

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากรายงานการวิจัยของ Tomschy และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* เพื่อที่จะจำแนกกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 (ตรงกับกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170) เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ซึ่งพบว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ผลต่อความจำเพาะต่อค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และความหลากหลายต่อสับสเตรต ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* โดยใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 เป็นโครงสร้างต้นแบบ พบว่าหมู่ข้างของกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 อยู่ใกล้บริเวณกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในบริเวณเร่งปฏิกิริยารวมทั้งอยู่ใกล้กับบริเวณที่จับกับสับสเตรตในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วย จากการวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติ จำลองการจับกันระหว่างเอนไซม์ phytases และสับสเตรต นักวิจัยได้สันนิษฐานว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* กับ หมู่ฟอสเฟต ตำแหน่งที่ 6 ของ myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate หรือ สับสเตรต phytic acid อาจมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างกัน ทำให้เกิดการขัดขวางกลไกของการเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ที่แท้จริง หรือ กลุ่ม inorganic phosphate ออกมา ซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ phytases-wild type มีค่าที่ค่อนข้างต่ำ (Tomschy et al. 2006)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 เพื่อศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโน Glutamine 50 ต่อการทำงานของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *Aspergillus niger* TR170 โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases ระหว่างเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. niger* TR170 *A. fumigatus* *A. japonicus* TR86 และ *A. niger* NRRL 3135 (เป็นสายพันธุ์ที่ทราบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase เป็นที่แน่นอนแล้ว) พบว่าเอนไซม์ phytases ที่ต้องการศึกษา จากเชื้อรา *A. niger* TR170 มีกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 เช่นเดียวกับเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* (64 เปอร์เซ็นต์ sequence identity) โดยผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases ระหว่างเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงในภาพที่ 4.1

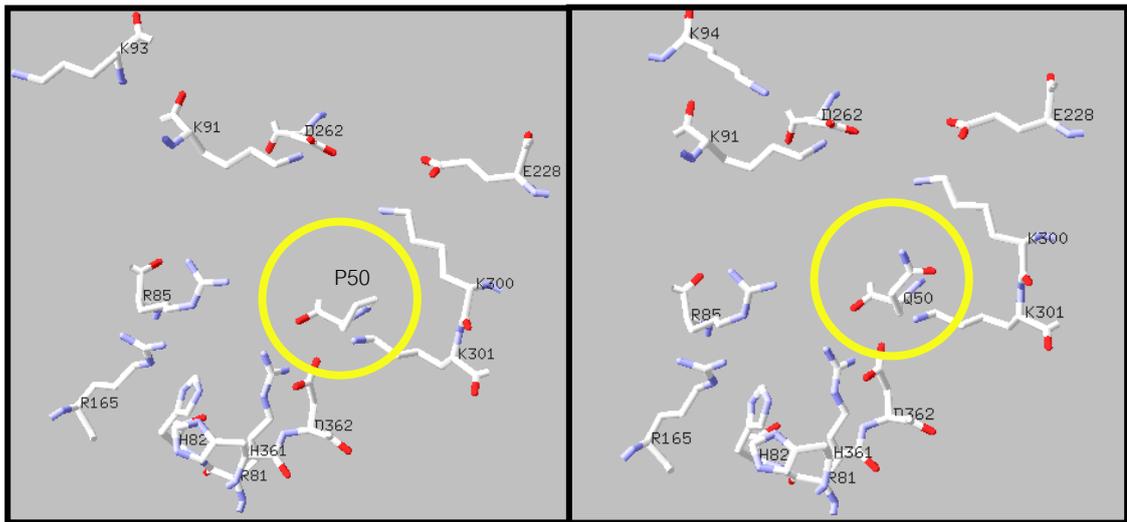
จากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytases จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 พบว่ากรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณ active site ของเอนไซม์บริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ได้แก่ R58 H59 R62 R142 H338 และ D339 (Kostrewa et al. 1997) และบริเวณที่จับกับสารตั้งต้น (substrate binding site) ได้แก่ K91 K94 E228 D262 K300 และ K301 (Mullaney et al. 2002) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytases จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 เป็นต้นแบบในการสร้างโครงสร้างสามมิติจำลองของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases จากเชื้อราทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก (97 เปอร์เซ็นต์ sequence identity) โดยผลจากการสร้างโครงสร้างสามมิติจำลองของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 พบว่าตำแหน่งของกรดอะมิโน Glutamine 50 อยู่ระหว่างกลุ่มของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็นบริเวณจับกับสับสเตรต (substrate binding site) ได้แก่ K91 K94 E228 D262 K300 และ K301 กับกลุ่มของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ได้แก่ R81 H82 R85 R165 H361 และ D362 โดยกรดอะมิโน Glutamine 50 มีตำแหน่งที่ใกล้ชิดกับกลุ่มของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) มากกว่า ดังภาพที่ 4.2 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งนี้น่าจะมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา หรืออาจจะมีผลต่อการจับกับสับสเตรตของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จึงได้ทำการศึกษากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 โดยทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ซึ่งมีคุณสมบัติไม่มีประจุและมีขั้วเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น 9 ชนิด ในกลุ่ม hydrophobic และไม่มีขั้ว รวมถึงการเปลี่ยนแปลงขนาดหมู่ข้างของกรดอะมิโนด้วย ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งจะทำให้ได้โปรตีนกลาย PhyA170 ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ โปรตีนกลาย Q50A Q50G Q50I Q50L Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V โดยจากการแสดงออกของโปรตีนกลายทั้ง 9 ชนิดสามารถผลิตโปรตีนกลายซึ่งมีขนาดประมาณ 66 kDa ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ phytases จากโปรตีนกลายทั้ง 9 ชนิด โดยในการทดลองเพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytase พบว่า โปรตีนกลาย Q50A Q50I Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 5.5 เช่นเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนดั้งเดิม ที่ pH ที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามโปรตีนกลาย Q50G และ Q50L จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 4.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่มีความเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งเมื่อดูจากหมู่ข้างของกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้จะพบว่า Glycine ซึ่งมีขนาดเล็กและไม่มีประจุ และ Leucine ที่หมู่ข้างมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ และเมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของการทำงานที่

