ลี ที ทุย ทริน : การผลิตและการทำบริสุทธิ์แคนาบิไดออลไกลโคไซด์ (PRODUCTION AND PURIFICATION OF CANNABIDIOL GLYCOSIDES) อาจารย์ที่ปรึกษา :
รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวัน, 121 หน้า.

คำสำคัญ : แคนนาบิไดออลไกลโคไซด์/ซูโครสซินเทส/SrUGT76G1/การแสดงออกของเอนไซม์/สภาวะการเกิดไกลโคซิเลชันของ CBD

แคนนาบิไดออลไกลโคไซด์ (cannabidiol glycosides) เป็นยากลุ่มประเภทโพรดรัก (prodrug) ที่มีข้อดีหลายประการรวมถึงความสามารถในการละลายสูง ความคงสภาพ การดูดซึมทางชีวภาพ และคุณลักษณะทางเภสัชจลนศาสตร์ ปฏิกิริยาเรียงซ้อน (cascade reaction) ของเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส SrUGT76G1 และซูโครสซินเทส SuSy ได้รับการพัฒนาเพื่อสังเคราะห์สารประกอบไกลโคไซด์โดยใช้ซูโครส (น้ำตาลทราย) ราคาถูกเป็นตัวให้กลูโคซิลอย่างง่าย ดังนั้นวัตถุประสงค์แรกของการศึกษานี้คือการหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีและสภาวะการแสดงออกที่เหมาะสมสำหรับการผลิต SuSy และ SrUGT76G1 ในฟลาสก์เขย่า ถังหมักขนาด 5 ลิตร และถังหมักขนาด 50 ลิตร หลังจากได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีแล้ว การออกแบบการทดลองโดยโมเดลของ Box-Benhken ได้ถูกนำมาใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของเอนไซม์ SuSy และ SrUGT76G1 โดยปรับปัจจัยสามอย่างให้เหมาะสมได้แก่ อุณหภูมิ ตัวเหนี่ยวนำแลคโตส และเวลา พบว่า การแสดงออกที่เหมาะสมถูกนำมาใช้ในฟลาสก์เขย่า ถังหมักขนาด 5 ลิตร และถังหมักขนาด 50 ลิตรได้สำเร็จ โดยผลผลิตของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากขวดทดลองไปจนถึงถังหมัก ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จำเพาะก็ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสำหรับเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์หลังการเพาะเลี้ยงจากทั้งสามระบบ

วัตถุประสงค์ที่สองคือเพื่อลดต้นทุนในการสกัดเอนไซม์ โดยใช้วิธีสกัดเอนไซม์แบบไมโครฟลูอิดิกแทนวิธีการสกัดด้วยไลโซไซม์ ผลการวิจัยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในด้านผลผลิตของเอนไซม์และความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ระหว่างทั้งสองเทคนิค ทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์สำหรับการสังเคราะห์ CBD glycosides

วัตถุประสงค์ที่สามคือการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแคนนาบิไดออลไกลโคไซด์ ในขณะเดียวกันก็ลดต้นทุนของตัวให้น้ำตาลโดยใช้ซูโครสซินเทส SuSy เพื่อสร้าง UDP-Glc ใหม่ ผลลัพธ์ได้มาจากเงื่อนไขสองประการในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีขั้วน้อยหรือมากกว่านั้น โดยมีการใช้ LC/MS/MS เพื่อยืนยันมวลของผลิตภัณฑ์ CBD glycosides จากนั้นจึงตรวจสอบโครงสร้างของ CBD glycosides ที่ได้

วัตถุประสงค์สุดท้ายคือการขจัดสิ่งเจือปนส่วนใหญ่ออกจาก CBD glycosides หลังเกิดปฏิกิริยา จากซิลิกาเจลโครมาโทกราฟี พบว่าสิ่งเจือปนส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกโดยเฉพาะ

สารประกอบที่ชอบน้ำ ผลิตภัณฑ์ CBD-G1 ถูกแยกออกด้วยเมทานอล 5% ในสารละลายเอทิลอะซิเตตของซิลิกาเจลโครมาโตกราฟี และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยโครมาโทกราฟีเรซินชนิด C18 บรรจุในคอลัมน์ขนาดเล็ก สำหรับ HPLC แบบแฟลช/preparative นั้น สารผสม CBD glycosides พบอยู่ในส่วนแยกลำดับที่ 23 และ 24 ที่มีตัวทำละลายประมาณ 28% อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ และ CBD-G2 ถูกชะล้างในส่วนแยกลำดับที่ 31 และ 32 ด้วยตัวทำละลายประมาณ 40% อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ

สภาวะการแสดงออกของการผลิตเอนไซม์ทั้งสอง เอนไซม์สกัดแบบไมโครฟลูอิดิก ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ CBD glycosides โดย SrUGT76G1 และเอนไซม์ SuSy เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ไกลโคไซด์ที่เป็นโพลาร์มากขึ้น และการทำให้ CBD glycosides บริสุทธิ์บางส่วน ได้ทำให้เกิดความชัดเจนจากผลการทดลองนี้ การศึกษาในอนาคตควรจะตรวจสอบการเชื่อมต่อ (Fusion) เพื่อปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการผลิต CBD glycosides รวมถึงวิธีการอื่นในการทำให้บริสุทธิ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2566

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

LE THI THUY TRINH : PRODUCTION AND PURIFICATION OF CANNABIDIOL GLYCOSIDES. THESIS ADVISOR : APICHAT BOONTAWAN, Ph.D., 121 PP.

Keyword: CANNABIDIOL GLYCOSIDES/SUCROSE SYNTHASE/SrUGT76G1/ENZYME EXPRESSION/ CBD GLYCOSYLATION CONDITIONS

Cannabidiol glycosides are prodrugs with many advantages, including high solubility, stability, bioavailability, and pharmacokinetic characteristics. The coupled SrUGT76G1 glucosyltransferase and sucrose synthase (SuSy) enzymes cascade reaction was developed to synthesize glycoside compounds using cheap sucrose as the expedient glucosyl donor. Thus, the first objective of this study was to screen for optimal medium and suitable expression conditions for SuSy and SrUGT76G1 production in shake flask, 5 L fermenter, and 50 L fermenter cultures. After the best medium was identified, Box-Benhken design was used to determine the suitable expression conditions for SrUGT76G1 and SuSy enzymes, optimizing three factors including temperature, lactose inducer, and time. For this, the suitable expression conditions were successfully applied in the shake flask, 5 L fermenter, and 50 L fermenter cultures. The yields of enzyme production were successfully increased from shake flask to fermenter. The specific activities of the enzymes were not significantly different for purified enzyme from each systems.

The second objective was to reduce cost and materials for the enzymatic extraction for which microfluidic method was used to substitute the used of lysozyme and DNase method. The results showed that there were no significant differences in the enzymes production yield and the enzyme activities between the two extraction techniques. The low-cost manufacture of enzyme materials for the synthesis of CBD glycoside was thereby facilitated.

The third objective was to obtain optimal conditions for the production of cannabidiol glycosides while reducing the cost of sugar donors by the use of sucrose synthase to regenerate UDP-Glc. Two conditions for generating either less or more polar products were drawn from the results. LC/MS/MS was used to confirm the mass of the CBD glycosides and then determine their structure.

The last objective was to partially remove most impurities from CBD glycosides after the reaction. From silica gel chromatography, most impurities especially hydrophilic compounds were removed. The CBD-G1 product was isolated by 5% methanol in ethyl acetate fractions of silica gel chromatography and purified more by mini C18-resin column chromatography. For flash/preparative HPLC, the mixed CBD glycoside formulations were found in fractions 23 and 24 at a solvent composition of around 28% acetonitrile in water, and the CBD-G2 eluted at fraction 31, 32, around 40% acetonitrile in water.

The expression conditions for both enzyme productions, the microfluidic extraction enzyme, the CBD glycoside synthesis reaction by SrUGT76G1 and SuSy enzyme for obtaining more polar glycoside products, and the partial purification of CBD glycosides were illuminated by these results. Future studies to examine the fusion for improving the enzyme-soluble forms of CBD glycosides as well as alternative methods for purification should be performed.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2023

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature _____