บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโน Q50 ต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยาและการจับของสับสเตรทของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *Aspergillus niger* TR170 และนำความรู้ที่ได้ไปปรับปรุงเอนไซม์ให้มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาดีขึ้น และมีความหลากหลายต่อสับสเทรตมากขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่บริเวณต่างๆ ทำให้ได้เอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *Aspergillus niger* TR170 ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากขึ้นในการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์

จากการศึกษาในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 (ตรงกับกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170) มีความสำคัญต่อความจำเพาะของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโน Q50 ต่อการจับของสับสเตรทและอัตราการเร่งปฏิกิริยา ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *Aspergillus niger TR170* โดยทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ซึ่งมีคุณสมบัติไม่มีประจุและมีขั้ว เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น 9 ชนิด ซึ่งในกลุ่ม hydrophobic และไม่มีขั้ว ได้แก่ Asparagine Threonine Leucine Isoleucine Valine Alanine Glycine Serine และ Proline ด้วยเทคนิค site directed mutagenesis ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้พลาสมิดสายผสม pPICZαA-rPhyA170 เป็นต้นแบบ ได้พลาสมิดดีเอ็นเอกลาย 9 ชนิด และนำมาแสดงออกในยีสต์เจ้าบ้าน *P. pastoris* ทำให้ได้โปรตีนกลาย PhyA170 ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ โปรตีนกลาย Q50A Q50G Q50I Q50L Q50N Q50P Q50S Q50T และ Q50V ซึ่งมีขนาดประมาณ 66 kDa ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ phytases จากโปรตีนกลายทั้ง 9 ชนิด โดยในการทดลองเพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytase พบว่าโปรตีนกลายเกือบทุกชนิดมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 5.5 เช่นเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม โดยพบว่าโปรตีนกลาย Q50P ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และสูงกว่าโปรตีนดั้งเดิมเกือบ 2 เท่า ยกเว้นโปรตีนกลาย Q50G และ Q50L จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 4.5 อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีค่าน้อยกว่าโปรตีนดั้งเดิมอยู่มาก และในส่วนของการทดลองหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytases พบว่าทุกชนิดของโปรตีนกลายมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าเดียวกับโปรตีนดั้งเดิมโดยโปรตีนกลาย

Q50P จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดโดยสูงกว่าโปรตีนดั้งเดิมเกือบ 2 เท่า ในขณะที่โปรตีนกลาย Q50L จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด ในส่วนของการทดลองเพื่อทดสอบความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด-เบส และ ความร้อนที่อุณหภูมิระดับต่างๆ จะพบว่าทุกชนิดของโปรตีนกลายสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด-เบสได้ในช่วงกว้างโดยพบว่าในช่วง pH 2 ถึง 10 โปรตีนกลาย Q50N Q50S Q50T มีค่า relative activity มากว่า 60 เปอร์เซนต์ และโปรตีนกลาย Q50A Q50G Q50I Q50L และ Q50V มีค่า relative activity มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ ในขณะที่โปรตีนดั้งเดิมมีค่า relative activity มากกว่า 60 เปอร์เซนต์ ในช่วง pH 2 ถึง 9 และโปรตีนกลาย Q50P มีค่า relative activity มากกว่า 70 เปอร์เซนต์ ในช่วง pH 3 ถึง 10 ดังตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลายทุกชนิดสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด-เบสได้ในช่วงกว้างเช่นเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม และในส่วนของการทดสอบการทนทานต่ออุณหภูมิ พบว่าโปรตีนดั้งเดิมมีค่า relative activity มากกว่า 60 เปอร์เซนต์ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดังภาพที่ 4.18 แต่โปรตีนกลาย Q50I และ Q50L มีค่า relative activity มากว่า 50 เปอร์เซนต์ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดังภาพที่ 4.19 และ 4.20 ตามลำดับ และโปรตีนกลาย Q50P มีค่า relative activity มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดังภาพที่ 4.21 ซึ่งโปรตีนกลายยังคงรักษาคุณสมบัติในการทนร้อนของโปรตีนดั้งเดิมไว้ และผลการคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ phytases โดยใช้หลักการของสมการ Michaelis-Menten ด้วยโปรแกรม KALEIDA-GRAPH version 3.51 (Synergy) พบว่าโปรตีนดั้งเดิมมีค่า 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 และโปรตีนกลาย Q50P มีค่า K_m V_{max} และ k_{cat} เท่ากับ 0.731 mM 513.81 U/mg และ 962.52 s^{-1} ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.24 โดยพบว่าค่า K_m ของโปรตีนกลาย Q50P และ Q50L มีค่ามากกว่า K_m ของโปรตีนดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าการจับของสับสเทรตกับเอนไซม์ในโปรตีนดั้งเดิมดีกว่าโปรตีนกลาย Q50P และ Q50L ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 จาก Glutamine ซึ่งมีหมู่ข้างแต่ไม่มีมีขั้ว ซึ่งเป็นตำแหน่งที่คาดว่าอาจจะมีความสำคัญต่อการจับกันระหว่างสับสเทรตกับเอนไซม์ phytase เป็นกรดอะมิโน Proline และ Leucine ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวน ไม่มีขั้ว และเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาว ไม่มีขั้ว ตามลำดับ อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างการเรียงตัวของกรดอะมิโนบริเวณที่จับกับกับสับสเทรตส่งผลให้การจับ

