

## Витамин С-ийн *in vitro* гликозилжилт

Д.Бямбасүрэн<sup>1,2</sup>, Б.Болор<sup>1</sup>, Jae Kyung Sohng<sup>2</sup>  
 ЭМШУИС, БиоАС, Биохими-Лабораторийн тэнхим<sup>1</sup>  
 СМИС, ББХ (iBR), Эмийн инженерийн тэнхим, Солонгос<sup>2</sup>  
 Email: byambasurentaiyoolucky@gmail.com

### Abstract

#### In vitro glycosylation of Vitamin C

Byambasuren Dorjsuren<sup>1,2</sup>, Bolor Buyanbadrakh<sup>1</sup>, Jae Kyung Sohng<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>HSUM, School of Biomedicine, Department of Biochemistry and Laboratory Medicine  
<sup>2</sup>Institute of Bimolecular Reconstruction (iBR), Department of Pharmaceutical Engineering,  
 Sun Moon University, Korea  
 Email: byambasurentaiyoolucky@gmail.com

**Background.** Glycosylation process helps in stabilization and solubilization natural of compounds. Glycosyltransferase (YjiC) provides for high efficient glycosylation product with an incredible variety of sugar moieties, typically from UDP-glucose. Vitamin C (L-ascorbic acid) is an essential nutrient for humans and certain other animal species. Vitamin C functions in many biological processes, such as collagen synthesis, antioxidation, intestinal absorption of iron. UDP-glucose acts as a starting material for glycosyltransferase (YjiC). In order to recycle UDP-glucose after glycosylation with glycosyltransferase (YjiC), sucrose synthase (AtSUS1) carry out than reversible conversion of sucrose and UDP to UDP-glucose and fructose.

**Materials and Methods.** DNA was extracted than *E.coli* BL 21 and *E.coli* JM 109 hosts were used for expression of proteins. The purified protein was then analyzed by 12% SDS-PAGE than used for enzymatic recycle system. TLC analyse of the products were carried out to the test glycosylation.

**Results.** In this study, we choose substrate vitamin C for the enhancement of enzymatic recycling system glycosylation. In this recycle system due to the high concentration of sucrose and vitamin C but low concentration of UDP-glucose with is relatively expensive made the system more economic. TLC analyses of the products were carried out to the recycled system worked and glycosylation product.

**Conclusion.** Based on proved function an enzymatic recycling system with glycosyltransferase (YjiC) and sucrose synthesis (AtSUS1) to be applicable to enzymatic production of vitamin C glucoside and resveratrol glucoside. Further analysis by HPLC and MS will elucidate the products.

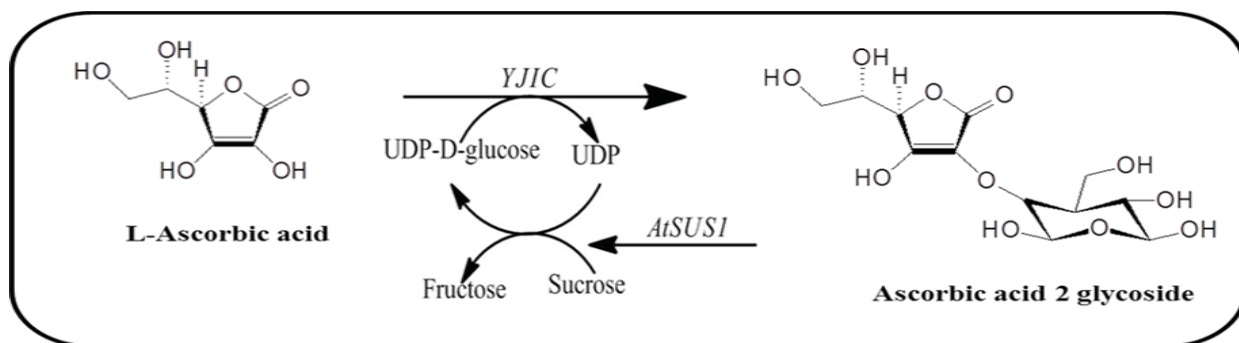
**Key words:** AtSUS1, Enzymatic recycling system, Glycosylation, Glycosyltransferase, Vitamin C, UDP-glucose, YjiC.

Рр.7-9, Figures 4, References 8

### Удиртгал

Витамин С нь хүний бие махбодид нийлэгждэггүй учир жимс жимсгэнэ, хүнсний ногоонд хоол тэжээлээр зайлшгүй авах шаардлагатай. Коллагены нийлэгжилт, нарийн гэдсэнд төмрийн шимэгдэлт зэрэг физиологийн үйл ажиллагааг хэвийн явуулахад витамин С чухал үүрэгтэй. Гэвч витамин С нь химийн шинж чанарын хувьд маш тогтворгүй, халаалт, саармаг рН, хүнд металлын нөлөөнд амархан задардаг [1]. Гликозилжилт нь байгаль дээрх нэгдлийн уусах чанарыг нэмэгдүүлж, тогтворжуулдаг [6]. Гликозилжилт явагдахад (-ОН) гидроксильн

бүлэг чухал ач холбогдолтой [8] бөгөөд глюкоз нь глюкотрансфераза (GT)-ийн тусламжтай гидроксильн бүлэгтэй холбогдоно. Витамин С буюу аскорбины хүчил нь 2, 3-диенол L-гулоны хүчлийн ү-лактон бөгөөд гликозилжих боломжтой 4 гидроксильн бүлэг агуулдаг. Витамин С-ийн нүүрстөрөгчийн 2 болон 6-р байрлалын гидроксильн бүлэг нь гликозилжих боломжтой бөгөөд ингэж гликозилжсэний дүнд витамин С илүү тогтвортой болж антиоксидант идэвхи нэмэгддэг. Витамин С-ийн гликозилжсэн AA2G хэлбэрийг гаргаж авахдаа ресайкл систем ашигласан.



**Figure 1:** Schematic reaction pathway of recycling system.

Энэхүү ресайкл системд глюкотрансфераза *YjiC* нь УДФ-глюкозыг задлаж глюкозыг витамин С-тэй холбоно. Сахарозсинтаза *AtSUS1* нь сахароз болон УДФ-ийн УДФ-глюкоз болон фруктоз болгон хувиргах эргэх урвалыг хурдасгадаг [3, 9, 10]. Энэхүү урвалын үр дүнд УДФ-глюкоз эргэн нийлэгжиж ресайклд систем дахин эхлэнэ (Зураг 1).

### Зорилго

УДФ-глюкоз бүхий ресайкл систем ашиглан гликозилжсэн витамин С гаргаж авах, ресайкл системийн бусад бүрэлдэхүүн хэсгүүд болох сахароз, витамин С-ийн концентрацийн хамаарлыг холбон судлах зорилго тавилаа.

### Материал, аргазүй

Рекомбинант глюкотрансфераза *YjiC*-ийн генийг *Bacillus licheniformis DSM 13* омгоос ялган авч pET302/NT-his векторт клонинг хийн *E.coli BL 21*-д экспресслэсэн. *Arabidopsis thaliana*-аас сахарозсинтазагийн генийг ялган авч pQE30 векторт клонинг хийн *E.coli JM 109*-д экспресслэсэн. *E.coli*-ийн омгуудыг LB тэжээлт орчинд өсгөвөрлөн, ультра соникатороор задлан центрифугдэж, уусамтгай уургийн фракцаас ферментийг өндөр даралтат шингэний хроматографийн аргаар ялган, цэвэршүүлсэн. Ялгасан уургийн фракцыг 12% SDS-PAGE-д шалгасан.

Ферментийн ресайкл системийн гликозилжилтийн тохиромжтой нөхцлийг тодорхойлохдоо аскорбины хүчлийн 100мМ, сахарозын 100мМ тогтмол нөхцөлд, УДФ-глюкозын 2мМ, 4мМ, 8мМ –н концентрацид тус тус шалгасан.

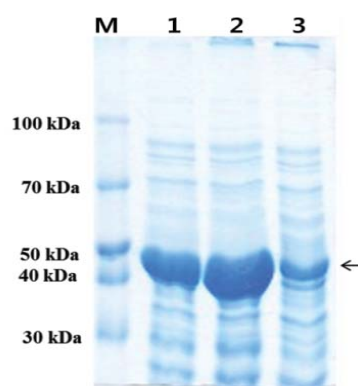
Гликозилжсэн урвалын бүтээгдэхүүнийг нимгэн үеийн хроматографын (TLC) аргаар шалгасан.

### Үр дүн, хэлцэмж

#### *YjiC* болон *AtSUS1* цэвэршүүлсэн дүн

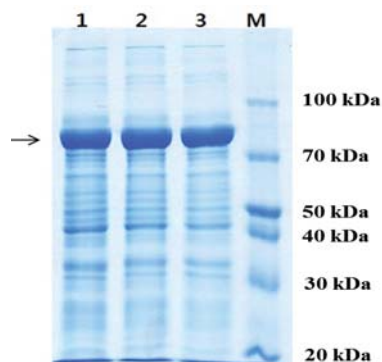
*E.coli BL21*-д экспресслэсэн усанд уусамтгай фракцд агуулагдах *YjiC* хроматографийн амиллоз багана, тусгай кит ашиглан ялган авсан. *YjiC* уургийн фракц SDS-PAGE-д тод зурвас ялгаран харагдаж байгаа нь экспресс амжилттай болж

концентраци харьцангуй өндөр байгааг харуулж байна (Зураг 2).



**Figure 2:** SDS – PAGE of purified *YjiC* protein. Lane M, protein marker; Lane 1, Purified *YjiC* soluble protein eluted by 100 mM imidazole; Lane 2, Purified *YjiC* soluble protein eluted by 200 mM imidazole; Lane 3, Purified *YjiC* soluble protein eluted by 500 mM imidazole; (44.7kDa).

*E.coli JM109*-д экспресслэсэн усанд уусамтгай фракцд агуулагдах *AtSUS1*-ийг хроматографийн амиллоз багана ашиглан, тусгай кит ашиглан ялган авсан. *AtSUS1* уургийн фракц SDS-PAGE-д тод зурвас ялгаран харагдаж байгаа нь экспресс амжилттай болж концентраци харьцангуй өндөр байгааг гэрчилж байна (Зураг 3).



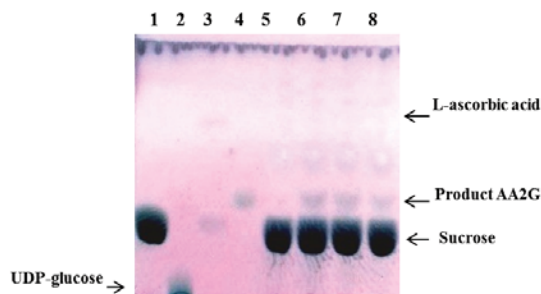
**Figure 3:** SDS – PAGE of purified *AtSUS1* protein. Lane 1, Purified *AtSUS1* soluble protein eluted by 100 mM imidazole; Lane 2, Purified *AtSUS1* soluble

protein eluted by 200 mM imidazole, Lane, 3 Purified *AtSUS1* soluble protein eluted by 500 mM imidazole; M, Protein marker; (88kDa).

Үр дүнгээс харахад *YjiC* нь 44.7 kDa, *AtSUS1* нь 88 kDa байгаа нь молекул массын хувьд тохирч байна.

#### Нимгэн үеийн хроматографийн үр дүн

Өтгөрүүлсэн дээжээ нимгэн үеийн хроматографийн аргаар шалгасан. Нимгэн үеийн хроматографийн уусгагчуудаар этил ацетат; цууны хүчил; шоргоолжны хүчилүүдийг (6: 1: 1) тус тус ашигласан. Стандарт AA2G, сахароз, УДФ-глюкоз, витамин С-тэй харьцуулсан хроматограмд AA2G-тэй нэг түвшинд шинэ цэг илэрсэн нь гликозилжсэн бүтээгдэхүүн байгааг илтгэж байна (Зураг 4).



**Figure 4:** TLC analysis of *in vitro* glycosylation of L-ascorbic acid. 1.Sucrose 100mM, 2. UDP-glucose 8 mM, 3. L-Ascorbic acid 100mM, 4. AA2G standart 10mM, 5. Control without UDP-glucose, 6. Rxn-with 2mM UDP-glucose, 7. Rxn-with 4mM UDP-glucose, 8.Rxn-with 8mM UDP-glucose.

Энэ ресайкл системийг хэрэглэснээр *AtSUS1*-аар харьцангуй үнэтэй субстрат УДФ-глюкозыг сахарозын задралаар эргэн үүсгэх боломжтой байгааг 2мМ, 4мМ, 8мМ-д хэрэглэсэн нимгэн үеийн хроматографийн үр дүнгээр харагдаж байна.

#### Дүгнэлт:

*YjiC* болон *AtSUS1* фермент бүхий ресайкл системд гликозилжсэн С витамин тодорхойлогдсон. Сахарозыг өндөр концентрацитай, УДФ-глюкозыг бага

концентрацитай ресайкл системийн хэрэглэх боломжтой юм. Үр дүнг бататгахын тулд HPLC болон масс- спектро스코поор (MS) шалгах шаардлагатай.

#### Номзүй

1. Akihiro, Tai., *et al.* Highly efficient and regioselective production of an erythorbic acid glucoside using cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. and amyloglucosidase. "J. Mol. Catal", **92**, 2013, pp 19-23.
2. Baud, Sйbastien., *et al.* Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. "J. Exper. Bot", **55**, 2004, pp 397-409.
3. Bowles, Dianna., *et al.* Glycosyltransferases: managers of small molecules. "Curr. Opin. Plan Biol", **8**, 2005, pp 254-263.
4. Dwek, Raymond A., *et al.* Biological importance of glycosylation. "J. Neth. Mol. Recog. Inc", 1998, pp 1-6.
5. Iqbal, Khalid., *et al.* Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health—a review." J. Nutr, **21**, 2004, pp 5-13.
6. Kren, Vladimйr., *et al.* Glycosides in medicine: The role of glycosidic residue in biological activity," Curr Med Chem", **8**, 2001, pp 1303-1328.
7. Masada, Sayaka., *et al.* An efficient chemoenzymatic production of small molecule glucosides with in situ UDP-glucose recycling." FEBS Lett", **581**, 2007, pp 2562-2566.
8. Terasaka, Kazuyoshi., *et al.* In situ UDP-glucose regeneration unravels diverse functions of plant secondary product glycosyltransferases. "FEBS Lett", **586**, 2012 pp 4344-4350.

Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:  
Анагаах ухааны доктор, дэд профессор  
Ж.Мөнхцэцэг