vokam (konstante spanning/konstante stroom) kragbron uitgevoer. Hierdie apparaat kan 8 buise met 'n binnedeursnit van 5 mm en 60 mm lank akkommodeer. Die elektroforetiese glasbuis is voor gebruik met chroomsuur skoongemaak en goed met gedistilleerde water gespoel voordat die jels gegiet is.

Die jels is volgens die voorskrif van Brewer, Pesce en Ashworth (1974) voorberei om 7,5% poliakriëlamiedjels te verskaf. Alle voorsorgmaatreëls is getref om lugblasievrye kolommetjies te verkry en te verseker dat die boonste oppervlakke van die kolommetjies absoluut horisontaal was. Proteïenmonsters van 25 tot 100 μg is in 'n volume van 25 tot 100 mm^3 in die vorm van 'n 10% sukrose bevattende oplossing op die kolommetjies aangewend.

Elektroforetiese skeidings is by 4°C uitgevoer. 'n Spanning van 4 mV per jel is oor die sisteem vir 60 minute aangelê. Van die jels is gebruik vir kleuring met amidoswart om die teenwoordigheid van proteïene vas te stel. Die proteïensones

TABEL 1: Opgesomde resultate van die suiweringsprosedure ter verkryging van aminopeptidase ensiem vanuit T. trinervoides.

Stap	Beskrywing	Volume (cm ³)	Proteïen (mg/cm ³)	Totale proteïen (mg)	Ensiem= aktiwiteit (eenhede/ cm ³)	Ensiem= aktiwiteit (eenhede)	Spesifieke aktiwiteit (eenhede/ g proteïen)	Suiwering (voud)	Herwins (%)
1	Ru-ekstrak	1250	9,941	12 426	0,1752	219,00	17,6	1,00	100,0
2	<u>0-30% (NH₄)₂SO₄</u> Bovloeistof	1400	6,603	9 244	0,1448	202,72	21,9	1,24	92,6
3	DE-52 (1)	40	67,099	2 684	2,7845	111,38	41,5	2,36	50,9
4	DE-52 (2)	23	36,340	836	3,6139	83,12	99,4	5,65	38,0
5	DEAE-Sephadex	10	48,701	487	7,4844	74,84	153,7	8,73	34,2
6	Sephadex G-200	12	3,750	45	5,6549	67,86	1508,0	85,78	31,0
7	CM-Sephadex	10	3,810	38	6,5941	65,94	1735,3	98,60	30,1
8	Sephadex G-200	5	7,191	36	12,4940	62,47	1735,3	98,60	28,5

TABEL 2: Opgesomde resultate van die suiweringsprosedure van aminopeptidase ensiem vanuit T. trinervoides t.o.v. die uitskakeling van ariel-beta-glukosidase.

Stap	Beskrywing	Volume (cm ³)	Proteïen (mg/cm ³)	Totale proteïen (mg)	Ensiem= aktiwiteit (eenhede/ cm ³)	Ensiem= aktiwiteit (eenhede)	Spesifieke aktiwiteit (eenhede/ g proteïen)	Suiwering (voud)	Herwins (%)
1	Ru-ekstrak	1250	9,941	12 426	0,5130	641,35	51,614	1,00	100,0
2	<u>0-30% (NH₄)₂SO₄</u> Bovloeistof	1400	6,603	9 244	0,4146	580,44	62,781	1,22	90,5
3	DE-52 (1)	40	67,099	2 684	0,3734	14,94	5,566	0,11	2,3
4	DE-52 (2)	23	36,340	836	0,1680	3,86	4,617	0,09	0,6
5	DEAE-Sephadex	10	48,701	487	0,1886	1,89	3,881	0,08	0,3
6	Sephadex G-200	12	3,750	45	<0,0100	<0,12	<2,667	<0,05	0,0

van die aminopeptidase- en ariel-beta-glukosidase ensieme is ook deur middel van aktiwiteitsbepalings op die nie-gekleurde jels geïdentifiseer. Densitogramme van die gekleurde jels is met 'n Vitraton TLD100 densitometer verkry.

2.9.1.2 SDS-poliakriëlamiedjielelektroforese:

Hierdie is 'n baie sensitiewe metode om die molekulêre massa van 'n onbekende globulêre proteïen relatief tot ander proteïene met bekende molekulêre massas te bepaal. Alhoewel hierdie skeiding van proteïene op dieselfde beginsels as jëlchromatografie neerkom, word onsuiverhede maklik aangetoon deur dié tegniek (Brewer, Pesce en Ashworth, 1974).

Die MM-merkers, jels en proteïenmonsters is volgens die vervaardiger se voorskrif vir SDS-poliakriëlamiedjielelektroforese behandel. Die volgende oplossings is voorberei.

Oplossing a: 0,01 M Na-fosfaatbuffer, pH 7,0, bevattende 0,1% SDS en 0,1% 2-merkptoëtanol.

Oplossing b: 0,01 M Na-fosfaatbuffer, pH 7,0, bevattende 1% SDS en 1% 2-merkptoëtanol.

Oplossing c: 8,82 g NaH_2PO_4 , 20,4 g Na_2HPO_4 en 2 g SDS per 1 dm^3 gedistilleerde water.

Akriëlamiedoplossing: 22,2 g akriëlamied en 0,6 g NN'-metileen-bisakriëlamied is met gedistilleerde water tot 100 cm^3 opgemaak.

Ammoniumpersulfaeloplossing: 15 mg/cm^3 vars voorbereide oplossing in gedistilleerde water.

Kleuringsoplossing: 0,25% (m/v) "Kenacid blue R"-oplossing in gedistilleerde water (5 dele), ysasynsuur (1 deel) en metanol (5 dele).

Jels is berei deur die volgende hoeveelhede van die spesifieke oplossings te meng

<u>Reagens</u>	<u>3,3% jels</u>
Oplossing c	$1,5 \text{ cm}^3$
Ammoniumpersulfaeloplossing	$1,5 \text{ cm}^3$
TEMED	$0,045 \text{ cm}^3$
Gedistilleerde water	$9,0 \text{ cm}^3$
Akriëlamiedoplossing	$4,5 \text{ cm}^3$

Alle voorsorgmaatreëls soos bespreek onder 2.9.1.1 is getref om ideale jelkolommetjies te verkry. Die MM-merkers is soos volg voorberei vir elektroforese.

Nadat die MM-merkers in 1 cm³ van oplossing b opgelos is, is dit vir 2 minute by 100°C geïnkubeer. Die proteïenoplossing is soortgelyk behandel en sorg is gedra dat die massaverhouding van SDS tot proteïen ten minste 4:1 was.

Geskikte jelmonsters is as volg berei:

300 mm³ behandelde merkeroplossing of 100 mm³ behandelde proteïenoplossing is vermeng met 4 druppels gliserol, 300 mm³ van oplossing a, 20 mm³ 2-merkptoëtanol en 20 mm³ versadigde bromofenolblou-oplossing. 100 mm³ hoeveelhede van die jelmonster is op die kolommetjies aangewend en 'n spanning van 6 mV per jel is daarvoor aangelê. Oplossing c is in 'n tweemaal verdunde toestand as elektroforetiese buffer gebruik.

Sodra die bromofenolblou-sone bykans die onderste rand van die jel bereik het, is die jels verwyder, die bromofenolblou-sone gemerk en die jels met kleuringsoplossing gekleur. Na ontkleuring was die posisie van die proteïene duidelik sigbaar as blou sones in die jel.

2.9.2 Jelfiltrasiestudies met Sephadex G-200

Die metode soos beskryf deur Andrews (1965) is vir die bepaling van die molekulêre massa van aminopeptidase gebruik. Gis-al-koholdehidrogenase, beesserumalbumien, ovalbumien, ribonuklease, sitochroom c en blou dekstraan is afsonderlik en as 'n mengsel gebruik om die kolom te standaardiseer.

2.10 Bepaling van chemiese eienskappe van ensiem - kinetiese studies

2.10.1 Substraatspesifisiteit en effek van pH-ariasie

Om die substraatspesifisiteit van aminopeptidase te bepaal,

is n aantal verskillende substrate gebruik. Die mate van hidrolise van die substrate is oor n pH-gebied van 2,5 tot 12 gevolg. Die finale reaksiemengsel het uit die volgende bestaan: 0,003 M substraat in 10% metanoliese 0,02 M Universele-buffer (Britton en Robinson, 1931).

Substrate wat gebruik is, was Lys-p-nitroanilied, Leu-p-nitroanilied, Gly-p-nitroanilied, N-bensoiel-DL-arginien-p-nitroanilied, N-karbobensoksi-L-tirosien-p-nitrofenielester en Ala-naftielamied. DMSO is gebruik om hierdie sintetiese substrate op te los

Aktiwiteitsbepalings is uitgevoer by n temperatuur van 30°C. In alle gevalle is n reaksiemengsel waar die ensiemoplossing met dieselfde hoeveelheid gedistilleerde water vervang is, in die verwysingsligpad van die spektrofotometer geplaas, om vir enige nie-ensimatiese hidrolise van substrate te korrigeer.

2.10.2 Invloed van verskillende buffers en bufferkonsentrasies

Die effek van verskillende buffers by verskillende pH-waardes is met 3 mM Lys-p-nitroanilied ondersoek. Die verskillende buffers is teen n finale konsentrasie van 0,02 M in hul onderskeie pH-gebiede gebruik. Van die volgende buffers is gebruik gemaak: Universele-buffer (Britton en Robinson, 1931): pH 6,1 - 10; Tris-HCl-buffer: pH 6,5 - 9,5; Na-fosfaatbuffer: pH 6,1 - 9,1; Barbitaalbuffer: pH 6,5 - 9,5 en Tris-maleaatbuffer: pH 6,0 - 8,5. Die hidrolise van die substrate is spektrofotometries by 30°C gevolg.

Om te bepaal of bufferkonsentrasies enige invloed op aminopeptidase-aktiwiteit het, is verskillende bufferkonsentrasies van Tris-HCl en Na-fosfaat by n pH van 8,5 gebruik. Aktiwiteitsbepalings is in konsentrasies, wat gevarieer het van 0,01 tot 1,333 M by 30°C uitgevoer.

2.10.3 Invloed van verskillende konsentrasies soute en EDTA

Verskillende konsentrasies $MgCl_2$, KCl , $NaCl$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $HgCl_2$, $CaCl_2$ en EDTA in 0,01 M Tris-HCl-buffer, pH 9,0, is gebruik. Die invloed van dié verbindings op die hidrolise van 3 mM Lys-p-nitroanilied is by 30°C ondersoek. Metaalioon- en EDTA-konsentrasies van 0,015 tot 0,9 M is gebruik.

2.10.4 Kinetiese studies met verskillende substrate

Michaeliskonstantes is vir die hidrolise van Lys-p-nitroanilied en Leu-p-nitroanilied bepaal. Die konsentrasies van die substrate is oor 'n wye gebied gevarieer sodat die genoemde konstante volgens die konvensionele grafiese metode soos die Lineweaver-Burk-grafiek (Dixon en Webb, 1958) bereken kon word.

Hierdie kinetiese konstantes is vir Lys-p-nitroanilied by 'n pH van 8,0 en 9,0 en vir Leu-p-nitroanilied by 'n pH van 8,0 in 0,02 M Tris-HCl-buffer bepaal. Die ondersoek is by 'n temperatuur van 30°C uitgevoer.

2.10.5 Temperatuurstudies

Die aktiveringsenergie-, entropie- en entalpie waardes is met 3 mM Lys-p-nitroanilied in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0, oor 'n temperatuurgebied van 3 tot 50°C bepaal. Die data is volgens die metodes van Gutfreund (1972) en Cornish-Bowden (1976) ontleed.

Ensiemoplossings is blootgestel vir 1 uur aan temperature wat tussen 3 en 80°C gewissel het. Die aktiwiteit van die ensiem is onmiddellik daarna by 30°C met 3 mM Lys-p-nitroanilied as substraat bepaal. Die ondersoek is in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0, uitgevoer.

2.10.6 Inhibisiestudies

Met die produkinhibisiestudies is Lys-p-nitroanilied (9,340 tot 3,113 μM) as substraat gebruik en die lisienkonsentrasie is vanaf 26,66 tot 2,66 mM gevarieer.

Hierdie resultate is volgens die metodes van Dixon en Webb (1958), Laidler (1958) en Cornish-Bowden (1976) ontleed.

2.10.7 Hidrolise van tripeptiede

Die hidrolise van 1 mM Gly-Gly-Leu en 1 mM Leu-Gly-Gly in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5, is by 30°C uitgevoer. Hidrolitiese produkte van hierdie substrate is volgens die metode bespreek in 2.5.1 geïdentifiseer. Standaardoplossings (1 mM) is in bogenoemde bufferoplossing opgemaak. Ongeveer 3 mm³ van die standaard-, ensiem- en gehidroliseerde substraatoplossings is op die chromatografiese plate aangewend. Die chromatogramme is vir ongeveer 8 uur by kamertemperatuur ontwikkel. Daarna is die kolle met die ninhidrienspuitreagens sigbaar gemaak en geïdentifiseer.

HOOFSTUK 3

RESULTATE EN BESPREKING

3.1 Voorlopige ondersoek

3.1.1 Lokalisering van aminopeptidase

Die spesifieke aktiwiteit en verspreiding van die aminopeptidase word in tabel 3 aangedui. Uit tabel 3 blyk dit dat die hoogste relatiewe spesifieke aktiwiteit en persentasie van totale aktiwiteit in die middelderm voorkom.

TABEL 3: Spesifieke aktiwiteit en verspreiding van aminopeptidase in T. trinervoides werkers.

Weefsel	Proteïen (g/dm ³)	Ensiem= aktiwiteit (eenhede/ dm ³ x 10 ⁻²)	Spesifieke aktiwiteit (eenhede/ g proteïen x 10 ⁻²)	Relatiewe spesifieke aktiwiteit (%)	Persentasie van die totale aktiwiteit (%)
Voorderm	0,618	5,741	9,29	1,0	0,9
Middelderm	0,599	420,100	701,00	78,7	68,1
Gemengde segment	2,790	126,600	45,40	5,1	20,5
Agterderm 1	0,358	40,020	112,00	12,6	6,5
Agterderm 2&3	0,880	10,120	11,50	1,3	1,7
Res van liggaam	1,232	14,290	11,60	1,3	2,3
Totaal	6,477	616,871	890,79	100,0	100,0

3.1.2 Voorlopige ondersoek en suiweringsprosedure

Die resultate van die voorlopige ammoniumsulfaatfraksionering word in tabel 4 weergegee. Dit is duidelik dat die bovloei-stof van 30% ammoniumsulfaatfraksionering tot 'n redelike suiwering en hoogs bevredigende herwins gelei het.

Die suiweringsprosedure, soos uiteengesit in figuur 11, is telkens herhaal om genoegsame ensiem vir verdere studies te bekom.

TABEL 4: Verspreiding van aminopeptidase na voorlopige ammoniumsulfaatfraksionering.

Stap	Beskrywing	Volume (cm ³)	Proteïen (mg/cm ³)	Totale proteïen (mg)	Ensiem= aktiwiteit (eenhede/ cm ³ x 10 ⁻²)	Ensiem= aktiwiteit (eenhede)	Spesifieke aktiwiteit (eenhede/ mg proteïen x 10 ⁻³)	Suiwering (voud)	Herwinning (%)
1	Ru-ekstrak	200	1,613	322,6	3,076	6,1520	19,070	1,00	100
2	<u>0-30% (NH₄)₂SO₄</u>								
	Presipitaat	40	1,945	77,8	0,764	0,3056	3,928	-	5,0
	Bovloeistof	260	0,933	242,6	2,195	5,7080	23,528	1,23	92,8
3	<u>30-45% (NH₄)₂SO₄</u>								
	Presipitaat	40	2,165	86,6	0,651	0,2604	3,007	-	4,2
4	<u>45-60% (NH₄)₂SO₄</u>								
	Presipitaat	40	3,315	132,6	8,113	3,2450	24,472	1,28	52,7
5	<u>60-100% (NH₄)₂SO₄</u>								
	Presipitaat	40	0,570	22,8	5,507	2,2030	96,623	5,07	35,8

Die herwinning van die ensiem het gevarieer van 20 tot 30%, terwyl die ensiem gewoonlik ongeveer 100-voud, met 'n spesifieke aktiwiteit van ongeveer 1,75 eenhede aminopeptidase per mg proteïen, gesuiwer is.

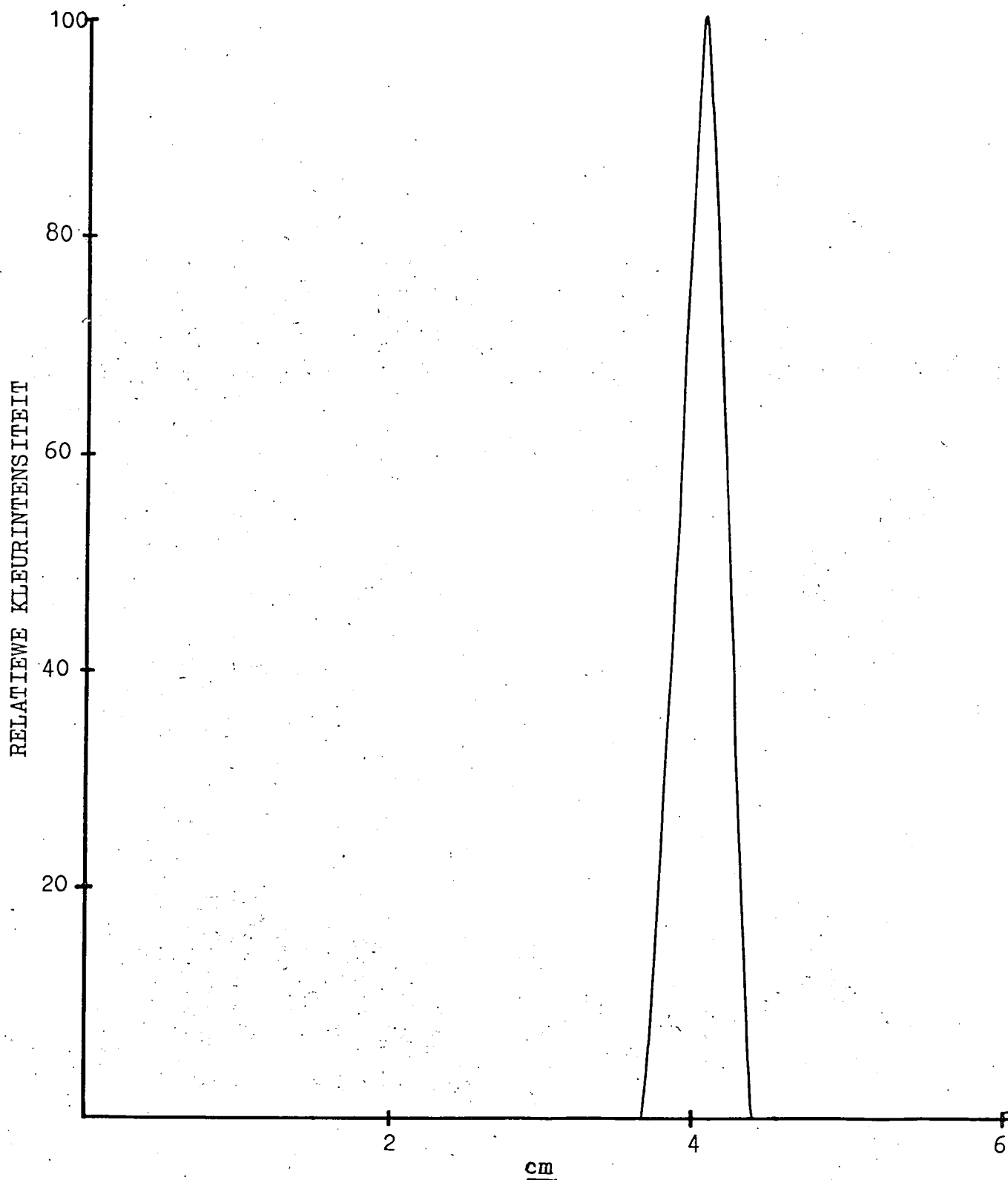
Volgens homogeniteits- en aktiwiteitsbepalings was die ensiem volgens suiweringsprosedure verkry reeds na die sewende stap (CM-Sephadex) suiwer.

3.2 Suiwerheid en fisiese eienskappe van die ensiem

3.2.1 Elektroforetiese studies

3.2.1.1 Analitiese poliakrielamiedjielektroforese:

Na suiweringstap 8 is die homogeniteit van die aminopeptidase met analitiese poliakrielamiedjielektroforese ondersoek. Die gekleurde jel is geskandeer en 'n weergawe van die densitogram word in figuur 12 weergegee. Hierdie jels is na elektroforetiese skeiding (2.9.1.1) by 'n pH van 8,6 verkry.



FIGUUR 12: Analitische polyakriëlamiedjelelektroforese van amino-peptidase. Densitogram van die gekleurde ensiem-sone in die jel. cm = Afstand vanaf oorsprong in cm.

Die ensiem is geïdentifiseer deur van die nie-gekleurde poliakrielamiedjels, verkry uit dieselfde elektroforetiese skeiding, in 'n oplossing bestaande uit 0,02 M Tris-HCl-bufofer, pH 8,0 en 3 mM Lys-p-nitroanilied by 30°C te inkubeer. Die sone wat Lys-p-nitroanilied gehidroliseer het, het ooreengestem met die enkele amidoswart-gekleurde sone op die jel.

In die 7,5% poliakrielamiedjels het die aminopeptidase 36 tot 44 mm oor 'n periode van ongeveer 1 uur by 4°C gemigreer.

3.2.1.2 SDS-poliakrielamiedjelelektroforese:

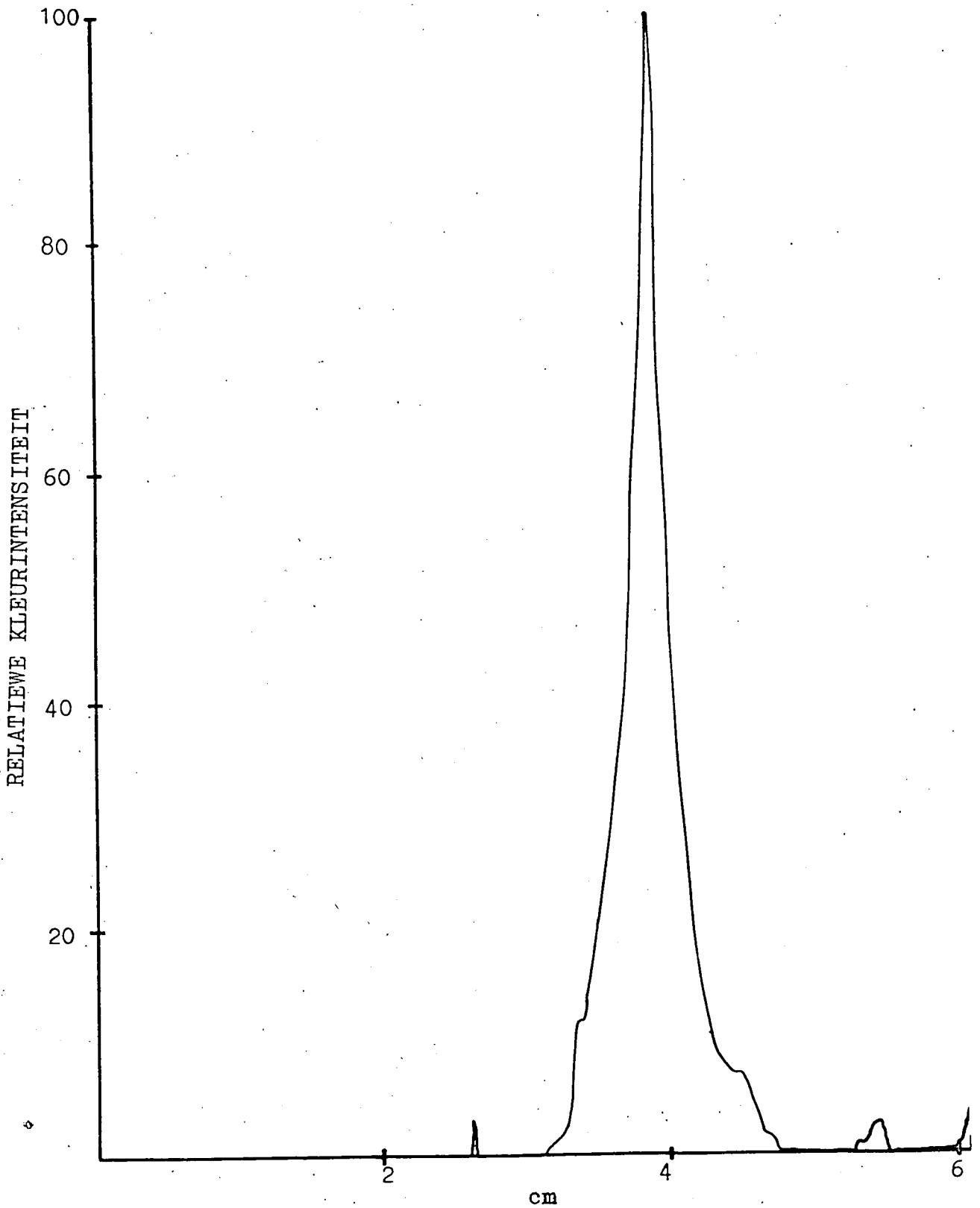
SDS-poliakrielamiedjelelektroforese is gebruik volgens die prosedure soos vroeër beskryf (2.9.1.2) om die homogeniteit sowel as molekulêre massa van die ensiem vas te stel.

Die afgetekende densitogram van die aminopeptidase-jel, wat in figuur 13 gegee word, is dié van die proteïen afkomstig vanaf die laaste suiweringsstap (stap 8). Aminopeptidase se mobiliteit ten opsigte van bromofenolblou word weergegee in byvoegsel 1. Die ensiem bestaan blykbaar uit 'n enkele polipeptiedstring.

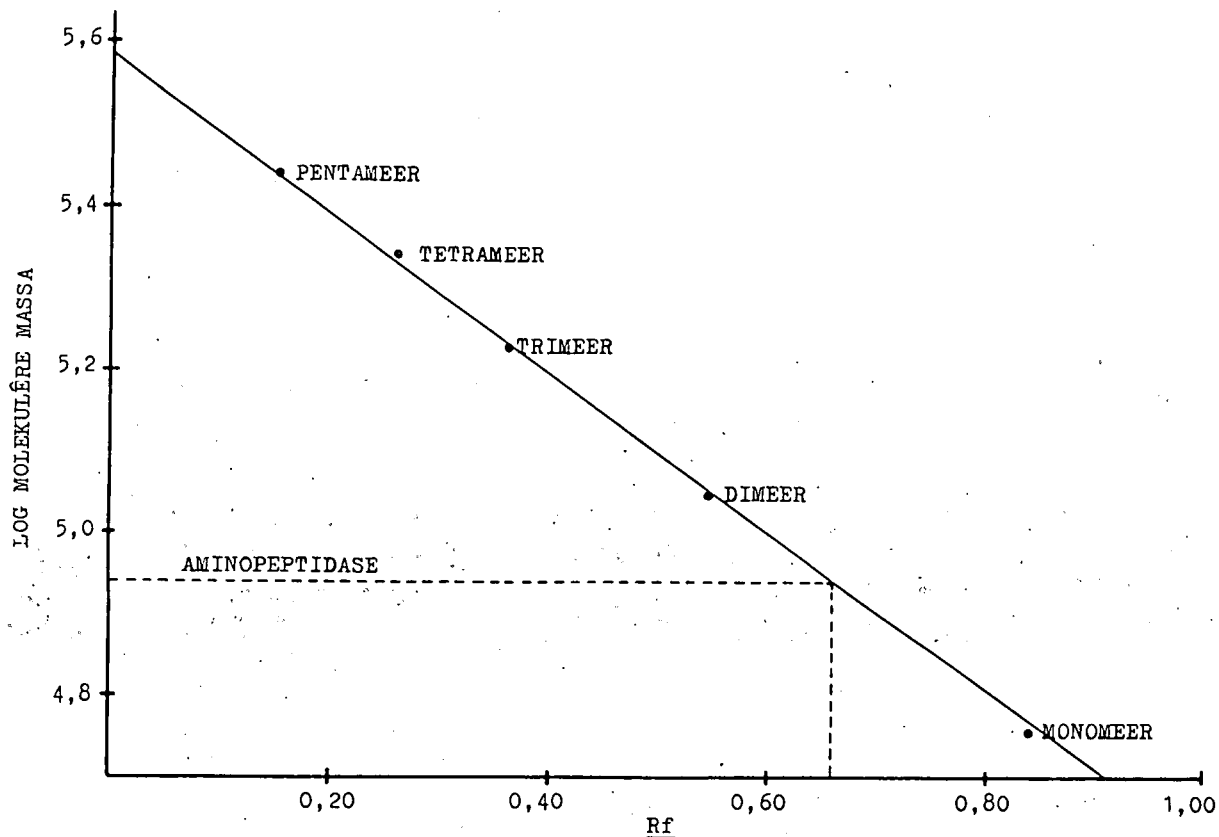
Om die molekulêre massa van die aminopeptidase te bepaal, is sy mobiliteit met dié van 'n reeks polipeptiede met molekulêre massas van 53 000 tot 265 000 daltons vergelyk. Die molekulêre massas van hierdie polipeptiede word in byvoegsel 1 gegee.

Die resultate van die prosedure waarvolgens die molekulêre massa van aminopeptidase bepaal is, word in figuur 14 opsom. Die eksperimentele gegewens word in byvoegsel 1 weer-gegee.

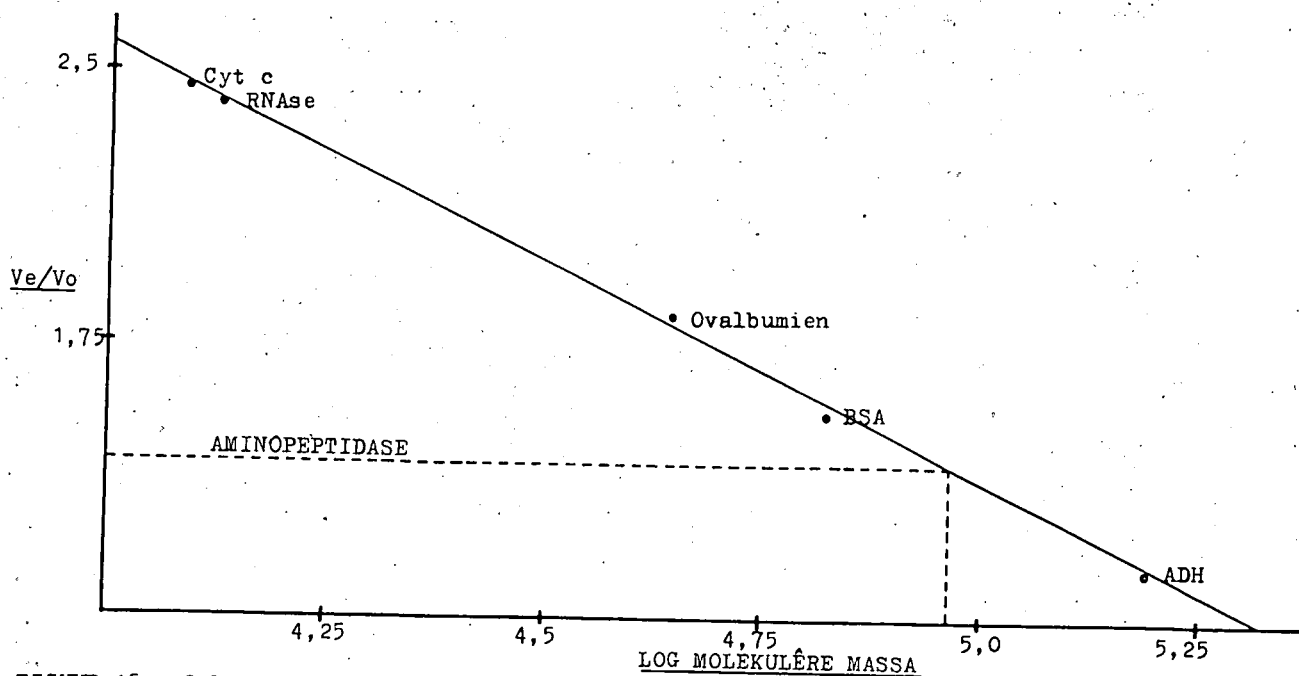
Volgens die metode is die molekulêre massa van die ensiem op 87 500 tot 87 600 daltons bepaal.



FIGUUR 13: SDS-poliakriëlamiedjëlelektroforese van aminopeptidase. Densitogram van die gekleurde ensiemsone in die jel. cm = Afstand vanaf oorsprong in cm.



FIGUUR 14: SDS-poliekriëlamiedjelelektroforese. Bepaling van die molekulère massa van aminopeptidase. Molekulère massas van merkers gebruik, word in byvoegsel 1 aangetoon.

$$R_f = \frac{\text{Afstand wat proteïen migreer het (mm)}}{\text{Afstand wat bromofenolblou migreer het (mm)}}$$


FIGUUR 15: Jelfiltrasiestudies met Sephadex G-200. Bepaling van die molekulère massa van aminopeptidase. Molekulère massas van standaard gebruik, word in byvoegsel 2 aangetoon. $Ve/Vo = \text{Eluëringsvolume/Uitsluitingsvolume}$.

