บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ดาลโคซิเนส) จากเมล็ดพะยูงในเรื่องต่างๆ ได้แก่ โครงสร้างและวิวัฒนาการของเอนไซม์ โครงสร้างและแอคติวิตีชีวภาพของสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ และการใช้เอนไซม์ เพื่อประโยชน์ในการสังเคราะห์สารจำพวกไกลโคไซด์ โดยที่เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอ ไซม์ที่กลุ่มวิจัยนี้เป็นผู้ค้นพบเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์นี้ในรายละเอียดในเรื่องของสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผลการศึกษาสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ชนิดนี้ โดยการเตรียมสับสเตรทธรรมชาติบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างทางเคมีพบว่าเป็นสารจำพวกไอโซฟลาโวนอยด์ตัวใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อน จึงตั้งชื่อสารดังกล่าวนั้นว่า ดาลโคชินิน-8'-โอ-เบต้า-กลูโคไซด์โดยเลียนแบบการเรียกชื่อคล้ายกับสารประกอบที่เคยมีรายงานแล้วที่ชื่อว่า อะมอร์ฟิเจนิน-8'-กลูโคไซด์ พบว่าสารดาลโคชินิน-8'-โอ-เบต้า-กลูโคไซด์ตัวนี้และส่วนที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรท (อะไกลโคน) ไม่มีฤทธิ์ในการใช้เป็นยารักษาโรคมาเลเรีย แต่ส่วนของสารที่ไม่มีหมู่คาร์โบไฮเดรทมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไมโตคอนเดรียเล็กน้อย อย่างไรก็ตามพบว่าสารดาลโคชินิน-8'-โอ-เบต้า-กลูโคไซด์มีปริมาณสูงมากในเมล็ดพะยูง โดยพบมากถึง 3 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักในเมล็ดแห้ง ดังนั้นสารนี้น่าจะมีหน้าที่สำคัญในเมล็ดพะยูง ซึ่งควรจะต้องศึกษาในรายละเอียด

เมื่อเลือกส่วนของเปปไทด์ที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่แยกได้ด้วยเครื่องแยกสารความดันสูงมาศึกษาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนและนำผลที่ได้ไปใช้ออกแบบไพร์เมอร์โอลิโกนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ทำการโคลนเอนไซม์และหาลำดับ ซีดีเอนเอที่ได้พบว่าแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 547 ตัวโดยแบ่งเป็นส่วนของโปรเปปไทด์ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 23 ตัว และในโปรตีนสมบูรณ์ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 524 ตัว และพบว่าลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากเปปไทด์ของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากเอนไซม์ธรรมชาติเป็นส่วนหนึ่งของผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยการเตรียมซีดีเอนเอ ยืนยันว่าลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้จากซีดีเอนเอเป็นของเอนไซม์ดาลโคชิเนสที่ศึกษาอยู่จริง เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มีผู้รายงานมาแล้วพบว่าเอนไซม์สมบูรณ์จะมีลำดับกรดอะมิโน 60 เปอร์เซ็นต์ เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไซยาโนเจนิก เบต้ากลูโคซิเดสของไวท์โคลเวอร์ ในหมู่ของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลสตระกูล 1 การหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ทำโดยการเทียบกับเอนไซม์อื่นในตระกูลเดียวกันพบว่าเป็นการเร่งโดยใช้หมู่นิวคลีโอไฟล์ของกรดอะมิโนกลูตามิกที่ตำแหน่งที่ 396 และหมู่กรดของกรดอะมิโนกลูตามิกที่ตำแหน่งที่ 182 ของโปรตีนสมบูรณ์จากดาลโคชิเนส เมื่อศึกษาโดยสร้างแบบจำลองสามมิติของโครงสร้างโปรตีนโดยใช้การเทียบเลียนแบบจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไซยาโนเจนิก เบต้ากลูโคซิเดสของไวท์โคลเวอร์ที่สร้างขึ้นจากผลการศึกษาการหักเหของรังสีเอกซ์เมื่อผ่านผลึกเอนไซม์ที่ได้มีผู้รายงานไว้ก่อนแล้ว พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ในตระกูลนี้เป็นบริเวณที่อนุรักษ์ ยกเว้นในเอนไซม์ดาลโคชิเนสพบว่ามีการแทนที่กรดอะมิโนฮิสติดีนที่ตำแหน่ง 253 และ กรดอะมิโนเซรีนที่ตำแหน่ง 184 ด้วยกรดอะมิโน วาลีนและทริปโตเฟน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีตำแหน่งกรดอะมิโนที่สามารถเกิดการเติมหมู่คาร์โบไฮเดรทได้ 8 ตำแหน่ง และได้ยืนยันความถูกต้องของตำแหน่งหนึ่งด้วยเทคนิคการย่อยโปรตีนแบบเอ็ดแมน ดีเกรดเดชัน และวิเคราะห์ผลด้วยแมส สเปคโตรสโคปี โปรตีนดาลโคชิเนสสามารถแสดงออกได้ในยีสต์ พิเชีย พาสโตริส และผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์นี้ที่แสดงออกในยีสต์พบว่า เอนไซม์รีคอมบิเนนท์ที่แสดงออกนั้นมีค่า K_m สำหรับสาร พีเอนพี กลูโคไซด์และ พีเอนพี ฟิวโคไซด์เหมือนกับ

