

ชื่อโครงการ “การศึกษา สเตอริโอซีเลคทีวิตีจากอิทธิพลของเอนไซม์ลินามาเรส
ซึ่งสกัดได้จากมันสำปะหลัง ในการ สังเคราะห์สารกลูโคไซด์”

**Stereoselective Transglucosylation
of Cassava Linamarase**

ทิพวัลย์ เกตุแก้ว¹⁾, ม.ร.ว. ชัยณัฐร สวัสดิวัตน์^{*2)} และ พลังพล คงเสรี^{*1)}

ชื่อผู้วิจัย¹⁾ และ ชื่อหัวหน้าโครงการ^{*1)*2)}

- 1) ภาควิชาเคมี และหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- 2) ภาควิชาชีวเคมี และหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ลินามาเรสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม β -glucosidase ซึ่งสกัดได้จากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเปลี่ยนลินามารินซึ่งเป็นไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (cyanogenic glucoside) ให้สารผลิตภัณฑ์เป็นไซยาโนไฮดริน เอนไซม์ในกลุ่ม β -glucosidase สามารถทำหน้าที่เป็น คะตะลิสต์ ในการเร่งปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชันกับ ไดสารกลูโคไซด์ โดยคุณสมบัติพิเศษที่ต่างไปจากเอนไซม์ในกลุ่ม β -glucosidase ชนิดอื่นคือ ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง สามารถที่จะทำปฏิกิริยากับทุติยเออลกอฮอล์ และตติยเออลกอฮอล์ ได้ดี

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาสเตอริโอซีเลคทีวิตี ของปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชันของเอนไซม์ ลินามาเรส โดยใช้ ทุติยเออลกอฮอล์ที่มี chiral center ที่ตำแหน่ง carbinol carbon โดยเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับ enantiomeric alcohol ได้ดีไม่เท่ากัน จุดประสงค์ประการหนึ่งของการศึกษานี้ เพื่อที่จะนำไปสู่ความเข้าใจในหน้าที่และกลไกการทำงานของ เอนไซม์ linamarase และอาจนำไปสู่การนำเอนไซม์นี้ไปพัฒนาใช้ประโยชน์ ในการสังเคราะห์สารในกลุ่ม glycoside ที่มีประโยชน์ต่อไป

ในปฏิกิริยา transglucosylation สารตั้งต้นที่ใช้ได้แก่ glucosyl acceptor คือ chiral alcohol และ glucosyl donor เป็น *p*-nitrophenolic glucopyranoside (pNPGlc) ได้ glucoside product ที่มีสมบัติทาง สเตอริโอเคมีต่างกัน โดยจะเป็น diastereomeric mixture และพบว่าปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชันของลินามาเรสทำปฏิกิริยากับ *R*-alcohol ได้ดีกว่า *S*-alcohol ในการวิเคราะห์ติดตามปฏิกิริยาจะใช้เทคนิค TLC และ liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) วิธีการทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์จะใช้เทคนิค silica-gel column chromatography และ HPLC ส่วนการเปรียบเทียบอัตราส่วนปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นใช้ ¹H-NMR Spectrophotometry

บทนำ

มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชที่เจริญเติบโตในเขตร้อน ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz มันสำปะหลังสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วโดยเมล็ด หรือการปักชำ เป็นพืชที่ชอบแสงแดด เติบโตได้ในทุกสภาพดินในประเทศไทย มันสำปะหลังจัดได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ สามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารได้ เนื่องจากประกอบไปด้วยสารอาหารประเภท คาร์โบไฮเดรต นอกจากนั้นยังสามารถนำมาหมักเพื่อเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ได้อีกด้วย โดยทำการเปลี่ยนจากแป้งมันสำปะหลังนี้ให้กลายเป็นน้ำตาล หลังจากการหมักจะปล่อยแอลกอฮอล์ออกมา ประโยชน์ของแป้งมันสำปะหลังนอกจากที่ใช้เป็นอาหารแล้ว ยังมีอีกมากมาย เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ โดยใช้แป้งเคลือบบนผิวกระดาษ หรือการผลิตผงชูรส เป็นต้น

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase)