3.2.2 Jelfiltrasiestudies op Sephadex G-200

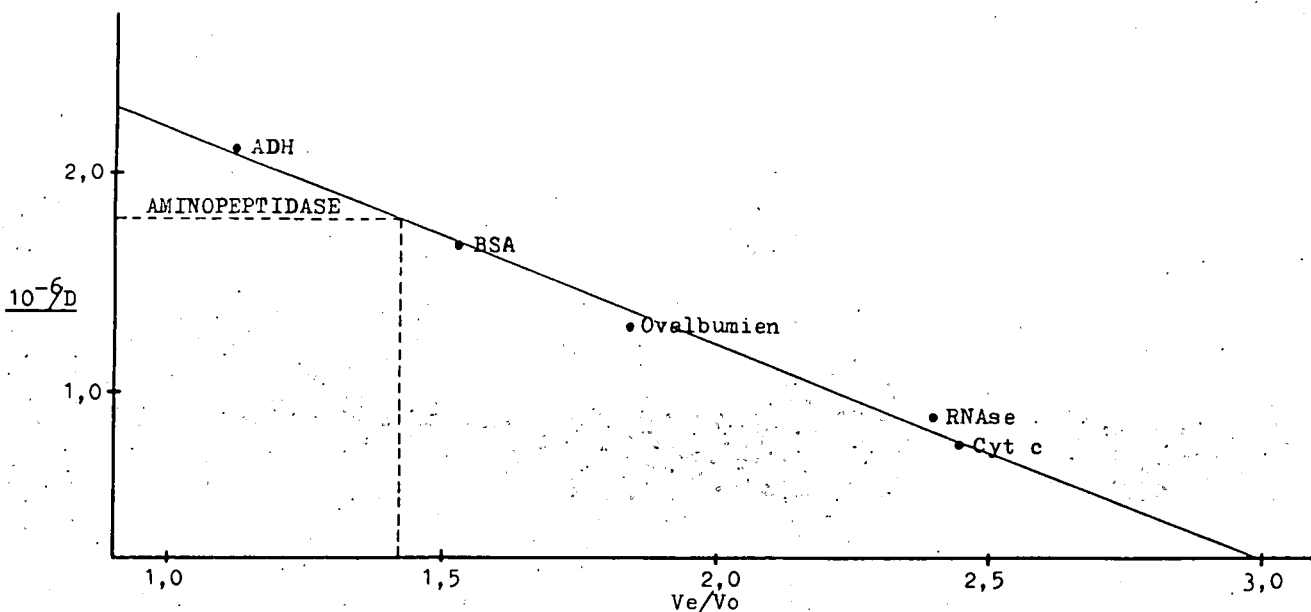
Die Sephadex G-200-kolom is voorberei en gebruik soos beskryf deur Andrews (1965 en 1970). Figuur 15 en byvoegsel 2 is 'n opsomming van die standaardiseringsprosedure van die kolom by die ondersoek van aminopeptidase.

Om die aantal fisiese konstantes van die ensiem te bepaal, is van die metodes soos uiteengesit deur Andrews (1970), gebruik gemaak.

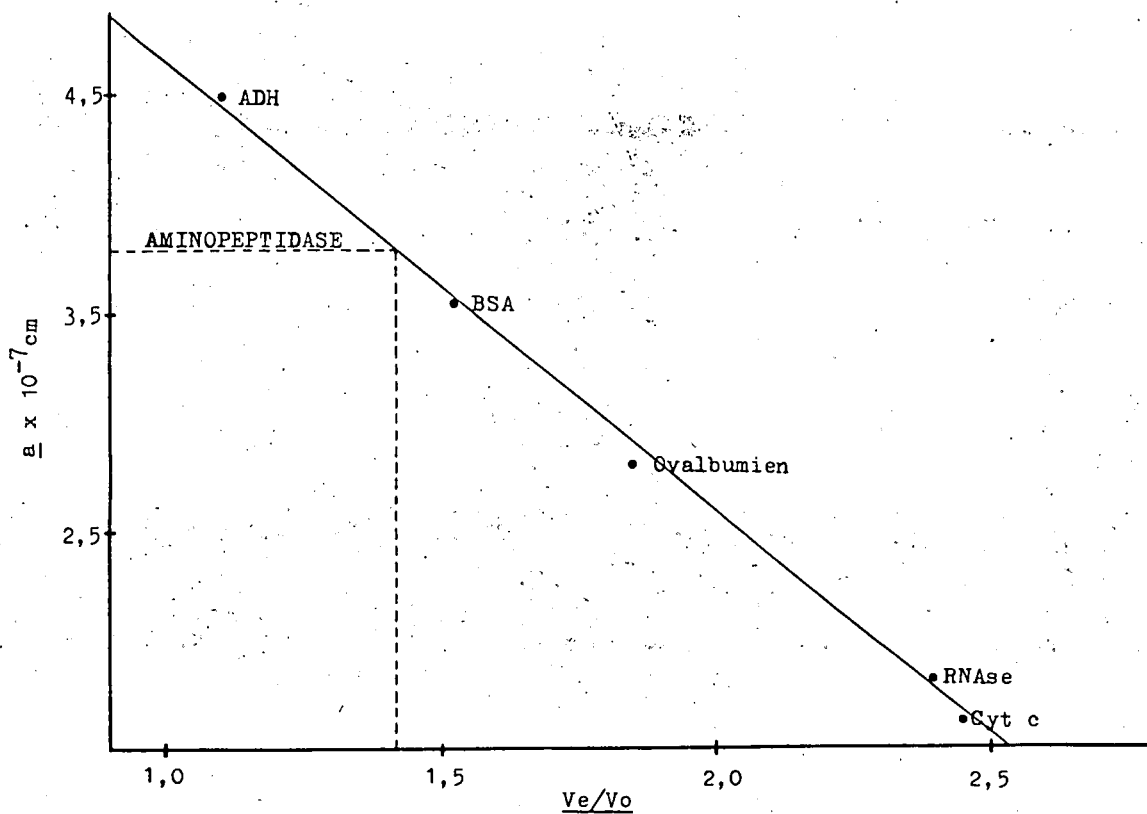
Volgens hierdie metodes is die molekulêre massa van die ensiem tussen 88 500 en 88 900 daltons bereken. Vanuit figuur 16 is die diffusiekoëffisiënt (D) op tussen $5,57 \times 10^{-7}$ en $5,59 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sek}$ vasgestel. Die Stokes radius (a) van aminopeptidase is uit figuur 17 op tussen $37,9 \times 10^{-8}$ en $38,0 \times 10^{-8} \text{ cm}$ vasgestel.

Die gemiddelde molekulêre massa (tabel 2) van die aminopeptidase geïsoleer uit T. trinervoides klassifiseer onder die kleiner aminopeptidasas, as dit vergelyk word met dié geïsoleer uit Talaromyces duponti, AP1 (Chapuis en Zuber, 1970), varkniere (Himmelhoch, 1970 en Pfleiderer, 1970), Bacillus stearothermophilus, AP1 (Roncari en Zuber, 1970) en beesoog (Carpenter en Vahl, 1973) met molekulêre massas in die orde van 280 000 en 400 000 daltons. Dit vergelyk egter goed met die aminopeptidase geïsoleer uit hondbrein, 86 000 daltons (Marks en Lajtha, 1970), die aktiewe vorm van aminopeptidase-P, 100 000 daltons (Yaron en Berger, 1970) en met dié van Agave americana, 86 500 daltons (Du Toit, Schabort, Kempff en Laubscher, 1978).

Aminopeptidasas waarvan die diffusiekoëffisiënt ongeveer van dieselfde grootte is as dié van die ensiem onder bespreking, is dié van Bacillus stearothermophilus (Roncari en Zuber, 1970) en Agave americana (Du Toit, et al, 1978) met onderskeidelike waardes van ongeveer $5,0 \times 10^{-7}$ en $5,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sek}$. Laasgenoemde ensiem se Stokes radius, $38,0 \times 10^{-8} \text{ cm}$, verge-



FIGUUR 16: Jelfiltrasiestudies met Sephadex G-200. Bepaling van die diffusiekoëffisiënt van aminopeptidase. Diffusiekoëffisiënte van standaard gebruik, word in byvoegsel 2 aangetoon. D = Diffusiekoëffisiënt, V_e/V_o = Eluëringsvolume/Uitsluitingsvolume.



FIGUUR 17: Jelfiltrasiestudies met Sephadex G-200. Bepaling van die Stokes radius van aminopeptidase. Stokes radiusse van standaard gebruik, word in byvoegsel 2 aangetoon. a = Stokes radius, V_e/V_o = Eluëringsvolume/Uitsluitingsvolume.

lyk ook goed met dié van die aminopeptidase geïsoleer uit T. trinervoides.

TABEL 5: Fisiese konstantes van aminopeptidase, geïsoleer uit T. trinervoides.

Fisiese konstante	Aminopeptidase
Diffusiekoëffisiënt (cm^2/sek)	$5,58 \times 10^{-7}$
Molekulêre massa $\pm 1\%$ (daltons)	$88,00 \times 10^3$
Stokes radius (cm)	$38,0 \times 10^{-8}$

3.3 Chemiese eienskappe van aminopeptidase

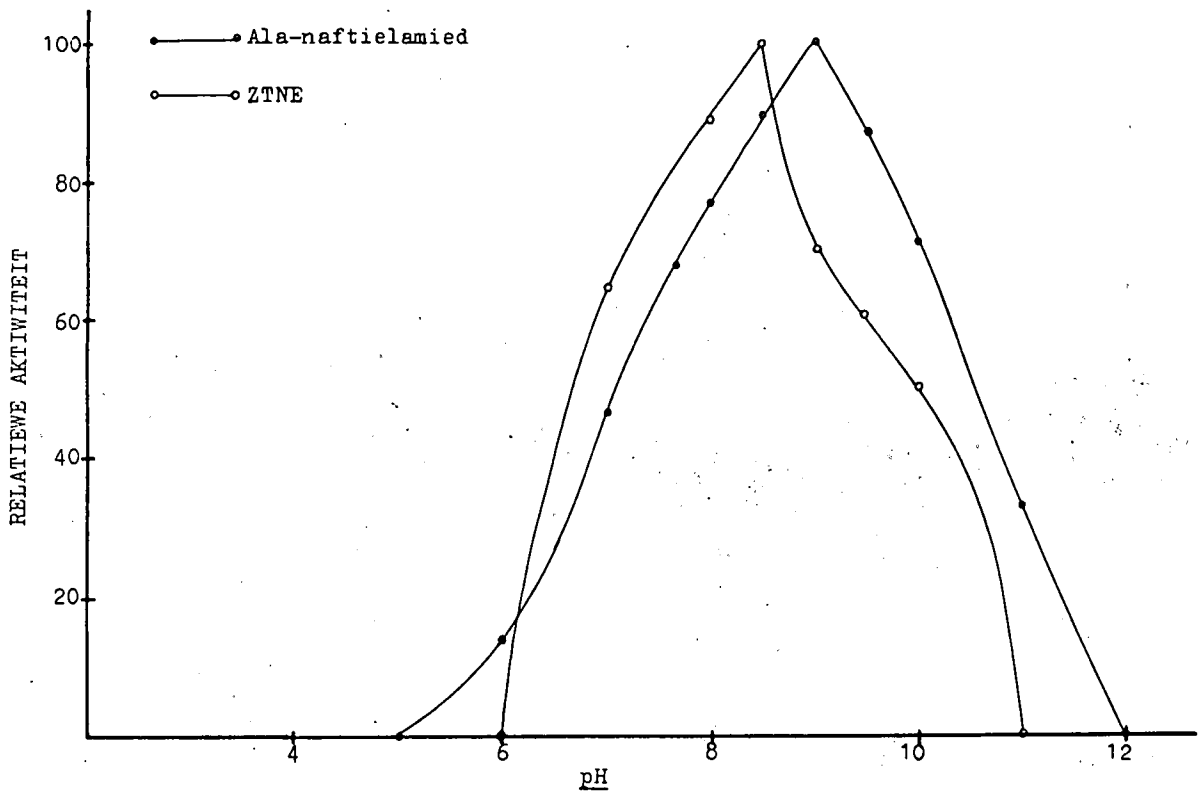
3.3.1 Substraatspesifisiteit en die effek van pH-variësie

By die ondersoek van die substraatspesifisiteit van aminopeptidase is verskeie substrate teen 'n konsentrasie van 3 mM elk by 30°C gebruik.

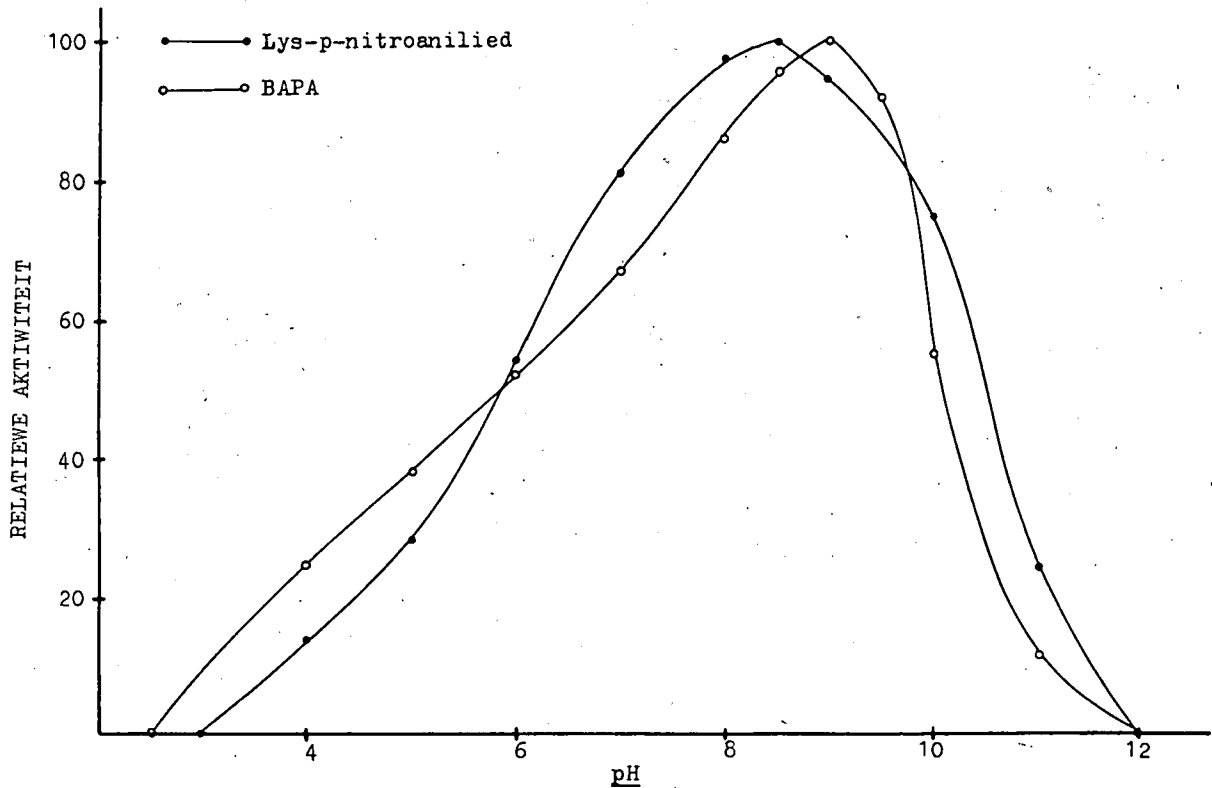
Die relatiewe hidrolise van Lys-p-nitroanilied, Leu-p-nitroanilied, Gly-p-nitroanilied, Ala-naftielamied, BAPA en ZTNE by verskillende pH-waardes word in figure 18, 19 en 20 aange-
toon. Hierdie ondersoek is in 0,02 M Universele-buffer (Britton en Robinson, 1931) uitgevoer.

Tussen pH 6 en 11 vertoon die ensiem aktiwiteit teenoor al die substrate. Buite hierdie pH-grense is aktiwiteit bykans afwesig. Maksimum ensimatiese hidrolise van die substrate vind tussen pH 8 en 9 plaas. Leusienaminopeptidase (beesoog) vertoon ook 'n pH-stabiliteit tussen pH 6 en 11 (Melbye en Carpenter, 1971), terwyl die leusienaminopeptidase, geïsoleer uit varkniere, 'n bykans soortgelyke pH-optimum (7,8 - 9,0) vertoon (Himmelhoch, 1970).

