

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880241

ชื่อโครงการ: การประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์ช่วยวิศวกรรมเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานเฟอเรส
ตระกูล 32 เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรยุทธ จิตอ่อนน้อม มหาวิทยาลัยพะเยา

E-mail: jitrayut.018@gmail.com

ระยะเวลา: 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2558 ถึง 30 มิถุนายน พ.ศ. 2560

เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานเฟอเรสมีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อน้ำตาลซูโครสที่ตำแหน่งพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้า (2→1) โดยปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส พร้อมกับย้ายหมู่ฟรุกโตสเพื่อเข้าจับกับโมเลกุลที่เป็นตัวรับ เอนไซม์ชนิดนี้มีศักยภาพในการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งได้รับความสนใจจากอุตสาหกรรม ปัจจุบันถึงแม้ว่าเอนไซม์ประเภทนี้ได้รับการศึกษาอย่างมาก แต่กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ยังไม่เป็นที่เข้าใจเด่นชัดนัก โดยเฉพาะข้อมูลระดับโมเลกุลเกี่ยวกับการสังเคราะห์น้ำตาลฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์จากน้ำตาลซูโครส ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้ประยุกต์ใช้ระเบียบวิธีผสมผสานกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์โมเลกุล เพื่อศึกษากระบวนการสลายน้ำตาลและกระบวนการย้ายหมู่ฟรุกโตสของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานเฟอเรสจากยีสต์ (*A. japonicus*) โดยมีน้ำตาลซูโครสทำหน้าที่เป็นตัวให้และตัวรับระหว่างเกิดปฏิกิริยา ผลการศึกษาพบว่าปฏิกิริยาขั้นตอนแรกของกระบวนการฟรุกโตซิเลชันเป็นขั้นกำหนดอัตรา โดยมีค่าพลังงานกระตุ้นเท่ากับ 15.7 กิโลแคลอรีต่อโมล ที่ระดับการคำนวณ SCC-DFTB/CHARMM22 สำหรับปฏิกิริยาขั้นตอนที่สองนั้น คณะผู้วิจัยสามารถอธิบายกระบวนการย่อยสลายและกระบวนการย้ายหมู่ฟรุกโตสได้เป็นครั้งแรก โดยพบว่าทั้งสองกระบวนการเกิดขึ้นแบบแข่งขันกัน โดยมีค่าพลังงานกระตุ้นใกล้เคียงกัน (~10 กิโลแคลอรีต่อโมล) ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยานั้น จะพบว่ามีโครงสร้างทรานซิชันชนิดออกโซคาร์บอเนียมเกิดขึ้นที่น้ำตาลฟรุกโตสตำแหน่ง -1 และมีรูปร่างชนิด C4'-endo ผลการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของโครงสร้างเชิงซ้อนของน้ำตาลซูโครสกับเอนไซม์ชนิดไม่กลายพันธุ์ กับชนิดกลายพันธุ์ D191A ชี้ให้เห็นว่า กรดแอสพาร์ติกลำดับที่ 191 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคงรูปร่างของน้ำตาลให้เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบรูปแบบอันตรกิริยาที่สำคัญ คือ Asp119...nucleophile...1-OH (substrate) ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการเกิดสารมัธยันตร์ของปฏิกิริยา โดยสรุปโครงการวิจัยนี้สามารถอธิบายกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับโมเลกุลได้เป็นครั้งแรก โดยความรู้ที่ได้นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่สังเคราะห์น้ำตาลชนิดเดียวกันได้

คำหลัก : ระเบียบวิธีผสมผสานกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์โมเลกุล; เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานเฟอเรส; ปฏิกิริยาทรานไกลโคซิเลชัน; ฟรีไบโอติก; SCC-DFTB

Abstract

Project code: TRG5880241
Title: Computer-aided engineering family GH32 fructosyltransferase for use in fructooligosaccharide synthesis
Investigator : Assistant Professor Dr. Jitrayut Jitonnorn, University of Phayao
E-mail: jitrayut.018@gmail.com
Project period: 1 July 2015 to 30 June 2017

Fructosyltransferases (FT) act on sucrose by cleaving the β -(2 $\rightarrow$ 1) linkage, releasing glucose, and then transferring the fructosyl group to an acceptor molecule. This enzyme is capable of producing prebiotic fructooligosaccharides (FOS) that are of industrial interest. While several FOS-synthesizing enzymes FTs have been investigated, their catalytic mechanism is not fully understood yet, especially the molecular details of how enzymatically synthesized FOS is obtained from sucrose. In this research project, we present a comparative QM/MM investigation on the hydrolysis and transfructosylation reactions catalyzed by a yeast FT from *A. japonicus* using sucrose as donor and acceptor molecule. It is shown that the fructosylation of the substrate is the rate-determining step of the whole catalytic cycle with an energy barrier of 15.7 kcal mol⁻¹ [at SCC-DFTB/CHARMM22], in good agreement with the published experimental data. For the defructosylation, both the hydrolysis and transfructosylation of the fructosyl-enzyme intermediate were explored and the two reactions seem to be competitive with similar energy barriers ($\sim$ 10 kcal mol⁻¹). For all studied reaction steps, the oxocarbenium transition state was observed on the fructosyl ring bound in the -1 position, having a C4'-endo conformation. Based on the SCC-DFTB/MM simulations of sucrose complex in wildtype and D191A mutant, Asp191 is shown to be responsible for the productive sugar conformation (at subsite -1) required for catalysis. An interaction pattern, Asp119 $\cdots$ nucleophile $\cdots$ 1-OH (substrate), is proposed to determine the feasibility of the formation of the intermediate. This is the first computational study for understanding the FOS synthesis process, which can be applicable to other related FOS-synthesizing enzymes.

Keyword: QM/MM; fructosyltransferase; transglycosylation; prebiotic; SCC-DFTB