

การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของบีตาไกลูโคซิเดสจาก *Daldinia eschscholzii*

นายอภิชาติ กาญจนทัต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
 β -GLUCOSIDASE FROM *Daldinia eschscholzii***

Mr. Aphichart Karnchanatat

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology**

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491574

Thesis Title PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF β -GLUCOSIDASE FROM *Daldinia eschscholzii*


By Mr. Aphichart Karnchanatat

Field of study Biotechnology

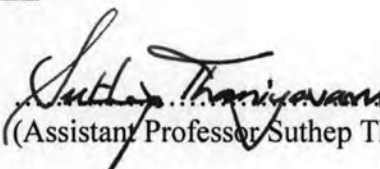
Thesis Advisor Associate Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D.

Thesis Co-advisor Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.
Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree


Dean of the Faculty of Science
 (Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

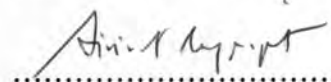
THESIS COMMITTEE


Chairman
 (Assistant Professor Suthep Thaniyavarn, Ph.D.)

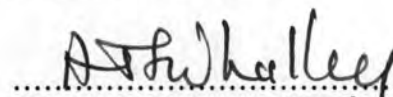
Prakitsin Sihanonth
Thesis Advisor
 (Associate Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D.)


Thesis Co-advisor
 (Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

Polkit Sangvanich
 Thesis Co-advisor
 (Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)


Member
 (Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

Jitra Piapukiew
Member
 (Jitra Piapukiew, Ph.D.)


Member
 (Professor Anthony J.S. Whalley, Ph.D.)

อภิชาติ กาญจนทัต : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของบีตาไกลูโคซิเดสจาก *Daldinia eschscholzii*: (PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF β -GLUCOSIDASE FROM *Daldinia eschscholzii*) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ประกิตต์สินี สีहनนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร. อมร เพชรสม, รศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวงษ์, 125 หน้า.

เชื้อราอ้อยสลายเนื้อไม้ *Daldinia eschscholzii* สามารถผลิตบีตาไกลูโคซิเดสได้เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีคาร์บอนซิมิลิเซลลูโลส 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และแยกโดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน แบบสัมพรรคภาพ และแบบเจลฟิลเตรชัน พบว่ามีแอกติวิตีเฉลี่ย 6.28 เปอร์เซ็นต์และบริสุทธิ์ขึ้น 50.23 เท่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 64.2 กิโลดาลตัน โดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเสียดภาพ และน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65,747 ดาลตัน โดยใช้เมสสเปกโตรสโคปี เอนไซม์มีค่า pI ประมาณ 8.55 เอนไซม์สามารถย่อยสับสเตรท p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) ได้มีค่า K_m ประมาณ 1.52 มิลลิโมลาร์ และ V_{max} ประมาณ 3.21 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์ถูกยับยั้งแบบแข่งขันโดย กลูโคส และ กลูโคโนแลคโตนโดยมีค่า K_i ประมาณ 0.79 มิลลิโมลาร์ และ 4.72 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือที่ pH 5.0 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิมากกว่า 50 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.0 โดยไม่สูญเสียแอกติวิตี บีตาไกลูโคซิเดสที่บริสุทธิ์แล้ว มีความจำเพาะต่อสับสเตรท PNPG เซลโลไบโอส ซอโฟโรส ลามินาโรโบส และเจนติโอไบโอส แต่ไม่มีความจำเพาะต่อ แลคโตส ซูโครส อะวิเซล และ o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside แอกติวิตีของเอนไซม์ถูกระงับได้โดย Ca^{2+} Co^{2+} Mg^{2+} Mn^{2+} กลีเซอรอล DMSO DTT และ EDTA แต่เอนไซม์ถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์โดย Hg^{2+} การดัดแปรทางเคมีของบีตาไกลูโคซิเดสโดยใช้ EDC โดยมีไกลซีนามาดีเป็น นิวคลีโอไฟล์ในปฏิกิริยา พบว่าการดัดแปรโมโนซิงเกิลคาร์บอกซิลิกกรุปของมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยมีอัตราการจับกันต่อ 1 โมลของเอนไซม์ และ EDC เท่ากับ 6.73×10^{-2} มิลลิโมลต่อนาที เมื่อใช้ กลูโคโนแลคโตนซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขัน มาป้องกันบริเวณเร่งของเอนไซม์พบว่าสามารถป้องกันได้บางส่วน มีค่า k_d เท่ากับ 70.74×10^{-2} มิลลิโมลาร์ บีตาไกลูโคซิเดสสามารถสังเคราะห์กลูโคไซด์ได้โดยการโยกย้ายหมู่ไฮดรอกซิลจาก PNPG สู่อัลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิได้ และเมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนภายในของบีตาไกลูโคซิเดสจากเชื้อราชนิดนี้พบว่าอยู่ในบีตาไกลูไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 3

