สุนารี โชคนัด : ปฏิกิริยาการย้ายกลูโคสโดยเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสและเบต้าทรานส์กลูโคซิเดสกลายพันธุ์จากข้าว (TRANSGLUCOSYLATION BY RICE β-GLUCOSIDASES AND β-TRANSGLUCOSIDASE VARIANTS). อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 141 หน้า.

ปฏิกิริยาการไกลโคซิเลชันเป็นกลไกที่สำคัญที่สามารถลดหรือเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้นได้ เพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ และเพิ่มส่วนยึดจับกับตัวรับสัญญาณ (receptor binding sites) ไกลโคไซด์ถูกสร้างได้โดยเอนไซม์ไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส โดยการย้ายน้ำตาลจากน้ำตาลนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sugars) หรือไกลโคไซด์ ไฮโดรเลส โดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันหรือปฏิกิริยาไฮโดร ไลซิสแบบย้อนกลับ เอนไซม์คล้ายคลึงไกลโคไซด์ ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase homologues) บางชนิดเลือกย้ายน้ำตาลจากอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรท ให้กับนิวคลีโอไฟล์มากกว่าให้น้ำ เรียกว่า เอนไซม์ทรานส์กลูโคสิเดส

เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสตระกูลที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่พบเป็นวงกว้าง ทำหน้าที่ตัดพันธะโอ-ไกลโคซิดิก ระหว่างส่วนที่เป็นน้ำตาล ที่ต่อกับส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล เอนไซม์ Os9BGlu31 ทรานส์กลูโคซิเดส จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายกลูโคสในพืชเพื่อสร้างอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรท และ Os9BGlu31 ในรูปกลายพันธุ์ W243L และ W243N ถูกรายงานว่า มีประสิทธิภาพสูงในการเคลื่อนย้ายกลูโคสให้กับตัวรับที่หลากหลายมากว่า Os9BGlu31 ดั้งเดิม

ในที่นี้เราได้ทำการศึกษาการย้ายกลูโคสให้กับยาปฏิชีวนะและยาเคมีบัด โดย Os9BGlu31 กลายพันธุ์ W243L และ W243N และวิเคราะห์ปฏิกิริยาโดยวิธี UPLC จากการศึกษาพบว่ามี 6 ตัวอย่างที่สามารถรับกลูโคสได้แก่ (1) คลอแรมเฟนิคอล (2) ไนโบไมซิน (3) ยาแอมพิซิลลิน (4) อะมอกซีซิลลิน (5) เตตราไซคลีน และ (6) ดอกโซรูบิซิน นอกจากนี้ได้มีการผลิตคลอแรมเฟนิคอลกลูโคไซด์โดย Os9BGlu31W243N และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMRพบว่า เบต้า-ดี-กลูโคส เชื่อมกับแอลกอฮอล์ปฐมภูมิของคลอแรมเฟนิคอล

เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสตระกูลที่ 3 เอกโซกลูคาเนส ทำหน้าที่ตัดเบต้ากลูแคนในพืช OsExo1 มีการแสดงออกหลากหลายใน *P. pastoris* โดยในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ พบว่า OsExo1 ถูกเติมน้ำตาลในระดับที่ต่างกัน และน้ำตาลเหล่านั้นสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ Endo-glycosidase H

เอนไซม์ OsExo1 ที่ถูกเติมน้ำตาล (glycosylated) ในระดับสูงมีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) สูงสุดคือ 17.8 $U{\cdot}mg^{-1}$ ระดับปานกลางคือ 9.76 $U{\cdot}mg^{-1}$ ระดับต่ำคือ 4.02 $U{\cdot}mg^{-1}$ ในขณะที่เอนไซม์ที่ถูกตัดน้ำตาลออก (deglycosylated) มีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ที่ 9.47 $U{\cdot}mg^{-1}$ และดูเหมือนว่าการที่เอนไซม์ถูกเติมน้ำตาลนั้นไม่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ ค่าประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ถูกเติมน้ำตาล และเอนไซม์ที่ถูกตัดน้ำตาล ต่อ *p*NPGlc (k_{cat}/K_M 113 และ157 $mM^{-1}s^{-1}$) ลามินาริไบโอส (k_{cat}/K_M 446 และ 546 $mM^{-1}s^{-1}$) และลามินาริน (k_{cat}/K_M 438 และ 602 $mM^{-1}s^{-1}$) พบว่า เอนไซม์ที่ถูกเติมน้ำตาลมีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ที่ถูกตัดน้ำตาลออก อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนของ OsExo2 ถูกโคลนในพลาสมิด pET32a/DEST และถูกผลิตใน *E. coli* ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี HIC พบว่าเมื่อชะล้างด้วยเอทิลีนไกลคอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้นการทำงานของ OsExo2 เพิ่มขึ้นตาม เนื่องจากความสามารถของ OsExo2 ที่เคลื่อนย้ายกลูโคสไปให้กับเอทิลีนไกลคอล การเคลื่อนย้ายกลูโคสโดยเอนไซม์ OsExo1 และ OsExo2 ถูกทดสอบโดยใช้ *p*NPGlc ทำหน้าที่เป็นตัวให้กลูโคสให้กับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับกลูโคส การทดสอบนี้พบว่า OsExo1 และ OsExo2 สามารถย้ายกลูโคสไปให้กับแอลกอฮอล์สายสั้นที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นแอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ ผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์ของแอลกอฮอล์กลุ่มนี้ได้รับการยืนยันโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR ได้แก่ (1) methyl-β-D-glucoside (2) ethyl-β-D-glucoside (3) *n*-propyl-β-D-glucoside (4) 1-butyl-β-D-glucoside (5) 3-methyl-1-butyl-β-D-glucoside (6) propargyl-β-D-glucoside (7) 4-hydroxybenzyl-β-D-glucoside และ (8) Ethylene-disulfide-β-D-glucoside ในขณะที่ *p*NPGlc สามารถทำหน้าที่เป็นได้ทั้งตัวให้และตัวรับกลูโคสในเวลาเดียวกัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาของ *p*NPGlc สามารถแยกได้ 4 ตัวอย่าง และถูกพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR ได้แก่ (1) *p*NP-gentiotrioside (2) *p*NP-gentiobioside (3) *p*NP-cellobioside และ (4) *p*NP-laminaribiose นอกจากนี้เซลโล-โอลิโกแซกคาไรด์ (C2-C5) ลามินาริ-โอลิโกแซกคาไรด์ (L2-L5) พอลิแซกคาไรด์ได้แก่ ลามินาริน บาร์เล่ย์-กลูแคน และลิชิแนน ยังสามารถเป็นตัวให้กลูโคสสำหรับ OsExo1 และ OsExo2 ได้ด้วยเช่นกัน ผลการทดลองเหล่านี้แนะให้เห็นถึงแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรทที่เป็นประโยชน์ต่อไป