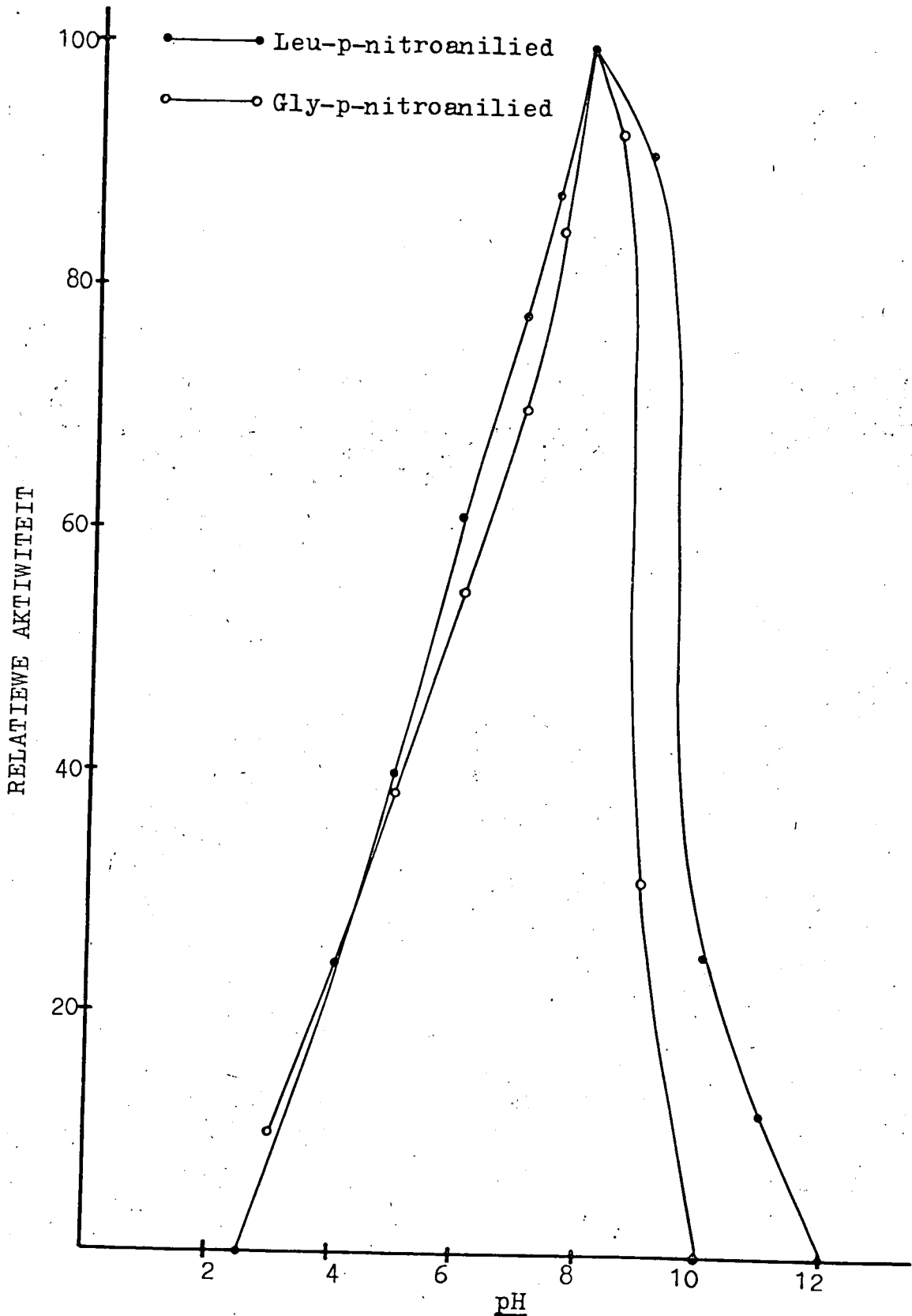
Na aanleiding van bogenoemde ensimatiese eienskappe is die mate van substraathidrolise by 'n pH van 8,5 ondersoek. Hierdie resultate word in tabel 6 gegee. Die optimum pH en die tempo van hidrolise van die verskillende substrate word in tabel 7 uiteengesit.



FIGUUR 18: Effek van pH-variase op die hidrolise van Ala-naftielamied en ZTNE. Resultate met 3 mM substraat in 0,02 M Universele-buffer verkry.



FIGUUR 19: Effek van pH-variase op die hidrolise van Lys-p-nitroanilied en BAPA. Resultate met 3 mM substraat in 0,02 M Universele-buffer verkry.



FIGUUR 20: Effek van pH-variase op die hidrolise van Leu-p-nitroanilied en Gly-p-nitroanilied. Resultate met 3 mM substraat in 0,02 M Universele-buffer verkry.

TABEL 6: Substraatspesifisiteit van amniopeptidase. Hidrolise van verskillende substrate teen 'n konsentrasie van 3 mM in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5, by 30°C.

Substraat	Tempo van hidrolise ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{cm}^3 \times 10^{-2}$)	Relatiewe hidrolise (%)
Leu-p-nitroanilied	18,04	100
Lys-p-nitroanilied	15,69	87
Gly-p-nitroanilied	4,55	25
BAPA	1,57	9
ZTNE	8,89	49
Ala-naftielamied	8,48	47

TABEL 7: Vergelyking van ensimatiese hidrolise van verskillende substrate by optimum pH-waardes in 0,02 M Tris-HCl-buffer. Onderzoek is met 3 mM substraatkonsentrasies by 30°C uitgevoer.

Substraat	Optimum pH	Tempo van hidrolise ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{cm}^3 \times 10^{-2}$)	Relatiewe hidrolise (%)
Leu-p-nitroanilied	8,0	18,50	100
Lys-p-nitroanilied	9,0	16,52	89
Gly-p-nitroanilied	8,0	4,92	27
BAPA	8,5	1,57	8
ZTNE	9,0	9,88	53
Ala-naftielamied	8,5	8,48	46

Uit tabelle 6 en 7 blyk dit dat die aminopeptidase 'n definitiewe voorkeur teenoor Leu-p-nitroanilied vertoon. Die mate waartoe die substrate by voorkeur gehidroliseer is neem af in die volgorde: Leu-p-nitroanilied, Lys-p-nitroanilied, ZTNE, Ala-naftielamied, Gly-p-nitroanilied en BAPA. Kaseïen is volgens die metode van Spies (1957) as 'n protease-substraat ondersoek.

Laasgenoemde substraat is so swak onder hierdie toestande gehidroliseer (vir alle praktiese doeleindes, geensins) dat dit onweerlegbaar daarop gedui het dat n eksopeptidase by die ondersoek betrokke was.

3.3.2 Invloed van verskillende buffers en bufferkonsentrasies

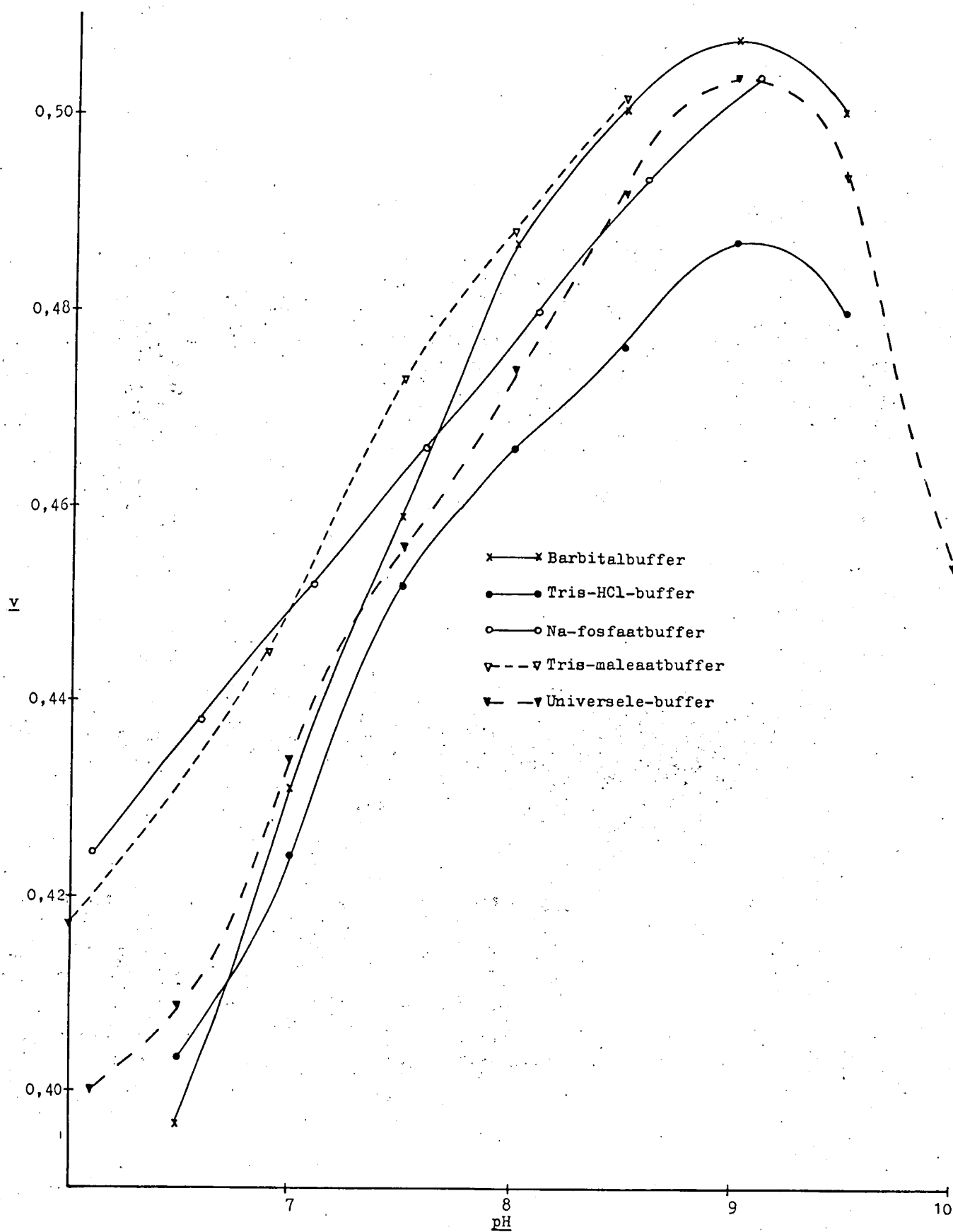
Aktiwiteitsbepalings is by 30°C met 3 mM Lys-p-nitroanilied in 0,02 M bufferoplossings uitgevoer. Universele- (Britton en Robinson, 1931), Tris-HCl-, Na-fosfaat-, Barbitaal- en Tris-maleaatbuffer is in die ondersoek gebruik. Die resultate van die buffervariasie word in figuur 21 weergegee. Die pH-gebied wat met elkeen van die buffers gedek is, word in die grafiek aangetoon. Volgens die krommes blyk dit dat alle buffers dieselfde effek ten opsigte van die katalitiese aktiwiteit het alhoewel dié van Tris-HCl-buffer effens laer is.

Die effekte van n algemene toename in ioonsterkte op die aktiwiteit van die ensiem word in figuur 22 opgesom. In die ondersoek is verskillende konsentrasies van Na-fosfaat-, Tris-HCl- en NaCl in 5 mM Tris-HCl-buffer by n pH van 8,0 gebruik. n Algemene afleiding wat gemaak kan word, is dat n verhoging in ioonsterkte die ensiem aktiveer met n maksimale aktiwiteit by ongeveer 0,2 tot 0,4 M. Tris-HCl het blykbaar n minder aktiverende effek gehad as die ander buffers of NaCl opgelos in Tris-HCl-buffer.

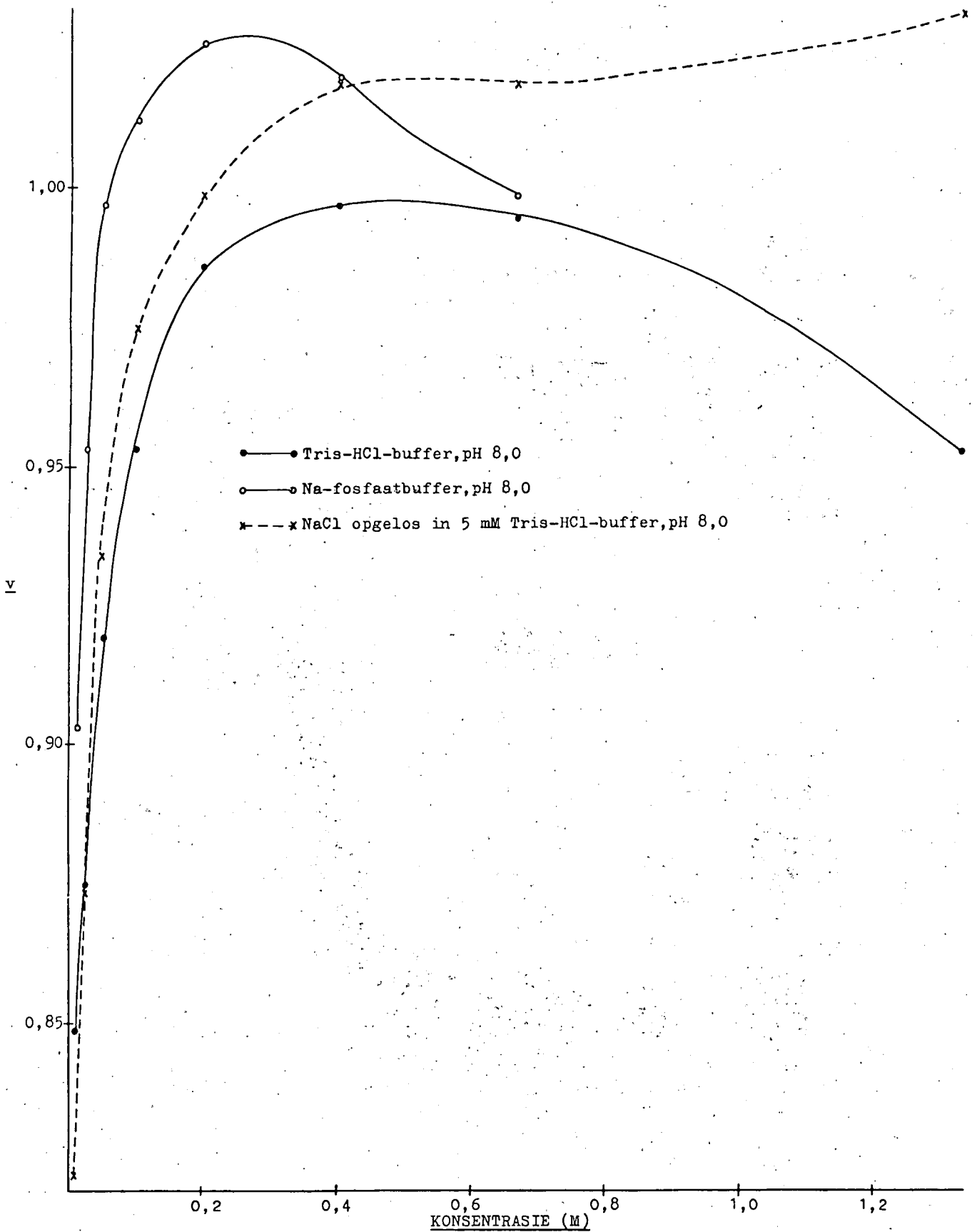
Amino-peptidase, geïsoleer uit Agave americana (Du Toit en Schabert, 1978a), vertoon dieselfde eienskappe ten opsigte van verskillende buffers en bufferkonsentrasies.

3.3.3 Invloed van verskillende konsentrasies sout en EDTA

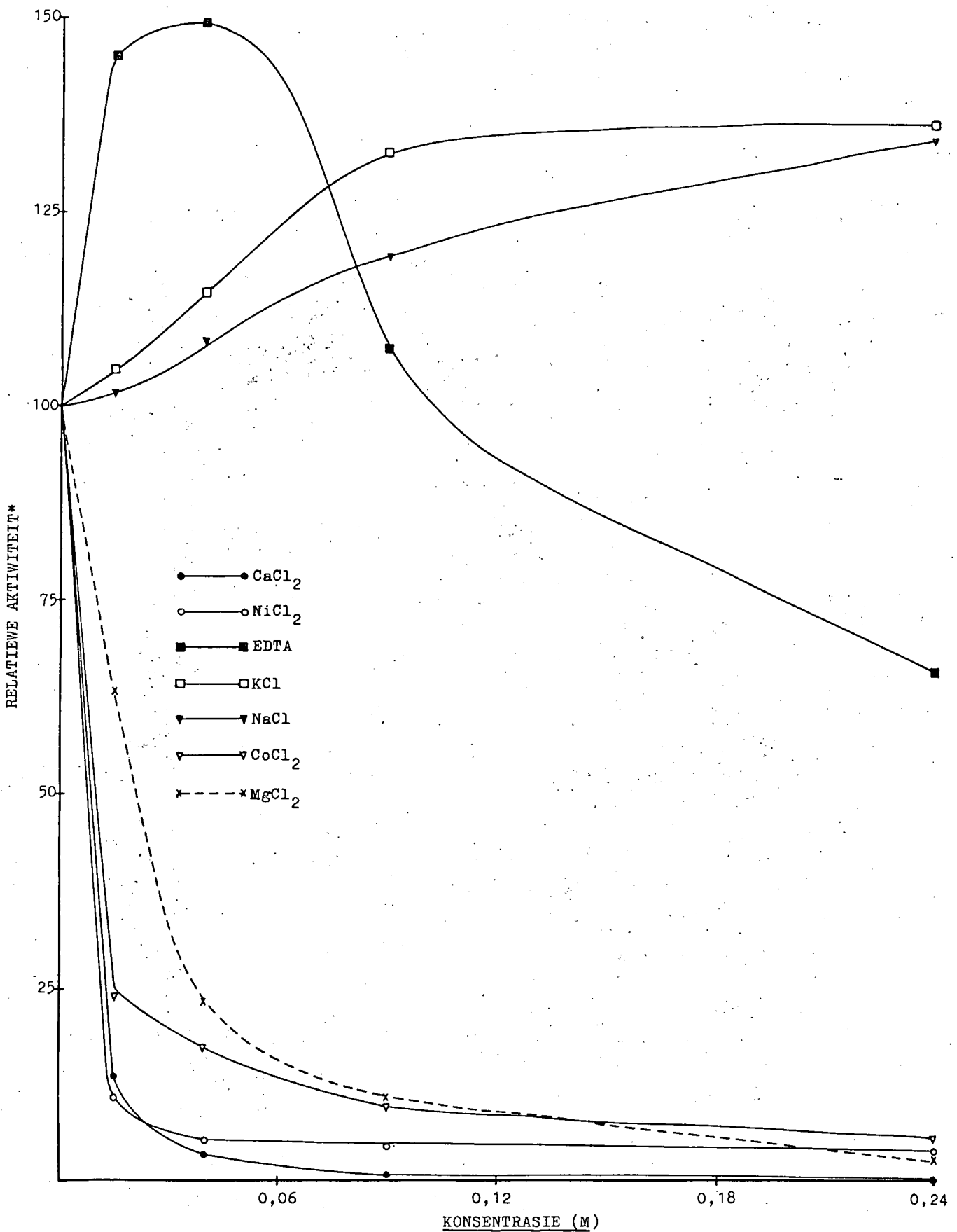
Die invloed van verskeie metaalione (0,015 tot 0,49 M) op ensimatiese hidrolise van 3 mM Lys-p-nitroanilied in 0,01 M Tris-HCl-buffer, pH 9,0, is ondersoek. Die resultate word in figuur 23 weergegee. HgCl₂-oplossings is nie verder



FIGUUR 21: Effek van verskillende 0,02 M bufferoplossings, oor 'n pH-gebied soos aangedui, op die hidrolise van 3 mM Lys-p-nitroanilied. $y = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³.



FIGUUR 22: Effek van verskillende buffers, asook n algemene toename in ionsterkte van die bufferoplossings, op die hidrolise van 3 mM Lys-p-nitroanilied. $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³.



FIGUUR 23: Effek van verskillende metaalione en EDTA, asook 'n algemene toename in ioonsterkte van die oplossings, op die hidrolise van 3 mM Lys-p-nitroanilied. Soute en EDTA is in 0,01 M Tris-HCl-buffer, pH 9,0, opgelos. Die pH van die EDTA-oplossing is op 9,0 ingestel. *Relatiewe aktiwiteit t.o.v. ensimatiese hidrolise in 0,01 M Tris-HCl-buffer, pH 9,0.

ondersoek nie, nadat vasgestel is dat n 0,015 M oplossing presipitering van die substraat tot gevolg gehad het.

In die geheel gesien het al die divalente metaalioonoplossings die ensiem by 0,49 M geïnhibeer. In 0,49 M CoCl_2 het die ensiem egter 5% aktiwiteit behou. Oplossings van 0,49 M NaCl en KCl gee tot n aktivering van 1,36-voud aanleiding.

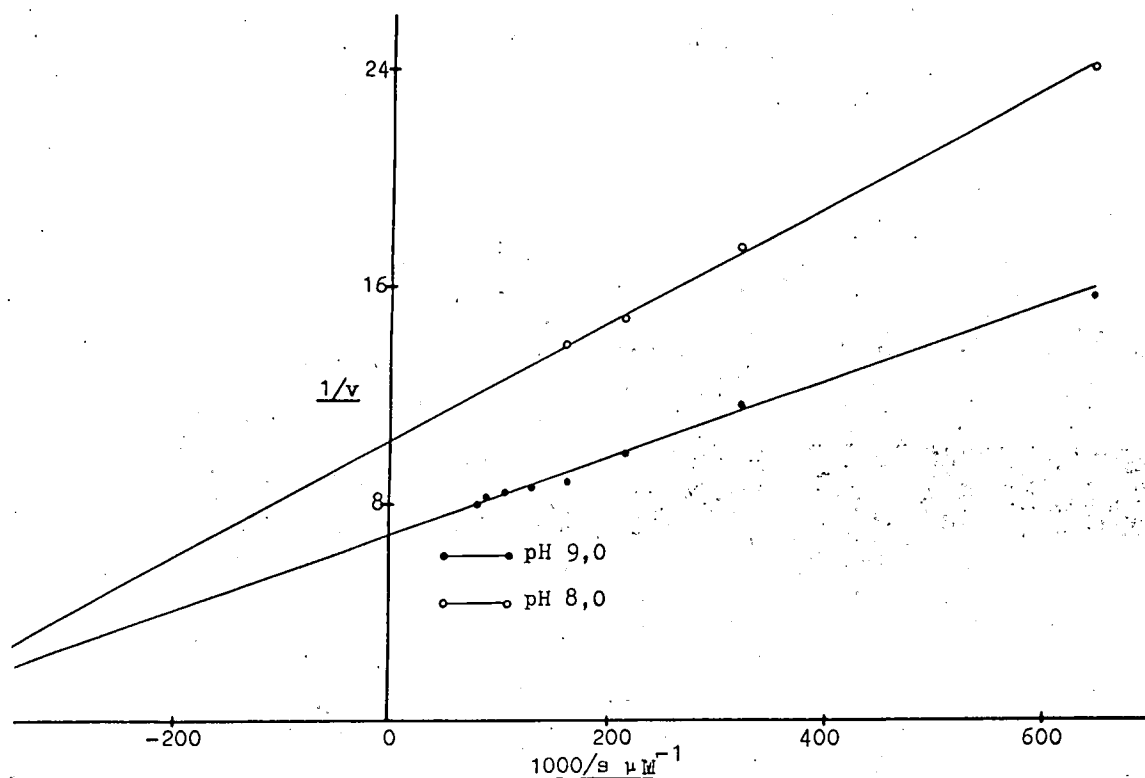
Uit bogenoemde en ander gegewens (kyk figuur 23) lyk dit of die ensiem deur alle divalente metale geïnhibeer en deur monovalente metale geaktiveer word. Hierdie gevolgtrekking kan gestaaf word deur die aktiverende effek van verhoogde konsentrasies van EDTA waar monovalente metale ten koste van divalente metale verplaas word. Die inhibisie van EDTA bo 0,09 M kan heelwaarskynlik aan die baie hoë konsentrasie van EDTA ten opsigte van die ensiemkonsentrasie toegeskryf word.

n Moontlike verklaring vir die relatief hoër katalitiese konstantes bepaal in Barbitaal-, Na-fosfaat- en Universelebuffer is heelwaarskynlik die teenwoordigheid van Na-ione in die bufferoplossings.

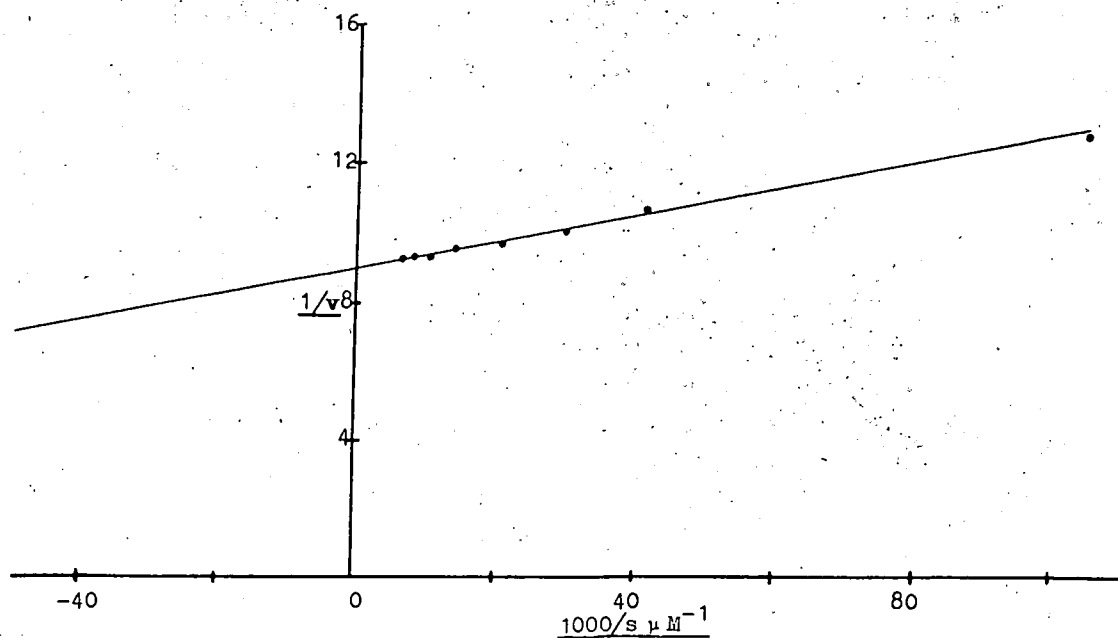
3.3.4 Algemene kinetiese eienskappe

Michaeliskonstantes van Lys-p-nitroanilied in 0,02 M Tris-HCl-bufferoplossings met pH-waardes van 8,0 en 9,0 en dié van Leu-p-nitroanilied in dieselfde bufferoplossing met n pH van 8,0 is met behulp van die Lineweaver-Burk-prosedure in figure 24 en 25 onderskeidelik bereken. Die numeriese resultate van die ondersoek word in byvoegsel 3 (Lys-p-nitroanilied) en 4 (Leu-p-nitroanilied) uiteengesit.

Lys-p-nitroanilied vertoon onderskeidelik by n pH van 8,0 en 9,0 Michaeliskonstantes van $2,048 \times 10^{-6}$ M en $2,001 \times 10^{-6}$ M, terwyl Leu-p-nitroanilied n waarde van $4,000 \times 10^{-6}$ M in n oplossing met n pH van 8,0 vertoon. Hierdie waardes is uitsonderlik laag en die enigste substraathidrolise wat gereedlik hiermee ooreenstem, is die hidrolise van H-Pro-Phe-OH ($K_m =$



FIGUUR 24: Bepaling van die Michaeliskonstantes met Lys-p-nitroanilied as substraat in 0,02 M Tris-HCl-buffer by pH-waardes van 8,0 en 9,0. v = μmol substraat verwerk/min/ cm^3 , s = substraatkonsentrasie.



FIGUUR 25: Bepaling van die Michaeliskonstante met Leu-p-nitroanilied as substraat in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0. v = μmol substraat verwerk/min/ cm^3 , s = substraatkonsentrasie.

$7,52 \times 10^{-5}$ M) met aminopeptidase-P (Yaron en Berger, 1970). Die lae K_m -waarde van die termiet-aminopeptidase stel hulle heelwaarskynlik in staat om op voedsel met 'n lae proteïeninhoud te kan bestaan. Proteïenhidrolise is dus heelwaarskynlik gemak op voorsiening van essensiële aminosure eerder as aminosure as voedsel.

3.3.5 Temperatuurstudies

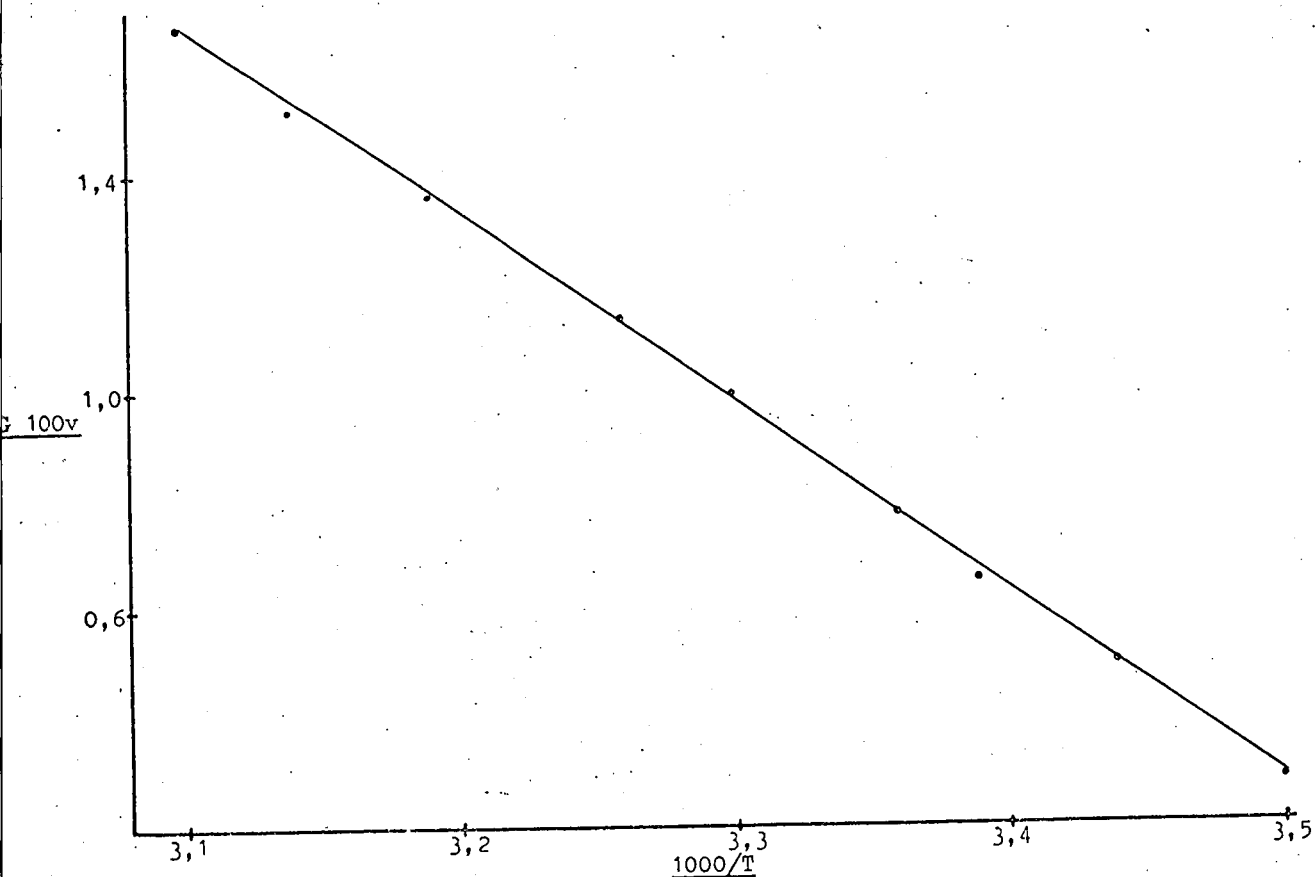
Die effek van temperatuur (3° tot 50°C) op die aminopeptidase-aktiwiteit is getoets met 3 mM Lys-p-nitroanilied as substraat in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0.

Aktiveringsenergie, E_a , is vanaf die Arrhenius-kromme in figuur 26 bereken as 66,79 kJ (16,016 kkal). Uit figure 27 en 28 is die entalpie en entropie van aktivering onderskeidelik op 64,24 kJ (15,34 kkal) en 232,16 J/ $^{\circ}\text{K/mol}$ (55,45 entropie eenhede) bepaal. 'n Q_{10} -waarde van 2,584 is vir die ensiem oor die temperatuurgebied 20° tot 30°C verkry. Addisionele inligting kan uit byvoegsel 5 verkry word. Die energie (onder 30°C) en entalpie van aktivering van die aminopeptidase, geïsoleer uit Agave americana (Du Toit en Schabort, 1978b), stem tot 'n groot mate ooreen met hierdie waardes. 'n E_a -waarde (18 kkal) wat ook redelik hiermee vergelyk, is dié van lusiferase met lusiferien as substraat (Likhtenshtein, 1966). Adenosientrifosfatase vertoon 'n entropie-waarde (44,0) in dieselfde orde-grootte as hierdie aminopeptidase (Laidler en Bunting, 1973).

