

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: **RMU5480004**

ชื่อโครงการ: **การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและ
การประยุกต์ปฏิกิริยาการสังเคราะห์**

ชื่อนักวิจัย: **ผศ.ดร. ประชุมพร คงเสรี**
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address: **fscippt@ku.ac.th**

ระยะเวลาโครงการ: **3 ปี ตั้งแต่ วันที่ 15 มิถุนายน 2554 ถึงวันที่ 15 มิถุนายน 2557**

กลุ่มเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (E.C. 3.2.1.21) ทำหน้าที่เร่งการสลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก ระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับน้ำตาล หรือระหว่างน้ำตาลกลูโคส (หมู่ไกลโค) กับหมู่อื่นๆ ที่ไม่ใช่น้ำตาล (หมู่อะไกลโค) เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากแหล่งต่างๆ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษากลไกในการกำหนดความจำเพาะต่อหมู่ไกลโคและหมู่อะไกลโคโดยใช้วิธีทางวิศวกรรมโปรตีน และใช้เอนไซม์ดัลโคซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Pseudomonas fluorescens* เป็นต้นแบบ ในการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อหมู่ไกลโค โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ดัลโคซิเนสกับเอนไซม์ Abg จาก *Agrobacterium* sp. พบว่า การกลายพันธุ์เอนไซม์ดัลโคซิเนสที่ตำแหน่ง F196H สามารถเพิ่มความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีน้ำตาลแมนโนสได้ โดยไม่กระทบต่อประสิทธิภาพในการสลายสับสเตรทที่มีน้ำตาลกลูโคส ส่วนการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อไอโซพลาโนกลูโคไซด์จากถั่วเหลือง ซึ่งมักมีการเติมหมู่ดัดแปรที่หมู่ไกลโค โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ดัลโคซิเนสกับเอนไซม์ GmICHG จากถั่วเหลือง พบว่า การกลายพันธุ์เอนไซม์ดัลโคซิเนสที่ตำแหน่ง E455A และ A454F/E455A สามารถเพิ่มความจำเพาะต่อไอโซพลาโนกลูโคไซด์จากถั่วเหลืองได้ และในการวิเคราะห์ความจำเพาะต่อหมู่อะไกลโค โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ดัลโคซิเนสกับเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง พบว่า กลายพันธุ์เอนไซม์ดัลโคซิเนสที่ตำแหน่ง I185A/N189F I185A/V255F และ I185A/N189F/V255F สามารถเพิ่มความจำเพาะต่อหมู่อะไกลโคที่ตำแหน่งคาร์บินอลคาร์บอนมีหมู่แทนที่ 3 หมู่ (เช่น ลินามาริน หรือ เทอร์เทียรีบิวทิลกลูโคไซด์) ได้ ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ จะนำไปสู่การสร้างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสชนิดใหม่ที่สามารถสลายสารประกอบไกลโคไซด์ได้หลายชนิด หรือสามารถปลดปล่อยสารไฟโตฮอร์โมนให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ รวมถึงสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารอัลคิลกลูโคไซด์ได้

คำหลัก: **เบต้า-กลูโคซิเดส ดัลโคซิเนส ไอโซพลาโนกลูโคไซด์ อัลคิลกลูโคไซด์**

Abstract

Project Code: RMU5480004

Project Title: Study of substrate specificity in beta-glucosidases and their synthetic applications

Investigator: Assistant Professor Prachumporn Kongsaree, Ph.D.

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University

E-mail Address: fscippt@ku.ac.th

Project Period: 3 years, from 15 June 2011 to 15 June 2014

Beta-glucosidases (E.C. 3.2.1.21) are a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of beta-glucosidic linkage between glucose and another sugar, or between glucose (glycone) moiety and another non-sugar (aglycone) moiety. Beta-glucosidases from different sources show different substrate specificities. So this research project aimed to study the mechanisms that determine the specificity for the glycone and the aglycone moieties by using protein engineering methods and dalcocinase, which is a beta-glucosidase from Thai rosewood, as a model. In the analysis of glycone specificity, dalcocinase was compared with Abg from *Agrobacterium* sp. The F196H mutation in dalcocinase was found to increase its specificity toward the mannoside substrate, without affecting its hydrolytic efficiency toward the glucoside substrate. In the analysis of specificity for soybean isoflavone glucosides which often contain a modifying group on the glycone moiety, dalcocinase was compared with GmiCHG from soybean. The E455A and A454F/E455A mutations in dalcocinase were found to increase its specificity toward the soybean isoflavone glucosides. In the analysis of aglycone specificity, dalcocinase was compared with linamarase from cassava. The I185A/N189F, I185A/V255F and I185A/N189F/V255F mutations in dalcocinase were found to increase its specificity toward the aglycone moiety whose carbinol carbon contains 3 substituents (such as linamarin and tertiary-butyl glucoside). Knowledge gained from this study can lead to production of novel beta-glucosidases that can hydrolyze various types of glycoside substrates, release bioactive phytohormones, or synthesize useful alkyl glucosides.

Keywords: beta-glucosidase, dalcocinase, isoflavone glucoside, alkyl glucoside