

- 1 JUL 2003



**TRANSGLYCOSYLATION OF ALCOHOLS BY  
CASSAVA LINAMARASE**

**THANAWAT PHONGSAK**

2

With compliments  
of

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  
2003**

**ISBN 974-04-3247-6**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH

T367t

2003

C. 2

Copyright by Mahidol University

**TRANSGLYCOSYLATION OF ALCOHOLS BY CASSAVA LINAMARASE**

THANAWAT PHONGSAK 4236794 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS : M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D., MONTRI  
CHULAVATNATOL, Ph.D.**ABSTRACT**

Cassava Linamarase (EC 3.2.1.21) was used to transfer glucose from p-nitrophenyl- $\beta$ -glucoside to various alcohols to produce alkyl- $\beta$ -glucosides. For the hydrolysis reaction, linamarase has pH optimum of 6.5 and  $K_m$  of 0.5 mM for p-nitrophenyl- $\beta$ -glucoside (PNPGlc). PNPGlc and p-nitrophenyl- $\beta$ -fucoside (PNPFuc) give high activity, while p-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (PNPGal), gentiobiose and cellobiose give less than 3% of PNPGlc activity. For synthesis of methyl- $\beta$ -glycoside, good yields were obtained between pH 4.0-7.0, 30 °C and 40 °C, and using 0.3 U/ml and 1.0 U/ml enzyme. PNPGlc gives a higher yield than PNPFuc as a glycosyl donor, but saturated glucose failed to produce alkyl glucoside under the same conditions. Furthermore, PNPFuc can be used to synthesize 2-methyl-2-propyl fucoside. Time course studies showed that the methyl- $\beta$ -glucoside and 2-methyl-2-propyl- $\beta$ -glucoside synthesized were stable to hydrolysis for at least 10 days and 3 days, respectively. Transglucosylation of other alcohol acceptors was also studied at 30 °C, pH 5.5, for 1 day, with 0.3 U/ml enzyme, using alcohol concentrations that still gave a single phase aqueous system. The optimum concentrations of different alcohol acceptors, namely methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-methyl-1-propanol, 2-butanol and 2-methyl-2-propanol for transglucosylation were 11.1 M, 8.6 M, 5.3 M, 5.3 M, 0.9 M, 0.9 M, 2.2 M and 5.3 M, respectively. Yields of alkyl glucoside exceeded 90% with all 8 alcohols, indicating that cassava linamarase has a very high capability for catalyzing glucose transfer reactions. Cassava linamarase shows decreasing transglucosylation yields in synthesis of primary, secondary and tertiary glucosides, respectively. In particular, the 94% yield of 2-methyl-2-propyl- $\beta$ -glucoside was exceptional, since no other enzyme has been found to give good yields for transfer of glucose to tertiary alcohols. The 2-butyl- $\beta$ -glucoside and 2-methyl-2-propyl- $\beta$ -glucoside obtained were further purified by Sephadex LH-20 and their structure was confirmed by NMR spectroscopy.

**KEY WORDS** : TRANSGLYCOSYLATION / CASSAVA LINAMARASE /  
SHORT CHAIN ALCOHOL /  $\beta$ -GLUCOSIDASE / ALKYL  
GLUCOSIDE

การโยกย้ายหมู่น้ำตาลสู่สารจำพวกอัลกอฮอล์โดยเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง  
(TRANSGLYCOSYLATION OF ALCOHOL BY CASSAVA LINAMARASE)

ธนวัฒน์ พงษ์ศักดิ์ 4236794 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี) สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ม.ร.ว. ชัยฉูธรรม สวัสดิวัตน์, Ph.D., มนตรี จุฬาวรรณทล,  
Ph.D.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังสามารถผลิตสารอัลคิล-เบต้า-กลูโคไซด์ โดยการโยกย้ายหมู่น้ำตาลสู่อัลกอฮอล์ได้ ในการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลของเอนไซม์ลินามาเรสพบว่ามีค่าพีเอชสูงสุดเท่ากับ 6.5 และมีค่า  $K_m$  สำหรับ p-nitrophenyl- $\beta$ -glucoside (PNPGlc) เท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้เอนไซม์สามารถย่อย PNPGlc และ p-nitrophenyl- $\beta$ -fucoside (PNPFuc) ได้ดีกว่า p-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (PNPGal), gentiobiose และ cellobiose ซึ่งมีแอกทิวิตีต่ำกว่า 3% ของ PNPGlc ในการสังเคราะห์ methyl- $\beta$ -glycoside พบว่าที่สภาวะพีเอช ระหว่าง 4.0-7.0, 30 °C และ 40 °C, และ 0.3 U/ml และ 1.0 U/ml จะได้ผลผลิตดี เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็น PNPGlc จะให้ผลผลิตมากกว่า PNPFuc แต่เมื่อใช้กลูโคสอิมิตัว ไม่สามารถเกิดการสังเคราะห์ได้ที่สภาวะเดียวกัน นอกจากนี้สารตั้งต้น PNPFuc ยังสามารถใช้สังเคราะห์ฟิวโคไซด์ ชนิด ตติยภูมิได้ การศึกษาช่วงเวลาพบว่า methyl- $\beta$ -glucoside และ 2-methyl-2-propyl- $\beta$ -glucoside สามารถคงอยู่ได้นาน 10 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ ในการโยกย้ายกลูโคสสู่อัลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ที่ไม่แยกชั้นของสารละลายน้ำ ในสภาวะ 30 °C, พีเอช 5.5, 0.3 U/ml และ 1 วัน, ความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตสูงสุดของ methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-methyl-1-propanol, 2-butanol and 2-methyl-2-propanol เท่ากับ 11.1, 8.6, 5.3, 5.3, 0.9, 0.9, 2.2 และ 5.3 โมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์ลินามาเรสมีความสามารถในการโยกย้ายกลูโคสสู่ อัลกอฮอล์ ทั้ง 8 ชนิด เพื่อผลิตอัลคิลกลูโคไซด์ได้สูงกว่า 90% และเมื่อเปรียบเทียบกับ เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจาก อัลมอนต์ และ พะยูง พบว่าเอนไซม์จากมันสำปะหลัง สังเคราะห์ผลผลิตได้ดีที่สุด สำหรับการสังเคราะห์ กลูโคไซด์ ชนิด ปฐมภูมิ, ทติยภูมิ และตติยภูมิ ยิ่งกว่านั้น 2-methyl-2-propyl-glucoside ที่เป็นอัลกอฮอล์ตติยภูมิ สามารถสังเคราะห์ได้ 94% ซึ่งยังไม่มีเอนไซม์ตัวอื่นสังเคราะห์ได้ผลผลิตสูงเท่านี้มาก่อน สำหรับการสังเคราะห์ 2-butyl- $\beta$ -glucoside และ 2-methyl-2-propyl- $\beta$ -glucoside ทำให้บริสุทธิ์โดย Sephadex LH-20 และยืนยันโครงสร้างโดยเทคนิค NMR