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส หรือ เรียกตามชนิดเอนไซม์ว่า EC 3.2.1.21 ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิเดส (glycosidase) หรือ EC 3.2 ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ที่ตำแหน่งพันธะไกลโคซิเดส โดยจะเกิดปฏิกิริยาอย่างเฉพาะเจาะจง เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสนี้ สามารถพบทั่วไปในสิ่งมีชีวิตในพืชส่วนใหญ่จะมีเอนไซม์ชนิดนี้เพื่อพฤติกรรมต่างๆ ตามชีววิทยาของมัน

เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง

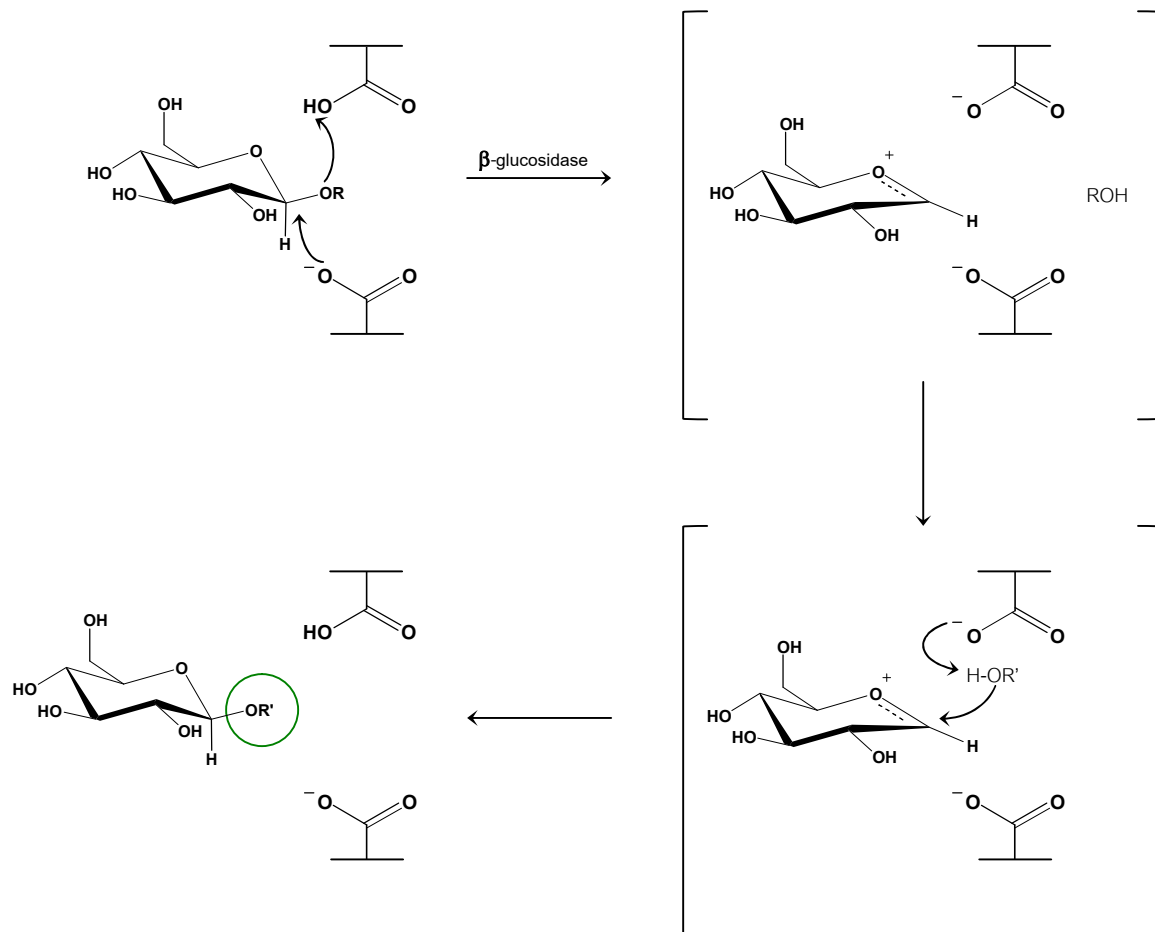
ลินามาเรส เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม β -glucosidase จากมันสำปะหลัง (Cassava) นอกจากมันสำปะหลังจะเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิตแล้ว ก็ยังคงเป็นพืชที่สามารถนำมาสกัดเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิเดส ชื่อ ลินามาเรส (linamarase) ซึ่งเป็นชนิด เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) โดยสามารถสกัด

