ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOCATALYST DIGESTING STEVIOSIDE

BOOTSAKORN BOONKAEW

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2016

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOCATALYST DIGESTING STEVIOSIDE

BOOTSAKORN BOONKAEW 5637970 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: JAMORM SOMANA, M.D., Ph.D., KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D.

ABSTRACT

Enterococcus casseliflavus BO2, isolated from microbial contaminant of stevia leaf extract, was found to catalyze hydrolysis of steviol glycosides, sweet components of *Stevia rebaudiana* Bertoni (stevia) leaves. Previous studies, however, have shown that enterococci bacteria have no activity in the metabolism of steviol glycosides as well as rarely constructed recombinant steviol glycosides hydrolyzing enzyme. In this study, to ascertain *E. casseliflavus* BO2 responsible for this role, the β-glucosidase candidate genes were cloned and expressed in *Escherichia coli* with C-terminal His_6-tagged form. An EcBgl4 presented both *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (*p*NPG) and stevioside hydrolysis activity. The gene sequence analysis indicated that EcBgl 4 was a member of GH 3 glycosyl hydrolase β-glucosidase consisting of 721 amino acids, and corresponding to a molecular mass of 79.37 kDa. EcBgl 4 performed the highest functionally active form upon induction with 0.2 mM IPTG at 25°C and overnight. The protein was purified to homogeneity and the biochemical properties were characterized. Both crude extract and purified form of EcBgl 4 specifically hydrolyzed the glucose moiety of stevioside to produce rubusoside. The purified EcBgl 4 exhibited an optimum pH and temperature at 6.0 and 37°C, respectively against both *p*NPG and stevioside. Kinetic constants, k_{cat}/K_m for *p*NPG and k_{cat}/K_m for stevioside were calculated to be 8583 $mM^{-1}s^{-1}$ for and 95.41 $mM^{-1}s^{-1}$, respectively, indicating that EcBgl 4 hydrolyzed *p*NPG had more efficiency than stevioside. Importantly, EcBgl 4 was found to be the highest efficient enzyme that catalyzed both *p*NPG and stevioside compared to the stevioside hydrolyzing β-glycosidases previously reported. The enzyme showed substantial activity towards amygdalin and also hydrolyzed natural saccharides but no hydrolytic activity was observed on tested aryl-glycoside synthetic substrates. The results revealed that *E. casseliflavus* BO2 indeed possessed stevioside hydrolyzing activity via a novel β-glucosidase, which also served as a potential enzyme for future applications.

KEY WORDS: STEVIOL GLYCOSIDES / STEVIOSIDE / RUBUSOSIDE / β-GLUCOSIDASE / *ENTEROCOCCUS CASSELIFLAVUS*

Copyright by Mahidol University

90 pages

การจำแนกและศึกษาคุณลักษณะของสารย่อยสตีวิโอไซด์

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOCATALYST DIGESTING STEVIOSIDE

บุษกร บุญแก้ว 5637970 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: จามร สมณะ, MD., Ph.D., กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา, Ph.D.

บทคัดย่อ

Enteroflavus cassiliflavus BO2 ได้จากการแยกเชื้อปนเปื้อนในน้ำใบหญ้าหวานสกัด สามารถย่อยสตีวิออลไกลโคไซด์ซึ่งเป็นสารหวานในใบหญ้าหวาน *Stevia rebaudiana* Bertoni แม้ว่าการศึกษาก่อนหน้าระบุว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ ไม่เกี่ยวข้องกับการเมทาบอลิซึมของสตีวิออลไกลโคไซด์ในลำไส้ และการผลิตรีคอมบิแนนต์เอนไซม์ที่ย่อยสารนี้มีน้อยมาก เพื่อทดสอบว่า *E. cassiliflavus* BO2 ย่อยสตีวิออลไกลโคไซด์ได้จริง การศึกษานี้ได้โคลนและเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเบต้า-กลูโคซิเดส จาก *E. cassiliflavus* BO2 ในรูปแบบที่มี His_6-tagged ที่ปลาย C-terminus ใน *E. coli* พบว่าโปรตีน EcBgl 4 ที่แสดงออกสามารถย่อย *p*NPG และสตีวิโอไซด์ จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า EcBgl 4 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 716 ตัว มีขนาดโมเลกุล 79.37 กิโลดาลตัน และเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม GH 3 ไกลโคซิลไฮโดรเลสเบต้ากลูโคซิเดส เอนไซม์นี้สร้างได้ดีที่สุดใน *E .coli* เมื่อถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนโดยใช้ IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ และเลี้ยงเซลล์ไว้หนึ่งคืนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทั้งเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์และบริสุทธิ์แล้วมีความจำเพาะในการย่อยกลูโคสจากสตีวิโอไซด์ได้เป็นรูบู-โซไซด์ เอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วมีความสามารถย่อยสูงสุดต่อทั้ง *p*NPG และสตีวิโอไซด์ ที่ pH 6 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซด์ต่อ *p*NPG และสตีวิโอไซด์ ได้ค่า k_{cal}/K_m เท่ากับ 8583 และ 95.41 มิลลิโมลาร์$^{-1}$ วินาที$^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ย่อย *p*NPG ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าย่อยสตีวิโอไซด์ และยังเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อย *p*NPG และสตีวิโอไซด์เมื่อเทียบกับเอนไซม์อื่นที่ถูกรายงานก่อนหน้า นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์สามารถย่อย amygdalin และสารตั้งต้นตามธรรมชาติอื่น แต่ไม่ย่อยสารตั้งต้นสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบได้ ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงชี้ว่า *E. cassiliflavus* BO2 สามารถย่อยสตีวิโอไซด์ได้จริงโดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และเอนไซม์นี้ยังมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสตัวใหม่ที่น่าจะนำไปประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดีในอนาคต

Copyright by Mahidol University

90 หน้า