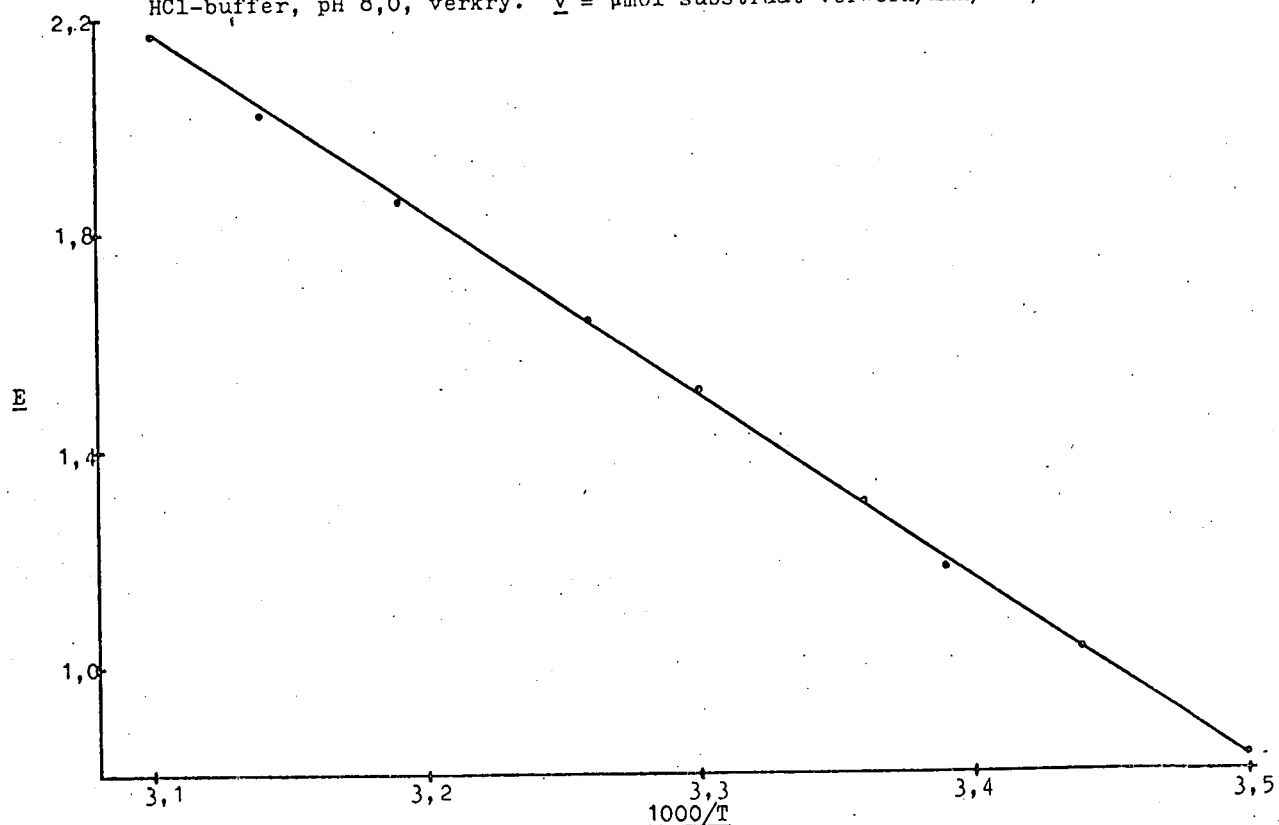
Figuur 29 is 'n opsomming van die mate waartoe aminopeptidase, na blootstelling van 1 uur aan temperature tussen 3° en 80°C , gedenatureer word. Uit hierdie resultate blyk dit dat die ensiem ongeskonde daarvan afkom na soortgelyke behandeling by 40°C . Vyftig persent verlies in aktiwiteit word by ongeveer 60°C en geen aktiwiteit by 75°C verkry.

3.3.6 Inhibisiestudies

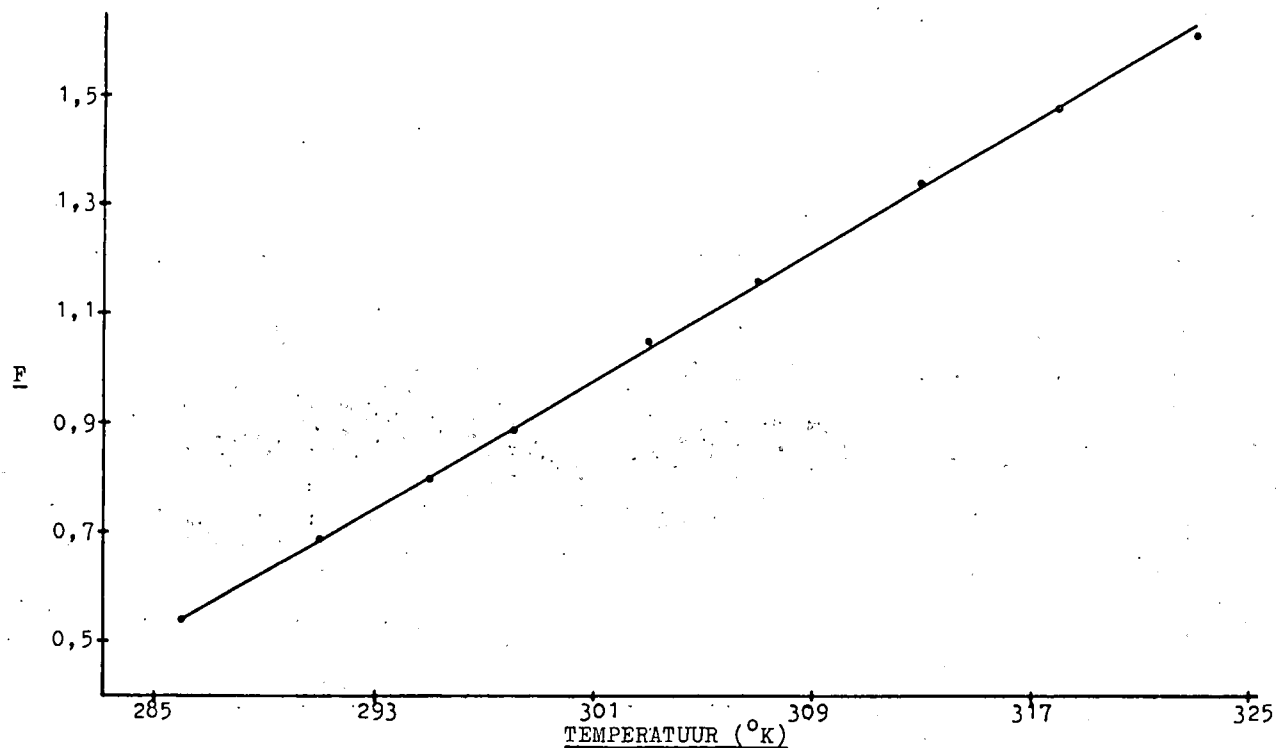
Die invloed van lisien oor 'n konsentrasiegebied van 1,333



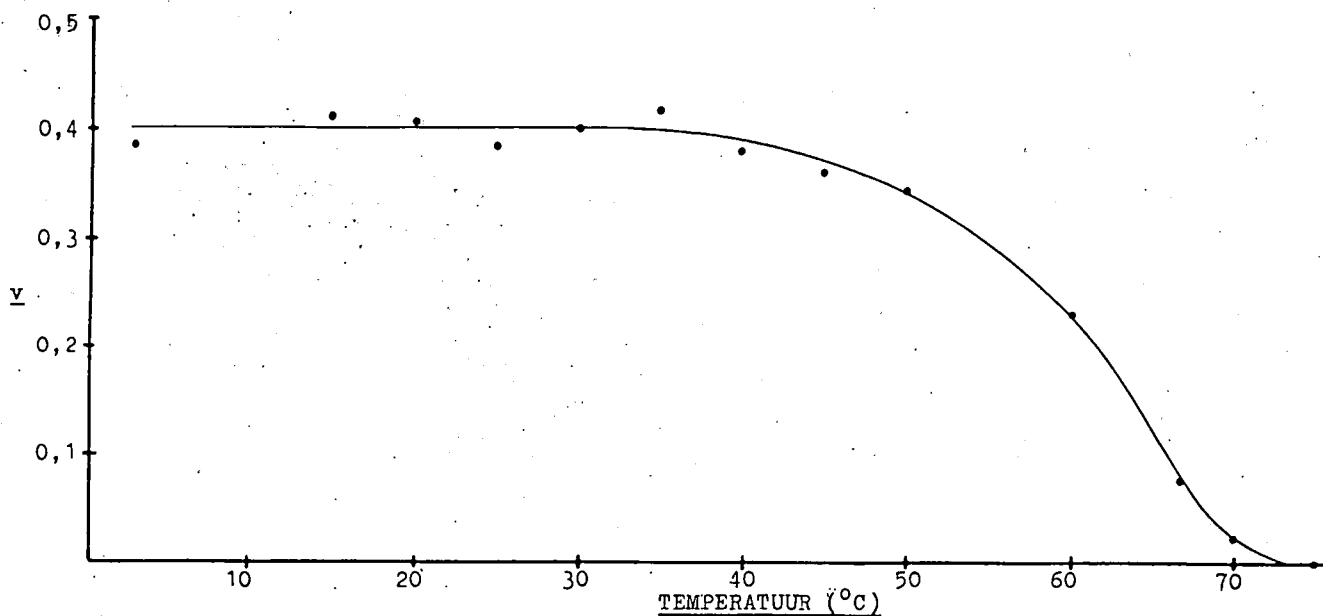
FIGUUR 26: Temperatuurstudies met aminopeptidase. Bepaling van E_a met behulp van Arrhenius grafiek. Resultate is met 3 mM Lys-p-nitroanilied as substraat in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0, verkry. $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³, $T = ^\circ\text{K}$.



FIGUUR 27: Temperatuurstudies met aminopeptidase. Bepaling van ΔH en ΔS . Resultate is met 3 mM Lys-p-nitroanilied as substraat in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0, verkry. $E = \log(1000v/T)$, waar $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³ en $T = ^\circ\text{K}$.



FIGUUR 28: Temperatuurstudies met aminopeptidase. Bepaling van ΔS . Resultate is met 3 mM Lys-p-nitroanilied as substraat in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0, verkry. $F = T \ln(v/T)$, waar $v = \mu\text{mol substraat verwerk/min/cm}^3$ en $T = ^\circ\text{K}$.



FIGUUR 29: Temperatuurstudies met aminopeptidase. Invloed van temperatuur op die stabiliteit van die ensiem. Resultate is met 3 mM Lys-p-nitroanilied as substraat in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0, verkry. Verdere besonderhede van die metode word in die teks gegee. $v = \mu\text{mol substraat verwerk/min/cm}^3$.

tot 26,666 mM op Lys-p-nitroanilied- (3,113 tot 9,340 μ M) hidrolise is ook ondersoek. n Voorstelling van die resultate kan in figure 30, 31, 32 en 33 verkry word.

Figure 30, 31 en 32 vertoon duidelike kompeterende inhibisie met K_i -waardes van $2,10 \times 10^{-3}$ M tot $3,00 \times 10^{-3}$ M. In figuur 33 is die kromme geëkstrapoleer na die punt van geen Lys om die Michaeliskonstante van Lys-p-nitroanilied by n pH van 8,5 in die afwesigheid van produkte te bereken. n Waarde van $2,267 \times 10^{-6}$ M is sodanig verkry, wat goed vergelyk met die vorige waardes. Verdere resultate van figure 30, 31, 32 en 33 word in byvoegsel 6 aangetoon.

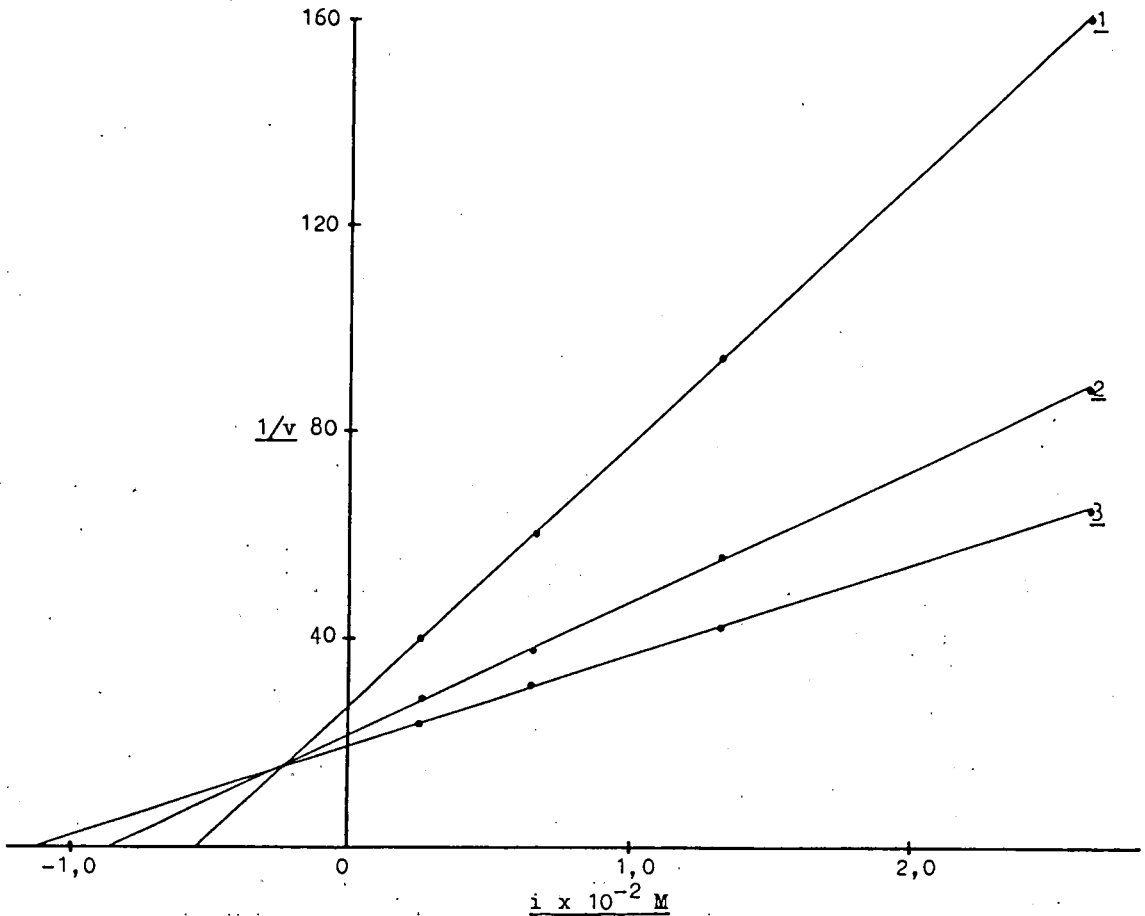
3.3.7 Hidrolise van tripeptiede

Die eindprodukte van Gly-Gly-Leu- en Leu-Gly-Gly-hidrolise is in figuur 34 en tabel 8 aangedui. Dit is duidelik dat die eerste produkte van Gly-Gly-Leu-hidrolise Gly en Gly-Leu is en dié van Leu-Gly-Gly, Leu en Gly-Gly is. In elke geval is die aminoterminale aminosuur dus vrygestel vanaf die tripeptied wat ondersoek is, onder die bepaalde toestande. Indien hoër ensiemkonsentrasies gebruik is (resultate nie getoon nie) is volledige afbreking van die tripeptiede bewerkstellig.