สภาวะ pH 4.5 และ 5.5 นั้นมีความแตกต่างกันน้อย ดังนั้นการที่กรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กและไม่มีขั้วจึงอาจมีผลต่อความเสถียรของโครงสร้างที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ทำให้สามารถทำงานได้ที่ pH ที่เป็นกรดมากขึ้น ในส่วนของการทดลองหาค่าคุณภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytases พบว่าทุกชนิดของโปรตีนกลายมีค่าคุณภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม โดยโปรตีนกลาย Q50P จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าโปรตีนดั้งเดิมเกือบ 2 เท่า โดยเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสามมิติจำลองของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จะพบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 จะอยู่ในบริเวณ active site ซึ่งค่อนข้างไปทางบริเวณเร่งปฏิกิริยา แต่ก็มีความใกล้ชิดกับบริเวณที่จับกับซับสเตรต เช่นเดียวกัน ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่า ในขณะที่ทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต หมู่ข้างของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 อาจจะไปรบกวนการทำปฏิกิริยาได้ โดยโปรตีนดั้งเดิมที่มี กรดอะมิโน Glutamine อยู่ในตำแหน่งที่ 50 มีหมู่ข้างมีขั้วที่สร้างพันธะไฮโดรเจนได้ ดังนั้น กรดอะมิโน Glutamine อาจมีผลรบกวนต่อการจับของเอนไซม์กับซับสเตรตได้ดังที่ไว้แล้วกล่าวข้างต้น ดังนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 จาก Glutamine เป็น Proline ซึ่งมีหมู่ข้างเป็นวงแหวนและไม่ชอบน้ำ อาจส่งผลให้ไม่เกิดการรบกวนการทำปฏิกิริยากับซับสเตรต phytic acid โดยหมู่ข้างเป็นวงแหวนของกรดอะมิโน Proline อาจทำให้เพิ่มพื้นที่ในการเข้าจับกับซับสเตรต phytic acid และกรดอะมิโน Proline มีหมู่ข้างที่ไม่ชอบน้ำทำให้ไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ จึงไม่ไปรบกวนซับสเตรต phytic acid ทำให้อัตราการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตดีกว่าในโปรตีนดั้งเดิม ดังภาพที่ 5.1 เปรียบโครงสร้างระหว่างโปรตีนดั้งเดิม กับโปรตีนกลาย Q50P

