วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตและการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะของรีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูง

Production and Site-directed Mutagenesis of Recombinant β-Glucosidase from Thai Rosewood

โดย

นางสาวเพ็ญพร สูจิวัฒนารัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-2359-3

เพ็ญพร สูจิวัฒนารัตน์ 2549: การผลิตและการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะของรีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D. 119 หน้า
ISBN 974-16-2359-3

ดัลโคชิเนสเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูง สามารถสลาย dalcochinin β-glucoside ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติได้ ขณะที่ลินามาเรสเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง จะสลายลินามารินได้ ดัลโคชิเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายได้ดี แต่เร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้น้อย ในขณะที่ลินามาเรสเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดี แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย ทั้งๆที่เอนไซม์ทั้งสองมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน 60% ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส โดยหาตำแหน่งกรดอะมิโนที่สำคัญสำหรับเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทและปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนของเอนไซม์ดัลโคชิเนส ให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เมื่อศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของรีคอมบิแนนต์ดัลโคชิเนส พบว่ามีค่าคล้ายคลึงกับดัลโคชิเนสธรรมชาติ จากนั้นทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะของยีนดัลโคชิเนส โดยการแทนที่กรดอะมิโนในบริเวณจับอะไกลโคนของดัลโคชิเนสด้วยกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ตรงกันของลินามาเรส นั่นคือเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และ A454N จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้งสองชนิด พบว่าตำแหน่ง N189 และ A454 ของเอนไซม์ดัลโคชิเนสไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลินามาริน แต่ตำแหน่ง N189 น่าจะเป็นตำแหน่งที่สำคัญต่อการย่อยสลาย *p*NP-Glc และ dalcochinin-glucoside เมื่อศึกษาการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสพบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F มีประสิทธิภาพดีขึ้น ในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ แต่ตำแหน่ง N189 และ A454 ของเอนไซม์ดัลโคชิเนสไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสกับแอลกอฮอล์ชนิดทุติยภูมิและตติยภูมิ

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Penporn Sujiwattanarat 2006: Production and Site-directed Mutagenesis of Recombinant β-Glucosidase from Thai Rosewood. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Miss Prachumporn Kongsaeree, Ph.D. 119 pages.
ISBN 974-16-2359-3

Dalcochinase, a β-glucosidase from Thai rosewood, can hydrolyze dalcochinin β-glucoside that is its natural substrate, whereas linamarase, a β-glucosidase from cassava, hydrolyzes linamarin. Dalcochinase can catalyze reverse hydrolysis well, but shows low efficiency in transglucosylation. On the other hand, linamarase catalyses transglucosylation better than dalcochinase, but was not efficient in catalyzing reverse hydrolysis. Despite these differences, both enzymes have 60% amino acid sequence homology. Thus, this project is interested in studying the relationship between structure and function of β-glucosidase, particularly the identification of the amino acid residue that is important for hydrolysis and transglucosylation. The coding sequence of dalcochinase was cloned, expressed in yeast *Pichia pastoris*, and purified. The recombinant enzyme exhibits similar enzymatic properties to natural dalcochinase. Mutant forms of dalcochinase (namely N189F and A454N) were generated by replacing amino acid residues located in the aglycone binding pocket of dalcochinase with the corresponding residues of linamarase. Kinetic analysis of both enzymes showed that both N189 and A454 were not involved in hydrolysis of linamarin, but N189 could be important for hydrolysis of *p*NP-Glc and dalcochinin glucoside. In transglucosylation studies, N189F mutant could improve transglucosylation efficiency using primary alcohols as acceptors. However, neither N189 nor A454 was likely to be involved in transglucosylation using secondary and tertiary alcohols as acceptors.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ประชุมพร คงเสรี ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมชัย พรบันลือลาภ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ดร.ดวงพร วรสุนทโรสถ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และรองศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ ทวีชัย อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์ และ ผศ.ดร.เจมส์ เกตุทัตคาร์นส์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการของอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างสูงที่เอื้อเฟื้อสารเคมีพร้อมทั้งให้คำแนะนำต่างๆเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ และพี่ๆนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ โดยเฉพาะคุณนุสรา ทองทับทิม ที่เสียสละเวลาสกัดลินามารินมาให้ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ที่คอยให้การสนับสนุน และให้กำลังใจเสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปี 2548 และความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้รับทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

เพ็ญพร สูจิวัฒนารัตน์

พฤษภาคม 2549