รหัสโครงการ SUT-102-43-36-02

รายงานการวิจัย

การแสดงลักษณะเฉพาะของไกลโคซิเดสจากพืชตระกูลถั่วป่า

[Characterization of Glycosidases from Forest Legumes]

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

บทคัดย่อภาษาไทย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิ บทบาทหน้าที่และการนำไปประยุกต์ใช้ของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสจากไม้ยืนต้นตระกูลถั่วที่พบในป่าของประเทศไทย เนื่องจากข้อจำกัดของงบประมาณจึงได้ศึกษา 2 เอนไซม์ คือ เอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้านและเบต้ากลูโคสิเดสจากฉนวน เอนไซม์ทั้งสองถูกแยกจากเมล็ดและต้นอ่อนและได้ทำการโคลน cDNA จากการสร้าง recombinant ไคติเนสใน *E.coli* พบว่าเอนไซม์นี้มีกิจกรรมคล้ายคลึงกับเอนไซม์ที่แยกได้จากพืชด้วยวิธี chitin-affinity adsorption เอนไซม์ทั้งจากพืชและ recombinant *E.coli* สามารถย่อยสลาย ซับสเตรตจำพวกไคตินได้ดี โดยสามารถย่อยสลาย colloidal chitin ได้ดีที่สุด ผลลัพท์จากการย่อยสลายส่วนใหญ่จะเป็น N, N'-diacetylchitobiose และ N, N', N"-triacetyl chitotriose ในระยะต้นและในระยะเวลาที่นานขึ้นจะได้ N-acetylglucosamine และ chitiobiose และยังพบว่า recombinant ไคติเนสสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา 13 ชนิด ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจจะชี้ให้เห็นถึงศักยภาพการนำเอาไคติเนสนี้ไปประยุกต์ใช้ในการเกษตรกรรม

เบต้ากลูโคสิเดสจากเมล็ดฉนวนสามารถย่อยสลาย *p*-nitrophenol glycoside ได้ดีใกล้เคียงกับเบต้ากลูโคสิเดสจากเมล็ดพยุง แต่ความสามารถในการย่อยสลาย isoflavanoind และ steriod β-glucosides นั้นแตกต่างกัน เบต้ากลูโคสิเดสจากฉนวนสามารถย่อยสลาย isofavanoid glycosides 2 ชนิด ที่แยกจากเมล็ดฉนวนได้แต่ เอนไซม์จากพยุงไม่สามารถย่อยสลายซับสเตรตทั้ง 2 ตัวนี้ได้ ทั้งๆ ที่ลำดับสายกรดอะมิโนของเอนไซม์จากฉนวนนั้นมีความเหมือนกับเอนไซม์จากพยุงถึง 85% เนื่องจากcDNA ของเอนไซม์จากฉนวนไม่สามารถแสดงออกใน *E.coli หรือ Pichia pastoris* ได้ จึงไม่สามารถทำการเปรียบเทียบ recombinant เอนไซม์ได้ อย่างไรก็ตามลำดับกรดอะมิโนเกือบทุกตัวที่มีความสำคัญสำหรับการเกาะกับสับสเตรตและการย่อยสลายของเอนไซม์จากฉนวนและพยุงไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้น พื้นฐานของความแตกต่างกันในการย่อยสับสเตรตจะต้องทำการศึกษาต่อไป

จึงสรุปได้ว่า ไคติเนสจากกระถินบ้าน อาจนำไปใช้ประโยชน์ในการเกษตรโดยนำไปใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของราที่เข้าทำลายพืช และการศึกษาเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเป็นพื้นฐานที่จะพัฒนางานเกี่ยวกับความสามารถในการจับกับสับสเตรต ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบเอนไซม์ให้เหมาะสมต่อไป

Abstract

This project set out to investigate the primary structures, functions and possible application of glycosidase enzymes from legumous trees found in Thai forests. In order to appropriately utilize the resources available, two enzymes were studied, chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit and beta-glucosidase from *Dalbergia nigrescens* Kurz. Both these enzymes were purified from seeds or young plants and their cDNAs cloned. The chitinase was expressed from the cDNA in *Escherichia coli* and the recombinant protein was found to have activity similar to that of protein purified from the plant by chitin-affinity adsorption. Both chitinases could hydrolyze chitinous substrates with the highest activity toward colloidal chitin. The products of both natural purified chitinase and recombinant chitinase hydrolysis were predominantly N,N'-diacetyl chitobiose and N,N',N''-triacetyl chitotriose at short time points and chitiobiose and N-acetylglucosamine at longer time periods. The recombinant protein was also found to significantly inhibit the growth of 13 strains of fugus, suggesting its potential use in agricultural applications. The *D. nigrescens* β-glucosidase was found to hydrolyze *p*-nitrophenol glycosides with similar preference to *D. cochinchinensis* β-glucosidase, but to have different specificity toward natural isoflavanoid and steriod β-glucosides. In particular, *D. nigrescens* β-glucosidase could hydrolyze two apparent isoflavanoid glycosides isolated from *D. nigrescens* seeds, while the *D. cochinchinensis* enzyme could not hydrolyze them well. Despite this, the protein deduced from the *D. nigrescens* cDNA was 85% identical to the *D. cochinchinensis* β-glucosidase and matched peptide sequences from the purified protein, though active protein could not be expressed by recombinant expression from the *D. nigrescens* cDNA in either *E. coli* or *Pichia pastoris*. Sequence analysis confirmed that almost all amino acid residues previously identified as being important for substrate binding and hydrolysis were identical between the *D. cochinchinensis* and *D. nigrescens* β-glucosidases, so the basis for their different specificities remains to be studied further. Thus, the *L. leucaena* chitinase provides a useful enzyme to be studied for agricultural application in preventing fungal disease, while the β-glucosidase work provides a basis for work on determinants of substrate specificity, which may be used to engineer enzymes for specific uses in the future.