221477

นุสรา ทองทับทิม 2552: การผลิตและศึกษาเอนไซม์ดัลโคชิเนสกลายพันธุ์หลายตำแหน่งในบริเวณจับสับสเตรท ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D. 123 หน้า

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูง (ดัลโคชิเนส) สามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิได้เท่านั้น ซึ่งตรงกันข้ามกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากมันสำปะหลัง (ลินามาเรส) ที่สามารถใช้ได้ทั้งแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิและตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติเฉพาะตัว คือ ดัลโคชินิน-กลูโคไซด์ และลินามาริน ตามลำดับ การกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่งในบริเวณจับสับสเตรท ของเอนไซม์ดัลโคชิเนส ไปเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส สามารถลดความจำเพาะต่อดัลโคชินิน-กลูโคไซด์ได้ แต่ยังไม่สามารถสลายลินามารินได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ดัลโคชิเนสกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการปรับปรุงปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้ดีขึ้น คือ I185A, N189F และ V255F ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการกลายพันธุ์ครั้งละ 2-3 ตำแหน่ง ในบริเวณจับสับสเตรท ของเอนไซม์ดัลโคชิเนส ด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส คือ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F เพื่อตรวจสอบอันตรกิริยาของกรดอะมิโนที่มีผลต่อความจำเพาะในการสลายสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส พบว่า ทั้งตำแหน่ง I185, N189 และ V255 ในเอนไซม์ดัลโคชิเนส มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาสลายดัลโคชินิน-กลูโคไซด์ โดยที่ตำแหน่ง I185 มีบทบาทที่เด่นชัดที่สุด ส่วนการสลายลินามาริน พบว่าตำแหน่ง A185-F189 และ A185-F255 สามารถมีอันตรกิริยาต่อกันในการสลายลินามาริน ในการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V2555F และ I185A-N189F-V2555F มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสดีขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V2555F ที่สามารถผลิตอัลคิลกลูโคไซด์โดยใช้ *iso*-propanol ได้ดี อย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เอนไซม์ดัลโคชิเนสกลายพันธุ์ N189F-V2555F มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ยังไม่สามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์โดยใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้

221477

Nudsara Thongthapthim 2009: Production and Characterization of Dalcochinase Mutants Containing Multiple Mutations in the Substrate Binding Site. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Prachumporn Kongsaeree, Ph.D. 123 pages.

β-Glucosidase from Thai rosewood (dalcochinase) can synthesize alkyl glucoside using only primary and secondary alcohols, whereas *β*-glucosidase from cassava (linamarase) can use primary, secondary and tertiary alcohols as acceptors. Both enzymes show specificities for their natural substrates, which are dalcochinin glucoside and linamarin, respectively. Single mutations in the substrate binding pocket of dalcochinase to corresponding residues of linamrase decreased their specificities toward dalcochinin glucoside, but did not improve their activity toward linamarin. In addition, three dalcochinase mutants, I185A, N189F and V255F, showed improved transglucosylation activity. In this project, three double- and one triple mutations in the substrate binding pocket of dalcochinase to the corresponding residues of linamrase (I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F and I185A-N189F-V255F) were made to investigate the interactions of amino acid residues in substrate specificity. Residues I185, N189 and V255 in dalcochinase played important roles in the hydrolysis of dalcochinin glucoside, with I185A being more dominant than the other two residues. In hydrolysis of linamarin, residues A185-F189 and A185-F255 interacted to assist in hydrolysis of linamrin. In transglucosylation studies, mutations I185A-N189F, I185A-V255F and I185A-N189F-V2555F could improve transglucosylation efficiency using primary and secondary alcohols as acceptors. In particular, I185A-N189F-V2555F mutant gave significantly high yield of alkyl glucoside from *iso*-propanol. On the other hand, N189F-V255F mutant showed reduction in transglucosylation efficiency compared with single mutants. However, none of our four dalcochinase mutants could catalyze transglucosylation using tertiary alcohols as acceptors.