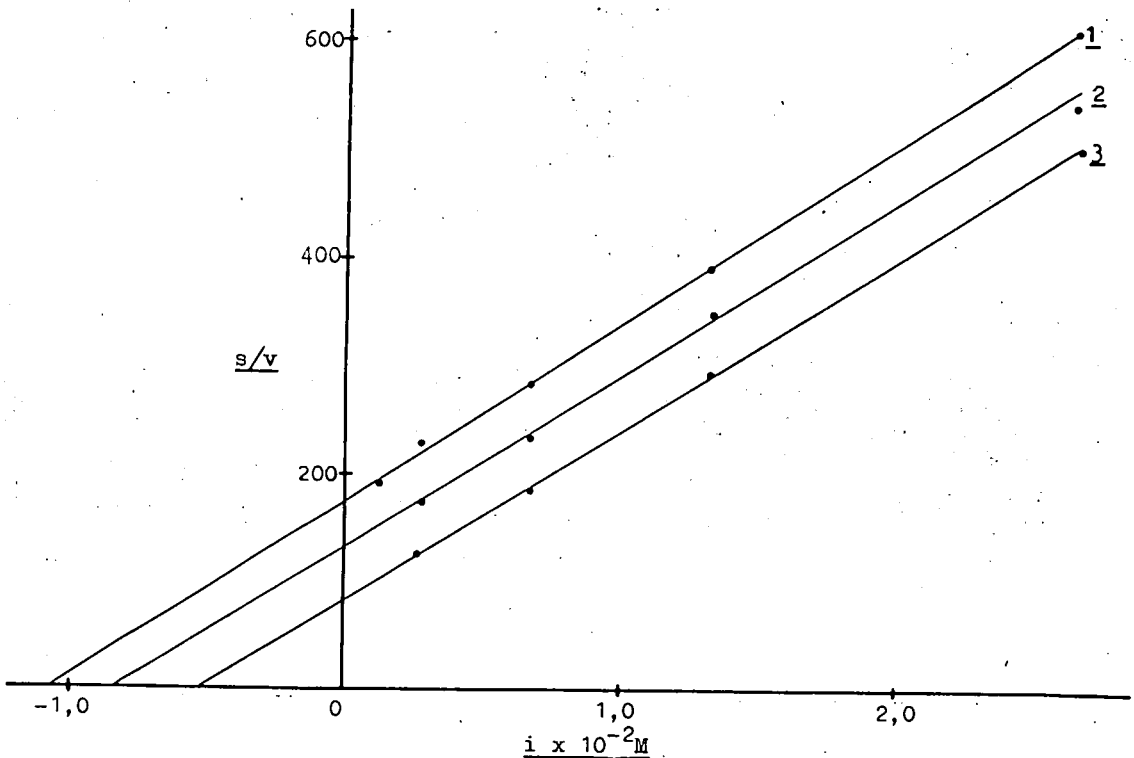
Op grond van hierdie resultate kon die eksopeptidase dus onder die aminopeptidasas geklassifiseer word.

3.4 Bespreking

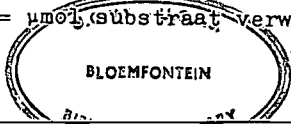
Uit die lokaliteitsbepalings van aminopeptidase blyk dit dat die maksimum vertering van peptiede met die algemene patroon van vertering by insekte ooreenstem. Dit is egter baie onwaarskynlik dat vertering by hierdie termiet hoofsaaklik in die agterderm, soos deur Noirot en Noirot-Timothee (1969) beweer, plaasvind. Laasgenoemde stelling, dat vertering by T. trinervoides werkers hoofsaaklik in die middelderm plaasvind, kan deur die bevindings van Potts en Hewitt (1973) met sellulase gestaaf word.



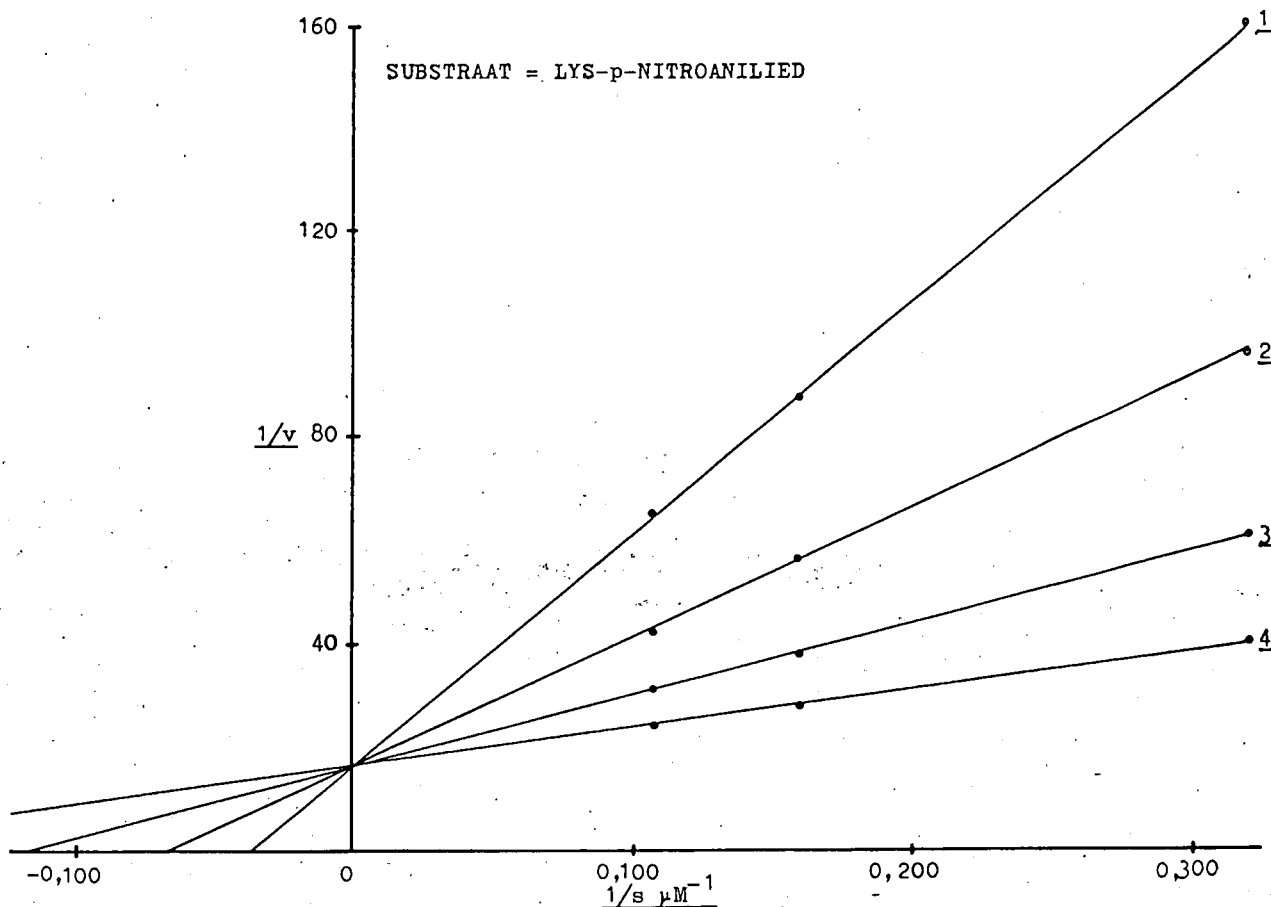
FIGUUR 30: Produktinhibisie van aminopeptidase met lisien. Verskillende Lys-p-nitroanilied-konsentrasies (1 = 3,113 μM ; 2 = 6,226 μM ; 3 = 9,340 μM) is in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5, ondersoek. v = μmol substraat verwerk/min/cm³, i = Lys-konsentrasie.



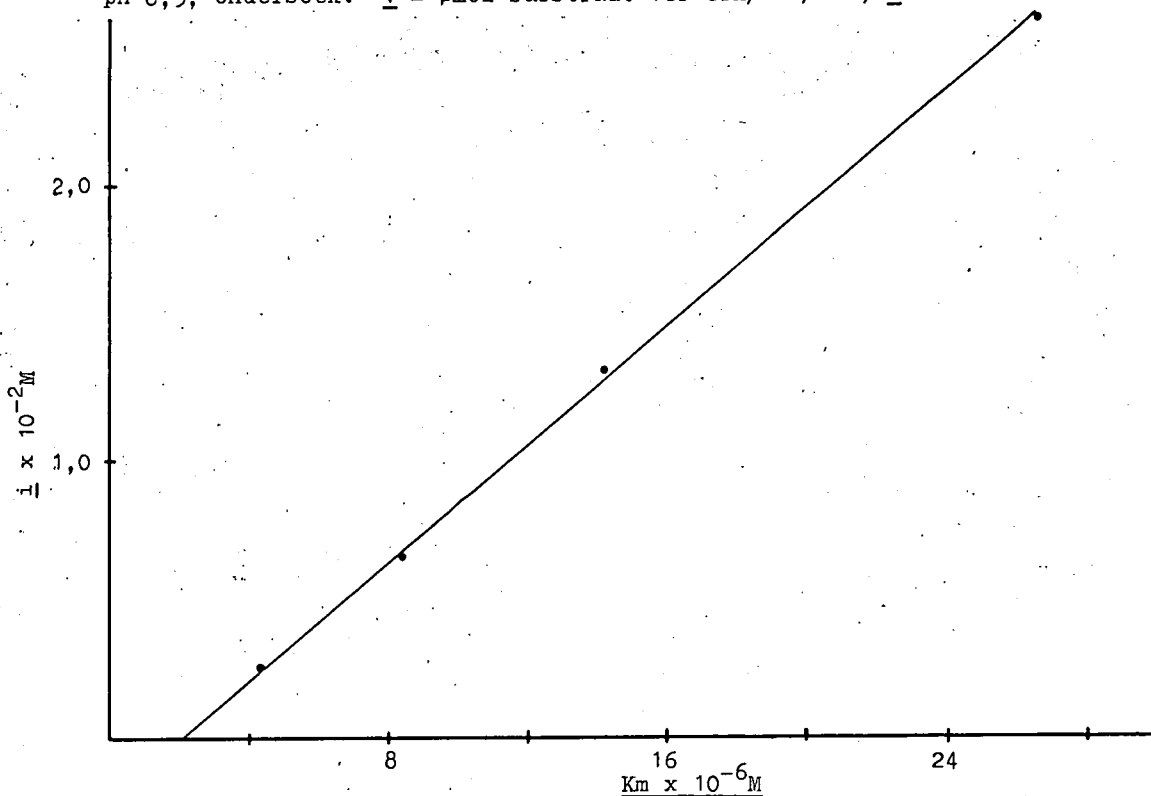
FIGUUR 31: Produktinhibisie van aminopeptidase met lisien. Verskillende Lys-p-nitroanilied-konsentrasies (1 = 3,113 μM ; 2 = 6,226 μM ; 3 = 9,340 μM) is in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5, ondersoek. v = μmol substraat verwerk/min/cm³, i = Lys-konsentrasie, s = substraatkonsentrasie.



280801

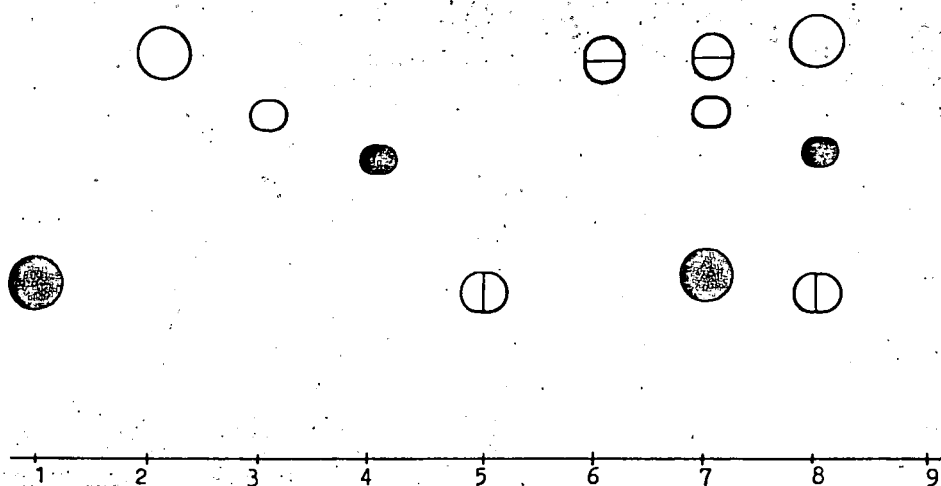


FIGUUR 32: Produktinhibisie van aminopeptidase met lisien. Verskillende Lys-konsentrasies (1 = 26,6 mM; 2 = 13,3 mM; 3 = 6,6 mM; 4 = 2,6 mM) is in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5, ondersoek. $v = \mu\text{mol}$ substraat verwerk/min/cm³, $s = \text{substraat}$ konsentrasie.



FIGUUR 33: Bepaling van die Michaeliskonstante met Lys-p-nitroanilied as substraat. Grafiese voorstelling van Lys-konsentrasie teenoor Km-waardes uit figuur 32. Ondersoek is in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,5, uitgevoer. Verdere besonderhede van die metode word in die teks gegee. $i = \text{Lys-konsentrasie}$, $K_m = \text{Michaeliskonstante}$.

FRONT VAN MOBIELE FASE



FIGUUR 34: Skeiding en identifisering van hidrolitiese produkte met behulp van dunlaagchromatografie. Standaarde: 1 = Gly, 2 = Leu, 3 = Gly-Gly-Leu, 4 = Leu-Gly-Gly, 5 = Gly-Gly, 6 = Gly-Leu. Produkte na inkubasie van 7 (Gly-Gly-Leu), 8 (Leu-Gly-Gly) en 9 (geen substraat) met ensiem. Verdere besonderhede van die metode word in die teks gegee.

TABEL 8: Chromatografiese skeiding en identifisering van die produkte na hidrolise van tripeptiede deur aminopeptidase.

Nommer	Aminosuur/peptied	Benaderde Rf-waarde
1	Gly	0,21
2	Leu	0,48
3	Gly-Gly-Leu	0,40
4	Leu-Gly-Gly	0,35
5	Gly-Gly	0,19
6	Gly-Leu	0,47
7	Ensiem + Gly-Gly-Leu	0,21
	" "	0,40
	" "	0,47
8	Ensiem + Leu-Gly-Gly	0,19
	" "	0,35
	" "	0,48
9	Ensiem	0,00

Bykans geen protosoë is in die inhoud van die spysverteringskanaal waargeneem nie. Tussen die peritrofiese membraan en die epiteellaagselle is bakterieë versprei as 'n laag oor die volle lengte van die gemengde segment, waargeneem. Dit stem met die waarnemings van Honigberg (1970), op hoër termiete, ooreen. Geen definitiewe bron van oorsprong kan aan die aminopeptidase toegeken word nie omrede dit óf vanaf die dermkanaal óf vanaf die bakterieë afkomstig kan wees. Geen uitsluitel kan ook aan die presiese lokaliteit van aminopeptidasewerking gegee word nie omdat dit óf in die spysverteringskanaallumen óf in die epiteelselle óf tussen die peritrofiese membraan en die epiteelselle kan fungeer. Die maksimum voorkoms van aminopeptidase stem met dié van sellulase ooreen (Potts en Hewitt, 1973).

Indien aanvaar word dat die 3,5% aminosure in droë Themeda triandra (Cilliers, 1978), die hoof voedselbron van die termiete, in die vorm van proteïene voorkom, dan kan 'n verklaring vir die betreklik lae ($\times 10^{-6}$ M) Michaeliskonstante van aminopeptidase verkry word. Die aminopeptidase mag ook met die vertering van dooie simbiote gemoed wees.

Die pH van die middelderm, 6,2 tot 6,6 (Potts, 1971), voldoen ongeveer aan die gemiddelde van die optimum pH van sellulase, pH 5,8 (Potts en Hewitt, 1974a) en aminopeptidase, pH 8,5.

3.5 Opsomming

Aminopeptidase is uit die grasdraertermiet, Trinervitermes trinervoides (Sjöstedt) geïsoleer. Die ensiem kom maksimaal in die middelderm voor. Hierdie ensiem is gesuiwer deur van die volgende prosedure gebruik te maak: Ru-ekstrahering in 0,9% NaCl-oplossing, 30% ammoniumsulfaatfraksionering, chromatografiese skeidings op twee diëtielaminoëtiel-sellulose- (DE-52), DEAE-Sephadex- (A-25), Sephadex G-200-, CM-Sephadex- (C-25) en Sephadex G-200-kolomme. Die suiwer ensiem se aktiwiteit was 100-voud meer as dié van die oor-

spronklike ekstrak met 'n spesifieke aktiwiteit van ongeveer 1,75 eenhede per milligram proteïen.

Die homogeniteit van die ensiem is bevestig met behulp van analitiese en SDS-poliakriëlamiedjuelelektroforese sowel as met Sephadex G-200-jelfiltrasie. 'n Molekulêre massa van 88 000 daltons, diffusiekoëffisiënt van $5,58 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sek}$ en Stokes radius van $38,0 \times 10^{-8} \text{ cm}$ is vir die ensiem vasgestel.

Van al die substrate (Leu-p-nitroanilied, Lys-p-nitroanilied, Gly-p-nitroanilied, BAPA, ZTNE, Ala-naftielamied en kaseïen) getoets, het die ensiem 'n definitiewe voorkeur teenoor Leu-p-nitroanilied vertoon. Die pH-optimum was in die omgewing van 8,5.

Die invloed van verskillende buffers en bufferkonsentrasies het bewys dat alle Na-ioonbevattende buffers 'n verhoging in ioonsterkte 'n aktiverende invloed op die ensiem gehad het. Met 'n verhoging in soutkonsentrasie het alle divalente metale die ensiem geïnhibeer en alle monovalente metale ensimatiese hidrolise geaktiveer. Dieselfde afleiding is uit die EDTA-studie gemaak.

