บทคัดย่อ

ในพืชชั้นสูงเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสจัดอยู่ในตระกูลไกลโคไซไฮโดรเลส กลุ่มที่ 1 มีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง รวมไปถึงกระบวนการสร้างลิกนิน จากการวิเคราะห์ phylogenetic ของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสในข้าว พบว่า Os4BGlu14 Os4BGlu16 และ Os4BGlu18 มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความใกล้เคียงกับเอนไซม์ในกลุ่มโมโนลิกนอลเบตา-กลูโคซิเดสมากที่สุด จึงนำมาสู่สมมติฐานว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนิน อย่างไรก็ตาม Os4BGlu14 ไม่มีกรดอะมิโนกลูตาเมทในตำแหน่ง catalytic acid/base ดังนั้น Os4BGlu14 อาจเป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถทำงานได้เหมือนไกลโคไซไฮโดรเลส กลุ่มที่ 1 ทั่วไป ยีน Os4BGlu16 ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ในยีสต์ เอนไซม์ผสม Os4BGlu16 ที่ถูกผลิตและแยกให้บริสุทธิ์จากอาหารที่ใช้เลี้ยง Os4BGlu16 ด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ในทางกลับกัน Os4BGlu18 สามารถผลิตใน *Escherichia coli* โดยมี thioredoxin และ His_6 tags ต่อที่ปลาย N-terminal และนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย anion exchange chromatography hydrophobic interaction chromatography และ IMAC column ตามลำดับ เอนไซม์ Os4BGlu16 และ Os4BGlu18 สามารถย่อยโมโนลิกนอลกลูโคไซด์สับสเตรท coniferin syringin และ p-coumarol glucoside ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าสับสเตรทตัวอื่น

ในการตรวจหาการแสดงออกของยีนโมโนลิกนอลเบตา-กลูโคซิเดสในข้าว พบว่า mRNA ของ Os4BGlu14 มีการตรวจพบมากที่สุดในส่วนของเมล็ด รวง และเกสร ส่วน mRNA ของ Os4BGlu16 พบมากที่สุดในส่วนของใบจากต้นข้าวสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 10 เอนโดสเปิร์ม และเปลือกเมล็ดส่วนนอก และ mRNA ของ Os4BGlu18 ส่วนใหญ่ถูกพบในช่วงแรกของการเจริญเติบโตตั้งแต่สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 4 และยังถูกพบในเกสรและเปลือกเมล็ดส่วนนอกอีกด้วย ข้อมูลเหล่านี้บ่งบอกถึงการทำงานของเอนไซม์โมโนลิกนอลเบตา-กลูโคซิเดสเกิดขึ้นทั้งในช่วงเจริญเติบโตจนถึงช่วงออกผลผลิต

Abstract

Plant glycoside hydrolase family 1 (GH1) β-glucosidases have been implicated in several functions, including lignification. In phylogenetic analysis of rice (*Oryza sativa* L.) GH1 β-glucosidases, Os4BGlu14, Os4BGlu16, and Os4BGlu18 grouped closely with known monolignol β-glucosidases, leading to the hypothesis that they may release monolignols from their inactive glucosides. However, Os4BGlu14 lacks the conserved glutamate in the acid/base position found in other GH1 β-glucosidases, so it may not be active. An optimized Os4BGlu16 cDNA was synthesized for expression of the protein in *Pichia pastoris*. Os4BGlu16 fusion protein was purified from induced *P. pastoris* culture media by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) to yield a single prominent protein band on SDS-PAGE analysis and strong β-glucosidase activity. In contrast, active Os4BGlu18 β-glucosidase fusion protein with N-terminal thioredoxin and His_6 tags was successfully expressed and extracted from *E. coli* cells, and was purified by anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and IMAC. Os4BGlu16 and Os4BGlu18 hydrolyzed the monolignol glucosides coniferin, syringin, and *p*-coumarol glucoside with much higher catalytic efficiencies than other substrates.

By quantitative RT-PCR, highest Os4BGlu14 mRNA levels were detected in seed, panicle and pollen. Os4BGlu16 was detected at highest levels in leaf from 4 to 10 weeks, endosperm and lemma, while Os4BGlu18 mRNA was most abundant in vegetative tissues from 1 week to 4 weeks old and in pollen and lemma. These data suggest a role for monolignol β-glucosidases in both vegetative and reproductive rice tissues.