ลิงห์ ธุย ถราน : การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ glycoside hydrolase family I - cluster At/Os 6 ในข้าว (CHARACTERIZATION OF RICE GLYCOSIDE HYDROLASE FAMILY I - CLUSTER AT/OS 6 ENZYMES). อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 112 หน้า.

เอนไซม์เบตากลูโคซิเดสของพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในตระกูลที่ 1 ของไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไกลโคไซไฮโดรเลส กลุ่มที่ 1 ยังมีความสามารถในการย้ายหมู่น้ำตาลกลูโคสให้กับสารใหม่ๆ ในพืชต่างๆ จากความคล้ายคลึงของลำดับเบสกรดอะมิโน Os5BGlu19 ของข้าวถูกจัดอยู่ในกลุ่มของไกลโคไซไฮโดเลส กลุ่มที่ 1 (GH1) At/Os cluster 6 ซึ่งมี Os9Glu31 ของข้าวที่สามารถย้ายหมู่น้ำตาลให้กับสารอื่นๆ การศึกษาการทำงานทางชีวเคมีของ Os5BGlu19 และ Os9Glu31 ที่กลายพันธุ์ เพื่อศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ในไกลโคไซไฮโดเลส กลุ่มที่ 1 cluster 6 cDNA ของ Os5BGlu19 ได้ตัดต่อเข้าไปในพลาสมิด pET32a และ pPIZCαBNH8/eGFP เพื่อผลิตโปรตีนใน *Escherichia coli* และในยีสต์ *P. pastoris* ตามลำดับ จากการศึกษาไม่พบโปรตีนที่ละลายน้ำได้หรือกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจาก pET32a/Os5BGlu19 ใน *E. coli* ส่วนโปรตีนที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* พบว่า มีอยู่ในเซลล์ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนส์ จึงได้ทำการตัดเบสบางส่วนที่ไม่ตรงกับ Os5BGlu19 ออกจาก cDNA Os5BGlu19 ที่ถูกตัดเบสบางส่วนออกได้ถูกผลิตโปรตีนใน *E. coli* และได้ทำการยืนยันโดย western blot ด้วย Os5BGlu19 แอนติบอดี โปรตีนถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) เพื่อนำมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Os5BGlu19 สามารถย้ายหมู่น้ำตาลไปให้ ferulic acid (FA) เพื่อสะสม 1-feruloyl-β-D-glucose (FAG) ในสารสกัดจากใบข้าว ที่ตรวจสอบโดย UPLC โดยใช้ negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MSMS) โดยใช้โหมด multiple reactant monitoring (MRM)

เพื่อศึกษาการแทนที่ของกรดอะมิโน tryptophan ลำดับที่ 243 ในการย้ายหมู่น้ำตาลของ Os9BGlu31 จึงได้ทำการกลายพันธุ์ไปเป็นกรดอะมิโนซึ่งประกอบไปด้วย ไกลซีน (G) ฮีสติดีน (H) ไลซีน (K) กลูตามีน (Q) อาร์จินีน (R) เซอรีน (S) และ วาลีน (V) โดยเทคนิค site directed mutagenesis Os9BGlu31 wild type และกลายพันธุ์ สามารถผลิตโปรตีนใน *E. coli* สายพันธุ์ Origami B (DE3) และถูกทำแยกให้บริสุทธิ์โดย IMAC และ His_6 tags ถูกตัดออกโดย TEV protease

UPLC ถูกใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของ 4NP ที่ถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ Os9BGlu31 wild type และตัวกลายพันธุ์โดนใช้ตัวรับ (acceptors) 22 ตัว Os9BGlu31 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง W243 (G Q และ V) พบว่า สามารถย้ายหมู่น้ำตาลไปที่ phenolic acids ฮอร์โมนพืช และฟลาโวนอยด์ ได้ดีกว่า wild type Os9BGlu31 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งW243 สามารถสังเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น กลูโคไซด์ และ บิส-กลูโคไซด์ กับ กรดไฮดรอกซีฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ แสดงถึงอิทธิพลของการย้ายหมู่น้ำตาลของ Os9BGlu31 ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน W243 ว่ามีความสำคัญในการย้ายหมู่น้ำตาลไปให้สารอื่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

LINH THUY TRAN : CHARACTERIZATION OF RICE GLYCOSIDE HYDROLASE FAMILY I - CLUSTER AT/OS 6 ENZYMES.

THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 112 PP.

GLYCOSIDE HYDROLASE/TRANSGLUCOSIDASE/ RICE/BETA-GLUCOSIDASE/ RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION/MUTAGENESIS

Plant β-glucosidases mostly belong in glycoside hydrolase family 1 (GH1), which includes transglycosidases as well. Enzymes in GH1 have been reported to catalyze novel transglycosylation reactions in different plants. Based on sequence similarity, rice Os5BGlu19 is classified in GH1 phylogenetic cluster At/Os 6, which also includes rice Os9BGlu31 transglucosidase. I characterized the biochemical functions of Os5BGlu19 and Os9Glu31 mutants in order to learn more about the functions of GH1 cluster 6 enzymes. An Os5BGlu19 cDNA was inserted into pET32a and pPIZCαBNH8/eGFP vectors to express in *Escherichia coli* and *P. pastoris*, respectively. However, no soluble protein or activity could be detected for protein expression from pET32a/Os5BGlu19 in *E. coli*, and protein which was expressed in *P. pastoris* was found to be localized inside the cell by fluorescence microscopy of the C-terminally fused enhanced green fluorescent protein (eGFP) tag. Therefore, Os5BGlu19 was truncated on both termini to remove extra sequence that did not match the homology model structure of Os5BGlu19 and might contain protease sites or sequence targeting the protein to the yeast vacuole. Truncated Os5BGlu19 fusion protein was expressed in *E. coli* and its expression confirmed by western blot analysis with anti-Os5BGlu19 peptide antibody. The protein was partially purified by

immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) to identify the enzyme activity. Os5BGlu19 could transfer glucose to ferulic acid (FA) to accumulate 1-feruloyl-β-D-glucose (FAG) in reactions with rice leaf extracts, as determined by the UPLC and electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MSMS) in the multiple reactant monitoring (MRM) mode.

In order to determine the influence of substitutions at Os9BGlu31 amino acid residue tryptophan 243 on transglycosylation of various acceptors, this position was mutated to glycine (G), histidine (H), lysine (K), glutamine (Q), arginine (R), serine (S) and valine (V) by site directed mutagenesis. Os9BGlu31 wild type and its mutants were successfully expressed in Origami B(DE3) and purified by IMAC, cleavage from the N-terminal thioredoxin and His_6 tags by TEV protease, and a second round of IMAC. The relative activity of Os9BGlu31 wild type and mutants with twenty-two acceptors were compared by UPLC. Some of the new W243 mutants (G, Q and V) showed higher activity than wild type in glycosylation of phenolic acids, phytohormones and flavonoids, although not as high as the previously generated W245N mutant. Several Os9BGlu31 W243 mutants could catalyze synthesis of multiple products, such as glucoside and bis-glucoside with hydroxyphenolic acids and flavonoids. Thus, the Os9BGlu31 W243 position has profound influence on its transglycosylation activity.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry Student's signature _____

Academic Year 2016 Advisor's signature _____