

6 JUL 1994



**EFFECTS OF SOME INHIBITORS ON LINAMARIN BIOSYNTHESIS BY  
CASSAVA PLANTLETS IN TISSUE CULTURE**

**SAIPIN SANGHIRUN**

*๙*

**อภิธาน์นทาการ**

**๑๓๓**

*“มีทุกสิ่งทุกอย่าง” มีชีวิต*

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
(BIOCHEMISTRY)**

**IN  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

1993

26957

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารยับยั้งบางตัวต่อการสังเคราะห์ลินามารินในพืชลำปะหลัง  
ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผู้วิจัย สายพิณ แสงหิรัญ

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

มนตรี จุฬาวัฒนทล, Ph.D.  
ทิพาพร ลิมปเสนีย์, Ph.D.  
พิชิต โตสุโขวงศ์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 17 พฤษภาคม พ.ศ. 2537

### บทคัดย่อ

เพื่อกำจัดความเป็นพิษจากไซยาไนด์ ที่เกิดจากสารไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ที่สะสมอยู่ในพืชลำปะหลังซึ่งส่วนใหญ่ คือ ลินามาริน จึงควรที่จะสร้างมันสำปะหลังสายพันธุ์ใหม่ซึ่งไม่สังเคราะห์สารไซยาโนจินิกกลูโคไซด์ ในการศึกษานี้จะทดสอบว่า เมื่อการสังเคราะห์ลินามารินถูกยับยั้งแล้ว ต้นมันสำปะหลังจะยังคงเจริญเติบโตปกติ โดยใช้พืชลำปะหลังที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารยับยั้งขบวนการสังเคราะห์ลินามารินที่มีประสิทธิภาพจะถูกทดสอบในหลอดทดลองกับเอนไซม์ และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของมันสำปะหลังก่อน แล้วจึงทดสอบกับต้นมันสำปะหลังที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากการทดสอบ พบว่าสารยับยั้งที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับอะซิโตนไซยาโนไฮดริน 5 ตัว สามารถยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิลทรานซเฟอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้อะซิโตนไซยาโนไฮดรินมาสังเคราะห์ลินามาริน ได้อย่างสมบูรณ์ ในการทดลองแบบ pre-incubation และการวิเคราะห์ kinetic พบว่าสารที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายอะซิโตนไซยาโนไฮดริน 3 ตัว ได้แก่ ไอโซบิวไทรัลดีไฮด์ ทูเมทิลบิวไทรัลดีไฮด์ และทูเมทิลทิวทานอล เป็นสารยับยั้งชนิดย้อนกลับได้แบบแข่งขัน ส่วนคลอโรบิวทานอลเป็นสารยับยั้งชนิดย้อนกลับได้เช่นกัน แต่สารนี้ทำให้ค่า  $K_m$  ของอะซิโตนไซยาโนไฮดริน และค่า  $V_{max}$  เพิ่มขึ้น สำหรับไอโซบิวทิลเอมีน เป็นสารยับยั้งแบบไม่ย้อนกลับ ซึ่งสารทั้ง 5 ตัวนี้ให้ค่า  $IC_{50}$  เป็นลำดับดังนี้ 0.0075, 0.20, 1.25, 12.0 และ 26.5 mM เมื่อทดสอบกับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของมันสำปะหลัง โดยใช้กรดอะมิโน  $^{14}C$ -valine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ลินามาริน พบว่าสารที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายอะซิโตนไซยาโนไฮดริน 3 ตัว ได้แก่ คลอโรบิวทานอล, ทูเมทิลบิวไทรัลดีไฮด์ และไอโซบิวทิลเอมีน ยับยั้งการสังเคราะห์ลินามารินได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนไอโซบิวไทรัลดีไฮด์ และทูเมทิลทิวทาน

