พักตร์นิศา ศิริมนตรี : การศึกษากลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยไคตินจากเชื้อ *Vibrio harveyi*: การเกิดปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชันและการยับยั้งทางจลนพลศาสตร์ของเกลือโซเดียม (STUDIES ON CHITINOLYTIC ENZYMES FROM *VIBRIO HARVEYI*: TRANSGLYCOSYLATION REACTION AND INHIBITION KINETICS OF SODIUM SALTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 137 หน้า

การเพิ่มปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชันของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ ไฮโดรเลส ไม่ได้ทำให้ผลิตน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาวได้เสมอไป เพราะว่าผลิตภัณฑ์จากทรานสไกลโคซิเลชันมักจะถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ในครั้งนี้ เราได้ทำการตรวจสอบถึงกลยุทธ์การกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาวด้วยวิธีของปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชัน โดยใช้เอนไซม์ไคติเนส เอ ที่อยู่ในกลุ่มแฟมิลีไกลโคไซด์ ไฮโดรเลส 18 จากเชื้อ *Vibrio harveyi* (*Vh*ChiA) ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชันโดยใช้เครื่อง HPLC หลังจากทำการบ่มน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ($GlcNAc_n$) กับเอนไซม์หลายตัวที่กลายพันธุ์ ได้ชี้ให้เห็นว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ W570G (การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน Trp570 ไปเป็น Gly) และเอนไซม์กลายพันธุ์ D392N (การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน Asp392 ไปเป็น Asn) ช่วยเพิ่มปฏิกิริยาการเกิดทรานสไกลโคซิเลชัน แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้ ได้ถูกย่อยสลายต่อเป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นในทันที ในทางตรงกันข้าม ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชัน ที่ได้รับจากเอนไซม์กลายพันธุ์ D313A และ D313N (การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน Asp313 ไปเป็น Ala และ Asn ตามลำดับ) ไม่ได้ถูกย่อยสลายต่อ ทำให้เกิดการสะสมของน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว โดยข้อมูลที่ได้จากเอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์แสดงให้เห็นว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง Asp313 ซึ่งเป็นตำแหน่งตรงกลางของ DxDxE catalytic motif ไปเป็น Ala และ Asn มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการผลิตน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว

เอนไซม์ไคติเนส เอ จาก เชื้อ *Vibrio harveyi* (*Vh*ChiA) ทำหน้าที่ย่อยไคตินผ่านกลไกที่เรียกว่า substrate assisted-retaining ในการศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อตรวจสอบถึงผลกระทบของเกลือโซเดียมต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ไคติเนส โดยการหาค่า IC_{50} และ TLC ได้ชี้ให้เห็นว่า โซเดียม เอไซด์ มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เป็น wild-type มากที่สุด และจากการหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสน์ของกราฟ Michaelis-Menten พบว่าค่า K_m และ k_{cat} ลดลงเมื่อความเข้มข้นโซเดียม เอไซด์เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า โซเดียม เอไซด์ แสดงการยับยั้งแบบผสมต่อ *p*NP-$GlcNAc_2$ โดยการยับยั้งนี้ได้ถูกยืนยันด้วยกราฟจาก Lineweaver-Burk plots ซึ่งเป็นกราฟส่วนกลับระหว่าง $1/v_0$ ต่อ 1/[S] ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของโซเดียม เอไซด์ โดยค่า K_i ของ EI complex มีค่าเท่ากับ 1.50± 0.10 M และ ค่า αK_i ของ ESI

complex มีค่าเท่ากับ 0.40 $\pm$ 0.02 M ซึ่งค่าที่ได้แสดงให้เห็นว่า โซเดียม เอไซด์จับกับเอนไซม์ในรูป ES complex ได้ดีกว่าในรูปเอนไซม์อิสระ และข้อมูลที่ได้ในการศึกครั้งนี้ สามารถนำเสนอได้ว่า เอไซด์ แอนไอออน จะเข้าไปแย่งโปรตอนจากหมู่คาร์บอกซิลของ Glu315 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ในการให้โปรตอนกับสับสเตรตเพื่อย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิคเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเมื่อเอนไซม์ให้โปรตอนกับ เอไซด์ แอนไอออนแล้ว มันจึงไม่สามารถให้โปรตอนกับสับสเตรต และเกิดการย่อยได้

