บทคัดย่อ

เบต้ากลูโคซิเดส (β-D-glucopyranosideglucohydrolases, E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก และปลดปล่อยหมู่ไกลโคซิลออกจากไกลโคไซด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ในจีโนมของข้าวพบยีนเบต้ากลูโคซิเดสทั้งหมด 34 ยีน จากการวิเคราะห์ลำดับโปรตีนโดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่า Os1BGlu4 จากข้าวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ BGLU42 จาก *Arabidopsis* และ latex cyanogenic β-glucosidase จาก *Heveabrasiliensis* และเป็นอิสระจากกลุ่มอื่น ๆ เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ Os1BGlu4 จึงทำการผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant Os1BGlu4; rOs1BGlu4) ใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ Origami B(DE3) พบว่าเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนลูกผสมนี้ โดยไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้น (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG) การวิเคราะห์ทางชีวเคมี พบว่าที่ค่าพีเอช 6.5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ การวิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์ rOs1BGlu4 ต่อสารตั้งต้น พบว่าในระดับขั้นโพลีเมอไรเซชัน (degree of polymerization; DP) ของเอนไซม์ลูกผสมนี้มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะ β-(1, 3)-linked oligosaccharides ที่ระดับ 2-3 และพันธะ β-(1, 4)-linked oligosaccharide ที่ระดับ 3-4 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายซับสเตรท โดยอาศัยพื้นฐานของตัวแปรทางจลนศาสตร์ พบว่าเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลาย *p*NP-glucopyranoside (*p*NPG) และ *p*NP-fucopyranoside ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC) ยังแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นจากธรรมชาติ เช่น salicin esculin และ para-coumaryl alcohol glucoside ได้ ในการศึกษาลำดับการย่อยสลายของเอนไซม์โดยใช้ *p*NP-cellobioside เป็นสารตั้งต้น พบว่าเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้เมื่อสารตั้งต้นประกอบไปด้วยกลูโคสตั้งแต่ 2 โมเลกุล ขึ้นไป การศึกษาทรานไกลโคซิเลชั่น พบว่าที่ความเข้มข้น *p*NPG ในระดับสูงเอนไซม์ rOs1BGlu4 มีความสามารถในการส่งต่อกลุ่มของกลูโคสจาก *p*NPG ไปสู่เอทานอลและ *p*NPG ได้ จากการศึกษาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ แสดงให้เห็นว่า $HgCl_2$ delta-glucono-lactone และ $FeCl_3$ มีอิทธิพลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rOs1BGlu4

Abstract

Beta-glucosidases (β-D-glucopyranoside glucohydrolases, E.C. 3.2.1.21) are enzymes that hydrolyze glycosidic bonds to release nonreducing terminal glucosyl residues from glycosides and oligosaccharides. Thirty-four active rice β-glucosidase genes had been identified in the rice genome. Protein sequence based phylogenetic analysis showed that Os1BGlu4 along with *Arabidopsis* BGlu42 and *Heveabra-siliensis* latex cyanogenic β-glucosidase represented an independent cluster. To help narrow the possible functions of Os1BGlu4, recombinant Os1BGlu4 (rOs1BGlu4) was expressed in *E. coli* OrigamiB(DE3). The optimized expression conditions showed that 16hr incubation time at 20^{o}C without isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) inducer were the optimum condition for the expression. Biochemical analyses showed that pH 6.5 and 45^{o}C were optimum conditions for the hydrolysis activity of rOs1BGlu4. The rOs1BGlu4 efficiently hydrolyzed β-(1,3)-linked oligosaccharides of degree of polymerization (DP) 2-3 and β-(1, 4)-linked oligosaccharide of DP 3-4. The rOs1BGlu4 can hydrolyze *para*nitrophenyl-β-D-glu-copyranoside (*p*NPG) and *p*NP-β-D-fucopyranoside efficiently, based on the kinetic parameters. Hydrolysis of natural substrates salicin, esculin and para-coumarylalcohol glucoside by rOs1BGlu4 can be detected by thin layer chromatography (TLC). The study of *p*NP-cellobioside sequential hydrolysis showed that the initial hydrolysis was between the two glucosyl moieties. The transglycosylation studies showed that a high concentration of pNPG, rOs1BGlu4 has the ability to transfer the glucose group of *p*NPG to ethanol and *p*NPG. The inhibition study revealed that $HgCl_2$, delta-glucono-lactone and $FeCl_3$ strongly inhibited the hydrolysis activity of rOs1BGlu4.