นอล ยับยั้งการสังเคราะห์ลินามารินได้เพียงบางส่วน ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เป็นลำดับดังนี้ 0.9, 2.1, 2.9, 4.0 และ 14 mM และพบว่าสารยับยั้งเอนไซม์กลุ่มไซโตโครม P<sub>450</sub> ซึ่งเป็นเอนไซม์ในขั้นตอนออกซิเดชันของกรดอะมิโนวาซีนไปเป็นอะซิโตนโซยานไฮดริน 2 ตัวได้แก่ คลอโพรมาซีน และควัมมาริน สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ลินามารินในการทดสอบกับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของม้าน้ำปะหลังนี้ได้เช่นกัน ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เป็น 0.5 และ 1.0 mM ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับต้นม้าน้ำปะหลังที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าทุเมททิลบิวไทรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.35–0.4 mM, คลอโรบิวทานอล ความเข้มข้น 0.5 mM หรือ ควัมมาริน ความเข้มข้น 0.5 mM สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ลินามารินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต ในขณะที่คลอโพรมาซีน ความเข้มข้น 0.2 mM ทำให้ต้นม้าน้ำปะหลังเติบโตช้าและผิดปกติแต่ไม่มีผลต่อระดับลินามาริน ส่วนไอโซบิวไทรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.5–1.0 mM ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการสังเคราะห์ลินามาริน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อการสังเคราะห์ลินามารินถูกยับยั้งที่ม้าน้ำปะหลังยังคงสามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติ

Thesis Title            Effects of Some Inhibitors on Linamarin Biosynthesis by  
                                 Cassava Plantlets in Tissue Culture

Name                     Saipin Sanghirun

Degree                  Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisor Committee

                              Montri Chulavatnatol, Ph.D.  
                              Tipaporn Limpaseni, Ph.D.  
                              Pichit Tosukhowong, Ph.D.

Date of graduation    17 May B.E. 2537 (1994)

### ABSTRACT

Cyanogenic glucosides, mainly linamarin, in cassava cause cyanide toxicity related to cassava consumption. To eliminate this health hazard problem, a new variety free of the cyanogenic glucosides should be produced. In the present study, cassava plantlets in tissue culture were used to test whether the plantlets could grow normally when linamarin biosynthesis is inhibited. To do so, potential inhibitors of enzyme involved in the biosynthesis were first tested *in vitro* using soluble enzyme and tissue slices before final *in vivo* test in the cassava plantlets tissue culture. Five analogs of acetone cyanohydrin were found to completely inhibit the glucosyltransferase which catalyzed linamarin synthesis from acetone cyanohydrin. Pre-incubation experiment and kinetic analysis show that three analogs, isobutyraldehyde, 2-methyl-butyraldehyde and 2-methyl-2-butanol, were competitive and reversible inhibitors. Although chlorobutanol exhibited reversible inhibition in the pre-incubation experiment, it caused an increase in both  $K_m$  and  $V_{max}$  of acetone cyanohydrin. Isobutylamine was an irreversible inhibitor. The  $IC_{50}$  values of these five analogs were

0.0075, 0.02, 1.25, 12.0 and 26.5 mM, respectively. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -valine into linamarin using petiole slices from tissue cultured plantlets was completely inhibited by three analogs, chlorobutanol, 2-methylbutyraldehyde and isobutylamine, and partially inhibited by isobutyraldehyde and 2-methyl-2-butanol. The  $\text{IC}_{50}$  values were 0.9, 2.1, 2.9, 4.0 and 14 mM, respectively. Chlorpromazine and coumarin, two inhibitors of cytochrome  $\text{P}_{450}$  which were involved in the microsomal oxidation of valine into acetone cyanohydrin, also inhibited the radioactive incorporation. Their  $\text{IC}_{50}$  values were 0.5 and 1.0 mM, respectively. By using cassava plantlets in tissue culture, the linamarin synthesis was effectively inhibited while the growth was normal in the presence of 0.35–0.4 mM 2-methylbutyraldehyde, 0.5 mM chlorobutanol or 0.5 mM coumarin. On the contrary, 0.2 mM chlorpromazine caused retardation and abnormality of growth of the cassava plantlets without a significant decrease in the linamarin level while 0.5–1.0 mM isobutyraldehyde affected neither the growth nor the linamarin synthesis. The data suggested that cassava could grow normally when the linamarin synthesis was much suppressed.