เอนไซม์กลุคแนคเอสจากเชื้อ *Vibrio harveyi* (*Vh*GlcNAcase) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซไฮโดรเลสแฟมิลี 20 (GH-20) ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นจากทางด้าน non-reducing end ผ่านกลไกที่เรียกว่า substrate-assisted retaining โดยผลการทดลองของผลกระทบของเกลือโซเดียมต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์กลุคแนคเอส พบว่า โซเดียม เอไซด์ และโซเดียม ไนเตรต แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุคแนคเอสได้ดีที่สุด โดยผลการทดลองนี้ถูกยืนยันด้วยการหาค่า IC_{50} และ TLC และจากค่าคงที่ทางจลนพลศาสน์ของกราฟ Michaelis-Menten พบว่าค่า K_m เพิ่มขึ้นและ k_{cat} คงที่ เมื่อความเข้มข้นโซเดียม เอไซด์ และโซเดียม ไนเตรต เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าโซเดียม เอไซด์ และ โซเดียม ไนเตรต แสดงการยับยั้งแบบแข่งขันต่อ *p*NP-GlcNAc โดยการยับยั้งนี้ได้ถูกยืนยันด้วยกราฟจาก Lineweaver-Burk plots ซึ่งเป็นกราฟส่วนกลับระหว่าง $1/v_0$ ต่อ 1/[S] ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของโซเดียม เอไซด์ และโซเดียม ไนเตรต โดยค่า K_i ของ โซเดียม เอไซด์ มีค่าเท่ากับ 0.20 $\pm$ 0.03 M และ ของ โซเดียม ไนเตรต มีค่าเท่ากับ 0.20 $\pm$ 0.05 M

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

PAKNISA SIRIMONTREE : STUDIES ON CHITINOLYTIC ENZYMES FROM *VIBRIO HARVEYI*: TRANSGLYCOSYLATION REACTION AND INHIBITION KINETICS OF SODIUM SALTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 137 PP.

CHITINOLYTIC ENZYMES, *VIBRIO HARVEYI*, TRANSGLYCOSYLATION REACTION, INHIBITION KINETICS, SODIUM SALTS

Enhancing the transglycosylation activity of glycoside hydrolases does not always result in the production of oligosaccharides with longer chains, because the TG products are often decomposed into shorter oligosaccharides. Here, we investigated mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by means of TG reaction catalyzed by family GH18 chitinase A from *Vibrio harveyi* (*Vh*ChiA). HPLC analysis of the TG products from incubation of chitooligosaccharide substrates ($GlcNAc_n$) with several mutant *Vh*ChiAs suggested that the mutation W570G (mutation of Trp570 to Gly) and the mutation D392N (mutation of Asp392 to Asn) significantly enhanced TG activity, but the TG products were immediately hydrolyzed into shorter $GlcNAc_n$. On the other hand, the TG products obtained from the mutants D313A and D313N (mutations of Asp313 to Ala and Asn, respectively) were not further hydrolyzed, leading to the accumulation of oligosaccharides with longer chains. The data obtained from the mutant *Vh*ChiAs suggested that mutations of Asp313, the middle aspartic acid residue of the DxDxE catalytic motif, to Ala and Asn are most effective for obtaining chitooligosaccharides with longer chains.

*Vibrio harvey*i chitinase A (*Vh*ChiA) catalyzes chitin degradation through the substrate-assisted retaining mechanism. This research aims to investigate the effects of

sodium salts on the hydrolytic activities of the chitinase variants. Determination of IC_{50} and TLC suggests that the compound was most active against the wild-type enzyme. Michaelis-Menten plots yield decreasing K_m and k_{cat} upon increasing concentrations of sodium azide, providing an idea that sodium azide acts mixed-type inhibition towards *p*NP-GlcNAc$_2$. Lineweaver-Burk plots between $1/v_0$ versus 1/[S] with different sodium azide concentrations also confirm mixed-type inhibition. The value of the K_i of the EI complex was found to be 1.5 $\pm$ 0.1 M and that of αK of the ESI complex to be 0.4 $\pm$ 0.02 M. The results suggested that sodium azide reacted much more efficiently to the ES complex than the free enzyme. Based on the data obtained from this study, it has been proposed that the azide anion abstracts the proton from the γ-COOH side chain of the catalytic residue Glu315, thereby preventing bond cleaving.

Family GH20 GlcNAcase from *Vibrio harveyi* (*Vh*GlcNAcase) sequentially degrades chitooligosaccharides from the non-reducing end through the substrate-assisted retaining mechanism. The results of the effects of sodium salts on the GlcNAcase activity showed that sodium azide and sodium nitrate considerably inhibited the activity of *Vh*GlcNAcase. The inhibitory effects of both compounds were also comfirm by IC_{50} and TLC. Michaelis-Menten plots yield increasing K_m with fairly steady k_{cat} upon increasing concentrations of sodium azide and sodium nitrate, providing an idea that sodium azide and sodium nitrate act competitively. Lineweaver-Burk plots between $1/v_0$ versus 1/[S] with different sodium azide and sodium nitrate concentrations also confirm competitive inhibition with the apparent K_i of 0.2 ± 0.03 M and 0.2 ± 0.05 M, respectively.

School of Biochemistry Student's signature_____

Academic Year 2014 Advisor's signature_____