

## สารบัญ

|                                                                                        | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| สารบัญ.....                                                                            | (1)  |
| สารบัญตาราง.....                                                                       | (3)  |
| สารบัญภาพ.....                                                                         | (4)  |
| คำอธิบายอักษรย่อ.....                                                                  | (6)  |
| คำนำ.....                                                                              | 1    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....                                                           | 3    |
| การตรวจเอกสาร.....                                                                     | 4    |
| เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดพะยูน.....                                              | 4    |
| ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดส.....                                                       | 7    |
| กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส.....                                    | 8    |
| การเกิดปฏิกิริย่อนการสลายและปฏิกิริยาย่อยหมู่กลูโคสของ<br>เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส..... | 11   |
| การศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์.....                                         | 13   |
| การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนใน <i>Pichia pastoris</i> .....                               | 15   |
| การสร้างยีนรีคอมบิแนนต์คัลโคซิเนส.....                                                 | 18   |
| อุปกรณ์และวิธีการ.....                                                                 | 20   |
| อุปกรณ์.....                                                                           | 20   |
| เชื้อและพลาสมิด.....                                                                   | 20   |
| สารเคมีและเอนไซม์.....                                                                 | 21   |
| วิธีการ.....                                                                           | 22   |
| เทคนิคทางรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ.....                                                     | 22   |
| การโคลนยีน His6-TRBG.....                                                              | 26   |
| การโคลนยีน His8-truncTRBG.....                                                         | 28   |
| การทำการกลายพันธุ์ของยีนคัลโคซิเนสที่ตำแหน่งจำเพาะ.....                                | 29   |
| การแสดงออกของเอนไซม์คัลโคซิเนสโดย <i>P. pastoris</i> .....                             | 31   |
| การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์.....                                                          | 33   |
| การวัดกิจกรรมเอนไซม์.....                                                              | 34   |

