GLUCOSYLTRANSFERASE FROM CASSAVA

(*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)

BY

มี.ค. 2532

PANPAKA CHALERMISRACHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(BIOCHEMISTRY)

IN THE

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

OF

MAHIDOL UNIVERSITY

1988

Copyright by Mahidol University

อภินันทนาการ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

12062

ชื่อวิทยานิพนธ์ กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสจากมันสำปะหลัง

ผู้วิจัย นางสาวพรรณพกา เฉลิมอิสระชัย

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

นายมนตรี จุฬาวัฒนกล

นายภิญโญ พานิชพันธ์

ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์

บทคัดย่อ

กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสที่แยกสกัดจากใบอ่อนของมันสำปะหลัง (Manihot esculenta Crantz) เป็นเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อของอะซิโตนไซยาโนไฮดริน (acetone cyanohydrin) กับกลูโคสในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ลินามาริน (linamarin) กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสจะพบเป็นส่วนน้ำใสหลังการปั่นที่ 100,000 x g เอนไซม์นี้นำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80% แล้วจึงนำมาผ่าน Sephadex G-200 column และ Mono Q HR5/5 column หลังจากผ่านขั้นตอนเหล่านี้พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 6 เท่า กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสที่บริสุทธิ์บางส่วนจะมี UDP-glucose hydrolysis activity บ้างเล็กน้อย และไม่มีลินามาเรสแอคติวิตี้ (linamarase activity) กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสจากมันสำปะหลังมีน้ำหนักโมเลกุล (native molecular weight) ประมาณ 46,000 การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้ประกอบด้วย 5 แถบ (band)เข้ม โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 39,000; 31,000; 25,000 และ 13,000 แอคติวิตี้ของเอนไซม์จะไม่อยู่ตัวโดยแอคติวิตี้จะลดลง 50% เมื่อเก็บเอนไซม์นี้ที่ -20^{o}ซ เป็นเวลา 17 วัน

กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสทำงานได้ดีที่ pH 9 ถึง 10 และที่อุณหภูมิ 37^{o} ซ UDP-glucose เป็นตัวให้น้ำตาลดีที่สุด โดยมีค่า Km 0.04 mM เมื่อใช้อะซิโตนไซยาโนไฮดรินเป็นตัวรับกลูโคส ADP-glucose ไม่สามารถเป็นตัวให้กลูโคสได้ในปฏิกิริยานี้ ในขณะที่ UDP-galactose จะสามารถทำได้ประมาณครึ่งหนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยมหิดล Copyright© by Mahidol University

ของ UDP-glucose จากการทดสอบตัวรับน้ำตาลต่างๆ พบว่า อะซิโตนไซยาโนไฮดริน เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดีกว่าบิวทาโนนไซยาโนไฮดริน (butanone cyanohydrin) แอลกอฮอลต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบพบว่ามีความสามารถในการเป็นตัวรับน้ำตาลได้ไม่ดีเท่ากับอะซิโตนไซยาโนไฮดริน โดยมีลำดับความสามารถดังนี้ ไอโซโพรพานอล > บิวทานอล > เอธานอล > กลีเซอรอล พี-นอลก็ไม่สามารถเป็นตัวรับน้ำตาล

เอนไซม์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์นี้ไม่สามารถในการเร่งปฏิกิริยาการส่งต่อกลูโคสจาก UDP-glucose ไปให้แป้ง ลินาริน และน้ำตาลบางชนิด เช่น กลูโคส กาแล็คโตส และซูโครส แอคติวิตี้ของกลูโคซิลทรานส์เฟอเรสจะพบสูงมากเมื่อมี UDP-glucose เป็นตัวให้น้ำตาล และฟรุคโตสเป็นตัวรับน้ำตาล โดยมีค่า Km 4.4 mM สำหรับฟรุคโตส แอคติวิตี้อาจเกิดจากการปนเปื้อนของ UDPG : D-fructose-glucosyltransferase หรืออาจจะเป็นเพราะกลูโคซิลทรานส์เฟอเรสของมันสำปะหลังมี 2 แอคติวิตี้ โดยแอคติวิตี้แรกใช้ในการสังเคราะห์ลินามาริน และอีกแอคติวิตี้ใช้ในการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Gluosyltransferase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)

Name Miss Panpaka Chalermisrachai

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Mr. Montri Chulavatnatol, Ph.D.

Mr. Bhinyo Panijpan, Ph.D.

M.R. Jisnuson Svasti, Ph.D.

ABSTRACT

A glucosyltransferase which catalyzes the conjugation of acetone cyanohydrin to glucose in the last step of linamarin biosynthesis was isolated from young leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). The glucosyltransferase was found to be a soluble enzyme and was partially purified by 40-80% ammonium sulphate fractionation followed by Sephadex G-200 column and Mono Q HR 5/5 column chromatography. These steps resulted in a purification of 6 folds. The partially purified glucosyltransferase possessed negligible linamarase and little UDP-glucose hydrolysis activity. The native molecular weight of cassava glucosyltransferase was 46,000. The partially purified preparation consisted of five major bands of 13,000; 21,000; 25,000; 31,000 and 39,000 separated by polyaccrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate. The enzyme activity was unstable but could be kept at -20^{o}C for 17 days with 50% loss of the activity.

Copyright by Mahidol University

Catalytically, the partially purified glycosyl transferase showed a pH optimum of 9 to 10 and a temperature optimum of 37°C. The substrate specificities were also analyzed. UDP-glucose was the best sugar donor with a K_M of 0.04 mM which ADP-glucose was not and UDP-galactose was only half as good as UDP-glucose. Among the sugar acceptors tested, acetone cyanohydrin was the best and better than butanone cyanohydrin. Other aliphatic alcohols were poorer sugar acceptors in the following order: isopropanol, butanol, ethanol and glycerol. Phenol was unable to serve as the sugar acceptor for this enzyme.

The enzyme was unable to catalyze the transfer of glucose from UDP-glucose to starch, linamarin or simple sugars i.e. glucose, galactose and sucrose. However, a high glucosyltransferase activity was detected in the presence of UDP-glucose and fructose with a K_m for fructose of 4.4 mM. This activity could be due either to a contaminating UDP-glucose: D-fructose-glucosyltransferase or to cassava glucosyltransferase having two activities, one for linamarin synthesis and the other for sucrose synthesis.

Copyright by Mahidol University