

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

探討甘藷磷解酵素在外源引體不存在下的  
催化反應與生理角色

Studies on starch phosphorylase catalyzed reaction and  
physiological role in the absence of an exogenous primer

計畫類別：個別型計畫    整合型計畫

計畫編號：NSC89-2313-B-041-002

執行期間：88年08月01日至89年07月31日

計畫主持人：陳師瑩 助理教授

共同主持人：葉東柏 教授

E-mail: shihying@mail.chna.edu.tw

執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國 89 年 9 月 25 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 探討甘藷澱粉解酵素在外源引體不存在下的 催化反應與生理角色

### Studies on starch phosphorylase catalyzed reaction and physiological role in the absence of an exogenous primer

計畫編號：NSC89-2313-B-041-002

執行期限：88年08月01日至89年07月31日

主持人：陳師瑩 助理教授 嘉南藥理科技大學保健營養系

共同主持人：葉東柏 教授 嘉南藥理科技大學食品衛生系

#### 一、中文摘要

在甘藷塊根中，會發現到兩種澱粉磷酸解酶：一是不需要外源引體（SPi; primer-independent starch phosphorylase），另一為需要引體（SP）才有活性。這兩種澱粉磷酸解酶目前無法用任何純化方法分離，其中一個原因是 SPi 相當不穩定。然而研究發現，最適當的 SPi 活性分析條件為甘藷材料必須取自新鮮甘藷，並在粗抽緩衝液中添加 5mM 2-mercaptoethanol 進行部分純化；在活性染色分析時，則在 sodium acetate pH 5.4 的緩衝液中進行效果最佳。考慮到 SPi 的生理角色，推論可能可以合成麥芽糖及葡三糖這兩個引體，並促使澱粉合成起始反應。換言之 SPi 在澱粉生合成上可能扮演重要角色。

**關鍵詞：**引體、澱粉生合成、不需要外源引體之澱粉磷酸解酶、。

#### Abstract

Starch phosphorylase from sweet potato tuber occurs in two forms: one independent (SPi) and the other (SP) dependent on the addition of primer for activity. These activities could not be separated by any current purification methods. One of the

reasons that SPi is vary unstable. However, the optimal activity of SPi can be markedly enhanced by picked from fresh tissue、crude extraction buffer containing 5mM 2-mercaptoethanol and sodium acetate (pH 5.4) staining buffer. With regard to the physiological role of SPi, it may synthesize the initiator of glucan having a degree polymerization of 2 or 3 and facilitate the task of starch synthesis initiation. In other words, SPi may play an important role in the starch biosynthesis.

**Keywords:** primer, starch biosynthesis, primer-independent starch phosphorylase (SPi) ,.

#### 二、緣由與目的

在甘藷粗抽液中，以原態膠體電泳分離後進行活性染色分析，有時會發現到同時擁有需要引體（SP）及不需要外源引體（SPi; primer-independent SP）但目前技術上尚且無法分離的澱粉磷酸解酶的活性；然而在歷經硫酸銨分割、陰離子交換層析法及製備式原態膠體電泳，純化得到的澱粉磷酸解酶則喪失 SPi 的活性；因此，SP 與 SPi 兩種活性特質的酵素到底是屬於不同的 isozymes<sup>[1-2]</sup>？還是同時具有雙重功能的 SP？有待進一步的釐清。

經過硫酸銨分劃、陰離子交換層析及製備式電泳純化後所得的 SP<sup>[3]</sup>，在試管中進行不含引體的酵素反應，並在不同的孵育時間 (incubation time) 下，利用醣類分析儀觀察其終產物 (各種醣類)，並進行定性與定量分析，試圖研判其為何無法進行澱起始化反應的機制。由結果可發現初期有大量的葡萄糖產生，待反應時間兩小時左右才開始出現麥芽糖，因而推論：一、葡萄糖與麥芽糖的累積，乃因麥芽糖及葡三糖的形成是 SP 進行澱粉合成起始反應之兩個能量障壁，二、SP 進行不需引體的催化反應步驟中，似乎必須先進行類似磷解酶 (phosphatase) 的催化作用，在排除磷解酶污染下，SP 仍具此催化能力，有可能是加入單一高濃度的基質 (glucose-1-phosphate; G1-P) 下，所促進的非自然酵素反應<sup>[4]</sup>。事實上，這樣的催化作用和目前所發現參與澱粉合成起始反應的酵素所具備的特性並不相同<sup>[5-9]</sup>；而 SP 要以 G1-P 為合成 primer 之基質，卻又要進行 phosphatase 的作用 (破壞 G1-P)，以一種酵素可以扮演多重功能的催化反應，似乎並不合理。三、SP 在產生麥芽糖和葡三糖 (maltotriose) 的速率雖緩慢，唯葡三糖一旦產生，便可快速的合成聚葡糖 (DP $\geq$ 4) 以上的分子，故不易在醣類分析儀中偵測到葡三糖以上的分子，事實上葡三糖已被確認為 SP 之優良的引體<sup>[10]</sup>，但此點並不能說明 SP 能進行不需引體的催化反應。

本研究的目的是在探討，甘藷粗抽液有的 SPi，是否才是澱粉合成起始反應的關鍵酵素？但因 SPi 不穩定且缺乏相關的性質研究，導致無法進一步的瞭解 SPi 是否存在生理意義，只有進行相關的酵素化學等性質分析後，建立其純化策略，並進一步分析鑑定，才有機會釐清 SP 與 SPi 兩者間的關係。

如能對上述問題進行一系列深入探討，將對澱粉合成起始的機制有重大突破，並對作物基因轉殖或組織培養之生物技術的工作，提供有效改良或控制植物澱粉品質的學理依據。

### 三、結果與討論

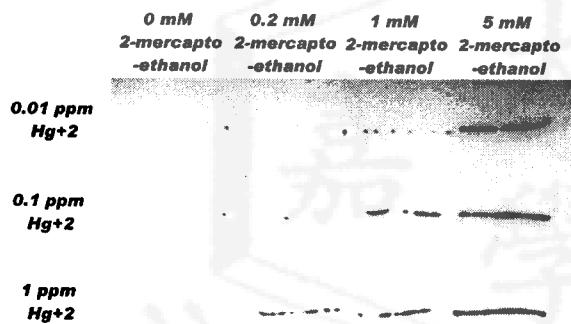
材料：本實驗材料均採用台農 57 號甘藷 (*Ipomoea batatas*, Tainong 57)，此甘藷之特色為葉片成三叉形，塊根表皮白色，肉質成淡黃色，富含澱粉，具經濟價值。於塊根形成的初期及末期，挑選適當大小的塊根，均分成兩組，一組以清水沖洗後，立即試驗，另一組則進行室溫與 -80°C 儲藏試驗。

**SPi 檢定：**將粗抽或純化的樣品立即以原態膠體電泳分離，以不加引體的方式進行活性染色分析 (內僅含 200 mM Sodium acetate buffer pH 5.4 及 100 mM Glucose-1-phosphate (G1-P))，此即為本實驗檢定 SPi 之主要方法；當不加引體時，出現活性染色帶時，即表示存在有 SPi。

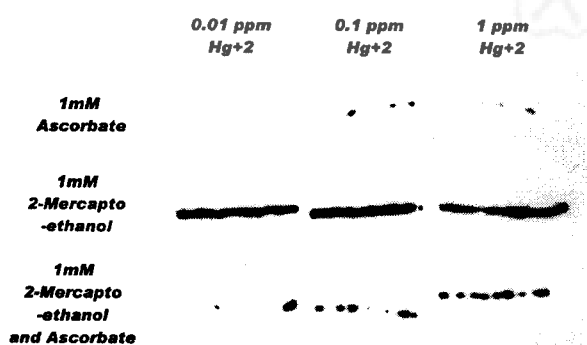
**SPi (primer-independent SP) 的酵素化學性質分析：**