Michaeliskonstantes van Lys-p-nitroanilied en Leu-p-nitroanilied is by 'n pH van 8,0 onderskeidelik $2,048 \times 10^{-6} \text{ M}$ en $4,000 \times 10^{-6} \text{ M}$ vasgestel. 'n K_m -waarde van $2,001 \times 10^{-6} \text{ M}$ is met Lys-p-nitroanilied as substraat by 'n pH van 9,0 verkry. Die kompeterende inhibisie van Lys vertoon 'n K_i -waarde van ongeveer $2,6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Die aktiveringsenergie (66,79 kJ), entalpie (64,24 kJ) en entropie ($232,16 \text{ J}/^\circ\text{K}/\text{mol}$) van aktivering is bepaal. 'n Q_{10} -waarde van 2,584 is oor 'n temperatuurgebied van 20° tot 30°C verkry. Die ensiem behou sy volle aktiwiteit na blootstelling van 1 uur aan 'n temperatuur van 40°C .

Tydens die ondersoek van die ensiem met kaseïen en tri-

peptiede as substrate is tot die gevolgtrekking gekom dat die ensiem onder die aminopeptidases sorteer.

BYVOEGSEL 1: SDS-poliakriëlamiedjielelektroforese: Data gebruik vir bepaling van molekulêre massa van aminopeptidase.

Polipeptied	MM	Log MM	Rf*
Monomeer	56 000	4,7482	0,8435
Dimeer	112 000	5,0492	0,5491
Trimeer	168 000	5,2253	0,3846
Tetrameer	224 000	5,3502	0,2361
Pentameer	280 000	5,4472	0,1273
Aminopeptidase	-	-	0,6543

* Gemiddelde van 4 waardes.

MM = molekulêre massa

$$Rf = \frac{\text{Afstand wat proteïen vanaf oorsprong migreer het}}{\text{Afstand wat bromofenolblou vanaf oorsprong migreer het}}$$

FIGUUR 14: Log MM versus Rf*
 $Y = 5,5837 - 0,9804X$

BYVOEGSEL 2: Jelfiltratie met Sephadex G-200: Data gebruik in standaardisering van kolom en karakteriseringstudies van aminopeptidase.

Proteïen	MM	Log MM	$D \times 10^7$	$10^{-6}/D$	$a \times 10^8$	V_e/V_o^*
Sitochroom C	12 500	4,097	13,0	0,77	16,4	2,450
Ribonuklease	13 500	4,130	11,1	0,90	19,2	2,404
Ovalbumien	45 000	4,653	7,8	1,28	27,3	1,850
BSA	67 000	4,826	6,0	1,67	35,5	1,532
ADH	150 000	5,190	4,7	2,13	45,0	1,127
Aminopeptidase	-	-	-	-	-	1,425

* Gemiddelde van 2 waardes

MM = molekulêre massa

D = diffusiekoëffisiënt (cm^2/sek)

a = Stokes radius (cm)

V_e/V_o = eluëringsvolume/uitsluitingsvolume

FIGUUR 15: V_e/V_o versus Log MM

$$Y = 7,419 - 1,2112X$$

FIGUUR 16: V_e/V_o versus $10^{-6}/D$

$$Y = 3,186 - 0,9804X$$

FIGUUR 17: V_e/V_o versus $a \times 10^7$

$$Y = 67,330 - 20,6397X$$

BYVOEGSEL 3: Algemene kinetiese eienskappe (Lys-p-nitroanilied)

A. Bepaling van die Michaeliskonstante van Lys-p-nitroanilied hidrolise by pH 9,0.

s μM	1000/s	v* μmol/min/cm ³	1/v
1,556	643	0,0642	15,58
3,113	321	0,0858	11,65
4,670	214	0,1025	9,76
6,226	161	0,1134	8,82
7,783	128	0,1163	8,60
9,340	107	0,1192	8,39
10,896	92	0,1218	8,21
12,453	80	0,1253	7,98

* Gemiddelde van 3 herhalings

$$Y = 0,0137X + 6,8872$$

B. Bepaling van Michaeliskonstante van Lys-p-nitroanilied hidrolise by pH 8,0.

s μM	1000/s	v* μmol/min/cm ³	1/v
1,556	643	0,0417	24,00
3,113	321	0,0574	17,40
4,670	214	0,0675	14,82
6,226	161	0,0726	13,78

* Gemiddelde van 3 herhalings

$$Y = 0,0213X + 10,3870$$

BYVOEGSEL 4: Algemene kinetiese eienskappe (Leu-p-nitroanilied)

Bepaling van die Michaeliskonstante van Leu-p-nitroanilied
hidrolise by pH 8,0.

s µM	1000/s	v* µmol/min/cm ³	1/v
9,546	105	0,0784	12,76
23,866	42	0,0932	10,74
33,413	30	0,0997	10,03
47,733	21	0,1032	9,69
71,600	14	0,1053	9,49
95,466	10	0,1066	9,38
119,333	8	0,1071	9,34
143,200	7	0,1082	9,24

* Gemiddelde van 3 herhalings

$$Y = 0,003629X + 0,900793$$

BYVOEGSEL 5: Temperatuurstudies met aminopeptidase. Onderzoek is met 3 mM Lys-p-nitroanilied as substraat in 0,02 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0, uitgevoerd.

T °K	100v* μmol/min/cm ³	log 100v	1000/T	E	F
323	47,90	1,68	3,10	2,17	1,614
318	33,10	1,52	3,14	2,02	1,477
313	22,90	1,36	3,19	1,86	1,343
307	13,50	1,13	3,26	1,64	1,161
303	9,77	0,99	3,30	1,51	1,050
298	5,89	0,77	3,36	1,30	0,890
295	4,47	0,65	3,39	1,18	0,801
291	3,09	0,49	3,44	1,03	0,687
286	1,91	0,28	3,50	0,82	0,542

* Gemiddelde van 3 herhalings

$$E = \log(1000v/T)$$

$$F = T \ln(v/T)$$

FIGUUR 26: Log 100v versus 1000/T

$$Y = 3,5803 - 3,487X$$

$$E_a = 3,487 \times 2,303R = 66,79$$

FIGUUR 27: Log(1000v/T) versus 1000/T

$$Y = 12,5634 - 3,375X$$

$$H = 3,375 \times 2,303R = 64,24$$

$$3,375 = \log(R/Nh) + S/2,303R = 223,81$$

FIGUUR 28: T ln(v/T) versus T

$$Y = 28,919X - 7,882$$

$$S = 28,919 \times R = 240,52$$

Gemiddelde S-waarde = 232,16

BYVOEGSEL 6: Inhibisiestudies (Lys). Resultate met Lys-p-nitro=anilied as substraat verkry.

s μM	1/s x 10 ³	v* μmol/min/cm ³	s/v x 10 ³	1/v	i x 10 ⁻² M
3,113	321,2	0,00625	0,4980	159,9743	2,666
"	"	0,01053	0,2957	94,9887	1,333
"	"	0,01666	0,1868	60,0064	0,666
"	"	0,02500	0,1245	39,9936	0,266
6,226	160,6	0,01153	0,5400	86,7302	2,666
"	"	0,01782	0,3494	56,1072	1,333
"	"	0,02659	0,2341	37,6024	0,666
"	"	0,03572	0,1742	27,9926	0,266
9,340	107,1	0,01528	0,6114	65,4578	2,666
"	"	0,02377	0,3930	42,0780	1,333
"	"	0,03225	0,2859	31,0058	0,666
"	"	0,04046	0,2309	24,7160	0,266
"	"	0,04894	0,1908	20,4315	0,133

* Gemiddelde van 3 herhalings

FIGUUR 30: 1/v versus i x 10⁻².

3,113μM substraat: Y = 50,1128X + 27,0367

6,226μM substraat: Y = 24,6636X + 21,8166

9,340μM substraat: Y = 15,8345X + 19,1332

FIGUUR 31: s/v versus i x 10⁻².

3,113μM substraat: Y = 0,1558X + 0,0842

6,226μM substraat: Y = 0,1559X + 0,1358

9,340μM substraat: Y = 0,1626X + 0,1777

FIGUUR 32: 1/v versus 1/s.

2,666 x 10⁻²M produk: Y = 0,4465X + 16,7766

1,333 x 10⁻²M produk: Y = 0,2460X + 16,1313

0,666 x 10⁻²M produk: Y = 0,1365X + 16,1117

0,266 x 10⁻²M produk: Y = 0,0727X + 16,7791

BYVOEGSEL 6: (vervolg)

FIGUUR 33: Km versus $i \times 10^{-2}$

Km μM	i $\times 10^{-2}$
26,612	2,666
15,229	1,333
8,472	0,666
4,333	0,266

$$Y = 0,1076X - 0,2419$$

4. LITERATUUROPGAWE

- ANDREWS, P. (1965). The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J., 96, 595 - 606.
- ANDREWS, P. (1970). Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. In: Methods of biochemical analysis (D. Glick, Red.), John Wiley & Sons, New York; 18, 1 - 53.
- BARMAN, T.E. (1969). Enzyme handbook. Springer-Verlag, New York; Volume II.
- BERNFELD, P. (1955). Amylases alpha and beta. In: Methods in Enzymology (S.P. Colowick en N.O. Kaplan, Red.) Academic Press, New York; I, 149 - 158.
- BREWER, J.M., PESCE, A.J. en ASHWORTH, R.B. (1974). Experimental techniques in biochemistry. Prentice-Hall, London.
- BRITTON, H.T.S. en ROBINSON, R.A. (1931). Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. J. chem. Soc. (1931), 1456 - 1462.
- BURSELL, E. (1970). An introduction to insect physiology. Academic Press, New York.
- CARPENTER, F.H. en VAHL, J.M. (1973). Leucine aminopeptidase (bovine lens). Mechanism of activation by Mg^{++} and Mn^{++} of the zinc metalloenzyme, amino acid composition and sulfhydryl content. J. biol. Chem., 248, 294 - 304.
- CHAPMAN, R.F. (1971). The insects. Structure and function. The English Universities Press, London.
- CHAPUIS, R. en ZUBER, H. (1970). Thermophilic aminopeptidases: AP1 from Talaromyces duponti. In: Methods in Enzymology (G.E. Perlmann en L. Lorand, Red.) Academic Press, New York; XIX, 552 - 555.
- CILLIERS, J.J. de R. (1978). Seisoenvariasie in die aminosuursamestelling van rumenprotosoë. M.Sc.-verhandeling, UOVS, Bloemfontein.

- CORNISH-BOWDEN, A. (1976). Principles of enzyme kinetics.
Butterworth & Co, London.
- DAY, M.F. en WATERHOUSE, D.F. (1953). The mechanism of digestion.
In: Insect Physiology (K.D. Roeder, Red.), John
Wiley & Sons, New York.
- DI JESO, F. (1968). Ammonium sulfate concentration conversion
nomograph for 0°. J. biol. Chem., 248, 2022
- 2023.
- DIXON, M. en WEBB, E.C. (1958). Enzymes. Longmans, Green & Co,
New York.
- DU TOIT, P.J. (1974). Die isolering en bestudering van twee proteo=
litiese ensieme van Agave americana. Ph.D.-
proefskrif, RAU, Johannesburg.
- DU TOIT, P.J. en SCHABORT, J.C. (1978a). An aminopeptidase from
Agave americana, chemical properties of the
enzyme. Phytochemistry 17, 371 - 375.
- DU TOIT, P.J. en SCHABORT, J.C. (1978b). An aminopeptidase from
Agave americana, thermodynamic studies.
Phytochemistry 17, 377 - 380.
- DU TOIT, P.J. en SCHABORT, J.C., KEMPF, P.G. en LAUBSCHER, D.S.A.
(1978). An aminopeptidase from Agave americana,
isolation and physical characterization.
Phytochemistry 17, 365 - 369.
- GABRIEL, O. (1971). Analytical disc gel electrophoresis. In:
Methods in Enzymology (W.B. Jakoby, Red.)
Academic Press, New York, XXII, 565 - 578.
- GILMOUR, D. (1961). The biochemistry of insects. Academic Press,
New York.
- GOMORI, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme
studies. In: Methods in Enzymology (S.P.
Colowick en N.O. Kaplan, Red.) Academic Press,
New York; I, 138 - 146.
- GUTFREUND, H. (1972). Enzymes: Physical principles. John Wiley &
Sons, New York.
- HEWITT, P.H., RETIEF, L.W. en NEL, J.J.C. (1974). Aryl-beta-glyco=
sidase in the heads of workers of the termite,
Trinervitermes trinervoides. Insect Biochem.,
4, 197 - 203.

- HIMMELHOCH, S.R. (1970). Leucine aminopeptidase from swine kidneys. In: Methods in Enzymology (G.E. Perlmann en L. Lorand, Red.) Academic Press, New York; XIX, 508 - 513.
- HONIGBERG, B.M. (1970). Protozoa associated with termites and their role in digestion. In: Biology of Termites (K. Krishna en F.M. Weesner, Red.) Academic Press, New York; II, 1 - 36.
- HOUSE, H.L. (1974). Digestion. In: The Physiology of Insecta (M. Rockstein, Red.) Academic Press, New York; V, 63 - 117.
- LAIDLER, K.J. (1958). The chemical kinetics of enzyme action. Oxford University Press, London.
- LAIDLER, K.J. en BUNTING, P.S. (1973). The chemical kinetics of enzyme action. Oxford University Press, London.
- LAYNE, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Methods in Enzymology (S.P. Colowick en N.O. Kaplan, Red.) Academic Press, New York; III, 447 - 454.
- LEE, H-J., LARUE, J.N. en WILSON, I.B. (1971). A simple spectrophotometric assay for amino acyl arylamidases (naphthylamidases, aminopeptidases). Analyt. Biochem., 41, 397 - 401.
- LIKHTENSHEIN, G.I. (1966). Regularities in the entropy and energy properties of enzymatic processes. Biofizika 11, 24 - 32.
- MARKS, N. en LAJTHA, A. (1970). Brain aminopeptidase hydrolyzing leucylglycylglycine and similar substrates. In: Methods in Enzymology (G.E. Perlman en L. Lorand, Red.) Academic Press, New York; XIX, 534 - 543.
- MELBYE, S.W. en CARPENTER, F.H. (1971). Leucine aminopeptidase (bovine lens): Stability and size of subunits. J. biol. Chem., 246, 2459 - 2463.

- NOIROT, C.H. en NOIROT-TIMOTHEE, C. (1969). The digestive system. In: Biology of Termites (K. Krishna en F.M. Weesner, Red.) Academic Press, New York; I, 49 - 88.
- PFLEIDERER, G. (1970). Particle-bound aminopeptidase from pig kidney. In: Methods in Enzymology (G.E. Perlman en L. Lorand, Red.) Academic Press, New York; XIX, 514 - 521.
- POTTS, R.C. (1971). The properties of cellulase and related enzymes from the harvester termite Trinervitermes trinervoides (Sjöstedt). M.Sc.-verhandeling, UOVS, Bloemfontein.
- POTTS, R.C. en HEWITT, P.H. (1972). Some properties of an aryl-beta-glucosidase from the harvester termite, Trinervitermes trinervoides. Insect Biochem., 2, 400 - 408.
- POTTS, R.C. en HEWITT, P.H. (1973). The distribution of intestinal bacteria and cellulase activity in the harvester termite Trinervitermes trinervoides (Nasutitermitinae). Insectes soc., 20, 215 - 220.
- POTTS, R.C. en HEWITT, P.H. (1974a). The partial purification and some properties of the cellulase from the termite Trinervitermes trinervoides (Nasutitermitinae). Comp. Biochem. Physiol., 47B, 317 - 326.
- POTTS, R.C. en HEWITT, P.H. (1974b). Some properties and reaction characteristics of the partially purified cellulase from the termite Trinervitermes trinervoides (Nasutitermitinae). Comp. Biochem. Physiol., 47B, 327 - 337.
- RETIEF, L.W. en HEWITT, P.H. (1973). Purification and properties of trehalase from the termite, Trinervitermes trinervoides. Insect Biochem., 3, 345 - 351.

- RONCARI, G. en ZUBER, H. (1970). Thermophilic aminopeptidases: AP1 from Bacillus stearothermophilus. In: Methods in Enzymology (G.E. Perlmann en L. Lorand, Red.) Academic Press, New York; XIX, 544-552.
- SMITH, I. en FEINBERG, J.G. (1965). Paper and thin layer chromatography and electrophoresis. Shandon Scientific Company, London.
- SPIEGEL, M.R. (1972). Theory and problems of statistics in SI units. In: Schaum's Outline Series. McGraw Hill, New York.
- SPIES, J.R. (1957). Colorimetric procedures for amino acids. In: Methods in Enzymology (S.P. Colowick en N.O. Kaplan, Red.) Academic Press, New York; III, 467 - 477.
- WIGGLESWORTH, V.V. (1965). The principles of insect physiology. Methuen & Co., London.
- YARON, A. en BERGER, A. (1970). Aminopeptidase-P. In: Methods in Enzymology (G.E. Perlmann en L. Lorand, Red.) Academic Press, New York; XIX, 521 - 534.

