

AKKARAWIT PRAWISUT : EXPRESSION, PURIFICATION AND
CHARACTERIZATION OF RICE BETA-GLUCAN EXOGLUCANASE.

THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 111 PP.

GLYCOSIDE HYDROLASE/ β -GLUCAN EXOHYDROLASE/ RECOMBINANT
EXPRESSION/ RICE/ SUBSTRATE SPECIFICITY

Glycoside hydrolase family 3 (GH3) enzymes play important roles in several fundamental biological processes. Higher plant GH3 enzyme amino acid sequences generate a phylogenetic tree with two distinct groups. One group contains the β -D-glucan glucohydrolases-like enzymes, while the second group contains β -D-xylosidase-like enzymes. Within the glucohydrolase-like branch of rice GH3 proteins, the one most similar to barley Exo1 exoglucanase was designated OsExo1. A cDNA optimized for expression of this protein in yeast was synthesized and cloned into the pPICZ α BNH8 expression vector. The recombinant protein was extracted and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Similarly, the cDNA for the rice GH3 β -exoglucanase-like gene most similar to barley Exo2, was cloned and used to express recombinant enzyme, designated OsExo2. This protein was expressed in *Escherichia coli* strain Origami B(DE3) as a fusion protein with N-terminal thioredoxin and His₆ tags from the pET32a expression vector. The recombinant protein was extracted and purified by IMAC, phenyl sepharose chromatography and gel filtration chromatography. Both rice GH3 enzymes could hydrolyze the polysaccharides laminarin, barley (1,3;1,4)- β -D-glucan, and lichenan and the synthetic glycosides *p*NP- β -D-glucopyranoside and *p*NP- β -D-xyloside. Moreover, OsExo2 hydrolyzed *p*NP- β -

D-fucopyranoside, *p*NP- β -D-galactopyranoside, and *p*NP- α -L-arabinoside at a relatively low rate. It also hydrolyzed cellobiose with a higher catalytic efficiency (k_{cat}/K_M 25.0 mM⁻¹s⁻¹) than the other oligosaccharides substrates tested, although the values for cellotriose (k_{cat}/K_M 20.5 mM⁻¹s⁻¹) and laminaritriose (k_{cat}/K_M 21.0 mM⁻¹s⁻¹) were similar. Among the substrates tested, rice OsExo1 had similar activity to OsExo2. Based on these observations and their rather broad expression pattern, we propose that rice β -exoglucanase might be involved in the turnover or modification of cell walls in various tissues in rice plants.



School of Chemistry

Academic Year 2018

Student's Signature ชวรินทร์ น.รัตน

Advisor's Signature James R. Mc

อัครวิทย์ ประวิสุทธิ : การศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของเอนไซม์เบต้ากลูแคนเอกโซไกลูคาเนสจากข้าว (EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RICE BETA-GLUCAN EXOGLUCANASE). อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 111 หน้า.

เอนไซม์โกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 3 มีหน้าที่สำคัญหลายอย่างในกระบวนการทางชีวภาพขั้นพื้นฐาน ซึ่งในพืชชั้นสูงสามารถวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์ของเอนไซม์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้ากลูแคนโกลโคไซด์ไฮโดรเลส และกลุ่ม 2 ประกอบด้วยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส ยีนของเอนไซม์โกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 3 ของข้าวที่มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์เบต้าเอกโซไกลูคาเนสของบาร์เลย์ (HvExo1) เรียกว่า OsExo1 ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นในพลาสมิด pPICZ α BNH8 เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ตัวดังกล่าวในยีสต์ เมื่อเอนไซม์ OsExo1 ถูกผลิตออกมาแล้ว เอนไซม์จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ยีสต์มาซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วถูกนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) เอนไซม์ที่ได้ศึกษาอีกตัวหนึ่งเรียกว่า OsExo2 โดย cDNA ของเอนไซม์ดังกล่าวได้ถูกโคลน และตัดต่อเข้าไปในพลาสมิด pET32a/DEST จากนั้นพลาสมิดดังกล่าวได้ถูกนำเข้าไปใน *Escherichia coli* เพื่อนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์โดยมี thioredoxin และ His6 tags ต่อที่ปลาย N-terminal ของเอนไซม์ เอนไซม์ OsExo2 ที่ผลิตออกมาถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี IMAC ตามด้วย phenyl sepharose และ gel filtration ตามลำดับ จากการศึกษพบว่าทั้งเอนไซม์ OsExo1 และ OsExo2 สามารถย่อยสลายได้แก่ ลามินาริน บาร์เลย์-เบต้า-ดี-กลูแคน และลิซิแนน รวมถึงสามารถย่อยกลูโคไซด์สับสเตรทได้แก่ pNP-glucoside และ pNP-xyloside เฉพาะในเอนไซม์ OsExo2 ที่สามารถย่อยสลายได้แก่ pNP-fucoside pNP-galactoside และ pNP-arabinoside รวมทั้ง เอนไซม์ OsExo2 ยังสามารถย่อยเซลลูโลส ได้เร็วกว่าโอลิโกแซคคาไรด์สับสเตรทตัวอื่น ๆ (k_{cat}/K_M , 25.0 mM⁻¹s⁻¹) แม้ว่าค่าความสามารถย่อยเซลลูโลส (k_{cat}/K_M 20.5 mM⁻¹s⁻¹) และลามินาริน ไตรโอส (k_{cat}/K_M 21.0 mM⁻¹s⁻¹) จะมีค่าใกล้เคียงกัน การทดสอบการย่อยสลายของเอนไซม์ OsExo1 พบว่าคล้ายกับการย่อยสลายของเอนไซม์ OsExo2 จากผลการทดลองและจาก

รูปแบบการแสดงผลของอินที่ค่อนข้างกว้าง พบว่าแอนิเมชันเบต้าเอกโซกลูกคานาเสจากข้าวน่าจะ
เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกลับคืนหรือการปรับแต่งของผนังเซลล์ในข้าว



สาขาวิชาเคมี

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา

อัครวิทย์ อธิวิทย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

James R. Mc