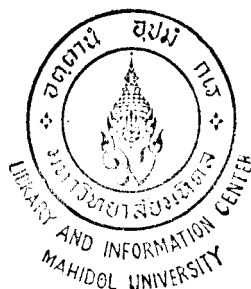


- 3 JUL 2001



**PURIFICATION OF SUCROSE SYNTHASES AND INVERTASE  
FROM CASSAVA LEAVES**

**PHICHAYA KAM-AI**

ศัลย์ภัณฑาคาร

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2001**

**ISBN 974-665-505-1**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

TH  
P.543p  
2001  
C.2

**4036422 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc (BIOCHEMISTRY)**

**KEY WORDS : SUCROSE SYNTHASE, INVERTASE, CASSAVA**

**PHICHAYA KAM-AI : PURIFICATION OF SUCROSE SYNTHASES AND INVERTASE FROM CASSAVA LEAVES. THESIS ADVISOR : MONTRI CHULAVATNATOL, Ph. D., M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D., SUNANTA RATANAPO Ph.D 113 P. ISBN 974-665-505-1**

Sucrose synthases (E.C. 2.4.1.13) and invertases (E.C. 2.4.1.26) are the enzymes which catalyze the breakdown of sucrose in plants. Sucrose synthases degrade sucrose in the presence of UDP to form UDP-glucose and fructose. On the other hand, an invertase hydrolyzes sucrose *in vivo* to glucose and fructose. The products of both enzymes are used in biosynthetic and respiratory pathways. In the present study, a membrane-bound sucrose synthase was extracted from a cassava leaf microsomal membrane by 10% Triton X-100 and it was further purified by 35-70 % ammonium sulfate fractionation. From the soluble crude extract, a soluble sucrose synthase and a soluble invertase were purified by ammonium sulfate fractionation, followed by phenyl Sepharose hydrophobic column chromatography and then Sepharose-6B gel filtration. The membrane-bound sucrose synthase was a polymeric enzyme with a molecular mass of 669 kD, consisting of 9-10 subunits molecular weight of 68 kD. Its  $K_m$  for sucrose was 52.68 mM and its  $K_m$  for UDP was 0.7 mM. It showed an optimum temperature of 55°C and a pH optimum of 6.0. The enzyme catalyzed the linamarin and sucrose synthesis and possessed linamarase and  $\beta$ -glycosidase activities. The soluble sucrose synthase was a polymeric enzyme with a molecular mass of 470 kD, consisting of 9 units molecular weight of 53 kD. It showed an optimum temperature of 50°C and an optimum pH of 5.0. Its  $K_m$  for sucrose was 53 mM whereas its  $K_m$  for UDP was 0.72 mM. The soluble invertase was trimeric with a molecular mass of 158 kD and a subunit molecular weight of 57 kD. Its optimum temperature was 50°C and its pH optimum was found at pH 4.0. Its  $K_m$  for sucrose was 32 mM.

4036422 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

พินิจ คำอ้าย : การทำให้บริสุทธิ์ของซูโครสซินเทสและอินเวอร์เทสจากใบมัน  
สำปะหลัง (PURIFICATION OF SUCROSE SYNTHASES AND INVERTASE FROM CASSAVA LEAVES)  
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : มนตรี จุฬาวัดนทล, Ph.D., ม.ร.ว. ชินอนุสรณ์ สวัสดิวัตน์,  
Ph.D., สุันทนา รัตนกิจ Ph.D. 113 หน้า ISBN 974-665-505-1

ซูโครสซินเทสและอินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยซูโครสในพืชโดยซูโครสซินเทสย่อยซูโครสโดยมี UDP เข้ามาร่วม เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็น UDP-glucose และ Fructose ส่วนอินเวอร์เทสไฮโดรไลซ์ซูโครสได้เป็นกลูโคสและฟรุคโตส ผลผลิตที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้จะถูกนำไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบของพืชรวมทั้งนำไปใช้เป็นพลังงานในการศึกษาครั้งนี้

membrane-bound ซูโครสซินเทส ได้ถูกแยกออกจาก microsome ของใบมันสำปะหลัง โดยใช้ 10% Triton X-100 และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วย 0-35% และ 35-70% ammonium sulfate ในส่วนของ crude soluble เอนไซม์ ซึ่งประกอบไปด้วย soluble sucrose synthase และ soluble invertase ได้ผ่านวิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยขั้นตอนดังนี้ ตกตะกอนด้วย ammonium sulphate ผ่าน column phenyl Sepharose และ Sepharose-6B หลังจากทำให้บริสุทธิ์พบว่า membrane bound sucrose synthase เป็น polymeric enzyme มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 669 kD ประกอบด้วย มี 9-10 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักประมาณ 68 kD และพบว่า membrane-bound sucrose synthase มี  $K_m$  ต่อ ซูโครส 52 mM และต่อ UDP 0.7 mM มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน 55 องศาเซลเซียส มี pH ที่เหมาะสมที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ pH เท่า กับ 6.0 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้สามารถสร้างซูโครสและ linamarin ได้ และ ยังมี activity ของ linamarase และ  $\beta$ -glycosidase ด้วย ในส่วนของ soluble sucrose synthase เป็น polymeric enzyme มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 470 kD ประกอบด้วย 9 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักประมาณ 53 kD มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน 50 องศาเซลเซียส มี pH ที่เหมาะสมที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ pH เท่า กับ 5.0 มี  $K_m$  ต่อ sucrose 53 mM และ  $K_m$  ต่อ UDP 0.72 mM ส่วน soluble invertase เป็น trimeric enzyme มีน้ำหนักโมเลกุลรวม 158 kD ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักประมาณ 57 kD มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน 50 องศาเซลเซียส มี pH ที่เหมาะสมที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ pH เท่า กับ 5.0 และมี  $K_m$  ต่อ sucrose 32 mM