由於 SPi 相當不穩定且缺乏相關的性質研究，故將很難建立其純化策略，為此本研究首先著重於增加安定與活性因子的探討。如已知 Hg<sup>2+</sup>可抑制 BA 活性，進而減少對 SP 活性分析的干擾，故汞離子對 SPi 是否具有相同效應，為是探討的重點之一。結果發現只要 0.1 ppm Hg<sup>2+</sup>確能突顯 SPi 活性效果，但僅在 SPi 活性適中的情形下發生，當 SPi 活性很強或很弱的時候，汞離子將無法再發揮突顯 SPi 活性的效果 (參見圖一及二)。對於添加還原劑用以防止酵素因氧化而喪失活性的 2-mercaptoethanol，則有意想不到效果，從甘藷粗抽到分析鑑定，若於緩衝液中維持 5 mM 2-mercaptoethanol，其 SPi 活性則有顯著增強效果 (參見圖一及二)；推測增強 SPi 活性的原因有二：一是 2-mercaptoethanol 穩定了 SPi 中 -SH 或

其他易氧化基團的結構，二是破壞了與 SPi 共同存在或不易分離，卻會影響酵素不穩定之因子，如 protease。當本研究以其他不同的還原劑進行比較時，結果 ascorbic acid 不論是單獨存在或與 2-mercaptoethanol 共存下，都造成抑制 SPi 活性的作用（圖二）。推測 SPi 中除了-SH 基團以外，其他易氧化基團的結構可能與 SPi 活性關係不大，但 ascorbic acid 酸性特質可能破壞 SPi 活性。而傳統使用 albumin 與 glycerol 作為酵素保存安定劑，對 SPi 的穩定毫無助益（data not shown）。而  $Mn^{2+}$  及  $Mg^{2+}$  等金屬離子亦對其活性沒有影響（data not shown）。



圖一：不同濃度的 2-mercaptoethanol 與  $Hg^{2+}$  對 SPi 活性的影響。



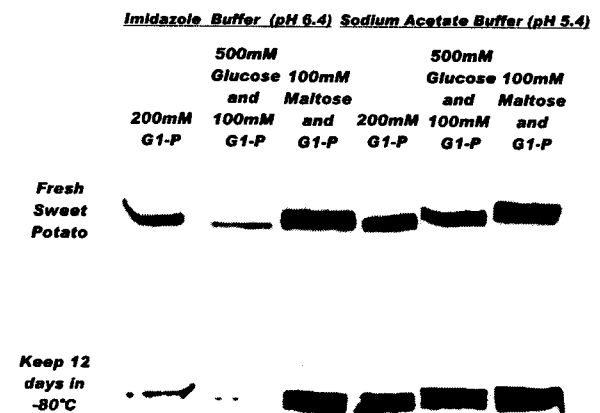
圖二：兩種抗氧化劑與不同  $Hg^{2+}$  濃度對 SPi 活性的影響。

另外從圖三中可以發現在僅含 G1-P 且不含其他任何引體下，以 sodium acetate pH 5.4 作為活性染色的條件比 imidazole pH 6.4 好，推測與最適反應 pH 值可能有

關，但也不排除該離子型式亦可能影響酵素結構。並從多次分析發現甘藷大小與 SPi 活性並無絕對關係，但甘藷材料的新鮮度則為絕對影響因素（data not shown），換言之，剛採集的甘藷才易偵測到 SPi 的活性；室溫或冷藏保存的甘藷都易喪失其活性， $-80^{\circ}C$  儲藏 12 天的甘藷，在 imidazole pH 6.4 的活染下，可見 SPi 在不含引體或含葡萄糖引體下的活性與新鮮甘藷有顯著差異（圖三）。從上述試驗的結果中，可以得到適當的 SPi 活性分析條件：即甘藷材料必須取自新鮮甘藷，並在粗抽緩衝液中添加 5mM 2-mercaptoethanol 進行部分純化；在活性染色分析時，則以 sodium acetate pH 5.4 的緩衝液中進行效果最佳。

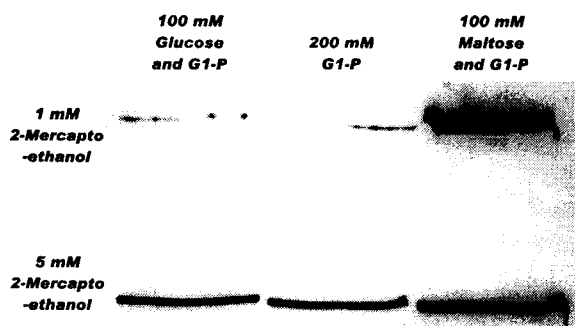
### SP 參與澱粉合成起始反應之可能性鑑定與分析比較：

本研究的另一個目的在於探討甘藷粗抽液中的 SPi，是否才是澱粉合成起始反應的關鍵酵素？故進行對受質的特異性研究：即分別加入不同的基質組合，如：G1-P/G1-P，Glucose/G1-P，Maltose/G1-P，評估 SPi 是否可以進行 SP 所不能利用的引體反應。圖三、四顯示在上述所確立的適當 SPi 活性分析條件下（粗抽液添加 5mM 2-mercaptoethanol，並以 sodium acetate pH 5.4 進行活性染色。），SPi 似



圖三：新鮮與儲藏甘藷在不同的緩衝液與受質下對 SPi 活性的影響。

乎能超越 SP 所遭遇的能量障壁，即可以利用 G1-P、葡萄糖與麥芽糖啟動澱粉合成的起始反應。



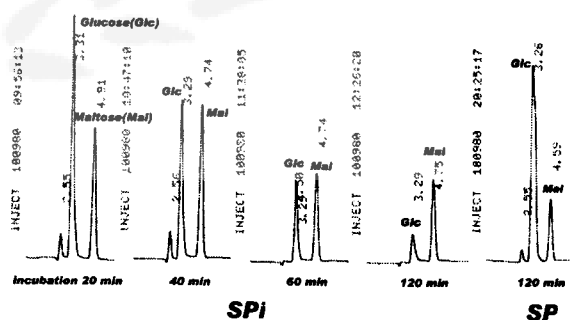
圖四：不同濃度的 2-mercaptoethanol 與不同受質對 SPi 活性的影響。

為了進一步證實 SPi 確能參與澱粉合成起始反應，將甘藷酵素粗抽液直接以製備式電泳做部分純化並溶離(從製備到溶離出產物約需 18 小時)。由於 SPi 的活性相當不穩定，故必須於溶離後，立即在 Eppendorf 中，於不同孵育時間下 (incubation time) 進行 SPi 酵素反應試驗；同時另一方面進行 SPi 的活性染色鑑定，倘若此時存在 SPi 的活性時，則 Eppendorf 中的 SPi 反應，將可成功得到 SPi 活性反應的產物。另外從甘藷中純化出 SP 作為對照組，亦即兩者皆在不合引體下所進行的反應。將兩者酵素產生的產物，利用醣類分析儀直接鑑定，用以追蹤產物產生的速度與種類(圖五)，配合上述活性染色的結果(圖三、四)，相互驗證。推論出 SPi 參與澱粉合成起始反應的可能催化機制，具有以下特點：(1) SPi 可能可以有效突破合成麥芽糖及葡三醣這兩個主要能量障壁的步驟，因為 SPi 初期累積的葡萄糖及麥芽糖量皆比 SP 所進行的反應有相對比例的減少(如圖五兩者酵素反應 120 min 後終產物的圖譜比較)。產物的累積是代表此為反應速率瓶頸，其他醣類不易被偵測到則是因為反應速率較快，導致這些醣類相對莫爾數減少，致使醣類分析儀無法偵

測到。(2) SPi 似乎與 SP 的反應稍有不同，可能不需要進行 phosphatase 的步驟，即能進行澱粉合成起始反應；因為葡萄糖(受質)的增加並未能增加 SPi 的反應活性(圖三)，另外 SPi 對葡萄糖的產生初產量不如 SP 的多與快(data not shown, 另從圖五也能看出葡萄糖的累積 SPi 不如 SP 的反應顯著)，似乎亦暗示 SPi 可以不進行 phosphatase 反應，直接以 G1-P 為受質，進行引體合成。推論 SPi 可能可以直接將兩莫爾 G1-P 形成麥芽糖，進而產生寡醣類小分子引體，並促成澱粉合成反應。但 SPi 是否能進行 phosphatase 反應，則無法從本實驗得知，因為產生的葡萄糖可能是 SP 或 SPi 進行 phosphatase 反應的結果。

(3) 除上述兩點不同外，其餘的反應機制與 SP 差異不大。

由上述結果說明了 SPi 在澱粉合成起始反應的過程中扮演了相當重要的角色，可能化解 SP 在生物體中能進行澱粉合成起始反應的疑慮，但 SP 與 SPi 兩者之間的學生關係，實有必要進一步釐清，如何穩定 SPi 活性並加以純化，則是重要關鍵。



圖五：不同濃度的 2-mercaptoethanol 與  $Hg^{2+}$  對 SPi 活性的影響。

#### 四、計劃成果自評

本研究已達計劃預期目標，完成(1)蛋白質部分純化、鑑定方法及相關設備之建立。對於 SPi 酵素化學性質分析的實驗與諸多探討，其主要目的是希望找出導致酵素 SPi 失去活性的不穩定因素，並從相關或特異的性質當中，尋求最適純化條

件，以便進一步分析其生理生化意義。(2) 完成 SPi 參與澱粉合成起始反應之可能性鑑定與分析比較，並推論出 SPi 參與澱粉合成起始反應的可能催化機制。其研究成果適合於學術期刊上發表，如能對相關問題再進行深入探討，對作物基因的改良將提供重要的學理依據。

##### 五、參考文獻

- [1] **Preiss, J. (1988)** The biochemistry of plants, Vol. 14. pp. 181-253. In Preiss, J., ed. Biosynthesis of starch and its regulation. Academic Press, New York.
- [2] **Mori, H., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1993)** A chimeric  $\alpha$ -Glucan phosphorylase of plant type L and H isozymes. *J. Biol. Chem.* 268: 5574-5581.
- [3] **Chang, T. C. Lee, P. D., and Su, J. C. (1987)** Sweet potato starch phosphorylase purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 51: 187-195.
- [4] **Chen, S. Y., Lee, P. D., and Su, J. C. (1997)** The molecular mechanism of beta-amylase inhibition against starch phosphorylase. Doctor Dissertation., **Inst. Agr. Chem., National Taiwan University.**
- [5] **Mu, J., Skurat, A. V., and Roach, P. J. (1997)** Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 31: 25589-27597
- [6] **Ardila, F. J., and Tandecarz, J. S. (1992)** Potato tuber UDP glucose protein transglucosylase catalyzes its own glucosylation. *Plant Physiol.* 99(4): 1342-1347.
- [7] **Moreno, S., and Tandecarz, J. S. (1996)** Analysis of primer independent phosphorylase activity in potato plants high levels of activity in sink organs and sucrose-dependent activity in cultured stem explants. *Cell. Mol. Biol.* 42(5): 637-643.
- [8] **Tandecarz, J. S., Lavintman, N., and Cardini, C. E. (1975)** Biosynthesis of starch formation of a glucoproteic acceptor by potato non-sedimentable preparation. *Biochim. Biophys. Acta.* 399: 345-355.
- [9] **Sivak, M. N., Tandecarz, J. S., and Cardini, C. E. (1981)** Studies on potato tuber phosphorylase catalyzed reaction in the absence of an exogenous acceptor: I. Characterization and properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 525-545
- [10] **Pan, S. M. (1989)** Biochemical study of rice starch phosphorylase. Ph. D. dissertation., **Inst. Agr. Chem., National Taiwan University.** **Fukui, T. (1983):** The new frontiers in plant biochemistry. pp. 71-82 In Akazawa, T., Asahi, T., and Imase, H. eds. *Plant phosphorylase.* **Japan Scientific Societies Press, Tokyo.**