

การทำให้เอนไซม์ 1,2 ดีไฮโดรเรดิควิลรีดักเตสจากต้นกล้าฝิ่น บริสุทธิ์ในปริมาณมาก



นางสาวจุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชเวท

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-658-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย

I16588929

**LARGE SCALE PURIFICATION OF  
1,2 DEHYDRORETICULINE REDUCTASE  
FROM  
THE OPIUM POPPY SEEDLINGS**



**Miss Juraithip Wungsintaweekul**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Graduate School  
Chulalongkorn University  
1995  
ISBN 974-632-658-9**

**Thesis Title** Large Scale Purification of 1,2 Dehydroreticuline Reductase  
from the Opium Poppy Seedlings  
**By** Miss Juraithip Wungsintaweekul  
**Department** Pharmacognosy  
**Thesis Advisor** Associate Professor Wanchai De-Eknamkul



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

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

Thesis Committee

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

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

*Vimolmas Lipipun* ..... Member  
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

*Rutt Suttisri* ..... Member  
(Rutt Suttisri, Ph.D.)

*Thitima Pengsuparp* ..... Member  
(Thitima Pengsuparp, Ph.D.)



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว

จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล : การทำให้เอนไซม์ 1,2 ดีไฮโดรเรติคูลินรีดักเทสจากต้นกล้าฝิ่น บริสุทธิ์ในปริมาณมาก (LARGE SCALE PURIFICATION OF 1,2 DEHYDRORETICULINE REDUCTASE FROM THE OPIUM POPPY SEEDLINGS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วันชัย ดีเอ็กนามกุล. 100 หน้า.

ISBN 974-632-658-9

เอนไซม์ 1,2 ดีไฮโดรเรติคูลินรีดักเทส เป็นเอนไซม์ที่ตรวจพบในต้นกล้าฝิ่น ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของ 1,2 dehydroreticuline ไปเป็น (R)-reticuline โดยมี NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้สังเคราะห์ สารกัมมันตรังสี [ $N-C^3H_3$ ]-1,2-dehydroreticuline ขึ้น เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ แอคติวิตีในระหว่างการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ การสังเคราะห์ [ $N-C^3H_3$ ]-1,2-dehydroreticuline ใช้ (S)-norreticuline เป็นสารเริ่มต้น และ อาศัยปฏิกิริยาทางเอนไซม์ 2 ปฏิกิริยา โดยใช้เอนไซม์จาก เซลเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของ *Berberis stolonifera* คือ (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase และ N-methyltransferase ตามลำดับ ส่วนการทำเอนไซม์ 1,2 ดีไฮโดรเรติคูลินรีดักเทสให้บริสุทธิ์ในปริมาณมากต้องอาศัย 6 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 55-85 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว, การใช้โครมาโทกราฟีบน ฟีนิลเซฟาโรส, การใช้โครมาโทกราฟีบน ดีอีเออี เซฟาเซล, การใช้โครมาโทกราฟีบน โมโนคิว เป็นครั้งที่ 1, การใช้โครมาโทกราฟีบน ซูเปอร์โรส และ การใช้โครมาโทกราฟีบน โมโนคิว เป็นครั้งที่ 2 โดยผลของการทำให้บริสุทธิ์ โดยขั้นตอนดังกล่าวทั้งหมดพบว่า เอนไซม์ 1,2 ดีไฮโดรเรติคูลินรีดักเทสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1433 เท่า และ ปริมาณแอคติวิตีคงเหลือเป็น 0.002 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ 1,2 ดีไฮโดรเรติคูลินรีดักเทส บนคอลัมน์ซูเปอร์โรส และ บน อิเล็กโตรโฟเรซิส (SDS-PAGE) ได้ค่า 34 กิโลดาลตัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้รายงานถึง ลำดับบางส่วนของกรดอะมิโนของเอนไซม์ 1,2 ดีไฮโดรเรติคูลินรีดักเทส ไว้ด้วย

ภาควิชา ..... เกสัชเวช  
สาขาวิชา ..... เกสัชเวช  
ปีการศึกษา ..... 2538

ลายมือชื่อนิสิต ..... จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....