ได้จาก ก้านใบ (petiole) เปลือกหุ้มชั้นนอกของหัวมัน (root cortex) และ ลำต้น (stem)^{2,1} เอนไซม์ลินามาเรส ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเปลี่ยนลินามารินซึ่งเป็นไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (cyanogenic glucoside) ให้สารผลิตภัณฑ์เป็นไซยาโนไฮดริน เอนไซม์ในกลุ่ม β -glucosidase สามารถทำหน้าที่เป็น คเตะลิสต์ ในการเร่งปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชันกับ ไดสารกลูโคไซด์ โดยคุณสมบัติพิเศษที่ต่างไปจากเอนไซม์ในกลุ่ม β -glucosidase ชนิดอื่นคือ ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง สามารถที่จะทำปฏิกิริยากับทุติยะอัลกอฮอล์ และตติยะอัลกอฮอล์ ได้ดี

กลไกการเกิดปฏิกิริยา

การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ของพันธะไกลโคซิติก (glycosidic bond) จะเกี่ยวข้องกับตำแหน่งของกรดอะมิโน คือ กรดกลูตามิก (glutamic acid) 2 ตัว ในลักษณะการเกิดแบบ acid-base catalysis ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะมี 2 ชนิด ได้แก่ retention configuration และ inversion configuration

เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จะเป็นลักษณะของ retention configuration ในการเร่งปฏิกิริยา transglucosylation โดยสารตั้งต้นที่ใช้ ได้แก่ chiral alcohol และ glucosyl donor โดยจะใช้เป็น *p*-NPGlc⁴ โดย linamarase จะ hydrolyze *p*-NPGlc แล้วจะได้ *p*-nitrophenol ออกมาและส่วนของ glucose จะติดอยู่กับเอนไซม์ในรูป oxonium ion และขั้นตอนหลังจะเกิดปฏิกิริยานucleophilic addition ของ alcohol ได้ glucoside product ที่มีสมบัติทาง stereochemistry ต่างกัน โดยจะเป็น diastereomeric mixture กลไกการเกิดปฏิกิริยาสามารถแสดงได้ดังต่อไปนี้



แผนภาพแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ลินามาเรส

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการสังเคราะห์สารกลูโคไซด์ของ เอนไซม์ลินามาเรส โดยปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิลเลชันที่ใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิทำหน้าที่เป็น glucose acceptor

2. แยกกลูโคไซด์ที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างสามมิติของกลูโคไซด์ที่สังเคราะห์ได้

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษา stereoselectivity ของปฏิกิริยา transglucosylation ของ เอนไซม์ลินามาเรส โดยใช้ alcohol substrate เป็น secondary alcohol ที่มี chiral center ที่ตำแหน่ง carbinol carbon เป็นไปได้ว่าเอนไซม์ลินามาเรส จะทำปฏิกิริยากับ enantiomeric alcohol ได้ดีไม่เท่ากัน เนื่องจาก เอนไซม์ประกอบด้วย chiral amino acids ดังนั้นจึงทำหน้าที่เป็น asymmetric catalyst จุดประสงค์ประการหนึ่งของการศึกษานี้ เพื่อที่จะนำไปสู่ความเข้าใจในหน้าที่และกลไกการทำงานของ เอนไซม์ลินามาเรส และอาจนำไปสู่การนำเอนไซม์นี้ไปพัฒนาใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์สารในกลุ่มไกลโคไซด์ที่มีประโยชน์ต่อไป

1. การวัดคุณภาพเอนไซม์

วิธีการทดลอง

การทดสอบคุณภาพนี้จะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ *p*-NPGlc (*p*-Nitrophenyl- β -D-glucospyranoside) ในการทดลองจะใช้สารนี้เข้มข้น 50 mM. และใช้ลินามาเรส เข้มข้น 10 mg/ml แล้วเจือจางเป็น 500 เท่า ในสารละลาย phosphate buffer pH 5.5 ปริมาตร 50 μ l ที่ 30 °c เป็นเวลา 10 นาที สารที่จะสามารถตรวจสอบได้จากการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวคือ *p*-Nitrophenol โดยอาศัยคุณสมบัติของการดูดกลืนแสงในช่วง UV ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 400 nm. เมื่ออยู่ในสภาวะเบส (โดยเติม

0.2 M. Na₂CO₃ 2 ml.) ค่าการดูดกลืนที่วัดได้ จะนำไปเปรียบเทียบกับ standard curve ของ *p*-Nitrophenol ค่าที่วัดได้จะคำนวณเป็น unit / ml. หรือ μ mol / min / ml

ผลการทดลอง

วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.291 (ค่าเฉลี่ยซึ่งหักจาก blank เรียบร้อยแล้ว)

ค่า activity สามารถคำนวณได้เท่ากับ 40.42 unit / ml.

ดังนั้น 1 unit เท่ากับ 24.7 ml

สรุปผลการทดลอง

ค่า activity ที่สามารถคำนวณได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังนั้นเอนไซม์ลินามาเรสที่สกัดจากก้านใบมันสำปะหลังนี้ สามารถนำไปทำปฏิกิริยา transglucosylation ต่อไปในขั้นต่อไปได้

2. สังเคราะห์สารอัลคิลกลูโคไซด์ โดยใช้เอนไซม์ลินามาเรส ในปฏิกิริยา ทรานสกลูโคซิลเลชัน

วิธีการทดลอง

เนื่องจากลินามาเรส สามารถทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำไปสู่การศึกษาการเกิดปฏิกิริยา transglucosylation ที่เกิดกับแอลกอฮอล์ที่ไม่สมมาตร (chiral alcohol) โดยใช้ *p*-NPGlc เป็นสารตั้งต้น ซึ่งแอลกอฮอล์ทุติยภูมิที่ใช้จะอยู่ในรูปของ racemic mixture

• การสังเคราะห์สารอัลคิลกลูโคไซด์ โดยใช้ Benzene methanol

- ผสม *p*-NPGlc 60 mg ใน Benzenemethanol ปริมาตร 4 ml ทำให้ละลายมากที่สุด

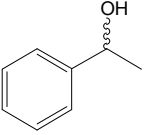
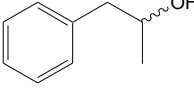
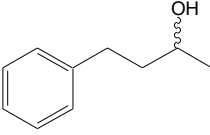
- เติมนลินามาเรส 200 μ l (ประมาณ 4 unit) แล้วนำไปตั้งใน water bath ที่ 30 °c

- ติดตามปฏิกิริยา โดยใช้ TLC (โดยใช้ระบบ 10 % MeOH/ CH₂Cl₂)
- เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ นำสารผสมดังกล่าวมาสกัดแยกด้วยระบบ H₂O/CH₂Cl₂
- นำสารในชั้นน้ำไปตรวจสอบอีกครั้งด้วยเทคนิค LC-MS
- แยกสารในชั้นน้ำ โดยอาศัยเทคนิค silica gel column chromatography ระบบของสารละลาย 10 % MeOH/ CH₂Cl₂
- ใช้เทคนิค HPLC เพื่อทำให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น
- วิเคราะห์สารที่แยกได้ โดยเทคนิค ¹H-NMR

● การสังเคราะห์สังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ โดยใช้ **Benzene ethanol** และ **Benzene propanol**

ทำการทดลองเช่นเดียวกับใน Benzenemethanol แต่เปลี่ยนชนิด alcohol เป็น Benzeneethanol และ Benzenepropanol

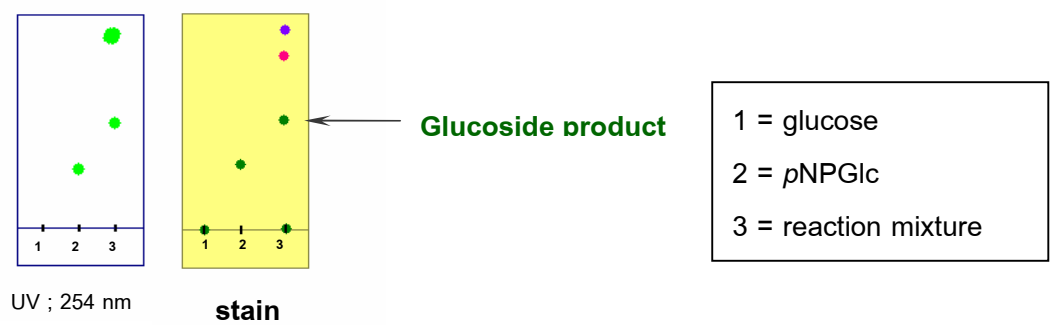
secondary alcohol ที่สนใจในการทำ การวิจัยครั้งนี้ ได้แก่

ชื่อสารเคมี	โครงสร้างโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล
1. Benzene methanol (1-phenyl-1-ethanol)		122
2. Benzene ethanol (1-phenyl-2-propanol)		136
3. Benzene propanol (4-phenyl-2-butanol)		150

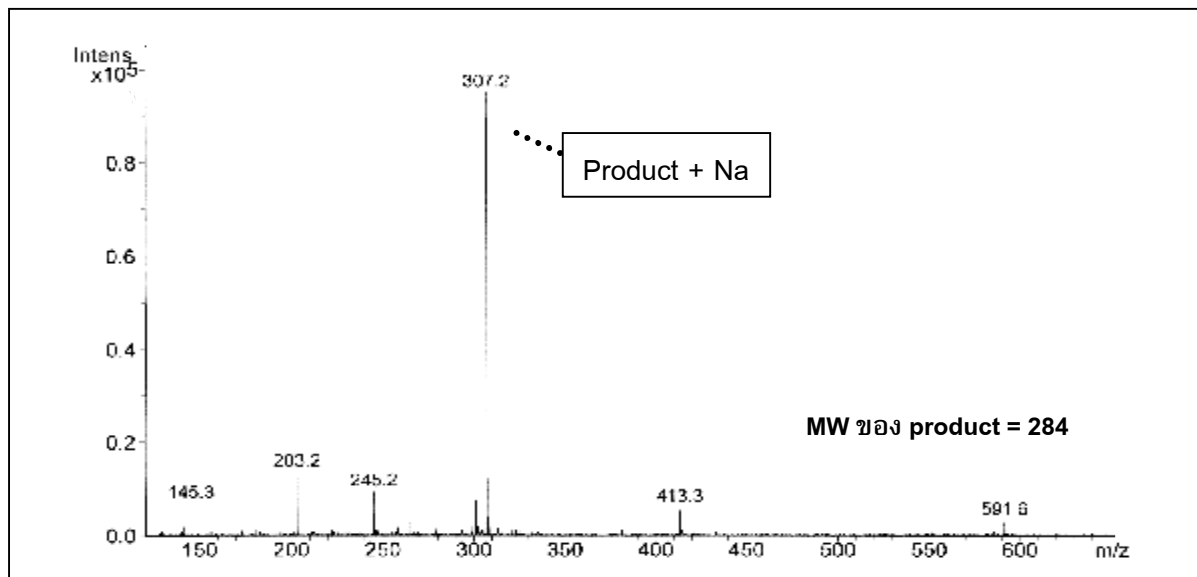
ผลการทดลอง

ตอนที่ 1. : Benzene methanoic glucoside Synthesis

➤ ผลจาก TLC

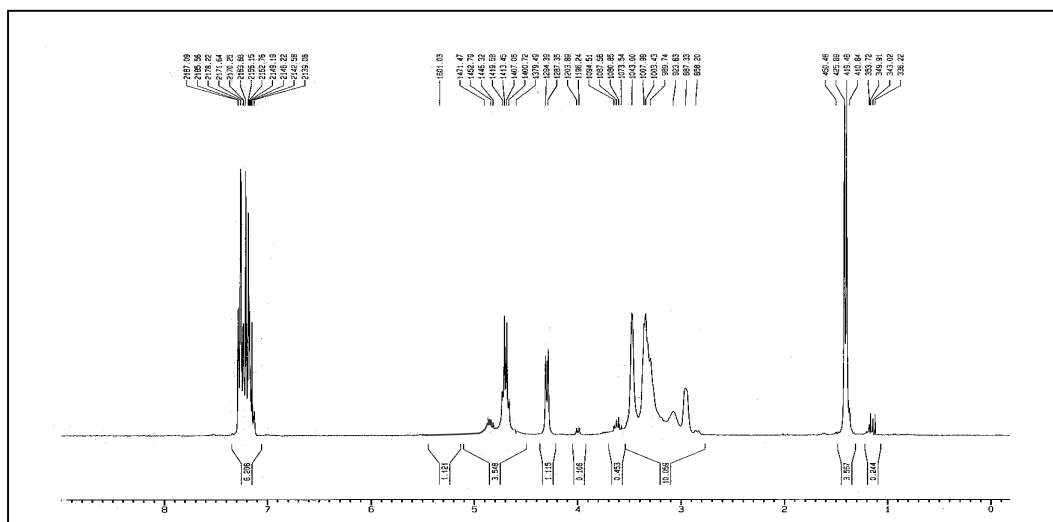


➤ Spectrum จาก LC-MS



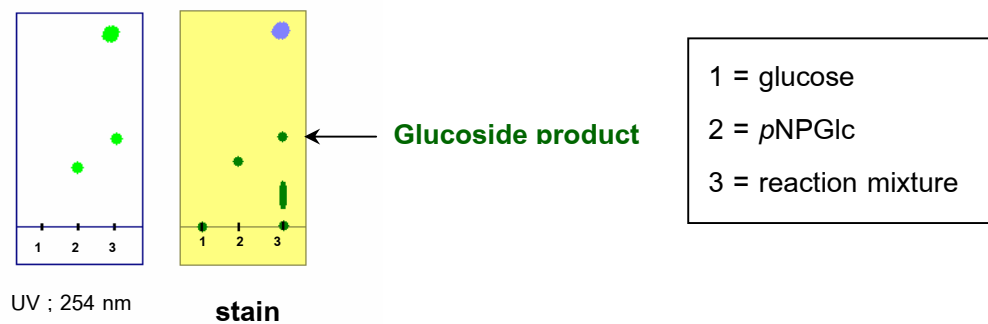
➤ Spectrum ผลจาก $^1\text{H-NMR}$ ของ product

- CH_2Cl_2 เป็นสารละลาย



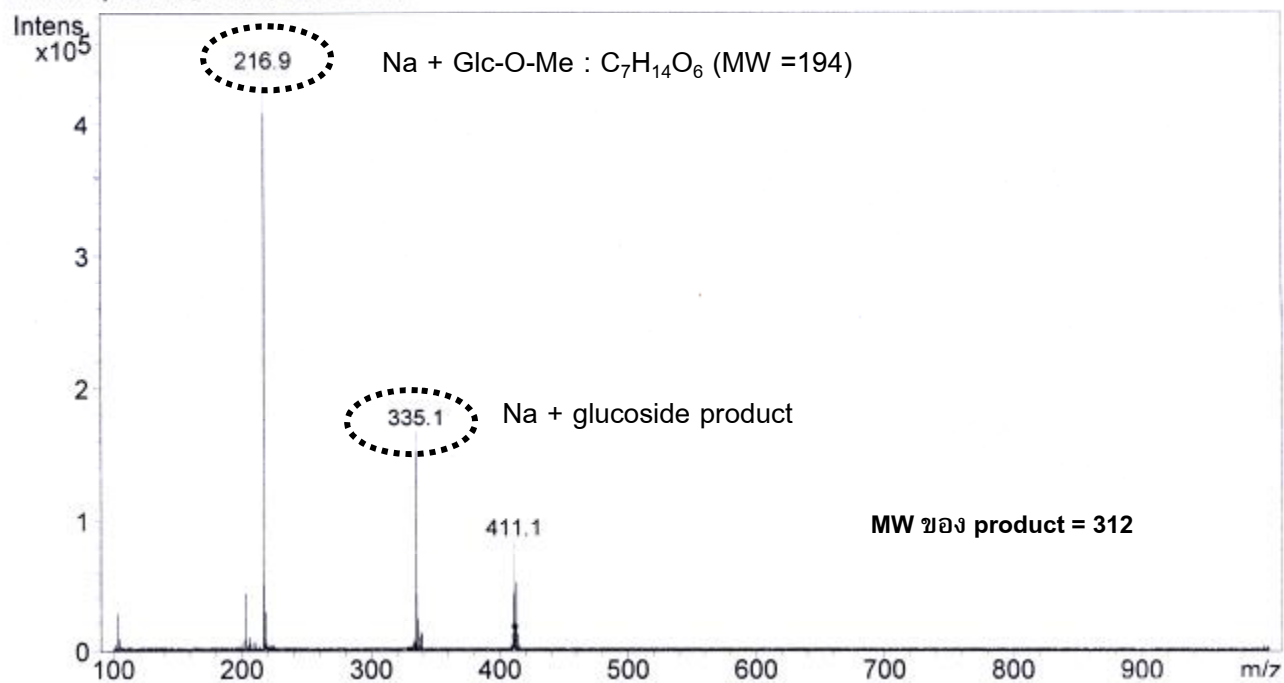
ตอนที่ 2. : Benzene propanoic glucoside Synthesis

➤ ผลจาก TLC



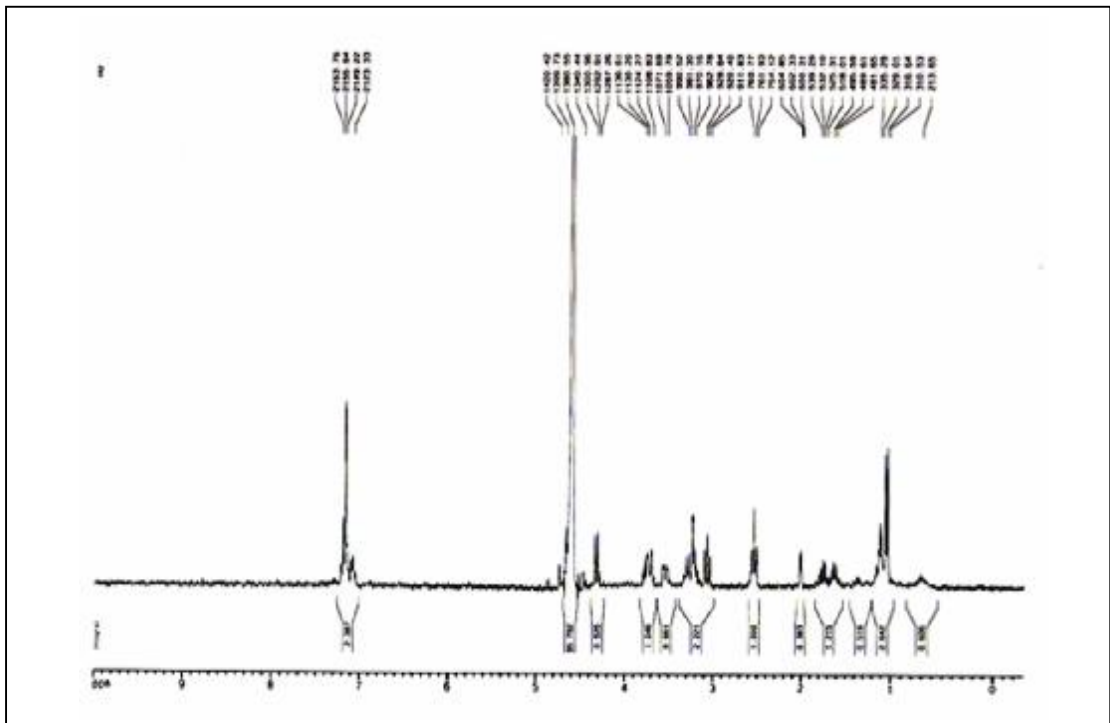
➤ Spectrum จาก LC-MS

Profile Spectrum, No.: 1, Time: 0 min

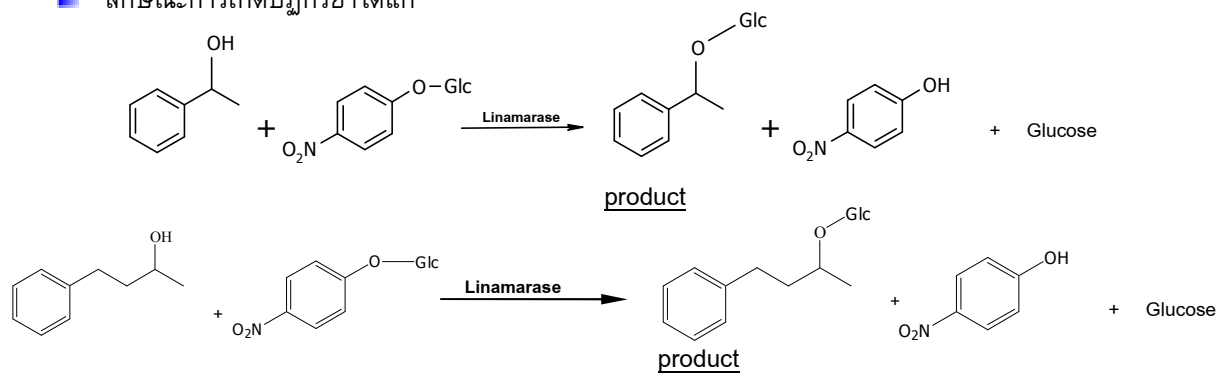


➤ Spectrum ผลจาก $^1\text{H-NMR}$ ของ product

- D2O เป็นสารละลาย



■ ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาได้แก่



สรุปผลการทดลอง

ตอนที่1.: Benzenemethanoicglucoside

Synthesis

■ ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาจะเป็นแบบ 2-phase system เนื่องจาก alcohol ที่ใช้ไม่ละลายน้ำ ทำให้การทำปฏิกิริยาของแอลกอฮอล์ และ เอนไซม์ซึ่งละลายในชั้นน้ำ เกิดขึ้นที่ผิวประชิดของทั้งสองตัว

