บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4580040

ชื่อโครงการ : ชีวสังเคราะห์ของสารเทอร์ปีนในต้นเปล้าน้อย

ชื่อนักวิจัย : ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รศ.ดร.วันชัย ตีเอกนามกูล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail address : juraithi@pharmacy.psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มเทอร์ปีนภายในต้นเปล้าน้อยว่าใช้กระบวนการชีวสังเคราะห์แบบ Classical-mevalonate pathway หรือ แบบ Non-mevalonate pathway (Deoxyxylulose phosphate pathway) โดยใช้เทคนิคด้าน feeding experiment และ quantitative ^{13}C-NMR spectroscopy **วิธีการทดลอง** 1.การเตรียมพืช:ยอดเปล้าน้อยถูกตัดและจุ่มในสารละลายดังต่อไปนี้ คือ สารละลาย I 1%(w/v)กลูโคส, สารละลาย II 0.95%(w/v)กลูโคสและ 0.05% (w/v) [U-^{13}C]กลูโคส, สารละลาย III 0.50%(w/v)กลูโคสและ 0.50% (w/v) [1-^{13}C]กลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 25±2 °C เป็นเวลา 10 วัน 2. การแยกสารเปลาโนทอล และสารไฟโตสเตอรอล นำยอดเปล้าน้อยที่ผ่านการบ่มมาสกัดด้วยเมธานอล แยกชั้นด้วย *n*-hexane และนำมาแยกต่อด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี 3. การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR โดยเครื่อง Varian INOVA-500 spectrometer, ที่ 500 MHz และ 125 MHz สำหรับ ^{1}H และ^{13}C ตามลำดับ **ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง** สารเปลาโนทอลเป็นสารกลุ่มอะไซคลิกไดเทอร์ปีน ที่พบในต้นเปล้าน้อย การป้อนสารติดฉลากด้วยสารไอโซโทปเสถียร ชนิด [U-^{13}C] กลูโคส และชนิด [1-^{13}C] กลูโคสให้กับยอดเปล้าน้อยพบว่าสารติดฉลากกลูโคสได้ถูกนำไปใช้ในวิถีชีวสังเคราะห์สู่โครงสร้างของเปลาโนทอล โดยการวิเคราะห์รูปแบบการติดฉลากด้วยเทคนิค NMR สเปคโตรสโคปี ผลการวิเคราะห์รูปแบบการติดฉลากพบว่าในโครงสร้างของสารเปลาโนทอลประกอบด้วยหน่วยไอโซปรีนจำนวน 4 หน่วยประกอบกันและมีลักษณะรูปแบบการติดฉลากไอโซไทปที่เหมือนกันทุกประการ ซึ่งเป็นไปตามการทำนายโครงสร้างของสารเปลาโนทอลที่เริ่มต้นด้วย สารตั้งต้นชนิด [U-^{13}C] กลูโคส และชนิด [1-^{13}C] กลูโคส ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ชนิด deoxyxylulose phosphate การศึกษาในครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นว่าวิถีชีวสังเคราะห์ชนิด deoxyxylulose phosphate (mevalonate-independent) เป็นวิถีชีวสังเคราะห์ที่ใช้ในการสร้างสารเปลาโนทอลในเปล้าน้อย สารไฟโตสเตอรอลเป็นสารกลุ่มไตรเทอร์ปีน ที่พบได้โดยทั่วไปในพืช ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เพื่อศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์สารไฟโตสเตอรอลในพืช ด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาในโมเลกุลของเปลาโนทอล ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณของ ^{13}C- ในโมเลกุลของไฟโตสเตอรอล ทั้งนี้อาจเนื่องจากวิถีชีวสังเคราะห์สารไฟโตสเตอรอล เกิดขึ้นน้อยมากในระหว่างการป้อนสารติดฉลาก จากผลการศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์สารเทอร์ปีนในเปล้าน้อย ด้วยเทคนิคการป้อนสารติดฉลากไอโซโทปชนิดเสถียร ได้ข้อมูลวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเปลาโนทอล ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเปลาโนทอลในระดับเอนไซม์และระดับยีนต่อไป

คำหลัก : *Croton stellatopilosus*, Euphorbiaceae, terpenoid biosynthesis, feeding experiment, plaunotol

Abstract

Project Code: TRG4580040

Project Title: Biosynthesis of Terpenes in *Croton stellatopilosus* Ohba.

Investigators : Juraithip Wungsintaweekul, Dr.rer.nat. Prince of Songkla University

Assoc.Prof. Wanchai De-Eknamkul, Ph.D. Chulalongkorn University

E-mail address : juraithi@pharmacy.psu.ac.th

Project Peroid : 2 years

Objective: To investigate on terpenoid biosynthesis in *Croton stellatopilosus* Ohba. performed via classical-mevalonate or deoxyxylulose phosphate pathways by feeding experiment of isotopic glucoses and elucidating their labeling patterns by quantitative ^{13}C-NMR spectroscopy.

Methodology: 1. Plant materials: ten shoots of *Croton stellatopilosus* Ohba. were cut and immersed into one of the following solutions. Solution I contained 1% (w/v) unlabeled glucose. Solution II contained 0.95% (w/v) unlabeled glucose and 0.05% (w/v) [U-^{13}C]-glucose (99% ^{13}C enrichment). Solution III contained 0.5% (w/v) unlabeled glucose and 0.5% (w/v) [1-^{13}C]-glucose (99% ^{13}C enrichment). The plant segments were incubated at 25±2 $^{\circ}$C for 10 days. 2. Isolation of plaunotol and phytosterols: Plaunotol and phytosterols were extracted from fed plants under reflux with methanol. The residue was dissolved with aqueous ethanol and partitioned with *n*-hexane. Fraction of *n*-hexane was then purified on silica gel chromatography. 3. NMR Spectroscopy: NMR spectra were recorded in $CDCl_3$ on a Varian INOVA-500 spectrometer, operating at 500 MHz and 125 MHz for ^{1}H and ^{13}C respectively.

Results, discussion and conclusion: Plaunotol is an acyclic diterpene alcohol, which is accumulated in Plau-noi, *Croton stellatopilosus* (Euphorbiaceae). Feeding of [U-^{13}C]glucose and [1-^{13}C]glucose into cut shoots showed that the labels from glucose were incorporated into skeleton of plaunotol. The incorporation of [U-^{13}C]glucose and [1-^{13}C]glucose into plaunotol were analyzed by NMR spectroscopy. Data from NMR analysis indicated that the four-isoprenoid moieties of the diterpene showed identical labeling patterns. The labeling patterns were observed as predicted according to the deoxyxylulose phosphate pathway. From this *in vivo* feeding experiments with [U-^{13}C] glucose and [1-^{13}C] glucose indicated that deoxyxylulose phosphate (mevalonate-independent) pathway is the dominant metabolic route for plaunotol biosynthesis in *Croton stellatopilosus* Ohba. Phytosterols were triterpenoid, which commonly found in plants as cell wall stabilizer. From the same condition of feeding experiment, phytosterols were isolated and elucidated their labeling pattern. Phytosterols skeleton showed no detectable ^{13}C labeling. This suggested that phytosterols were biosynthesized before the period of glucose feeding. The result of this study is useful data for further study in plaunotol biosynthesis in depth to enzymology and molecular biology levels.

Keywords: *Croton stellatopilosus*, Euphorbiaceae, terpenoid biosynthesis, feeding experiment, plaunotol