# # C575414 : MAJOR PHARMACOGNOSY

KEY WORD : *PAPAVER SOMNIFERUM* L. SEEDLINGS/ PURIFICATION/ 1,2-DEHYDRORETICULINE REDUCTASE

JURATHIP WUNGSINTAWEEKUL : LARGE SCALE PURIFICATION OF 1,2 DEHYDRORETICULINE REDUCTASE FROM THE OPIUM POPPY SEEDLINGS.  
THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D. 100 pp. ISBN 974-632-658-9

1,2-Dehydroreticuline reductase is an enzyme present in *Papaver somniferum* L. seedlings. It catalyses the hydrogenation of 1,2-dehydroreticuline by using NADPH to form (R)-reticuline, a key intermediate in the morphine biosynthetic pathway. The radioactive labelled [N-C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>]-1,2-dehydroreticuline was synthesized enzymatically from (S)-norreticuline by using two consecutive reactions catalysed by *Berberis stolonifera* enzymes, namely (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase and N-methyltransferase, respectively. The [N-C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>]-1,2-dehydroreticuline was used as substrate for assaying the enzyme activity during a large scale purification of 1,2-dehydroreticuline reductase from *P. somniferum* seedlings. The complete purification procedure included 6 steps: 55-85% ammonium sulfate fractionation, Phenyl Sepharose CL-4B, DEAE Sephacel, the first MonoQ, Superose12 and the second MonoQ. The final enzyme preparation gave a single band on SDS-PAGE and was purified with 1433-fold and a 0.002% yield. The molecular weight of the reductase enzyme based on SDS-PAGE and gel filtration on Superose12 was 34 kD. In this study, we also reported the partial amino acid sequence of 1,2-dehydroreticuline reductase.

ภาควิชา..... เกษษเวท.....

สาขาวิชา..... เกษษเวท.....

ปีการศึกษา..... 2538.....

ลายมือชื่อนิสิต..... สุพรรณ เว้งวิฑูรย์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## ACKNOWLEDGEMENTS

I am deeply indebted to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his guidance, suggestion and encouragement which enable me to carry out this work. His precious instructions are not only confined to the scientific study but also to the general concepts and arts of life. The kindness and devotion he has given to me will be long remembered.

I would like to express my appreciation and thank to Professor Meinhart H. Zenk for his helpful consultation and kindly providing reference compounds, *Berberis* cell culture and opium seeds.

I would like to thank the thesis committee, for their serving as copreceptor.

I would like to thank the University Development Commission (UDC) for a scholarship the peroid of the study, the Graduate School of Chulalongkorn University and the R&D Unit for Herbs and Spices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for granting partial financial support to conduct this research work.

I would also like to thank all my dear friends for their contributions and unforgettable friendships during the past years.

Finally, I do extremely appreciate and feel deeply thankful to my dearest father, mother and everyone in my family for their care, love, understanding and encouragement throughout my life. Without their supports, my success would never come true.



## CONTENTS

	page
ABSTRACT(Thai).....	iv
ABSTRACT(English).....	v
ACKNOWLEDEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II HISTORICAL.....	4
1. Botanical Aspects of <i>Papaver somniferum</i> L.....	4
2. The Uses of <i>P. somniferum</i> .....	6
3. Chemical Constituents.....	8
4. Quantitative Analysis of Morphinan Alkaloids.....	13
5. The Alkaloidal Storage, Translocation and Metabolism of <i>P. somniferum</i> .....	15
6. The Biosynthetic Pathway of Morphinan Alkaloids.....	17
6.1 The pathway from L-tyrosine to (S)-reticuline.....	18
6.2 The pathway from (S)-reticuline to morphine.....	20
7. Review of Enzymes Involved in the Morphinan Alkaloid Biosynthesis.....	21
8. 1,2-Dehydroreticuline.....	29
8.1 Structure and chemical properties.....	29
8.2 Synthesis of 1,2-dehydroreticuline.....	29
III EXPERIMENTAL.....	33
1. Chemicals.....	33
2. Plant Material.....	34
3. Preliminary Study on the Activity of 1,2-Dehydroreticuline Reductase from <i>P. somniferum</i> Seedlings.....	34
4. Synthesis of radiolabelled [N-C <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ]-1,2-Dehydroreticuline...34	
4.1 Preparation of partially purified S-tetrahydroprotoberberine oxidase (STOX) and N-methyltransferase (NMT).....	34