ค่า K_m ของเอนไซม์ที่แยกได้จากธรรมชาติ และมีค่าอัตราส่วนของV_{max} เหมือนกับของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากเมล็ดพะยูง และมีความสามารถในการย่อยสับสเตรทธรรมชาติคือ สารดาลโคชินิน-8'-โอ-เบต้า-กลูโคไซด์ ได้เหมือนกับเอนไซม์ธรรมชาติ

จากการศึกษาการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ดาลโคชิเนส) จากเมล็ดพะยูงในการสังเคราะห์สารจำพวกไกลโคไซด์โดยปฏิกริยาทรานสกลูโคซิเลชันโดยใช้สารจำพวกอัลกอฮอร์เป็นตัวรับหมู่น้ำตาล พบว่า ปฏิกริยาที่ใช้สารจำพวกอัลกอฮอล์ปฐมภูมิ เมธานอล เอธานอล และ1-โปรปานอล จะสามารถได้ผลผลิตเป็นสารอัลคิลไกลโคไซด์มากที่สุด และใช้สารพีเอนพี-กลูโคสไปกว่า 90 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เมื่อใช้สารบิวธานอลปฐมภูมิ 1-บิวธานอล และ 2-เมธิล-1-โปรปานอลจะได้ผลผลิตมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมีผลผลิตเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อใช้อัลกอฮอล์ทุติยภูมิ คือประมาณ 40 เปอร์เซนต์เมื่อใช้ 8.6 โมลาร์ของ 2-โปรปานอล และ มีผลผลิตเกิดขึ้น 27 เปอร์เซนต์เมื่อใช้ 2.2 โมลาร์ของ 2- บิวธานอล และไม่เกิดการย้ายหมู่น้ำตาลเลยเมื่อใช้อัลกอฮอล์ตติยภูมิ คือ 2-เมธิล-2-โปรปานอลเป็นตัวรับ จากการศึกษาผลของเวลาต่อการสังเคราะห์สารไกลโคไซด์แสดงให้เห็นว่า เมธิลกลูโคไซด์ และ โปรปิว-1-กลูโคไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถทนต่อการสลายด้วยน้ำเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ดาลโคชิเนส) สามารถใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์สารไกลโคไซด์ได้ดีกว่าเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากอัลมันด์ โดยใช้ขบวนการทรานสกลูโคซิเลชัน เพื่อย้ายหมู่น้ำตาลจากตัวให้ที่เป็นพีเอนพีกลูโคไซด์ไปยังตัวรับที่เป็นสารจำพวกอัลคิลอัลกอฮอล์สายยาวได้แก่ 1-โปรปานอล 1-บิวธานอล 1-เฮกซานอล และ 1 ออกตานอล เอนไซม์ดาลโคชิเนส ยังสามารถย้ายหมู่น้ำตาลไปยังหมู่ไฮดรอกซีปฐมภูมิของตัวรับที่เป็นสารพวกไดออล์สายสั้น เช่น เอธีลีนไกลคอลได้อีกด้วย และยังสามารถสร้างกลูโคไซด์โดยใช้ เบนซิลอัลกอฮอล์และไซโคลเฮกซานอลเป็นตัวรับหมู่น้ำตาลได้แต่จะใช้ฟีนอลเป็นตัวรับไม่ได้ นอกจากนี้ด้วยปฏิกริยาทรานสกลูโคซิเลชันนี้เอนไซมีนี้จะใช้สร้างสารดาลโคชินิน ไกลโคไซด์ที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์นี้ได้บ้างในปริมาณน้อยอีกด้วย

Abstract

TE 144493

The purpose of the present work was to study the enzyme Thai Rosewood β-glucosidase (dalcochinase) in terms of its structure and evolution, the structure and biological activity of its natural substrate, and the use of the enzyme to synthesise glycosides. This enzyme was discovered by us, purified and characterised in terms of kinetic properties, in earlier work supported by the National Research Council of Thailand.

The natural substrate of the enzyme was purified and shown to be a novel isoflavonoid β-glucoside, which we called dalcochinin-8'-O-β-glucoside, similar to the previously described compound amorphigenin-8'-glucoside. Dalcochinin-8'-O-β-glucoside and its aglycone failed to show antimalarial activity, antibacterial activity or mosquitocidal activity, but the aglycone showed slight inhibition of mitochondrial activity. However, dalcochinin-8'-O-β-glucoside is present in large amounts, namely 3% by weight in the seed, so that its may fulfil some still unknown function.

Selected peptides were isolated from Thai Rosewood dalcochinase by HPLC, sequenced, and used to design oligonucleotide primers for cloning and sequencing the enzyme. The cDNA included a reading frame coding for 547 amino acids including a 23 amino acid propeptide and a 524 amino acid mature protein. The sequences determined at peptide level were found in the cDNA sequence, indicating the sequence obtained was indeed the dalcochinase enzyme. The mature enzyme is 60% identical to the cyanogenic β-glucosidase from white clover glycosyl hydrolase family 1. Active site residues identified by homology were the catalytic nucleophile Glu 396 and catalytic acid Glu 182 in the mature *D. cochinchinensis* protein. Modeling of the three-dimensional structure, based on the white clover X-ray crystal structure, showed that most residues in the active site were conserved, except that His 253 and Ser 184 in dalcochinase were replaced by Val and Trp in white clover respectively. Eight putative glycosylation sites were identified and one was confirmed to be glycosylated by Edman degradation and mass spectrometry. The protein was expressed as an prepro-alpha-mating factor fusion in *Pichia pastoris* and the activity of the secreted enzyme characterized. The recombinant enzyme had the same K_m for pNP-glucoside and pNP-fucoside and the same ratio of V_{max} for these enzymes as the enzyme purified from seeds and similarly hydrolyzed the natural substrate, dalcochinin-8′-β-glucoside.

Thai Rosewood β-glucosidase was used for synthesis of β-glucosides. With the primary alcohols, methanol, ethanol, and 1-propanol, maximum yields of alkyl glucoside in terms of total pNP-Glc used exceeded 90%, while for primary butanols, 1-butanol and 2-methyl-1-propanol, yields exceeded 70%. Alkyl glucoside yields were much lower for secondary alcohols, reaching 40% for 8.6 M 2-propanol and 27% for 2.2 M 2-butanol, and no transglucosylation was found with the tertiary alcohol, 2-methyl-2-propanol. Time course studies indicate that the methyl glucoside and propyl-1-glucoside formed were stable to hydrolysis for at least 24 hours. Thai rosewood dalcochinase showed higher levels of transglucosylation with the longer chain alkyl alcohols 1-propanol, 1-butanol, 1-hexanol and 1-octanol than almond β-glucosidase. It could also transglucosylate the primary hydroxyl in short chain diols, such as ethylene glycol. Glucosides could also be formed with benzyl alcohol and cyclohexanol, but not with phenol. Small amounts of dalcochinin glycosides could also be formed by transglycosylation.