เกษฎา สาลา : การทำโปรตีนบริสุทธิ์และศึกษาการทำงานของไกลโคไซด์ไฮโดรเลส กลุ่ม 3 จากข้าว เบต้าไซโลซิเดส OsXYL1 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RICE GLYCOSIDE HYDROLASE FAMILY 3 β-XYLOSIDASE OsXYL1. อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 96 หน้า.

คำสำคัญ: เบต้าไซโลซิเดส/ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส กลุ่ม 3/ไซโลโอลิโกแซ็คคาไรด์

เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตออกนอกเซลล์เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย การปรับโครงสร้าง และการดัดแปลงโพลิแซ็กคาไรด์ของผนังเซลล์พืชในการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช เอนไซม์เหล่านี้ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในการย่อยสลายสารชีวมวล เอนไซม์ในตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดรเลส 3 จากพืช มีส่วนร่วมในการดัดแปลงและการย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์ มีเอนไซม์จากพืชชั้นสูงเพียงบางชนิดที่มีการศึกษาคุณสมบัติมาแล้ว เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจากข้าว (*Oryza sativa*) OsXYL1 ซึ่งอยู่ในตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดรเลส 3 ถูกโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pPICZαBH8 เพื่อการแสดงออกในเชื้อ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ SMD1168H ทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติโปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 5 วันที่อุณหภูมิ 20 °C สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้สำเร็จ ฟิวชันเบต้าไซโลซิเดส OsXYL1 โปรตีนที่มีฮิสทิดีนแท็ก ที่ตำแหน่งและมี N-glycosylation สามตำแหน่ง ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีสองขั้นตอน คือ Ni-immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ตามด้วยโครมาโตกราฟีแบบแยกขนาดด้วย Superdex S200 โปรตีนที่ถูกตัดหมู่น้ำตาลออกมีน้ำหนักโมเลกุล (MW) ประมาณ 84 kDa จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ซึ่งตรงกับขนาดที่คาดการณ์ไว้ เอนไซม์ OsXYL1 ที่บริสุทธิ์มีความสามารถในการย่อย 4NP-β-D-xylopyranoside (4NPXyl) ได้ดีที่สุดที่ pH 4.0 และอุณหภูมิ 60 °C และทนต่ออุณหภูมิ 30-50 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง เอนไซม์ OsXYL1 สามารถย่อย 4NPXyl และไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 (XOS, ที่มี DP 2 ถึง 6 หน่วย) เอนไซม์นี้สามารถย่อย 4-nitrophenyl glycosides อื่น ๆ ได้แก่ 4NP-α-L-arabinofuranoside (4NPAra*f*), 4NP-α-L-arabinopyranoside (4NPAra*p*), 4-NP-N-acetyl-β-D-glucosaminide และ 4NP-β-D-glucopyranoside ไม่เกิน 10% ของ 4NPXyl ค่าจลนศาสตร์ของ OsXYL1 ต่อ 4NPXyl ซึ่งมีความชอบสูง ได้แก่ ค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m) เท่ากับ 0.65 ± 0.03 mM และค่า

ประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา (k_{cat}/K_m) สูงถึง 19.0 $mM^{-1}s^{-1}$ กิจกรรมการย่อยถูกยับยั้งด้วยไซโลสที่มีค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) แบบแข่งขัน เท่ากับ 1.41 ± 0.06 mM นอกจากนี้ OsXYL1 สามารถย่อย β-1,4-xylo-oligosaccharides (XOSs) ที่มีระดับการเกิดพอลิเมอไรเซชัน (DP) 2 ถึง 6 หน่วย ซึ่งมีค่าประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา (k_{cat}/K_m) เท่ากับ 2.56, 4.17, 3.11, 2.80 และ 1.47 $mM^{-1}s^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งมีสัมพันธ์แบบผกผันกับระดับของพอลิเมอไรเซชันจาก 3 ถึง 6 หน่วย สำหรับกิจกรรมทรานส์ไกลโคซิเลชันได้ผลิตภัณฑ์อัลคิลไซโลไซด์ที่มีตัวรับแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยาใช้เวลาในการสะสมผลิตภัณฑ์นานกว่า 4 วัน

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส OsXYL1 จากข้าวอาจทำหน้าที่ในการย่อยสลายไซแลนในการรีไซเคิลผนังเซลล์พืช และกิจกรรมทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์กับตัวรับแอลกอฮอล์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อัลคิลไซโลไซด์ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

KADSADA SALA : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RICE GLYCOSIDE HYDROLASE FAMILY 3 β-XYLOSIDASE OsXYL1. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 96 PP.

Keyword: β-XYLOSIDASE/GLYCOSIDE HYDROLASE FAMILY 3/XYLOOLIGO-SACCHARIDES

Various extracellular glycoside hydrolases are involved in degrading, remodeling, and modifying polysaccharides in plant cell wall in plant growth and development, and these enzymes are widely employed in degradation of biomass. Plant glycoside hydrolases family 3 members have been associated with modification and degradation of cell wall matrix, but few have been characterized in higher plants. A rice (*Oryza sativa*) β-xylosidase designated as OsXYL1, which belongs to glycoside hydrolase family 3, was recombinantly cloned for expression, purification and characterization. OsXYL1 β-xylosidase from the pPICZαBH8/OsXYL1 vector in heterologous *Pichia pastoris* SMD1168H strain was successfully purified from the secreted protein in culture medium after induction for 5 days at 20 °C. The fusion protein with histidine tags, 3C Precision sites and three N-glycosylation sites in OsXYL1 β-xylosidase was purified by two chromatographic steps, Ni-immobilized metal affinity chromatography (IMAC), followed by Superdex S200 size exclusion chromatography. The molecular weight (MW) of the deglycosylated protein was estimated as 84 kDa by SDS-PAGE, which matched the predicted mass. The purified OsXYL1 showed the optimal hydrolysis activity toward 4NP-β-D-xylopyranoside (4NPXyl) at pH 4.0 and at 60 °C, and it was relatively stable at temperatures ranging from 30-50 °C for at least 4 h. OsXYL1 had hydrolysis activity on 4NPXyl and also on β-1,4-linked xylooligosaccharides (XOS, with DP 2-6). The relative activity was not greater than 10% of that on 4NPXyl with the other 4-nitro-phenyl glycosides, including 4NP-α-L-arabinofuranoside (4NPAra*f*), 4NP-α-L-arabinopyranoside (4NPAra*p*), 4NP-N-acetyl-β-D-glucosaminide, and 4NP-β-D-glucopyranoside. Kinetic parameters of OsXYL1 with the highly preferred 4NPXyl included an apparent Michaelis-Menten constant (K_m) value of 0.65 ± 0.03 mM, and high catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) value of 19.0 $mM^{-1}s^{-1}$. The hydrolytic activity was inhibited by xylose with a competitive inhibition constant (K_i) of 1.41 ± 0.06 mM. In addition, OsXYL1 hydrolyzed

β-1,4-xylo-oligosaccharides (XOSs) with degree of polymerization (DP) of 2-6 with apparent catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) values 2.56, 4.17, 3.11, 2.80, and 1.47 $mM^{-1}s^{-1}$, respectively, which were inversely related to its degree of polymerization from 3 to 6. Transglycosylation activity produced alkyl xyloside products with alcohol acceptors in reactions in which the products accumulated for over 4 days.

These data indicate that rice β-xylosidase OsXYL1 might function in degradation of xylans in plant cell wall recycling, and its transglycosylation activity with alcohol acceptors to produce alkyl xyloside products may be a useful application of this enzyme.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry
Academic Year 2021

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____