บทคัดย่อ (Thai abstract)

โครงการนี้มีจุดประสงค์ในการใช้เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการเพื่อบ่งชี้และหาคุณสมบัติของไกลโคไซด์ในสารสกัดจากพืช รวมถึงศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ ในการวิจัยได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากต้นฉนวน (*Dalbergia nigrescens*) และใช้สารสกัดที่ได้มาทดสอบกลไกการทำงานของบีต้ากลูโคซิเดสต่อไอโซฟลาโวน ส่วนที่สองได้บ่งชี้ถึงไกลโคไซด์จากข้าวที่น่าจะเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสที่ศึกษาในห้องปฏิบัติการชีวเคมี มทส

ในส่วนแรก ได้ทำการยืนยันโครงสร้างของไอโซฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ของดาลไนกระเซน และดานไนกริน หรือ ดาลไนกรีดิน และพบว่าเอนไซม์นี้สามารถแตกพันธะระหว่างกลูโคสและไอโซเฟลโวน 7-O เพื่อปลดปล่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่อะดูมิโนส นอกจากนี้ยังพบว่าริคอมบิแนนท์เอนไซม์ Dnbglu2 ก็สามารถทำได้เช่นเดียวกัน ถึงแม้การแสดงความสามารถในการแตกพันธะของสารตั้งต้นทั้งสองนี้เกิดขึ้นได้ดี แต่พบว่าความสามารถในการแตกพันธะของไอโซเฟลโวน 7-O กลูโคไซด์ไดอะซินและเจนิสตีนจากถั่วเหลืองสูงกว่าเมื่อดูจากค่า k_{cat}/K_m เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจากต้นฉนวนสามารถแตกพันธะไอโซเฟลโวนในแป้งถั่วเหลืองและสารละลายแป้งได้ จึงสามารถใช้เอนไซม์นี้ในการเพิ่มไอโซเฟลโวนอิสระในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองได้ เอนไซม์นี้สามารถแตกพันธะมาโลนิลและอเซติลเจนิสตีน และไดอาซีนได้เช่นเดียวกับที่สามารถเป็นตัวรับหมู่อพิโอซิลในตำแหน่ง 6'-O ของกลูโคสจากกลุ่มไกลโคไซด์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ผลจากการค้นพบนี้ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติสามบทความ

ในส่วนที่สอง Os4BGlu7 และ Os4BGlu12 จากข้าว ถูกใช้ในการค้นหาสารตั้งต้นในธรรมชาติของข้าวโดยการสกัดสารจากข้าวที่อายุต่าง ๆ คือ ต้นอ่อน รากอ่อน ต้นข้าวที่กำลังออกรวง โดยแยกสารออกมาจากส่วนที่เป็นต้นและรากด้วยเมธานอล ในเบื้องต้นพบว่าเอนไซม์ทั้งสองสามารถแตกพันธะไกลโคไซด์ที่เรืองแสงในส่วนของต้นอ่อน อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถที่จะสกัดสารนี้ได้เพียงพอสำหรับการหาโครงสร้างของสารนี้ จากนั้นจึงทำการค้นหาสารตั้งต้นที่จำเพาะต่อเอนไซม์ Os4BGlu7 และพบว่าสามารถแตกพันธะของไกลโคไซด์จากรากอ่อน ใบแก่ และต้นได้ ไกลโคไซด์เหล่านี้ถูกทำให้บริสุทธิ์ผ่านโครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ LH20, TLC และ reverse phase HPLC ซึ่งได้ไกลโคไซด์บริสุทธิ์จำนวนหนึ่งและไม่บริสุทธิ์อีกจำนวนหนึ่ง ไกลโคไซด์ที่บริสุทธิ์สามชนิด พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 492 688 และ 688 จากการวิเคราะห์ผ่าน electrospray mass spectrometry จึงได้ตั้งชื่อว่า Cs/1D1 Cs/1D2 และ Cs/1D3 ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของ Cs/1D1 ใกล้เคียงกับ trihydrozyl dimethoxy glucoside เช่น tricin 4'-O-β-D-glucoside และ tricin 7-O- β-D-glucoside ที่เคยมีรายงานว่าพบในข้าว ในการทดลองเพื่อศึกษาโครงสร้างต่อโดยใช้ NMR จำเป็นต้องมีการเตรียมสารเหล่านี้ให้ได้ในปริมาณมาก การทดลองนี้พบว่าเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสสามชนิดจากข้าวที่ทราบโครงสร้างแล้วคือ Os3BGlu6 Os3BGlu7 และ Os4BGlu12 สามารถแตกพันธะของ Cs/1D1 ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน แต่การแตกพันธะของ Cs/1D2 ถูกทำลายอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ Os3BGlu6 และ Cs/1D3 ถูกแตกพันธะได้เร็วโดยเอนไซม์ Os4BGlu12 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า แม้ไกลโคไซด์เหล่านี้จะมีขนาดโมเลกุลเท่ากัน แต่เอนไซม์ Os3BGlu6 และ Os4BGlu12 สามารถแยกความแตกต่างของไกลโคไซด์ทั้งสองชนิดได้

การศึกษาในอนาคตควรเตรียมสารไกลโคไซด์ Cs/1D1 Cs/1D2 และ Cs/1D3 ในปริมาณมาก เพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้างและการแตกพันธะของสารทั้งสามชนิดนี้โดยเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจากข้าว ซึ่งจะสามารถทำให้ทราบหน้าที่ของเอนไซม์และไกลโคไซด์ในข้าวได้

Abstract:

This project was aimed at the use of β-glucosidase enzymes produced in our lab to identify and characterize glycosides in plant extracts and the mechanism of enzyme hydrolysis of these glycosides. It was broken down into two parts, 1) completion of the characterization of *Dalbergia nigrescens* natural substrates and the use of *D. nigrescens* β-glucosidase to hydrolyze natural isoflavone glycosides, and 2) the identification of rice glycosides that may serve as natural substrates for the rice enzymes characterized in our laboratory.

In the first part, we were able to confirm the structures of two isoflavonoid glycosides, dalnigrecin [dalpatein 7-O-(1,6)-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucopyranoside], and dalnigrin [7-O-β-D-apiosyl-(1,6)-β-D-glucosyl-7-hydroxy-2',4',5',6-tetramethoxyisoflavone] or dalnigrein 7-O-(1,6)-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucopyranoside]. It was also shown that the enzyme hydrolyzed the bond between the glucose and the isoflavone 7-O to release the disaccharide acuminose. This was also found to be true for the recombinant *D. nigrescens* β-glucosidase Dnbglu2, which showed high activity toward these two natural substrates, although it hydrolyzed the soy isoflavone 7-O-glucosides diadzin and genistin with higher efficiency (k_{cat}/K_m values). The *D. nigrescens* β-glucosidase could also hydrolyze soy isoflavones in soy flour extracts and suspensions, suggesting it could be used to increase the levels of free isoflavones in soy products. The enzyme could hydrolyze malonyl and acetyl genistin and diadzin, consistent with its acceptance of an apiosyl group at the 6'-O position on the glucosyl moiety of the natural product glycosides. This work, in addition to suggesting the use of D. nigrescens for soy food processing, generated 3 international journal papers.

In the second part, the rice β-glucosidases Os3BGlu7 and Os4BGlu12 were used to screen for natural glycoside substrates in methanolic extracts of rice seedling shoot and root and mature rice plant at flowering stage shoot and root fractions. Initial experiments indicated that both compounds could hydrolyze a fluorescent glycoside in seedling shoots, but insufficient quantity and purity of glycoside was generated to determine the structure. Since the Os4BGlu12 enzyme is more stable for storage, it was used for further screening and was found to hydrolyze glycosides in seedling roots and mature leaf and stem. The leaf and stem glycoside fraction was purified by LH20 column chromatography, preparative TLC and reverse phase HPLC to give 3 apparently pure glycosides from one TLC spot from a pool of LH20 fractions, as well as some as yet impure glycosides. The three purified components, Cs/lD1, Cs/lD2, and Cs/lD3 were analyzed by electrospray mass spectrometry to show they have apparent molecular masses of 492, 688 and 688, respectively. The mass of the Cs/lD1 matches that of a trihydroxyl dimethoxy glucoside, such as tricin 4'-O-β-D-glucoside and tricin 7-O-β-D-glucoside, which have been reported to occur in rice. Further preparations of large amounts of material will be needed for complete structure determination by NMR. It was found that three rice β-glucosidases with known structures, Os3BGlu6, Os3BGlu7 and Os4BGlu12, hydrolyzed Cs/lD1 at similar rates, but Cs/lD2 was hydrolyzed most rapidly by Os3BGlu6, while Cs/lD3 was hydrolyzed most rapidly by Os4BGlu12. Thus, despite the fact that they have the same mass, the Os3BGlu6 and Os4BGlu12 enzymes seem to differentiate these two compounds. Further studies of large scale preparations of Cs/lD1, Cs/lD2 and Cs/lD3 will allow structural characterization and kinetic studies of their hydrolysis by the rice β-glucosidases, which can tell about the functions of these enzymes and the glycosides.