	page
4.2 Synthesis of radiolabelled	
[N-C <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ]-1,2-dehydroreticuline.....	36
5. Determination of 1,2-Dehydroreticuline Reductase Activity...	37
6. Protein Determination.....	38
7. Preparation of Crude Enzyme Extract.....	38
8. Preparation of 55-85% Saturated Ammonium Sulfate	
Fractionation.....	38
9. Large Scale Purification of 1,2-Dehydroreticuline Reductase..	39
10. Molecular Weight Determination.....	40
10.1 Determination of molecular weight of 1,2-dehydroreticuline	
reductase using denaturing gel electrophoresis	
(SDS-PAGE).....	40
10.2 Determination of molecular weight of 1,2-dehydroreticuline	
reductase using gel filtration.....	42
11. Amino Acid Sequence Determination.....	42
11.1 Protein blotting.....	42
11.2 Determination of amino acid sequence.....	43
IV RESULTS.....	44
1. Synthesis of [N-C <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ]-1,2-Dehydroreticuline.....	44
1.1 Preparation of STOX and NMT enzymes from <i>Berberis</i> cell	
cultures.....	45
1.2 Enzymatic synthesis of 1,2-dehydronorreticuline from	
(S)-norreticuline.....	45
1.3 Synthesis of [N-C <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ]-1,2-dehydroreticuline.....	49
2. Detection of 1,2-Dehydroreticuline Reductase Activity.....	52
3. Large Scale Purification of 1,2-Dehydroreticuline Reductase..	53
4. Purity Check of the Purified 1,2-Dehydroreticuline	
Reductase.....	63
5. Molecular Weight of 1,2-Dehydroreticuline Reductase.....	63
5.1 Determination by SDS-PAGE.....	63
5.2 Determination by gel filtration.....	63
6. Partial Amino Acid Sequencing of 1,2-Dehydroreticuline	
Reductase.....	67



	page
V DISCUSSION.....	69
1. Synthesis of [N-C <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ]-1,2-Dehydroreticuline.....	69
2. Enzyme Detection in <i>P. somniferum</i> Seedlings.....	70
3. Large Scale Purification of 1,2-Dehydroreticuline Reductase..	71
4. Partial Amino Acid Sequencing of 1,2-Dehydroreticuline Reductase.....	72
CONCLUSION.....	74
REFERENCES.....	75
APPENDIX I.....	85
APPENDIX II.....	94
VITA.....	100

## LIST OF TABLES

Table	page
1. Isoquinoline alkaloids from <i>Papaver somniferum</i> L.....	9
2. Alkaloids produced by <u>in vitro</u> cultures of <i>P.somniferum</i> .....	11
3. The major alkaloids present in different organs and latex.....	14
4. The content of alkaloids in callus and suspension cultures.....	14
5. List of enzymes involved in morphinan alkaloid biosynthesis.....	28
6. Some properties of the enzymes.....	28
7. Composition of SDS-polyacrylamide gel.....	41
8. Summary of the purification of 1,2-dehydroreticuline reductase.....	54
9. The ammonium sulfate precipitation table.....	95
10. Stock solutions for SDS-polyacrylamide gel.....	96
11. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis preparation.....	97
12. Silver staining.....	98
13. Coomassie blue R-250 staining of SDS-polyacrylamide gel.....	99

## LIST OF FIGURES

Figure	page
1. <i>Papaver somniferum</i> L. (Papaveraceae).....	5
2. Morphine alkaloid content of the aerial tissue of developing <i>P.somniferum</i> plant.....	16
3. Morphine alkaloid content of the root tissue of developing <i>P. somniferum</i> plant.....	17
4. Biosynthetic sequence leading from tyrosine to (S)-norcoclaurine.....	19
5. Biosynthetic sequence leading from the building blocks to (S)-reticuline.....	20
6. The conversion from (S)- to (R)-reticuline via 1,2-dehydroreticuline.....	21
7. Proposed biosynthetic pathway of morphine.....	22
8. The enzymes involved in the initial steps of (S)-reticuline biosynthesis.....	23
9. Various enzymes involved in (S)-reticuline biosynthesis.....	24
10. Reaction sequence catalysed by salutaridine: NADPH-7-O-oxidoreductase...	25
11. Reaction catalysed by acetyl Co A: salutaridinol-7-O-acetyltransferase and subsequent allylic elimination.....	26
12. Various enzymes involved in morphine biosynthesis.....	27
13. The chemical structure of 1,2-dehydroreticulinium ion.....	29
14. The total synthesis of 1,2-dehydroreticulinium chloride.....	31
15. The synthesis of 1,2-dehydroreticuline from (S)-norreticuline by two enzymatic steps.....	32
16. The synthesis of 1,2-dehydroreticuline from (S)-norreticuline by enzymatic and chemical reactions.....	32
17. <i>Berberis stolonifera</i> cell suspension cultures.....	35
18. DEAE-Sephacel anion exchange chromatography of partially purified of NMT .....	46
19. TLC pattern: the conversion of (S)-norreticuline to 1,2-dehydronorreticuline.	47
20. TLC chromatogram: the conversion of (S)-norreticuline to 1,2-dehydronorreticuline.....	48
21. UV-absorption spectrum of 1,2-dehydronorreticuline.....	49
22. Mass spectrum of 1,2-dehydronorreticuline (LC-MS, APCI).....	50
23. TLC radiochromatogram: the conversion of 1,2-dehydronorreticuline to [N-C <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ]-1,2-dehydroreticuline.....	51
24. A. Five-day-old seedlings of <i>P. somniferum</i> .....	52
B. The germinated seedlings in aluminium tray	

Figure	page
25. Phenyl Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography.....	55
26. DEAE-Sephacel anion exchange chromatography.....	57
27. The first FPLC MonoQ HR5/5 anion exchange chromatography.....	58
28. FPLC Superose12 HR16/50 gel filtration chromatography.....	59
29. SDS-PAGE in each fraction of Superose12 column.....	60
30. The second FPLC MonoQ HR5/5 anion exchange chromatography.....	61
31. SDS-PAGE in each fraction of MonoQ column.....	62
32. SDS-PAGE of purified protein of each purification step.....	64
33. SDS-PAGE of purified enzyme.....	65
34. Calibration curve of molecular weight against Rf.....	65
35. FPLC Superose12 HR16/50 chromatography of 55-85% ammonium sulfate precipitation.....	66
36. Elution profile of Bio-Rad molecular weight on Superose12 column.....	68
37. Calibration curve of molecular weight against $V_0/V_e$ .....	68

## ABBREVIATIONS

AA	= acrylamide
APCI	= atmospheric pressure chemical ionization
APS	= ammonium persulfate
AUFS	= absorbance full scale
Bis	= N,N'-methylene bisacrylamide
BSA	= bovine serum albumin
cDNA	= cloning DNA
cm	= centimeter
cpm	= counts per minute
DEAE	= diethylaminoethyl
dpm	= disintegrations per minute
EDTA	= ethylenediamine tetraacetic acid
eg.	= for example
etc.	= et cetera
Fig	= Figure
FPLC	= fast protein liquid chromatography
fr.wt	= fresh weight
g	= gram
HPLC	= high performance liquid chromatography
hr	= hour
LS	= Linsmaier and Skoog
M <sup>+</sup>	= molecular ion
m/z	= mass to charge ratio
mA	= miliampere
min	= minute
ml	= mililiter
Mr	= relative molecular mass
NAA	= $\alpha$ -naphthaleneacetic acid
NADP/NADPH	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nm	= nanometer
NMR	= nuclear magnetic resonance
NMT	= N-methyltransferase
no.	= number
opt	= optimum



pH	= hydrogen ion concentration
pkat	= pico katal
pmol	= picomole
PVDF	= polyvinylidene difluoride
R <sub>f</sub>	= distance spot moved/ distance solvent moved(TLC)
rpm	= revolutions per minute
SAM	= S-adenosyl L-methionine
SDS	= sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	= sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
sp.act.	= specific activity
STOX	= S-tetrahydroprotoberberine
TEMED	= N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TFA	= trifluoroacetic acid
TLC	= thin layer chromatography
TPCK	= tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone
UV	= ultraviolet light
V <sub>e</sub>	= elution volume
V <sub>0</sub>	= void volume
<sup>3</sup> H	= tritium
2,4-D	= 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
β	= beta
°C	= degree celsius
g	= centrifugal force (relative to gravity)
λ <sub>max</sub>	= wavelength at maxima absorption
μCi	= microCurie
μmol	= micromole