บทที่ 4
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างไคติเนสกลายพันธุ์โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณจับกับสับสเตรทและกรดอะมิโนที่ผิวของเอนไซม์โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp70 Trp168 Tyr171 Trp231 Tyr245 Trp275 Trp397 และ Trp570 โดยเทคนิค site-directed mutagenesis การทดสอบหาค่า specific hydrolyzing activity ของการสลาย *p*NP-$GlcNAc_2$ และ colloidal chitin เปรียบเทียบกับโปรตีน wild-type พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนวงแหวนมีความสามารถย่อย *p*NP-glycoside และ colloidal chitin ได้น้อยกว่าโปรตีน wild-type เอนไซม์กลายพันธุ์ W397F เป็นตัวเดียวที่ให้ค่า specific activity ของการย่อยสับสเตรททั้งสองตัวมากกว่า wild-type การตรวจสอบผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการสลายไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ตั้งแต่ 2-6 หน่วย (NAG_2-NAG_6) พบว่าไคติเนสกลายพันธุ์ W275G และ W397F ได้เปลี่ยนแปลงรูปแบบการสลายน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ไปจากรูปแบบของเอนไซม์ wild-type อย่างสิ้นเชิง ผลการทดลองสรุปได้ว่ากรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 น่าจะมีความสำคัญต่อการเลือกจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ส่วนผลของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่อยู่ที่บริเวณผิวโปรตีน พบว่า Trp70 ซึ่งอยู่ที่ปลายด้านเอ็นของโดเมนจับไคตินมีบทบาทสำคัญต่อการจับและการสลายไคตินสายยาว ส่วนกรดอะมิโน Trp231 และ Tyr245 ซึ่งอยู่ใกล้กับปลายมีผลต่อการสลายไคตินแต่ไม่มีผลต่อการจับกับไคตินสายยาว และกรดอะมิโนทั้งหมดไม่มีบทบาทสำคัญต่อการจับและการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ การศึกษาลักษณะการจับของเอนไซม์กับไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์เทียบกับไคตินโดยเทคนิค quantitative HPLC MS พบว่าสับเสตรท NAG_5 และ NAG_6 ชอบที่จะจับกับบริเวณเร่งที่ตำแหน่งจับ -2 ถึง +2 ส่วนไคตินสายยาวเริ่มต้นจับทั้งแบบสุ่มและแบบ progressive แต่ผลิตผลน้ำตาล NAG_2 ที่พบมากกว่าน้ำตาลสายสั้นอื่น ๆ แสดงว่าเอนไซม์สลายไคตินสายยาวแบบ progressive จากการวิเคราะห์โดย HPLC MS ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ wild-type ไม่มีการเลือกใช้สับสเตรทส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์ W397F และ W275G เลือกสลาย β สับสเตรทมากกว่า α สับสเตรท

4.2. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี