บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG 4580066 **ระยะเวลาโครงการ:** 1 กรกฎาคม 2545 - 31 มีนาคม 2551

ชื่อโครงการ: การตรวจสอบหาเอ็นไซม์ไกลคอซิเดสชนิดใหม่จากพืช และการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์อัลฟ่า-แมนนอซิเดสจากเมล็ดถ่อน

ชื่อนักวิจัย: หัวหน้าโครงการ: ดร. สุจินต์ อังกุราวิรุฑธ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
มหาสารคาม 44150; E-mail: sujint.a@msu.ac.th
นักวิจัยที่ปรึกษา: ศ. ดร. มรว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์
หน่วยวิจัยโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
กรุงเทพมหานคร 10400; E-mail: scjsv@mahidol.ac.th

เอ็นไซม์ไกลคอซิเดสสามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างและสังเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรต งานวิจัยนี้เป็นการตรวจสอบเอ็นไซม์ไกลคอซิเดสชนิดใหม่ที่น่าสนใจจากพืช เพื่อการแยกและศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ดังกล่าว จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ไกลคอซิเดส 6 ชนิด คือ เอ็นอะเซ็ททิลบีต้าดีกลูคอซามินิเดส อัลฟ่าดีแมนนอซิเดส อัลฟ่าดีแกแลคโตซิเดส บีต้าดีแกแลคโตซิเดส อัลฟ่าดีกลูคอซิเดส และบีต้าดีกลูคอซิเดส จากตัวอย่างพืชไทย 59 ชนิด พบว่าเอ็นไซม์อัลฟ่าดีแมนนอซิเดส (EC 3.2.1.24) ในเมล็ดถ่อนมีปริมาณมากที่สุด เมื่อแยกบริสุทธิ์เอ็นไซม์ดังกล่าวจากเมล็ดถ่อนโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนไอออน โครมาโตกราฟฟี่แบบแรงไฮโดรโฟบิค โครมาโตกราฟฟี่แบบเจลฟิลเตรชั่น และโครมาโตกราฟฟี่โดยใช้คอนคานาวาลินเอ ตามลำดับ พบว่าเอ็นไซม์มีมวลโมเลกุลในธรรมชาติเป็น 320 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และมีจุดไอโซอิเล็คตริกเป็น 4.9 จากการวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE และอิเล็คโตรโฟรีซิสแบบ 2 มิติ พบว่าเอ็นไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 110 kDa และ 120 kDa เมื่อเปรียบเทียบการใช้พาราไนโตรฟีนิลไกลคอซัยด์หลายชนิดเป็นสับสเตรทพบว่าพาราไนโตรฟีนิลดีแมนนอซัยด์เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดของเอ็นไซม์โดยมีค่า K_m เป็น 1.2 mM และค่าพีเอชที่ทำงานได้ดีที่สุดในช่วง 3.8-4.6 เอ็นไซม์คงความเสถียรได้ถึงอุณหภูมิ 60 ^{0}ซ. และเอ็นไซม์คงความเสถียรที่ pH 5.0-7.4 หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ. เป็นเวลา 5 ชั่วโมง $CaCl_2$, $MgCl_2$, KCN, $ZnCl_2$ และ EDTA ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์ เอ็นไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่แมนโนสได้เมื่อใช้ดีแมนโนสหรือพาราไนโตรฟีนิลดีแมนนอซัยด์เป็นตัวให้หมู่แมนโนสและแอลกอฮอล์เป็นตัวรับหมู่แมนโนส โดยพบว่าแอลกอฮอล์ปฐมภูมิสายสั้นให้ผลผลิตอัลคิลแมนนอซัยด์ได้มากกว่าแอลกอฮอล์ปฐมภูมิสายยาว ส่วนแอลกอฮอล์ทุติยภูมิให้ผลผลิตน้อยกว่า จากการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่สมรรถนะสูง พบว่าเอ็นไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบย้อนกลับในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ คุณสมบัติของเอ็นไซม์อัลฟ่าดีแมนนอซิเดสในเมล็ดถ่อนอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาบทบาทของคาร์โบไฮเดรตในระบบของสิ่งมีชีวิต และการสังเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและยา

คำหลัก: เอ็นไซม์ไกลคอซิเดส เอ็นไซม์ไกลคอไฮโดรเลส อัลฟ่าดีแมนนอซิเดส ถ่อน ทิ้งถ่อน

Abstract

Project Code: TRG 4580066 **Project Period:** 1 July 2002 - 31 March 2008

Project Title: Screening for Novel Plant Glycosidases and Characterization of α-mannosidase from *Albizia procera* Benth.

Investigators: Sujint Anguravirutt[1] and M.R. Jisnuson Svasti[2]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham, Thailand, E-mail: sujint.a@msu.ac.th;

[2]Center for Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand, E-mail: scjsv@mahidol.ac.th

Glycosidases are enzymes which can be applicable to carbohydrate bioengineering by using either their specific hydrolytic activity or their reverse hydrolytic activity. This study aims to search for novel plant glycosidases and to isolate and characterize one such enzyme. Screening of six glycosidases namely: N-acetyl-β-D-glucosaminidase, α-D-mannosidase, α-D-galactosidase, β-D-galactosidase, α-D-glucosidase and β-D-glucosidase from 59 Thai plants showed that the highest enzyme activity was α-D-mannosidase in the seeds of *Albizia procera* Benth. The α-D-mannosidase (EC 3.2.1.24) was purified to apparent homogeneity by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Cellulose, Butyl-Sepharose, Sephacryl S-300 HR, and Con A Sepharose chromatography. It had a native MW of 320 kDa when analyzed by gel filtration, and an isoelectric point of 4.9. Analysis using SDS-PAGE and 2-dimensional gel electrophoresis revealed that the enzyme contained subunits of 110 kDa and 120 kDa. Study with various *p*-NP-glycoside-substrates indicated that the enzyme showed by far the highest activity for *p*-NP-α-D-mannoside with the K_m value of 1.2 mM. The enzyme showed a pH optimum for *p*-NP-α-D-mannoside, ranging from pH 3.8-pH 4.6, and was stable up to 60 ^{0}C. It exhibited pH stability at 5.0-7.4 after incubation at 37 ^{0}C for 5 h. $CaCl_2$, $MgCl_2$, and KCN, $ZnCl_2$ and EDTA did not have any significant effect on the enzyme activity with *p*-NP-α-D-mannoside. Transmannosylation activity was observed when the enzyme was incubated with D-mannose or *p*-NP-□-D-mannoside as mannosyl-donor and methanol, or ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 1-pentanol, 2-methyl-1-propanol, 1-hexanol, and 1-heptanol, as mannosyl-acceptor. Short-chain primary alcohols gave better yields of alkyl mannosides than long-chain primary alcohols, and secondary alcohols gave poorer yields. Analysis using HPLC suggested that the enzyme displayed reverse hydrolysis activity for oligosaccharide synthesis. The enzyme properties may be applied to identifying the functional roles of carbohydrates in biological systems or to synthesizing oligosaccharide or glycosides used in food and pharmaceutical industry.

Keywords: glycosidase, glycohydrolase, α-D-mannosidase, *Albizia procera* Benth.