ลักษณะสมบัติของเอนไซม์ตัดโซ่กิ่งของแป้งจากหัวมันสำปะหลัง *Manihot esculenta* CRANTZ cv. KU50

นางสาว ทิพวัลย์ กรศิริปัญญา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF STARCH DEBRANCHING ENZYME FROM TUBER OF CASSAVA *Manihot esculenta* CRANTZ cv. KU50

Miss Thippawan Kornsiripanya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007
Copyright of Chulalongkorn University

500501

Thesis Title	CHARACTERIZATION OF STARCH DEBRANCHING ENZYME FROM TUBER OF CASSAVA *Manihot esculenta* CRANZ cv.KU50
By	Miss Thippawan Kornsiripanya
Field of Study	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.

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

S. Hannongbua ..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Aran Incharoensakdi ..... Chairman

(Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

Tipaporn Limpaseni ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

Teerapong Buaboocha ..... Member

(Assistant Professor Teerapong Buaboocha, Ph.D.)

Kanoktip Packdibamrung ..... Member

(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

ทิพวัลย์ กรศิริปัญญา : ลักษณะสมบัติของเอนไซม์ตัดโซ่กิ่งของแป้งจากหัวมันสำปะหลัง *Manihot esculenta* CRANTZ cv. KU50. (CHARACERIZATION OF STARCH DEBRANCHING ENZYME FROM TUBER OF CASSAVA *Manihot esculenta* CRANTZ cv. KU50) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์, 98 หน้า.

เอนไซม์ตัดโซ่กิ่งของแป้ง เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในพืช เอนไซม์ตัดโซ่กิ่งมีแอกติวิตี 2 แบบ คือ ไอโซอะไมเลสและพูลลูแลนเนส ในการทดลองนี้ ทำการสกัดและศึกษาสมบัติของเอนไซม์ตัดโซ่กิ่งของแป้งจากหัวมันสำปะหลังสายพันธุ์ KU50 ได้ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยตกตะกอนโปรตีนด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 60% และผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ DEAE-Sepharose และ Sephacryl S-200 ได้ไอโซอะไมเลสและพูลลูแลนเนสที่มีความบริสุทธิ์ 14.6 และ 20 เท่าตามลำดับ ไอโซอะไมเลสมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 98 กิโลดาลตัน เมื่อคำนวณจากการแยกด้วย Sephacryl S-200 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเลกโตรโฟรีซิสแบบเสียสภาพพบแถบโปรตีนหลัก 2 แถบ ที่มีขนาด 41 และ 34 กิโลดาลตัน พูลลูแลนเนสมีน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณจากการแยกด้วย Sephacryl S-200 เท่ากับ 175 กิโลดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยอิเลกโตรโฟรีซิสแบบเสียสภาพ พบแถบโปรตีนหลัก 3 แถบ ขนาด 54, 46 และ 41 กิโลดาลตัน ไอโซอะไมเลสและพูลลูแลนเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิที่ไอโซอะไมเลสและพูลลูแลนเนสทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุด คือ 70 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ พูลลูแลเนสสามารถย่อยซับสเตรตได้ทั้งพูลลูแลนและอะไมโลเพคติน แต่มีความจำเพาะต่อพูลลูแลนมากกว่า ไอโซอะไมเลสมีความจำเพาะต่ออะไมโลเพคตินและไม่สามารถย่อยพูลลูแลนได้ ไอโซอะไมเลสมีค่า K_m ต่ออะไมโลเพคติน 21.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พูลลูแลนเนสมีค่า K_m ต่อพูลลูแลน 39.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาผลของ sulfhydryl reagent พบว่า DTT, GSH และ β-mercaptoethanol กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ตัดโซ่กิ่ง แสดงว่าหมู่ –SH มีบทบาทต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และผลของ divalent metal ion ต่อเอนไซม์ พบว่า การทำงานของไอโซอะไมเลสถูกยับยั้งด้วย Cu^{2+} และกระตุ้นโดย Co^{2+} ในขณะที่พูลลูแลนเนสถูกยับยั้งด้วย Cu^{2+} และ Ni^{2+} และกระตุ้นโดย Co^{2+} และ Mn^{2+}

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....ทิพวัลย์ กรศิริปัญญา.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....Tipaporn Limpasenee.....

ปีการศึกษา.....2550.....

4772313023 : MAJOR BIOCHEMSTRY
KEY WORD: STARCH DEBRANCHING ENZYME / CASSAVA / STARCH BIOSYNTHESIS

THIPPAWAN KORNSIRIPANYA : CHARACTERIZATION OF STARCH DEBRANCHING ENZYME FROM TUBER OF CASSAVA *Manihot esculenta* CRANTZ cv. KU50. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. TIPAPORN LIMPASENI, Ph.D., 98 pp.

Starch debranching enzyme (DBE), one of the enzymes involved starch biosynthsis in plant, hydrolyzed the α-1,6 linkages of polyglucans was classified into two types; isoamylase and pullulanase. DBE from nine moths old cassava tubers cv.KU50 was purified by 60% saturated ammonium sulfate precipitation followed by chromatographies on DEAE-Sepharose and Sephacryl S-200. Isoamylase and pullulanase were 14.6 and 20 folds purified. On Sephacryl S-200, molecular weight of isoamylase and pullulanase were 98 and 175 kDa respectively. On SDS-PAGE, isoamylase showed 2 major protein bands containing 41 and 34 kDa, and pullulanase showed 3 major protein bands of 54, 46 and 41 kDa. Both isoamylase and pullulanase had optimum pH at 6.0 while the optimum temperatures for their activities were 70 and 50°C, respectively. Pullulanase showed high specificity towards pullulan and low specificity with amylopectin. Isoamylase showed high specificity with amylopectin but could not hydrolyze pullulan. The K_m for amylopectin of isoamylase was 21.14 mg/ml while the K_m for pullulan of pullulanase was 39.49 mg/ml. The sulfhydryl reagents such as DTT, GSH and β-mercaptoethanol showed positive effect on DBE, indicating that –SH group involved in DBE activity. Isoamylase was inhibited by Cu^{2+} and activated by Co^{2+} while pullulanase was inhibited by Cu^{2+} and Ni^{2+} and activated by Co^{2+}, Mn^{2+}.

Department: ....Biochemistry.....Student's Signature: ..Thippawan Kornsiripanya
Field of Study: ..Biochemistry.....Advisor's Signature: ..Tipaporn Limpaseni
Academic Year: ...2007.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation and gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni for her instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis.

My gratitude is also extended to Prof. Dr. Aran Incharoensakdi, Assist. Prof. Dr. Kanoktip Packdibamrung and Assist. Prof. Dr. Teerapong Buaboocha for serving as thesis committee.

Sincere thanks are extended to all members in Starch and Cyclodextrin Research Unit and friends in the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their assistance and friendship.

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

This thesis was supported by Research Grant from the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, NSTDA.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI)..... iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....xi

LIST OF FIGURES.....xii

LIST OF ABBREVIATIONS.....xiv

CHAPTER I INTRODUCTION.....1

1.1 Cassava.....1

1.2 Starch.....4

1.2.1 Amylose.....4

1.2.2 Amylopectin.....5

1.3 Pullulan.....6

1.4 Starch biosynthesis and the enzymes involved.....10

1.4.1 The synthesis of ADP-glucose through ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase).....13

1.4.2 The role of starch synthase.....14

1.4.2.1 The synthesis of amylose.....14

1.4.2.2 The synthesis of amylopectin.....15

1.4.3 The role of starch branching enzymes (SBE or Q-enzyme).....16

1.4.4 The role of debranching enzymes (DBE).....18

1.4.5 The function of disproportionating enzyme (D-enzyme).....23

1.4.6 Other factors and evidence implicating their involvement 23

Page

1.5 Objective.....25

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....26

2.1 Plant materials.....26

2.2 Chemicals.....26

2.3 Equipments.....27

2.4 Preparation of starch debranching enzyme (DBE) from cassava tubers....28

2.5 Purification of DBE.....28

2.5.1 Ammonium sulfate precipitation.....28

2.5.2 Ion exchange chromatography.....28

2.5.3 Gel filtration chromatography.....29

2.6 Protein determination.....29

2.7 DBE activity assay.....30

2.7.1 Pullulanase activity.....30

2.7.2 Isoamylase activity.....30

2.8 Non-denaturing starch PAGE.....30

2.9 SDS-PAGE.....31

2.10 Characterization of starch debranching enzyme.....31

2.10.1 Determination of molecular weight.....31

2.10.1.1 Sephacryl S-200 chromatography.....31

2.10.1.2 SDS-PAGE.....32

2.10.2 Effect of temperature on DBE.....32

2.10.3 Effect of pH on DBE.....32

2.10.4 Temperature stability.....33

Page

2.10.5 Effect of sulfhydryl reagents on DBE.....33

2.10.6 Effect of divalent metal ions.....33

2.10.7 Comparison of DBE activity with various substrates.....33

2.11 Determination of K_m and V_{max}.....34

CHAPTER III RESULTS.....35

3.1 DBE activities in cassava tubers from different ages and cultivars.....35

3.2 Purification of DBE from cassava tuber cv. KU50.....38

3.2.1 Preparation of crude enzyme.....38

3.2.2 Ammonium sulfate precipitation.....38

3.2.3 Ion exchange chromatography.....38

3.2.4 Gel filtration chromatography.....39

3.3 Native PAGE.....39

3.4 Characterization of DBE.....45

3.4.1 Native molecular weight from gel filtration.....45

3.4.2 Molecular weight of DBE from SDS-PAGE.....45

3.4.3 Optimum pH for DBE activity.....49

3.4.4 Optimum temperature for DBE activity.....49

3.4.5 Thermal stability of DBE.....49

3.4.6 Effect of sulfhydryl reagents on DBE activity.....53

3.4.7 Effect of divalent metal ions on DBE activity.....53

3.4.8 Comparison of DBE activity with various substrates.....56

3.4.9 Kinetic parameters, K_m and V_{max} of DBE.....56

CHAPTER IV DISCUSSION.....58

Page

4.1 Assay methods for DBE.....58

4.2 Preparation of crude extraction.....59

4.3 Purification of DBE.....61

4.4 Characterization of DBE.....62

4.4.1 Molecular weight of DBE.....62

4.4.2 Effect of pH and temperature on DBE.....63

4.4.3 Effect of sulfhydryl reagents and divalent metal ions on DBE...64

4.4.4 Kinetic constants of DBE and substrate specificity.....65

CHAPTER V CONCLUSIONS.....71

REFERENCES.....73

APPENDICES.....89

BIOGRAPHY.....98

LIST OF TABLES

Table **Page**

CHAPTER I

1.1 Approximate amylase and amylopectin content of common food starches.....9

CHAPTER III

3.1 The activity of pullulanase in tubers of cassava.....35

3.2 The activity of isoamylase in tubers of cassava.....36

3.3 Purification of isoamylase from cassava tuber cv.KU50.....43

3.4 Purification of pullulanase from cassava tuber cv.KU50.....43

3.5 Comparison of DBE activity with various substrates.....56

CHAPTER IV

4.1 Basic physio-chemical parameters of isoamylase in plants.....68

42. Basic physio-chemical parameters of pullulanase in plants.....69

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

CHAPTER I

1.1 Display of a cassava plant and its starch granule architecture.....3

1.2 Short segment of amylase.....7

1.3 An α(1-6) branch point of amylopectin.....7

1.4 Amylopectin structure and diagrammatic presentation of starch granule...8

1.5 Structure of pullulan.....9

1.6 The major metabolites and enzymes involved in the conversion of sucrose.....11

1.7 Reaction of enzymes involved in amylopectin synthesis.....12

1.8 Models to explain the involvement of DBE in starch synthesis. The preamylopectin trimming model.....21

1.9 Models to explain the involvement of DBE in starch synthesis. The soluble glucan recycling model.....22

CHAPTER III

3.1 The specific activity of pullulanase in tubers of cassava.....37

3.2 The specific activity of isoamylase in tubers of cassava.....37

3.3 DEAE-Sepharose chromatographic profiles of DBE.....40

3.4 Chromatographic of isoamylase from Sephacryl S-200.....41

3.5 Chromatographic of pullulanase from Sephacryl S-200.....42

3.6 Activity staining of cassava DBE on native PAGE.....44

3.7 Calibration curve of native molecular weight determined by chromatography on Sephacryl S-200.....46

Page

3.8 SDS-PAGE pattern of DBE.....47

3.9 Calibration curve molecular weight markers on SDS-PAGE.....48

3.10 Optimum pH of isoamylase.....50

3.11 Optimum pH of pullulanase.....50

3.12 Optimum temperature of DBE.....51

3.13 Thermal stability of isoamylase.....52

3.14 Thermal stability of pullulanase.....52

3.15 Effect of sulfhydryl reagents on isoamylase activity.....54

3.16 Effect of sulfhydryl reagents on pullulanase activity.....54

3.17 Effect of divalent metal ions on isoamylase activity.....55

3.18 Effect of divalent metal ions on pullulanase activity.....55

3.19 Kinetic studies of isoamylase activity.....57

3.20 Kinetic studies of pullulanase activity.....57

LIST OF ABBREVIATIONS

2-ME	β-mercaptoethanol
A	absorbance
cv.	cultivar
DBE	starch debranching enzyme
DEAE	diethylaminoethyl
DNS	3,5-dinitrosalicylic acid
DTT	dithiothreitol
GSH	glutathione reduced form
IAA	iodoacetic acid
K_{av}	partition coefficient
K_m	Michaelis constant
NEM	*N*-Ethylmaleimide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF	phenylmethyl sulfonyl fluoride
R_f	relative mobility
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	*N, N, N′, N′*– tetramethyl ethylene diamine
V_{max}	maximum velocity
w/v	weight by volume