

**STRUCTURE AND ACTIVITY RELATIONSHIPS
IN THAI PLANT β -GLUCOSIDASES**

GREANGRAI HOMMALAI

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในพืชไทย (STRUCTURE AND ACTIVITY RELATIONSHIPS IN THAI PLANT β -GLUCOSIDASES)

เกรียงไกร หอมมาลัย 4436744 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ม.ร.ว. ชัยณูสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D., เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, Ph.D., พิมพีใจ ใจเย็น, Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสในพืชไทยประกอบด้วยสองส่วนหลักคือ การศึกษาปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชันของเอนไซม์แต่ละชนิดโดยใช้อนุพันธ์ของน้ำตาลจำพวก 2-deoxy-2-fluoro-sugar ในการยับยั้งปฏิกิริยาเพื่อใช้เตรียมสารตัวกลางกลูโคซิเลเอนไซม์ โดยความจำเพาะต่อการโยกย้ายหมู่น้ำตาลไปยังน้ำตาลตัวรับแอลกอฮอล์แต่ละชนิดสามารถวิเคราะห์ได้โดยการวัดอัตราเร็วการคืนกลับของเอนไซม์แอกทีวิตี้หลังจากที่ถูกยับยั้งในรูปสารตัวกลางดังกล่าว ผลจากการวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์บ่งชี้ว่าบริเวณหมู่ที่จับกับตัวรับหมู่น้ำตาลของเอนไซม์จากมันสำปะหลังมีความเป็นไฮโดรโฟบิกเนื่องจากเอนไซม์สามารถโยกย้ายหมู่น้ำตาลตัวให้ไปสู่หมู่น้ำตาลที่เป็นไฮโดรโฟบิกแอลกอฮอล์ได้ดีซึ่งให้ผลตรงข้ามกับหมู่น้ำตาลที่เป็นน้ำตาลไฮโดรฟิลิก จากการศึกษาปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชันของเอนไซม์จากมันสำปะหลังโดยใช้บิวทานอลพบว่าอัตราเร็วการโยกย้ายหมู่น้ำตาลเกิดได้ดีกับบิวทานอลชนิดปฐมภูมิซึ่งเร็วกว่าชนิดทุติยภูมิและตติยภูมิตามลำดับ เมื่อใช้เอทานอลและอนุพันธ์ของเอทานอลที่มีหมู่แทนที่คลอไรด์เป็นตัวรับน้ำตาลพบว่าอัตราการโยกย้ายหมู่น้ำตาลเกิดได้เร็วกว่าแอลกอฮอล์ที่มีค่า pK_a ต่ำ ซึ่งสามารถแตกตัวเกิดเป็นหมู่อัลคอกไซด์ในการเข้าทำปฏิกิริยาได้ดี แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเกิดหมู่อัลคอกไซด์มีความสำคัญเป็นหลักในระหว่างขั้นตอนการเกิดสถานะทรานซิชันของเอนไซม์ การศึกษายิจัยในส่วนที่สองศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์เซลโลอลิโกแซ็กการไรด์โดยใช้เอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสจากข้าวที่กรดอะมิโนกลูตามาตำแหน่งที่ 414 ถูกตัดแปลงเป็นกรดอะมิโนไกลซีน ซีรีน และ อะลานีน ผลการทดลองพบว่าการตัดแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวสามารถทำลายการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ อย่างไรก็ตามการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ยังสามารถกู้คืนกลับได้เมื่อใช้สารที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ประจุลบเข้าทำปฏิกิริยาเป็นการพิสูจน์ว่ากรดอะมิโนกลูตามาตำแหน่งดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนิวคลีโอไฟล์ นอกจากนี้มีวแคนท์เอนไซม์แต่ละชนิดสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซ็กการไรด์สายยาวต่างกัน ได้โดยปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่น้ำตาลเมื่อใช้น้ำตาลหมู่ให้ชนิด α -glucosyl fluoride และน้ำตาลหมู่น้ำตาลชนิด pNP -cellobioside ผลการศึกษาวแคนท์เอนไซม์แต่ละชนิดพบว่าไกลซีนวแคนท์เร่งปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่น้ำตาลได้เร็วที่สุดเร็วกว่า ซีรีน และอะลานีนวแคนท์ ถึง 3 เท่า และ 19 เท่า ตามลำดับ และให้ผลผลิตที่ไม่ละลายน้ำมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ที่อัตราส่วนน้ำตาลหมู่ให้ต่อน้ำตาลหมู่น้ำตาล 5 ต่อ 1 ผลการการวิเคราะห์ทาง ^{13}C -NMR การเมธิลเลชัน และแมสสเปกโทรสโกปี แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำเป็นโอลิโกแซ็กการไรด์ที่เชื่อมต่อด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด β -(1,4) มีความยาวประมาณ 5 ถึง 11 หน่วยของน้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่าไกลซีนวแคนท์มีความชอบน้ำตาลหมู่น้ำตาลที่เป็นโอลิโกแซ็กการไรด์สายยาวโดยที่แต่ละโมเลกุลของน้ำตาล โมเลกุลเดียวกันมีปฏิสัมพันธ์กับบริเวณหมู่จับน้ำตาลของเอนไซม์อย่างน้อยสามโมเลกุลในการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ที่ให้ผลผลิต

**STRUCTURE AND ACTIVITY RELATIONSHIPS IN THAI PLANT
β-GLUCOSIDASES**

GREANGGRAI HOMMALAI 4436744 SCBC/D
Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D., JAMES R. KETUDAT-
CAIRNS, Ph.D., PIMCHAI CHAIYEN, Ph.D.

ABSTRACT

This study of structure and activity relationships in Thai plant β-glucosidases consists of two main parts. The first part concerns studies of the transglucosylation reactions of these enzymes using trapped-enzyme intermediates. In this study, β-glucosidases from Thai rosewood, cassava and rice were inactivated by 2-deoxy-2-fluoro-sugar analogues to form the covalent glycosyl-enzyme intermediates which were used for investigating transglucosylation specificity, by measuring the rate of reactivation by various alcohols. Kinetic analysis indicated that the aglycone binding site of the cassava enzyme was hydrophobic, since the enzyme bound better to more hydrophobic alcohols and showed poor transfer of glucose to hydrophilic sugars. With butanol, transglucosylation was faster with the primary alcohol than with the secondary or tertiary forms of the alcohol. Studies with ethanol and chloro-substituted ethanols indicated that the rate of transglucosylation was significantly faster with alcohols with lower pK_a values, where the reactive alkoxide was more readily generated, indicating that the formation of the alkoxide species was a major step governing the formation of the transition state in the cassava enzyme. The second part covers studies of enzymatic synthesis of cello-oligosaccharide by mutated rice (BGlu1) β-glucosidases. Mutations of this enzyme at glutamate residue 414 destroyed the enzyme's catalytic activity, but the enzyme could be rescued in the presence of the anionic nucleophiles, which verifies that this residue is the catalytic nucleophile. All three mutants (E414G, E414S and E414A) could catalyze the synthesis of mixed length oligosaccharides by transglucosylation when α-glucosyl fluoride was used as donor and *p*NP-cellobioside as acceptor. The E414G mutant gave the fastest transglucosylation rate, which was approximately 3 and 19 fold faster than E414S and E414A respectively, and gave yields of up to 80 % insoluble products with a donor: acceptor ratio of 5:1. ¹³C-NMR, methylation analysis and electrospray ionization mass spectroscopy showed that the insoluble products were β-(1,4)-linked oligomers with a degree of polymerization of 5 to at least 11. The BGlu1 E414G glycosynthase was found to prefer longer chain length oligosaccharide acceptors and required acceptors that occupy at least three sugar residue binding subsites as acceptor for productive transglucosylation.

**KEY WORDS: β-GLUCOSIDASE/TRANSGLUCOSYLATION SPECIFICITY/
GLYCOSYNTHASE/OLIGOSACCHARIDE SYNTHESIS**