

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION  
OF  $\beta$ -GLUCOSIDASE AND ITS NATURAL SUBSTRATES  
FROM *SOLANUM TORVUM* SW.**

**DUMRONGKIET ARTHAN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2003**

**ISBN 974-04-3731-1**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและสับสเตรทธรรมชาติ จากต้นมะเขือพวง  
(PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  $\beta$ -GLUCOSIDASE AND ITS  
NATURAL SUBSTRATES FROM *SOLANUM TORVUM* SW.)

ดำรงเกียรติ อาจารย์ 4136261 SCBC/D

ปร.ค. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ม.ร.ว. ชัยนุสรณ์ สวัสดิวัตน์, Ph.D., มนตรี จุฬวัฒน์, Ph.D.,  
ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, Ph.D., จริญญา ณรงค์ชวนะ, Ph.D., สุพรรณมา เตชะสกุล, Ph.D.,  
ประสาท กิตตะคุปต์, Ph.D.

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมะเขือพวง (*Solanum torvum* Sw) โดยนำสารสกัดเมธานอลจากผลมะเขือพวงมาทำการแยกบริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีและศึกษาโครงสร้างทางเคมีโดยวิธีการทางเคมีและสเปกโทรสโกปี ได้สาร 2 ชนิด คือ torvoside A และ torvoside H ในระหว่างการทำบริสุทธิ์สับสเตรทธรรมชาติได้สารชนิดใหม่ที่เป็นสาร isoflavonol sulphate (torvanol A) เมื่อนำสับสเตรทธรรมชาติทั้ง 2 ชนิดมาย่อยด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นอัลมอนต์พบว่า ได้สารอนุพันธ์คือ aglycone torvoside A และ aglycone torvoside H เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สาร torvanol A, torvoside H และ aglycone torvoside H มีฤทธิ์ต้าน Hepes simplex virus type I โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 9.6, 23.2 และ 17.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากใบอ่อนต้นมะเขือพวงถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยกระบวนการ 6 ขั้นตอน ดังนี้ คือ การตกตะกอนด้วยเกลืออัมโมเนียมซัลเฟต 30 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว และการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีของ Butyl-Toyopearl, ConA-Sepharose, CM-Accell, Sephacryl S-300 และ Butyl-Sepharose FF จากการทำให้บริสุทธิ์โดยขั้นตอนทั้งหมดดังกล่าวพบว่า เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 169 เท่า และปริมาณแอกทิวิตี้ที่หลงเหลือเท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาขนาดของโมเลกุลของเอนไซม์บนคอลัมน์เซฟาคริล เอส-300 ได้ค่า 87 กิโลดาลตัน และบนอิเล็กโตรโฟรีซิส(SDS-PAGE) ได้ค่า 80 กิโลดาลตัน และพบว่าเอนไซม์มีค่า pI เท่ากับ 9.3 จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อพันธะเบต้า-กลูโคซิดิกสูงมาก โดยจะไม่ย่อยพันธะไกลโคซิดิกชนิดอื่นๆ และยังพบว่าเอนไซม์แสดงความจำเพาะต่อกลูโคสที่ตำแหน่ง C-26 ของสับสเตรทธรรมชาติ (torvoside A และ torvoside H) นอกจากนี้เบต้า-กลูโคซิเดส สามารถย่อย Dalcochinin-8'- $\beta$ -glucoside ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นพะยุง และเอนไซม์สามารถย่อยอัลคิลกลูโคไซด์โดยอัตราเร่งของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเมื่อความยาวของโซ่คาร์บอนเพิ่มขึ้นแต่ไม่สามารถย่อยสับสเตรทธรรมชาติของเบต้า-กลูโคซิเดสชนิดอื่นๆได้ จากการศึกษาทางด้านจลศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสบริสุทธิ์ต่อสับสเตรทธรรมชาติ torvoside A และ torvoside H ได้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 63 และ 68 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าสับสเตรทสังเคราะห์ pNP- $\beta$ -glucoside และ 4-MU- $\beta$ -glucoside ซึ่งมีค่า  $K_m$  เท่ากับ 1.03 และ 0.78 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ เมื่อศึกษาลำดับของกรดอะมิโนภายในสายโพลีเปปไทด์พบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส มีความเหมือนกับเบต้า-กลูโคซิเดส ตระกูลที่ 3

113 หน้า ISBN 974-04-3731-1

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  $\beta$ -GLUCOSIDASE AND ITS NATURAL SUBSTRATES FROM *SOLANUM TORVUM* SW.

DUMRONKIET ARTHAN 4136261 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS : M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D., MONTRI CHULAVATNATOL, Ph.D., DHIRAYOS WITITSUWANNAKUL, Ph.D., SUPANNA TECHASAKUL, Ph.D., JARUNYA NARONGAJAVANA, Ph.D., PRASAT KITTA KOOP, Ph.D.

ABSTRACT

This research was designed to purify and characterize  $\beta$ -glucosidase and the natural substrates for its hydrolysis in *Solanum torvum* Sw. The isolation from a MeOH extract of *Solanum torvum* Sw fruits for  $\beta$ -glucosidase hydrolysis yielded the two natural substrates – a new steroidal glycoside, torvoside H, together with the known glycoside, torvoside A – as well as a new C-4 sulfated isoflavonoid, torvanol A. Upon enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucosidase, torvoside A, and torvoside H yielded the corresponding acetal derivatives, aglycone torvoside A and aglycone torvoside H, respectively. Torvanol A, torvoside H and aglycone torvoside H exhibited antiviral activity (herpes simplex virus type 1) with the IC<sub>50</sub> values of 9.6, 23.2, and 17.4  $\mu$ g/ml, respectively.  $\beta$ -Glucosidase was purified to homogeneity from young leaves of *Solanum torvum* Sw. The purified enzyme was highly specific for the cleavage of the glucose unit attached at the C-26 hydroxyl of torvoside A and H. Kinetic constants showed that K<sub>m</sub> values for torvoside A (63  $\mu$ M) and torvoside H (68  $\mu$ M) were lower than for the synthetic substrates, pNP- $\beta$ -glucoside (1.03 mM) and 4-MU- $\beta$ -glucoside (0.78 mM). The purified enzyme is monomeric with a native molecular weight of 87,000, a subunit molecular weight of 80,000, and a pI of 9.3 by chromatofocusing. The enzyme showed specificity only for the  $\beta$ -D glucosyl bond. *Solanum*  $\beta$ -glucosidase hydrolyzes torvosides and dalcochinin-8'- $\beta$ -glucoside, the natural substrate of Thai rosewood  $\beta$ -glucosidase, but does not hydrolyze other natural substrates from  $\beta$ -glucosidases. *Solanum*  $\beta$ -glucosidase also hydrolyzes C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> alkyl- $\beta$ -glucosides, with rate of hydrolysis increasing with longer alkyl chain length. The internal amino acid sequences of *Solanum*  $\beta$ -glucosidase have a high similarity to the sequences of the family 3  $\beta$ -glucosyl hydrolase.

KEY WORDS :  $\beta$ -GLUCOSIDASE / TORVOSIDE A / TORVOSIDE H/  
*SOLANUM TORVUM* SW.

113 p. ISBN 974-04-3731-1