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต..... อภิชาติ กาญจนทัต
 ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4673838323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: β -GLUCOSIDASE / PURIFICATION / *Daldinia eschscholzii*

APHICHART KARNCHANATAT: PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF β -GLUCOSIDASE FROM *Daldinia eschscholzii*.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PRAKITSIN SRIHANONTH, Ph.D., THESIS

COADVISOR: ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., ASSOC. PROF. POLKIT SANGVANICH, Ph.D., 125 pp.

An extracellular β -glucosidase (EC 3.2.1.21) was purified from culture filtrate of the wood decaying fungus *Daldinia eschscholzii* grown on 1.0% (wt/vol) carboxymethyl-cellulose by using ammonium sulfate precipitation, ion-exchange, hydrophobic interaction, and gel filtration chromatography with 6.28 % yield and 50.23 purification fold. The enzyme is monomeric with a molecular weight of 64.2 kDa as estimated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and with a molecular weight of 65,747 Da estimated by MALDI-TOF spectrometry, has *pI* 8.55 obtained using isoelectric focusing. The enzyme catalyzes the hydrolysis of p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) as the substrate, the K_m values of 1.52 mM, and V_{max} values of 3.21 U/min/mg of protein. Glucose and glucono- δ -lactone inhibited β -glucosidase competitively, with K_i values of 0.79 mM, and 4.72 μ M, respectively. Optimal activity with PNPG as the substrate was at pH 5.0 and 50 °C. The enzyme was stable at pH 5.0 at temperatures up to 50 °C. The purified β -glucosidase was active against PNPG, cellobiose, sophorose, laminaribiose, and gentiobiose, but did not hydrolyze lactose, sucrose, Avicel, and o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside. The activity of β -glucosidase was stimulated by Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , glycerol, DMSO, DTT, and EDTA, and strongly inhibited by Hg^{2+} . β -Glucosidase was chemically modified by EDC in the presence of glycylamide as nucleophile under various conditions to study role of carboxy groups in the catalytic mechanism of this enzyme. β -Glucosidase was inactivated by the binding of one mol of EDC per mol of the enzyme with a second-order rate constant of 6.73×10^{-2} mM/min. Glucono- δ -lactone as a competitive inhibitor, partly protected the active-site carboxy group against chemical modification, with k_d of 70.74×10^{-2} mM. The enzyme catalyzed the synthesis of alkyl-glucosides in the presence of primary secondary and tertiary alcohol with PNPG by transglucosylation. The internal amino acid sequences of *D. eschscholzii* β -glucosidase have similarity to the sequence of the family 3 β -glucosyl hydrolase.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature..... Aphichart Karnchanatat
 Academic year.....2006.....Advisor's signature..... Prakitsin Srihanonth
 Co-advisor's signature..... Amorn Petsom
 Co-advisor's signature..... Polkit Sangvanich

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation and gratitude to Associate Professor Prakitsin Sihanonth, my advisor and Associate Professor Amorn Petsom, and Associate Professor Polkit Sangvanich, co-advisor for their excellent suggestions, guidance, encouragement and support throughout the entire period of conducting this thesis.