ภาพที่ 5.1

การเปรียบเทียบโครงสร้างจำลองของเอนไซม์ phytases
ระหว่างโปรตีนกลาย Q50P กับ โปรตีนดั้งเดิม



ในขณะที่โปรตีนกลายชนิดอื่น จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าโปรตีนดั้งเดิม โดยเฉพาะโปรตีนกลาย Q50L จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด ทั้งนี้เมื่อพิจารณาหมู่ข้างของกรดอะมิโน Leucine ที่มีสมบัติไม่มีขั้ว ซึ่งอาจจะไม่มีผลรบกวนสับสเทรตในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับเอนไซม์ phytase แต่จากลักษณะหมู่ข้างที่เป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวและมีขนาดใหญ่กว่าโปรตีนดั้งเดิม อาจจะมีผลในการลดพื้นที่ของบริเวณจับกับสับสเทรต (substrate binding site) ทำให้รบกวนการจับของสับสเทรตส่งผลให้อัตราเกิดปฏิกิริยาลดลง

ในส่วนของการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ที่ความเป็นกรด-เบส และ ความร้อน ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ พบว่าทุกชนิดของโปรตีนกลายสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด-เบสได้ในช่วงกว้าง โดยพบว่าในช่วง pH 2 ถึง 10 โปรตีนกลาย Q50N Q50S Q50T มีค่า relative activity มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และ โปรตีนกลาย Q50A Q50G Q50I Q50L และ Q50V มีค่า relative activity มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โปรตีนดั้งเดิมมีค่า relative activity มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง pH 2 ถึง 9 และ โปรตีนกลาย Q50P มีค่า relative activity มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง pH 3 ถึง 10 ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งในการทดลองนี้ได้เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 เอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 เป็นกรดอะมิโนในกลุ่มที่ไม่มีประจุ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งนี้ จึงมีผลต่อการทำงานในสภาวะความเป็นกรด-เบส

น้อย ซึ่งยังคงรักษาคุณสมบัติการทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด-เบสในช่วงกว้างของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 ได้ และในส่วนของ การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่า โปรตีนดั้งเดิมมีค่า relative activity มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดังภาพที่ 4.18 แต่โปรตีนกลาย Q50I และ Q50L มีค่า relative activity มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดังภาพที่ 4.19 และ 4.20 ตามลำดับ และโปรตีนกลาย Q50P มีค่า relative activity มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดังภาพที่ 4.21 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลาย Q50I Q50L และ Q50P มีความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง

เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ phytases ซึ่งคำนวณโดยใช้หลักการของสมการ Michaelis-Menten ซึ่งจะใช้โปรแกรม KALEIDA-GRAPH version 3.51 (Synergy) สรุปค่าได้ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1

สรุปค่าพารามิเตอร์จลนศาสตร์ K_m และ V_{max}

ชนิดเอนไซม์ phytases	ค่าพารามิเตอร์		
	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)
Wild-type	0.416	387.09	720.61
Q50L	0.758	216.97	429.82
Q50P	0.731	513.81	962.52

พบว่า โปรตีนดั้งเดิม มีค่า K_m V_{max} และ k_{cat} เท่ากับ 0.4160 mM 387.09 U/mg และ 720.61 s⁻¹ ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.22 ส่วนโปรตีนกลาย Q50L มีค่า K_m V_{max} และ k_{cat} เท่ากับ 0.758 mM 109.47 U/mg และ 429.82 s⁻¹ ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.23 และ โปรตีนกลาย Q50P มีค่า K_m V_{max} และ k_{cat} เท่ากับ 0.731 mM 513.81 U/mg และ 962.52 s⁻¹ ตามลำดับ ดัง

ภาพที่ 4.24 ซึ่งเมื่อพิจารณา K_m ของโปรตีนกลาย Q50P และ Q50L จะพบว่าค่ามากกว่า K_m ของโปรตีนดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการจับของเอนไซม์กับซับสเตรตของโปรตีนดั้งเดิมดีกว่าโปรตีนกลาย Q50P และ Q50L ซึ่งขัดแย้งกับข้อคิดเห็นก่อนหน้านี้ว่าการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 เป็น Proline ซึ่งมีหมู่ข้างเป็นวงแหวนอาจเพิ่มพื้นที่ในบริเวณจับกับซับสเตรตของเอนไซม์ทำให้การเข้าจับกับซับสเตรตดีกว่าโปรตีนดั้งเดิม ซึ่งเมื่อพิจารณาหมู่ข้างของกรดอะมิโน Proline ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนซึ่งจะทำให้การเปลี่ยนโครงรูปในโปรตีนได้ไม่ดีและไม่มีความยืดหยุ่น ดังนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงขึ้นอาจไม่ได้เกิดจากความเสถียรของการจับกันของเอนไซม์และสารตั้งต้น

แต่เมื่อพิจารณาค่า V_{max} และ ค่า k_{cat} จะพบว่าค่าพารามิเตอร์ทั้งสองชนิดของโปรตีนดั้งเดิมและโปรตีนกลาย Q50L มีค่าน้อยกว่าโปรตีนกลาย Q50P แสดงให้เห็นว่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในโปรตีนกลาย Q50P ดีกว่าโปรตีนดั้งเดิมและโปรตีนกลาย Q50L ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่หมู่ข้างของกรดอะมิโน Proline เป็นวงแหวนและไม่มีขั้วทำให้ไม่มีโอกาสสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ฟอสเฟตกลุ่มอื่นๆ ซึ่งไม่ใช่ตำแหน่งเป้าหมายในการทำปฏิกิริยาของโมเลกุลซับสเตรต phytic acid ทำให้ไม่เกิดการรบกวนในการจับกันของเอนไซม์กับซับสเตรต และมีอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่สูงกว่าโปรตีนดั้งเดิม และโปรตีนกลาย Q50L ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับข้อคิดเห็นที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ที่กล่าวไว้ว่า หมู่ข้างกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ในโปรตีนดั้งเดิม ซึ่งมีหมู่ข้างมีขั้วอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานปฏิกิริยากับซับสเตรตโดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ฟอสเฟตกลุ่มอื่นในโมเลกุล phytic acid ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลง ดังนั้นเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 จาก Glutamine เป็น Proline จะทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานปฏิกิริยากับซับสเตรต ดังนั้นผลของค่า K_m และ V_{max} จากการศึกษากลศาสตร์ของเอนไซม์ phytase ซึ่งใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์น่าจะช่วยยืนยันผลการทดลองที่ได้ก่อนหน้านี้อีกทางหนึ่ง

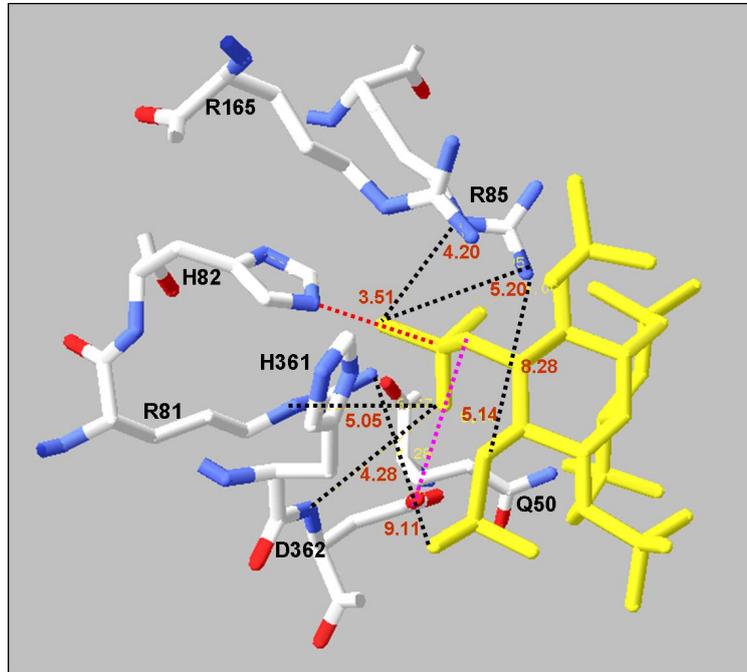
และจากรายงานการวิจัยของ Tomschy และคณะ ที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ ซึ่งใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงในงานวิจัยนี้ โดยทำการศึกษาเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* โดยทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 (ตรงกับกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170) เป็น Leucine และพบว่าเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับซับ

เทอร์ต phytic acid ที่ pH 5.0 สูงขึ้น 4 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* ดั้งเดิม แต่ในทางตรงข้ามเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 เป็น Proline กลับพบว่าเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรต phytic acid ที่ pH 5.0 ลดลงเมื่อเทียบกับเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* ดั้งเดิมและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับโปรตีนกลายชนิดอื่น

ดังนั้นจะเห็นว่าผลการวิจัยของ Tomschy นั้นแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้จากการทำวิจัยครั้งนี้ โดยพบว่าในส่วนของ การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytase และการหาค่าพารามิเตอร์ของเอนไซม์ phytase พบว่าโปรตีนกลาย Q50P ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 จาก Glutamine เป็น Proline ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase สูงที่สุด และสูงกว่าโปรตีนดั้งเดิมเกือบ 2 เท่า รวมทั้งให้ค่าพารามิเตอร์ของเอนไซม์ phytase ต่อสับสเตรต phytic acid V_{max} และ k_{cat} สูงกว่า โปรตีนดั้งเดิม และโปรตีนกลาย Q50L ในขณะที่โปรตีนกลาย Q50L ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 จาก Glutamine เป็น Leucine ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phytase ต่ำ และให้ค่าพารามิเตอร์ของเอนไซม์ phytase ต่อ สับสเตรต phytic acid V_{max} และ k_{cat} ต่ำกว่าโปรตีนดั้งเดิม และ Q50P ดังนั้นเพื่อหาคำอธิบายของผลการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ต่อการทำงานของเอนไซม์ phytases จากเชื้อรา *A. niger* TR170 จึงได้ทำการจำลองการจับกันระหว่างเอนไซม์ phytase กับสับสเตรต phytic acid เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างสามมิติของการจับกันระหว่าง เอนไซม์ phytase กับสับสเตรต phytic acid โดยใช้โปรแกรม Arguslab จากเว็บไซต์ <http://www.arguslab.com/> ซึ่งจะเปรียบเทียบลักษณะในการจับกับสับสเตรต phytic acid ระหว่าง โปรตีนดั้งเดิม โปรตีนกลาย Q50L และ Q50P โดยผลจากการจำลองการจับกันระหว่างเอนไซม์ phytase กับ สับสเตรต phytic acid ของโปรตีนดั้งเดิม โปรตีนกลาย Q50L และ Q50P ซึ่งในรูปแบบเส้นประจะแสดงระยะห่างระหว่างอะตอม (Å) ของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยากับอะตอมออกซิเจนและอะตอมฟอสฟอรัสในกลุ่ม inorganic phosphate ของโมเลกุล phytic acid แสดงดังในภาพที่ 5.2 5.3 และ 5.4 ตามลำดับ

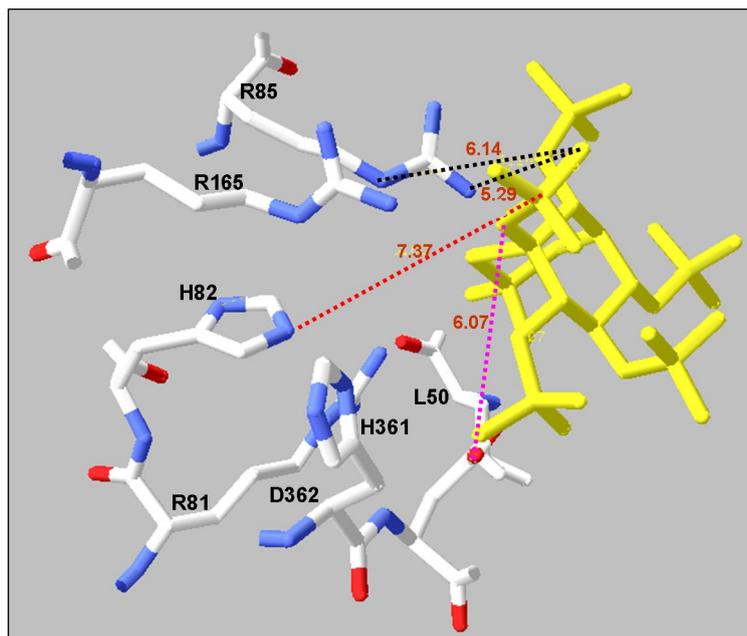
ภาพที่ 5.2

การจำลองการจับกันระหว่างโปรตีนดั้งเดิม กับ สับสเทรต phytic acid



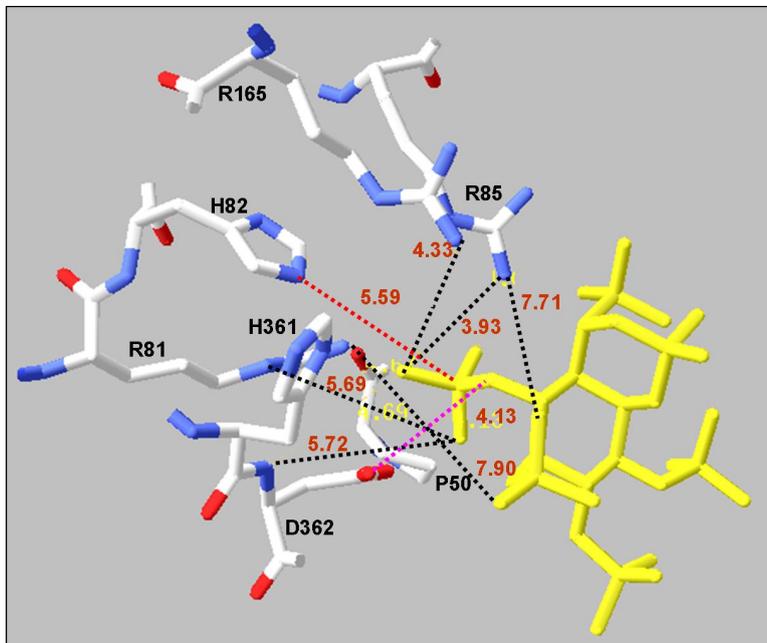
ภาพที่ 5.3

การจำลองการจับกันระหว่างโปรตีนกลาย Q50L กับ สับสเทรต phytic acid



ภาพที่ 5.4

การจำลองการจับกันระหว่างโปรตีนกลาย Q50P กับสับสเทรต phytic acid



จากการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับกลไกในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase ต่อสับสเทรต phytic acid พบว่าในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase เพื่อปลดปล่อยกลุ่ม inorganic phosphate ออกจากโมเลกุล phytic acid โดยจะใช้กรดอะมิโนในกลุ่มบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ได้แก่ R81 H82 R85 R165 H361 และ D362 เป็นส่วนช่วยส่งเสริมในการเร่งปฏิกิริยาโดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมออกซิเจนของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย และจะมีกรดอะมิโน 2 ตัวหลักที่มีความสำคัญที่สุดในการเร่งปฏิกิริยาได้แก่ H82 และ D362 โดยกรดอะมิโน H82 จะถูกทำให้มีคุณสมบัติเป็น nucleophile จากการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน G83 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนในบริเวณใกล้เคียง ทำให้อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของอะตอมไนโตรเจนในวงแหวนอิมิดาไซด์ซึ่งเป็นหมู่ข้างกรดอะมิโน H82 ถ่ายทอดให้กับอะตอมของฟอสฟอรัสของหมู่ inorganic phosphate เป้าหมาย และส่งต่ออิเล็กตรอนให้กับอะตอมออกซิเจนทำให้อะตอมออกซิเจนมีประจุเป็นลบ จึงต้องการโปรตอนเข้ามาเพื่อทำให้อะตอมออกซิเจนมีความเสถียรมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้อะตอมออกซิเจนที่สร้างพันธะอยู่กับอะตอมฟอสฟอรัสของหมู่ inorganic phosphate เป้าหมาย ดึงเอาโปรตอนจากหมู่ข้างของกรดอะมิโน D362 เข้ามาทำพันธะด้วย โดยเมื่อโปรตอนเข้ามาทำพันธะกับอะตอมของออกซิเจนของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย จะส่งผลให้หมู่ inorganic phosphate หลุดออกจากโมเลกุล

ของ phytic acid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการทำปฏิกิริยา (Kostrewa et al. 1997; Lim et al. 2000) โดยกลไกการเร่งปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 5.5

