บทคัดย่อ

สารอนุพันธ์ของจิบเบอเรลลิน (gibberellins; GA) 9 ชนิด ประกอบด้วย acetylated และ deacetylated ของ GA_4 glucosyl ester (GA_4-GE), acetylated และ deacetylated ของ GA_3 glucosyl ester (GA_3-GE), GA_4 และ GA_3 methyl ester, 3-O-β-D-glucopyranosyl GA_3 methyl ester, 13-O-β-D-glucopyranosyl GA_3 methyl ester, และ β-D-glucopyranosyl GA_4 methyl ester ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้เป็นสับสเทรตสำหรับตรวจหาเอนไซม์เบตา-ดี-กลูโคสิเดสที่มีความสามารถในการไฮโดรไลส์สารอนุพันธ์ของจิบเบอเรลลิน โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดด้วยเครื่อง nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

ตัวอย่างจากเมล็ดข้าว รำข้าว ต้นอ่อน และรากข้าวที่มีอายุ 7 วัน ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เพื่อตรวจหาเอนไซม์เบตา-ดี-กลูโคสิเดสที่มีความสามารถในการไฮโดรไลส์สารอนุพันธ์ของจิบเบอเรลลิน โดยสกัดตัวอย่างแต่ละชนิดและแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค affinity chromatography และ ion exchange chromatography และตรวจหาเอนไซม์เป้าหมายที่มีความสามารถในการไฮโดรไลส์ *p*-nitophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPGlc) และ GA_4-GE จากการศึกษาพบกิจกรรมของเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดสในส่วนสกัดหยาบจากรำข้าว เมล็ดข้าว ต้นอ่อน และราก เช่นเดียวกันกับส่วนที่แยกได้จาก ion exchange columns อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถแยกเอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีกิจกรรมสูงได้

การทดสอบความสามารถในการไฮโดรไลส์ *p*NPGlc และ GA_4-GE โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในตระกูล GH1 จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Os3BGlu6, Os3BGlu7 (BGlu1), Os4BGlu12, Os3BGlu18 และ Os9BGlu31 พบว่า Os3BGlu6 สามารถไฮโดรไลส์ GA4-GE ได้ดีที่สุด ในขณะที่ Os4BGlu12 สามารถไฮโดรไลส์ *p*NPGlc ดีกว่า Os3BGlu6 ถึง 50 เท่า อย่างไรก็ตาม Os4BGlu12 สามารถไฮโดรไลส์ GA4-GE ได้เพียงร้อยละ 20 ของที่ไฮโดรไลส์โดย Os3BGlu6 จากข้อมูลที่ได้ Os3BGlu6 จึงถูกใช้เป็นต้นแบบ ในการศึกษาการไฮโดรไลส์ glucosyl ester (GA4-GE) เปรียบเทียบกับการไฮโดรไลส์กลูโคไซส์

Abstract

In order to monitor the extraction of β-D-glucosidases that can hydrolyze gibberellin (GA) conjugates from rice, 9 GA conjugates, which included acetylated and deacetylated gibberellin GA_4 glucosyl esters (GA_4-GE), acetylated and deacetylated GA_3 glucosyl esters, GA_4 methyl ester, GA_3 methyl ester, 3-O-β-D-glucopyranosyl gibberellin A_3 methyl ester, 13-O-β-D-glucopyranosyl gibberellin A_3 methyl ester and β-D-gluco-pyranosyl gibberellin A_4 methyl ester, were synthesized. Their structures were identified with nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

To identify a GA β-D-glucosidase from rice, rice seeds, glumes, 7-day rice seedlings and roots were extracted and the β-D-glucosidase activities were purified with affinity chromatography and ion exchange chromatography. The fractions were monitored for hydrolysis of *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPGlc) and GA_4-GE. The β-glucosidase activities were found in the crude extracts of glumes, seeds, seedlings and roots, as well as their fractions from the ion exchange columns; but the pure protein with high activity has not been separated yet.

Five rice GH1 enzymes that have been expressed in our lab, Os3BGlu6, Os3BGlu7 (BGlu1), Os4BGlu12, Os3BGlu18 and Os9BGlu31 were tested for the hydrolysis of *p*NPGlc and GA_4-GE. Os3BGlu6 was found to have the highest hydrolysis activity to GA_4-GE among these enzymes. The activity of Os4BGlu12 to hydrolyze *p*NPGlc was 50 times higher than Os3BGlu6, but the activity to hydrolyze GA_4-GE of Os4BGlu12 was only 20% of that of Os3BGlu6. Based on these data, Os3BGlu6 has become a model for hydrolysis of the glucosyl ester (GA_4-GE) in comparison to glucosides.