เอนไซม์สร้างโซ่กิ่งของแป้งจากหัวมันสำปะหลัง *Manihot esculenta* CRANTZ

นาย นพดล อรุณรุ่งสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-499-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19053071

STARCH BRANCHING ENZYME FROM CASSAVA *Manihot esculenta* CRANTZ TUBERS

Mr Nopphadol Aroonrungsawasdi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-334-499-3

Thesis Title	Starch branching enzyme from cassava *Manihot esculenta* Crantz tubers
By	Mr. Nopphadol Aroonrungsawasdi
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Montri Chulavatnatol, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Professor Montri Chulavatnatol, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)

นพดล อรุณรุ่งสวัสดิ์ : เอนไซม์สร้างโซ่กิ่งของแป้งจากหัวมันสำปะหลัง *Manihot esculenta* Crantz. (Starch branching enzyme from cassava M*anihot esculenta* Crantz tubers) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์, อ.ที่ปรึกษา-ร่วม : ศ. ดร. มนตรี จุฬาวัฒนทล, 83 หน้า. ISBN 974-334-499-3.

ในการตรวจหาเอนไซม์สร้างโซ่กิ่งของแป้ง (SBE, starch branching enzyme, EC 2.4.1.18) ในหัวมันสำปะหลัง M*anihot esculenta* Crantz พบเอนไซม์นี้ในส่วนของ parenchyma เมื่อนำมาทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย polyethyleneglycol (PEG) ที่ความเข้มข้น 10% และ คอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออนคือ DEAE-cellulose กับ Q-Sepharose ตามด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 สามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ 148.5 เท่า เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยอิเลคโตรโฟเรซิสในสภาวะเสียสภาพ พบว่ามีค่าเท่ากับ 80 กิโลดาลตัน แต่น้ำหนักโมเลกุลของ SBE จาก Sephadex G-200 คอลัมน์ มีค่าเท่ากับ 160 กิโลดาลตัน แสดงว่าเอนไซม์มีโครงสร้างประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน ในการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่า มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 37°C เอนไซม์มีค่า pI เท่ากับ 5.4 และเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เพิ่มขึ้นเป็น 5.7 , 2.4 , 2.0 และ 1.9 เท่า เมื่อเติมสารละลายแป้งไกลโคเจน อะไมโลเพคติน หรือ เดกซ์ตริน ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปในส่วนผสมของปฏิกิริยา ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 45 °C และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์เป็นเวลานานคือ -20 °C ซึ่งเก็บได้นานถึง 4 สัปดาห์ โดยมีแอคติวิตี้เหลือ 50 %

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... **ลายมือชื่อนิสิต**.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**.....

ปีการศึกษา.....2542..... **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม**.....

4072281023 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : STARCH BRANCHING ENZYME / CASSAVA / *Manihot esculenta* / TUBER

NOPPHADOL AROONRUNGSAWASDI : STARCH BRANCHING ENZYME FROM CASSAVA *Manihot esculenta* Crantz TUBERS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. TIPAPORN LIMPASENI, Ph.D. THESIS COADVISOR : PROF. MONTRI CHULAVATNATOL, Ph.D. 83 pp. ISBN 974-334-499-3.

Starch branching enzyme (SBE, EC 2.4.1.18) from cassava *Manihot esculenta* Crantz tubers was found in the parenchymal tissue. It was purified by precipitation with 10 % polyethyleneglycol (PEG) followed by column chromatography on DEAE-cellulose, Q-Sepharose and Sephadex G-200, respectively. SBE was purified up to 148.5 folds with 2.0 % yield. The molecular weights of the enzyme determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was 80 kD and the molecular weight by Sephadex G-200 column was 160 kD, indicating the enzyme may contain 2 identical subunits. The optimum pH of the enzyme activity was 7.0, optimum temperature was 37°C and its pI was 5.4. Moreover, enzyme activity increased by 5.7, 2.4, 2.0 and 1.9 folds when 1.0 mg/ml solution of starch, glycogen, amylopectin or dextrin were presence in the reaction mixture respectively. The enzyme was found to be stable up to 45°C. At -20°C 50 % activity was retained at 4 week storage.

ภาควิชา.....Biochemistry..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....Biochemistry..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....1999..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, and co-advisor Professor Montri Chulavatnatol for their excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without their kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Associate Professor Piamsook Pongsawasdi and Assistant Professor Suganya Soontaros for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

A Grant to Professor Montri Chulavatnatol from the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and Graduate School of Chulalongkorn University supported this research.

I am grateful to the Christian College for granting my study leave.

My appreciation is also expressed to Miss Thidarat Eksitthikul, Mr Thakorn Sornwatana and Mr Worapong Hirunyapisarnsakul for their friendships and their comments.

Sincere thanks are extended to all staff members and friends of the Department Biochemistry and Biotechnology Program, Faculty of science Chulalongkorn University and members of B303 at Department of Biochemistry, Faculty of science Mahidol University for their assistance and their friendship.

The greatest gratitude is expressed to Miss Pranom Panchaphattanasiri for her unlimited love, understanding and care during my study in Chulalongkorn University.