## สารบัญ (ต่อ)

### หน้า

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะครีลาไมด์เจล.....                         | 35  |
| อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอน-ดีแนชเซอริง-พอลิอะครีลาไมด์เจล.....                  | 35  |
| การทำเวสเทอร์นอิมมูโนวิเคราะห์.....                                         | 36  |
| การศึกษาสมบัติของเอนไซม์คัลโคซิเนสในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส.....     | 36  |
| การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธีโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง.....                       | 37  |
| ผลการทดลองและวิจารณ์.....                                                   | 38  |
| การโคลนยีน His6-TRBG เข้าสู่ <i>Pichia pastoris</i> (GS115).....            | 38  |
| การเลือกอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแสดงออกของ <i>P. pastoris</i> .....     | 41  |
| การโคลนยีน His8-truncTRBG เข้าสู่ <i>P. pastoris</i> (GS115).....           | 42  |
| การทำการกลายพันธุ์ของยีนคัลโคซิเนสที่ตำแหน่งจำเพาะ.....                     | 44  |
| การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์.....                                               | 52  |
| การศึกษาจลพลศาสตร์ของเอนไซม์.....                                           | 58  |
| การศึกษาสมบัติของเอนไซม์คัลโคซิเนสในการเร่งปฏิกิริยา<br>ย้ายหมู่กลูโคส..... | 61  |
| สรุป.....                                                                   | 70  |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง.....                                                   | 72  |
| ภาคผนวก.....                                                                | 76  |
| ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐาน.....                                                  | 77  |
| ภาคผนวก ข การเตรียมสาร.....                                                 | 80  |
| ภาคผนวก ค ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนส His6-TRBG.....                           | 82  |
| ภาคผนวก ง ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนส His8-truncTRBG.....                      | 89  |
| ภาคผนวก จ ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F.....                     | 97  |
| ภาคผนวก ฉ ลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ A454N.....                     | 103 |
| ภาคผนวก ช กราฟ Michaelis-Menten.....                                        | 109 |
| ภาคผนวก ซ โครงสร้างของแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นตัวรับกลูโคส.....                  | 118 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่            |                                                                                      | หน้า |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1                   | โคโลนี <i>P. pastoris</i> ที่มีพลาสมิด pPICZ-His6-TRBG .....                         | 40   |
| 2                   | โคโลนี <i>P. pastoris</i> ที่มีพลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG.....                     | 43   |
| 3                   | โคโลนี <i>P. pastoris</i> ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F.....              | 51   |
| 4                   | โคโลนี <i>P. pastoris</i> ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N.....              | 51   |
| 5                   | ตารางสรุปการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนของเอนไซม์ H18.....                   | 52   |
| 6                   | ตารางสรุปการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนของ<br>เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F8.....  | 53   |
| 7                   | ตารางสรุปการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนของ<br>เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N11..... | 53   |
| 8                   | ค่า $K_m$ (mM) และ $V_{max}$ (mU) ในการสลายสับสเตรทของเอนไซม์.....                   | 59   |
| 9                   | ปริมาณอัลคิลดิวโคไซด์ที่ปรากฏในปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส.....                          | 66   |
| <b>ตารางผนวกที่</b> |                                                                                      |      |
| ข1                  | ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE.....                                             | 81   |
| ข2                  | ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม non-denaturing PAGE.....                                  | 81   |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่                                                                                                                          | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 โครงสร้างของ dalcochinin-8'-O- $\beta$ -D-glucoside.....                                                                      | 5    |
| 2 แบบจำลองโครงสร้างของเอนไซม์คัลโคซิเนส.....                                                                                    | 6    |
| 3 โครงสร้างของลินามารินและโลคัสตราลิน.....                                                                                      | 7    |
| 4 ปฏิกริยาการสลายไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์.....                                                                                | 8    |
| 5 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส.....                                                                           | 10   |
| 6 การเกิดปฏิกิริยาของการสลายและปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของ<br>เอนไซม์เบต้า- กลูโคซิเดส.....                                      | 12   |
| 7 กลไกการสลาย methanol ใน <i>Pichia pastoris</i> .....                                                                          | 16   |
| 8 พลาสมิด pPICZ $\alpha$ B.....                                                                                                 | 17   |
| 9 การสร้างยีนรีคอมบิแนนต์คัลโคซิเนส.....                                                                                        | 19   |
| 10 พลาสมิด pPICZ-His8-truncTRBG.....                                                                                            | 20   |
| 11 ตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ 5PstN และ 3EcoN.....                                                                                | 26   |
| 12 พลาสมิด pPICZ-His6-TRBG จากโคลนี <i>E. coli</i> .....                                                                        | 38   |
| 13 กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกับ 1 mM pNP-Glc ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ.....                                                 | 41   |
| 14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ZmGlu1 คัลโคซิเนสและลินามาเรส.....                                                           | 45   |
| 15 ตำแหน่งของ N189 และ A454 ในโครงสร้างจำลองของเอนไซม์คัลโคซิเนส.....                                                           | 45   |
| 16 โครงสร้างกรดอะมิโน (a) แอสปาราจีน, (b) เฟนิลอะลานีน และ (c) อะลานีน .....                                                    | 46   |
| 17 พลาสมิดจากโคลนี <i>E. coli</i> ที่มียีนของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และ<br>เอนไซม์กลายพันธุ์ A454N.....                        | 48   |
| 18 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกับเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F.....                                                        | 49   |
| 19 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสกับเอนไซม์กลายพันธุ์ A454N.....                                                        | 50   |
| 20 การวิเคราะห์โปรตีนของเอนไซม์แต่ละตัวที่ผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์.....                                                        | 56   |
| 21 การวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยวิธี non-denaturing PAGE .....                                                                      | 58   |
| 22 การวิเคราะห์โครมาโตกราฟีบนชั้นบางในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส<br>กับ 0.9 M C <sub>1</sub> -C <sub>3</sub> แอลกอฮอล์..... | 62   |
| 23 การวิเคราะห์โครมาโตกราฟีบนชั้นบางในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส กับ 0.9 M<br>C <sub>4</sub> แอลกอฮอล์.....                 | 63   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่            |                                                                                                                                             | หน้า |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 24                | การวิเคราะห์โครมาโตกราฟีบนชั้นบางในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส<br>กับ methanol และ ethanol ที่ความเข้มข้นสูง.....                        | 64   |
| 25                | การวิเคราะห์โครมาโตกราฟีบนชั้นบางในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส<br>กับ C <sub>3</sub> และ C <sub>4</sub> แอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นสูง..... | 65   |
| <b>ภาพผนวกที่</b> |                                                                                                                                             |      |
| ก1                | กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA).....                                                                                              | 78   |
| ก2                | กราฟมาตรฐานของ pNP.....                                                                                                                     | 78   |
| ก3                | กราฟมาตรฐานของกลูโคส.....                                                                                                                   | 79   |
| ข1                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ คัลโคซิเนสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท pNP-Glc.....                                             | 110  |
| ข2                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ คัลโคซิเนสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท<br>dalcochinin glucoside .....                           | 110  |
| ข3                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ คัลโคซิเนสธรรมชาติ ต่อสับสเตรทลินามาริน.....                                            | 111  |
| ข4                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ H18 ต่อสับสเตรท pNP-Glc.....                                                            | 111  |
| ข5                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ H18 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside.....                                              | 112  |
| ข6                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ H18 ต่อสับสเตรท ลินามาริน.....                                                          | 112  |
| ข7                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ N189F8 ต่อสับสเตรท pNP-Glc.....                                                         | 113  |
| ข8                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ N189F8 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside.....                                           | 113  |
| ข9                | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ N189F8 ต่อสับสเตรท ลินามาริน.....                                                       | 114  |
| ข10               | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ A454N11 ต่อสับสเตรท pNP-Glc.....                                                        | 114  |
| ข11               | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ A454N11 ต่อสับสเตรท dalcochinin glucoside.....                                          | 115  |
| ข12               | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ A454N11 ต่อสับสเตรท ลินามาริน.....                                                      | 115  |
| ข13               | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ ลินามาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท pNP-Glc.....                                              | 116  |
| ข14               | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ ลินามาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท<br>dalcochinin glucoside.....                             | 116  |
| ข15               | กราฟแสดงค่า K <sub>m</sub> และ V <sub>max</sub> ของ ลินามาเรสธรรมชาติ ต่อสับสเตรท ลินามาริน.....                                            | 117  |

## คำอธิบายอักษรย่อ

|                     |   |                                                           |
|---------------------|---|-----------------------------------------------------------|
| Abg                 | = | <i>Agrobacterium</i> sp. $\beta$ -glucosidase             |
| non-denaturing PAGE | = | Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis         |
| PCR                 | = | Polymerase Chain Reaction                                 |
| <i>p</i> NP         | = | <i>para</i> -nitrophenyl                                  |
| <i>p</i> NP-Glc     | = | <i>para</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside      |
| <i>p</i> NP-Fuc     | = | <i>para</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranoside       |
| SbDhr1              | = | Sorghum $\beta$ -glucosidase isozyme Dhr1                 |
| SDS-PAGE            | = | Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| TLC                 | = | Thin-Layer Chromatography                                 |
| ZmGlu1              | = | Maize $\beta$ -glucosidase isozyme Glu1                   |