

การศึกษาเอนไซม์เจอร์รานิลเจอร์รานีโอล-18-ไฮดรอกซิลเลส

ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ

เปลาโนทอลในเปล้าน้อย

นางสาว พิมพ์พิมล ต้นสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชเวช

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-495-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20503296

**STUDY ON THE ENZYME GERANYLGERANIOL-18-HYDROXYLASE
IN THE BIOSYNTHESIS OF PLAUNOTOL IN
CROTON SUBLYRATUS KURZ.**

Miss Pimpimon Tansakul

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Pharmacy**

Department of Pharmacognosy

Graduate School

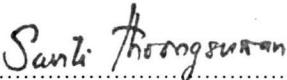
Chulalongkorn University

1996


ISBN 974-633-495-6

Thesis Title Study on the Enzyme Geranylgeraniol-18-Hydroxylase in
the Biosynthesis of Plaunotol in *Croton sublyratus* Kurz.
By Ms. Pimpimon Tansakul
Department Pharmacognosy
Thesis Advisor Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the requirements for the Master's Degree



..... Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee


..... Chairman
(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, M.Sc.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, Ph.D.)




..... Member
(Mr. Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

พิมพ์พิมพ์มิล ดันสกุล : การศึกษาเอนไซม์เจอร์รานิลเจอร์รานีโอล-18-ไฮดรอกซิลเลส ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของเปลาโนทอลในเปล้าน้อย (STUDY ON THE ENZYME GERANYL GERANIOL-18-HYDROXYLASE IN THE BIOSYNTHESIS OF PLAUNOTOL IN *CROTON SUBLYRATUS* KURZ.) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล. 80 หน้า.
ISBN 975-633-495-6.

จากการศึกษาเอนไซม์แอคติวิตีของเอนไซม์เจอร์รานิลเจอร์รานีโอล-18-ไฮดรอกซิลเลส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิลเลชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 18 ของเจอร์รานิลเจอร์รานีโอล ไปเป็นเปลาโนทอล พบว่าเอนไซม์นี้อยู่ในไมโครโซมที่เตรียมจากใบเปล้าน้อย และเกี่ยวข้องกับขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของเปลาโนทอลซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์รักษาโรคกระเพาะอาหาร ที่พบสะสมในต้นเปล้าน้อย. เมื่อใช้เจอร์รานิลเจอร์รานีโอลเป็นสารตั้งต้นในการศึกษา และใช้เครื่องที่แอลซีเดนซิโตเมเตอร์ ในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์นี้อยู่ในชั้น 20,000 g ของไมโครโซม การเกิดเปลาโนทอลในปฏิกิริยา มีความสัมพันธ์กับเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีน การทำงานของเอนไซม์เจอร์รานิลเจอร์รานีโอล-18-ไฮดรอกซิลเลส จะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมโคแฟกเตอร์ คือ เอ็นเอดีพีเอช หรือการต้ม 20,000 g ไมโครโซม ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.0 ลักษณะทางกายภาพของ 20,000 g ไมโครโซมที่คาดว่าเอนไซม์เกาะอยู่ เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีลักษณะเป็นอนุภาคที่มีขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วง 20-60 นาโนเมตร การศึกษานี้เป็นการรายงานการพบเอนไซม์นี้เป็นครั้งแรก ซึ่งสามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้เอนไซม์นี้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ต่อไป

ภาควิชา เกษศาสตร์
สาขาวิชา เกษศาสตร์
ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C675430 : MAJOR PHARMACOGNOSY

KEY WORD: *CROTON SUBLYRATUS* KURZ./ GERANYLGERANIOL-18-HYDROXYLASE /
PLAUNOTOL / BIOSYNTHESIS

PIMPIMON TANSAKUL : STUDY ON THE ENZYME GERANYLGERANIOL-18-
HYDROXYLASE IN THE BIOSYNTHESIS OF PLAUNOTOL IN *CROTON SUBLYRSTUS*
KURZ. THESIS ADVISER : ASSO. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL. PhD. 80 pp.
ISBN 974-633-495-6

The activity of geranylgeraniol-18-hydroxylase, the enzyme catalyzes the C-18 hydroxylation of geranylgeraniol to plaunotol was discovered in the microsomal fraction prepared from *Croton sublyratus* Kurz. leaves. This enzyme potentially involved in the final step of the biosynthesis of plaunotol, an antiulcerative constituent accumulated in this plant. Using geranylgeraniol as substrate and TLC-densitometer as enzymatic activity detector, the activity of geranylgeraniol-18-hydroxylase was found in the 20,000 g microsomal fraction. The formation of plaunotol was correlated with both incubation time and the amount of microsomal protein. The enzyme activity could be increased by adding NADPH or boiling the microsomal fraction. The pH optimum for the enzyme activity was 5.0. Observation of the microsomal fraction under electron microscope revealed the presence of particles with the diameter range between 20 nm to 60 nm. The discovery of this new enzyme activity has led to a possibility of using the enzyme for biotechnological application.

ภาควิชา..... เกษตรศาสตร์

สาขาวิชา..... เกษตรศาสตร์

ปีการศึกษา..... 2538.

ลายมือชื่อผู้คิด..... Pimpimon T.

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... Wanchai De-Eknamkul

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... -

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express the sincere gratitude to her advisor, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his invaluable advice, guidance and encouragement given throughout the course of this work.

The author is also very grateful to the thesis committee, Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Dr. Khanit Suwanborirux of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart of Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for the completion of this thesis.

The author wishes to express her thank to

Tissue Culture Unit and R&D Unit for Herbs and Spices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing laboratory facilities during the course of this work.

The Graduate School of Chulalongkorn University for granting partial financial support (9,900 Baht).

Finally, the author wish to express her infinite gratitude to her family for their love, understanding and encouragement.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II HISTORICAL.....	6
1. Botanical Aspects of <i>Croton</i> Genus.....	6
2. <i>Croton sublyratus</i> Kurz.....	9
2.1 Botanical Aspects of <i>C. sublyratus</i>	9
2.2 The Uses of <i>C. sublyratus</i>	10
2.3 Chemical Constituents of <i>C. sublyratus</i>	11
3. Plaunotol	14
3.1 Structure and Chemical Properties.....	14
3.2 Extraction, Isolation and Purification of Plaunotol from <i>C. sublyratus</i> leaves.....	15
3.3 Detection and Determination of Plaunotol.....	17
3.4 Plaunotol Content in <i>C. sublyratus</i> leaves.....	19
3.5 Synthesis of Plaunotol.....	19
3.6 Biological Activities of Plaunotol.....	24
3.7 Plaunotol Production in Cell Cultures.....	25
4. Biosynthesis Pathway of Diterpenes.....	26
5. Hydroxylation in Plants.....	29

III MATERIALS AND METHODS.....	33
1. Chemicals and Equipment.....	34
2. Plant Materials.....	35
3. Preparation of Crude Enzyme Extracts and Microsomal Fractions from the Leaves of <i>C. sublyratus</i>	35
4. Detection of Activity by Using Radioactively Labelled Substrate.....	35
5. Enzyme Assay for Geranylgeraniol- 18-Hydroxylase.....	36
6. Protein Determination.....	37
7. Preparation and Identification of Enzymatic Product.....	37
8. The Study on Boiling Microsomal Fraction.....	38
9. The Study on pH Optimum of Enzyme Activity....	39
10. The Study on the Enzyme Specificity towards Shorter-Length Substrates.....	39
11. Effect of Cofactor on Enzyme Activity.....	39
12. Electron Micrograph of Boiled Microsomal Fraction.....	39
IV RESULTS.....	41
1. Detection of Enzyme Activity of Geranylgeraniol-18-Hydroxylase.....	41
2. Detection of Enzyme Activity of Differential Pellets of <i>C. sublyratus</i> Kurz. Leaves.....	41
3. Time-Course of the Conversion of [1- ³ H] Geranylgeranyl pyrophosphate to Putative Plaunotol.....	43

4. Enzyme Assay for Geranylgeraniol- 18-Hydroxylase Activity.....	46
5. Time Course of the Conversion of Geranylgeraniol to Putative Plaunotol.....	46
6. Relationship Between the Amount of Microsomal Protein and the Enzyme Activity.....	51
7. Identification of Enzymatic Reaction Product.....	51
8. Effect of Microsomal Boiling on the Enzyme Activity.....	58
9. Effect of pH on Enzyme Activity.....	58
10. Effect of Cofactor on Enzyme Activity.....	58
11. The Enzyme Specificity towards Shorter Length Substrate.....	63
12. Electron Micrograph of the Microsome- Containing Geranylgeraniol-18- Hydroxylase Activity.....	63
V DISCUSSION.....	67
1. Detection of Enzyme Activity in Leaf Cell-Free Extracts.....	67
2. Identification of the Enzymatic Reaction Product.....	69
3. Enzyme Assay and Characterization of the Partially Purified Enzyme.....	70
4. Electron Microscope Observation of the Active Enzyme Function.....	73
VI CONCLUSION.....	74
REFERENCES.....	75
VITA.....	80