Finally, I wish to express my deepest gratitude to my family for their understanding and encouragement.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURES.....xi

ABBREVIATIONS xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION

1.1 Cassava.....1

1.2 Starch components.....3

1.3 Biosynthesis of starch.....8

1.4 Starch branching enzyme (SBE).....12

1.5 Aim of thesis.....19

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material 20

2.2 Equipment.....20

2.3 Chemicals.....21

2.4 Purification of the cassava SBE

2.4.1 Preparation of crude enzyme.....22

2.4.2 Precipitation with polyethyleneglycol 22

2.4.3 DEAE-cellulose chromatography.....22

2.4.4 Q-Sepharose chromatography.....23

2.4.5 Chromatography on Sephadex G-200 column.....23

2.5 Protein determination.....24

Page

2.6 Assay of starch branching enzyme 27
2.7 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)
2.7.1 Non-denaturing Starch-PAGE 27
2.7.2 SDS-PAGE.....29
2.8 Effect of pH on SBE activity.....29
2.9 Effect of temperature on SBE activity 29
2.10 Temperature stability.....30
2.11 Isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis (IEF).....30
2.12 Effect of glycans on the cassava SBE activity 31
2.13 Effect of glycans on precipitation of SBE reaction products.....31

III RESULTS

3.1 Purification of SBE from Cassava Tuber
3.1.1 Preparation of crude enzyme.....33
3.1.2 Precipitation with polyethyleneglycol 33
3.1.3 DEAE-cellulose chromatography.....33
3.1.4 Q-Sepharose chromatography.....36
3.1.5 Sephadex G-200 column chromatography.....38
3.1.6 Monitoring of SBE purification.....40
3.2 Characterization of cassava SBE
3.2.1 Molecular weight determination 44
3.2.2 Effect of pH on SBE activity.....47
3.2.3 Effect of temperature on SBE activity 47
3.2.4 Temperature stability.....47
3.2.5 Isoelectric point (pI).....52

Page

3.2.6 Effect of glycans on the cassava SBE activity.....52
3.2.7 Effect of glycans on precipitation of SBE reaction products.....52

IV DISCUSSION

4.1 Assay method for SBE.....57
4.2 Purification of SBE.....58
4.3 Characterization of SBE.....60
4.4 Further study of cassava SBE.....66

V CONCLUSIONS.....67

REFERENCES.....68
APPENDICES.....73
APPENDIX A.....74
APPENDIX B.....79
APPENDIX C.....81
APPENDIX D.....82
BIBLIOGRAPHY.....83

LIST OF TABLES

Table **Page**

1.1 A typical cassava root analysis.....3
1.2 Properties of the amylose and amylopectin components of starch.....6
1.3 Percent of amylose and amylopectin in reserve plant starch.....7
3.1 Purification of starch branching enzyme from cassava tubers.....40
3.2 Effects of some Glycans on cassava SBE activity.....55
3.3 Assay of cassava SBE activity using different carbohydrates as carrier for product precipitation.....56
4.1 Effects of different Glycans on phosphorylase a and SBE activity.....62
4.2 Comparative properties of starch branching enzymes from various starch reserve plants.....65

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1.1 Cassava tree and its underground tuberous roots.....2

1.2 Structures of amylose and amylopectin

(a) Amylose, showing the mode of linkage of the chain

(b) Amylopectin, showing the branching point

(c) The conformation of the chain in amylose

(d) The branched structure of the amylopectin and glycogen type of molecule.....5

1.3 Photomicrograph of starch granules from scanning electron microscope.....10

1.4 Biosynthetic pathway of starch.....11

1.5 Precipitation curves of proteins in potato juice with polyethyleneglycol 16

1.6 Relative sizes, starch and amylose compositions of the mature endosperms of various genotypes of maize.....18

2.1 Cassava whole tuber and its tissue, cortex and parenchyma.....25

2.2 Flowchart of purification process of cassava SBE.....26

2.3 Flowchart of cassava SBE assay.....28

3.1 Elution profile of cassava SBE from DEAE-cellulose column.....35

3.2 Elution profile of cassava SBE from Q-Sepharose column.....37

3.3 Elution profile of cassava SBE from Sephadex G-200 column.....39

3.4 Staining of cassava SBE activity on Non-denaturing starch-polyacrylamide gel electrophoresis.....42

Page

3.5 SDS-PAGE pattern of cassava SBE.....43
3.6 Calibration curve of molecular weight markers from Sephadex G-200 column.....45
3.7 Calibration curve of relative molecular weight markers on SDS-PAGE.....46
3.8 Effect of pH on cassava SBE activity.....48
3.9 Effect of temperature on cassava SBE activity.....49
3.10 Temperature stability of cassava SBE 50
3.11 Storage temperature of cassava SBE.....51
3.12 Polyacrylamide isoelectrofocusing of cassava SBE.....53
3.13 Calibration curve of standard pI markers.....54
4.1 Assay of SBE activity.....63

ABBREVIATION

A	absorbance
BSA	bovine serum albumin
CD	cyclodextrin
cm	centimeter
^{o}C	degree Celsius
DEAE-	diethylaminoethyl-
g	gravitational force
IEF	isoelectrofocusing
µl	microlitre
mA	milliampere
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
M	molar
Mr	relative molecular weight
PEG	polyethyleneglycol
SBE	starch branching enzyme
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SS	starch synthase
TEMED	tetramethylethylenediamine