กันของสับสเทรต phytic acid กับโปรตีนกลาย Q50P และ Q50L เกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่ากับโปรตีนดั้งเดิม

แต่เมื่อพิจารณาอัตราการเร่งปฏิกิริยาพบว่า จะพบว่าค่า V_{max} และ k_{cat} ของโปรตีนดั้งเดิมและโปรตีนกลาย Q50L มีค่าน้อยกว่าโปรตีนกลาย Q50P แสดงให้เห็นว่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนกลาย Q50P ดีกว่าโปรตีนดั้งเดิมและโปรตีนกลาย Q50L ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการวิเคราะห์การจำลองการจับกันระหว่างโปรตีนดั้งเดิม โปรตีนกลาย Q50L และ โปรตีนกลาย Q50P ซึ่งพบว่าระยะห่างระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของหมู่ข้างของกรดอะมิโน D362 กับอะตอมของออกซิเจนที่ทำพันธะเชื่อมระหว่างวงแหวน inositol กับอะตอมฟอสฟอรัสของกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย ของโปรตีนกลาย Q50P นั้นสั้นกว่าโปรตีนดั้งเดิม และโปรตีนกลาย Q50L โดยมีค่าเท่ากับ 4.13 Å 5.14 Å และ 6.07 Å ตามลำดับ ซึ่งระยะห่างที่สั้นกว่าจะทำให้ระยะเวลาในการปลดปล่อยกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย หลุดออกจากโมเลกุลสับสเทรต phytic acid นั้นน้อยกว่าและส่งผลให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase ของโปรตีนกลาย Q50P ดีกว่าโปรตีนดั้งเดิมและโปรตีนกลายชนิดอื่นนั่นเอง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 เป็นกรดอะมิโน Proline ซึ่งมีหมู่ข้างที่มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีนดั้งเดิมและไม่มีประจุเช่นเดียวกัน ทำให้เกิดการรบกวนกลุ่มกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาไม่มากและอาจส่งผลให้การจัดเรียงตัวของกลุ่มกรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเล็กน้อยแต่ให้ผลที่ดีขึ้นต่อการเร่งปฏิกิริยากับสับสเทรต phytic acid ในขณะที่เมื่อเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน Leucine ซึ่งมีหมู่ข้างที่ยาวกว่าโปรตีนดั้งเดิมอาจมีผลไปขัดขวางการทำหน้าที่ของกลุ่มกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา ทำให้โปรตีนกลาย Q50L มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนดั้งเดิม และ โปรตีนกลายชนิดอื่น

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จากงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 น่าจะมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเข้าถึงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ของสับสเทรต phytic acid เพื่อทำให้ปฏิกิริยาในการปลดปล่อยกลุ่ม inorganic phosphate เป้าหมาย ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาสามารถดำเนินต่อไปได้ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้จากผลของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50 จาก Glutamine ซึ่งมีหมู่ข้างที่ไม่มีประจุแต่มีขั้วเป็น Proline ซึ่งมีหมู่ข้างเป็นวงแหวนที่ไม่มีขั้ว อาจส่งผลโอกาสในการจับสับสเทรตเกิดขึ้นได้ไม่ดีเท่ากับโปรตีนดั้งเดิม แต่เมื่อจับแล้วอัตราเร่งของปฏิกิริยาสามารถดำเนินได้เร็วกว่าโปรตีนดั้งเดิม ในขณะที่โปรตีนกลาย Q50L ซึ่งมีหมู่ข้างที่ยาวกว่า อาจส่งผลให้โอกาสในการจับกับสับสเทรตและอัตราเร่งของปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ไม่ดี

ดังนั้นจากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้เข้าใจความสำคัญของกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ต่อเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 มากขึ้น และข้อมูลที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 นั้นมีความสำคัญต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยาและการเข้าจับกับสับสเทรตของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 โดยคาดว่าความรู้ที่ได้นี้จะสามารถนำไปประยุกต์และปรับปรุงเอนไซม์ให้มีอัตราการเร่งปฏิกิริยา และความหลากหลายต่อสับสเทรตมากขึ้น เพื่อที่จะสามารถผลิตเอนไซม์ phytase ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต่อไป