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2563 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

SUNAREE CHOKNUD : TRANSGLUCOSYLATION BY RICE β-GLUCOSIDASES AND β-TRANSGLUCOSIDASE VARIANTS.
THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 141 PP.

β-GLYCOSIDE HYDROLASE/ β-TRANSGLUCOSIDASE/ β-EXOGLUCANASE/ TRANSGLYCOSYLATION/ ALKYL GLUCOSIDE/ ANTIBIOTIC

Glycosylation is an important mechanism to restrict or increase bioactivity, increase water solubility and provide receptor binding sites. Glycosides can be produced by glycosyltransferases that transfer sugars from nucleotide sugars or glycoside hydrolases via transglycosylation or reverse hydrolysis. Some glycoside hydrolase homologues prefer to transfer sugars from glycoconjugates to nucleophiles other than water and are designated transglycosidases.

oside hydrolase family 1 are a widespread group of enzymes that hydrolyze the O-glycosidic bond between a sugar portion, which can be one or more monosaccharides, linked to a non-sugar moiety. Os9BGlu31 transglucosidase has been recognized to catalyze transglycosylation in production of glycoconjugates in plants from previous reports. Os9BGlu31 variants W243L and W243N were previously shown to have high activity and transglycosylate more substrates than wild-type enzyme. The transglucosylation of medicinal compounds by Os9BGlu31 variants W243L and W243N and assessed by reaction and ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). Among the tested acceptor substrates, six acceptors resulted in glycosylated products, including chloramphenicol, nybomycin, ampicillin, amoxicillin, tetracycline, and doxorubicin. Chloramphenicol glucoside was produced

of this carbohydrate was removed by Endoglycosidase H. The high glycosylation form was found to have highest specific activity at 17.8 $U \cdot mg^{-1}$, the form with medium glycosylation had 9.76 $U \cdot mg^{-1}$, and the low glycosylation form had 4.02 $U \cdot mg^{-1}$, while the deglycosylated form had a specific activity of 9.47 $U \cdot mg^{-1}$. Glycosylation did not seem to be critical for the stability of OsExo1. The catalytic efficiency values of the OsExo1 glycosylated form were lower than the deglycosylated form for *p*NPGlc (k_{cat}/K_M 113 and 157 $mM^{-1}s^{-1}$), laminaribiose (k_{cat}/K_M 446 and 546 $mM^{-1}s^{-1}$), and laminarin (k_{cat}/K_M 438 and 602 $mM^{-1}s^{-1}$). When OsExo2 in pET32a/DEST was produced in *E. coli*, it was found to have transglucosylation activity toward ethylene glycol during HIC purification, evidenced by its activity increasing with increasing ethylene glycol concentration. The transglucosylation activity of OsExo1 and OsExo2 was assessed in reactions using *p*NPGlc as a glucosyl donor substrate and various alcohols as acceptors. OsExo1 and OsExo2 could apparently only transfer glucose to primary alcohols of short-chain molecules. The structures of short-chain alcohols were confirmed by NMR including methyl-β-D-glucoside, ethyl-β-D-glucoside, *n*-propyl-β-D-glucoside, 1-butyl-β-D-glucoside, 3-methyl-1-butyl-β-D-glucoside, propargyl-β-D-glucoside, 4-hydroxybenzyl-β-D-glucoside, and β-mercaptoethyl-β-D-glucoside. The *p*NPGlc can act as both, glucosyl donor and acceptor substrate at the same time. Four *p*NP-oligosaccharide products were identified from the transglucosylation reaction toward *p*NPGlc including *p*NP-gentiotrioside, *p*NP-gentiobioside, *p*NP-cellobioside, and *p*NP-laminaribiose. Cello-oligosaccharides (C2-C5), laminari-oligosaccharides (L2-L5), and the polysaccharides laminarin, barley glucan, and lichenan could serve as glucosyl donors for OsExo1 and OsExo2. These results suggest efficient enzyme-catalyzed routes to produce useful glycoconjugates.

School of Chemistry Student's Signature _____

Academic Year 2020 Advisor's Signature _____