I would also like to extend my gratitude to Assistant Professor Suthep Taniyavarn, Associate Professor Sirirat Rengpipat, Professor Anthony Whalley, and Dr. Jittra Piapukiew, for serving as the committee and for their editorial assistance and comments.

All the thanks to all my friends, all members in Research Center for Bioorganic Chemistry, staff of Biotechnology Program, and staff of the Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their friendship, help and encouragement.

For financial support, my research is supported by The Royal Golden Jubilee Program of the Thailand Research Fund.

Finally, my deepest gratitude is to my family for their support, understanding, and encouragement throughout my study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI	iv
ABSTRACT IN ENGLISH	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II REVIEW OF THE LITERATURES	3
2.1 Chemical structure of wood component.....	3
2.2 Fungal degradation of wood.....	5
2.3 Types of wood decay.....	5
2.4 The family Xylariaceae.....	6
2.5 The genus <i>Daldinia</i>	8
2.6 Biodegradation of cellulose.....	10
2.7 Cellulose structure.....	11
2.8 Enzymes required for the hydrolysis of cellulose.....	12
2.9 β -Glucosidases: Mechanism and applications.....	13
III MATERIALS AND METHODS	18
3.1 Equipments.....	18
3.2 Chemicals.....	18
3.3 Organism.....	20
3.4 Identification of wood decaying fungi <i>D. eschscholzii</i>	21
3.4.1 Macroscopical features.....	21
3.4.2 Microscopical features.....	21
3.4.2.1 Preparation of specimen for light microscope.....	21

CHAPTER

Page

3.4.2.2 Preparation of ascospores for scanning electron microscope.....	21
3.4.3 Technique for induction of teleomorph.....	22
3.5 Wood decay activity by <i>D. eschscholzii</i>	23
3.6 Cellulolytic enzyme activities on solid media.....	23
3.6.1 Cellulolysis basal medium (CBM).....	24
3.6.2 Cellulase (cellulose azure agar).....	24
3.6.3 Endoglucanase (CMC agar).....	24
3.6.4 β -glucosidase (esculin agar).....	24
3.7 Culture conditions and production of β -glucosidase.....	25
3.8 Analytical method.....	25
3.8.1 Assay of β -glucosidase.....	25
3.8.2 Protein determination.....	25
3.8.3 Reducing sugar content.....	26
3.9 Purification of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	26
3.9.1 Step of purification.....	26
(i) $(NH_4)_2SO_4$ precipitation.....	26
(ii) Cation exchange chromatography.....	26
(iii) Hydrophobic interaction chromatography.....	26
(iv) Gel filtration chromatography.....	27
3.9.2 Determination of enzyme purity and protein pattern	
on native-PAGE.....	27
Non-denaturing gel electrophoresis.....	27
(i) Coomassie blue staining.....	27
(ii) Enzyme activity staining.....	27
3.10 Biochemical characterization β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	28
3.10.1 Molecular weight determination.....	28
3.10.1.1 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel	
electrophoresis (SDS-PAGE).....	28
3.10.1.2 Matrix-assisted laser desorption	
ionization time of flight.....	28
3.10.2 Isoelectric-focusing PAGE.....	28
3.10.3 Effect of temperature on β -glucosidase activity and stability.....	28

