

**PLANT β -GLUCOSIDASES: STUDY OF
TRANSGLUCOSYLATION OF LONG CHAIN ALCOHOLS AND
CRYSTALLISATION OF THAI ROSEWOOD β -GLUCOSIDASE**

RAKRUDEE SARNTHIMA

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

**ISBN 974-04-5236-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากพืช การศึกษาปฏิกิริยาการ โยกย้ายหมู่ น้ำตาลสู่แอลกอฮอล์สายยาว และการตกผลึกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่แยกบริสุทธิ์จากเมล็ดพะยูน

(PLANT β -GLUCOSIDASES: STUDY OF TRANSGLYCOSYLATION OF LONG CHAIN ALCOHOLS AND CRYSTALLISATION OF THAI ROSEWOOD β -GLUCOSIDASE)

รักฤดี สารธิมา 4136801 SCBC/D

ปร. ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ม.ร.ว. ชัยณัฐร สวัสดิวัฒน์, Ph.D., จิรันดร ยูวะนิยม, Ph.D., เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, Ph.D., สุจินต์ อังกราวีรุทธิ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

ศึกษาถึงศักยภาพในการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส จากเมล็ดพะยูน ในปฏิกิริยาการ โยกย้ายหมู่ น้ำตาลสู่แอลกอฮอล์สายยาวเพื่อสังเคราะห์อัลคิล-กลูโคไซด์จากแอลกอฮอล์นั้นๆ โดยใช้สารตั้งต้นตัวให้หมู่ น้ำตาล (Glycosyl donor) และตัวรับหมู่ น้ำตาล (Glycosyl-acceptor) หลายชนิดด้วยกัน และได้ทำการวิจัยเปรียบเทียบผลจากปฏิกิริยาที่เร่งโดยใช้เอนไซม์ ที่แยกบริสุทธิ์จากพืช 3 ชนิด คือ จากเมล็ดพะยูน เมล็ดอัลมอนต์ และจากต้นมันสำปะหลัง ติดตามผลโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี แบบเยื่อบาง และผลิตภัณฑ์ที่ได้คิดเป็น ไมโครโมล % จากการวัดความเข้มด้วย Densitometer โดยมีสารมาตรฐาน n-octyl- β -D-glucoside pNP- β -D-glucoside และ กลูโคส พบว่า เอนไซม์จากพืช ทั้ง 3 ชนิดสามารถใช้สารตั้งต้น ที่เป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิได้ดี ทั้งสายโซ่ตรงและโซ่แขนง ผลผลิตสูงสุดได้จากปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์จากต้นมันสำปะหลัง เอนไซม์จากเมล็ดอัลมอนต์และจากเมล็ดพะยูน ให้ผลผลิตที่ดีเมื่อใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ สำหรับแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ เอนไซม์จากเมล็ดอัลมอนต์ให้ผลผลิตดีกว่า เอนไซม์จากเมล็ดพะยูน แต่เอนไซม์จากต้นมันสำปะหลังเท่านั้นที่สามารถใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นสารตั้งต้นได้ เอนไซม์ ทั้ง 3 ชนิดยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ อัลคิล-กาแลคโตไซด์ และ อัลคิล-ฟิวโคไซด์ได้ด้วย นอกจากนี้พบว่ามีความสามารถต่างกันในการใช้สารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) หรือโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) เอนไซม์จากต้นมันสำปะหลังมีศักยภาพสูง เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปและใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบอื่นๆที่น่าสนใจ และ การศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง 3 มิติ และหน้าที่การทำงาน เป็นอีกทางหนึ่งที่น่าสนใจ จึงได้ทดลองศึกษาการตกผลึกของเอนไซม์จากเมล็ดพะยูนด้วย เพื่อดูว่าสามารถที่จะตกผลึกเพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติ โดยวิธี X-ray crystallography ได้หรือไม่

PLANT β -GLUCOSIDASES: STUDY OF TRANSGLYCOSYLATION OF LONG CHAIN ALCOHOLS AND CRYSTALLISATION OF THAI ROSEWOOD β -GLUCOSIDASE

RAKRUDEE SARNTHIMA 4136801 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D., JIRUNDON YUVANIYAMA, Ph.D., JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., SUJINT ANGURAVIRUTT, Ph.D.

ABSTRACT

The overall aim of this thesis was to study the potential application of Thai rosewood β -glucosidase in transglucosylation of hydrophobic alcohols yielding alkyl-glucosides of corresponding alcohols. The work was extended to synthesis of other alkyl-glucosides of various glycosyl donor and buffer-saturated acceptor substrates, and the results were compared to the reaction of almond β -glucosidase and cassava linamarase. Thin layer chromatography (TLC) was used to analyse the product. The yields of alkyl-glycosides were calculated in $\mu\text{mole}\%$ by densitometry, using n-octyl- β -D-glucoside, pNP- β -D-glucoside, and glucose run in the same TLC as standards. All three plant enzymes studied were shown to transfer glucose to both linear and branched primary alcohols. Excellent alkyl-glucoside yields were obtained using cassava linamarase with all alcohols tested and this was the only enzyme that could transfer glucose to tertiary alcohols. Almond β -glucosidase and Thai rosewood gave high yields with both linear and branched primary alcohols. Transglucosylation of secondary alcohols by almond β -glucosidase was better than that by Thai rosewood β -glucosidase, which had little activity. All three enzymes can synthesize alkyl β -D-galactosides and alkyl- β -D-fucosides. Moreover, the enzymes showed different abilities in using disaccharides or monosaccharides as glycosyl donors for alkyl-glycoside synthesis. The results indicate that cassava linamarase shows high potential in transferring glucose from activated sugar donors to glycosyl acceptors, especially to tertiary alcohols. It may be of interest as a new model for further study and use in synthesis of interesting compounds. Due to differences in the substrate specificity of these plant enzymes, further study on their structure and function relationships are of interest. This work also explores crystallisation trials of Thai rosewood β -glucosidase to see whether the enzyme can be crystallised for the 3D structure determination by X-ray crystallography.

KEY WORDS: β -GLUCOSIDASE/ALKYL-GLUCOSIDE/TERTIARY ALCOHOL/BUFFER-SATURATED /CRYSTALLISATION

137 p. ISBN 974-04-5236-1