ธีรชัย คุณโทถม : การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์ rHv βII ในบาเล่ย์และเอนไซม์ในข้าวที่มีสมบัติคล้ายเอนไซม์ BGlu1 (CHARACTERIZATION OF THE SUBSTRATE-SPECIFICITY OF BARLEY rHv βII AND RICE BGlu1-LIKE ENZYMES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 138 หน้า.

เอนไซม์ (rHv βII) เป็นเอนไซม์ β-mannosidase ในบาเล่ย์พบได้ในเมล็ดข้าวบาเล่ย์ที่งอก เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์โดยการย่อยสลาย galactomannan ซึ่งเป็นแกนกลางของ hemicellulose โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ β-mannanase จากการเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนระหว่าง rHv βII และเอนไซม์ β-glucosidaseในข้าว พบว่าเอนไซม์ Os1BGlu1 ในข้าวถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ rHv βII แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ Os1BGlu1น่าจะมีคุณสมบัติเป็น β-mannosidase เช่นเดียวกับเอนไซม์ rHv βII และเอนไซม์ Os3BGlu8 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับเอนไซม์ Os3BGlu7 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น β-glucosidase แสดงให้เห็นว่า Os3BGlu8 น่าจะมีคุณสมบัติเป็น β-glucosidase เหมือน Os3BGlu7

cDNA ที่เป็นต้นแบบในการสร้างเอนไซม์ rHv βII ถูกสกัด และใช้เป็นต้นแบบในการสร้างเอนไซม์ rHv βII ในแบคทีเรีย พบว่าเอนไซม์ rHv βII ที่สร้างมีความจำเพาะต่อสับสเตรตเช่นเดียวกับเอนไซม์ Hv βII จากธรรมชาติเพราะทั้งสองเอนไซม์ย่อยสลาย *p*NP-β-(1,4)-D-mannoside ได้ดีกว่า *p*NP-β-(1,4)-D- glucoside และย่อยสลายสับสเตรต β-(1,4)-D-cellobiose ดีกว่า β-(1,4)-D-cellotriose เอนไซม์ rHv βII สามารถย่อยสลาย mannooligosaccharides ที่มีความยาว 2-6 หน่วยได้ดีกว่าเอนไซม์ Os3BGlu7 จากปฏิกริยา transglycosylation พบว่าเอนไซม์ rHv βII สามารถใช้สับสเตรต *p*NPGlc และ cellobiose ในการสังเคราะห์ ผลผลิตที่เชื่อมต่อกันโดย β-(1,2)-, β-(1,3)-, and β-(1,4)-D-linkages ตามลำดับ เอนไซม์ rHv βII สามารถเร่งปฏิกริยา transglycosylation โดยใช้ *p*NP-Glucoside และ cellobiose เป็นสับสเตรตได้ และได้ผลผลิตที่เชื่อมต่อกันพันธะ β-(1,2)-, β-(1,4)-, และ β-(1,6)-linkages แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกริยา transglycosylation โดยใช้ สับสเตรตกลุ่ม mannosyl ได้

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ Os1BGlu1 และเอนไซม์ Os3BGlu8 พบว่าเอนไซม์ Os1BGlu1 ไม่มีคุณสมบัติ β-mannosidase ดังที่คาดไว้ข้างต้น แต่เอนไซม์ Os1BGlu1 และเอนไซม์ Os3BGlu8 มีคุณสมบัติเป็น β-glucosidase เหมือนกับเอนไซม์ Os3BGlu7 เนื่องจากเอนไซม์ rHv βII และเอนไซม์ Os3BGlu7 มีความจำเพาะในการย่อยสลายการ *p*NPMan และ *p*NPGlc แตกต่างกัน การเปรียบเทียบโครงสร้างจำลองของเอนไซม์ rHv βII, Os1BGlu1, และ Os3BGlu8 พบว่ากรดอะมิโนบริเวณที่ใช้ในการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์มีความแตกต่างกัน

ระหว่าง rHv βII, Os1BGlu1, Os3BGlu7 และ Os3BGlu8 ดังนั้นกรดอะมิโนที่บริเวณที่ทำหน้าที่จับกับสับสเตรตด้านปลาย (aglycone binding site) ใน subsite +1 และ +2 ในเอนไซม์ rHv βII จึงถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ Os3BGlu7 ใน 4 ตำแหน่งคือ V184I, A187L, L246V, และ V250N พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวนั้น ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงความจำเพาะต่อสับสเตรตได้ จากการศึกษาความจำเพาะของ *p*NPMan ต่อ *p*NPGlc พบว่า กรดอะมิโน L246 ทำให้ความจำเพาะต่อ *p*NPMan ลดลง 1.95 เท่าและเพิ่มความจำเพาะต่อ *p*NPGlc จากการศึกษาจลศาสตร์การเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์กลายพันธุ์พบว่า L246 จับกับสับสเตรตและเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

TEERACHAI KUNTOTHOM : CHARACTERIZATION OF THE SUBSTRATE-SPECIFICITY OF BARLEY rHv βII AND RICE BGlu1-LIKE ENZYMES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 138 PP.

β-GLCUCOSIDASE/β-MANNOSIDASE

Barley (*Hordeum vulgare*) β-glucosidase isozyme II/HvMANNOS1 (Hv βII), a β-mannosidase purified from germinated barley seed, plays a role in cell wall remodeling by concerted action with β-mannanase in the hydrolysis of galactomannan. Multiple protein sequence alignment of Hv βII with plant glycosyl hydrolase family 1 enzymes shows that it is most similar to plant β-mannosidases and rice BGlu1 β-glucosidase (Os3BGlu7) and related isozymes. Phylogenetically, Hv βII is grouped with the rice isozymes Os1BGlu1 and Os7BGlu26, suggesting that these enzymes should have β-mannosidase activity like Hv βII. Os3BGlu8 is grouped with Os3BGlu7, which suggests that Os3BGlu8 should have β-glucosidase activity like Os3BGlu7.

A cDNA encoding Hv βII was cloned and the Hv βII protein it encodes (rHv βII) was expressed in recombinant *Escherichia coli* and purified. The activity of rHv βII is nearly identical to Hv βII, as they both showed higher efficiency in hydrolysis of *p*NP-β-D-mannopyranoside (*p*NPMan) than *p*NP-β-D-glucopyranoside and in hydrolysis of cellobiose than cellotriose. rHv βII can hydrolyse oligosaccharides with β-(1,2)-, β-(1,3)-, and β-(1,4)-D-linkages, and glycosides, including alcohol glucosides, cyanogenic glucosides, hormonal glucosides, and isoflavonoid glucosides. rHv βII hydrolysed mannooligosaccharides with much higher specific activity than