■ ผลจาก LC-MS ทำให้ยืนยันได้ว่า ปฏิกิริยาเกิดขึ้น ตามที่ได้สมมติฐานไว้ แสดงว่า ลินามาเรสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ถึงแม้ว่าจะให้สารที่มีความเกะกะ (steric) สูงก็ตาม

■ เนื่องจากมีน้ำปะปนอยู่จากในระบบ ทำให้เกิดการแข่งขันทางปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เพราะทำหน้าที่เป็น nucleophile ได้เช่นเดียวกัน จึงทำให้มีกลูโคสเกิดขึ้นด้วย

■ จากการคำนวณหา % yield พบว่าได้เท่ากับ 40.5 % ซึ่งสอดคล้องกับอิทธิพลของหมู่แทนที่ที่มีความเกะกะมากขึ้น (more steric) โดยเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ใช้ 2-butanol และ 3-methyl-2-butanol พบว่า ได้ % yield สูงถึง 78.7 และ 78.8 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารที่มีความเกะกะสูง จะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า สารที่มีความเกะกะน้อย

■ จากการคำนวณ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของ R-product และ S-product จาก ¹H-NMR Spectrum ของสาร benzene methanoic glucoside ที่สังเคราะห์ได้ พบว่าได้เท่ากับ 84.9 % d.e. ในขณะที่ 2-butanol และ 3-methyl-2-butanol พบว่า ได้ % d.e. เท่ากับ 55.6

■ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สารที่มีความเกะกะสูง ถึงแม้จะสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณที่น้อย แต่สมบัติทางสเตอริโอซีเลคทีฟ จะสูงกว่า สารที่มีความเกะกะน้อย

ตอนที่2.: Benzenepropanoicglucoside

Synthesis

■ ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาจะเป็นแบบ 2-phase system เช่นเดียวกัน เนื่องจากแอลกอฮอล์ที่ใช้ ได้แก่ benzene propanol (4-phenyl-2-butanol) มีขั้วใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทดลองตอนที่ 1 คือ benzene methanol (1-phenyl-1-ethanol) เพียงแต่เปลี่ยนลักษณะของหมู่แทนที่ให้มีความเกะกะมากขึ้น

■ ผลจาก LC-MS ทำให้ยืนยันได้ว่า ปฏิกิริยาเกิดขึ้น ตามที่ได้สมมติฐานไว้

■ จาก ¹H-NMR Spectrum ทำให้ทราบว่ามีสารที่สามารถแยกได้ ยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอ จึงทำให้ยังไม่สามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้

■ การวิเคราะห์โครงสร้างจาก ¹H-NMR ยังไม่สามารถหาข้อมูลอ้างอิงได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์โครงสร้างจึงต้องใช้ เทคนิคและวิธีการอื่น ในการเปรียบเทียบ R-product และ S-product

เอกสารอ้างอิง

1. Eksittikul, T.; Chulavatnatol, M. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS FIELD Publication* Date:1988 Oct, 266, 263-9. FIELD Reference Number: FIELD Journal Code:0372430 FIELD Call Number:
2. Eksittikul, T.; Chulavatnatol, M. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1988, 266, 263-9.

3. Francisco, I. A.; Pinotti, M. H. P.
Brazilian Archives of Biology and Technology **2000**, 43, 487-492.
4. Lirdprapamongkol, K.; Svasti, J.
Biotechnology Letters **2000**, 22,
1889-1894.
5. Prawat, H.; Mahidol, C.; Ruchirawat,
S.; Prawat, U.; Tuntiwachwuttikul, P.;
Tooptakong, U.; Taylor, W. C.;
Pakawatchai, C.; Skelton, B. W.;
White, A. H. *Phytochemistry* **1995**,
40, 1167-73.