บทคัดย่อ

เอนไซม์ phytase มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งมีความจำเพาะต่อสับสเทรต phytic acid (myo-inositol -1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate; IP_6) หรือเกลือของ phytate ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โมเลกุล phytic acid ที่มีหมู่ฟอสเฟต 1 ถึง 5 กลุ่ม และ สาร inorganic phosphates ปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ phytase มาผสมลงในอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น สุกรและไก่ ซึ่งในระบบย่อยอาหารจะไม่มีเอนไซม์ phytase ทำให้สัตว์กระเพาะเดี่ยวสามารถนำแร่ธาตุฟอสฟอรัส จากสาร inorganic phosphates ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ phytase มาใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis พบว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ความจำเพาะต่อค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และ ความหลากหลายต่อสับสเทรต จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence alignment) ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* กับ *A. niger* TR170 phytase (PhyA 170) พบว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 ของ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* ตรงกับ กรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 และเมื่อทำการสร้างโครงสร้างจำลองสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 (PhyA170) โดยอาศัยโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 ที่ 2.5 Å เป็นต้นแบบ พบว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 อยู่ในบริเวณ active site ของเอนไซม์ เพื่อศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนตำแหน่งนี้ จึงทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis พบว่าโปรตีนกลายทุกชนิดถูกผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 66 kDa ในยีสต์ *Pichia pastoris* และพบว่าโปรตีนกลายทุกชนิดยังคงคุณสมบัติการทนต่อความร้อนและสภาวะความเป็นกรด-เบสในช่วงกว้างได้เช่นเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม โปรตีนกลาย Q50A Q50I Q50N Q50P Q50T Q50V และ Q50S มีค่าอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส และ 5.5 ตามลำดับ เหมือนกับโปรตีนดั้งเดิม แต่โปรตีนกลาย Q50G และ Q50L จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 4.5 โดยโปรตีนกลาย Q50P มีค่า specific activity สูงกว่าโปรตีนกลายชนิดอื่นๆ และสูงกว่าโปรตีนดั้งเดิมเกือบ 2 เท่า และ มีค่า K_m V_{max} และ k_{cat} สูงกว่าโปรตีนดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลาย Q50P มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาที่ดีกว่าโปรตีนดั้งเดิม แต่

มีความเสถียรในการจับกับสับสเทรต phytic acid น้อยกว่าโปรตีนดั้งเดิม และจากการสร้างแบบจำลองการจับกันระหว่างสับสเทรต phytic acid กับ เอนไซม์ phytase พบว่า โปรตีนกลาย Q50L ที่มีการแทนที่ด้วยกรดอะมิโน Glutamine ด้วย Leucine ซึ่งมีหมู่ข้างที่ยาวกว่าโปรตีนดั้งเดิม และอยู่ในตำแหน่งที่มีผลรบกวนการจับกันของเอนไซม์กับสับสเทรต phytic acid ในขณะที่กรดอะมิโน Proline ในโปรตีนกลาย Q50P ซึ่งมีหมู่ข้างขนาดใกล้เคียงและไม่มีขั้วเช่นเดียวกับกรดอะมิโน Glutamine ในโปรตีนดั้งเดิม ซึ่งจะส่งผลรบกวนต่อการจับกับสับสเทรต phytic acid น้อยกว่า และจากค่า k_{cat} ของโปรตีนกลาย Q50P ที่สูงกว่าโปรตีนดั้งเดิม อาจเป็นผลจากการที่กรดอะมิโนหลักในการเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ R85 และ D362 ของโปรตีนกลาย Q50P มีระยะห่างระหว่างอะตอมออกซิเจนของหมู่ฟอสเฟตเป้าหมายน้อยกว่าโปรตีนดั้งเดิม ทำให้มีการปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟตเป้าหมายได้เร็วกว่าโปรตีนดั้งเดิม ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่ากรดอะมิโน Glutamine ที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 (PhyA170) น่าจะมีความสำคัญในการส่งเสริมการเข้าถึงสับสเทรต phytic acid เพื่อเร่งปฏิกิริยาการทำลายพันธะเพื่อปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟตซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ออกจาก active site ของเอนไซม์