

# 嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

不需引體的甘藷磷解□之檢定與生化性質分析

計畫類別：個別型計畫    整合型計畫

計畫編號： 90-EN-05

執行期間：90年01月01日至90年12月31日

計畫主持人：陳師瑩 助理教授

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



執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國 90 年 2 月 28 日

# 嘉南藥理科技大學補助專題研究計畫成果報告

## 不需引體的甘藷磷解□之檢定與生化性質分析

計畫類別：■個別型計畫 □整合型計畫

計畫編號：90-EN-05

執行期間：90年01月01日至90年12月31日

計畫主持人：陳師瑩 助理教授 嘉南藥理科技大學保健營養系

### 一、中文摘要

在甘藷塊根中，會發現到兩種澱粉磷解□：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。這兩種澱粉磷解□目前無法用任何純化方法分離。其中有一個原因是 SPi 相當不穩定，此點影響了純化策略的發展。鑒於 SPi 的不穩定且缺乏相關的性質研究，因此就影響酵素不穩定的所有因素中，以酵素之氧化性傷害作為本研究的重點。

研究發現，要尋找最適當的 SPi 活性分析條件，甘藷材料必須取自新鮮甘藷，或新鮮採摘並在-80°C下儲藏下的甘藷；綜合以上對各種抗氧化劑的研究，可以發現 DTT 與 βME 是目前發現穩定 SPi 活性較有效的還原劑，這些抗氧化劑。其中又以 DTT 能使 SPi 的活性延長到一天的時間，至於其他還原劑對於 SPi 活性穩定的效果，依據現有實驗數據觀察，大抵依序為 DTT> 2-mercaptoethanol> Cysteine albumin、維生素 C、CK> Methionine> DMSO。

關鍵詞：引體、澱粉生合成、不需要外源引體之澱粉磷解□、。

**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）及不需要外源引體的澱粉磷解□的活性（SPi; primer-independent SP）。從多次分析發現甘藷材料的新鮮度與 SPi 的活性有著重要影響，室溫或冷藏保存的甘藷都易喪失其活性，新鮮採摘的或新鮮採摘並在-80°C下儲藏下的甘藷，較易發現到 SPi 的活性；然而 SP 的活性就不一定要新鮮採摘或需要嚴格的溫度儲藏條件，如同 SPi 一般。

但到目前為止，這兩種不同的澱粉磷解□的活性，以現有的技術尚且無法分離。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。在歷經硫酸銨分劃、陰離子交換層析法及製備式原態膠體電泳，純化得到的澱粉磷解□（SP），由於醇化過程至少需要四天，皆已觀察不到 SPi 的活性，推測 SPi 在純化過程中已經喪失其活性。

根據過去的結果<sup>[3]</sup>發現 SP 要做為澱粉起始的合成反應，存在以下幾點矛盾：一、SP 初期反應生成的產物以葡萄糖最多，並大量累積，待反應時間加長後才開始出現麥芽糖及葡三糖的形成，顯示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□ (phosphatase) 的催化作用，在排除磷解□污染下，SP 仍具此催化能力，有可能是在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。反觀不需引體的 SPi 活性，在原態膠體電泳中觀察發現，SPi 在僅有 G1-P 單一基質的存在下，可以比 SP 有效率的形成澱粉，顯示麥芽糖及葡三糖的形成不是 SPi 進行澱粉合成起始反應之兩個能量障壁，其所扮演的生理角色可能也比 SP 在參與澱粉起始合成上更顯重要。

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 是否存在不同的生理意義，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，在  $-80^{\circ}\text{C}$  下儲藏等待分析。

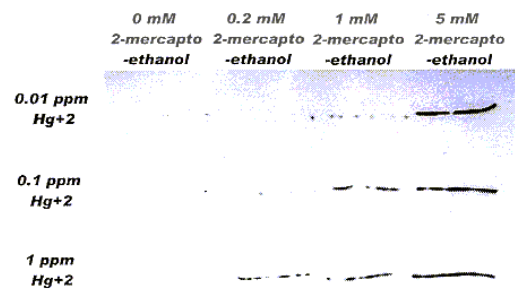
**SPi 檢定：**將粗抽或純化的樣品立即以原態膠體電泳分離，以不加引體的方式進行活性染色分析 (內僅含 200 mM Sodium acetate buffer pH 5.4 及 100 mM

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，以其延長 SPi 活性的時間。由於影響酵素穩定的因素很多，本報告重點乃在探討酵素之氧化性傷害。

