

งานวิจัยนี้เพื่อจะทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเบต้า-กลูโคซิเดสที่ย่อยจำเพาะต่อสาร iridoid glucoside โดยการคัดเลือกจากพืชในตระกูล Oleaceae 5 ชนิดที่พบว่ามีสาร iridoid- $\beta$ -glucoside มีปริมาณสูงในใบ พบว่าต้นขี้ชม (*Ligustrum confusum*) มีเอนไซม์จากใบขี้ชมมีทั้งเอนไซม์และสับสเตรทธรรมชาติ สับสเตรทธรรมชาติจากต้นขี้ชมสามารถทำบริสุทธิ์โดยการสกัดด้วย MeOH และใช้คอลัมน์ Sephadex LH-20, MPLC และ Sephadex LH-20 ตามลำดับ จะได้สารบริสุทธิ์สีเหลืองน้ำตาล (Amorphous yellow power) ข้อมูลของ spectroscopy ของ NMR และ 2-D NMR และ Mass spectrometry พบว่าเป็นสารประเภท Secoiridoid  $\beta$ -glucoside ที่เคยรายงานแล้ว ที่ชื่อ Ligustalosite A และถูกย่อยได้ดีด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากอัลมอลด์และใบขี้ชม เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากใบขี้ชมจะพบได้ใน Thylakoid membrane ของคลอโรพลาสต์ และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสับสเตรทธรรมชาติชนิดต่างๆ พบว่าเบต้า-กลูโคซิเดสจากใบขี้ชมสามารถย่อย Ligustalosite A ได้ดีที่สุด โดยไม่สามารถย่อย iridoid  $\beta$ -glucoside ชนิดอื่นๆ คือ Gonocaryoside A, Kingiside, Plumieride coumarate glucoside และ Steroidal glucoside (torvoside A) แต่สามารถย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ pNP- $\beta$ -glucoside และ 4-MU- $\beta$ -Glucoside ได้เล็กน้อย ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า เบต้า-กลูโคซิเดสจากใบขี้ชมมีความสามารถในการย่อยจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติ ligustalosite A มากกว่า สับสเตรทธรรมชาติชนิดอื่น ๆ จากการเตรียมสาร Aglycones จากสารไกลโคไซด์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Torvoside A และ Torvoside H จากผลมะเขือพวง Plumieride coumarate glucoside จากดอกฉันทม Dalcochinin-8'-O- $\beta$ -glucoside จากเมล็ดพะยูน และ Ligustalosite A จากใบขี้ชม โดยการย่อยด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากอัลมอลด์ จะได้สาร Aglycone ดังนี้ 26-degluco-torvoside A, 26-degluco-torvoside H, 13-O-coumarylplumieride และ Dalcochinin ตามลำดับ เมื่อนำสารไกลโคไซด์และ Aglycone ที่เตรียมได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (HEPES Simplex type I และ tape II) ยกเว้น torvoside H และ 26-degluco-torvoside H แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อโรคเขตร้อนคือ *Trichomonas vaginalis* พบว่าสารไกลโคไซด์ส่วนมากมีฤทธิ์ต้านเชื้อดีกว่า aglycone ของตัวมันเอง สารไกลโคไซด์ที่มีฤทธิ์ต้าน *Trichomonas vaginalis* ได้ดี คือสารประเภท iridoid glucosides (Plumieride coumarate glucoside, Gonocaryoside A, Kingiside A) และ สารประเภท steroidal glycoside (Torvoside A) แต่ aglycone ของสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Trichomonas vaginalis* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารไกลโคไซด์ นอกจากนี้สารไกลโคไซด์และ aglycones เกือบทุกชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อใช้ Vero KB (oral epidermal carcinoma) และ MCF-7 (human breast adenocarcinoma) cell line ยกเว้น Dalcochinin ที่มีฤทธิ์ต้าน Vero cell , KB และ MCF-7 cell line

This research is aimed to purify and characterize a  $\beta$ -glucosidase specifically hydrolyzing iridoid glucosides from Thai plants. Ligustalloside A, a known secoiridoid  $\beta$ -glucoside and a natural substrate of  $\beta$ -glucosidase, was purified from the *Ligustrum confusum* leaves. Structure elucidation of ligustalloside A was established by analyses of their NMR, 2D-NMR and mass spectroscopy data. Ligustalloside A could be readily hydrolyzed by crude aqueous extract containing  $\beta$ -glucosidase from the *Ligustrum* leaves. *Ligustrum*  $\beta$ -glucosidase was found to locate in the thylakoid membrane of chloroplast. When the hydrolytic activities of  $\beta$ -glucosidase towards both various natural substrates and synthetic substrates were tested, *Ligustrum*  $\beta$ -glucosidase was able to hydrolyze ligustalloside A and showed little hydrolysis of synthetic substrates, 4-MU- $\beta$ -glucoside and pNP- $\beta$ -glucoside. Additionally, this enzyme did not hydrolyze torvoside A and the other iridoid- $\beta$ -glucosides (gonocaryoside A, kingiside, and plumieride coumarate glucoside). In conclusion, *Ligustrum*  $\beta$ -glucosidase prefers to hydrolyze a natural substrate ligustalloside A rather than other  $\beta$ -glycosides. Furthermore, the objective of this research is to test biological activities of glycosides and its corresponding aglycones prepared by enzymatic hydrolysis of various glycosides isolated from Thai plants. Upon enzymatic hydrolysis of  $\beta$ -glycosides with almond  $\beta$ -glucosidase, torvoside A and torvoside H yielded 26-degluco-torvoside A and 26-degluco-torvoside H; dalcochinin-8'-O- $\beta$ -glucoside yielded dalcochinin; plumieride coumarate glucoside yielded 13-O-coumarylplumieride. Gonocaryoside A and kingiside was purified and prepared from *Gonocaryum robbianum*. Biological activities tested showed that glycosides including iridoid glucoside (gonocaryoside A, Kingiside plumieride coumarate glucoside) and steroidal glucoside (torvoside A) exhibited a potent anti-*Trichomonas vaginalis* activity but its corresponding aglycone showed less potent of anti-*Trichomonas vaginalis* activity. In addition, all compounds showed no cytotoxicity (at 50  $\mu$ g/ml) against Vero KB and MCF-7 cell lines except dalcochinin had cytotoxicity activity against cancer and Vero cell lines.