ชื่อ-สกุล ผู้อธิบายงานวิจัย ฐิติมา เกศกนกวงศ์

☐นาย ■น.ส. ☐นาง ☐ดร. ☐อ. ☐ผศ. ☐รศ. ☐ศ.

ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 กท 10400 โทร. 2460063 ต่อ 4311

สาขาวิชา:
☐ กายภาพ ■ ชีวภาพ
☐ แพทย์ ☐ ทรัพย์-แวดล้อม
☐ เกษตร ☐ วิศวะ-เทคโนฯ
☐ วิทย์-ศึกษา ☐ ทั่วไป

PURIFICATION OF CASSAVA GLUCOSYLTRANSFERASE

Thitima Keskanokwong and Montri Chulavatnatol
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University. Rama 6 Rd.. Bangkok 10400

Linamarin is the predominant cyanogenic glucoside in cassava, can accumulate to concentration as high as 500 mg kg^{-1} fresh weight in roots and to higher level in leaves. Biosynthesis of linamarin requires an amino acid precursor. valine and microsomal P450-dependent oxidative enzyme system to fonn cyanohydrin or hydroxynytrile. At pH 5 and above, cyanohydrin can undergo autohydrolysis to yield ketone and cyanide. At pH below 5, hydroxynitrile 1yase is needed to catalyze the hydrolysis. To avoid the hydrolysis, a glucosyltransferase catalyzes the conjugation of glucose from UDP-glucose to hydroxynitrile in the last step.oflinamarin biosynthesis. This enzyme has not been well studied because it is unstable and the method for assay activity is no t sensitive enough. This study attempted to purify the enzyme from cassava and develop a new sensitive assay method. From the extraction of shoot tips of cassava *(Manihot esculenta* Crantz.). the glucosyltransferase was found to be a soluble enzyme which does not sediment at 100,000g. The enzyme was purified 71-fold by 40-80% ammonium sulfae fractionation and chromatography on Sephacryl S-100 and Q-Sepharose columns. This glucosyltransferase has a native molecular weight of about 57,000 Da. To increase stability of enzyme during the experiment, a purified enzyme was stored at -20°C in 50 mM potassium phosphate buffer pH 8.0 containing of 5 mM DTT and 50% glycerol.

การทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสในมันสำปะหลัง

ฐิติมา เกศกนกวงศ์ และมนตรี จุฬาวัฒนทล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กท 10400

ลินามารินเป็นสารประกอบไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ที่สะสมในหัวมันสำปะหลังปริมาณสูงถึง 500 มก.ต่อน้ำหนักสด 1 กก.และในใบจะสะสมปริมาณที่สูงกว่า การสังเคราะห์ลินามารินเริ่มต้นด้วยกรดอะมิโนวาลีนทำปฏิกิริยากับ microsomal P_{450} oxidative enzyme เพื่อสร้างอะซิโดนไซยาโนไฮดริน ที่ pH 5 หรือสูงกว่าอะซิโดนไซยาโนไฮดรินจะเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสได้เอง แต่ที่ pH ต่ำกว่า 5 ไฮดรอกซีไนไตรล์ไลเอสจะเร่งกระบวนการไฮโดรไลซิส เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดไฮโดรไลซิสเอ็นไซม์กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อของกลูโคสกับอะซิโดนไซยาโนไฮดรินในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ลินามาริน เนื่องจากเอ็นไซม์ไม่อยู่ตัวและวิธีทดสอบแอคติวิตี้ไม่ไวเพียงพอจึงทำให้การศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์ตัวนี้มีไม่มากนัก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงพยายามทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์ขึ้นรวมถึงพัฒนาเทคนิคใหม่ที่ว่องไวและง่ายขึ้น กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสถูกแยกสกัดจากยอดใบของมันสำปะหลังโดยจะพบในส่วนที่เป็นน้ำใสหลังการปั่นที่ 100,000 x g หลังจากนั้นทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80% แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ Sephacryl S -100 และ Q-Sepharose หลังจากผ่านขั้นตอนเหล่านี้พบว่าเอ็นไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 71 เท่า กลูโคซิลทรานส์เฟอเรสจากมันสำปะหลังมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57,000 ดาลตัน ระหว่างการทดลองเพื่อเพิ่มความอยู่ตัวของเอนไซม์จึงเก็บที่ –20°C ใน 50 mM potassium phosphate buffer pH 8 โดยเติม 5 mM DTT และ 50% กลีเซอรอล

INDEX KEY WORDS:
glucosyltransferase, linamarin , cassava

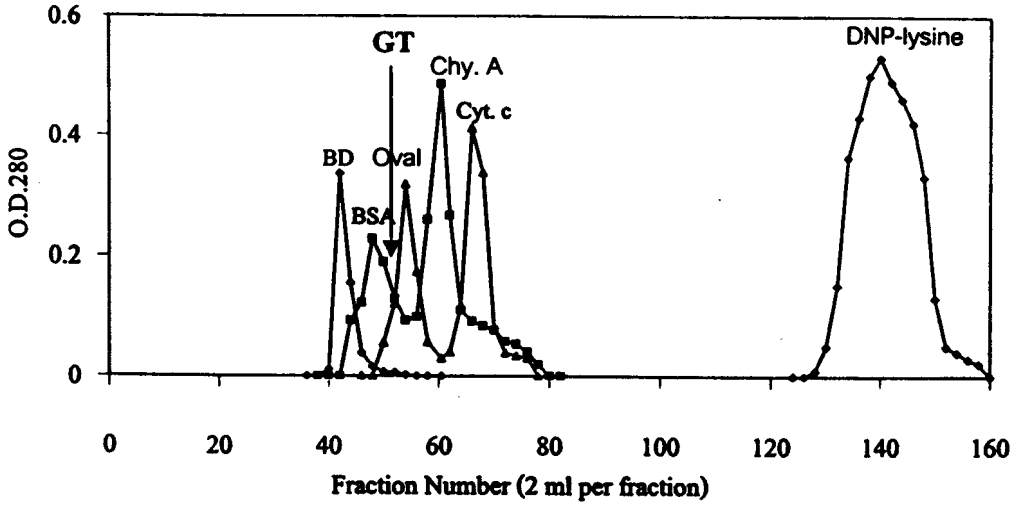

Fig 1. Chromatography on a Sephacryl S-100 column (61.5x2.5 cm.) of protein standard markers

BD = Blue dextran
Chy. A = Chymotrypsinogen A , Mr = 25,000
BSA = Bovine serum albumin, Mr = 67,000
Cyt. C = Cytochrome C , Mr = 12,500
Oval = Ovalbumin, Mr = 43,000
DNP-lysine = Dinitrophenyl-lysine
GT = Cassava glucosyltransferase, Mr = 57,000

Table 1. Purification of glucosyltransferase from shoot tips of cassava

Purification step	Total protein (mg)	Protein (mg)	Activity (µmole/h)	Specific activity (µmole/h/mg)	Fold	Yield (%)
Crude extract	345	3	3.03	1.01	1	100
40-80%$(NH_4)_2SO_4$	113.3	11.33	74.25	7.42	7	32.84
Sephacryl S-100	23.04	0.83	15.50	18.67	18	6.68
Q-Sepharose	8.84	0.75	53.75	71.67	71	2.56

เอกสารอ้างอิง

Mederacke, H., Biehl, B. and Selmar, D. (1996) *Phytochemistry* 42,1517-22.