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1.	<i>Croton</i> spp. found in Thailand.....	6
2.	Chemical constituents found in <i>C. sublyratus</i>	11
3.	Effect of cofactor on enzyme activity.....	62
4.	Enzyme activity and protein content in each fraction.....	65

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1 <i>Croton sublyratus</i> Kurz. (Euphorbiaceae).....	2
2 The chemical structure of plaunotol.....	3
3 Proposed biosynthesis of plaunotol in <i>C. sublyratus</i> Kurz.....	14
4 Extraction and isolation of plaunotol from <i>C. sublyratus</i> stems	16
5 Synthesis of plaunotol by application of the method	21
6 Synthesis of plaunotol by the stereoselective direct Wittig olefination	22
7 Synthesis of plaunotol by application of Horner-Emmons reaction	23
8 Biosynthesis of isopentenyl diphosphate.....	27
9 Biosynthesis of geranylgeranyl diphosphate.....	28
10 Representation of the catalytic cycle for Cytochrome P-450.....	32
11 TLC-radiodetection of enzyme activities converting geranylgeranyl pyrophosphate (GGOPP) to geranylgeraniol (GGOH) and plaunotol	42
12 TLC-radiodetection of reaction mixture containing GGOPP	44
13 Time-course study of the conversion of [1- ³ H] GGOPP to GGOH and plaunotol by a crude enzyme extract of <i>Croton sublyratus</i> leaves.....	45
14 A typical TLC-chromatogram of the reaction mixture separated by TLC and scanned by TLC scanner.....	47
15 Standard curve of authentic plaunotol.....	48

16 (A) TLC patterns of the reaction mixtures of difference incubation times (B) TLC chromatograms obtain from the scanning on TLC plates (C) The graph showed the formation of putative plaunotol.....	49
17 The formation of putative plaunotol during 3- hr incubation..	50
18 Effect of the amount of microsomal protein on the conversion of geranylgeraniol to plaunotol.....	52
19 UV-absorption of standard plaunotol and enzymatic product.....	53
20 GC chromatogram of standard plaunotol and isolated product from enzymatic reaction.....	54
21 CIMS of standard plaunotol and the isolated product from enzymatic reaction.....	55
22 CI mass fragmentation of plaunotol.....	56
23 IR spectra of standard plaunotol and isolated product from enzymatic reaction.....	57
24 Comparison between the boiled and unboiled microsomal fractions on the conversion of geranylgeraniol to plaunotol.....	59
25 (A) TLC pattern patterns of the reaction mixture of difference boiling times (B) TLC chromatograms obtained from the scanning on TLC plates (C) The graph showed the formation of putative plaunotol from different boiling time.....	60
26 Effect of pH on the 20,000 g microsomal activity in the conversion of geranylgeraniol to plaunotol.....	61

27 Effect of cofactor on microsomal activity.....	62
28 (A) TLC pattern and (B) TLC chromatograms of the reaction mixture containing shorter-length substrates.....	64
29 Electron micrographs of the boiled microsomal fraction.....	66
30 Structure and mechanism of NADH and NADPH.....	72

ABBREVIATIONS

Abs	= absorbance
BSA	= bovine serum albumin
°C	= degree celsius
Ci	= curie
CIMS	= chemical impact mass spectroscopy
cm	= centimeter
cpm	= counts per minute
δ	= chemical shift
dpm	= disintegrations per minute
DTT	= <i>dl</i> -dithiothreitol
EDTA	= ethylene diamine tetraacetic acid
EtOAc	= ethylacetate
eV	= electron volt
g	= gram
g	= centrifugal force (relative to gravity)
GC	= gas chromatography
GGOH	= geranylgeraniol
GGOPP	= geranylgeranyl pyrophosphate
¹ H-NMR	= proton nuclear magnetic resonance
hr	= hour
Hz	= hertz
³ H	= tritium
IR	= infrared spectroscopy
kg	= kilogram
λ_{\max}	= wavelength at maxima absorption
M ⁺	= molecular ion
MeOH	= methanol
mg	= milligram

min	= minute
ml	= milliliter
mM	= millimolar
mm	= millimeter
<i>m/z</i>	= mass to charge ratio
MS	= mass spectroscopy
μg	= microgram
μmol	= micromole
NADPH	= β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NADH	= β-nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
NaHCO ₃	= sodium hydrogen carbonate
nM	= nanomolar
nm	= nanometer
nmol	= nanomole
pH	= log of reciprocal of hydrogen ion concentration
R _f	= ratio of movement of the band to the front of the solvent
rpm	= rounds per minute
ν_{\max}	= wave number at maxima absorption
tab	= tablet
TLC	= thin-layer chromatography
UV	= ultraviolet spectrum