ดังนั้นในการวิเคราะห์ผลของการจำลองการจับกันระหว่างเอนไซม์ phytase กับสับสเตรต phytic acid จึงได้ตรวจสอบหาระยะห่างระหว่างอะตอมของไนโตรเจนในวงแหวนอิมิดาไซด์ของหมู่ข้างของกรดอะมิโน H82 กับอะตอมฟอสฟอรัสของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย และระยะห่างระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่ข้างของกรดอะมิโน D362 กับ อะตอมของออกซิเจนที่ทำพันธะเชื่อมระหว่างวงแหวน inositol กับอะตอมฟอสฟอรัสกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย โดยจากการวิเคราะห์โครงสร้างการจำลองการจับกันระหว่างโปรตีนกลาย Q50L กับ สับสเตรต phytic acid พบว่าระยะห่างระหว่างอะตอมของไนโตรเจนในวงแหวนอิมิดาไซด์ของหมู่ข้างของกรดอะมิโน H82 กับอะตอมฟอสฟอรัสของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย และ ระยะห่างระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่ข้างของกรดอะมิโน D362 กับ อะตอมของออกซิเจนที่ทำพันธะเชื่อมระหว่างวงแหวน inositol กับอะตอมฟอสฟอรัสกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย มีระยะห่างเท่ากับ 7.37 Å และ 6.07 Å ตามลำดับ ในขณะที่โปรตีนดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 3.51 Å และ 5.14 Å ซึ่งจะพบว่าระยะห่างของโปรตีนกลาย Q50L มีค่ามากกว่าระยะห่างของโปรตีนดั้งเดิมมาก แสดงให้เห็นว่าในการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 เป็น Leucine มีผลทำให้โครงสร้างเอนไซม์ phytase บริเวณ active site เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลให้ความสามารถของกรดอะมิโนหลักในการเร่งปฏิกิริยากับ phytic acid ได้แก่ H82 และ D362 ลดลง และทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนดั้งเดิม ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับค่าพารามิเตอร์ที่ได้

ในขณะโปรตีนกลาย Q50P มีระยะห่างระหว่างอะตอมของไนโตรเจนในวงแหวนอิมิดาไซด์ของหมู่ข้างของกรดอะมิโน H82 กับอะตอมฟอสฟอรัสของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย และ ระยะห่างระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่ข้างของกรดอะมิโน D362 กับ อะตอมของออกซิเจนที่ทำพันธะเชื่อมระหว่างวงแหวน inositol กับอะตอมฟอสฟอรัสของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย เท่ากับ 5.59 Å และ 4.13 Å ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนดั้งเดิมจะพบว่าระยะห่างระหว่างอะตอมของไนโตรเจนในวงแหวนอิมิดาไซด์ของหมู่ข้างของกรดอะมิโน H82 กับอะตอมฟอสฟอรัสของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมายของโปรตีนกลาย Q50P นั้นมากกว่าโปรตีนดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการทำงานของกรดอะมิโน H82 นั้นดีต่อกว่าโปรตีนดั้งเดิม โดยในการที่ระยะห่างระหว่างอะตอมของไนโตรเจนในวงแหวนอิมิดาไซด์ของหมู่ข้างของกรดอะมิโน H82 กับอะตอมฟอสฟอรัสของกลุ่ม inorganic phosphate

เป้าหมายนั้นมากกว่าโปรตีนดั้งเดิม จะทำให้ความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของอะตอมไนโตรเจนในวงแหวนอิมิดาโซลซึ่งเป็นหมู่ข้างกรดอะมิโน H82 ให้กับอะตอมของฟอสฟอรัสของหมู่ inorganic phosphate นั้นต่ำกว่าโปรตีนดั้งเดิม ส่งผลให้ในขั้นตอนนี้ต้องใช้เวลามากกว่าโปรตีนดั้งเดิม

แต่ด้วยผลจากระยะห่างระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่ข้างของกรดอะมิโน D362 กับ อะตอมของออกซิเจนที่ทำพันธะเชื่อมระหว่างวงแหวน inositol กับอะตอมฟอสฟอรัสของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมายของโปรตีนกลาย Q50P นั้นสั้นกว่าโปรตีนดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการทำงานของกรดอะมิโน D362 นั้นดีกว่าโปรตีนดั้งเดิม ซึ่งระยะห่างที่สั้นกว่านั้นจะทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของการเกิดผลิตภัณฑ์คือ หมู่ inorganic phosphate จากโมเลกุลสับสเตรต phytic acid สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าพารามิเตอร์ V_{max} และ k_{cat} ของโปรตีนกลาย Q50P ที่มีค่าสูงกว่าโปรตีนดั้งเดิม นั้นแสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลาย Q50P มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาที่ดีกว่าโปรตีนดั้งเดิมนั่นเอง

ภาพที่ 5.5

กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase ต่อสับสเตรต phytic acid
(ปรับปรุงจาก Chu et. al 2004)