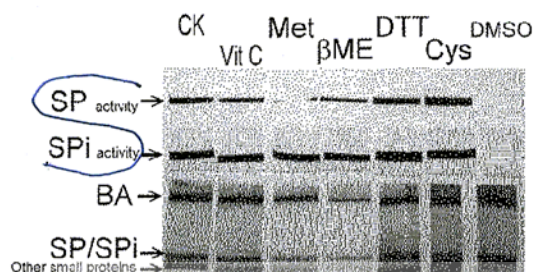
圖一實驗結果發現。在添加  $\text{Hg}^{2+}$  (0.01-1 ppm) 抑制  $\beta$ -amylase 對 SP 活性分析的干擾下，對於添加還原劑用以防止 SPi 酵素因氧化而喪失活性的 2-mercaptoethanol ( $\beta$ ME)，對 SPi 的活性似乎有劑量依存 (0-5 mM) 上的顯著影響；從甘藷粗抽到分析鑑定，若於緩衝液中始終維持 5 mM 2-mercaptoethanol，其 SPi 活性有明顯的增強效果 (圖一)；推測增強 SPi 活性的原因有二：一是 2-mercaptoethanol 穩定了 SPi 中  $-\text{SH}$  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。



圖一：不同濃度 (0-5 mM) 的 2-mercaptoethanol 與  $\text{Hg}^{2+}$  對 SPi 活性的影響。

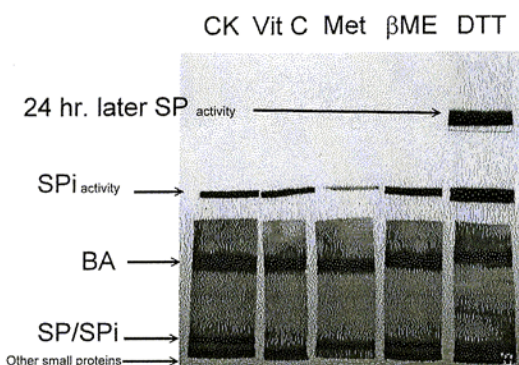
當本研究以 albumin 與 glycerol 作為

酵素保存安定劑時，對 SPi 的穩定則沒有助益 (data not shown)。



圖二：各種抗氧化劑 (10 mM) 對 SP 與 SPi 活性的影響。上半圖為或性染色分析，下半圖為 CBR 染色。

以各種不同還原劑 (維生素 C、DTT、2-mercaptoethanol、Cysteine 與 Methionine 等) 添加在甘藷粗抽液中，置於 10°C 下孵育不同時間後觀察 SPi 活性，圖二結果顯示，抗氧化劑直接加入粗抽液後，隨即進行原態膠體電泳後，可以發現各種抗氧化物的添加與控制組相比 (即未添加抗氧化劑)，並未發現有使 SPi 的活性變得比較穩定或活性增強效應；其中 DMSO 與 Met (methionine) 的添加反而不利於 SPi 的活性，其中又以 DMSO 的添加也使 SP 的活性喪失殆盡。



圖三：兩種抗氧化劑與不同  $Hg^{2+}$  濃度對 SPi 活性的影響。上半圖為或性染色分析，下半圖為 CBR 染色。

圖三結果顯示抗氧化劑直接加入粗抽液後孵育 37°C，4 小時及 24 小時後，進行原態膠體電泳，可以發現維生素 C (Vit C) 與 2-mercaptoethanol ( $\beta$ ME) 的添加與控制組相比 (即未添加抗氧化劑)，並無顯著差異；至於  $\beta$ ME 所出現的結果與圖一所示雖有不同，主因在於活性分析的步驟中，圖一有添加  $\beta$ ME，然而圖三的實驗沒有添加任何還原劑，這樣的結果反映出活性分析時，亦應考慮添加還原劑以使結果容易判斷。

Met 的添加仍不利於 SPi 的活性，維生素 C 也沒有預期的理想；但意想不到的是 DTT 在孵育 37°C，4 小時及 24 小時後，有使 SPi 的活性比控制組明顯維持，並且變得比較穩定 (其他抗氧化劑於孵育 37°C，24 小時後，SPi 活性皆喪失)，此一效應的實際原因值得進一部分分析探討。

#### 四、計劃成果總評

綜合以上對各種抗氧化劑的研究，可以發現 DTT 與  $\beta$ ME 是目前發現穩定 SPi 活性較有效的還原劑，這些抗氧化劑。其中又以 DTT 能使 SPi 的活性延長到一天的時間，對於要純化 SPi 的目標，展現一線曙光。至於其他還原劑對於 SPi 活性穩定的效果，依據現有實驗數據觀察，大抵依序為 DTT > 2-mercaptoethanol > Cysteine albumin、維生素 C、CK > Methionine > DMSO。

#### 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.**