CHAPTER	Page
3.10.4 Effect of pH on β -glucosidase activity and stability.....	28
3.10.5 Effect of metals and reagents.....	29
3.10.6 Substrate specificity.....	29
3.10.7 Effect of alcohols.....	29
3.11 Kinetic mechanism studies of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	30
3.11.1 Determination of kinetic parameters.....	30
3.11.2 Inhibitory effect of glucose and glucono- δ -lactone.....	30
3.11.3 Identification of active-site residues by	
carboxyl group modification.....	30
3.11.3.1 Kinetic of β -glucosidase inactivation by EDC.....	30
3.11.3.2 Kinetic of active-site protection by glucono- δ -lactone.....	30
3.12 Identification of β -glucosidase from <i>D. Eschscholzii</i>	31
3.13 Synthesis of alkyl-glucosides using β -glucosidase.....	31
3.13.1 Transglycosylation reaction.....	31
3.13.2 TLC analysis and confirm structures of	
alkyl- β -glucosides products.....	31
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	33
4.1 Identification of wood-decaying fungus <i>D. eschscholzii</i>	33
4.1.1 Morphological identification.....	33
<i>Description of the species</i>	33
<i>Cultural characteristics and anamorph</i>	34
<i>Induction of teleomorph formation</i>	36
4.1.2 Molecular Identification.....	40
4.2 Wood decay activity by <i>D. eschscholzii</i>	42
4.3 Cellulolytic enzyme activities on solid media.....	46
4.4 Culture conditions and production of β -glucosidase.....	48
4.5 Purification of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	50
4.5.1 Step of enzyme purification.....	50
4.5.2 Determination of enzyme purity and	
protein pattern on native-PAGE.....	56
4.6 Biochemical characterization β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	57

CHAPTER	Page
4.6.1 Molecular weight determination.....	57
4.6.2 Determination of isoelectric point.....	57
4.6.3 Effect of temperature on β -glucosidase activity and stability.....	63
4.6.4 Effect of pH on β -glucosidase activity and stability.....	64
4.6.5 Effect of metals and reagents.....	65
4.6.6 Substrate specificity.....	67
4.6.7 Effect of alcohols.....	69
4.7 Kinetic mechanism studies of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	71
4.7.1 Determination of kinetic constant.....	71
4.7.2 Inhibitory effect of glucose and glucono- δ -lactone.....	72
4.7.3 Identification of active-site residues by carboxyl group modification.....	75
4.8 Identification of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	79
4.9 Synthesis of alkyl-glucosides using β -glucosidase.....	82
4.9.1 Alkyl-glucosides synthesis using transglycosylation.....	82
4.9.2 ^1H NMR data.....	84
V CONCLUSION	85
REFERENCES	87
APPENDICES	103
APPENDIX A.....	104
APPENDIX B.....	106
APPENDIX C.....	108
APPENDIX D.....	111
APPENDIX E.....	112
APPENDIX F.....	113
APPENDIX G.....	114
APPENDIX H.....	115
APPENDIX I.....	123
BIOGRAPHY	125

LIST OF TABLE

Table	Page
4.1 Teleomorphic and amamorphic characteristics of <i>D. concentrica</i> , and <i>D. eschscholzii</i>	39
4.2 Weight losses of various timbers by xylariaceous fungi.....	42
4.3 Purification table of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	55
4.4 Effect of some cations and other reagents on purified β -glucosidase activity from <i>D. eschscholzii</i>	66
4.5 Substrate specificity by purified β -glucosidase activity from <i>D. eschscholzii</i>	68

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Schematic illustration of the molecular architecture of wood.....	4
2.2 Section through perithecial stroma of <i>Daldinia concentrica</i>	8
2.3 A schematic structure of a cellulose chain.....	11
2.4 A schematic view of the cellulose structure and action of the Endoglucanase (EG), Cellobiohydrolase (CBH), and β -glucosidases (β -gluc) in <i>Trichoderma reesei</i>	13
2.5 Mechanisms of retaining and inverting glycosidases.....	16
4.1 Colonial and microscopic characteristic of <i>D. eschscholzii</i>	34
4.2 Scanning Electron Microscopic characteristic of <i>D. eschscholzii</i>	35
4.3 Induction of <i>D. eschscholzii</i> teleomorph formation.....	37
4.4 Nucleotide sequences of <i>D. eschscholzii</i> , containing a partial of the 18S, ITS1, 5.8S and 28S rDNA.....	40
4.5 Alignment data of a part of the 18S, ITS1, 5.8S and 28S rDNA of <i>D. eschscholzii</i> and reference 1 taxa.....	41
4.6 Set up of wood decay experiment.....	43
4.7 <i>Tectona grandis</i> decay caused by <i>D. eschscholzii</i>	45
4.8 Cellulolytic enzyme activities on solid media.....	47
4.9 Time course of β -glucosidase production by <i>D. eschscholzii</i> grown on different carbon source.....	49
4.10 Purification of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i> by SP Sepharose Fast Flow column.....	52
4.11 Purification of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i> by Phenyl Sepharose Fast Flow column.....	53
4.12 Purification of β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i> by Superdex-200 High Resolution column.....	54
4.13 Non-denaturing PAGE of the <i>D. eschscholzii</i> β -glucosidase from each step of purification.....	56
4.14 SDS-PAGE of purified β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	58
4.15 Standard curve of molecular weight and relative mobility of Purified β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i> on SDS-PAGE.....	59

Figure	Page
4.16 MALDI-TOF mass spectrum of purified β -glucosidase from Superdex-200 High Resolution column.....	59
4.17 IEF-PAGE of purified β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	61
4.18 Standard curve of <i>pI</i> determination.....	62
4.19 Temperature activity and temperature stability.....	63
4.20 pH activity and pH stability.....	64
4.21 Effect of <i>n</i> -alcohols on activity of the purified β -glucosidase.....	70
4.22 Variation of initial velocity with PNPG concentration in the hydrolysis reaction of purified β -glucosidase.....	71
4.23 Lineweaver-Burk plot of PNPG hydrolysis by purified β -glucosidase in the presence of glucose.....	73
4.24 Lineweaver-Burk plot of PNPG hydrolysis by purified β -glucosidase in the presence of glucono- δ -lactone.....	74
4.25 First-order plots for the inactivation of β -glucosidase by vary amounts of EDC in the presence of glycinamide.....	77
4.26 First-order plots for protection of β -glucosidase from EDC modification by variable concentrations of glucono- δ -lactone.....	78
4.27 MS-MS spectra of purified β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i> tryptic peak.....	80
4.28 Amino acid sequences from the fragment obtained by tryptic digestion of the purified β -glucosidase from <i>D. eschscholzii</i>	81
4.29 Transglucosylation of various alcohol using <i>D. eschscholzii</i> β -glucosidase ...	83
H.1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Methyl- β -D-glucoside.....	115
H.2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Ethyl- β -D-glucoside.....	116
H.3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of <i>n</i> -Propyl- β -D-glucoside.....	117
H.4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of <i>n</i> -Butyl- β -D-glucoside.....	118
H.5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-Propyl- β -D-glucoside.....	119
H.6 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-Methyl-1-Propyl- β -D-glucoside.....	120
H.7 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-Butyl- β -D-glucoside.....	121
H.8 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2-Methyl-2-Propyl- β -D-glucoside.....	122
I.1 <i>D.eschscholzii</i> on Mango Twig obtained from Dr. Jitra Piapukiew.....	123

LIST OF ABBREVIATIONS

%	percentage
°C	degree celsius
µg	microgram
µl	microlitre
A	Absorbance
BSA	Bovine serum albumin
cm	centimeter
Da	Dalton
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	DL-Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
g	gram
hr	hour
IEF	Isoelectric focusing
kDa	kilodaton
l	litre
LC-MS-MS	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry- Mass Spectrometry
M	Molar
mA	miliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mg	miligram
min	minute
ml	mililiter
mM	milimolar
MS-MS	Mass Spectrometry- Mass Spectrometry
MW	Molecular weight
NaCl	Sodium chloride
nm	nanometer
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PNPG	p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside

pI	Isoelectric point
rpm	revolution per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl ethylenediamine
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	Unit activity
v	volt
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume