



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตและศึกษาเอนไซม์คัลโคจีนเนสกลายพันธุ์หลายตำแหน่งในบริเวณจับซับสเตรท

Production and Characterization of Dacochinase Mutants Containing Multiple
Mutations in the Substrate Binding Site

นามผู้วิจัย นางนุสรุา ทองทับทิม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ณัฐวัฒน์ บุญญาลัย, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พรพวงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตและศึกษาเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์หลายตำแหน่งในบริเวณจับสับสเตรท

Production and Characterization of Dalcochinase Mutants Containing Multiple Mutations in the
Substrate Binding Site

โดย

นางนุสรุา ทองทับติม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ.2552

นุสรรา ทองทับทิม 2552: การผลิตและศึกษาเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์หลายตำแหน่ง
ในบริเวณจับสับสเตรท ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุ
วิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D. 123 หน้า

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน (คัลโคซิเนส) สามารถสังเคราะห์อัลทิลกลูโคไซด์โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิได้เท่านั้น ซึ่งตรงกันข้ามกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากมัน
สำปะหลัง (ลินามารเอส) ที่สามารถใช้ได้ทั้งแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิและตติยภูมิเป็นตัวรับ
กลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติเฉพาะตัว คือ คัลโคซินิน-กลู
โคไซด์ และลินามาริน ตามลำดับ การกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่งในบริเวณจับสับสเตรท ของ
เอนไซม์คัลโคซิเนส ไปเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามารเอส สามารถลดความจำเพาะต่อคัลโคซิ
นิน-กลูโคไซด์ได้ แต่ยังไม่สามารถสลายลินามารินได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนส
กลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการปรับปรุงปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้ดีขึ้น คือ I185A, N189F และ
V255F ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการกลายพันธุ์ครั้งละ 2-3 ตำแหน่ง ในบริเวณจับสับสเตรท ของ
เอนไซม์คัลโคซิเนส ด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามารเอส คือ I185A-N189F, I185A-V255F,
N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F เพื่อตรวจสอบอันตรกิริยาของกรดอะมิโนที่มีผลต่อ
ความจำเพาะในการสลายสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส พบว่า ทั้งตำแหน่ง I185,
N189 และ V255 ในเอนไซม์คัลโคซิเนส มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาสลายคัลโคซินิน-กลู
โคไซด์ โดยที่ตำแหน่ง I185 มีบทบาทที่เด่นชัดที่สุด ส่วนการสลายลินามาริน พบว่าตำแหน่ง A185-
F189 และ A185-F255 สามารถมีอันตรกิริยาต่อการสลายลินามาริน ในการศึกษาการเร่ง
ปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F และ I185A-
N189F-V255F มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และ
ทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสดีขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ที่สามารถ
ผลิตอัลทิลกลูโคไซด์โดยใช้ *iso-propanol* ได้ดี อย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เอนไซม์คัลโคซิเนสกลาย
พันธุ์ N189F-V255F มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ
เอนไซม์กลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ยังไม่สามารถ
สังเคราะห์อัลทิลกลูโคไซด์โดยใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้

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 Kongsaree, 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 linamarase 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 linamarase (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 linamarin. In transglucosylation studies, mutations I185A-N189F, I185A-V255F and I185A-N189F-V255F could improve transglucosylation efficiency using primary and secondary alcohols as acceptors. In particular, I185A-N189F-V255F 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.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ประชุมพร คงเสรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนการทำงานวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และช่วยแก้ไขปัญหาดัง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำงานวิจัย ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.นลวัฒน์ บุญญาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ปัญญาภัทร โสจิกุล ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเพื่อให้ใช้เครื่อง Scanning densitometer และขอขอบพระคุณอาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่เอื้อเพื่อให้ใช้เครื่อง Mass spectrometry ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ พี่สาว พี่ชาย และสามี ที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจเสมอมา

นุสรา ทองทับทิม

เมษายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	83
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	87
ภาคผนวก	92
ภาคผนวก ก เทคนิคทางรีคอมบีแนนท์ดีเอ็นเอ	93
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน	101
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของยีนดีลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F	104
ภาคผนวก ง ลำดับเบสของยีนดีลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F	106
ภาคผนวก จ ลำดับเบสของยีนดีลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F	108
ภาคผนวก ฉ ลำดับเบสของยีนดีลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F	110
ภาคผนวก ช กราฟ Michaelis-Menten	112
ภาคผนวก ซ กราฟมาตรฐานของ TLC	119
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	123

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	31
2	กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด	46
3	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร	47
4	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร	48
5	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร	48
6	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร	49
7	ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดในการสลาย <i>pNP-Glc</i>	59
8	ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิมและคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดในการสลายคัลโคซินินเบต้า-กลูโคไซด์	60
9	ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิมและคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดในการสลายลินามาริน	60
10	ค่า k_{cat} และค่า K_m ของการสลายคัลโคซินินเบต้า-กลูโคไซด์ ที่ลดลงเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม	64
11	% mole ของ alkyl glucoside ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของแอลกอฮอล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิกับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิมและคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด	77

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล	97
ก2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม นอน-ดีแนชเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล	100

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้าง (α/β) ₈ barrel structure ของเอนไซม์เอนไซม์คัลโคซิเนสที่ได้จากการทำ modeling โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover เป็นต้นแบบ	5
2	โครงสร้างของคัลโคซินินกลูโคไซด์	8
3	ปฏิกิริยาการสลายไซยาโนจินิกเบต้า-กลูโคไซด์	10
4	กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส	12
5	การเกิดปฏิกิริยาการสลาย ปฏิกิริยาซ้อนการสลาย และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส	13
6	แผนภาพแสดงผลของการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งแบบ additive effects	17
7	แผนภาพแสดงผลของการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งแบบ partially additive effects	18
8	แผนภาพแสดงผลของการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งแบบ synergistic effects	19
9	แผนภาพแสดงผลของการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งแบบ antagonistic effects	20
10	กลไกการสลาย methanol ใน <i>Pichia pastoris</i>	22
11	พลาสมิด pPICZ α A, B, C	23
12	แผนภาพแสดงการทดแทนยีนที่สนใจจากเวกเตอร์เข้าสู่โครโมโซมของ <i>P. pastoris</i> ในตำแหน่ง AOX1 โปรโมเตอร์	24
13	โครงสร้างยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส	25
14	พลาสมิด pPICZ-His8-trncTRBG	26
15	แผนภาพแสดงการทำกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะโดยพีซีอาร์	32
16	แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ endoglycosidase H	37
17	1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ในการทำกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ผลการตัดพลาสมิดที่คาดว่าจะเ็นเอนไซม์คัลโคซิเนส กลายพันธุ์ทั้ง 4 ตัว ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	42
19	ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม	44
20	การตรวจสอบคุณลักษณะเบื้องต้นของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้	52
21	การวิเคราะห์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง ที่ถูกทำ ให้บริสุทธิ์	54
22	แผนภาพแสดงความแตกต่างของการกระบวนการ glycosylation ระหว่างพืชกับยีสต์	55
23	การย่อยเอนไซม์คัลโคซิเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยเอนไซม์ <i>Endoglycosidase</i>	56
24	การวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบนอน-ดีแนชเซอริง- พอลิอะคริลาไมด์	58
25	โครงสร้างของสับสเตรทลินามาริน	61
26	อันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์กลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง ต่อการเร่งปฏิกิริยา (k_{cat}) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม	65
27	อันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์กลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง ต่อการจับสับสเตรท (K_m) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม	66
28	แผนภาพจำลองแสดงแขนงข้างของกรดอะมิโนที่เข้าไปในบริเวณ จับอะไกลโคน ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 2 และ 3 ตำแหน่ง	69
29	% Mole ของ <i>n</i> -butyl glucoside ที่ได้จากปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ที่เวลาต่างๆ กัน	71
30	ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M methanol และ 0.9 M ethanol เป็น glucosyl acceptor	73
31	ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>n</i> -propanol และ 0.9 M <i>n</i> -butanol เป็น glucosyl acceptor	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
32	ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>iso</i> -propanoll และ 0.9 M <i>iso</i> -butanol เป็น glucosyl acceptor	75
33	ผลการวิเคราะห์ TLC เมื่อใช้ 0.9 M <i>sec</i> -butanol และ 0.9 M <i>tert</i> -butanol เป็น glucosyl acceptor	76
34	โครงสร้าง 3 มิติของแบบจำลองดัลโคซิเนสที่แสดงให้เห็นตำแหน่งของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185, N189, M195, H253, V255, N323, G367, K402, A454 และ E455	85
ภาพผนวกที่		
ก1	แผนภาพแสดงส่วนประกอบการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แมมเบรน	98
ก2	แผนภาพแสดงการทำอิมมูโนวิเคราะห์สำหรับโปรตีน	99
ข1	กราฟมาตรฐานโปรตีน	102
ข2	กราฟมาตรฐาน <i>p</i> NP ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	102
ข3	กราฟมาตรฐาน <i>p</i> NP ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์	103
ข4	กราฟมาตรฐานกลูโคส	103
ข1	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลาย <i>p</i> NP-Glc	113
ข2	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลาย <i>p</i> NP-Glc	113
ข3	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลาย <i>p</i> NP-Glc	114
ข4	กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลาย <i>p</i> NP-Glc	114

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข5 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลาย Dal-Glc	115
ข6 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลาย Dal-Glc	115
ข7 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลาย Dal-Glc	116
ข8 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลาย Dal-GI	116
ข9 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลายลินามาริน	117
ข10 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลายลินามาริน	117
ข11 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลายลินามาริน	118
ข12 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลายลินามาริน	118
ข1 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ methanol	120
ข2 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ ethanol	120
ข3 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ <i>n</i> -propanol	120
ข4 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ <i>n</i> -butanol	121
ข5 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ <i>iso</i> -propanol	121
ข6 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ <i>iso</i> -butanol	121
ข7 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ <i>sec</i> -butanol	122
ข8 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ <i>tert</i> -butanol	122

การผลิตและศึกษาเอนไซม์ดัลโคชินสกลายพันธุ์หลายตำแหน่งในบริเวณจับซับสเตรท

Production and Characterization of Dalcochinase Mutants Containing Multiple Mutations in the Substrate Binding Site

คำนำ

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (EC.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคซิล ไฮโดรเลส แฟมิลี 1 และ 3 (Toonkool *et al.*, 2003) มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก ที่เชื่อมสารประกอบระหว่างหมู่ไกลโคโคนกับหมู่อะไกลโคโคน พบได้ทั่วไปทั้งในคน พืช สัตว์ รา และ แบคทีเรีย โดยเอนไซม์ที่มาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกัน จะมีความจำเพาะต่อซับสเตรทที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ดัลโคชินส (dalcochinase) จากเมล็ดพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre หรือ Thai rosewood) จะมีความจำเพาะต่อซับสเตรทที่เป็นไอโซฟลาโวนอยด์เบต้า-กลูโคไซด์ (isoflavonoid β -glucoside) เอนไซม์คูรีเนส (dhurrinase) จากข้าวฟ่าง มีความจำเพาะต่อซับสเตรท คูรีน (dhurrin) เอนไซม์ลินามาราส (linamarase) จากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz หรือ cassava) จะมีความจำเพาะต่อซับสเตรทไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์ (cyanogenic β -glucoside) (Svasti *et al.*, 2003) และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากอัลมอนด์มีความจำเพาะต่อซับสเตรท อะมิกดาลิน (amygdalin) (Esen, 1993) ดังนั้นเอนไซม์จึงมีหน้าที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ซับสเตรทของเอนไซม์ เช่น ในพืช เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ ควบคุมการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม การสร้างลิกนิน การย่อยสลาย เซลโลไบโอส และระบบป้องกันตัวเองจากสัตว์กัดแทะ (Toonkool *et al.*, 2006)

เมื่อทำการเปรียบเทียบเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส 2 ชนิด คือ เอนไซม์ดัลโคชินสและ เอนไซม์ลินามาราส พบว่า เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความสามารถในการทำงานแตกต่างกัน กล่าวคือ ในการสลายซับสเตรท เอนไซม์ 2 ชนิดนี้ มีความสามารถในการสลายซับสเตรท *pNP-Glc* (*para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside) ซึ่งเป็น ซับสเตรททางการค้าได้เหมือนกัน เอนไซม์ดัลโคชินสมีความสามารถในการสลายซับสเตรท ดัลโคชินินเบต้า-กลูโคไซด์ (dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside, Dal-Glc) ซึ่งเป็นซับสเตรท ธรรมชาติของเอนไซม์ดัลโคชินส แต่ไม่สามารถสลายซับสเตรทลินามาริน (linamarin) ซึ่งเป็น ซับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาราสได้ และในทำนองเดียวกัน เอนไซม์ลินามาราสซึ่ง

สามารถสลายสับสเตรทลินามาริน แต่ไม่สามารถสลายสับสเตรท Dal-Glc ได้ นอกจากนี้ เอนไซม์ คัลโคซิเนส ยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย โดยเปลี่ยนกลูโคสอิสระให้กลับมาเป็นไดแซคคาไรด์ หรือ ไตรแซคคาไรด์ได้ดี (Svasti *et al.*, 2003) และยังสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์ alkyl glucoside โดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้ดี และใช้แอลกอฮอล์ชนิดทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้เลย (Lirdprapamonkol *et al.*, 2000) ในทางตรงกันข้าม เอนไซม์ลินามาเรสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายได้น้อยมาก แต่เอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพสูงในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส โดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิและทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้ดี และลักษณะพิเศษของเอนไซม์นี้คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส โดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้ ซึ่งนักวิจัยไม่พบคุณสมบัตินี้ในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Svasti *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่า กรดอะมิโนที่แตกต่างกันเป็นสาเหตุทำให้การทำงานของเอนไซม์ต่างกัน จึงจะทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ เพื่อที่จะระบุว่าการดัดแปลงตำแหน่งใดเป็นสาเหตุให้เกิดความแตกต่างนี้

จากงานวิจัยของนางสาวชมพูนุท พรเจริญพ นางสาวเพ็ญพร สุจิตนารัตน์ และนางสาวอมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม ได้ทำการแทนที่กรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนส ในบริเวณจับสับสเตรท ให้เหมือนกับกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส โดยวิธีการกลายพันธุ์ของยีนคัลโคซิเนสที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed mutagenesis) ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง ดังนี้ I185A, N189F, M195V, H253F, V255F, N323Q, G367S, K402Y, A454N และ E455I พบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 10 ตำแหน่ง มีผลในการลดความจำเพาะต่อ Dal-Glc ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติ ในระดับที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการปรับปรุงปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิสายยาว เป็นตัวรับกลูโคสได้ดีขึ้น คือ I185A, N189F และ V255F และใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้ดีขึ้น คือ I185A และ V255F (เพ็ญพร, 2549; ชมพูนุท, 2550; ออมรรัตน์, 2550) ดังนั้นตำแหน่ง I185A, N189F และ V255F จึงถูกเลือกเพื่อทำการกลายพันธุ์แบบ 2 และ 3 ตำแหน่ง (double mutation and triple mutation) คือ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาอันตรกิริยาของกรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่ง ในการทำงานร่วมกัน ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทและการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

วัตถุประสงค์

1. สร้างเอนไซม์คัตโคซิเนสกลายพันธุ์ 4 ชนิด คือ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F โดยการแทนที่กรดอะมิโนของเอนไซม์คัตโคซิเนสด้วยกรดอะมิโนตำแหน่งเดียวกับที่พบในเอนไซม์ลินามาเรส

2. ศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ (K_m , V_{max} และ k_{cat}) ของเอนไซม์คัตโคซิเนสกลายพันธุ์ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัตโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์ลินามาเรส ในการสลายสับสเตรท *p*NP-Glc, Dal-Glc และ ลินามาริน

3. ศึกษาคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์คัตโคซิเนสกลายพันธุ์ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัตโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์ลินามาเรส โดยใช้แอลกอฮอล์ methanol, ethanol, *n*-propanol, *n*-butanol และ *iso*-butanol ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ *iso*-propanol และ *sec*-butanol ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ชนิดทุติยภูมิ และแอลกอฮอล์ *tert*-butanol ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิ เป็นตัวรับกลูโคส

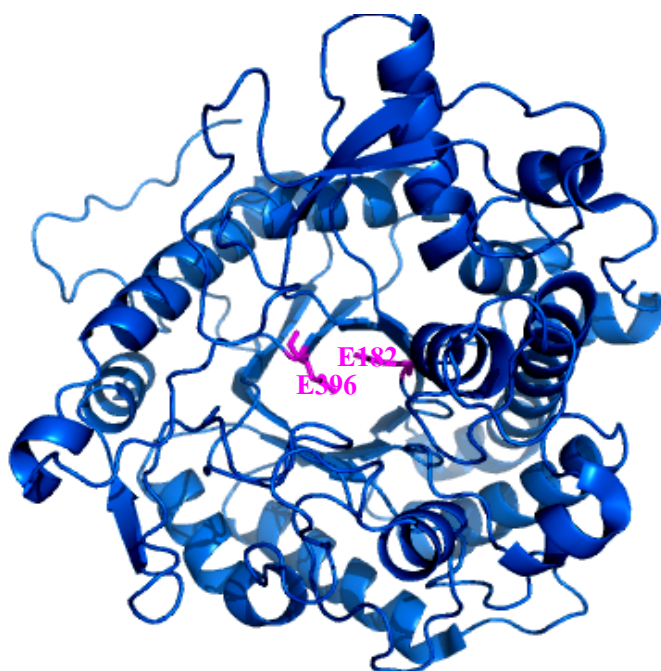
การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคซิล ไฮโดรเลส (glycosyl hydrolase) แฟมิลี 1 และ 3 (Toonkool *et al.*, 2003) ส่วนใหญ่มีขนาด 55-65 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 5-6 มีสารประกอบเบต้า-กลูโคไซด์เป็นสับสเตรท เช่น ไอโซฟลาโวนอยด์เบต้า-กลูโคไซด์ (isoflavonoid β -glucoside) ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์ (cyanogenic- β -glucoside) ฟีนอลิกเบต้า-กลูโคไซด์ (phenolic- β -glucoside) และไทโอเบต้า-กลูโคไซด์ (thio- β -glucoside) เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก ที่เชื่อมสารประกอบระหว่างหมู่ไกลโคโคนกับหมู่อะไกลโคโคน หรือน้ำตาลอื่นๆ (Esen, 1993) พบได้ทั่วไปทั้งในคน พืช สัตว์ รา และแบคทีเรีย เอนไซม์ที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะต่อส่วนไกลโคโคนคล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันในความจำเพาะต่อส่วนอะไกลโคโคน เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่แตกต่างกัน (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000) ดังนั้นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสามารถทำหน้าที่ทางชีวภาพที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท ในมนุษย์เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลูโคเซอริโบซิเดส (glucocerebrosidase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายกลูโคซิลเซอรามีด์ (glucosylceramide) ในไลโซโซม ถ้าขาดเอนไซม์นี้จะทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมที่ชื่อว่า โกเชร์ (Gaucher's disease) ในพืช เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส มีหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการที่สำคัญหลายกระบวนการ เช่น การควบคุมการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม การสร้างลิกนิน การย่อยสลายเซลโลไบโอส และระบบป้องกันตัวเองจากศัตรูและแมลง (Toonkool *et al.*, 2006)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส บางชนิด สามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากอัลมอนด์ (almond emulsin) เอนไซม์อะมิกดาลิน ไฮโดรเลส (amygdalin hydrolase) และเอนไซม์พรุนาซิน ไฮโดรเลส (prunasin hydrolase) สามารถสลายสับสเตรทได้ทั้งที่เป็น เบต้า-ดี-กลูโคไซด์และ เบต้า-ดี-กาแลกโตไซด์ สำหรับเอนไซม์ลินามาเรส และเอนไซม์คัลโคซิเนส สามารถสลายสับสเตรทได้ทั้งที่เป็น เบต้า-ดี-กลูโคไซด์และ เบต้า-ดี-ฟิวโคไซด์ และจากการทำ chemical modification ของเอนไซม์คัลโคซิเนส โดยใช้คอนดูไรทอล บี อีพอกไซด์ (conduritol B epoxide) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คัลโคซิเนส มีบริเวณเร่งเพียงแห่งเดียวที่เร่งการสลายสับสเตรททั้งสองได้ (Surarit *et al.*, 1996)

จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิล ไฮโดรเลส แฟมิลี 1 จากสิ่งมีชีวิต 8 ชนิด พบว่า เอนไซม์ทุกชนิดมีโครงสร้างเป็นแบบ $(\beta/\alpha)_8$ barrel (Toonkool *et al.*, 2006) (ภาพที่ 1) โดยมีกรดอะมิโนกลูตาเมต 2 ตัว ทำหน้าที่เป็น catalytic acid/base กับ catalytic nucleophile ซึ่งอยู่บริเวณปลาย carboxy terminal ของ β strand ที่ 4 และ 7 ตามลำดับ (Opassiri *et al.*, 2003) โดยกรดอะมิโนกลูตาเมตที่ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst จะพบในบริเวณอนุรักษ์ TFNEP และกรดอะมิโนกลูตาเมตที่ทำหน้าที่เป็น catalytic nucleophile มักถูกพบใน conserve sequence I/VTENG (Opassiri *et al.*, 2003)



ภาพที่ 1 โครงสร้าง $(\beta/\alpha)_8$ barrel ของเอนไซม์คัลโคซิเนส ที่ได้จากการทำ modeling โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก white clover (1CBG) เป็นต้นแบบ

ที่มา: Swissmodel (2007)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสบางชนิด สามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ด้วยปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) (Surarit *et al.*, 1995) และสามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) ได้ผลิตเป็นอัลคิลกลูโคไซด์ โดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ เป็นตัวรับกลูโคส และใช้สารพาราไนโตรฟีนิลเบต้า-กลูโคไซด์ (*para*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *pNP*-Glc) และพาราไนโตรฟีนิลเบต้า-ฟิวโคไซด์ (*para*-nitrophenyl- β -D-fucopyranoside, *pNP*-Fic) เป็นตัวให้กลูโคสได้ดี (Svasti *et al.*, 2003) จากความสามารถของ

เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาเหล่านี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การสังเคราะห์ โอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยปฏิกิริยาย้อนการสลาย มีประโยชน์สำหรับการพัฒนา ยา เช่น แลคตูโลส (lactulose) เป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ ที่ใช้เป็นยารักษาโรคท้องผูกเรื้อรัง (Boons, 1996) นอกจากนี้โอลิโกแซคคาไรด์บางชนิดยังช่วยในการทำงานของระบบทางเดินอาหารและ เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในรูปของสารพรีไบโอติก (Prebiotic) ช่วยป้องกันโรค ท้องร่วง เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ และ โซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (wikipedia, 2009) นอกจากการนำไปใช้เป็นยาและอาหารเสริมแล้ว ยังมีการนำโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้มาใช้ในการอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารให้ความหวานที่มี แคลอรีต่ำ โดยเป็นองค์ประกอบของอาหารต่าง ๆ เช่น ลูกก๊ี้ น้ำอัดลม ซีเรียล และ ลูกกวาด สำหรับอัลคิลกลูโคไซด์ที่ได้จากปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส จะมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารลด แรงตึงผิวชนิดใหม่ ประเภทปราศจากประจุ (nonionic surfactants) เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ ง่ายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ และมีความอ่อนโยนต่อผิวหนังถึงแม้จะใช้ในปริมาณมากหรือใช้เป็น ประจำ สารลดแรงตึงผิวนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์ ล้างภาชนะสำหรับเด็ก ครีมนวดผม สบู่ ผงซักฟอก น้ำยาปรับผ้านุ่ม กาว หมึก สี ยาระบาย ยาฆ่า วัชพืช และยาฆ่าแมลง เป็นต้น (Sarney and vulfson, 1995)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืช

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืช ถูกจัดอยู่ในแฟมิลี 1 ของไกลโคซิล ไฮโดรเลส มีบทบาท ในการควบคุมกระบวนการทำงานของไฟโตฮอร์โมน (phytohormone-conjugated glucosides) ช่วย ในการป้องกันการรุกรานจากสัตว์กินพืช รวมทั้งรา โดยการย่อยสลายกลูโคไซด์เพื่อให้ได้ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษ เช่น HCN, saponin, coumarins, rotenoid และ quinones เป็นต้น เอนไซม์เบต้า- กลูโคซิเดสยังมีหน้าที่ในกระบวนการ recycling โอลิโกแซคคาไรด์จากผนังเซลล์ในระหว่าง กระบวนการงอกของข้าว และบางชนิดมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ผลิตผล ธรรมชาติที่มีสารตั้งต้นเป็นกลูโคไซด์ (Opassiri *et al.*, 2003) นอกจากนั้นจากการศึกษาการ แพร่กระจายกลิ่นในดอกกลีดิ นักวิจัยพบว่า ในเนื้อเยื่อดอกไม้มีสารประกอบมากมายที่ระเหยได้ แต่พบอยู่ในรูปของสารที่ไม่ระเหย (non-volatile) ที่ติดอยู่กับน้ำตาล แต่เมื่อหุมน้ำตาลถูกตัดออก โดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ทำให้สารประกอบเหล่านี้สามารถหลั่งออกมาได้ ซึ่งกิจกรรมของ เอนไซม์นี้จะสัมพันธ์กับปริมาณความหอมที่ผลิตขึ้น โดยถ้ายับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า- กลูโคซิเดสด้วยสาร gluconic acid lactone จะทำให้การแพร่กลิ่นจากดอกกลีดิลดลง (Reuveni *et al.*, 1999) จากบทบาทที่สำคัญเหล่านี้ ทำให้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืช เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่

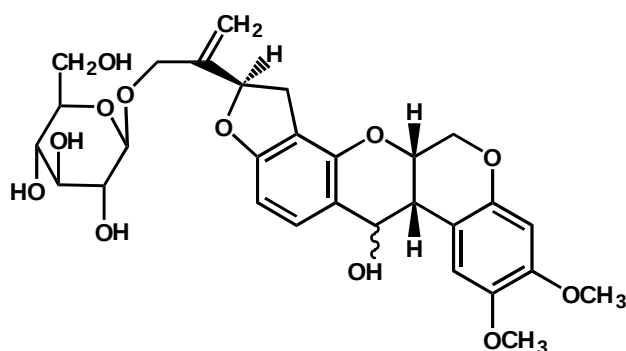
นำศึกษาเป็นอย่างมาก จึงได้มีความพยายามในการคัดกรองหาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืชหลากหลายชนิด และศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเอนไซม์นี้ต่อไป และจากการตรวจหาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากเมล็ดพืชไทยจำนวน 50 สายพันธุ์ จาก 17 ตระกูล พบว่า เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ได้จากเมล็ดพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre หรือ Thai rosewood) มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด (Surrit *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ได้มีการโคลนยีนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวที่กำลังงอก (*Oryza sativa* L.cv.) คือ *bglu1* และ *bglu2* โดยให้มีการแสดงออกของโปรตีนใน *Escherichia coli* พบว่าใน *bglu1* โปรตีนที่ถูกผลิตออกมาอยู่ในรูปของ active form สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลาย *pNP-Glc* ได้ดี พืชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิ 15-35°C มีขนาดประมาณ 66 กิโลดาลตัน สามารถสลายสับสเตรทธรรมชาติได้หลายชนิด แต่มีกิจกรรมค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ *pNP-Glc* นอกจากนี้ ยังสามารถสลายสับสเตรทที่เป็นสารประกอบไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์ได้ เช่น พรุนาซิน จาก *Prunus serotina* อะมิกดริน จากอัลมอนด์ และคูริน จากข้าวฟ่าง (*sorghum*) แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถสลายสับสเตรทลินามาริน จากมันสำปะหลังได้ (Opassiri *et al.*, 2003)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดพะยูน

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ดัลโคซินเนส (dalcochinase) มีน้ำหนักโมเลกุล 330 กิโลดาลตัน ในสภาพธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4-6 หน่วย แต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน (Srisomsap *et al.*, 1996) มี Dal-Glc ซึ่งเป็นสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์เบต้า-กลูโคไซด์ เป็นสับสเตรทธรรมชาติ โดยส่วนอะไกลโคนของ Dal-Glc เป็นสารประเภท 12-dihydroamorphigenin และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 574 (ภาพที่ 2) เนื่องจากโครงสร้างส่วนอะไกลโคนของ Dal-Glc คล้ายกับสารโรทีโนน (rotenone) ซึ่งเป็นสารพิษที่ใช้เป็นยาฆ่าแมลง จึงคาดว่าหมู่อะไกลโคนของ Dal-Glc มีบทบาทสำคัญในพืชสำหรับการป้องกันสัตว์ที่มากัดแทะเมล็ด (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000) เอนไซม์ดัลโคซินเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทสังเคราะห์ได้ทั้ง *pNP-Glc* และ *pNP-Fuc* (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000) โดยมีบริเวณเร่งเพียงบริเวณเดียว (Surarit *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทสังเคราะห์ตัวอื่นๆ ได้เล็กน้อย เปรียบเทียบจากการให้กิจกรรมของเอนไซม์ในการสลาย *pNP-Glc* เป็น 100 % เช่น เบต้า-กาแลกโตไซด์ (8.95%) เบต้า-ไซโลไซด์ (3.91%) และเบต้า-อะราบิโนไซด์ (4.89%) แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์นี้ไม่สามารถสลายสับสเตรทธรรมชาติทางการค้าได้

เช่น ไชยานิโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์ พรุณาซิน และอะมิกดารีนิ ซึ่งจากการศึกษาทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ดัลโคซิเนส พบว่าค่า K_m ในการสลาย *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc เท่ากับ 5.4 mM และ 0.54 mM ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่า K_m ในการสลาย *p*NP-Glc สูงกว่า *p*NP-Fuc 10 เท่า ในขณะที่ค่า V_{max} ในการสลาย *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc เท่ากับ 50 $\mu\text{mol/mg protein/min}$ และ 21 $\mu\text{mol/mg protein/min}$ ตามลำดับ ดังนั้นค่า V_{max} ของ *p*NP-Glc จะเป็น 2 เท่าของ *p*NP-Fuc ทำให้อัตราส่วนระหว่าง V_{max}/K_m สำหรับ *p*NP-Fuc จะสูงกว่า *p*NP-Glc 5 เท่า (Surarit *et al.*, 1996) สำหรับค่า k_{cat} ในการสลาย *p*NP-Glc (307 sec^{-1}) สูงกว่าการสลาย *p*NP-Fuc (151 sec^{-1}) 2 เท่า ดังนั้นอัตราส่วนระหว่าง k_{cat}/K_m ของการสลาย *p*NP-Fuc ($283,100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) สูงกว่าการสลาย *p*NP-Glc ($57,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) ส่วนค่า K_m ในการสลาย Dal-Glc เท่ากับ 1.68 mM แสดงให้เห็นว่ามีค่าอยู่ระหว่างค่า K_m ในการสลาย *p*NP-Glc (5.37 mM) และ *p*NP-Fuc (0.54 mM) (Savasti *et al.*, 1999) นอกจากนี้ ดัลโคซิเนสยังเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรค่อนข้างสูง สามารถเก็บไว้ได้นานในรูปของ lyophilized form หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยเก็บไม่มีการสูญเสียกิจกรรมเลยเป็นเวลานานกว่า 6 เดือน (วิชณสูตร และคณะ, 2538)



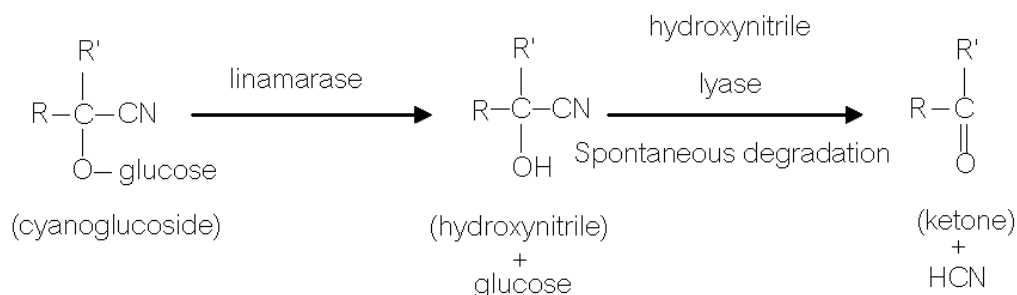
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารดัลโคซินิโนเบต้า-กลูโคไซด์

ที่มา: Svasti *et al.* (1999)

จากการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์คัลโคซิเนส พบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนส ประกอบด้วยกรดอะมิโน 547 ตัว ประกอบด้วย ส่วนที่เป็น propeptide 23 ตัว และส่วนที่เป็น mature protein 524 ตัว โดยส่วน mature protein ของเอนไซม์คัลโคซิเนสมีความเหมือนกับเอนไซม์ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดส จาก white clover ถึง 60% จึงคาดว่าเอนไซม์คัลโคซิเนส มีโครงสร้างเป็นแบบ $(\beta/\alpha)_8$ barrel คล้ายกับเอนไซม์ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดส จาก white clover (1CBG) (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000) ซึ่งได้มีการตรวจโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไว้ก่อนหน้านี้ (Barrett *et al.*, 1995) และจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของคัลโคซิเนส กับ เบต้า-กลูโคซิเดสชนิดอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนในกลูตามาตเป็นตำแหน่งอนุรักษ์ โดยกรดอะมิโนในกลูตามาตที่ตำแหน่ง 182 เป็นตำแหน่ง catalytic acid/base และกรดอะมิโนในกลูตามาตที่ตำแหน่ง 396 เป็นตำแหน่ง catalytic nucleophile (Ketudat-Cairns *et al.*, 2000)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง หรือเรียกอีกชื่อว่า ลินามาเรส (linamarase) เป็นเอนไซม์จำพวกไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคซิเดส (cyanogenic β -glucosidase) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายสารไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์ 2 ชนิด คือ ลินามาริน (linamarin) และ โลตัสตาลิน (lotaustralin) (Keresztessy *et al.*, 1994) ซึ่งปกติ 95% ของไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์ ในมันสำปะหลังเป็นลินามาริน (Keresztessy *et al.*, 2001) และยังพบว่าเอนไซม์ลินามาเรสและสับสเตรทจะแยกกันอยู่คนละส่วนภายในเซลล์ ดังนั้นปฏิกิริยาการสลายจะเกิดขึ้นเมื่อเนื้อเยื่อถูกทำลาย การสลายสารทั้ง 2 ตัวนี้ จะให้ผลิตภัณฑ์ คือกลูโคส และไฮดรอกซีไนไตรล์ (hydroxynitrile) จากนั้นจะมีเอนไซม์ไฮดรอกซีไนไตรล์ ไลเอส (hydroxynitrile lyase) มาสลายไฮดรอกซีไนไตรล์ ให้เป็น คีโตน และกรดไฮโดรไซยานิก (HCN) (ภาพที่ 3) ซึ่งกรดไฮโดรไซยานิกที่ถูกปลดปล่อยออกมานั้นจะเป็นสารพิษ คาดว่ากระบวนการดังกล่าวนี้จะเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันศัตรูพืชที่มากัดแทะได้ (Esen, 1993)



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการสลายไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์; $\text{R} = \text{CH}_3$; $\text{R}' = \text{CH}_3$ ลินามาริน; $\text{R} = \text{CH}_3$; $\text{R}' = \text{C}_2\text{H}_5$ โลตัสตราลิน; ลินามารส = ไซยาโนจีนิกเบต้า-กลูโคไซด์

ที่มา: Esen (1993)

จากการศึกษาโดยการแยกเอนไซม์ลินามารสจาก ลำต้น ก้านใบ และเปลือกกราก ของ มันสำปะหลัง โดยใช้การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ตามด้วย column chromatography sepharose 6B และ chromatofocusing พบว่า เอนไซม์ลินามารสที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ เหล่านี้มีลักษณะเป็น homopolymer โดยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63 กิโลดาลตัน จากการศึกษาของ Yeoh ในปี 1989 พบว่า เอนไซม์ลินามารสที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลัง สามารถสลายสับสเตรท *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc ที่เป็น *p*NP- β -monoglucoside และ ลินามาริน ที่เป็น cyanogenic- β -monoglucoside ได้ดี โดยมีค่า K_m ของการสลาย *p*NP-Glc และ *p*NP-Fuc อยู่ในช่วง 0.26 ± 0.02 ถึง 0.42 ± 0.02 mM และพบว่า ค่า K_m ในการสลายลินามาริน ของเอนไซม์ลินามารสจากใบ มีค่าค่อนข้างต่ำ ($K_m = 2.08 \pm 0.15$ mM) เมื่อเปรียบเทียบกับสับสเตรท salicin ($K_m = 3.56 \pm 0.38$ mM) และ prunasin ($K_m = 12.22 \pm 1.40$ mM) นอกจากนี้เอนไซม์ที่แยกได้จากเปลือกกราก พบว่า มีค่า K_m ในการสลายลินามาริน เท่ากับ 0.57 mM ซึ่งค่า K_m ที่ได้ต่ำกว่าการใช้เอนไซม์ลินามารสจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น เอนไซม์ที่ได้จาก *Fusarium oxysporum* มีค่า K_m ของการสลายลินามารินเท่ากับ 2.4 mM (Yeoh and Loh, 1995) แต่ในทางตรงข้าม เอนไซม์ลินามารสนี้ไม่สามารถสลายสับสเตรท *p*NP- β -D-maltoside อะมิกดาริน และเซลโลไบโอส ที่เป็นสารประกอบพวก *p*NP- β -diglycoside cyanogenic- β -diglucoside และสารประกอบ disaccharide ตามลำดับได้ จากการศึกษาต่อมาทำให้ทราบว่า สารประกอบ monoglucoside จะไม่สามารถถูกขนส่งเข้าไปภายในเซลล์ได้เนื่องจากจะถูกสลายด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่อยู่บริเวณเมมเบรน ดังนั้นจึงทำให้พืชต้องขนส่งน้ำตาลในรูปสารประกอบ diglucoside เพื่อป้องกันการถูกสลายด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (Esen, 1993)

นอกจากจะพบเอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลังแล้ว ยังพบในพืชชนิดอื่นๆ เช่น white clover, lima bean และยางพารา ซึ่งในพืชเหล่านี้จะมีกระบวนการ cyanogenesis เหมือนกับในมันสำปะหลัง นอกจากนี้ในพืชและราบางสายพันธุ์แล้ว ก็ยังมีการแยกเอนไซม์ลินามาเรสได้จาก yeast เช่น *zygosaccharomyces* ซึ่งสามารถสลายสับสเตรทได้ทั้ง cyanogenic- β -monoglucoside และ cyanogenic- β -diglucoside (Brimer *et al.*, 1998)

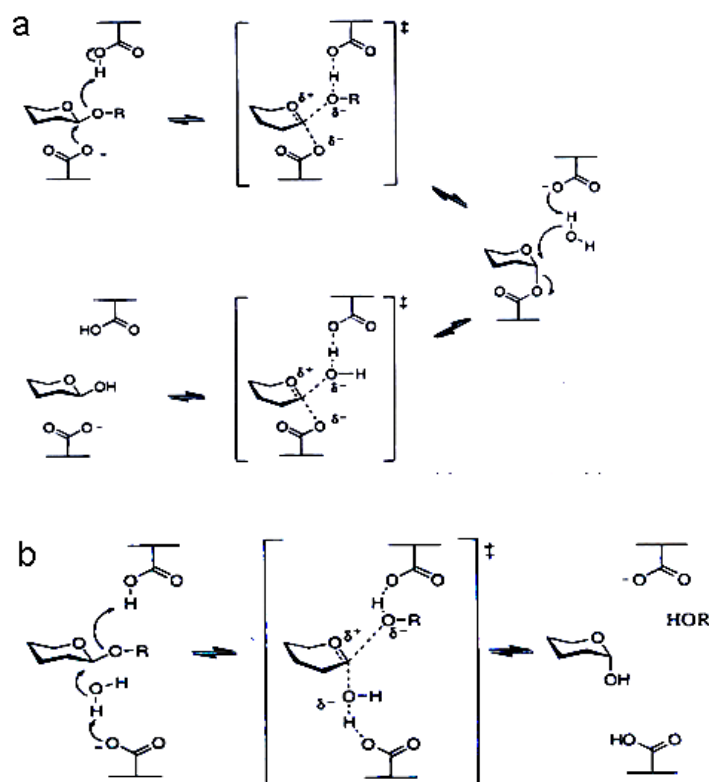
กลไกการเร่งปฏิกิริยาการสลายของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดิก สามารถเกิดกลไกการสลายที่แตกต่างกันได้ 2 รูปแบบ คือ แบบ retention หรือ แบบ inversion (ภาพที่ 4) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส family 1 ทุกตัว ซึ่งรวมถึงเอนไซม์อัลโลอินเนสและเอนไซม์ลินามาเรส มีลักษณะเป็น retaining enzyme โดยมีการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทโดยผ่านกลไก double-displacement (Zechel and Withers, 2000)

การเร่งปฏิกิริยาแบบ retention นั้น (ภาพที่ 4a) จะมีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ ซึ่งอยู่ห่างกันประมาณ 5.5 Å ในขั้นแรก หมู่คาร์บอกซิล 1 ตัว จะทำหน้าที่เป็น acid catalyst ให้โปรตอนแก่ glycosidic oxygen พร้อมกับสลายพันธะไกลโคซิดิก ส่วนหมู่คาร์บอกซิลอีกตัวจะทำหน้าที่เป็น nucleophile เกิด nucleophilic attack ที่ C1 ของหมู่น้ำตาล สร้างพันธะ covalent ได้เป็น glycosyl-enzyme intermediate ซึ่งขั้นตอนนี้เรียกว่า ขั้นไกลโคซิเลชัน (glycosylation) และต่อมาในขั้นที่สอง ซึ่งเรียกว่าขั้นดีไกลโคซิเลชัน (deglycosylation) โดยโมเลกุลของน้ำเข้ามาทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลตัวที่ 1 ที่สูญเสียโปรตอน ในขั้นนี้จะทำหน้าที่เป็น base catalyst ดึงโปรตอนออกจากริเวณออกซิเจนของน้ำจะทำหน้าที่โจมตี anomeric center ของน้ำตาลกลูโคส ทำให้ได้น้ำตาลหลุดออกมา ซึ่งทั้ง 2 ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นโดยผ่าน transition state ที่มีลักษณะคล้ายออกโซคาร์บีนียมไอออน (oxocarbenium ion-like transition state) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีโครงสร้าง anomeric center ของน้ำตาลกลูโคสเหมือนกับสับสเตรท (Zechel and Withers, 2000)

การเร่งปฏิกิริยาในกลุ่มของ inverting glycosidase (ภาพที่ 4b) จะพบว่าไม่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น acid และ base catalyst โดยทั้ง 2 หมู่ จะอยู่ห่างกันประมาณ 10.5 Å โดยโมเลกุลของสับสเตรท และน้ำ จะเข้าจับระหว่างหมู่คาร์บอกซิลทั้ง 2 พร้อมกัน และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเกิดโดยผ่านกลไก single-displacement และเกิด transition state ที่มีลักษณะคล้าย

ออกโซคาร์บีนียม ไอออน (oxocarbenium ion-like transition state) โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมี โครงสร้าง anomeric center ไม่เหมือนกับสับสเตรท (Zechel and Withers, 2000)



ภาพที่ 4 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส: (a) retaining (b) inverting

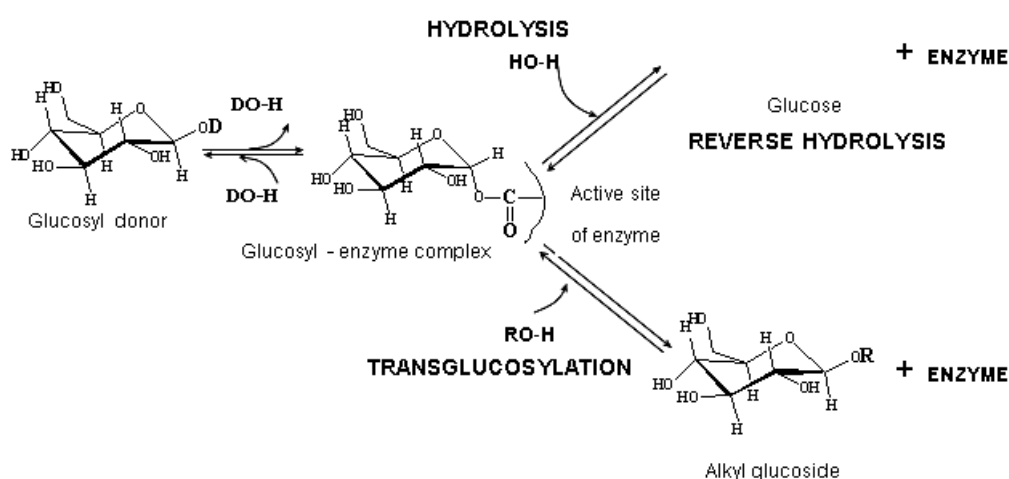
ที่มา: Zechel and Withers (2000)

ปฏิกิริยาย้อนการสลาย และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

โดยปกติ เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์และ เบต้า-กลูโคไซด์ แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งอาจจะเป็นสภาวะที่มีความเข้มข้นของ monosaccharide สูง (เช่น 60-85% w/v) อุณหภูมิสูง มีกิจกรรมของน้ำต่ำ (water activity) และความเข้มข้นของเอนไซม์สูง ก็จะสามารถทำให้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายได้ โดยเกิดการสร้างพันธะระหว่างกลูโคสอิสระได้เป็น ไดแซคคาไรด์, ไตรแซคคาไรด์หรือโอลิโกแซคคาไรด์ ได้ (ภาพที่ 5)

จากการศึกษาปฏิกิริยาของการสลายโดยใช้เอนไซม์คัลโคซิเนส พบว่า สามารถสังเคราะห์ โอลิโกแซคคาไรด์ ได้ประสิทธิภาพสูง จากการใช้กลูโคสอิสระที่ 40%-70% (w/w) เป็นสับสเตรท และ pH ที่เหมาะสมคือ 5.0 และอุณหภูมิ 60-65 °C โดยได้ผลิตภัณฑ์ทั้งหมดประมาณ 30% หลังจากทำปฏิกิริยา 20 วัน ซึ่ง 25% เป็นไดแซคคาไรด์ และอีก 5% เป็นไตรแซคคาไรด์ (Srisomsap *et al.*, 1999) แต่ในทางตรงข้าม ถ้าใช้เอนไซม์ลินามาเรส ในการทำปฏิกิริยาของการสลาย โดยใช้ กลูโคสเป็นสับสเตรท พบว่า สามารถสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์ได้น้อยกว่า 5% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ลินามาเรสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของการสลายได้น้อยมาก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ก็จะสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของการสลายต่างกัน (Toonkool, 2003)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส นอกจากจะสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาของการสลายได้แล้ว ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ โดยการย้ายหมู่กลูโคสจากตัวให้ เช่น *p*NP-Glc ไปยังตัวรับ เช่น แอลกอฮอล์ (ภาพที่ 5) ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ สารพวก alkyl glucoside ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้เป็นสาร biodegradable detergent ได้ (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000)



ภาพที่ 5 การเกิดปฏิกิริยาของการสลาย และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์
เบต้า-กลูโคซิเดส D คือ หมู่อะไคโคน หรือ หมู่น้ำตาล; R คือ แอลกอฮอล์

ที่มา: Svasti *et al.* (2000)

จากการศึกษาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์ดัลโคซิเนสจากพะยูน พบว่าเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้เป็น alkyl glucoside โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้ดี และสามารถใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้ ดังนั้นมันจึงไม่สามารถสังเคราะห์ tertiary alkyl glucoside ได้ (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000) แต่อย่างไรก็ยังพบว่า เอนไซม์ดัลโคซิเนสจากพะยูนสามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้เป็น alkyl glucoside สูงกว่าการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดอัลมอนต์ กับแอลกอฮอล์ทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ

จากการศึกษาโดย Svasti และคณะ ในปี 2003 พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส พบว่า เอนไซม์ลินามาเรส มีความสามารถในการย้ายหมู่กลูโคส จาก *p*NP-Glc ไปยังแอลกอฮอล์ชนิดทุติยภูมิ เป็นตัวรับได้มากกว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ และนอกจากนี้เอนไซม์ลินามาเรสยังมีความสามารถพิเศษเฉพาะในการสังเคราะห์ C4, C5 และ C6 tertiary alkyl glucoside โดยได้ผลผลิตเท่ากับ 94% 82% และ 56% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ซึ่งไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับได้ (Svasti *et al.*, 2003)

การศึกษาโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์โดยใช้การกลายพันธุ์

การศึกษาโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสโดยใช้การกลายพันธุ์ มีอย่างกว้างขวาง ทั้งเอนไซม์ที่ได้จากพืช คน และแบคทีเรีย เพื่อระบุหน้าที่จำเพาะของกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ และนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาคุณภาพของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เช่น จากการศึกษาถึงความสำคัญของกรดอะมิโนในบริเวณ active site ของเอนไซม์ไฮยาโนจินเบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง โดยใช้เทคนิค site-directed mutagenesis ในการเปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตามัท ที่ตำแหน่ง 413 ไปเป็นกรดอะมิโนไกลซีน พบว่า เอนไซม์ที่ทำการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าว ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนกลูตามัทที่ตำแหน่ง 413 นี้จะเป็นตำแหน่ง catalytic nucleophile และเมื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตามินที่ตำแหน่ง 339 ไปเป็นกรดอะมิโนกลูตามัท พบว่า เอนไซม์ที่ได้ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนกลูตามินที่ตำแหน่ง 339 น่าจะเป็นตำแหน่ง catalytic diad และเมื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนอะลานีนที่ตำแหน่ง 201 ไปเป็นกรดอะมิโนวาเลีน พบว่า การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน

ที่ตำแหน่งนี้ มีผลทำให้ค่า pK_a ของกรดอะมิโนกลูตามัทที่ตำแหน่ง 198 ซึ่งเป็นตำแหน่ง acid/base catalyst เปลี่ยนแปลงจาก 7.22 ไปเป็น 7.44 ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลง hydrophobic environment ของเอนไซม์

นอกจากนี้ นักวิจัยได้ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่ง 269 ไปเป็น กรดอะมิโนแอสพาราจีน พบว่า ค่า K_m ในการสลายลินามารินเพิ่มขึ้นถึง 16 เท่า (16.1 mM) เมื่อเทียบกับ wild-type (1.05 mM) แต่ในการสลาย $pNP-Glc$ ค่า K_m เพิ่มขึ้นเพียง 2.5 เท่า (0.84 mM) เมื่อเทียบกับ wild-type (0.35 mM) แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่ง 269 น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถต่อสับสเตรทที่เป็นลินามารินมากกว่า $pNP-Glc$ (Keresztessy *et al.*, 2001)

การศึกษาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Agrobacterium* sp. พบว่าถ้าทำการแทนที่กรดอะมิโนกลูตามัท ที่ตำแหน่ง 358 ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนจะทำให้ได้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์มีความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้มากกว่า 90% และถ้าทำการแทนที่กรดอะมิโน ในตำแหน่งเดียวกันนี้ ด้วยกรดอะมิโนซีรีน พบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ที่ได้จะมีความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้มากกว่าการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนถึง 24 เท่า (Mayer *et al.*, 2000)

นักวิจัยได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของเอนไซม์คัลโคซิเนส โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน ในตำแหน่งที่คาดว่าจับกับหมู่อะไคโคนของเอนไซม์คัลโคซิเนส ไปเป็นกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง สอดคล้องกันของเอนไซม์ลินามาเรส พบว่า การกลายพันธุ์แบบตำแหน่งเดียว คือ I185A, N189F, M195V, H253F, V255F, N323Q, G367S, K402Y, A454N และ E455I สามารถลดความจำเพาะต่อ Dal-Glc ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์คัลโคซิเนส แต่ไม่สามารถช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ ให้มีความสามารถในการสลายลินามาริน ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาเรส แต่พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, N189F และ V255F ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการย้ายหมู่กลูโคส โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ เป็นตัวรับกลูโคส ส่วน I185A และ V255F สำหรับ แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ เมื่อเทียบกับเอนไซม์คัลโคซิเนสจากธรรมชาติ และเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม (เพ็ญพร, 2549; ชมพูนุท, 2550; อมรัตน์, 2550)

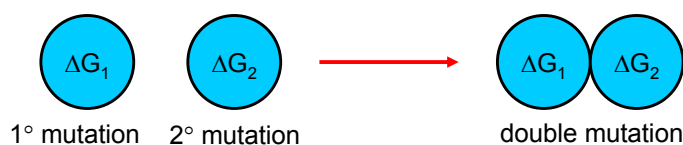
นอกจากการทำกลายพันธุ์โดยวิธี site-directed mutagenesis แล้ว ยังมีการทำการกลายพันธุ์แบบสุ่ม (random mutation) เช่น ในการศึกษาการทำการกลายพันธุ์ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จาก *Paenibacillus polymyxa* เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ให้สามารถทนร้อนได้เพิ่มมากขึ้น

(thermal resistance) โดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จาก *P. polymyxa* มี half-life นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และไม่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ดังนั้นนักวิจัยได้ทำการกลายพันธุ์เอนไซม์นี้โดยใช้วิธีการกลายพันธุ์แบบสุ่ม และหลังจากมีการตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยการหาลำดับเบสแล้ว ก็พบตำแหน่งของการกลายพันธุ์ 6 แบบ ดังนี้คือ E96K, T385A, N411S, M416I, N437K และ N437H ซึ่งพบว่าการกลายพันธุ์แบบ T385A ไม่มีคุณสมบัติการทนร้อนเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ wild-type แต่เมื่อศึกษาค่าทางจลนศาสตร์ พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เพิ่มขึ้น 20 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ wild-type นอกจากนี้ นักวิจัยได้ทำการกลายพันธุ์หลายตำแหน่งพร้อมๆ กัน (multiple mutation) พบว่า สามารถเพิ่มคุณสมบัติในการทนร้อนของเอนไซม์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์สามตำแหน่ง คือ E96K/M416I/N437K มีกิจกรรมจำเพาะลดลงประมาณ 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ wild-type นอกจากนี้การกลายพันธุ์แบบสี่ตำแหน่ง คือ E96K/M416I/N437K/ T385A แสดงให้เห็นว่ามีคุณสมบัติการทนร้อนสูงสุด (50 °C มากกว่า 90 นาที) คล้ายกับการกลายพันธุ์แบบ E96K/M416I/N437K และมีกิจกรรมจำเพาะสูงเหมือนกับการกลายพันธุ์แบบ T385A ดังนั้นลักษณะการกลายพันธุ์เหล่านี้ทำให้เอนไซม์มีคุณสมบัติการทนร้อนเพิ่มขึ้นจากเดิมที่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เลยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ได้นี้มี half-life นาน 12 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (González-Blasco *et al.*, 2000)

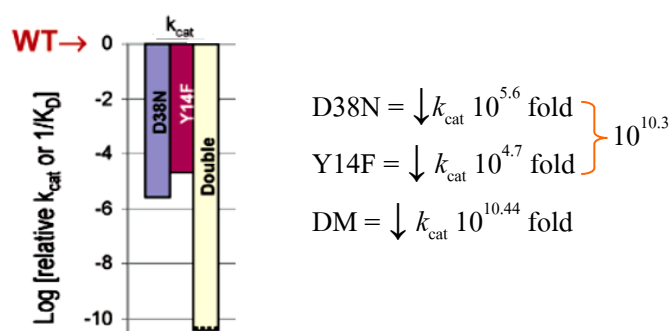
การแปรผลเชิงปริมาณของผลจากการกลายพันธุ์เอนไซม์ 2 ตำแหน่ง (Quantitative interpretations of double mutations of enzymes)

Mildvan *et al* (1992); Mildvan (2004) ได้ทำการศึกษาผลของการสร้างเอนไซม์กลายพันธุ์มากกว่าสองตำแหน่ง และทำการแปรผลเชิงปริมาณ เพื่ออธิบายหน้าที่ของแต่ละตำแหน่ง และอันตรกิริยามีระหว่างกัน โดยผู้วิจัยให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง ที่ 1 ตำแหน่งที่ 2 และ 2 ตำแหน่งร่วมกัน เท่ากับ ΔG_1 , ΔG_2 และ ΔG_{1+2} ตามลำดับ และเปรียบเทียบค่าของ ΔG_{1+2} กับ ค่าของ $\Delta G_1 + \Delta G_2$ ทำให้ผู้วิจัยสามารถแบ่งผลของการกลายพันธุ์ออกเป็น 5 ประเภท ได้แก่

1. Additive effects คือ การกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่ง มีผลเท่ากับการบวกผลของการกลายพันธุ์หนึ่งตำแหน่งเข้าด้วยกัน ($\Delta G_{1+2} = \Delta G_1 + \Delta G_2$) ลักษณะเช่นนี้ เกิดเนื่องจากกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำงานไม่เกิดอันตรกิริยาระหว่างกัน (non-interacting residues) แต่มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน (ภาพที่ 6)



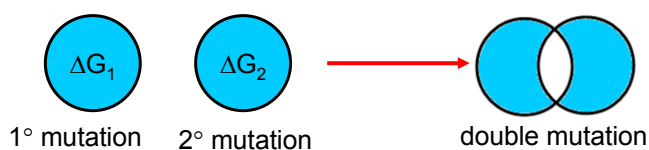
ตัวอย่าง



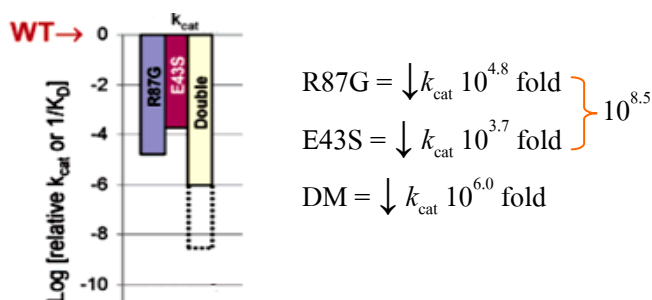
ภาพที่ 6 แผนภาพแสดงผลของการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งแบบ additive effects

ที่มา: Mildvan (2004)

2. Partially additive effects คือ การกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่ง มีผลมากกว่าการเกิดการกลายเพียงตำแหน่งเดียว แต่น้อยกว่าการบวกผลของการกลายพันธุ์หนึ่งตำแหน่งเข้าด้วยกัน ($\Delta G_1 < \Delta G_{1+2} < \Delta G_1 + \Delta G_2$) ลักษณะเช่นนี้ เกิดเนื่องจากกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำงานร่วมกัน (cooperative interaction) ในการเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน (ภาพที่ 7)



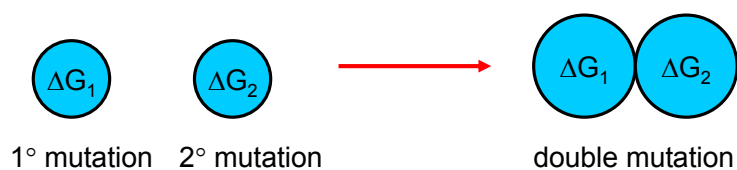
ตัวอย่าง



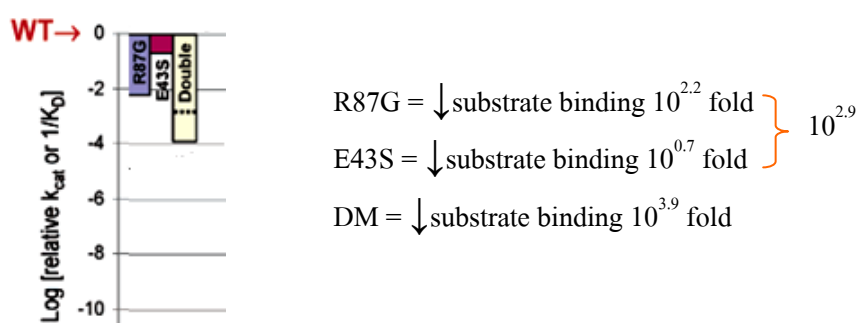
ภาพที่ 7 แผนภาพแสดงผลของการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งแบบ partially additive effects

ที่มา: Mildvan (2004)

3. Synergistic effects คือ การกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่ง มีผลมากกว่าการบวกผลของการกลายพันธุ์หนึ่งตำแหน่งเข้าด้วยกัน ($\Delta G_{1+2} > \Delta G_1 + \Delta G_2$) ลักษณะเช่นนี้ เกิดเนื่องจากกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำงานต้านกัน (anticooperative residues) ในการเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน ดังนั้นเมื่อทำการกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง ทำให้เกิดความเสียหายน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เพราะทำให้ความเค้น (strain) หรือความต้าน (anti-cooperativity) ระหว่างทั้ง 2 ตำแหน่งหายไปด้วย และส่งผลให้อีกตำแหน่งหนึ่งที่เหลืออยู่ทำงานได้ดีขึ้น (ภาพที่ 8)



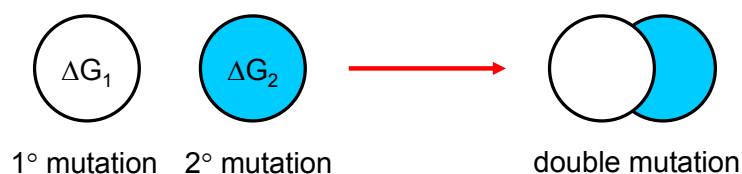
ตัวอย่าง



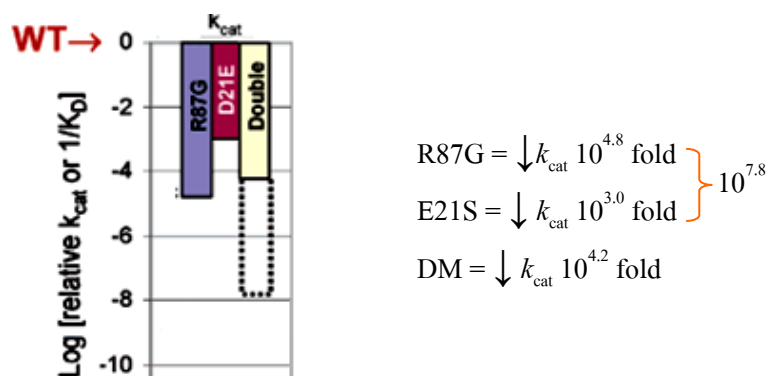
ภาพที่ 8 แผนภาพแสดงผลของการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งแบบ synergistic effects

ที่มา: Mildvan (2004)

4. Antagonistic effects คือ การกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่ง มีผลน้อยกว่าการเกิดการกลายเพียงตำแหน่งเดียว ($\Delta G_{1+2} < \Delta G_1$) ลักษณะเช่นนี้ เกิดเนื่องจากกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำงานให้ผลตรงข้ามกัน (opposing effects) ในการเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน โดยผลของการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ 2 จะหักล้างผลของการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ 1 (ภาพที่ 9)



ตัวอย่าง



ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงผลของการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งแบบ antagonistic effects

ที่มา: Mildvan (2004)

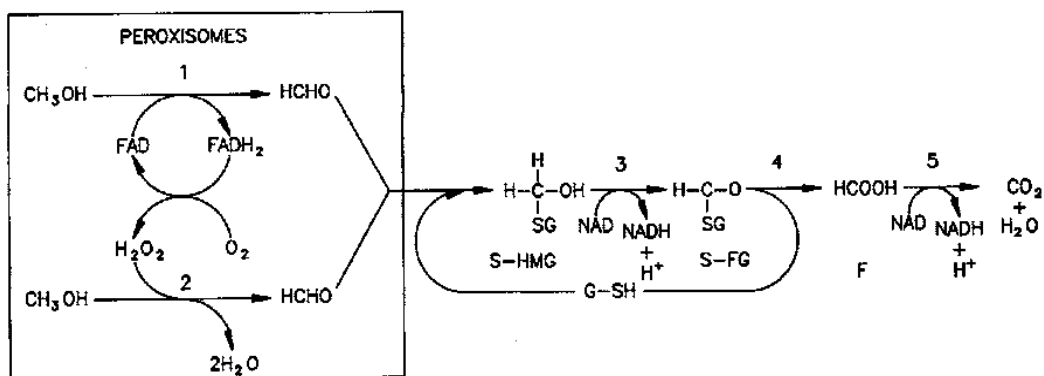
5. No additional effects คือ การกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่ง มีผลเท่ากับการเกิดการกลายเพียงตำแหน่งเดียว ($\Delta G_{1+2} = \Delta G_1$) ลักษณะเช่นนี้ เกิดเนื่องจากในบางกรณีที่เกิดอะมิโนในตำแหน่งที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำงานร่วมกัน (cooperative interaction) หรือทำงานตรงข้ามกัน (opposing effects) ในการเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน แต่ผลของความเสียหายที่เกิดขึ้นไม่สามารถจำแนกเข้ากลุ่มดังกล่าวทั้ง 2 ได้

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *Pichia pastoris*

P. pastoris เป็นยีสอาร์ิโอดชั้นสูง ที่มีข้อดีคือ มีกระบวนการม้วนพับโปรตีน (protein folding) กระบวนการดัดแปลงโปรตีนหลังการสังเคราะห์ ซึ่งคล้ายกับขั้นตอนที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงทั่วไป ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะไม่พบใน *E. coli* นอกจากนี้ *P. pastoris* เลี้ยงง่าย โตเร็ว อาหารเลี้ยงเชื้อราคาไม่แพง และมีการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณสูง (Invitrogen, n.d.) และสามารถนำไปใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้หลายชนิด

P. pastoris เป็นเมธิลโลโทรฟิยีสต์ ซึ่งสามารถเติบโตโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีการเจริญและเพิ่มจำนวนโดยวิธีการแตกหน่อ และมีความต้องการวิตามินไบโอตินเพื่อการเจริญ (Dijken and Harder, 1974) กลไกการสลายเมทานอลเกิดโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเริ่มโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (alcohol oxidase) จะเปลี่ยนเมทานอลไปเป็นฟอร์มาลดีไฮด์โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งปฏิกิริยานี้จะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้น ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ ดังนั้นกลไกการสลายเมทานอลจะเกิดขึ้นภายในเพอรอกซิโซม (peroxisome) เพื่อจะได้กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากเซลล์ได้ง่าย โดยอาศัยเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นออกซิเจนกับน้ำ ส่วนฟอร์มาลดีไฮด์จะออกจากเพอรอกซิโซม ไปอยู่ไซโตพลาสซึมและถูกออกซิไดซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟอร์เมทกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (formaldehyde dehydrogenase) และฟอร์เมท ดีไฮโดรจีเนส (formate dehydrogenase) ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

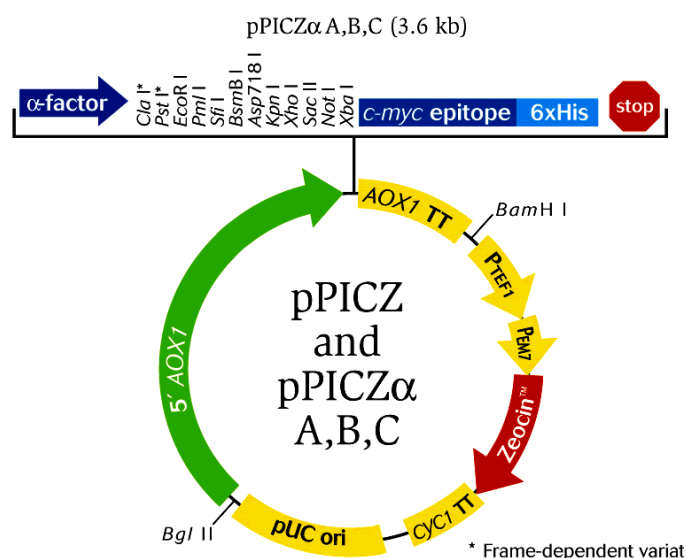
P. pastoris สามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสได้ปริมาณมากเมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล ดังนั้นจึงมีการนำโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส มาใช้ในการควบคุมการผลิตเฮเทอโรกัสโปรตีน ซึ่งมีขึ้นที่เป็รหัสของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส คือ *AOX1* และ *AOX2* ส่วนมากที่พบในเซลล์จะผลิตมาจาก *AOX1* ซึ่งคิดเป็น $\geq 30\%$ โดยการควบคุมการแสดงออกของยีน *AOX1* จะอยู่ในระดับการถอดรหัส (transcription) และเกี่ยวข้องกับ 2 กลไก คือ กลไก repression/depression และกลไกการเหนี่ยวนำ (induction) ดังนั้น ถ้ามีเมทานอลจะชักนำให้เกิดการถอดรหัสของยีน *AOX1* และในทางกลับกันถ้าขาดเมทานอลการถอดรหัสของยีนก็ไม่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงมีการใช้โปรโมเตอร์ *AOX1* มาใช้ในการควบคุมการผลิตโปรตีน (Invitrogen, n.d.)



ภาพที่ 10 กลไกการสลาย methanol ใน *Pichia pastoris* 1: alcohol oxidase; 2: catalase; 3: formaldehyde dehydrogenase; 4: S-formylglutathione-hydrolase; 5: formate dehydrogenase
 ตัวย่อ F: formaldehyde; S-HMG: S-hydroxymethylglutathione; S-FG: S-formalglutathione; G-SH: reduced glutathione; F: formate

ที่มา: Duff and Murray (1990)

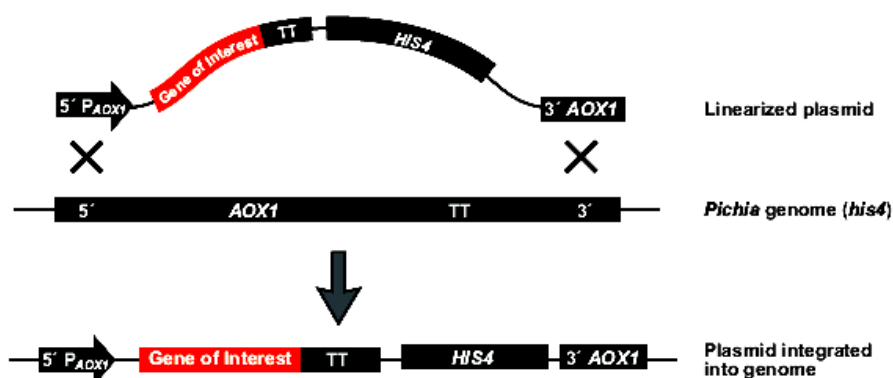
การแสดงออกของโปรตีนใน *P. pastoris* ทำได้โดยการโคลนยีนที่สนใจเข้าสู่เวกเตอร์ pPICZαB ซึ่งเป็น vector ที่ออกแบบมาให้สามารถจำลองตัวเองได้ทั้งใน *E. coli* และ *P. pastoris* (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 พลาสมิด pPICZ α A,B,C ประกอบด้วยจุดเริ่มต้นของกระบวนการจำลองตัว(pUC ori) โปรโมเตอร์สำหรับใช้ในกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนที่สนใจ (5'AOX1) สัญญาณส่งโปรตีนออกสู่เซลล์ (α -factor signal) บริเวณที่จะใส่ยีนของโปรตีนที่ต้องการให้แสดงออก (multiple cloning site) ยีนของโปรตีน myc ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จะจับกับ anti myc antibody (c-myc epitope) ฉลากฮิสติดีน (polyhistidine tag) เพื่อใช้ในการทำบริสุทธิ์ กับคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography (6xHis) จุดสิ้นสุดในกระบวนการถอดรหัสของยีน AOX1 (AOX1TT) โปรโมเตอร์ที่ใช้ในการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin ใน *P. pastoris* (P_{TEF1}) โปรโมเตอร์ที่ใช้ในการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin ใน *E. coli* (P_{EM7}) ยีนต้านยาปฏิชีวนะ zeocin และจุดสิ้นสุดในกระบวนการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin (CYC1TT)

ที่มา: Invitrogen (n.d.)

ในการแทรกยีนเข้าสู่จีโนมของยีสต์มี 2 แบบ คือ แบบ single crossover คือการแทรกยีนเข้าที่ปลาย 3' AOX1 โปรโมเตอร์ด้านเดียว และ แบบ double crossover คือการแทรกยีนเข้าทั้งปลาย 3' AOX1 และ 5' AOX1 โปรโมเตอร์ ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แผนภาพแสดงการทดแทนยีน ที่สนใจจากเวกเตอร์เข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ในตำแหน่ง *AOX1* โปรโมเตอร์

ที่มา: Invitrogen (n.d.)

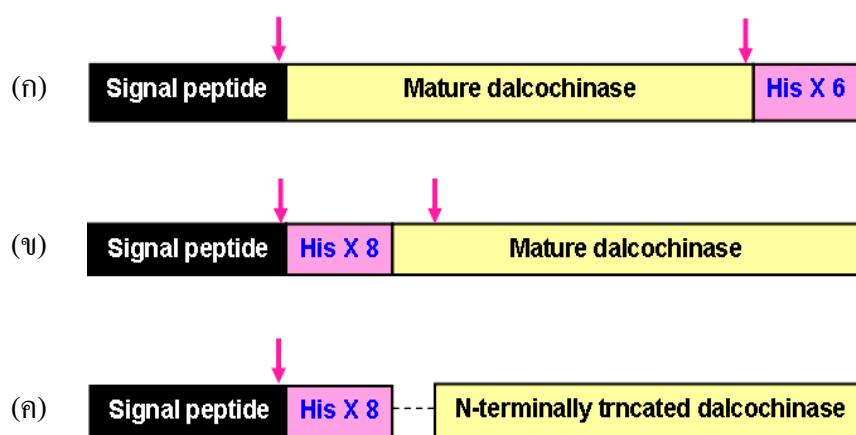
การผลิตรีคอมบิแนนท์คัลโคจีนเนส

Toonkool *et al.* (2006) ได้ทำการโคลนยีนคัลโคจีนเนส และให้มีการแสดงออกในสิ่งมีชีวิต 2 ระบบ คือ ยีสต์ และ แบคทีเรีย พบว่าเอนไซม์คัลโคจีนเนสที่มีการแสดงออกใน *Escherichia coli* ได้โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถทำให้โปรตีนละลายน้ำได้โดยให้มีการแสดงออกร่วมกับ chaperonin GroESL แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้ก็ไม่มีกิจกรรม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใน *E. coli* ขาดกระบวนการตัดแปรรูปโปรตีนหลังการสังเคราะห์ (post-translational modification) ที่เหมาะสม ซึ่งกระบวนการนี้ จำเป็นต่อการม้วนพับที่ถูกต้องของเอนไซม์ ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาใช้ยีสต์ในการผลิตโปรตีนแทน เนื่องจากยีสต์มีออร์แกเนลล์ที่สำคัญที่มีกระบวนการตัดแปรรูปโปรตีนหลังการสังเคราะห์ คล้ายกับพืชชั้นสูง

เมื่อมีการแสดงออกของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคจีนเนสใน *Pichia pastoris* ภายใต้สภาวะที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล และ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้สภาวะที่มีการแสดงออกตลอดเวลา พบว่า สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคจีนเนสได้ทั้งในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์คัลโคจีนเนสใน *P. pastoris* จะได้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าการแสดงออกใน *S. cerevisiae* ดังนั้นจึงมีการสร้างรีคอมบิแนนท์คัลโคจีนเนส 2 แบบ คือ ให้มีการคอดะมิโนฮิสติดีนติดอยู่ที่บริเวณปลาย C-terminus (pPICZ-TRBG-His₆) (ภาพที่ 13ก) และ N-terminus (pPICZ-His₈-TRBG) (ภาพที่ 13ข) เพื่อที่จะสามารถทำให้บริสุทธิ์

โดยผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography ได้ง่าย แต่จากผลการทดลอง พบว่า รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสทั้ง 2 แบบไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนฮิสติดีนน่าจะถูกตัดออกโดยเอนไซม์โปรตีเอสในกระบวนการตัดแปรรหัสโปรตีนหลังการสังเคราะห์ และจากการหาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminus ของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ พบว่า กรดอะมิโน 12 ตัวแรกของรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส ถูกตัดออกไปพร้อมกับกรดอะมิโนฮิสติดีนที่อยู่ด้านปลาย N-terminus ดังนั้นนักวิจัยจึงได้สร้างรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสชนิดใหม่ (pPIC-His₈-trncTRBG) (ภาพที่ 13ค) โดยให้เริ่มต้นด้วย signal peptide ตามด้วย กรดอะมิโนฮิสติดีน 8 ตัว และตามด้วยลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนส ซึ่งทางด้านปลาย N-terminus ถูกตัดออกไป 13 ตัว โดยเริ่มที่ VPPFN ซึ่งอยู่หลังบริเวณตัดของเอนไซม์โปรตีเอส พบว่าสามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography ได้

เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสที่ได้ สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลาย *p*NP-Glc, *p*NP-Fuc และ Dal-Glc ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ได้จากธรรมชาติ โดยมีค่า K_m ในการสลาย *p*NP-Glc, *p*NP-Fuc และ Dal-Glc เท่ากับ 5.78 mM, 0.57 mM และ 1.48 mM ตามลำดับ



ภาพที่ 13 โครงสร้างยีนรีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส (ก) pPICZ-TRBG-His₆ (ข) pPICZ-His₈-TRBG (ค) pPIC-His₈-trncTRBG โดยถูกครีสมพู่ แสดงถึงตำแหน่งตัดของเอนไซม์โปรตีเอสในกระบวนการตัดแปรรหัสโปรตีนหลังการสังเคราะห์

ที่มา: Toonkool *et al.* (2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

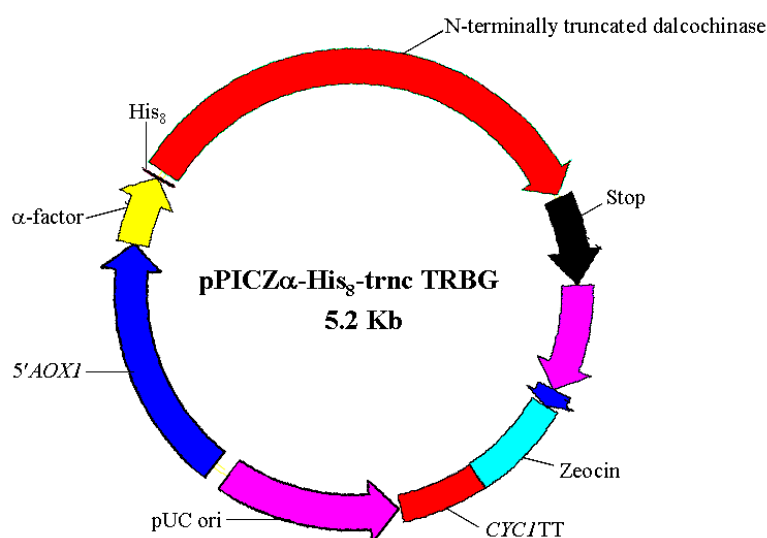
1. เชื้อและพลาสมิด

1.1 *Escherichia coli* (DH5 α) genotype

supE44 Δ *lacU169*(ϕ 80*lacZ* Δ M15)*hsdR17recA1 endA1gyrA96thi-1relA1*

1.2 *Pichia pastoris* (Y11430) genotype wild-type

1.3 พลาสมิดของคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A, N189F และ V255F ซึ่งสร้างจาก pPICZ-His₈-trncTRBG โดยนางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ และนางสาวเพ็ญพร สุจิตนารัตน์ ซึ่งส่วนประกอบของพลาสมิด pPICZ-His₈-trncTRBG (Toonkool *et al.*, 2006) แสดงดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 พลาสมิด pPICZ-His₈-trncTRBG ประกอบด้วย จุดเริ่มต้นของกระบวนการจำลองตัวเอง (pUC ori) โปรโมเตอร์ *AOXI* ลำดับเบสของสัญญาณส่งโปรตีนออกสู่เซลล์ (α -factor) ลำดับเบสของคัลโคซิเนสที่เริ่มต้นลำดับกรดอะมิโนด้วย VPPFN โดยมีลำดับเบสของฮิสติดีน 8 ตำแหน่งอยู่ทางด้านปลาย N-terminus (His₈) ขึ้นด้านยาปฏิชีวนะ Zeocin และจุดสิ้นสุดในกระบวนการถอดรหัสของยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ zeocin (CYC/TT)

2. สารเคมีและเอนไซม์

2.1 คัลโคจีนินเบต้า-กลูโคไซด์ (dalcochin-8'-O- β -glucoside, Dal-Glc) สกัดโดยนางสาวเยาวลักษณ์ จินดานุรักษ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ลินามาริน (linamarin) สกัดตามวิธีของ Svasti และคณะ (1999)

2.3 เอนไซม์คัลโคจีนเนสธรรมชาติ จากห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.ม.ร.ว. ชัยนุสรร์ สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.4 เอนไซม์ลินามาเรสธรรมชาติ จากห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.ม.ร.ว. ชัยนุสรร์ สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.5 โพลีโคลนอลแอนติบอดีของกระต่าย ที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของหนู ซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์ราดิซเปอร์ออกซิเดส (Dako Cytomation, Denmark)

2.6 โมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู ที่จำเพาะต่อเอนไซม์คัลโคจีนเนสธรรมชาติ จากห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.วัชร กสิณฤกษ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.7 2,2'-Azonobis-3-Ethylbenz-Thiazolinesulfonic Acid (ABTS) (Roche, USA)

2.8 Acrylamide (Bio Basic, Canada)

2.9 Bis-acrylamide (Bio Basic, Canada)

2.10 Agarose (Research organics, USA)

2.11 Ammonium sulphate (Ajax Finechem, Australia)

2.12 *iso*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)

2.13 *n*-Butanol (Lab-Scan, Thailand)

2.14 *sec*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)

2.15 *tert*-Butanol (Carlo ERBA, Italy)

2.16 Casamino acid (Becton Dickinson, USA)

2.17 Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, USA)

2.18 ECL plus Western blotting Detection reagents (GE Healthcare Life sciences, USA)

2.19 Endoglycosidase H (BioLabs, UK)

2.20 Ethanol (Carlo ERBA, Italy)

2.21 Ethyl acetate (Carlo ERBA, Italy)

2.22 Glucose oxidase kit (Sigma, USA)

2.23 Histidine (Bio Basic, Canada)

- 2.24 Imidazole (ICN Biomedicals, Germany)
- 2.25 Methanol (Lab-Scan, Thailand)
- 2.26 α -D-Methylglucoside (ACROS organics, USA)
- 2.27 Ni-NTA Superflow (Qiagen, Germany)
- 2.28 *para*-Nitrophenol (*p*NP) (Sigma, USA)
- 2.29 *para*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) (Sigma, USA)
- 2.30 *Pfu*Ultra HF DNA polymerase (Promega, USA)
- 2.31 Phenyl Sepharose High performance (GE Healthcare, Sweden)
- 2.32 Potassium dihydrogen phosphate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.33 di-Potassium hydrogen orthophosphate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.34 *iso*-Propanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.35 *n*-Propanol (Carlo ERBA, Italy)
- 2.36 *Sac*I (Fermentas, USA)
- 2.37 Sodium acetate (Merck, Germany)
- 2.38 Sodium carbonate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.39 Sodium dihydrogen orthophosphate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.40 di-Sodium hydrogen orthophosphate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.41 Sodium dodecyl sulphate (Ajax Finechem, Australia)
- 2.42 Sodium hydroxide (Merck, Germany)
- 2.43 Silica gel 60 F254 aluminium Sheets (Merck, Germany)
- 2.44 Zeocin (Invitrogen, USA)

หมายเหตุ สารเคมีทุกรายการที่ใช้เป็น analytical grade

วิธีการ

1. การสร้างเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

1.1 การคัดเลือกตำแหน่งบนยีนคัลโคซิเนสสำหรับการกลายพันธุ์

จากงานวิจัยของนางสาวชมพูนุท พรเจริญพ และนางสาวเพ็ญพร สุจิตพัฒนารัตน์ ได้สร้างเอนไซม์กลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนในบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์คัลโคซิเนส ไปเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลีนามาเรส พบว่า มีเอนไซม์กลายพันธุ์ 3 ชนิด คือ I185A, N189F และ V255F ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย่อยหมักกลูโคสเพิ่มขึ้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาอันตรกิริยาของกรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่ง ในการทำงานร่วมกัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการกลายพันธุ์ครั้งละ 2 และ 3 ตำแหน่ง โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนในบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์คัลโคซิเนส ไปเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลีนามาเรส คือ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F

1.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการสร้างเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

ในการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะแบบ 2 และ 3 ตำแหน่ง ในงานวิจัยนี้ ได้ใช้พลาสมิดของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง คือ I185 และ N189F ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (ตารางที่ 1) และบางส่วนได้ใช้ไพรเมอร์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ บางส่วนได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ (ตารางที่ 1) โดยออกแบบให้ไพรเมอร์ใหม่มีลักษณะดังนี้

- 1) ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบทั้ง 2 สาย มีตำแหน่งที่ต้องการทำการกลายพันธุ์อยู่ตรงกลางของสายไพรเมอร์และมีลำดับเบสคู่สมกัน และคู่สมกับลำดับเบสของยีนคัลโคซิเนสที่อยู่บนสายของพลาสมิด
- 2) ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบ มีความยาวประมาณ 25 ถึง 45 เบส ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากกว่านี้ อาจจะนำมาใช้ได้ แต่การใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากๆ จะทำให้เกิดการสร้างเป็นโครงสร้างทุติยภูมิของไพรเมอร์ ซึ่งอาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยาการกลายพันธุ์
- 3) ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบมีค่า melting temperature (T_m) ≥ 78 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมในการทำการกลายพันธุ์ โดยค่า T_m หาได้จากสูตรด้านล่าง

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

โดยที่ N คือ จำนวนเบสของไพรเมอร์

4) ไพรเมอร์ที่ดีควรมี % GC อย่างน้อยประมาณ 40 % และควรมีเบส C หรือ G จำนวน 1 เบส หรือมากกว่านั้น อยู่ทางด้านปลาย 3' ของไพรเมอร์

1.3 การทำการกลายพันธุ์ของยีนคัดโคชินสที่ตำแหน่งจำเพาะ

ทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยการทำการปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบและไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 15 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีดังนี้

พลาสมิดของยีนคัดโคชินสกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง (ปริมาณ 50 ng)	5 µl
ฟอร์เวิร์สไพรเมอร์ (25 ng/µl)	5 µl
รีเวิร์สไพรเมอร์ (25 ng/µl)	5 µl
10x บัฟเฟอร์	5 µl
2 mM dNTP mix	5 µl
<i>Pfu</i> Ultra HF DNA polymerase (2.5 U/µl)	1 µl
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	24 µl
ปริมาตรรวม	50 µl

จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้สภาวะดังนี้

95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	1 รอบ
95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	} 16 รอบ
55	องศาเซลเซียส	1	นาที	
68	องศาเซลเซียส	12	นาที	
72	องศาเซลเซียส	8.30	นาที	1 รอบ

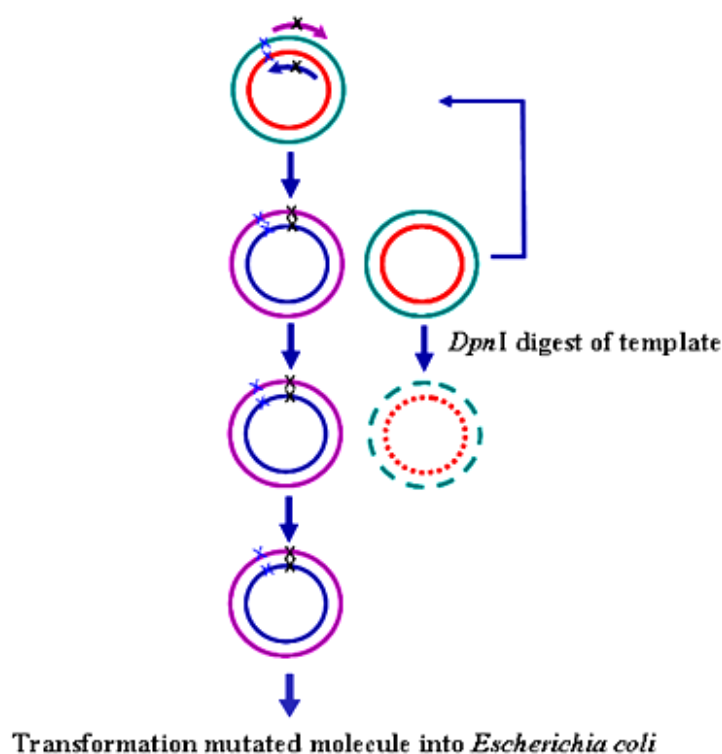
ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์คัดโคซิเนสการกลายพันธุ์

เอนไซม์คัดโคซิเนส กลายพันธุ์	ดีเอ็นเอต้นแบบ (ชื่อผู้สร้าง)	ไพรเมอร์ (ชื่อผู้สร้าง)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
I185A-N189F	N189F (นางสาวเพ็ญพร สุจิตตินารัตน์)	<u>I185A-N189Ffor*</u>	5' GGA TTA CAC TAA ATG AGC CAT CAG <u>CTT</u> TCA CCG CGT TTG GGT ATG C 3'
		<u>I185A-N189Frev*</u>	5' GCA TAC CCA AAC GCG GTG AAA <u>GCT</u> GAT GGC TCA TTT AGT GTA ATC C 3'
I185A-V255F	I185A (นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ)	<u>DearV255Ffor</u> (นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ)	5' GGC ATT TCC TG CAC GTA <u>TTT</u> TGG GTT ATA CCG C 3'
		<u>DearV255Frev</u> (นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ)	5' GCG GTA TAA CCC <u>AAA</u> ATA CGT GCA AGG AAA TGC C 3'
N189F-V255F	N189F (นางสาวเพ็ญพร สุจิตตินารัตน์)	<u>DearV255Ffor</u> (นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ)	5' GGC ATT TCC TG CAC GTA <u>TTT</u> TGG GTT ATA CCG C 3'
		<u>DearV255Frev</u> (นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ)	5' GCG GTA TAA CCC <u>AAA</u> ATA CGT GCA AGG AAA TGC C 3'
I185A-N189F- V255F	N189F-V255F (นางนุสรา ทองทับทิม ในงานวิจัยนี้)	<u>I185A-N189Ffor*</u>	5' GGA TTA CAC TAA ATG AGC CAT CAG <u>CTT</u> TCA CCG CGT TTG GGT ATG C 3'
		<u>I185A-N189Frev*</u>	5' GCA TAC CCA AAC GCG GTG AAA <u>GCT</u> GAT GGC TCA TTT AGT GTA ATC C 3'

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์

* คือ ไพรเมอร์ทำการออกแบบใหม่ในงานวิจัยนี้

เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จแล้ว นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 1% อะกาโรส และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และเมื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดถูกต้องแล้ว ทำการเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* (10 U/ μ l) ปริมาตร 1 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อย่อยดีเอ็นเอต้นแบบ



ภาพที่ 15 แผนภาพแสดงการทำลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed mutagenesis) โดยการ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

1.4 การถ่ายโอนยีนดัดโคชินสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E.coli* (DH5 α)

เมื่อได้พลาสมิดที่มียีนดัดโคชินสกลายพันธุ์แล้ว ทำการถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* (DH5 α) โดยเทคนิค electroporation (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB, pH 7.5 (1% tryptone (w/v), 0.5% yeast extract (w/v), 0.5% NaCl (w/v)) ที่มี 25 μ g/ml zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยการสกัดพลาสมิด (ภาคผนวก ก ข้อ 3) และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ทำการตรวจวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1% อะกาโรส เมื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดถูกต้องได้แล้ว นำโคโลนีมาสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) และนำพลาสมิดที่สกัดได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งไปทำการวิเคราะห์ที่ Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อตรวจสอบว่า ยีนดัดโคชินเนสที่ได้เกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ถูกต้องตามที่ต้องการ

1.5 การถ่ายโอนยีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *P. pastoris* (Y11430)

เมื่อได้โคลนของยีนดัดโคชินเนสที่มีตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ถูกต้อง (ข้อ 1.4) นำโคลนนั้นมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB, pH 7.5 ที่มี 25 µg/ml zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าให้มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ข้ามคืน ทำการสกัดพลาสมิด พร้อมทั้งตัดพลาสมิดที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* ตามสภาวะดังนี้

ดีเอ็นเอ	10 µl
10 U/µl <i>Sac I</i>	1 µl
10x reaction buffer	2 µl
1 mg/ml BSA	2 µl
2 mg/ml Rnase	2 µl
น้ำกลั่น	3 µl
ปริมาตรรวม	20 µl

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อให้พลาสมิดเป็นเส้นตรง และนำดีเอ็นเอที่ได้ มาตกตะกอนด้วยเอทานอล (ภาคผนวก ก ข้อ 4) และเตรียมดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณ 5 µg ในปริมาตร 10 µl ทำการถ่ายโอนพลาสมิดของดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ที่ได้เข้าสู่ *P. pastoris* (Y11430) ด้วยวิธี electroporation (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPDS (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1 M sorbitol) ที่มี 25 µg/ml zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน ก็จะได้โคโลนี

2. การผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

2.1 การคัดเลือกโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสได้ในปริมาณสูง

เลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่ได้รับการถ่ายยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMGH (100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 0.34% (w/v) yeast nitrogen base, 1% (w/v) ammonium sulfate, 1% (v/v) glycerol) ปริมาตร 5 ml ที่มี 0.02% (w/v) biotin เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าให้มีความเร็ว 200-220 รอบต่อนาที ข้ามคืน นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำเฉพาะส่วนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหาร BMMH (100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 0.34% (w/v) yeast nitrogen base, 0.5% (w/v) cassamino acid, 1% (w/v) ammonium sulfate, 0.5% (v/v) methanol) ปริมาตร 5 ml ที่มี 0.02 % (w/v) biotin โดยให้มีความเร็ว 200-220 รอบต่อนาที ข้ามคืน โดยทำการเติม 100% methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง เลี้ยงไป 7 วัน นำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ ไปทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ (ข้อ 5.1) เลือกโคโลนีที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดไปใช้ในการผลิตเพื่อให้ได้เอนไซม์ในปริมาณมาก

2.2 การผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสในปริมาณมากในระบบ Shake flask

นำ 1 โคโลนีของเชื้อ *P. pastoris* ที่ได้รับการถ่ายยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหาร BMGH ปริมาตร 20 ml ที่มี 0.02% (w/v) biotin ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าให้มีความเร็ว 200-220 รอบต่อนาที ข้ามคืน จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในอาหาร BMGH ปริมาตร 130 ml ที่มี 0.02% (w/v) biotin ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200-220 รอบต่อนาที ข้ามคืน นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำเฉพาะส่วนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหาร BMMH ที่มี 0.02% (w/v) biotin โดยให้มีความเร็ว 200-220 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 9-13 วัน โดยทำการเติม 100% methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5% (w/v) ทุก 24 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารที่เลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน (ข้อ 5.1) จนกระทั่งกิจกรรมของ

เอนไซม์คังที่ นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ เพื่อนำไปแยกเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ให้บริสุทธิ์

3. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

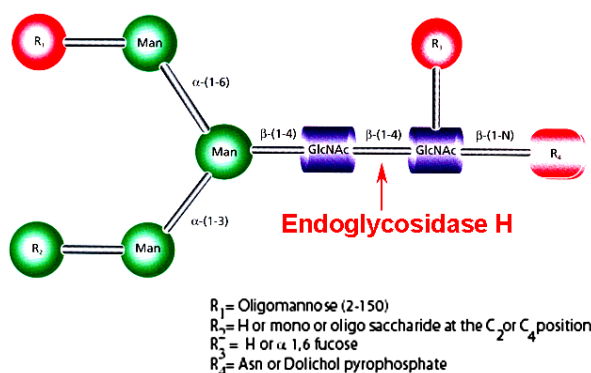
นำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ที่ผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์มาผ่าน ultrafiltration membrane ที่มี molecular weight cut-off เท่ากับ 30 กิโลดาลตัน เพื่อลดปริมาณ จากนั้นเติม ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 M และนำไป load ลงในคอลัมน์ phenyl sepharose chromatography ที่ผ่านการ equilibrate คอลัมน์ด้วย 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 ที่มี 1 M ammonium sulfate ทำการล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 ที่มี 1 M ammonium sulfate และชะโปรตีนออกจากคอลัมน์โดยการเติม 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 เก็บสารที่ชะได้ fraction ละ 2 ml ทั้งหมด 10 fractions นำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนส และทำการรวม fraction ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน นำ fraction ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูง ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose chromatography มากำจัดเกลือ ammonium sulfate พร้อมทั้งเติม wash buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl) เพื่อให้ได้ pH 8.0 โดยใช้ Amicon Ultra Centrifugal Filter ที่มี molecular weight cut-off เท่ากับ 30 กิโลดาลตัน

นำ fraction ที่มีการกำจัดเกลือ และปรับ pH แล้ว มา load ลงในคอลัมน์ Ni^{2+} -ion affinity chromatography ที่ผ่านการ equilibrate คอลัมน์ด้วย wash buffer ซึ่งโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่จับกับ Ni^{2+} จะถูกชะออกจากคอลัมน์ แต่โปรตีนคัลโคซิเนสที่ต้องการนั้นมี polyhistidine tag จะสามารถจับกับ Ni^{2+} ทำให้โปรตีนติดอยู่ในคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer เพื่อกำจัดโปรตีนตัวอื่น ทำการชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) โดยเก็บ fraction ละ 1 ml เพื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วรวม fraction ที่มีการทำงานของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปผ่าน Amicon Ultra Centrifugal Filter ที่มี molecular weight cut-off เท่ากับ 30 กิโลดาลตัน เพื่อกำจัด imidazole รวมทั้งทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และละลายเอนไซม์ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 0.5 ml.

นำเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน มาหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ Bio-Rad Protein Assay และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่าปริมาณโปรตีน (mg/ml) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (ภาคผนวก ข ข้อ 1) จากนั้นนำเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่แยกได้ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) (ภาคผนวก ก ข้อ 6) การทำอิมมูโนวิเคราะห์สำหรับโปรตีน (western blot) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู ที่จำเพาะต่อเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ เป็นแอนติบอดีชนิดที่ 1 และใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีของกระต่าย ที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลินของหนู ซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์ราดิซเปอร์ออกซิเดส เป็นแอนติบอดีชนิดที่ 2 และนำไปทำปฏิกิริยากับ ECL plus western blotting detection (GE Healthcare Life Sciences, USA) ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ฮอร์ราดิซเปอร์ออกซิเดส และนำไปประกบกับฟิล์ม เพื่อดูการเรืองแสงที่เกิดขึ้น (ภาคผนวก ก ข้อ 7) และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอน-ดีเนซเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล (Non-denaturing-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Non-denaturing PAGE) โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.2 unit และนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (4-MU-Glc) แล้วตรวจสอบการเรืองแสงของ 4-MU ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ภาคผนวก ก ข้อ 8)

4. การตรวจสอบกระบวนการ glycosylation ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

นำโปรตีนของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ปริมาณ 2.5 μ g ผสมรวมกับ 10x glycoprotein denaturing buffer ปริมาตร 1 μ l โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 10x G5 reaction buffer ปริมาตร 2 μ l และเอนไซม์ endoglycosidase H ซึ่งมีตำแหน่งตัดน้ำตาลแสดงดังภาพที่ 16 ปริมาตร 0.1 μ l (50 unit) ปริมาตรสุดท้ายรวมเท่ากับ 12 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล



ภาพที่ 16 แผนภาพแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ endoglycosidase H

ที่มา: Gates *et al.* (n.d.)

5. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

5.1 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์

ทำปฏิกิริยาโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 μ l หรือเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ บ่มร่วมกับ 1 mM *p*NP-Glc เติม 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 500 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 2 M Na_2CO_3 ปริมาตร 1 ml ตรวจวัดผลผลิตของการสลาย คือ พาราไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร โดยในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ จะนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาคำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*NP (ภาคผนวก ข ข้อที่ 2)

5.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

นำเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ที่ปริมาตรต่าง ๆ มาบ่มร่วมกับ 15 mM *p*NP-Glc และเติม 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 2 M Na_2CO_3 ปริมาตร 100 μ l จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้มาคำนวณเพื่อ

เปลี่ยนเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*NP (ภาคผนวก ข ข้อที่ 3)

6. การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ (K_m , V_{max} , k_{cat} และ k_{cat}/K_m)

การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ทำได้โดยการหาปริมาณกลูโคสที่เป็นผลผลิตจาก สับสเตรท 3 ชนิด คือ *p*NP-Glc, Dal-Glc และ ลินามาริน โดยการนำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาณ 0.1 unit มาทำปฏิกิริยากับสับสเตรท ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเติม 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นทันที จากนั้นเติม 2 mg/ml ABTS (2,2'-Azonobis-3-Ethylbenz-Thiazolinesulfonic Acid) ปริมาตร 50 μ l และ glucose oxidase kit ปริมาตร 100 μ l (0.5 unit) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (ภาคผนวก ข4) และใช้โปรแกรม KaleidaGraph (Synergy Software) ในการหาค่าจลนศาสตร์ โดยค่า K_m และ V_{max} คำนวณจาก สมการ Michaelis-Menten ดังสมการ (1) และค่า k_{cat} หรือ turnover number ซึ่งคำนวณได้ดัง สมการที่ (2)

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_t} \quad (2)$$

โดย V_0	คือความเร็วของการเกิดปฏิกิริยา (μ mol/min)
V_{max}	คือความเร็วสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยา (μ mol/min)
K_m	คือค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (mM)
[S]	คือความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรท (mM)
E_t	คือจำนวนโมลของเอนไซม์ทั้งหมด (μ mol)
k_{cat}	คือความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อจำนวนเอนไซม์ต่อเวลา (s^{-1})

7. การศึกษาคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส

นำเอนไซม์อัลโคซิเนสสังเคราะห์และกลายพันธุ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาณ 0.1 unit มาทำปฏิกิริยา โดยใช้แอลกอฮอล์ (methanol, ethanol, *n*-propanol, *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol และ *tert*-butanol) ความเข้มข้น 0.9 M เป็นตัวรับกลูโคส (glucosyl acceptor) และใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส (glucosyl donor) ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 ให้ได้ปริมาตรรวม 100 μ l จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าให้มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)

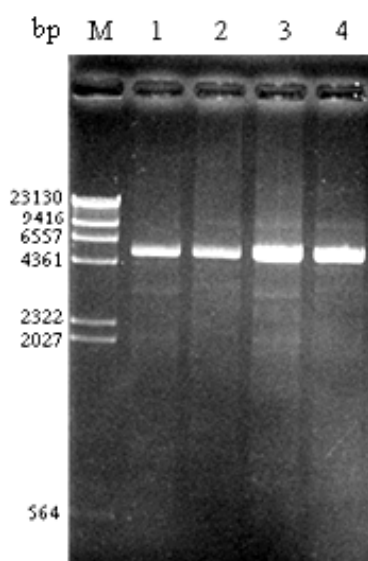
การวิเคราะห์ TLC ทำได้โดยนำตัวอย่างปริมาตร 8 μ l หยดลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปแช่ในสารละลาย A (ethyl acetate/methanol/water 16:6:1 v/v) โดยให้สารละลาย A วิ่งผ่านแผ่น TLC ประมาณ 4.25 เซนติเมตร ทำ 2 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย P (2-propanol/ethanol/water 5:1:2 v/v) โดยให้สารละลาย P วิ่งผ่านแผ่น TLC ประมาณ 1.75 เซนติเมตร ทำ 2 ครั้ง จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวิเคราะห์ผลโดยแช่ใน 20% (v/v) sulfuric acid ใน ethanol และนำไปอบที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับ standard marker ประกอบด้วยกลูโคส *p*NP-Glc และ เมทิลกลูโคไซด์ (methyl glucoside) ปริมาณ 40 nmol, 80 nmol, 120 nmol และ 160 nmol ตามลำดับ และวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเครื่อง GS-800 image densitometer (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรม Quantity One[®] version 4.2.1 โดยกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มและปริมาณของ standard marker จะต้องมีความสัมพันธ์ค่า correlation coefficient (r^2) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.90 จึงจะนำมาใช้ โดยผลที่ได้จะถูกแสดงเป็น % mole ของ alkyl glucoside เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวน mole ทั้งหมดของกลูโคสอิสระ *p*NP-Glc และ alkyl glucoside ที่มีในปฏิกิริยานั้นๆ (Svasti *et al.*, 2003)

ผลและวิจารณ์

1. การสร้างเอนไซม์ตัดโคจีนสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ

1.1 การทำการกลายพันธุ์ของยีนตัดโคจีนสที่ตำแหน่งจำเพาะ

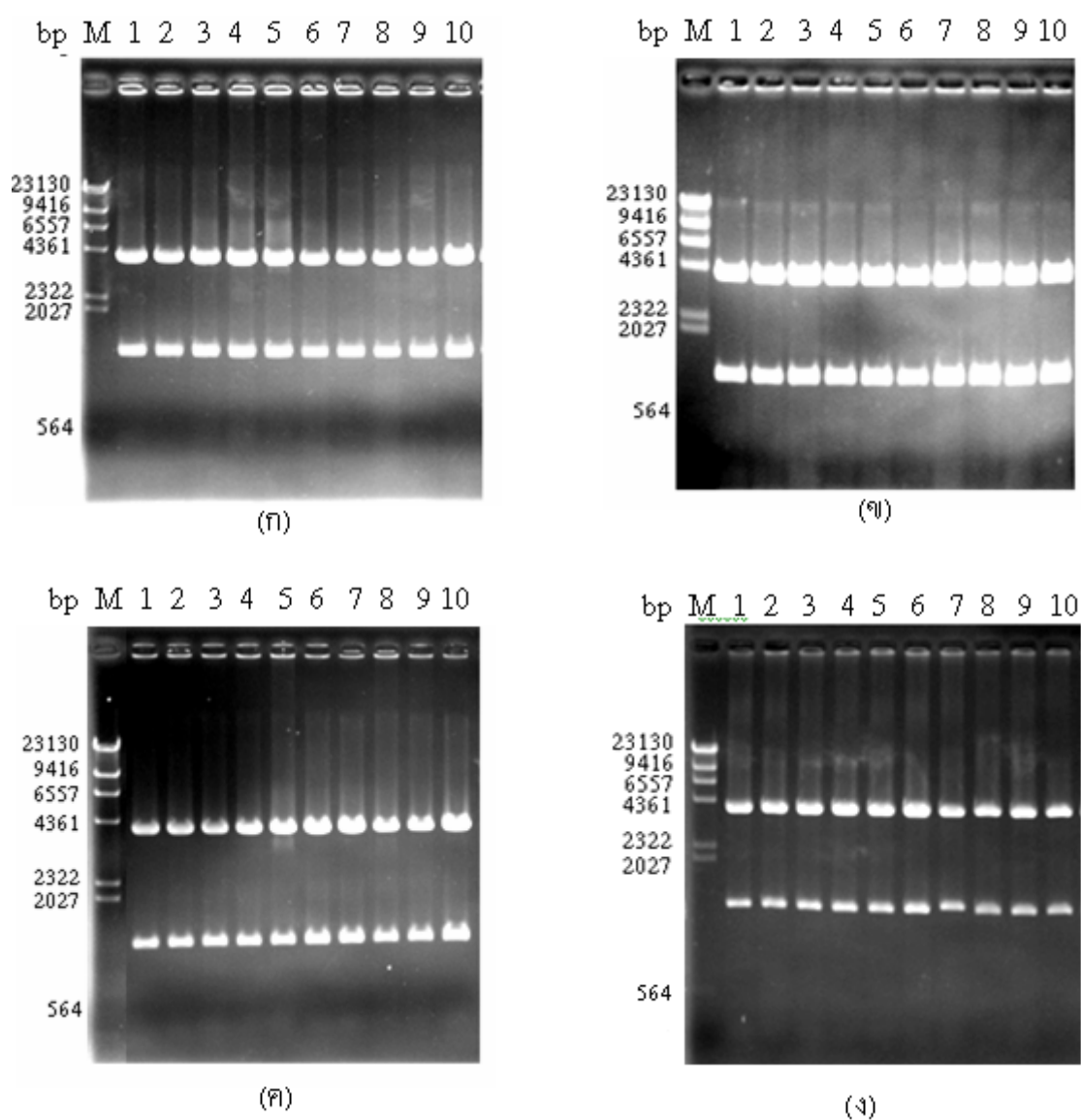
ทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ แบบ 2 และ 3 ตำแหน่ง ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาวิเคราะห์ด้วย 1 % อะกาโรส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า แลบดีเอ็นเอของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด มีขนาดประมาณ 5.2 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้อง (ภาพที่ 17) จากนั้นเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DpnI* และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อย่อยดีเอ็นเอต้นแบบ



ภาพที่ 17 1 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ในการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ โดย 1: คัดโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-N189F, 2: คัดโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-V255F, 3: คัดโคจีนสกลายพันธุ์ N189F-V255F, 4: คัดโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F และ M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /HindIII

1.2 การโคลนยีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *E. coli* (DH5 α) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์กลายพันธุ์

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดที่คาดว่าจะมียีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ (ข้อ 1.1) เข้าสู่ *E. coli* (DH5 α) โดยวิธี electroporation เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB pH, 7.5 ที่มี 25 μ g/ml zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน พบว่า เอนไซม์ดัดโคชินเนส กลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F มีโคโลนีเจริญ 120, 140, 142 และ 52 โคโลนี ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือก 10 โคโลนีในแต่ละเอนไซม์กลายพันธุ์ สกัดพลาสมิด และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* นำไปวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจล เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 18 พบว่า ทุกโคโลนีให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 3.8 กิโลเบส และ 1.4 กิโลเบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้อง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าโคโลนีที่ได้เป็นโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดทั้งหมด



ภาพที่ 18 ผลการตัดพลาสมิดที่คาดว่ามียีนดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ 4 ชนิด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ก) พลาสมิดของเอนไซม์ดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F (ข) พลาสมิดของเอนไซม์ดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F (ค) พลาสมิดของเอนไซม์ดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F (ง) พลาสมิดของเอนไซม์ดัดโคชินเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F หมายเลขบนรูป: หมายเลขโคโลนีที่นำมาสกัดพลาสมิด M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /HindIII

ดังนั้น จึงเลือกสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ 3, 4, 4 และ 6 สำหรับเอนไซม์ตัดโคซิเนส กลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F ตามลำดับ และนำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบว่าเอ็นของเอนไซม์ตัดโคซิเนสเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ถูกต้อง ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของเอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ตัดโคซิเนสดั้งเดิม แสดงดังภาพที่ 19 และแสดงผลอย่างละเอียดในภาคผนวก ก-ฉ จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดตัดโคซิเนส กลายพันธุ์แต่ละชนิด พบว่า ประสบความสำเร็จในการสร้างเอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างถูกต้อง ในตำแหน่งที่ต้องการดังนี้

เอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ACT (โคดอนของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน) ไปเป็น GCT (โคดอนของกรดอะมิโนอะลานีน) และจาก AAT (โคดอนของกรดอะมิโนแอสพาราจีน) ไปเป็น TTT (โคดอนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน)

เอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ACT (โคดอนของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน) ไปเป็น GCT (โคดอนของกรดอะมิโนอะลานีน) และจาก GTT (โคดอนของกรดอะมิโนวาลีน) ไปเป็น TTT (โคดอนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน)

เอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก AAT (โคดอนของกรดอะมิโนแอสพาราจีน) ไปเป็น TTT (โคดอนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน) และจาก GTT (โคดอนของกรดอะมิโนวาลีน) ไปเป็น TTT (โคดอนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน)

เอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F มีการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ACT (โคดอนของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน) ไปเป็น GCT (โคดอนของกรดอะมิโนอะลานีน) และ AAT (โคดอนของกรดอะมิโนแอสพาราจีน) ไปเป็น TTT (โคดอนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน) และจาก GTT (โคดอนของกรดอะมิโนวาลีน) ไปเป็น TTT (โคดอนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน)

```

wild-type      GTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCGAATGGGTATGCATAC 540
I185A-N189F   GGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAGCTTTTCCACCGCGTTTGGGTATGCATAC 540
I185A-V255F   GTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAGCTTTTCCACCGCGAATGGGTATGCATAC 540
N189F-V255F   GTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAATCTTCACCGCGTTTGGGTATGCATAC 540
I185A-N189F-V255F GTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCAGCTTTTCCACCGCGTTTGGGTATGCATAC 539
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

wild-type      GGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGCACAGGTGGGGAT 600
I185A-N189F   GGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGCACAGGTGGGGAT 600
I185A-V255F   GGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGCACAGGTGGGGAT 600
N189F-V255F   GGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGCACAGGTGGGGAT 600
I185A-N189F-V255F GGTATGTTTGCACCAGGTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGCACAGGTGGGGAT 599
*****

wild-type      GCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTC 660
I185A-N189F   GCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTC 660
I185A-V255F   GCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTC 660
N189F-V255F   GCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTC 660
I185A-N189F-V255F GCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACCTGATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTC 659
*****

wild-type      CAAGTGTAACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGAC 720
I185A-N189F   CAAGTGTAACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGAC 720
I185A-V255F   CAAGTGTAACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGAC 720
N189F-V255F   CAAGTGTAACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGAC 720
I185A-N189F-V255F CAAGTGTAACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGAC 719
*****

wild-type      GTAGTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATAT 780
I185A-N189F   GTAGTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATAT 780
I185A-V255F   GTATTTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATAT 780
N189F-V255F   GTATTTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATAT 780
I185A-N189F-V255F GTATTTTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATAT 779
*** *****

wild-type      CTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGC 840
I185A-N189F   CTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGC 840
I185A-V255F   CTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGC 840
N189F-V255F   CTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGC 840
I185A-N189F-V255F CTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGC 839
*****

```

ภาพที่ 19 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนของคัลโคซินเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด

เปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซินเนสดั้งเดิม สีเหลือง: ตำแหน่งกลายพันธุ์

I185A; สีเขียว: ตำแหน่งกลายพันธุ์ N189F และสีชมพู: ตำแหน่งกลายพันธุ์ V255F;

wild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซินเนสดั้งเดิม

1.3 การโคลนยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์เข้าสู่ *P. pastoris* Y11430 และการคัดเลือกโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสได้ในปริมาณสูง

เมื่อนำโคลนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิดของยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งถูกต้องทั้ง 4 ชนิด ที่ได้มาสกัดพลาสมิด และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* เพื่อให้พลาสมิดเป็นเส้นตรง ถ่ายโอนพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *P. pastoris* (Y11430) ด้วยวิธี electroporation เลี้ยงบนอาหาร YPDS ที่มี 100 µg/ml zeocin ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F, I185A-N189F-V255F มีโคโลนีเจริญ 60, 75, 60 และ 42 โคโลนี ตามลำดับ

จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของยีสต์ ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์แต่ละชนิดสูงสุด โดยนำโคโลนียีสต์ที่ได้รับถ่ายโอนยีนคัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด มาชนิดละ 20 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร BMGH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น และนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหาร BMMH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเติม 0.5% (v/v) methanol ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ กับ 1 mM *pNP-Glc* ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1 พบว่า โคโลนีที่ 17, 10, 9 และ 20 ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F ตามลำดับ มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ต่อ 1 mM *pNP-Glc* สูงที่สุด ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 2 ดังนั้น จึงเลือกโคโลนีดังกล่าวไปใช้ในการผลิตเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ในระบบ shake flask ต่อไป

ตารางที่ 2 โคลนของ *P. pastoris* ที่แสดงกิจกรรม ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด
ต่อ 1 mM *p*NP-Glc

โคลนของ <i>P. pastoris</i>	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร			
	I185A-N189F	I185A-V255F	N189A-V255F	I185A-N189F-V255F
1	0.955	0.637	2.961	0.213
2	0.923	0.713	2.892	0.220
3	0.982	0.698	2.922	0.281
4	0.764	0.711	2.712	0.113
5	0.842	0.667	2.637	0.220
6	0.742	0.498	2.898	0.266
7	0.716	0.689	1.983	0.276
8	0.720	0.748	3.495	0.231
9	0.722	0.788	3.522*	0.267
10	0.800	0.875*	3.060	0.167
11	0.881	0.783	3.378	0.275
12	0.671	0.684	3.276	0.232
13	0.926	0.673	2.742	0.238
14	1.063	0.667	2.859	0.230
15	0.969	0.858	3.453	0.234
16	1.019	0.661	2.604	0.293
17	1.073*	0.676	3.129	0.277
18	0.911	0.708	2.772	0.249
19	0.980	0.763	3.252	0.144
20	0.906	0.578	2.985	0.368*

หมายเหตุ *: โคลนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

2. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์

นำโคโลนียีสต์ที่ 17, 10, 9 และ 20 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F สูงที่สุด ตามลำดับ เลี้ยงในระบบ shake flask ดังวิธีการทดลองในข้อ 2.2 และเนื่องจากเอนไซม์จะถูกหลั่งออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปลดปริมาตรโดยผ่าน ultrafiltration และนำไปแยกให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose chromatography ตามด้วยคอลัมน์ Ni^{2+} -affinity chromatography จากนั้นจะนำโปรตีนที่ได้ไปผ่าน amicon ultra centrifugal filter เพื่อกำจัด imidazole และทำให้โปรตีนมีความเข้มข้น ดังวิธีการทดลองในข้อ 3 ซึ่งในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ จะมีการหากิจกรรมของเอนไซม์กับ 1 mM *p*NP-Glc และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford โดยผลของการทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด แสดงดังตารางที่ 6-9

ตารางที่ 3 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-N189F ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

ขั้นตอน	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture medium	49.54	25.07	1.98	1.00	100.00
Ultrafiltration	44.47	13.08	3.40	1.71	89.77
Phenyl sepharose	35.90	5.20	6.90	3.48	72.47
Buffer changing	35.79	5.14	6.96	3.52	72.24
Ni^{2+} -ion affinity	25.37	1.53	16.58	8.40	51.21
Centrifugal Filter	24.14	1.09	22.15	11.19	48.73

ตารางที่ 4 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

ขั้นตอน	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture medium	20.73	28.80	0.72	1.00	100
Ultrafiltration	19.78	17.75	1.11	1.54	95.42
Phenyl sepharose	16.28	7.06	2.31	3.21	78.53
Buffer changing	11.92	5.13	2.33	3.24	57.50
Ni ²⁺ -ion affinity	4.43	0.72	6.15	8.54	21.37
Centrifugal Filter	3.20	0.66	4.85	6.74	15.44

ตารางที่ 5 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

ขั้นตอน	Total activity (unit)	Total protein (mg)	specific activity (unit/mg)	purification (fold)	yield (%)
Culture medium	145.36	11.47	12.68	1.00	100.00
Ultrafiltration	154.11	8.54	18.04	1.42	106.02
Phenyl sepharose	103.77	3.27	31.71	2.50	71.39
Buffer changing	95.25	2.20	43.34	3.42	65.53
Ni ²⁺ -ion affinity	64.30	1.05	61.24	4.83	44.24
Centrifugal Filter	60.46	0.53	114.07	9.00	41.59

ตารางที่ 6 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

ขั้นตอน	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture medium	9.08	19.74	0.46	1.00	100
Ultrafiltration	11.42	11.04	1.03	2.24	125.77
Phenyl sepharose	9.73	4.26	2.28	4.96	107.16
Buffer changing	9.60	3.51	2.73	5.93	105.73
Ni ²⁺ -ion affinity	5.70	0.41	13.90	30.22	62.78
Centrifugal Filter	5.48	0.21	26.09	56.72	60.35

จากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ พบว่า ได้เอนไซม์กลายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ 4 ชนิด คือ I185A-N189F ปริมาณ 24.14 unit, I185A-V255F ปริมาณ 3.20 unit, N189F-V255F ปริมาณ 60.46 unit และ I185A-N189F-V255F ปริมาณ 5.48 unit ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งคิดเป็น 48.73%, 15.44%, 41.59% และ 60.35 % โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 11.19, 6.74, 9.00 และ 56.72 เท่า ตามลำดับ

จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตที่ได้ (% yield) พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F และ N189F-V255F ได้ผลผลิตของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์น้อยกว่า 50% ซึ่งในความเป็นจริง กิจกรรมของเอนไซม์ควรมีค่าเท่าเดิม หรือลดลงเพียงเล็กน้อย การที่กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อาจเนื่องมาจากการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ โดยในการทำบริสุทธิ์นั้น จะทำการรวม fraction ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเท่านั้น ดังนั้น เอนไซม์คัลโคซิเนสบางส่วนอาจหลุดไปอยู่ใน fraction ที่ไม่ได้เก็บ หรืออาจจะเป็นเพราะเอนไซม์เกิดการเสียดสภาพในระหว่างการทำบริสุทธิ์ เพราะอาจใช้เวลาในการทำบริสุทธิ์นานเกินไป เนื่องจากต้องผ่านหลายขั้นตอน หรืออุณหภูมิของตู้เย็นที่ใช้สูงเกินไป หรืออาจเกิดการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรตีนเอส นอกจากนี้ ในระหว่างการทำบริสุทธิ์ จะต้องมีการเก็บเอนไซม์ไว้ในหลอด และดูดสารละลายเอนไซม์โดยใช้ pipette ซึ่งอาจทำให้ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ลดลง เนื่องจากสูญเสียปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ ซึ่งสาเหตุเหล่านี้มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเช่นกัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255 F พบว่า เปอร์เซ็นต์ของ

ผลิตภัณฑ์ที่ได้ (% yield) ในขั้นตอน ultrafiltration สูงกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ (125.77 %) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในอาหารเลี้ยงเชื้อของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255 F อาจมีตัวยับยั้ง (inhibitor) ต่าง ๆ ที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่าที่ได้ต่ำกว่าที่เป็นจริง ดังนั้น เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาผ่าน ultrafiltration ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีการกำจัดโปรตีนบางส่วนออกไป อาจทำให้ตัวยับยั้งที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกกำจัดออกไปด้วย เมื่อนำส่วนที่ผ่าน ultrafiltration มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ จึงทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้สูงกว่าขั้นตอนก่อนผ่าน ultrafiltration

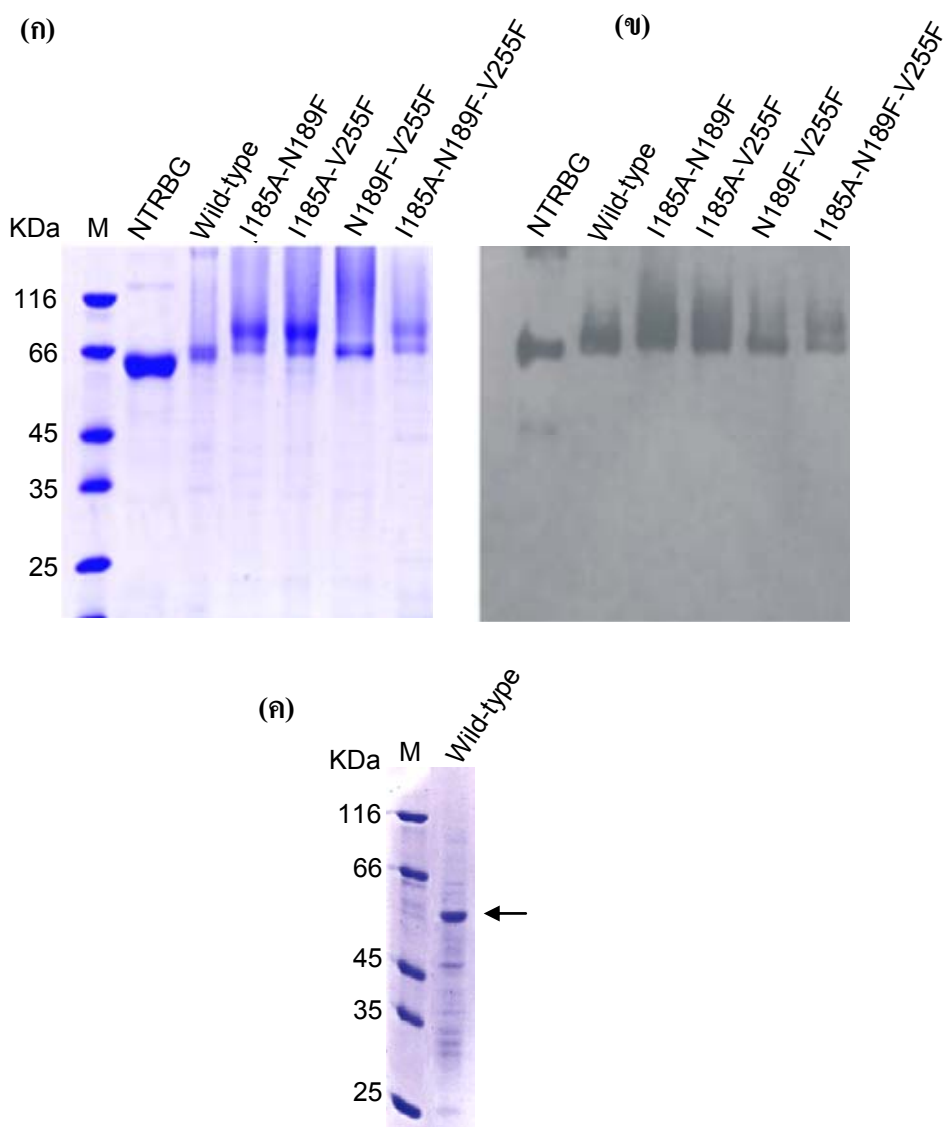
สำหรับการพิจารณาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์กลายพันธุ์ (total protein) พบว่า ในขั้นตอนของการทำ amicon ultra centrifugal filter เพื่อกำจัดเกลือ ammonium sulfate และเปลี่ยน buffer สำหรับนำไปลง Ni^{2+} -ion chromatography และขั้นตอนการกำจัด imidazole และเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เช่น ขั้นตอนการกำจัด imidazole มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.09, 0.66, 0.53 และ 0.21 มิลลิกรัม สำหรับเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าในขั้นตอน Ni^{2+} -ion chromatography ซึ่งมีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 1.53, 0.72, 1.05 และ 0.41 มิลลิกรัม ซึ่งโดยทฤษฎีแล้วปริมาณโปรตีนทั้งหมดก่อนและหลังจากการผ่าน amicon ultra centrifugal filter ควรมีค่าเท่ากัน เนื่องจากโปรตีนที่ผ่าน ultrafiltration มาก่อน จะมีขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน และเมื่อนำโปรตีนมาผ่าน amicon ultra centrifugal filter อีกครั้ง ปริมาณโปรตีนที่ได้ควรจะทำเท่าเดิม เนื่องจาก amicon ultra centrifugal filter มี molecular weight cut off เท่ากับ 30 กิโลดาลตัน ดังนั้น amicon ultra centrifugal filter จึงควรทำหน้าที่เพียงการกำจัด imidazole ออกจากสารละลายเอนไซม์ และเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนเท่านั้น แต่จากการทดลอง พบว่า โปรตีนที่นำมาผ่าน amicon ultra centrifugal filter มีปริมาณน้อยกว่าก่อนผ่าน อาจเนื่องมาจาก เกิดการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรตีนเอสในระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ทำให้โปรตีนบางส่วนในสารละลายเอนไซม์ ถูกตัดจนมีขนาดเล็กกว่า 30 กิโลดาลตัน ทำให้โปรตีนขนาดเล็กเหล่านี้หลุดผ่านเมมเบรนออกมา ในขั้นตอนการทำ amicon ultra centrifugal filter หรืออาจเนื่องมาจาก เมื่อนำโปรตีนมาผ่าน ultra centrifugal filter ความเข้มข้นของโปรตีนจะเพิ่มขึ้น ทำให้โปรตีนบางส่วนไปติดแน่นอยู่ตามเมมเบรนของ ultra centrifugal filter ซึ่งอาจทำให้น้ำโปรตีนออกจาก ultra centrifugal filter ได้ไม่หมด หรืออาจเนื่องมาจากเมมเบรนของ ultra centrifugal filter เกิดการรั่ว ทำให้โปรตีนหลุดออกจาก ultra centrifugal filter ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณโปรตีนหลังผ่าน ultra centrifugal filter ลดลง ซึ่งจากผลของปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงในบางขั้นตอนดังที่กล่าวไปแล้วนั้น ส่งผลทำให้ได้ค่า specific activity (unit/mg) ของเอนไซม์ไม่เป็นไปตามที่คาดไว้

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า specific activity ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F พบว่า มีค่าลดลงจาก 6.15 unit/mg ในขั้นตอนการผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion chromatography เป็น 4.85 unit/mg ในขั้นตอนผ่าน amicon ultra centrifugal filter เพื่อกำจัด imidazole และเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน ซึ่งในความเป็นจริงค่านี้จะต้องเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มากขึ้น เพราะค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (total activity) แต่ละขั้นตอนควรมีค่าเท่าเดิม หรือลดลงเล็กน้อย ขณะที่ค่าปริมาณโปรตีนจะลดลงเรื่อย ๆ เพราะแต่ละขั้นตอน จะกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไปมากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การผ่านคอลัมน์ Ni^{2+} -ion chromatography กิจกรรมของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255 ลดลงมาก ขณะที่ปริมาณโปรตีนลดลงเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่า specific activity และค่า purification fold น้อยกว่าที่ควรจะเป็น

ดังนั้นเพื่อที่จะทำบริสุทธิ์เอนไซม์ให้ได้ประสิทธิภาพมากที่สุด ผู้ทำการทดลอง ควรใช้อุปกรณ์ที่สะอาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรตีนเอส และใช้เวลาในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ให้สั้นที่สุด ควรตรวจเช็คอุณหภูมิของตู้เย็นที่ใช้ ให้อยู่ประมาณ 4 องศาเซลเซียสรวมถึงในขั้นตอนที่ผ่าน amicon ultra centrifugal filter เพื่อเปลี่ยน buffer และกำจัด imidazole นั้นควรนำโปรตีนที่ติดค้างอยู่ที่เมมเบรนของ amicon ultra centrifugal filter ออกให้หมด และควรตรวจเช็ค amicon ultra centrifugal filter ว่าเกิดการรั่วหรือไม่ เพื่อลดการสูญเสียปริมาณโปรตีน

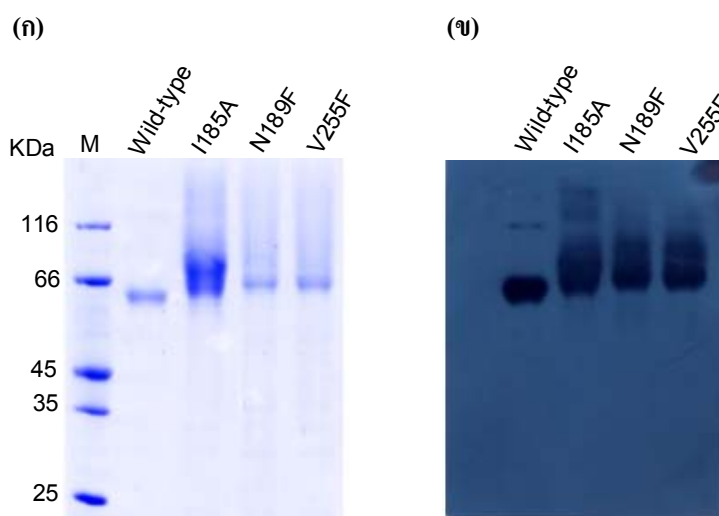
3. การตรวจสอบคุณลักษณะเบื้องต้นของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว จะถูกนำมาวิเคราะห์ โดย 10% เอสดีเอส-พอลิอะครีลาไมด์เจล และเทคนิคอิมมูโนโบลอตสำหรับโปรตีน (western blot) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู ที่จำเพาะต่อเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ เป็นแอนติบอดีชนิดที่ 1 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ และตรวจสอบว่าเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้น เป็นเอนไซม์คัลโคซิเนสตามที่คาดไว้ ผลที่ได้แสดงภาพที่ 20



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์ลักษณะเบื้องต้นของเอนไซม์คัดโคซินเนสกลายพันธุ์ครั้งละ 2 และ 3 ตำแหน่ง ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ (ก) ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (ข) Western blot ที่แสดงผลบนฟิล์ม (ค) เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัดโคซินเนสดั้งเดิม ที่ผลิตใน *E.coli* (ได้รับความอนุเคราะห์ภาพจาก paper ของ Toonkool (2006)) โดย NTRBG คือ เอนไซม์คัดโคซินเนสธรรมชาติ; wild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัดโคซินเนสดั้งเดิม และ M คือ Protein standard markers

จากผลการวิเคราะห์เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ปรากฏแถบโปรตีนที่มีลักษณะเป็นปื้น และไม่คมชัด ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิมที่ผลิตจากยีสต์ แต่แตกต่างจากเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิมที่ผลิตจาก *E.coli* (Toonkool, 2006) และเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติที่ผลิตจากพืช ที่ปรากฏแถบของโปรตีนคมชัด โดยเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด มีขนาดเท่ากับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม คือ ประมาณ 66 กิโลดาลตัน แต่มีขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *E.coli* และเอนไซม์ที่แยกได้จากธรรมชาติ ซึ่งมีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 20 ก) จากการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากจำนวนกรดอะมิโน ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด และเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม พบว่า เอนไซม์ทุกชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน การที่น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ที่ผลิตมาจากยีสต์เพิ่มขึ้นนั้น อาจเนื่องมาจากในยีสต์นั้น มีกระบวนการ glycosylation ที่มีความหลากหลาย และมีจำนวนน้ำตาลมากกว่าในพืช (ภาพที่ 22) โดยในยีสต์จะมีกระบวนการ glycosylation ทั้งแบบ *N*-linked และ *O*-linked ซึ่ง Cereghino และ Cregg (2000) ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่า ในยีสต์ *P. pastoris* มีการเติมน้ำตาลแมนโนสที่ปลาย *N*-linked core (Man₈GlcNAc₂) ตั้งแต่ 50 ถึง 150 หน่วย และจากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม ที่ผลิตได้จากยีสต์มีน้ำตาลมากกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ ซึ่งผลิตได้จากพืช ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ (Toonkool *et.al.*, 2006) ซึ่งตรงข้ามกับ *E.coli* ที่ไม่สามารถเกิดกระบวนการ glycosylation ได้เลย ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า การที่แถบโปรตีนของเอนไซม์ที่ผลิตจากยีสต์ มีลักษณะของแถบโปรตีนไม่คมชัด และมีขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *E. coli* และพืช มีสาเหตุมาจากกระบวนการ glycosylation ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด สามารถตรวจผลได้โดยใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู ที่จำเพาะต่อเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ ในเทคนิคอิมมูโนวิเคราะห์สำหรับโปรตีน (ภาพที่ 20 ข) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ทั้ง 4 ชนิด เป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

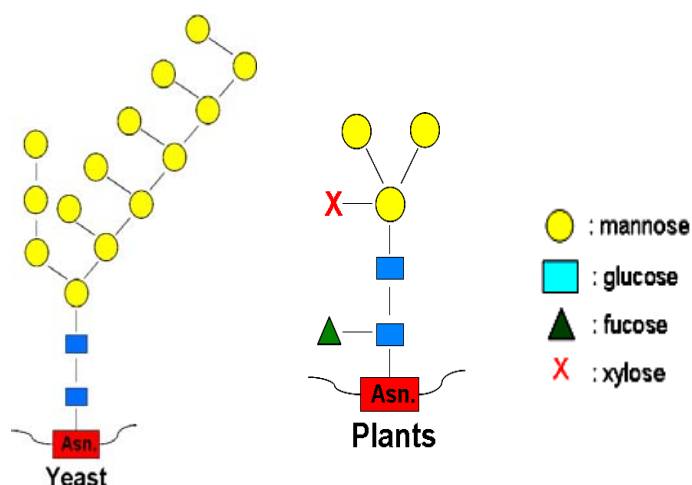


ภาพที่ 21 การวิเคราะห์เอนไซม์คัดโคซินสกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์

(ก) ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (ข) Western blot ที่แสดงผลบนฟิล์ม โดย wild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัดโคซินสกลายพันธุ์ และ M คือ Protein standard markers

นอกจากนี้ ยังพบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์แบบ 2 และ 3 ตำแหน่งที่มี I185A ร่วมอยู่ด้วย (ภาพที่ 20 ก) แสดงให้เห็นแถบของโปรตีน 2 แถบ ในแต่ละแถว จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ I185A แสดงให้เห็นแถบของโปรตีน 2 แถบ ในขณะที่ เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F และ V255F แสดงโปรตีนเพียงแถบล่างเท่านั้น (ภาพที่ 21 ก) อย่างไรก็ตาม โปรตีนทั้ง 2 แถบของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A และเอนไซม์กลายพันธุ์ 2 และ 3 ตำแหน่ง ที่ประกอบด้วย I185A ก็สามารถวิเคราะห์ผลได้โดยเทคนิคอิมมูโนวิเคราะห์สำหรับโปรตีน โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีของหนู ที่จำเพาะต่อเอนไซม์คัดโคซินสธรรมชาติ (ภาพที่ 20 ข และภาพที่ 21 ข) และเพื่อยืนยันว่าโปรตีนทั้ง 2 แถบของเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ประกอบด้วย I185A เป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเหมือนกัน จึงได้ทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล จากนั้นทำการตัดแถบของโปรตีนทั้ง 2 แถบ แยกออกจากกัน และย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass spectrometry พบว่า จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ trypsin ทำให้ได้โปรตีนเป็นชิ้นๆ มีขนาดที่แตกต่างกัน (ไม่แสดงผล) และเมื่อนำผลของการทำ Mass spectrometry ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่โดยใช้โปรแกรม Mascot พบว่า โปรตีนทั้ง 2 แถบของเอนไซม์กลายพันธุ์ มีความเหมือนกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนมากที่สุด จึงสรุปได้ว่า โปรตีนทั้ง 2 แถบ เป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เหมือนกัน ไม่ได้เป็นโปรตีนชนิดอื่นที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อน แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า โปรตีนที่แสดงให้เห็นบนเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล ทั้ง 2 แถบ เป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มี form ต่างกัน จากผลการ

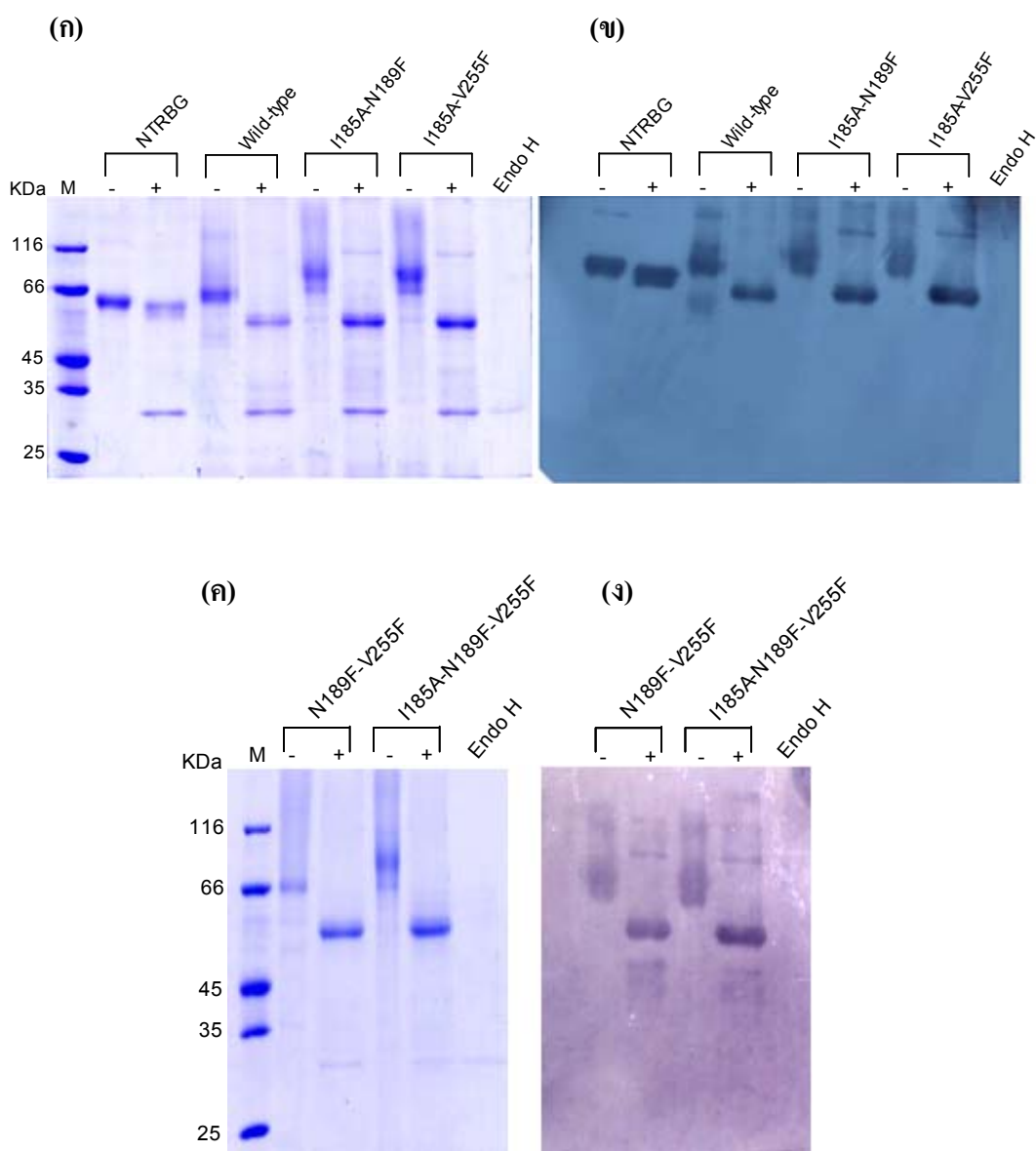
ทดลองนี้ดูเหมือนว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง I185A จะเพิ่มกระบวนการ glycosylation ของ เอนไซม์คัลโคซิเนส แต่เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโน สำหรับกระบวนการ *N*-linked glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr โดย Xaa เป็นกรดอะมิโนใดก็ได้ ยกเว้น proline) จะพบว่า ตำแหน่ง I185A ไม่ได้เป็นส่วนของ Asn-Xaa-Ser/Thr ดังนั้นการกลายพันธุ์ I185A จึงไม่เป็นการ เพิ่มตำแหน่ง *N*-linked glycosylation อย่างไรก็ตาม อาจสันนิษฐานได้ว่า การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง I185A อาจเปลี่ยน conformation ของเอนไซม์ ซึ่งอาจทำให้เกิด glycosylation เพิ่มขึ้น โดยอาจจะทำให้ตำแหน่ง glycosylation เพิ่มขึ้น หรือตำแหน่งที่เกิด glycosylation เท่าเดิม แต่จำนวนน้ำตาลที่เพิ่ม



ภาพที่ 22 แผนภาพแสดงความแตกต่างของการกระบวนการ glycosylation ระหว่างพืชกับยีสต์

ที่มา: Staudacher (2008)

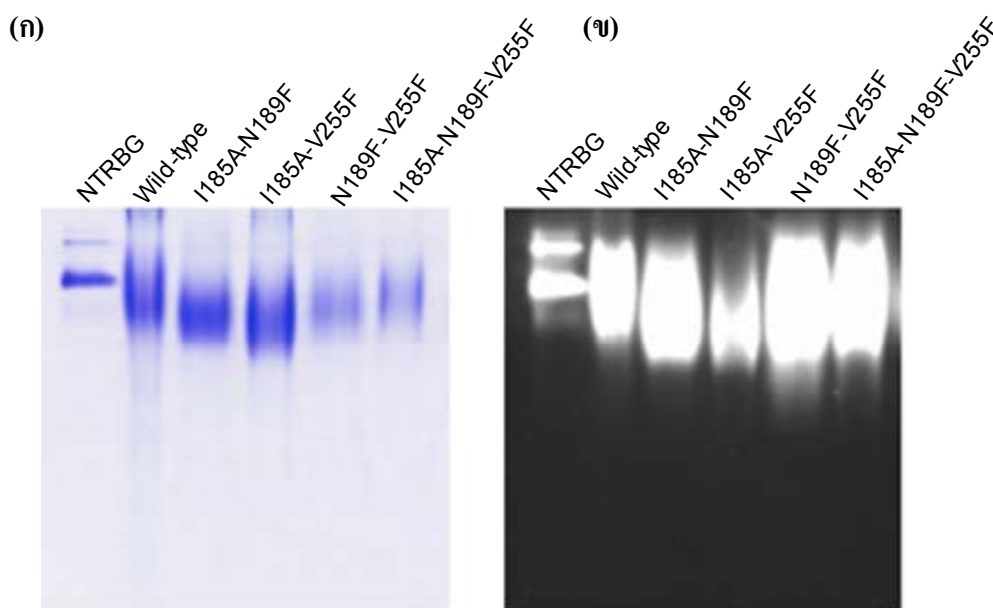
ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ข้อสันนิษฐานที่ว่า ขนาดที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่แสดงบนเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่แยกได้จากธรรมชาติ นั้น มีผลมาจากความแตกต่างของ กระบวนการ glycosylation ระหว่างเอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืช กับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากยีสต์ ผู้ทำการทดลองจึงนำเอนไซม์ทั้งหมด มาย่อยด้วยเอนไซม์ Endoglycosidase H ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะ β -(1-4) ระหว่าง *N*-acetylglucosamine ที่เชื่อมอยู่กับกรดอะมิโนแอสพาราจिन จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล ผลที่ได้แสดงภาพที่ 23



ภาพที่ 23 การย่อยเอนไซม์คัลโคซิเนสส์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยเอนไซม์ Endoglycosidase H (ก, ค) SDS-PAGE ที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (ข, ง) western blot ที่แสดงผลบนฟิล์ม โดย NTRBG คือ เอนไซม์คัลโคซิเนสส์ธรรมชาติ; wild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสส์ดั้งเดิม; M คือ Protein standard markers; – คือ โปรตีนที่ไม่ถูกย่อยด้วย Endoglycosidase H และ + โปรตีนที่ถูกย่อยด้วย Endoglycosidase H

จากผลการวิเคราะห์เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่า เมื่อย่อยโปรตีนทั้งหมดด้วย เอนไซม์ Endoglycosidase H แล้ว จะได้แถบโปรตีน 2 แถบ โดยมีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นแถบของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และขนาดประมาณ 29 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นแถบของ เอนไซม์ Endoglycosidase H (ภาพที่ 23) เห็นได้ว่าแถบของโปรตีนมีขนาดลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Endoglycosidase H โดยแถบของโปรตีนที่ได้จาก เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด มีขนาดเท่ากับแถบของโปรตีนที่ได้จากเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และสามารถตรวจผลได้โดย โมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ คัลโคซิเนสธรรมชาติ ในเทคนิคอิมมูโนวิเคราะห์สำหรับโปรตีน นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่า เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Endoglycosidase H จะมีขนาดของโปรตีนต่ำกว่าเอนไซม์ที่แยกได้จากพืชเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของกรดอะมิโนและจำนวนน้ำตาลที่ถูกเติมในกระบวนการ glycosylation ระหว่างพืชและยีสต์

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เบื้องต้น โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ทุกชนิด 0.2 Unit (หาได้จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์กับ 15 mM *p*NP-Glc) บน 7.5% นอน-ดีแนชเชอริง-พอลิอะคริลาไมด์ และตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยการย้อมเจลด้วย 1 mM 4-MU-Glc และนำไปตรวจสอบการเรืองแสงของ 4-MU ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 การวิเคราะห์ด้วยนอน-ดีแนชเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจลของเอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ก) ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (ข) ย้อมด้วย 1 mM 4-MU-Glc และตรวจสอบการเรืองแสงของ 4-MU ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดย NTRBG คือ เอนไซม์ตัดโคซิเนสธรรมชาติ และwild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ตัดโคซิเนสดั้งเดิม

จากการการวิเคราะห์ห่อเล็กโครโฟเรซิสแบบนอน-ดีแนชเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล และย้อมด้วยสับสเตรท 4-MU-Glc และ Coomassie brilliant blue โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.2 Unit พบว่า เอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด มีความสามารถในการสลายสับสเตรท 4-MU-Glc ได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F, N189F-V255F และI185A-N189F-V255F แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับใกล้เคียงกัน และมากกว่าเอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ชนิดอื่น (ภาพที่ 24 ข) แต่เมื่อนำ นอน-ดีแนชเซอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล ไปย้อมด้วย coomassie brilliant blue พบว่า เอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด (ภาพที่ 24 ก) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F มีความสามารถในการสลายสับสเตรท 4-MU-Glc ได้ดีที่สุด ในทางตรงข้าม เอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F มีกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด (ภาพที่ 24 ข) ทั้งที่มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (ภาพที่ 24 ก) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ตัดโคซิเนสธรรมชาติ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ตัดโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตัดโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F มีความสามารถในการสลายสับสเตรท 4-MU-Glc ได้น้อยที่สุด สำหรับ

เอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่อ 4-MU-Glc ในระดับที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 20 ข) และจากการวิเคราะห์อเล็กโตรโฟเรซิสแบบนอน-ดีแนซเซอร์ริง-พอลิอะครีลาไมด์เจล จะเห็นได้ว่า แอมป์โลนของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด มีลักษณะเป็นปื้น ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ ซึ่งมีลักษณะเป็นแถบโปรตีนคมชัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในยีสต์มีกระบวนการ glycosylation มากกว่าในพืช

4. จลนศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม เอนไซม์ลินามารส และเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด หาได้โดยการวัดปริมาณกลูโคสที่เป็นผลผลิตจากการสลายสับสเตรท *p*NP-Glc, Dal-Glc และ ลินามาริน (วิธีการทดลองข้อ 6) ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 7-9 และกราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กับสับสเตรทแต่ละชนิดแสดงในภาพผนวกที่ ข1-ข12

ตารางที่ 7 ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม เอนไซม์ลินามารส และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ในการสลาย *p*NP-Glc

เอนไซม์	$K_m \pm \text{S.E. (mM)}$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
คัลโคซิเนสธรรมชาติ	3.92 ± 0.46	261 ± 8.5	$66,600 \pm 8,100$
รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม	3.91 ± 0.31	237 ± 5.2	$60,600 \pm 5,000$
ลินามารส	0.72 ± 0.04	132 ± 1.3	$183,000 \pm 10,300$
I185A-N189F	2.99 ± 0.27	59 ± 1.24	$20,000 \pm 1,800$
I185A-V255F	3.26 ± 0.25	20 ± 0.33	$6,000 \pm 490$
N189F-V255F	1.09 ± 0.06	199 ± 1.36	$183,000 \pm 10,000$
I185A-N189F-V255F	1.69 ± 0.15	47 ± 0.75	$28,000 \pm 2,500$

หมายเหตุ S.E. คือ Standard error ที่ได้จากการคำนวณตามสมการ Michaelis-Menten

ตารางที่ 8 ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส
ดั้งเดิม เอนไซม์ลินามาเรส และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ในการสลาย Dal-Glc

เอนไซม์	$K_m \pm \text{S.E. (mM)}$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
คัลโคซิเนสธรรมชาติ	7.08±0.59	94±4.0	13,000±1,200
รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม	5.67±0.33	62±1.7	11,000±700
ลินามาเรส	N.D.	N.D.	N.D.
I185A-N189F	3.13±0.31	5±0.17	1,600±170
I185A-V255F	1.52±0.09	3±0.08	2,300±140
N189F-V255F	3.03±0.36	19±0.77	6,400±800
I185A-N189F-V255F	0.98±0.11	6±0.17	6,000±690

หมายเหตุ N.D.: ไม่สามารถหาค่าได้

S.E. คือ Standard error ที่ได้จากการคำนวณตามสมการ Michaelis-Menten

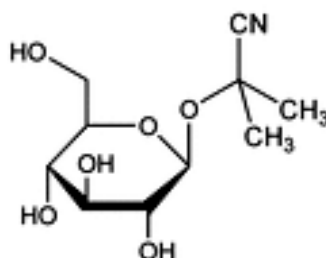
ตารางที่ 9 ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนส
เอนไซม์ลินามาเรส และเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ในการสลายลินามาริน

เอนไซม์	$K_m \pm \text{S.E. (mM)}$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
คัลโคซิเนสธรรมชาติ	N.D.	N.D.	N.D.
รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม	N.D.	N.D.	N.D.
ลินามาเรสธรรมชาติ	0.84±0.07	80±1.6	94,600±8,000
I185A-N189F	5.76±0.38	1±0.01	90±6
I185A-V255F	68.24±9.09	1±0.11	15±3
N189F-V255F	N.D.	N.D.	N.D.
I185A-N189F-V255F	N.D.	N.D.	N.D.

หมายเหตุ N.D.: ไม่สามารถหาค่าได้

S.E. คือ Standard error ที่ได้จากการคำนวณตามสมการ Michaelis-Menten

จากตารางที่ 7-9 พบว่า เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการสลาย *p*NP-Glc และ Dal-Glc ซึ่งเปรียบเทียบได้กับค่า k_{cat}/K_m คล้ายคลึงกัน สำหรับเอนไซม์ลินามาเรสในการสลาย *p*NP-Glc พบว่ามีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนในบริเวณจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์ลินามาเรสมีความเหมาะสม สำหรับการจับกับส่วน *p*NP ของสับสเตรทมากกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และในการสลายลินามาริน พบว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ ไม่สามารถสลายสับสเตรทลินามารินได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะลินามารินมีโครงสร้างที่มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ ต่ออยู่กับอะตอมของคาร์บอนที่สร้างพันธะเบต้า-กลูโคซิดิกกับน้ำตาลกลูโคส (ภาพที่ 25) ซึ่งโครงสร้างลักษณะนี้อาจขัดขวางการเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิมและเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ (Svasti *et al.*, 2003) ในขณะเดียวกัน เอนไซม์ลินามาเรสก็ไม่สามารถสลายสับสเตรท Dal-Glc ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์คัลโคซิเนสได้เช่นกัน อาจเป็นเพราะโครงสร้างของหมู่อะไกลโคโคนของสับสเตรท Dal-Glc มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะเข้าจับกับส่วนจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์ลินามาเรส ในขณะที่ลินามารินซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาเรสมีขนาดเล็กกว่าสับสเตรท Dal-Glc มาก



ภาพที่ 25 โครงสร้างของสับสเตรทลินามาริน

ที่มา: Cereda and Mattos (1996)

ในการสลาย *p*NP-Glc ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 2-3 ตำแหน่งทั้ง 4 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม พบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F มีค่า K_m ลดลงมาก (ประมาณ 4 เท่า) ในขณะที่ค่า k_{cat} ก่อนข้างคงที่ ซึ่งส่งผลให้มีค่า k_{cat}/K_m สูงกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และยังใกล้เคียงกับเอนไซม์ลินามาเรส แต่ในทางตรงกันข้าม เมื่อพิจารณาเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่มี I185A ร่วมอยู่ด้วย (I185A-

N189F, I185A-V255F และ I185A-N189F-V255F) พบว่ามีค่า k_{cat} ลดลงมาก ในขณะที่ค่า K_m ลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งก็ทำให้ค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์กลายพันธุ์เหล่านี้ลดลงด้วย (2-10 เท่า) นอกจากนี้ถ้าเพิ่ม I185A ลงในเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F พบว่าสัดส่วนของค่า k_{cat}/K_m ลดลงประมาณ 7 เท่า แสดงให้เห็นว่า N189F และ V255F เป็นตำแหน่งกลายพันธุ์ที่เพิ่มความสามารถในการจับกับ *p*NP-Glc ในขณะที่ I185A เป็นตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ลดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน F205 และ F271 ในเอนไซม์ลินามาเรส (ตรงกับตำแหน่ง N189 และ V255 ในเอนไซม์คัลโคซิเนส ตามลำดับ) เป็นตำแหน่งที่ทำให้เอนไซม์จับกับ *p*NP-Glc ด้วยค่า K_m ที่ต่ำ อาจเป็นเพราะการแทนที่แอสปารากีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทมีขั้ว ด้วยฟีนิลอะลานีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว และการแทนที่วาลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว ด้วยฟีนิลอะลานีนที่มีแขนงข้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก และมีขนาดใหญ่กว่าแขนงข้างของวาลีนซึ่งเป็นประเภทอะลิฟาติก ส่งผลให้สภาพแวดล้อมบริเวณจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์มีความเป็น hydrophobic เพิ่มขึ้น และทำให้เกิด hydrophobic interaction กับ *p*NP-Glc ซึ่งมีส่วนอะไกลโคโคนที่มีความเป็น hydrophobic ได้มากขึ้น นอกจากนี้แขนงข้างของฟีนิลอะลานีนที่มีขนาดใหญ่กว่าแขนงข้างของวาลีน อาจส่งผลให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงสับสเตรทที่มีหมู่อะไกลโคโคนขนาดเล็กอย่าง *p*NP-Glc ได้ดี สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ที่มี I185A ร่วมอยู่ด้วย จะมีประสิทธิภาพการทำงานลดลง แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน A201 ในเอนไซม์ลินามาเรส เป็นตำแหน่งที่ไม่ดีสำหรับการเร่งปฏิกิริยา อาจเป็นเพราะการแทนที่ไอโซลิวซีนด้วยอะลานีน ทำให้ช่องว่างในบริเวณจับสับสเตรทใหญ่ขึ้น อาจมีผลทำให้การวางตัวของน้ำตาลเปลี่ยนไป ซึ่งอาจอยู่ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ในการสลายสับสเตรท Dal-Glc ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 2-3 ตำแหน่งทั้ง 4 ชนิด พบว่า ค่า K_m ในการสลาย Dal-Glc ลดลงเล็กน้อย (2-6 เท่า) ในขณะที่ค่า k_{cat} ลดลงมากกว่า 10 เท่า ยกเว้นเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ที่มีค่า k_{cat} ลดลงเพียง 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนตำแหน่ง A201, F205 และ F271 ในเอนไซม์ลินามาเรส (ตรงกับตำแหน่ง I185, N189F และ V255 ในเอนไซม์คัลโคซิเนส ตามลำดับ) เป็นตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ลดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลาย Dal-Glc อาจเนื่องมาจากการแทนที่ไอโซลิวซีน ด้วยอะลานีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างสั้นกว่า และการแทนที่แอสปารากีนและวาลีน ด้วยฟีนิลอะลานีน ซึ่งมีแขนงข้างที่ยาวกว่า อาจทำให้การวางตัวของสับสเตรทเปลี่ยนไป ทำให้น้ำตาลอยู่ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และเมื่อเปรียบเทียบค่า k_{cat} ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ด้วยกันเอง พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F มีค่า k_{cat} สูงที่สุด แต่เมื่อเพิ่มตำแหน่งกลายพันธุ์ I185A (I185A-N189F-

V255F) เข้าไป ซึ่งทำให้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์นี้ มีกรดอะมิโนเหมือนเอนไซม์ลินามาเรส มากที่สุด พบว่าค่า k_{cat} ของเอนไซม์กลายพันธุ์นี้ ลดลง 3 เท่าของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ซึ่งให้เห็นว่า กรดอะมิโนตำแหน่ง A201 ในเอนไซม์ลินามาเรส มีผลอย่างมากต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คัลโคซิเนส อาจเป็นเพราะ การแทนที่ไอโซลิวซีนด้วยอะลานีน ซึ่งมีแขนงข้างสั้นกว่า อาจทำให้การวางตัวของสับสเตรทในบริเวณจับอะไกลโคโคนเปลี่ยนไป ทำให้วงน้ำตาลอยู่ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

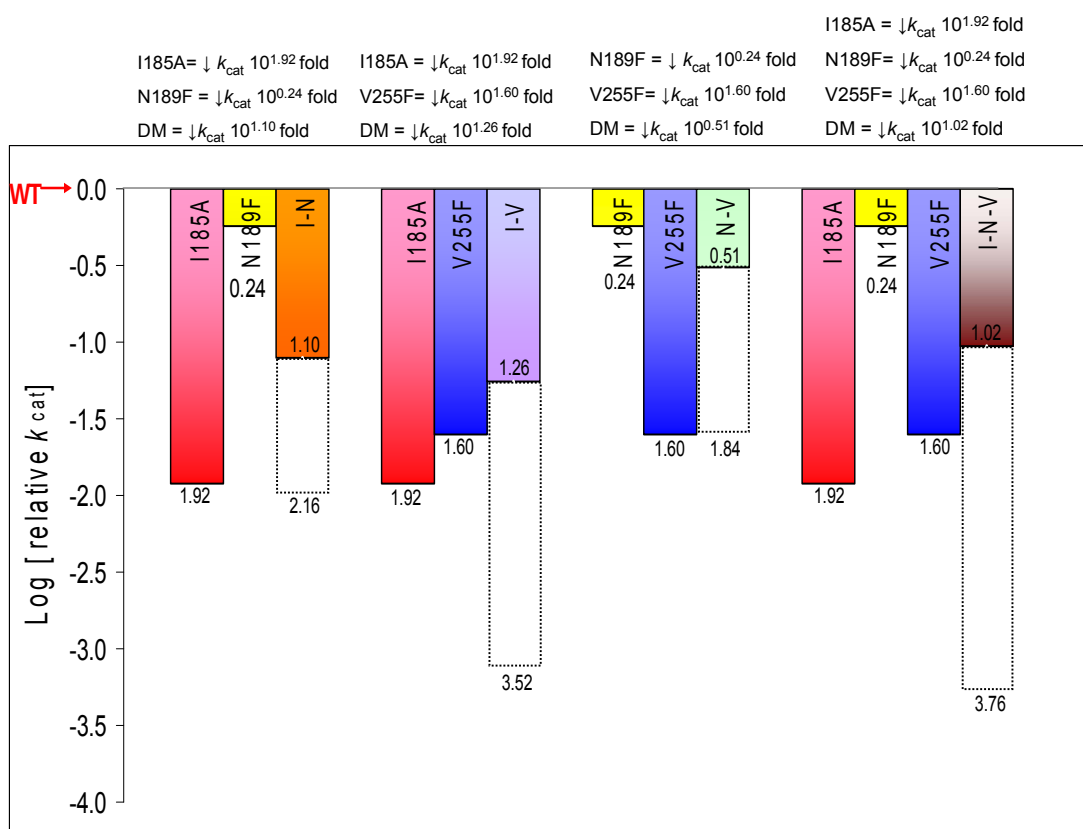
เมื่อพิจารณาค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์เหล่านี้มีค่า k_{cat}/K_m ลดลงตั้งแต่ 2-7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และเมื่อเปรียบเทียบค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ด้วยกันเอง พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F มีประสิทธิภาพการทำงานใกล้เคียงกัน ซึ่งสูงกว่า I185A-N189F และ I185A-V255F ประมาณ 3-4 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าเพิ่ม V255F ลงในเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F (I185A-N189F-V255F) ค่า k_{cat}/K_m เพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลายพันธุ์ที่มี N189 อยู่กับ I185A เพียงลำพัง และถ้าเพิ่ม N189F ลงในเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-V255F (I185A-N189F-V255F) ค่า k_{cat}/K_m จะเพิ่มขึ้น 3 เท่า จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การทำงานร่วมกัน ของกรดอะมิโนในตำแหน่ง F205 และ F271 ของเอนไซม์ลินามาเรส ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์คัลโคซิเนส ได้ดีกว่าการมี F อยู่เพียงลำพังในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง อาจเป็นเพราะการแทนที่แอสปารากีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทมีขั้ว ด้วยเฟนิลอะลานีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว และการแทนที่วาลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว ด้วยเฟนิลอะลานีนที่มีแขนงข้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก และมีขนาดใหญ่กว่าแขนงข้างของวาลีนซึ่งเป็นประเภทอะลิฟาติก ส่งผลให้สภาพแวดล้อมบริเวณจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์มีความเป็น hydrophobic เพิ่มขึ้น จึงสามารถจับและสลายสับสเตรท Dal-Glc ได้ดีขึ้น สำหรับการที่เอนไซม์กลายพันธุ์ I185A ทำงานร่วมกับ N189F หรือ V255F เพียง 1 ตำแหน่ง ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานลดลงกว่าการที่มีทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ร่วมกัน อาจเนื่องมาจากการแทนที่ไอโซลิวซีน ด้วยอะลานีน ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ตำแหน่ง เป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้วเหมือนกัน แต่กรดอะมิโนอะลานีนมีแขนงข้างสั้นกว่า รวมทั้งการแทนที่ด้วยเฟนิลอะลานีน ที่เป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้ว เพียงตำแหน่งเดียว อาจส่งผลให้ความเป็น hydrophobic ของสภาพแวดล้อมในบริเวณจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์ลดลง ดังนั้น hydrophobic interaction ระหว่าง Dal-Glc กับเอนไซม์กลายพันธุ์จึงลดลงด้วย นอกจากนี้ การแทนที่ไอโซลิวซีนด้วยอะลานีน อาจทำให้การวางตัวของสับสเตรทเปลี่ยนไป ทำให้วงน้ำตาลอยู่ในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม ในการจับและเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

จากผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ในการสลายสับสเตรท Dal-Glc ซึ่งเป็น
 สับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์คัลโคซิเนส ผู้ทำการทดลองได้ทำการแปรผลเชิงปริมาณ เพื่อ
 อธิบายหน้าที่ของกรดอะมิโนแต่ละตำแหน่ง และอันตรกิริยาที่มีระหว่างกัน โดยคำนวณจำนวนเท่า
 ของการลดลงของค่า k_{cat} และ K_m เปรียบเทียบกับค่า k_{cat} และ K_m ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโค
 ซิเนสดั้งเดิม ตามวิธีของ Mildvan ในปี 2004 (ตารางที่ 10)

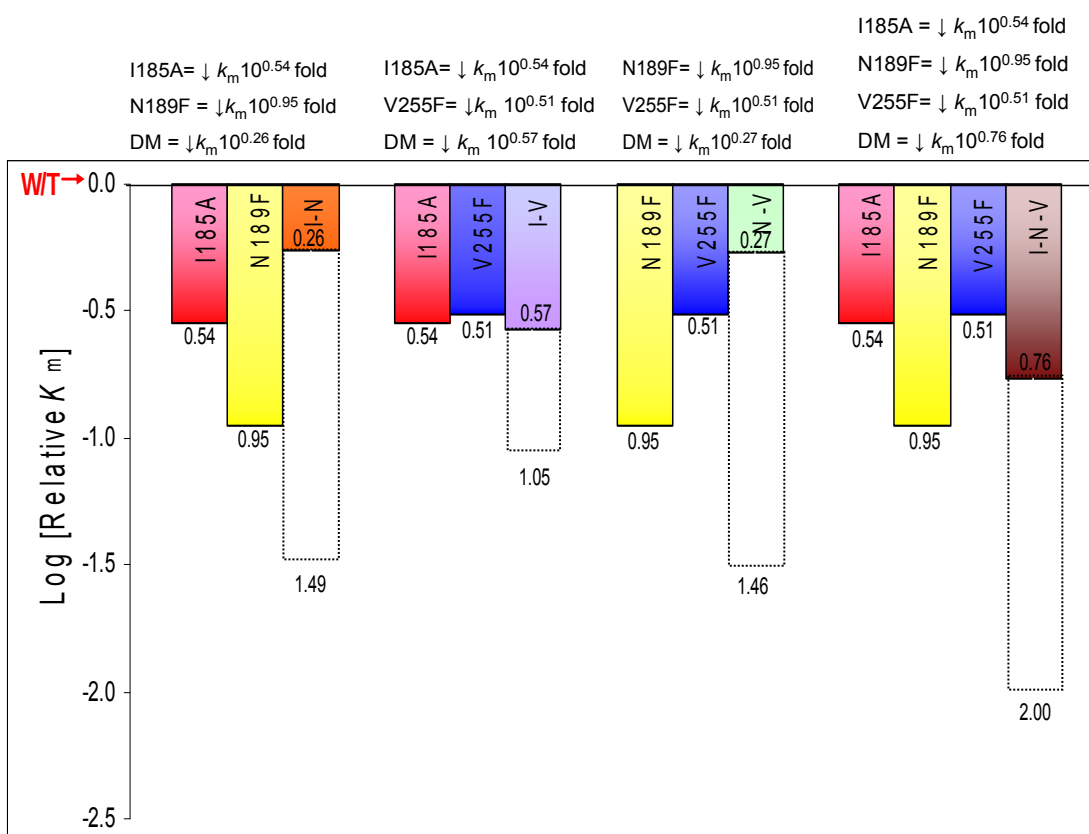
ตารางที่ 10 ค่า k_{cat} และ K_m ของการสลาย Dal-Glc ที่ลดลง เปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์
 คัลโคซิเนสดั้งเดิม

เอนไซม์คัลโคซิเนส กลายพันธุ์	k_{cat}			K_m		
	experimental		expected	experimental		expected
	fold-	Log fold-	Log fold-	fold-	Log fold-	Log fold-
	change	change	change	change	change	change
I185A	84	1.92	-	4	0.54	-
N189F	2	0.24	-	9	0.95	-
V255F	40	1.60	-	3	0.51	-
I185A-N189F	13	1.10	2.16	2	0.26	1.49
I185A-V255F	18	1.26	3.52	4	0.57	1.05
N189F-V255F	3	0.51	1.84	2	0.27	1.46
I185A-N189F-V255F	11	1.02	3.76	6	0.76	2.00

นำค่า log ของจำนวนเท่าที่เปลี่ยน ของ k_{cat} และ K_m เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอม
 บิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม จากตารางที่ 10 มาวิเคราะห์ตาม Mildvan ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 26-27



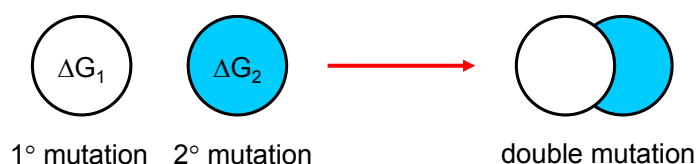
ภาพที่ 26 อันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์กลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง ต่อการเร่งปฏิกิริยา (k_{cat}) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม (W/T) โดยเส้นปะ แสดงถึงผลบวกของค่า log ของจำนวนเท่าที่เปลี่ยน ของ k_{cat} ระหว่าง เอนไซม์กลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง 2 และ 3 ชนิด



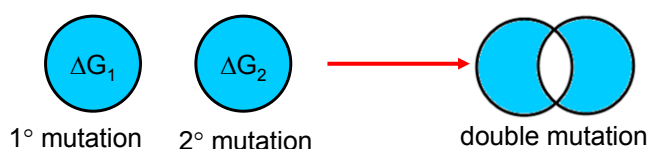
ภาพที่ 27 อันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์กลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง ต่อการจับซับสเตรท (K_m) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม (W/T) โดยเส้นปะ แสดงถึงผลบวกของค่า log ของจำนวนเท่าที่เปลี่ยน ของ k_{cat} และ K_m ระหว่าง เอนไซม์กลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง 2 และ 3 ชนิด

เมื่อพิจารณาค่า log ของจำนวนเท่าที่เปลี่ยนของ k_{cat} และค่า log ของจำนวนเท่าที่เปลี่ยนของ K_m เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ 2-3 ตำแหน่งทุกชนิดมีค่า k_{cat} ลดลงน้อยกว่าค่าที่คาดไว้ ($\Delta G_{1+2} = \Delta G_1 + \Delta G_2$) และน้อยกว่าการทำกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 26 และ 27) ในขณะเดียวกันเอนไซม์กลายพันธุ์ครั้งละ 2-3 ตำแหน่งทุกชนิด ยกเว้น I185A-V255F มีค่า K_m ลดลงน้อยกว่าค่าที่คาดไว้ และน้อยกว่าการทำกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง เช่นเดียวกัน จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทุกชนิด มีผลของการกลายพันธุ์ในการเร่งปฏิกิริยา และการจับกับซับสเตรทเป็นแบบ Antagonistic ($\Delta G_{1+2} < \Delta G_1$) ยกเว้นผลของการจับซับสเตรทของ I185A-V255F ซึ่งเกิดเนื่องจากกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำงานให้ผลตรงข้ามกัน (opposing effects)

ในการเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน โดยผลของการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ดี จะหักล้างผลของการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ไม่ดี (ภาพที่ 9)

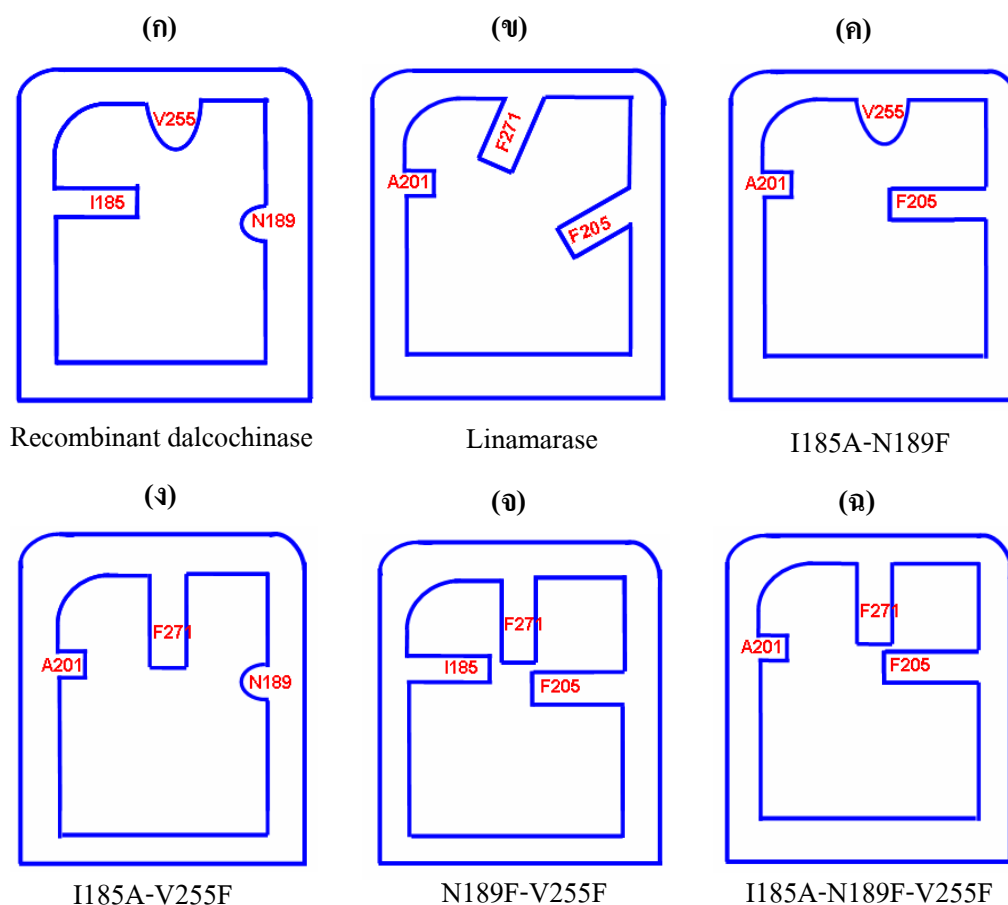


สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F เมื่อพิจารณาค่า $\log$ ของจำนวนเท่าที่เปลี่ยนของ K_m พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-V255F มีค่า K_m ลดลงน้อยกว่าค่าที่คาดไว้ คือ $10^{1.05}$ เท่า แต่มากกว่าการทำการกลายพันธุ์เพียง 1 ตำแหน่งเล็กน้อย (ภาพที่ 27) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-V255F มีผลของการกลายพันธุ์ในการจับกับสับสเตรท เป็นแบบ partially additive effects ($\Delta G_1 < \Delta G_{1+2} < \Delta G_1 + \Delta G_2$) ซึ่งเกิดเนื่องจาก ทั้ง A185 และ F255 ในเอนไซม์คัลโคซิเนสทำงานร่วมกันในการเร่งปฏิกิริยาเดียวกันในการจับกับสับสเตรท (ภาพที่ 7)



เมื่อพิจารณาค่าจลนศาสตร์ในการสลายสับสเตรทลินามารินของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 2-3 ตำแหน่งทั้ง 4 ชนิด พบว่า มีเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 2 ชนิด ที่สามารถสลายสับสเตรทลินามารินได้ คือ I185A-N189F และ I185A-V255F ซึ่งเป็นที่น่าสนใจ เพราะเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่ง N189F-V255F และเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่ง ไม่สามารถสลายลินามารินได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนตำแหน่ง A201 ในเอนไซม์ลินามาเรสช่วยเพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา แต่ A201 เพียงตำแหน่งเดียวไม่เพียงพอในการเพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา โดยต้องทำงานร่วมกับ F201 หรือ F271 ในเอนไซม์ลินามาเรส โดยเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F และ I185A-V255F มีค่า k_{cat} เท่ากัน แต่ I185A-N189F มี K_m น้อยกว่า I185A-V255F จึงส่งผลให้ I185A-N189F มีค่า k_{cat}/K_m มากกว่า I185A-V255F ด้วย แสดงให้เห็นว่า การแทนที่กรดอะมิโนแอสปารจีนที่ตำแหน่ง 189 ของเอนไซม์คัลโคซิเนส ด้วยกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีน ทำให้รูปร่างในบริเวณช่องจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์คัลโคซิเนส มีความเหมาะสมในการรับและตัดลินามาริน

มากกว่าการแทนที่กรดอะมิโนวาเลินที่ตำแหน่ง 255 ด้วยเฟนิลอะลานีน (ภาพที่ 28 ค และง) นอกจากรูปร่างแล้ว อาจเป็นเพราะการแทนที่กรดอะมิโนแอสปารากีนที่ตำแหน่ง 189 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทมีขั้ว ด้วยกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีน ซึ่งไม่มีขั้ว อาจทำให้มีความเหมาะสมในการรับและตัดลินามารินซึ่งเป็นสารประเภทไม่มีขั้วมากกว่า ในขณะที่การแทนที่กรดอะมิโนวาเลินที่ตำแหน่ง 255 ด้วยเฟนิลอะลานีน ไม่ได้เปลี่ยนคุณสมบัติของกรดอะมิโน เพราะกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิด เป็นกรดอะมิโนประเภทไม่มีขั้วเหมือนกัน สำหรับเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F ซึ่งไม่สามารถสลายสับสเตรทลินามารินได้ แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนตำแหน่ง F205 และ F271 ในเอนไซม์ลินามาเรส ทำงานตรงข้ามกัน เพราะจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เมื่อมีกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีนทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ด้วยกัน จะไม่สามารถตัดลินามารินได้ อาจเนื่องมาจากการแทนที่กรดอะมิโนแอสปารากีนที่ตำแหน่ง 189 ร่วมกับแทนที่กรดอะมิโนวาเลินที่ตำแหน่ง 255 ด้วยเฟนิลอะลานีนทั้ง 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ อาจทำให้แขนงข้างที่มีขนาดใหญ่นี้ขัดขวางการเข้าจับบริเวณเร่งของสับสเตรทลินามาริน ซึ่งมีโครงสร้างที่มีหมู่อะไกลโคนที่มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ ติดอยู่กับอะตอมของคาร์บอน (ภาพที่ 28 จ)



ภาพที่ 28 แผนภาพจำลอง แสดงแขนงข้างของกรดอะมิโนที่เข้าไปในบริเวณจับอะไกลโคโคน ของ เอนไซม์ดัลโคซินะสกลายพันธุ์ 2 และ 3 ตำแหน่ง โดย (ก) เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ดัลโคซินะดั้งเดิม (ข) เอนไซม์ลินามาเรส (ค) เอนไซม์ดัลโคซินะสกลายพันธุ์ I185A-N189F (ง) เอนไซม์ดัลโคซินะสกลายพันธุ์ I185A-V255F (จ) เอนไซม์ดัลโคซินะสกลายพันธุ์ N189F-V255F (ฉ) เอนไซม์ดัลโคซินะสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F; A : กรดอะมิโนอะลานีน I: กรดอะมิโนไอโซลิวซีน F: กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน N: กรดอะมิโนแอสปารากีน และ V: กรดอะมิโนวาลีน

สำหรับเอนไซม์ดัลโคซินะสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ซึ่งมีกรดอะมิโนเหมือนกับเอนไซม์ลินามาเรสมากที่สุด ไม่สามารถสลายสับสเตรทลินามารินได้ และที่น่าประหลาดใจคือเอนไซม์สกลายพันธุ์ I185A-N189F และ I185A-V255F ซึ่งมีกรดอะมิโนเหมือนกับเอนไซม์ลินามาเรสน้อยกว่าเอนไซม์สกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่ง แต่สามารถสลายสับสเตรทลินามารินได้ อาจเป็นเพราะการทำกลายพันธุ์เพียง 2 ตำแหน่ง ทำให้รูปร่างในบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์ดัลโคซินะสกลายพันธุ์ มีความเหมาะสม มากกว่าการทำกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่ง สำหรับการรับ

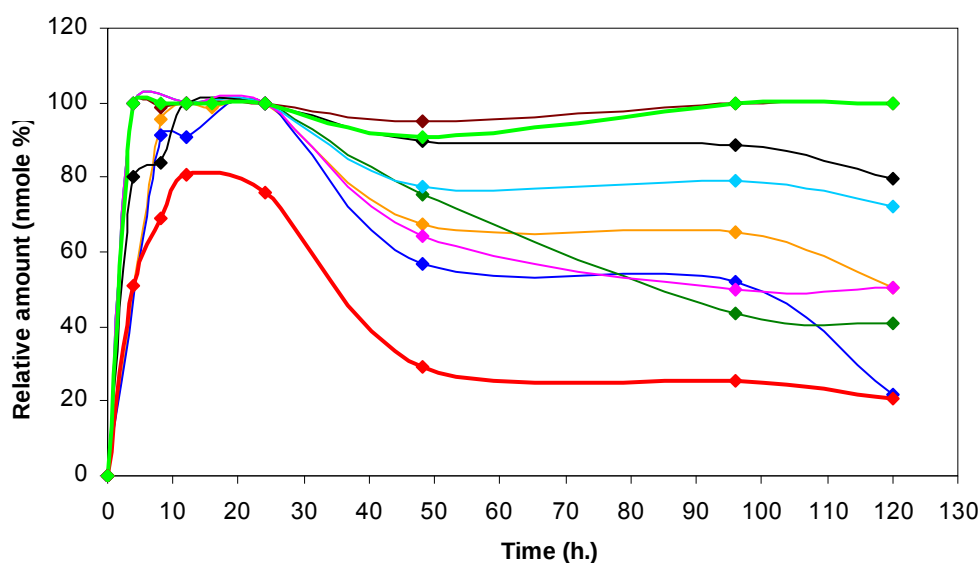
สับสเตรทลินามาริน เพราะในเอนไซม์กลายพันธุ์ 3 ตำแหน่งนั้น มีกรดอะมิโนฟีนีลอะลานีนถึง 2 ตำแหน่ง ซึ่งอาจทำให้ช่องว่างในบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์ลดลง (ภาพที่ 28 จ) อาจทำให้สับสเตรทลินามารินเข้าไปในบริเวณดังกล่าวได้ยาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ที่ไม่สามารถสลายลินามารินได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามในเอนไซม์ลินามารเอส ซึ่งมีกรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่งเหมือนกัน สามารถสลายลินามารินได้ แสดงให้เห็นว่า อาจมีกรดอะมิโนในเอนไซม์ลินามารเอสที่มีแขนงข้างยื่นเข้าไปในช่องจับอะไกลโคนในตำแหน่งอื่น ซึ่งอาจมีความสำคัญกับรูปร่างในบริเวณช่องจับอะไกลโคนของเอนไซม์ลินามารเอส ซึ่งทำให้เหมาะสมในการสลายลินามารินได้ ดังนั้น อาจจะทำให้การกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่น โดยทำลาย ๆ ตำแหน่งพร้อมกัน เพื่อให้รูปร่างในบริเวณช่องจับสับสเตรท ของเอนไซม์ดัลโคซิเนส มีความเหมาะสมที่จะรับสับสเตรทลินามารเอสมากขึ้น

เพื่อให้เกิดความแม่นยำและน่าเชื่อถือของผลการทดลอง ผู้ทำทดลองจึงเลือกใช้ค่าทางจลนศาสตร์จากกราฟ Michaelis-Menten ที่มีค่า R^2 ตั้งแต่ 0.99 ขึ้นไป (ภาคผนวก ข) เนื่องจากการหาค่า K_m ต้องการความแม่นยำสูง และค่า K_m มีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายถ้ามีความคลาดเคลื่อนในการทดลองเพียงเล็กน้อย ความคลาดเคลื่อนในการทดลองอาจเกิดจากผู้ทำการทดลองไม่มีความแม่นยำในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา เช่น เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา หรือปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ อาจไม่แม่นยำ นอกจากนี้เอนไซม์ที่ใช้ก็ต้องมีความบริสุทธิ์ เพื่อที่จะได้ค่า k_{cat} ที่ถูกต้องแม่นยำ

5. การเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์

5.1. การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปริมาณ 0.1 unit มาทำปฏิกิริยากับ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส และ 0.9 M *n*-butanol เป็นตัวรับกลูโคส ใน 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 ให้มีปริมาตรรวม 0.1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บผลผลิตที่เวลาต่าง ๆ กัน นำไปวิเคราะห์ผลโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีบนชั้นบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) และนำไปวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่อง scanning densitometry จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณเพื่อเปลี่ยนเป็นค่า % mole ของ alkyl glucoside (Svasti *et al.*, 2003) และสร้างกราฟระหว่าง % mole ต่อเวลา โดยผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 29



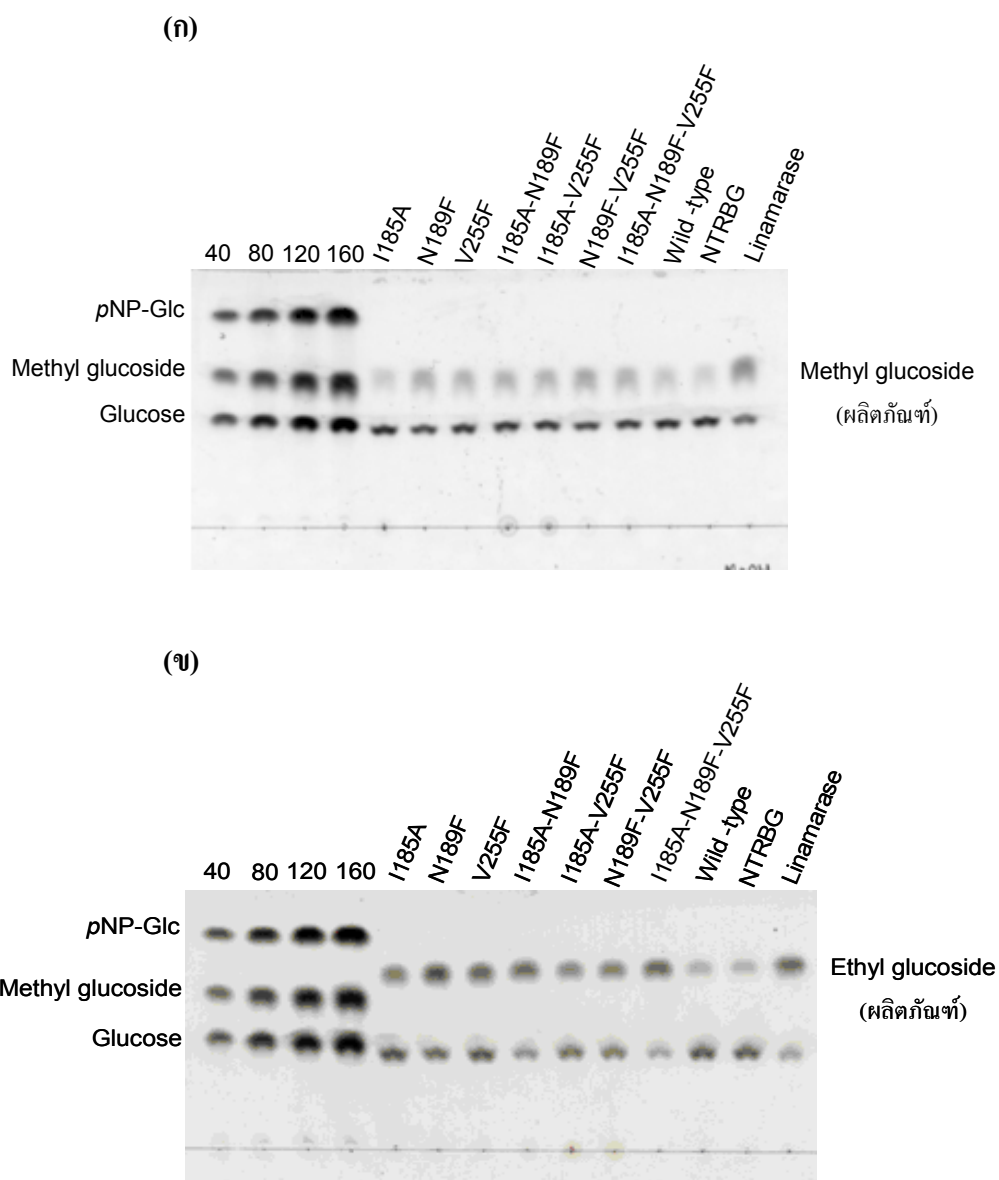
ภาพที่ 29 % Mole ของ *n*-butyl glucoside ที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยหมู่อะมิโนโคสที่เวลาต่าง ๆ กัน โดยใช้ *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส และใช้ 0.9 M *n*-butanol เป็นตัวรับกลูโคส โดยเอนไซม์คัลโคซินในสกลายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ I185A (◆), N189F (◆), V255F (◆), I185A-N189F (◆), I185A-V255F (◆), N189F-V255F (◆), I185A-N189F-V255F (◆) และเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซินสเต็ม (◆) เอนไซม์ลินามารเอส (◆)

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของ *n*-butyl glucoside ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยานี้จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง และจะลดลงหลังจากผ่าน 24 ชั่วโมงไปแล้ว สำหรับเอนไซม์ทุกชนิด ยกเว้นปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์คัลโคซินในสกลายพันธุ์ I185A-V255F, I185A-N189F-V255F และ เอนไซม์ลินามารเอส ที่มีสัดส่วนของ *n*-butyl glucoside ก่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถสลายผลิตภัณฑ์ *n*-butyl glucoside ได้ไม่ดี ส่วนเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซินสเต็ม สามารถผลิต *n*-butyl glucoside ได้น้อย และยังสามารถสลายผลิตภัณฑ์ได้ดี ทำให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์สุทธิน้อยกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ และจากการที่สัดส่วนของ *n*-butyl glucoside ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเกิดการสลายของ *n*-butyl glucoside เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเป็นเวลานาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งพบว่า สัดส่วนของ alkyl glucoside เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง และจะลดลงอย่างรวดเร็ว พร้อม ๆ กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคส หลังจากผ่าน 24 ชั่วโมงไปแล้ว เมื่อใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันปะหลังปริมาณ 16.7 nkat/ml ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองนี้ (Savasti *et al.*, 2003) ดังนั้นในการทดลองต่อไป ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบสมบัติการเร่งปฏิกิริยาย่อย

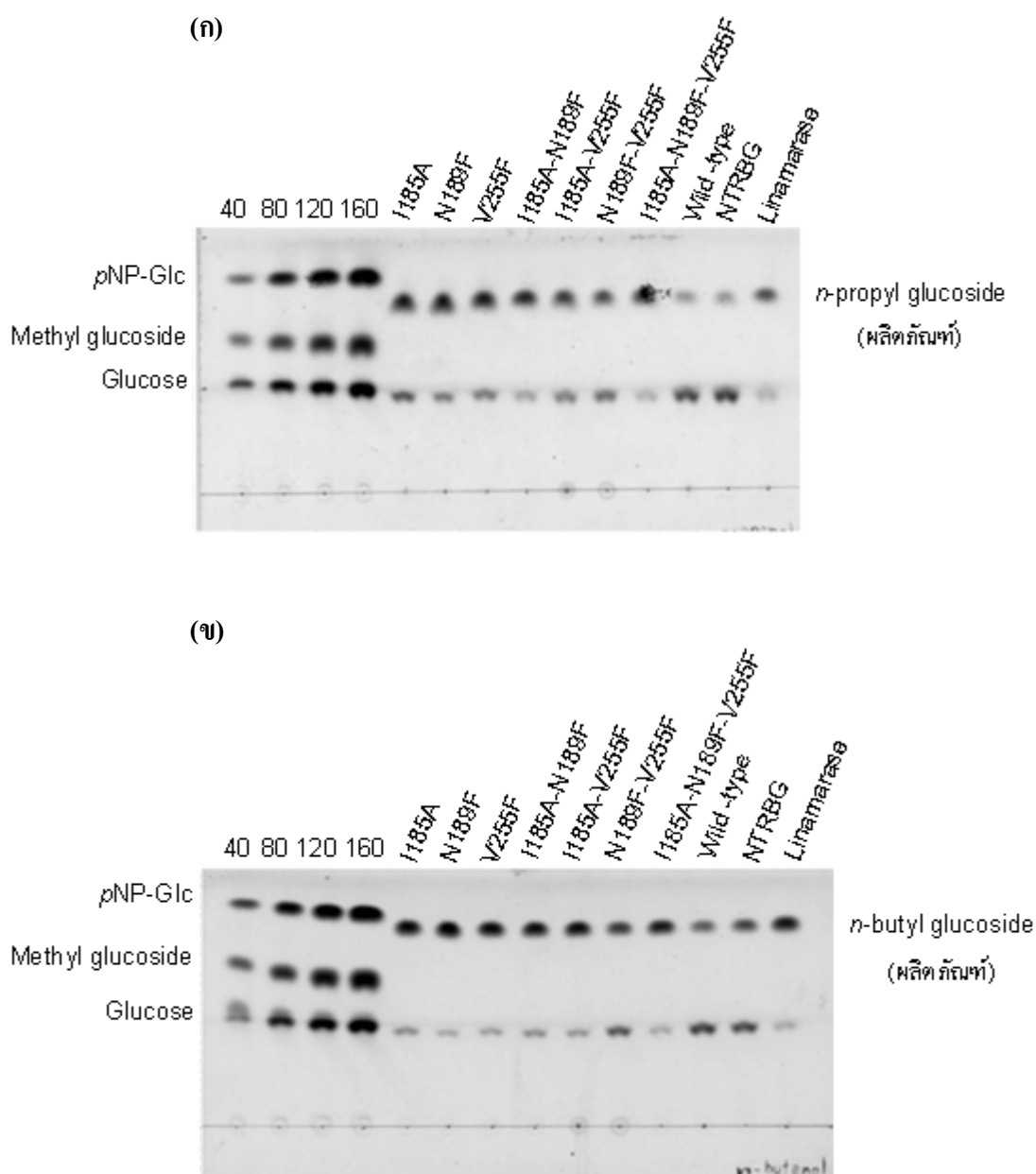
หมุกกูโคสโดยเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ผู้ทำการทดลองจึงจะเลือกใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาย้ายหมุกกูโคสเท่ากับ 20 ชั่วโมง สำหรับทุกเอนไซม์ที่จะใช้ในการทำปฏิกิริยาย้ายหมุกกูโคส

5.2. เปรียบเทียบสมบัติการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมุกกูโคสโดยเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

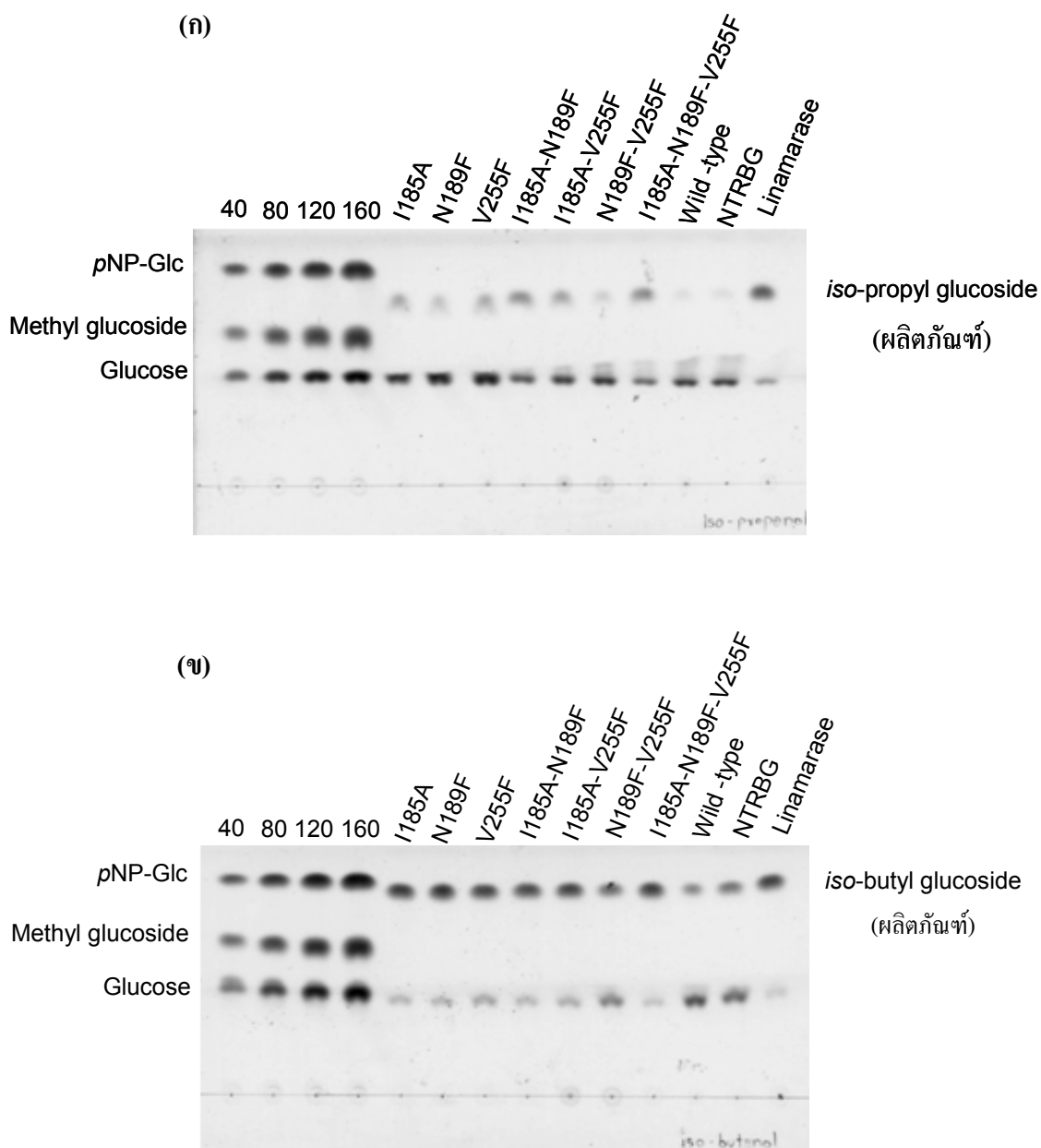
จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า แอลกอฮอล์บางชนิด เช่น *n*-butanol, *iso*-butanol และ *sec*-butanol มีข้อจำกัดในการเพิ่มความเข้มข้น เช่นที่ความเข้มข้น 10 M เอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติไม่สามารถผลิต *n*-butyl glucoside ได้ (Svasti and Lirdprapamongkol, 2000) อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงๆ ทำให้ความสามารถในการละลายของแอลกอฮอล์ลดลง ซึ่งส่งผลให้การเกิดปฏิกิริยานั้นไม่ดี เพราะจะเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำและแอลกอฮอล์ หรืออาจเป็นเพราะเมื่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ทำให้กิจกรรมของน้ำ (water activity) ลดลง ซึ่งน้ำจะมีความสำคัญในการช่วยทำให้เอนไซม์ละลาย จากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาย้ายหมุกกูโคสโดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากเชื้อ *Thermotoga neapolitana* เท่ากับ 16% (Turner *et al.*, 2007) ในทางตรงข้ามถ้าใช้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่า 0.9 M เช่น 0.5 หรือ 0.6 M พบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาย้ายหมุกกูโคสได้ แต่ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะต่ำกว่าการใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 0.9 M เช่น ที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 0.5 M จะพบว่าสัดส่วนของ *n*-butyl glucoside เท่ากับ 78 % แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 0.9 M จะได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 89 % (Svasti and Lirdprapamongkol, 2000) ดังนั้นในการเปรียบเทียบปฏิกิริยาย้ายหมุกกูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ เป็นตัวรับกลูโคส ผู้ทำการทดลองจึงจะใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 0.9 M ในการศึกษาปฏิกิริยาย้ายหมุกกูโคส โดยนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ปริมาณ 0.1 unit มาทำปฏิกิริยาโดยใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส และใช้ 0.9 M methanol, ethanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol และ *tert*-butanol เป็นตัวรับกลูโคส ปรับปริมาตรให้ได้ 100 μ l ด้วย 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยในการทดลองนี้ได้ใช้เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง ในการทำปฏิกิริยาย้ายหมุกกูโคสด้วย เพื่อความแม่นยำในการเปรียบเทียบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเทคนิค TLC และนำไปวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่อง scanning densitometry โดยปริมาณของ alkyl glucoside จะถูกแสดงในรูปของ % mole โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส *p*NP-Glc และเมทิล กลูโคไซด์ (ภาคผนวก ข) ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 30-33 และตารางที่ 11



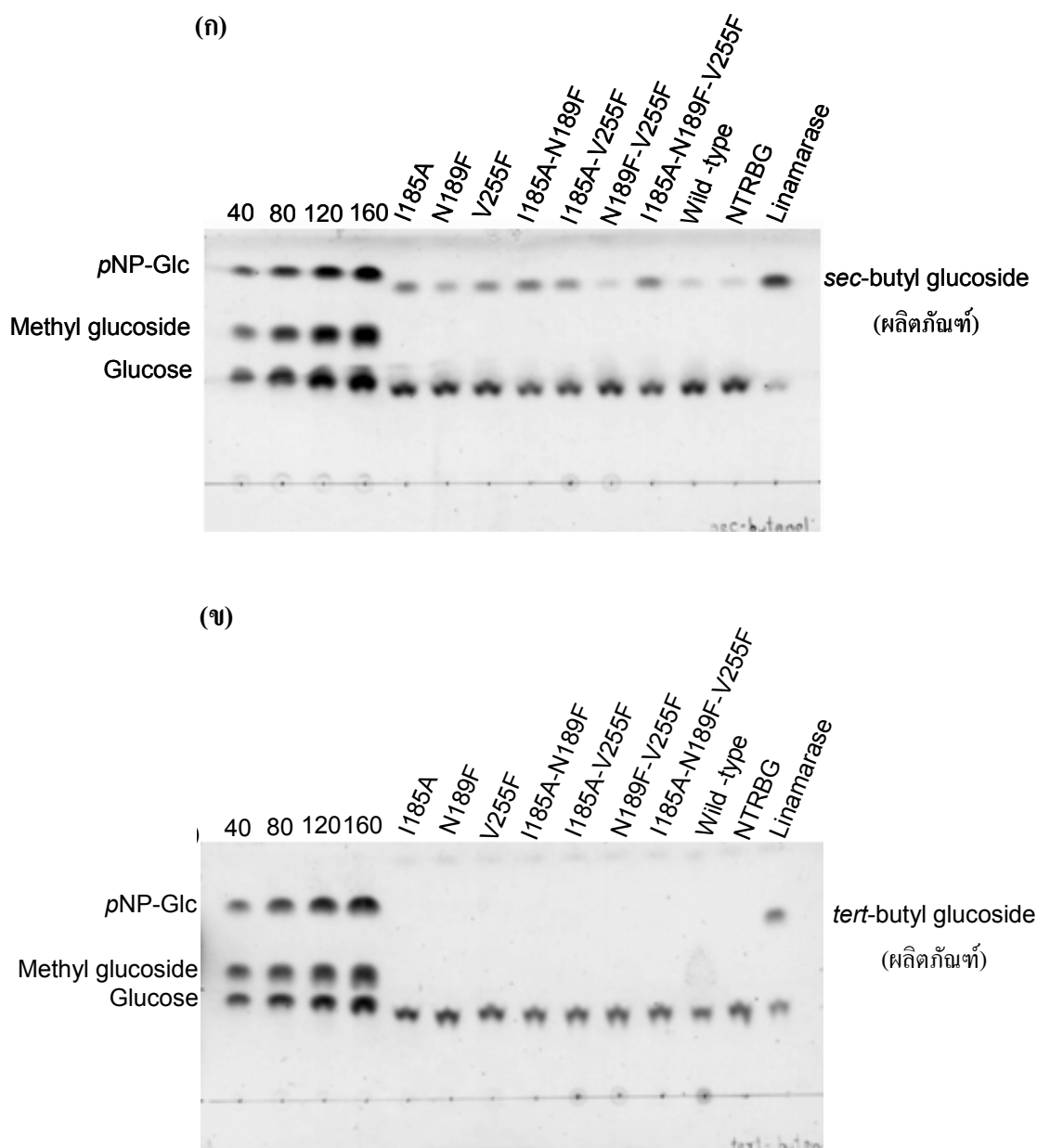
ภาพที่ 30 การวิเคราะห์ TLC โดยใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส และใช้ (ก) 0.9 M methanol (ข) 0.9 M ethanol เป็นตัวรับกลูโคส โดย wild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ คัลโคซิเนสดั้งเดิม; NTRBG คือ เอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ; 40, 80, 120, 160 เป็น nmol ของ standard แต่ละชนิด ซึ่งประกอบด้วย *p*NP-Glc, Methyl glucoside และ glucose



ภาพที่ 31 การวิเคราะห์ TLC โดยใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส และใช้ (ก) 0.9 M *n*-propanol (ข) 0.9 M *n*-butanol เป็นตัวรับกลูโคส โดย wild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนต์ดัลโคซิเนสดั้งเดิม; NTRBG คือ เอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ; 40, 80, 120, 160 เป็น nmol ของ standard แต่ละชนิด ซึ่งประกอบด้วย *p*NP-Glc, Methyl glucoside และ glucose



ภาพที่ 32 การวิเคราะห์ TLC โดยใช้ 10 mM *pNP-Glc* เป็นตัวให้กลูโคส และใช้ (ก) 0.9 M *iso*-propanol (ข) 0.9 M *iso*-butanol เป็นตัวรับกลูโคส โดย wild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนต์ดัลโคซิเนสดั้งเดิม; NTRBG คือ เอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ; 40, 80, 120, 160 เป็น nmol ของ standard แต่ละชนิด ซึ่งประกอบด้วย *pNP-Glc*, Methyl glucoside และ glucose



ภาพที่ 33 การวิเคราะห์ TLC โดยใช้ 10 mM *p*NP-Glc เป็นตัวให้กลูโคส และใช้ (ก) 0.9 M *sec*-butanol (ข) 0.9 M *tert*-butanol เป็นตัวรับกลูโคส โดย wild-type คือ เอนไซม์รีคอมบิแนนต์ดัลโคซิเนสดั้งเดิม; NTRBG คือ เอนไซม์ดัลโคซิเนสธรรมชาติ; 40, 80, 120, 160 เป็น nmol ของ standard แต่ละชนิด ซึ่งประกอบด้วย *p*NP-Glc, Methyl glucoside และ glucose

ตารางที่ 11 % mole ของ alkyl glucoside ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส โดยเอนไซม์ คัลโคซิเนสธรรมชาติ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม เอนไซม์ลินามาเรส และเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์

เอนไซม์	แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ					แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ	
	MeOH	EtOH	<i>n</i> -prop	<i>n</i> -but	<i>iso</i> -but	<i>iso</i> -prop	<i>sec</i> -but
คัลโคซิเนสธรรมชาติ	29	26	25	55	50	4	8
รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม	29	20	19	37	29	4	9
ลินามาเรส	80	84	87	81	100	83	78
I185A	28	52	65	80	90	15	21
N189F	52	80	88	96	83	14	12
V255F	57	63	76	91	89	13	32
I185A-N189F	44	83	86	89	93	43	44
I185A-V255F	47	66	79	77	82	35	16
N189F-V255F	74	68	63	62	48	6	0.9
I185A-N189F-V255F	60	92	85	92	95	67	32

หมายเหตุ; MeOH: methanol, EtOH: ethanol, *n*-prop: *n*-propanol, *n*-but: *n*-butanol, *iso*-but: *iso*-butanol, *iso*-prop: *iso*-propanol, *sec*-but: *sec*-butanol

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 11) พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ และเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม ได้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกัน เมื่อใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ เป็นตัวรับกลูโคส โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิได้ดีที่สุด และใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิได้เลย ซึ่งสอดคล้องกับที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Lirdprapamongkol and Svasti, 2000) อย่างไรก็ตามสำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ พบว่าในการใช้ *n*-propanol และ *n*-butanol เป็นตัวรับกลูโคส มีปริมาณของผลิตภัณฑ์น้อยกว่าที่เคยรายงานไว้มาก (71%, 89% สำหรับ *n*-propanol และ *n*-butanol ตามลำดับ) อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ใช้เป็นคอนสตรัคชันในการทดลอง หรืออาจเป็นเพราะเอนไซม์ที่ใช้เก็บไว้เป็นเวลานานแล้ว ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง

เมื่อพิจารณาเอนไซม์ลินามาเรส พบว่า เอนไซม์ลินามาเรสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสไปให้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ ได้ดีกว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสดั้งเดิมและเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ และเป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวที่สามารถย้ายหมู่กลูโคสไปให้แอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิได้ ซึ่งตรงกับที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Svasti *et al.*, 2003) โดยในการทดลองนี้ได้ % mole ของ *tert*-butyl glucoside เท่ากับ 56% การที่เอนไซม์ลินามาเรสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสไปให้ แอลกอฮอล์ตติยภูมิได้ ในขณะที่เอนไซม์คัลโคซิเนสไม่สามารถทำได้ อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของแอลกอฮอล์ตติยภูมิ คล้ายคลึงกับโครงสร้างของส่วนอะไกลโคนของลินามาริน ซึ่งเป็นสับสเตรตธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาเรส คือ มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ตรงคาร์บอนที่ต่อกับพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก ซึ่งทำให้ตำแหน่งจับอะไกลโคนของเอนไซม์ลินามาเรส สามารถรองรับโครงสร้างคาร์บอนที่มีหมู่แทนที่ 3 หมู่เหมือนลินามารินได้ (Svasti *et al.*, 2003) โดยผลการทดลองนี้ก็สอดคล้องกับการศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม และเอนไซม์คัลโคซิเนสธรรมชาติ ที่ไม่สามารถสลายสับสเตรตลินามารินได้

เมื่อพิจารณาการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับกลูโคส พบว่าเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์เกือบทุกชนิดสามารถผลิต alkyl glucoside ได้มากกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม ยกเว้นเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A ที่ได้ผลผลิตใกล้เคียงกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม เมื่อใช้ methanol เป็นตัวรับกลูโคส และในการทำนองเดียวกันเมื่อใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคส พบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์เกือบทุกชนิด สามารถผลิต alkyl glucoside ได้มากกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม ยกเว้น เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F ที่ผลิต alkyl glucoside ได้น้อยกว่าเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม เมื่อใช้ *sec*-butanol เป็นตัวรับกลูโคส อย่างไรก็ตามไม่มีเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ชนิดใด ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้เลย

สำหรับการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F เมื่อใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับกลูโคส พบว่าสามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีกว่า I185A (methanol, ethanol, *n*-propanol) และดีใกล้เคียงกับ N189F และยังผลิต alkyl glucoside ได้ดีใกล้เคียงกับเอนไซม์ลินามาเรส เมื่อใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเกือบทุกชนิด ยกเว้น methanol เท่านั้นที่ผลิต alkyl glucoside ได้น้อยกว่าเอนไซม์ลินามาเรส ในแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ พบว่า I185A-N189F ผลิต alkyl glucoside ได้ดีกว่า I185A และ N189F แสดงให้เห็นว่าเกิดการทำงานร่วมกันของ A185 และ F189 ในเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา

ย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ ซึ่งอาจเป็นเพราะการแทนที่ตำแหน่ง 185 ของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน ที่มีแขนงข้างยาว ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนที่มีแขนงข้างสั้นลง น่าจะเป็นการลดความเกะกะของแขนงข้าง ทำให้แขนงข้างของกรดอะมิโนอะลานีนไม่ไปขัดขวางในบริเวณช่องจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ และการแทนที่ตำแหน่ง 189 ของกรดอะมิโนแอสปารากีนซึ่งมีประจุ ด้วยกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนซึ่งเป็น hydrophobic ซึ่งน่าจะเพิ่มความเป็น hydrophobic ให้แก่บริเวณจับอะไกลโคไลน และทำให้เอนไซม์มีโครงสร้างที่เหมาะสมมากขึ้น ดังนั้นเอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์ I185A-N189F จึงสามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ เป็นตัวรับกลูโคสในปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้ดีขึ้น เพราะช่องว่างในบริเวณจับสับสเตรทกว้างขึ้น ทำให้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเข้าไปได้ง่ายขึ้น รวมทั้งแอลกอฮอล์เป็นสารที่มีความเป็น hydrophobic จึงทำให้เกิด hydrophobic interaction ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic ได้ดี

สำหรับเอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์ I185A-V255F เมื่อใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับกลูโคส พบว่าสามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีกว่า I185A และดีใกล้เคียงกับ V255F ส่วนในแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ พบว่า I185A-V255F ผลิต alkyl glucoside ได้ดีกว่า I185A และ V255F ใน *iso*-propanol แต่แย่กว่า V255F เมื่อใช้ *sec*-butanol ทั้งนี้อาจเนื่องจากการแทนที่ตำแหน่ง 185 ของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน ที่มีแขนงข้างยาว ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนที่มีแขนงข้างสั้นลง น่าจะเป็นการลดความเกะกะของแขนงข้างของกรดอะมิโน และทำให้ช่องว่างในบริเวณจับกับสับสเตรทของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น ทำให้ไม่ขัดขวางในบริเวณช่องจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ ดังนั้นจึงทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงแอลกอฮอล์ปฐมภูมิที่มีคาร์บอนสายยาวมากกว่า 2 อะตอม และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิซึ่งมีแขนงข้างเกะกะได้ดีขึ้น และการแทนที่ตำแหน่ง 255 ของกรดอะมิโนวาลีนด้วยกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดเป็น hydrophobic เหมือนกัน แต่กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนมีแขนงข้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก จึงมีขนาดใหญ่กว่าแขนงข้างของวาลีน ซึ่งเป็นประเภทอะลิฟาติก โดยแขนงข้างกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนน่าจะทำให้เกิด hydrophobic interaction กับแอลกอฮอล์ได้ดี แต่อาจจะส่งผลให้ช่องว่างในบริเวณจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ลดลงกว่าเดิม จึงทำให้ไม่เหมาะสมสำหรับ *sec*-butanol ซึ่งมีโครงสร้างที่มีความเกะกะมากกว่า *iso*-propanol

สำหรับเอนไซม์คัลโคซินสกลายพันธุ์ N189F-V255F เมื่อใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับกลูโคส พบว่าสามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีกว่า N189F และ V255F ใน methanol แต่แย่กว่าในแอลกอฮอล์ชนิดอื่น รวมทั้งเมื่อใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสด้วย อาจ

เนื่องมาจากการแทนที่ตำแหน่ง 189 ของกรดอะมิโนแอสปารากีน ด้วยกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีน ร่วมกับการแทนที่ตำแหน่ง 255 ของกรดอะมิโนวาเลีนด้วยกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีนเช่นเดียวกัน ซึ่งกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีนมีโครงสร้างขนาดใหญ่ อาจทำให้ช่องว่างในบริเวณจับสับสเตรท ลดลง จึงอาจทำให้การเข้าไปจับกับกลูโคสในบริเวณจับสับสเตรทของแอลกอฮอล์เกิดได้น้อย โดยเฉพาะเมื่อใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ ซึ่งมีแขนงข้างใหญ่และเกาะก่กว่า จึงอาจทำให้ไปขัดขวาง การเข้าไปจับกับกลูโคสในบริเวณจับสับสเตรทของแอลกอฮอล์ แต่อย่างไรก็ตามการทำลายพันธู์ N189F-V255F ทำให้สามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีเมื่อ methanol อาจเป็นเพราะแทนที่ด้วย กรดอะมิโนเฟนิลอะลานีนทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ จะทำให้ความเป็น hydrophobic ในบริเวณจับ สับสเตรทของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เกิด hydrophobic interaction กับแอลกอฮอล์ได้มากขึ้น รวมทั้งการที่กรดอะมิโนเฟนิลอะลานีนมีขนาดใหญ่ จึงส่งผลให้ช่องว่างในบริเวณจับสับสเตรท เล็กลง ดังนั้น methanol ซึ่งมีขนาดเล็กก็จะเข้าถึงได้ดีขึ้น

สำหรับเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V2555F พบว่าสามารถผลิต alkyl glucoside ได้ดีมาก เกือบเท่ากับเอนไซม์ลินามาเรส เมื่อใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิเป็นตัวรับ กลูโคส ยกเว้น methanol และเมื่อใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคส พบว่า I185A-N189F-V2555F ผลิต alkyl glucoside ได้ดีกว่า I185A, N189F และ V255F และดีใกล้เคียงกับเอนไซม์ ลินามาเรส ใน *iso*-propanol สำหรับ *sec*-butanol พบว่า I185A-N189F-V2555F ผลิต alkyl glucoside และดีใกล้เคียงกับ V255F หรือ I185A-N189F แต่น้อยกว่าเอนไซม์ลินามาเรสประมาณ 2 เท่า อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมในบริเวณจับกับอะไกลโคนมีความเป็น hydrophobic เหมาะสมจากการที่มีกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีนทั้ง 2 ตำแหน่ง และการมีช่องว่างในบริเวณจับกับ สับสเตรท ของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนไอโซลิวซีนเป็น กรดอะมิโน อะลานีน และจากการที่เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V2555F สามารถผลิต alkyl glucoside โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิได้ดีกว่าการใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคส ทั้งนี้อาจ เนื่องมาจากเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ชนิดนี้ มีการแทนที่กรดอะมิโนในตำแหน่ง 189 และ 255 ด้วยกรดอะมิโนเฟนิลอะลานีน ซึ่งมีแขนงข้างขนาดใหญ่ อาจจะไปขัดขวางการเข้ามารับกลูโคส ของแอลกอฮอล์ทุติยภูมิชนิด *iso*-propanol และ *sec*-butanol ซึ่งมีแขนงข้างที่เกาะก่ นอกจากนั้นถ้า เปรียบเทียบระหว่าง *iso*-propanol และ *sec*-butanol จะเห็นว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V2555F สามารถผลิต alkyl glucoside โดยใช้ *iso*-propanol ได้มากกว่า *sec*-butanol อาจเป็นเพราะโครงสร้างของ *iso*-propanol มีขนาดเล็กกว่า *sec*-butanol ทำให้สามารถเข้าไปจับ กลูโคสในบริเวณจับสับสเตรทได้ดีกว่า

แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ซึ่งมีกรดอะมิโนเหมือนกับเอนไซม์ลินามาเรสมากที่สุด กลับไม่สามารถสังเคราะห์ alkyl glucoside โดยใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้ ในขณะที่เอนไซม์ลินามาเรสสามารถทำได้ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะ การแทนที่กรดอะมิโนของเอนไซม์คัลโคซิเนส ด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรสในตำแหน่งที่สอดคล้องกัน เพียง 3 ตำแหน่งดังกล่าว (ภาพที่ 28 จ) อาจจะยังไม่เพียงพอที่จะทำให้ขนาดในบริเวณช่องจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ มีความเหมาะสม สำหรับการเข้าไปรับกลูโคสของแอลกอฮอล์ *tert*-butanol ซึ่งมีโครงสร้างที่เกะกะ ได้เหมือนกับเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์ ที่พบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ยังไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาสลายลินามาริน ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับแอลกอฮอล์ตติยภูมิได้ จากผลการทดลอง ดูเหมือนว่า ถ้าจะเพิ่มความสามารถในการสร้าง *tert*-butyl glucoside จะต้องเพิ่มช่องว่างในบริเวณจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ แต่ต้องคงความเป็น hydrophobic ไว้เช่นเดิม

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า การทำการกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (I185A, N189F และ V255F) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์คัลโคซิเนสดั้งเดิม แสดงว่า A185, F189 และ F255 ในเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ เป็นกรดอะมิโนที่ช่วยให้สภาพแวดล้อมภายในบริเวณจับอะไกลโคโคนของสับสเตรท มีความเหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและแอลกอฮอล์ทุติยภูมิได้ดีขึ้น และเมื่อทำการกลายพันธุ์ครั้งละ 2 และ 3 ตำแหน่ง (I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F) พบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิ ถ้าสภาพแวดล้อมในส่วนจับอะไกลโคโคนมีความเป็น hydrophobic ที่เหมาะสม และช่องว่างในส่วนจับอะไกลโคโคนต้องมีขนาดที่เหมาะสม สำหรับการเข้าทำปฏิกิริยาโดยแอลกอฮอล์ ยกเว้นเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F ที่ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสลดลง ถ้าแอลกอฮอล์สายยาวขึ้น หรือ แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ เมื่อเปรียบเทียบกับทำการกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง แสดงว่าการทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง F189 ร่วมกับ F255 ทำให้สภาพแวดล้อมในบริเวณจับส่วนอะไกลโคโคนของเอนไซม์ไม่เหมาะสม เพราะแขนงข้างที่มีขนาดใหญ่ของทั้งคู่ ทำให้ช่องว่างในการเข้ารับน้ำตาลกลูโคสของแอลกอฮอล์ทุติยภูมิน้อยลง

จากตารางที่ 11 ค่าที่ได้จากการวัดปริมาณ alkyl glucoside ด้วยเครื่อง scanning densitometer นั้นอาจมีความคลาดเคลื่อนเล็กน้อย เพราะว่าปริมาณของสารที่ทำการหยดลงบนแผ่น TLC อาจไม่แม่นยำ เนื่องจากสารอาจติดค้างอยู่ในอุปกรณ์ที่ใช้หยดสาร นอกจากนี้ลักษณะของจุดบนแผ่น TLC อาจจะมีรูปร่างไม่กลม และความเข้มภายในจุดไม่สม่ำเสมอ แต่อย่างไรก็ตามค่าที่ได้ก็อยู่ในระดับที่น่าเชื่อถือ เพราะจะพิจารณาจากค่า R^2 ที่ได้จากกราฟมาตรฐานของแอลกอฮอล์แต่ละชนิด ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.90 ขึ้นไป อีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจสอบประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของหมู่กลูโคสของเอนไซม์ได้ คือวิธีหยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วย 2', 4'-dinitrophenyl-2-deoxy-2-fluoro- β -D-glucopyranoside จากนั้นบ่มเอนไซม์ที่ไม่ทำงานนี้กับแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ แล้วทำการวัดปริมาณเอนไซม์ ที่ได้รับการกระตุ้นให้กลับมาทำงานได้เหมือนเดิม (reactivation) จากแอลกอฮอล์ (Hommalai *et al.*, 2005) ซึ่งแตกต่างจากวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ เพราะในการทดลองนี้ เป็นการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์สุทธิที่ได้ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่วัดได้อาจน้อยกว่าที่เป็นจริง เพราะเอนไซม์อาจสลายผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

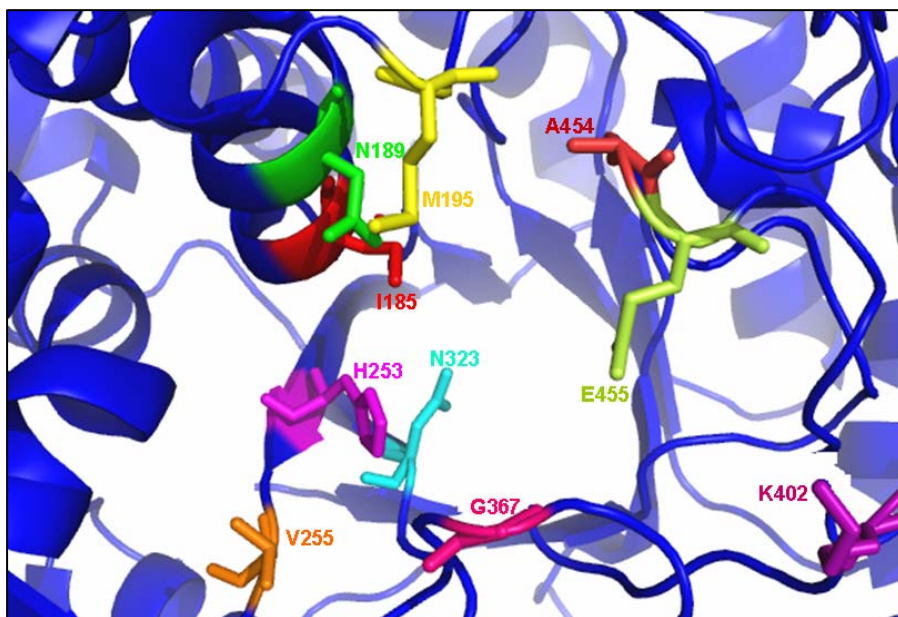
สรุปและข้อเสนอแนะ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือสร้างเอนไซม์ดัดโคชินะสกลายพันธุ์ครั้งละ 2-3 ตำแหน่ง โดยการแทนที่กรดอะมิโน ในบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์ดัดโคชินะส ด้วยกรดอะมิโนที่ สอดคล้องกันของเอนไซม์ลินามาเรส ได้แก่ I185A-N189F, I185A-V255F, N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F เพื่อตรวจสอบอันตรกิริยาของกรดอะมิโนที่มีผลต่อความจำเพาะในการ สลายสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาย่อยหมู่กลูโคส

เอนไซม์ดัดโคชินะสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ถูกผลิตใน *P. pastoris* โดยใช้ 0.5 % (v/v) methanol เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน และถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน ultrafiltration membrane, phenyl sepharose chromatography และ Ni^{2+} -ion affinity chromatography ตามลำดับ ซึ่งปัญหาที่พบในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ คือ กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงค่อนข้างมาก ซึ่ง อาจเกิดจากการปนเปื้อนของเอนไซม์โปรตีเอส ดังนั้น ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ครั้งต่อไป ควรเติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสลงไปด้วย เช่น phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

จากนั้นเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์แล้ว ถูกนำมาศึกษาความสามารถของเอนไซม์ในการ สลายสับสเตรท *pNP-Glc*, *Dal-Glc* และลินามาริน โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ดัดโค ชินะสดั้งเดิม พบว่าเอนไซม์ดัดโคชินะสกลายพันธุ์ N189F-V255F มีความจำเพาะต่อ *pNP-Glc* เพิ่มขึ้น ในขณะที่เอนไซม์กลายพันธุ์ชนิดอื่นมีความจำเพาะต่อ *pNP-Glc* ลดลง สำหรับสับสเตรท *Dal-Glc* พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดมีความจำเพาะต่อ *Dal-Glc* ลดลง และสำหรับการสลาย สับสเตรทลินามาริน พบว่า เอนไซม์ดัดโคชินะสกลายพันธุ์ I185A-N189F และ I185A-V255F สามารถสลายสับสเตรทลินามารินได้ โดยเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F มีประสิทธิภาพการ ทำงานดีกว่า I185A-V255F ประมาณ 6 เท่า แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ยังมี ความสามารถในการตัดลินามาริน น้อยกว่าเอนไซม์ลินามาเรสประมาณ 1,000 และ 6,000 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าประหลาดใจ เนื่องจากเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ซึ่งมีกรดอะมิโนเหมือนกับเอนไซม์ลินามาเรสมากที่สุด ไม่สามารถสลายลินามารินได้ ซึ่งจากผล การทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่า ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสามารถของเอนไซม์ในการสลาย สับสเตรทต่าง ๆ คือ ขนาดของบริเวณช่องจับสับสเตรทของเอนไซม์ หรือความกะกะของแขนง ข้าง ความเป็น hydrophobic ของสภาพแวดล้อมบริเวณจับอะไกลโคโคนของเอนไซม์ การ folding ของเอนไซม์ และกรดอะมิโนตำแหน่งอื่น ๆ โดยในการสลายลินามาริน จะเห็นว่ารูปร่างใน

บริเวณช่องจับสับสเตรทของเอนไซม์มีความสำคัญมาก เพราะต้องรองรับโครงสร้างคาร์บอนที่มี หมู่แทนที่ 3 หมู่ ที่ต่อกับพันธะเบต้า-กลูโคซิดิก ดังนั้นการจะเพิ่มความสามารถของเอนไซม์ในการ สลายสับสเตรทลินามาริน อาจจะต้องมีการทำการกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่น หรือทำหลายๆ ตำแหน่งพร้อมกัน ซึ่งอาจจะช่วยทำให้รูปร่างในบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์ มีความ เหมาะสมที่จะจับ และตัดสับสเตรทลินามารินได้เหมือนในเอนไซม์ลินามาเรส ซึ่งจากการศึกษา ก่อนหน้านี้ ได้ทำการกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่งในบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์ดัลโคซิเนส โดยแขนงข้างของกรดอะมิโนอื่นเข้าไปในบริเวณจับอะไกลโคน ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง คือ I185A , N189F, M195V, H253F, V255F, N323Q, G367S, K402Y, A454N และ E455I ดังแสดงในภาพที่ 30 ดังนั้นการทำการกลายพันธุ์หลาย ๆ ตำแหน่ง พร้อมกัน อาจจะเลือกตำแหน่งเหล่านี้มาทำร่วมกัน เช่น เพิ่ม M195V ลงในเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V255F หรือ I185A-N189F-V255F เพราะการเปลี่ยนกรดอะมิโนเมไธโอนีน ไปเป็นกรดอะมิโนวาเลีน ซึ่งมีแขนงข้างสั้นกว่า อาจทำให้ช่องว่างในบริเวณจับสับสเตรทของเอนไซม์กว้างขึ้น ซึ่งอาจทำให้มีความเหมาะสมที่ตัด ลินามารินได้ดีขึ้น หรือ อาจจะเพิ่ม E455I เข้าไปด้วย เพราะการแทนที่กรดอะมิโนกลูตาเมตซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีประจุลบ ด้วยกรดอะมิโนไอโซลิวซีนที่ไม่มีประจุ อาจทำให้มีความเหมาะสม ในการรับและตัดลินามารินซึ่งเป็นสารประเภทไม่มีขั้วมากกว่า นอกจากนี้ K402Y ก็เป็นตำแหน่ง กลายพันธุ์ที่คาดว่าจะนำไปเพิ่มในการสร้างเอนไซม์กลายพันธุ์หลายตำแหน่ง เนื่องจากการเปลี่ยน กรดอะมิโนไลซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทมีขั้วบวก และมีแขนงข้างยาว ไปเป็นโรไทโรซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างสั้น ซึ่งอาจทำให้ไม่ไปขัดขวางการเข้าจับของเอนไซม์กับสับสเตรท ลินามาริน แต่อย่างไรก็ตาม อาจจะมีกรดอะมิโนรอบนอกที่มีผลต่อแขนงข้างของกรดอะมิโนที่ยื่น เข้าไปในบริเวณจับอะไกลโคน ซึ่งอาจทำให้รูปร่างในบริเวณจับอะไกลโคนไม่มีความเหมาะสม สำหรับตัดลินามารินก็ได้



ภาพที่ 34 โครงสร้าง 3 มิติของแบบจำลองคัลโคซิเนสที่แสดงให้เห็นตำแหน่งของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185, N189, M195, H253, V255, N323, G367, K402, A454 และ E455

สำหรับการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ครั้งละ 2 และ 3 ตำแหน่ง พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F, I185A-V2555F และ I185A-N189F-V2555F มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสดีขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V2555F ที่สามารถผลิตอัลคิลกลูโคไซด์โดยใช้ *iso*-propanol ได้ดี อย่างเห็นได้ชัด เนื่องมาจากสภาพแวดล้อมในบริเวณจับกับอะไกลโคนมีความเป็น hydrophobic และการมีช่องว่างในบริเวณจับกับสับสเตรทเหมาะสม ในขณะที่เอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V2555F ผลิต alkyl glucoside ได้น้อยที่สุด โดยเฉพาะเมื่อใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคส อย่างไรก็ตามเอนไซม์กลายพันธุ์ 3 ตำแหน่ง ซึ่งมีกรดอะมิโนเหมือนเอนไซม์ลินามาเรสมากที่สุด ก็ยังไม่สามารถผลิต alkyl glucoside โดยใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก รูปร่างในบริเวณช่องจับอะไกลโคนของเอนไซม์คัลโคซิเนสกลายพันธุ์ ยังไม่เหมาะสมสำหรับการเข้ารับกลูโคสของแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส คือ ช่องว่างในบริเวณจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ ความเป็น hydrophobic ของสภาพแวดล้อมในบริเวณจับอะไกลโคนของเอนไซม์ และลักษณะโครงสร้างของแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นตัวรับกลูโคส ดังนั้นดูเหมือนว่า ถ้าจะเพิ่มความสามารถในการสร้าง *tert*-butyl glucoside จะต้องเพิ่มช่องว่างในบริเวณจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ แต่ต้องคงความเป็น hydrophobic ไว้เช่นเดิม โดยอาจจะแทนที่ด้วยกรดอะมิโนของ

เอนไซม์ลินามาเรสชนิดอื่น ซึ่งอาจจะช่วยส่งเสริมให้สภาพแวดล้อมในส่วนจับอะไกลโคนมีความเหมาะสมสำหรับการเข้ารับกลูโคสของแอลกอฮอล์ดีดิกูมิ ได้ นอกเหนือจากกรดอะมิโน ทั้ง 3 ตำแหน่งนี้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชมพูนุท พรเจริญพ. 2550. การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก
พันธุ์จากพะยูน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชัยนุสรณ์ สวัสดิวัฒน์, ม.ร.ว., ฤดี สุทธาฤทธิ, เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย, จันทรกานต์ พิภพมงคล และ
C. Bucke. 2538. รายงานวิจัยเรื่องการพัฒนาและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสจาก
พืชในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต. 192-193.
- เพ็ญพร สุจิตต์นารัตน์. 2549. การผลิตและการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะของรีคอมบิแนนต์เบต้า-
กลูโคซิเดสจากพะยูน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม. 2550. การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะในช่องจับอะไกลโคนของเอนไซม์
เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Staudacher, E. 2008. Glycomic Biochemistry and Analysis of glycans. ในรายงานการประชุมเชิง
ปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 1 (สาขาชีวเคมี). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพฯ.
- Anonymous. 2009. **Prebiotic (nutrition)**. Available Source:
<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Prebiotic>, March 30, 2009.
- Barrett, T., CG. Suresh, SP. Tolley, EJ. Dodson and MA. Hughes. 1995. The crystal structure of a
cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. **Structure**.
3: 951-960.
- Bencurova, M., D. Rendic, G. Fabini, E.M. Kopecky, F. Altman and I.B.H. Wilson. 2003.
Expression of eukaryotic glycosyltransferases in the yeast *Pichia pastoris*. **Biochimie**.
85: 413-422.

- Boons, G.J. 1996. Synthetic oligosaccharide: recent advances. **Drug Discov Today**. 1: 331-342.
- Cereda, M.P. and M.C.Y. Mattos. 1996. Linamarin-the toxic compound of cassava. **J. Venom. Anim. Toxins**. 2: 1-8.
- Cereghino, J.L. and J.M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**. 24: 45-66.
- Duff, S. and M. William. 1990. Methabolism of hydrogen peroxide by *Pichia pastoris*. **Agric Biol. Chem**. 54(8): 1967-1973.
- Eksittikul, T. and M. Chulavatnatol. 1988. Characterization of cyanogenic β -glucosidase (Linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Arch of Biochem Biophys** 266: 263-269.
- Esen, A. 1993. β -glucosidase: overview. In β -Glucosidase Biochemistry and Molecular Biology. (A. Esen, Ed.) pp. 1-14. **American Chemical Society, Washington D.C.**
- Gates, R., E. Rathbone, L. Masterson, I. Wright, and A. Electricwala. n.d. Glycoprotein analysis manual. **Sigma**. 35.
- Gibthai. 2008. **Westernblot**. Service and support. Available Source: http://www.gibthai.com/technical_detail.php, March 30, 2009.
- González-Blasco, G., J. Sanz-Aparicio, B. González, J. A. Hermoso, and J. Polaina. 2000. Directed evolution of β -Glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance. **J. Biol. Chem**. 275(18): 13708-13712.

- Hommalai, G., P. Chaiyen and Svasti. 2005. Studies on the transglucosylation reactions of cassava and Thai rosewood β -glucosidase using 2 deoxy-2-fluoro-glycosyl-enzyme intermediates. **Arch Biochem Biophys.** 442: 11-20.
- Ikediobi, C.O., S. Ibrahim and A. Ogbonna. 1987. Linamarase from *Fusarium equiseti*. **Appl microbial Biotechnol** 25: 327-333.
- Invitrogen. n.d. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. EasySelecTM *Pichia* Expression Kit. Available Source: <http://www.invitrogen.com>, March 15, 2002.
- Keresztessy, Z., K. Brown, M.A. Dunn and M.A. Hughes. 2001. Identification of essential active-site residues in cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by site-directed mutagenesis. **Biochem. J.** 353: 199-205.
- Ketudat-Cairn, J.R., V. Champattanachai, C. Sriomsap, B. Wittman-Liebold, B. Thiede and J. Svasti. 2000. Sequence and expression of Thai rosewood β -Glucosidase/ β -Fucosidase, a Family 1 Glycosyl Hydrolase Glycoprotein. **J. Biochem.** 123: 999-1008.
- Lirdprapamongkol, K. and J. Svasti. 2000. Alkyl glucoside synthesis using Thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnology Letters.** 22: 1889-1894.
- Mayer, C., D.L. Zechel, S.P. Reid, R.A.J. Warren and S.G. Withers. 2000. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is greatly improved glycosynthase. **FEBS Letters.** 466: 40-44.
- Mildvan, A.S. 2004. Inverse thinking about double mutants of enzymes. **American Chemical Society.** 43: 14517-14520.
- Mildvan, A.S., D. Weber and A. Kuliopulos. 1992. Quantitative interpretation of double mutations of enzymes. **Arch Biochem Biophys.** 294: 327-340.

- Opassiri, R., J.R. Ketudat-Cairns, T. Akiyama, O. Wara-Aswapati, J. Svasti and A. Esen. 2003. Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. **Plant Sci.** 165: 627-638.
- Reuveni, M., Z. Sagi, D. Evnor and A. Hetzroni. 1999. β -glucosidase activity is involved in scent production in Narcissus flowers. **Plant Sci.** 147: 19-24.
- Sarney, D.B., E.N. Vulfson. 1995. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. **Trends Biotechnol.** 13: 164-172.
- Srisomsap, C., J. Svasti, R. Surarit, V. Champattanachai, P. Sawangareetrakul, K. Boonpua, P. Subhasitanont and D. Chokchaichamnankit. 1996. Isolation and characterization of an enzyme with β -glucosidase and β -fucosidase activity from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. **J. Biochem.** 119: 585-590.
- Srisomsap, C., P. Subhasitanont, S. Techasakul, R. Surarit and J. Svasti. 1999. Synthesis of homo-and hetero-oligosaccharides by Thai rosewood β -glucosidase. **Biotechnol Lett.** 21: 947-951.
- Surarit, R., H. Matsui, S. Chiba, J. Svasti, and C. Srisomsap. 1996. Chemical modification of β -glucosidase/ β -fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre by Conduritol B Epoxide. **Biosci. Biotech. Biochem.** 60: 1265-1268.
- _____, H. Matsui, S. Chiba, J. Svasti, and C. Srisomsap. 1996. Evidence for a single active site in β -glucosidase/ β -fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* seeds. **Biosci. Biotech. Biochem.** 61: 93-95.
- _____, J. Svasti, C. Srisomsap, W. Suginta, S. Khunyoshyeng, S. Nilwarangkoon, P. Harnsakul and E. Benjavongkulchai. 1995. Screening of glucosylhydrolase enzymes in Thai plant seeds for potential use in oligosaccharide synthesis. **J. Sci. Soc. Thailand** 21: 293-303.

- Svasti, J., C. Srisomsap, S. Techasakul and R. Surarit. 1999. Dalcochinin-8'-*O*- β -D-glucoside and its β -Glucosidase enzyme from *Dalbergia cochinchinensis*. **Phytochem.** 50: 739-743.
- _____, T. Phongsak and R. Sarnthima. 2003. Transglucosylation of tertiary alcohols using cassa β -glucosidase. **Biochem. Biophys. Commun.** 305: 470-475.
- Toonkool, P., J. Ketudat-Cairns and J. Svasti. 2003. β -glucosidase from Thai Plants. **Srinakarinwirot Univ Sci J.** 19: 1-10.
- _____, P. Metheenukul, P. Sujiwattananarat, P. Paiboon, N. Tongtubtim, M. Ketudat-Cairns, J. Ketudat-Cairns and J. Svasti. 2006. Expression and purification of dalchochinase, a β -glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. **Protein. Expres. Purif.** 48: 195-204.
- Turner, P., D. Svensson, P. Adlercreutz and E.N. Karlsson. 2007. A novel variant of *Thermotoga neapolitana* β -glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucoside by transglycosylation. **J. Biotechnol.** 130: 67-74.
- Yeoh, H.H. 1989. Kinetic properties of β -glucosidase from cassava. **Phytochem.** 28: 721-724.
- _____, T. K. Tan and C. M. Loh. 1995. Sources of fungal linamarases. **World J Microbiol Biotechnol.** 11: 678-680.
- Zechel, D.L. and S.G. Withers. 2000. Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. **Acc. Chem. Res.** 33: 11-18.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

1. การเตรียม competent *E. coli* (DH5 α) และการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* โดยเทคนิค electroporation

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* (DH5 α) ในอาหารเหลว LB (1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) NaCl) ปริมาตร 2 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 1 ml ใส่อาหารเหลว LB ปริมาตร 100 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5-1.0 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่เย็นปริมาตร 100 ml นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นปริมาตร 50 ml นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% (v/v) glycerol ที่เย็นปริมาตร 2 ml นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย 10% (v/v) glycerol ที่เย็นปริมาตร 0.2 ml และนำ competent cell ที่ได้ แบ่งใส่หลอดๆละ 40 μ l

นำ competent *E. coli* (DH5 α) ที่ได้จากข้อ 1 ปริมาตร 40 μ l ผสมรวมกับ พลาสมิดดีเอ็นเอ ปริมาณ 1-10 ng บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที ใช้ pasteur pipette ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ใน cuvette เกลาะเบาๆ ให้เซลล์นอนก้น วาง cuvette ลงในเครื่อง electroporation (Bio-Rad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 ไมโครฟารัด 200 โอห์ม 2.5 กิโลโวลต์ กดปุ่ม plus ที่เครื่อง electroporation เพื่อให้กระแสไฟฟ้าทำงาน จากนั้นเติมอาหารเหลว LB, pH 7.5 ปริมาตร 1 ml ทันที ทำการย้ายเซลล์แขวนลอยที่ได้ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนของเหลวออก 800 μ l ผสมตะกอนเซลล์ให้เข้ากันและ spread ลงบนอาหารแข็ง LB, pH 7.5 ที่มี 25 μ g/ml zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2. การเตรียม competent *P. pastoris* (Y11430) และการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *P. pastoris* โดยเทคนิค electroporation

เลี้ยงเชื้อยีสต์ 1 โคโลนี ในอาหารเหลว YPD (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน คูดเซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 40 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนของเหลวทิ้ง และละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแช่เย็น ปริมาตร 40 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำซ้ำอีกครั้ง นำส่วนของเหลวออก แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1 M sorbitol ที่เย็นปริมาตร 40 ml นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนของเหลวออก และเติม 1 M Sorbitol ปริมาตร 1-2 ml เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 100

การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *P. pastoris* โดยเทคนิค electroporation ทำได้โดยนำ competent cell ปริมาตร 80 μ l ผสมกับดีเอ็นเอปริมาณ 5 μ g ในปริมาตร 10 μ l บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที คูดเซลล์ทั้งหมดใส่ใน cuvette ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้ววางลงในเครื่อง electroporation (Bio-Rad, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 ไมโครฟารค์ 200 โอห์ม และ 1.5 กิโลโวลต์ จากนั้นกดปุ่มที่เครื่อง electroporation เพื่อให้กระแสไฟฟ้าทำงาน แล้วเติม 1 M Sorbitol ปริมาตร 1 ml ทันที จากนั้นนำไปทำการปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูดส่วนของเหลว ปริมาตร 800 μ l ทิ้ง ผสมตะกอนเซลล์ให้เข้ากัน และคูดเซลล์แขวนลอยทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPDS (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose, 1 M Sorbitol) ที่มี 25 μ g/ml zeocin บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน

3. การสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* โดยวิธี MiniPrep

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB, pH 7.5 ที่มี 25 μ g/ml zeocin ปริมาตร 2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน คูดเซลล์แขวนลอยที่ได้ ปริมาตร 1.5 ml ใส่ลงใน eppendorf นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

เพื่อตกตะกอนเซลล์ นำส่วนของเหลวทิ้ง เติมสารละลาย 1 (50 mM glucose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการ Vortex บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 2 (1% SDS, 0.2 M sodium hydroxide) ปริมาตร 200 μ l ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 3 (3 M potassium acetate, 2 M acetic acid) ที่เย็นปริมาตร 150 μ l ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนของเหลวใส่ eppendorf ใหม่ จากนั้นเติม 100% ethanol ปริมาตร 900 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนของเหลวทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 150 μ l นำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนของเหลวทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 20 μ l

4. การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเติม 3 M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตร สารละลายดีเอ็นเอทั้งหมด และเติม 100% ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมด บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% (v/v) ethanol ปริมาตร 150 μ l และนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-3 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 μ l

5. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis)

เตรียม 1 % อะกาโรส ใน 1x TAE buffer (50x: 40 mM Tris, 0.1142 % (v/v) acetic acid, 2 mM EDTA, pH 8.5) จากนั้นเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล และปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใส่ 1x TAE buffer ให้ท่วมเจล นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ 1x loading buffer (6x: 50 mM EDTA, pH 8.0, 0.4% (w/v) bromphenol, 5% (w/v) glycerol) หยดลงไปบนเจล และต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง และเปิดกระแสไฟฟ้า โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าเท่ากับ 100 โวลต์ และเมื่อ loading buffer เคลื่อนที่ได้ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของเจล จึงปิดเครื่อง นำเจลมาย้อมด้วย 0.5 μ g/ml ethidium bromide

เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำเปล่าอีก 15 นาที นำเจลที่ได้ไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อวิเคราะห์ผล

6. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis หรือ SDS-PAGE)

การวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล ทำได้โดยเตรียม 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel ดังแสดงในตารางผนวกที่ ก1 โดยเติม 10% (w/v) ammonium persulfate และ TEMED ในขั้นตอนสุดท้าย

ตารางผนวกที่ ก1 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม เอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

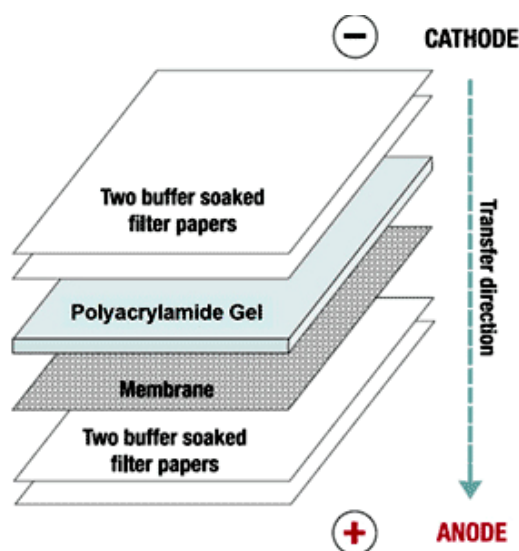
สารที่ใช้	7.5% resolving gel	4% stacking gel
น้ำกลั่น	2050 μ l	3050 μ l
30% T, 2.67% C Polyacrylamide	1560 μ l	650 μ l
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1250 μ l	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	1250 μ l
10% (w/v) SDS	50 μ l	50 μ l
10% (w/v) Ammonium persulfate	50 μ l	50 μ l
TEMED	12 μ l	10 μ l

นำตัวอย่างโปรตีน ซึ่งผสมอยู่ใน 1x sample buffer (4x: 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) glycerol, 1.25% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.0025% (w/v) Coomassie blue G และ 12.5 mM Tris, pH 6.8) ตั้งเป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำแข็ง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ตัวอย่างโปรตีนตกอยู่ก้นหลอด และนำตัวอย่างโปรตีนหยอดลงในช่องของพอลิอะคริลาไมด์เจล จากนั้นต่ออุปกรณ์เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส และนำเจลผ่านกระแสไฟฟ้า 30 mA ใน 1x running buffer (10x: 2.5 mM Tris, pH 8.3, 0.2 M glycine, 0.1% (w/v) SDS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้ว นำเจลที่ได้แช่ลงใน 50% (v/v) methanol เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อมด้วย staining solution (0.125% (w/v) Coomassie blue R, 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid) เป็นเวลา

2 ชั่วโมง และล้างสีออกด้วย destaining solution (25% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid) เป็นเวลา 30 นาที

7. เทคนิคอิมมูโนวิเคราะห์สำหรับโปรตีน (Western blot)

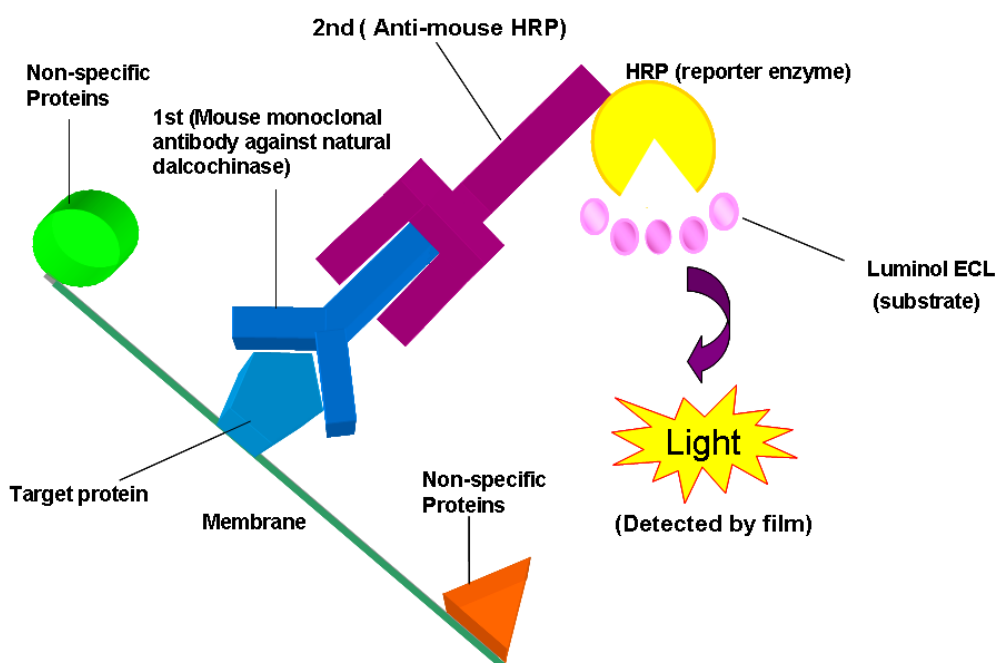
นำเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล แช่ลงใน 1x transfer buffer (20x: 10 mM Tris, 100 mM glycine) เป็นเวลา 25 นาที เตรียมเมมเบรน polyvinylidene fluoride (PVDF) ให้มีขนาดกว้างกว่าเจล 1 เซนติเมตร และเตรียมกระดาษกรองให้มีขนาดกว้างกว่าเมมเบรน 1 เซนติเมตร จำนวน 6 แผ่น จากนั้นแช่เมมเบรนใน 100% (v/v) methanol เป็นเวลา 5 วินาที แล้วแช่ต่อใน transfer buffer เป็นเวลา 20 นาที สำหรับกระดาษกรองจะแช่ใน transfer buffer เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนโดยใช้เครื่อง Trans-Blot ®Semi-Dry (Bio-Rad, USA) ดังแสดงในภาพผนวกที่ ก1 และใช้กระแสไฟฟ้า 10 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที



ภาพผนวกที่ ก1 แผนภาพแสดงส่วนประกอบการย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรน

ที่มา : Gibthai (2009)

เมื่อทำการย้ายโปรตีนลงสู่เมมเบรนแล้ว นำเมมเบรนมาแช่ใน 5% (w/v) skim milk ซึ่งอยู่ใน phosphate buffer saline plus tween, pH 7.5 (PBST) (10x: 80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 1 M NaCl, 10% tween 20) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 2 ครั้ง ครั้งละ 50 ml จากนั้นนำเมมเบรนบ่มกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีของหนูที่จำเพาะต่ออัลโคซินเนสธรรมชาติ (แอนติบอดีชนิดที่ 1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วย PBST 2 ครั้ง ครั้งละ 50 ml จากนั้นแช่ใน PBST 15 นาที 1 ครั้ง และ 5 นาที 3 ครั้ง ทุกครั้งปริมาตร 50 ml จากนั้นบ่มด้วย โพลีโคลนอล แอนติบอดีของกระต่ายที่จำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลิน ของหนูซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์ชแรดดิช เปอร์ออกซิเดส (แอนติบอดี ชนิดที่ 2) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 2 ครั้ง จากนั้นแช่ใน PBST 15 นาที 1 ครั้ง และ 5 นาที 3 ครั้ง ทุกครั้งปริมาตร 50 ml จากนั้นนำเมมเบรนมาซับให้พอหมาด ๆ แล้วบ่มกับ ECL plus western blotting detection (Amersham, Sweden) เป็นเวลา 5 นาที นำเมมเบรนที่ได้ประกบกับฟิล์มในห้องมืดเป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำฟิล์มมาแช่ลงใน developer, fixer และน้ำกลั่น ตามลำดับ ซึ่งขั้นตอนโดยสรุป แสดงดังภาพผนวกที่ ก2



ภาพผนวกที่ ก2 แผนภาพแสดงการทำอิมมูโนวิเคราะห์สำหรับโปรตีน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Gibthai (2009)

8. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอน-ดีเนชเชอริง พอลิอะคริลาไมด์เจล (Non-Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis หรือ ND-PAGE)

การวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนอน-ดีเนชเชอริง พอลิอะคริลาไมด์เจล ทำได้โดยเตรียม 7.5% resolving gel และ 4% stacking gel ดังแสดงในตารางผนวกที่ ก2 โดยเติม 10% (w/v) ammonium persulfate และ TEMED ในขั้นตอนสุดท้าย

ตารางผนวกที่ ก2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม นอน-ดีเนชเชอริง-พอลิอะคริลาไมด์เจล

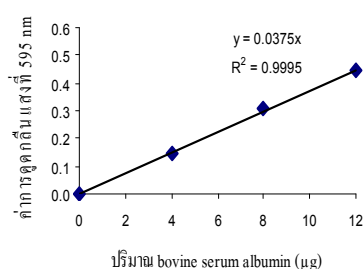
สารที่ใช้	7.5% resolving gel	4% stacking gel
น้ำกลั่น	2050 μ l	3050 μ l
30% T, 2.67% C Polyacrylamide	1560 μ l	650 μ l
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1250 μ l	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	1250 μ l
10% (w/v) SDS	50 μ l	50 μ l
10% (w/v) Ammonium persulfate	50 μ l	50 μ l
TEMED	12 μ l	10 μ l

นำตัวอย่างโปรตีน ซึ่งผสมอยู่ใน 1x sample buffer (4x: 12.5% (w/v), bromophenol blue, 125 mM Tris pH 6.8, 10% (v/v) glycerol) หยดลงในช่องของพอลิอะคริลาไมด์เจล จากนั้นต่ออุปกรณ์เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วนำเจลไปผ่านกระแสไฟฟ้า 90 mA ใน 1x running buffer (10x: 25 mM Tris, pH 8.3, 0.2 M glycine) เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง นำเจลที่ได้เชื่อมด้วย 1 mM 4-MU-Glc จากนั้นนำนอน-ดีเนชเชอริง พอลิอะคริลาไมด์เจล ไปตรวจสอบการเรืองแสงของ 4-MU ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานโปรตีน

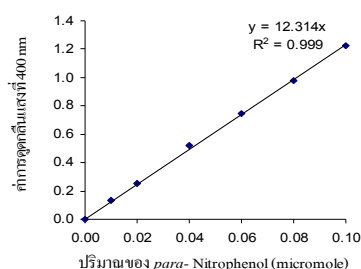
เตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 0 ถึง 12 μg โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 800 μl และเติม Bio-Rad protein reagent ปริมาตร 200 μl บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐาน โปรตีน

2. กราฟมาตรฐาน *para*-nitrophenol (pNP) ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในขั้นตอนการผลิตโปรตีนและขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

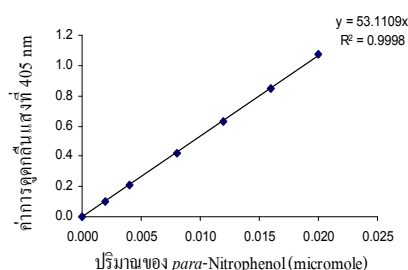
เตรียมสารละลายมาตรฐาน pNP ให้มีปริมาณ 0 ถึง 0.1 μmol โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 500 μl แล้วเติม 2 M Sodium carbonate ปริมาตร 1 ml และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐาน *para*-nitrophenol (pNP) ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในขั้นตอนการผลิตโปรตีนและขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

3. กราฟมาตรฐาน *para*-nitrophenol (*p*NP) ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

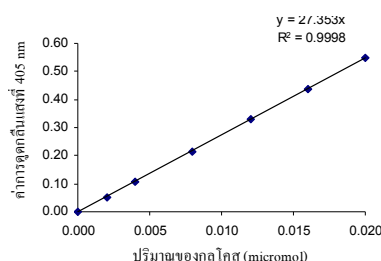
เตรียมสารละลายมาตรฐาน *p*NP ให้มีปริมาณ 0 ถึง 0.02 μmol โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μl จากนั้นเติม 2 M Sodium carbonate ปริมาตร 100 μl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐาน *para*-nitrophenol (*p*NP) ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

4. กราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสให้มีปริมาณ 0 ถึง 0.02 μmol โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μl เติม 2 mg/ml ABST ปริมาตร 50 μl และ glucose oxidase kit (5 unit/ml) ปริมาตร 100 μl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานกลูโคส

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของยีนดัลโคซินในสกลายพันธุ์ I185A-N189F

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอโคจินสกลายพันธุ์ I185A-N189F โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

CCCTATGATTTTAGACACTTGAGAGATCAAAAACAACTAATTATTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTAT
TCGCAGCATCCTCCGATTAGTCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTAC
TATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACC
ATGCTGCAGTTCCCTCAATTCAACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCATTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGT
GAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCAACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGT
TGACCAATTTCAACGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCATCTCCTGGCCTA
GAATTCCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCC
AATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGGTGGCTTTAAATCATAG
CGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCATTATTTGGAGATAGGGGTAAGCATTGGAT

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอโคจินสกลายพันธุ์ I185A-N189F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

AAGATTTTGGGAGCATCCTCCTCGTACAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCA
GAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTCAACGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATAT
GAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCTTAGAATTCCTCCAAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAG
TTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACCTGGCCAAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTCATTGGGATCTTCCACAA
GCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAATGATTTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTTAT
TGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCA**GCCTT**TCACCGCG**TTT**GGGTATGCATACGGTATGTTTGACACCAG
GTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTT
TCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGACAGTATGTTG
GGTTATACCGCTTTCAAATAGCAGATCAGATCAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCAC
TTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATTAG

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอโคจินสกลายพันธุ์ I185A-N189F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

CCCTCATATGGAATGGGTAAAGCATTGGATTACCTAAATGAGCCATCA**GCCTT**TCACCGCG**TTT**GGGTATGCATACGGTATGTTTGCA
CCAGGTGATGTTCTCCATCGTACAATCCAACCTTGACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGAT
CCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACGTAG
TTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCAGATCAGATCAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGAC
CCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATT
AGTTAAGGGTTTCATTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCAC
CTAGTTACCTCAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATG
GATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTCACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAA
ATGGTATAGATGAGAAGATGATGCATCACTATCACTTGAAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCAT
CTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCT

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอโคจินสกลายพันธุ์ I185A-N189F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

GGCATTAGCATAGTTAGGGTTTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAATCAGATGCGTCAACA
TGCTGCCACCTAGTTACCTCAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTC
AGGATGGATGTGATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCA
CTGAAAATGGTATAGATGAGAAGATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTAT
CGTCATCTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGA
ATGGGCTGAGGGTTATACATCAGATTTGGATTATTTTTGTGAACTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACAT
GGTTCAAGTATTTCTGGCAGCTGATCAAGAGAGTGCTAAATTTGAAATTTTAGCACCAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATG
ATCAAGGAAGAAAAGACAAAACCAAGTGGGCTTTGAAGGCTTTTGATCTAGATCTTAATCACTAGTAGTAATCGCGGCCGCTG
AGTACGTAGAATTCAGTGGCCAGCGGCCGCTCTCGATCGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCGCGGAGCTTTCTAGAACAAAACT
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCGCTCGACCATCATCATCATCATTCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTG

ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของยีนดัล โคซินะสกลายพันธุ์ I185A-V255F

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคจินสกลายพันธุ์ I185A-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

CCCTTAGCTTTACGACACTTGAGAGATCAAAAACAACTAATTATTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTAT
TCGCAGCATCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGTGAAGCTGTCATCGGT
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAACTACTAC
TATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACC
ATGCTGCAGTTCTCCATTCAACCGAAGCTGTTTTCTTTCAGATTTTCAATTTTGGGACAGCATCCTCCTCGTACCAGTATGAAGGT
GAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGT
TGACCAATTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCATCTCCTGGCCTA
GAATTCCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCC
AATGGCATAAACCACTTTGTAACCAATTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAG
CGTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTAC

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคจินสกลายพันธุ์ I185A-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

GGGGTTTTGGGAGCATCCTCCTCGTACAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCA
GAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTCCCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATAT
GAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCCTGGCTTAGAATTTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAG
TTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACCTGGCCAATGGCATAACCACTTTTGAACCAATTTTTCATTGGGATCTTCCACAA
GCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAATGATTTTCCAAGACTATGCGGATCTTTGCTTCCAATTATT
TGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCA**GCCTT**CCACCGCAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGACCCAG
GTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAATTTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTT
TCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGACGTA**TTTG**
GGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGAATGTTATGGACCCAC
TTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAA

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคจินสกลายพันธุ์ I185A-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

CCTGCATATGGAATGGGTAAAGCATTGGATTAACTAAATGAGCATCA**GCCTT**CCCGCGAATGGGTATGCATACGGTATGTTTGACCC
AGGTGCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAATTTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCC
TTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGACGTA**TTT**
TGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCC
ACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATTAG
TTAAGGGTTCAATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCT
AGTTACCTCAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGGATGTG
CATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAATGGTA
TAGATGGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTT
TATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCANATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTGA

4. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคจินสกลายพันธุ์ I185A-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

GGGTTAGCAATAGTTAGGGTTATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAATCAGATGCGTCAACAT
GCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCA
GGATGGATGTGCAATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCAC
TGAAAATGGTATAGATGAGAAGAAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATC
GTCATCTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGAA
TGGGCTGAGGGTTATACATCACGATTTGGATTATTTTTGTGAATCACTACTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACATG
GTTCAAGTATTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTTGGAATTTTAGCACCAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATGA
TCAAGGAAGAAAAGCAAAAACCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTGATCTAGATCTTAATCACTAGTGAATTCGCGCGCGCTGCA
GTACGTAGAATTACGTTGGCCAGCCGCGCTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGCGCGCCGAGCTTTCTAGAACAAAA
ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCGTGCACCATCATCATCATCATCATGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGT

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีนดัล โคจินเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนคลอโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ AOXF

TTCCTTACACTTACGACACTTGAGAGATCAAAAACTAATTATTGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTA
TTCGCAGCATCTCCGATTAGTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGG
TACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAACTA
CTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCAC
CATGCTGCAGTTCCCTCATTCAACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCATTTTTGGGACAGCATCTCTCGTACCAGTATGAAGG
TGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAG
TTGACCAATTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCTGGCCT
AGAATTCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGC
CAATGGCATAACACCATTTGTAAACCATTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTCTTAAATCATA
GCGTTGTAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTGTCTCAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTAC

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนคลอโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

GGGATTTTGGGAGCATCTCTCTGACAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCAATATCCA
GAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATAT
GAACCTTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCTGGCTTAGAATCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAG
TTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCCAAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTCATTGGGATCTTCCAA
GCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAATGATTTTCCAAGACTATGCGGATCTTGTCTTCAATTATT
TGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACCTAAATGAGCCATCAATCTTACCGCGTGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAG
GTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAATTTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTT
TCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACGTAATG
GGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCAC
TTACAGCAGGAAGGT

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนคลอโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

CCCGTCTTTGGAATGGAAGCTGGATACCTAAATGAGCCTCATCTTCCCGCGGGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAGGTG
ATGTTCTCCATCGTACAATCCAATTTGCACAGGTGGGGATGCAGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTTTCTC
ATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACGTAATGGGTT
ATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCACTTAC
AGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATAGTTAAGG
GTTCAATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCCACCTAGTTAC
CTCACAGATCCTCAAGTCACTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCAGTGAATGCTCCCTCAGGATGGATGTGATTTA
TCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTAAACAATCCTTTGGTTTACATCTGAAAAATGGTATAGATG
AGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATCTCTTTTATGTT
CGATATGCAATTAGGTCTGGCGCANATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACTTTGA

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนคลอโคซิเนสกลายพันธุ์ N189F-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

GGCATTAGCATAGTTAGGGTTCATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACA
TGCTGCCACCTAGTTACCTCACAGATCCCAAGTCACTCTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTC
AGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCA
CTGAAAATGGTATAGATGAGAAGATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTAT
CGTCATCTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGA
ATGGGCTGAGGGTTATACATCACGATTTGGATTATATTTTGTGAACTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACAT
GGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTGGAAATTTTAGCACCAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATG
ATCAAGGAAGAAAAGACAAAACCAAGTGGGGCATTGAAGGCTTTTGTATGATGATCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGC
AGTACGTAGAATTCAGTGGCCAGCGGCCGCTCTCGATCGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCGCGGAGCTTTCTAGAACAAAACT
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGT

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีนคัดโคซินในสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F

1. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F โดยใช้ไพรเมอร์

AOXF

CCGTTGACTTACGACACTTGAGAGATCAAAAACAATAATTATTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATT
CGCAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTT
ACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTAAATACTACT
ATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCACATCACCATCACCATCATCACCA
TGCTGCAGTTCTCCATTCAACCGAAGCTGTTTTCTTCAGATTTTCAATTTTGGGACAGCATCCTCTCGTACCAGTATGAAGGTG
AGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCAGAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTT
GACCAATTTACCCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATATGAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCTGGCCCTAG
AATTCTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAGTTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCCA
ATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTCATTGGGATCTTCCACAAGCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGC
GTTGTAAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTGTCTCAATTATTTGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTAC

2. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF1

GGGATTTTGGGAGCATCCTCTCGTACAGTATGAAGGTGAGGGCAGAGTACCAAGTATATGGGATAACTTCACCCACCAATATCCA
GAAAAGATAGCGGATAGAAGCAACGGAGATGTTGCAGTTGACCAATTTACCCGCTATAAGAAGGATATTGCAATCATGAAGGATAT
GAACCTGGATGCTTATAGAATGTCCATCTCTGGCCCTAGAATTTCCCAACGGGTAGGGTTAGTGGAGGCATAAACCAACAGGAG
TTGACTACTACAACAGGCTCATCAATGAGTCACTGGCCAATGGCATAACACCATTTGTAACCATTTTTCATTGGGATCTTCCACAA
GCCTTGGAGGATGAGTACGGTGGCTTCTTAAATCATAGCGTTGTAATGATTTCCAAGACTATGCGGATCTTGTCTTCAATTTATT
TGGAGATAGGGTAAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCA[6CTTTTACC[GGGTATGCATACGGTATGTTTGCACCAG
GTCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAATTTGCACAGGTGGGGATGCGAGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACTGATCCTT
TCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACGTA[TTTG
GGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATGGACCCAC
TTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAAATTAG

3. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF2

NNCCCTTCTATGGAATGGGTAAGCATTGGATTACACTAAATGAGCCATCA[6CTTTACC[GGGTATGCATACGGTATGTTT
GCACCAGGTGCGATGTTCTCCATCGTACAATCCAATTTGCACAGGTGGGGATGCGGAACAGAGACTTATCTGGTTGCGCACAACT
GATCCTTTCTCATGCAGCAACTGTCCAAGTGTACAAAAGGAAGTATCAGGAACATCAGAAAAGGTACAATAGGCATTTCTTGCACG
TA[TTTGGGTTATACCGCTTTCAAATAGCACATCAGATCAAAATGCTACCCAGCGATATCTTGACTTCACATGTGGATGGTTTATG
GACCCACTTACAGCAGGAAGGTATCCAGATAGCATGCAATATCTAGTTGGAGATCGATTGCCTAAGTTTACTACAGATCAAGCCAA
ATTAGTTAAGGGTTCAATTTGATTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACATGCTGCC
CACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCCAGTGACTCCCTCAGGATGG
ATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCACTGAAAA
TGGTATAGATGAGAAGAATGATGCATCACTATCACTTGAGGAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTATCGTCATC
TCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCANATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGA

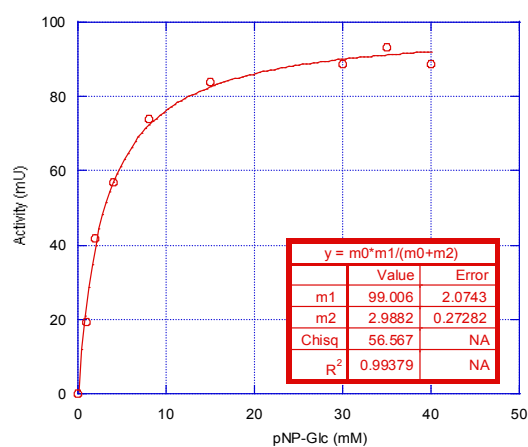
3. ผลการหาลำดับเบสของยีนดัดโคจีนสกลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F โดยใช้ไพรเมอร์ TRF3

AAAATTAGCAATAGTTAGGGTTATTTGATTTTATTGGACTAACTATTACACCACTAACTATGCTACCAAATCAGATGCGTCAACA
TGCTGCCCACCTAGTTACCTCACAGATCCTCAAGTCACTCTTTACAGCAACGCAATGGGGTCTTTATAGGTCAGTGACTCCCTC
AGGATGGATGTGCATTTATCCAAAAGGACTTCGAGATTTGTTGCTTTACTTCAAGGAAAAGTATAACAATCCTTTGGTTTACATCA
CTGAAAATGGTATAGATGAGAAGAATGATGCATCACTATCACTTTGAGGAAATCCTTGATAGACACTTATAGAATTGATAGTTATTAT
CGTCATCTCTTTTATGTTGATATGCAATTAGGTCTGGCGCAATGTGAAAGGATTTTTTGCATGGTCATTGTTGGACAACCTTTGA
ATGGGCTGAGGGTTATACATCAGATTTGGATTATATTTTGTGAACTACACTACTTTGAATAGATATCCCAAGCTCTCTGCAACAT
GGTTCAAGTATTTTCTGGCACGTGATCAAGAGAGTGCTAAATTTGGAATTTTAGCACCAAGGCAAGATGGAGCTTATCAACGATG
ATCAAGGAAGAAAAGACAAAACCAAGTGGGGCTTTGAAGGCTTTTGTAGTCTTAATCACTAGTGAATTGCGCGCCGCTGCG
AGTACGTAGAATTCAGTGGCCAGCCGGCGTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCGCGCTTCTAGAACAAAACT
CATCTCAGAAAGAGGATCTGAATAGCGCGTCTGACCATCATCATCATCATTTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGAC

ภาคผนวก ข

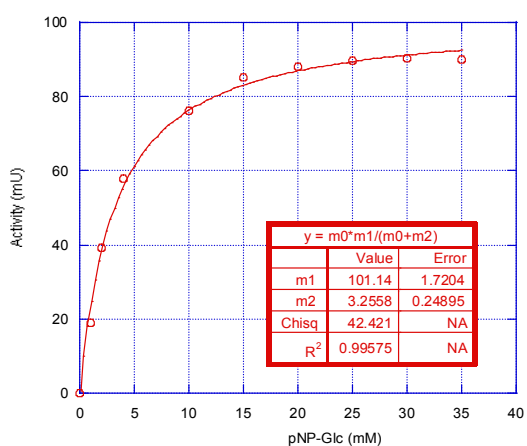
กราฟ Michaelis-Menten

1. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลาย *p*NP-Glc



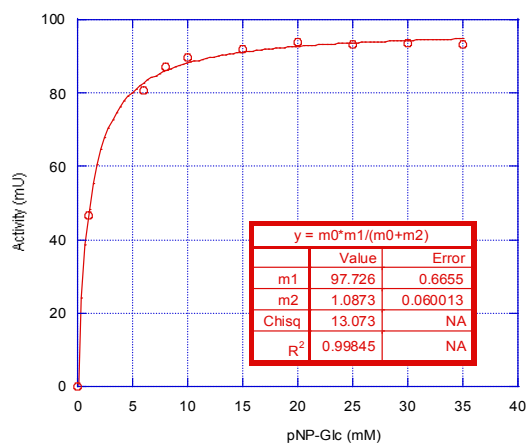
ภาพผนวกที่ ข1 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลาย *p*NP-Glc

2. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลาย *p*NP-Glc



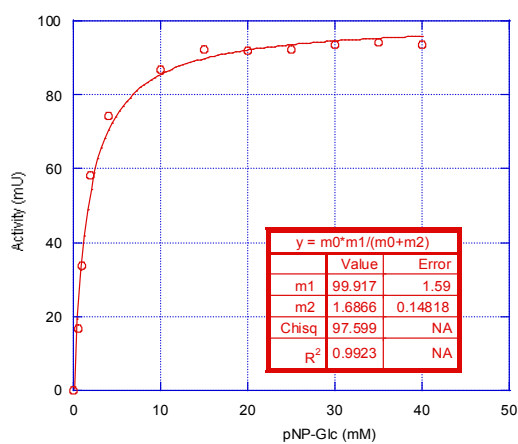
ภาพผนวกที่ ข2 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลาย *p*NP-Glc

3. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลาย *p*NP-Glc



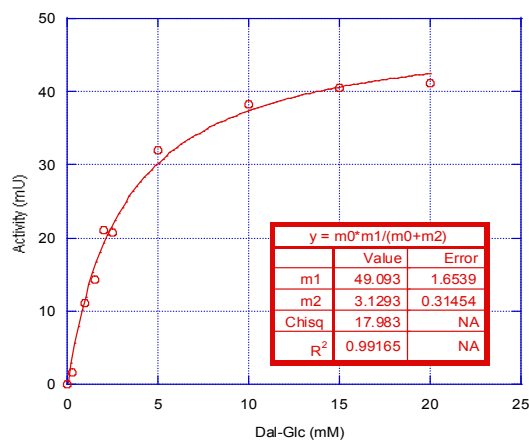
ภาพผนวกที่ ข3 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลาย *p*NP-Glc

4. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลาย *p*NP-Glc



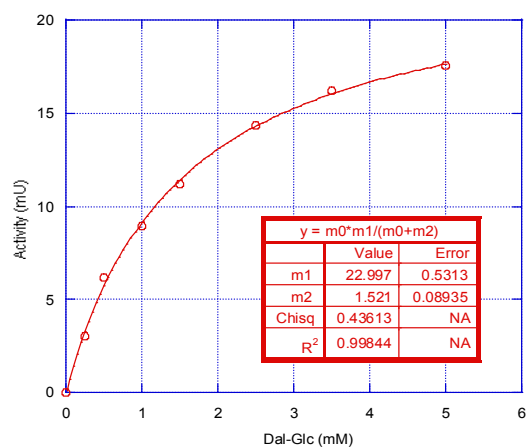
ภาพผนวกที่ ข4 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลาย *p*NP-Glc

5. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลาย Dal-Glc



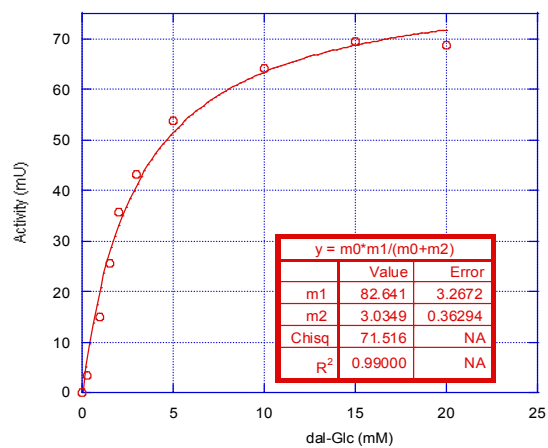
ภาพผนวกที่ ข5 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลาย Dal-Glc

6. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลาย Dal-Glc



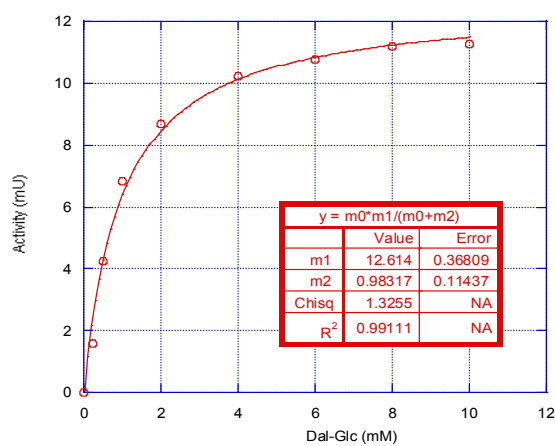
ภาพผนวกที่ ข6 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลาย Dal-Glc

7. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลาย Dal-Glc



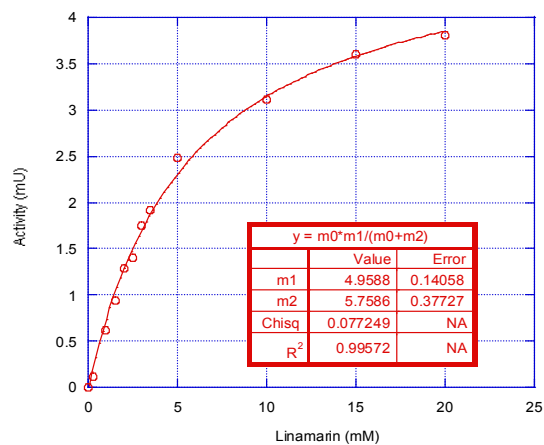
ภาพผนวกที่ ข7 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลาย Dal-Glc

8. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลาย Dal-Glc



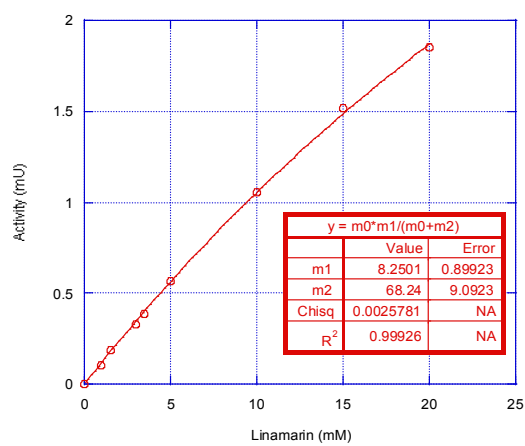
ภาพผนวกที่ ข8 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลาย Dal-Glc

9. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลายลินามาริน



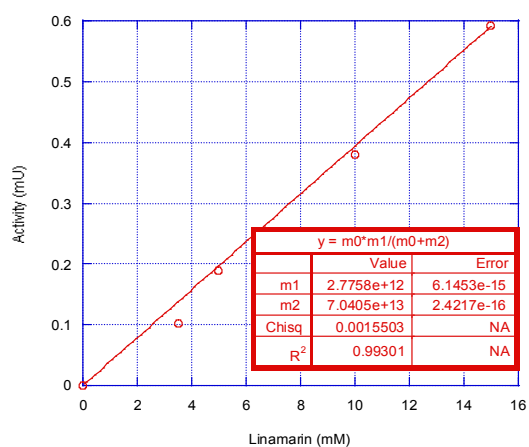
ภาพผนวกที่ ข9 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F ในการสลายลินามาริน

10. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลายลินามาริน



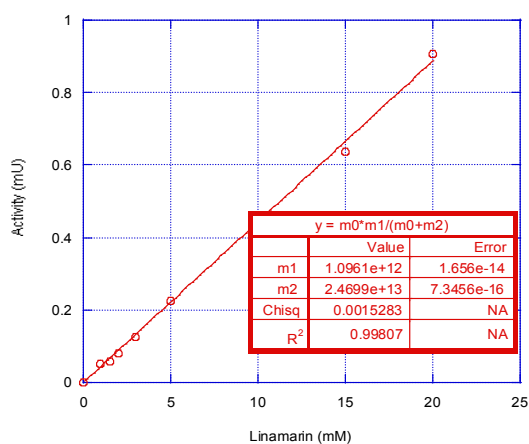
ภาพผนวกที่ ข10 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-V255F ในการสลายลินามาริน

11. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลายลินามาริน



ภาพผนวกที่ ข11 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F-V255F ในการสลายลินามาริน

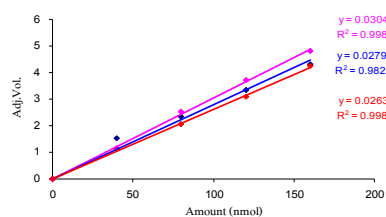
12. กราฟ Michaelis-Menten ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลายลินามาริน



ภาพผนวกที่ ข12 กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A-N189F-V255F ในการสลายลินามาริน

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานของ TLC

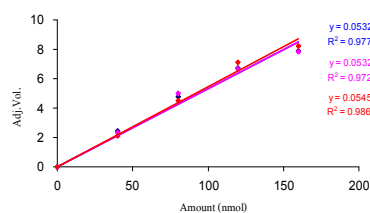
1. กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ methanol



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ methanol

โดย ◆ คือ glucose; ◆ คือ เมทิล กลูโคไซด์; ◆ คือ pNP-Glc

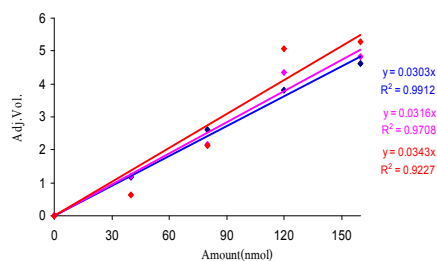
2. กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ ethanol



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ ethanol

โดย ◆ คือ glucose; ◆ คือ เมทิล กลูโคไซด์; ◆ คือ pNP-Glc

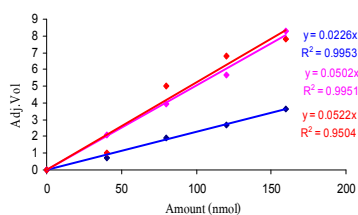
3. กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ n-propanol



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ n-propanol

โดย ◆ คือ glucose; ◆ คือ เมทิล กลูโคไซด์; ◆ คือ pNP-Glc

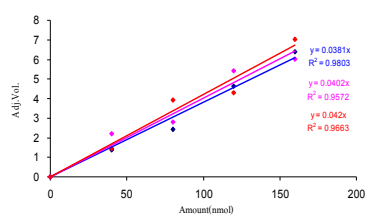
4. กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *n*-butanol



ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *n*-butanol

โดย ◆ คือ glucose; ◆ คือ เมทิล กลูโคไซด์; ◆ คือ *p*NP-Glc

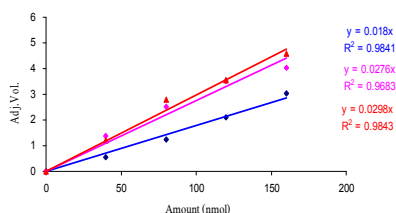
5. กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *iso*-propanol



ภาพผนวกที่ ข5 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *iso*-propanol

โดย ◆ คือ glucose; ◆ คือ เมทิล กลูโคไซด์; ◆ คือ *p*NP-Glc

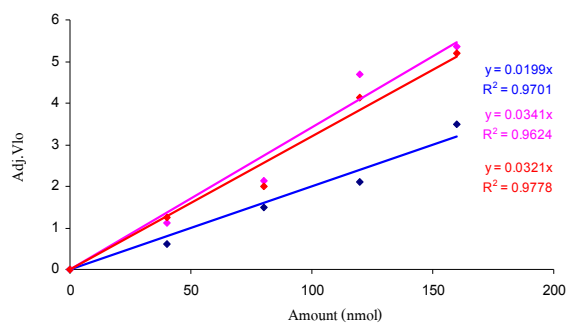
6. กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *iso*-butanol



ภาพผนวกที่ ข6 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *iso*-butanol

โดย ◆ คือ glucose; ◆ คือ เมทิล กลูโคไซด์; ◆ คือ *p*NP-Glc

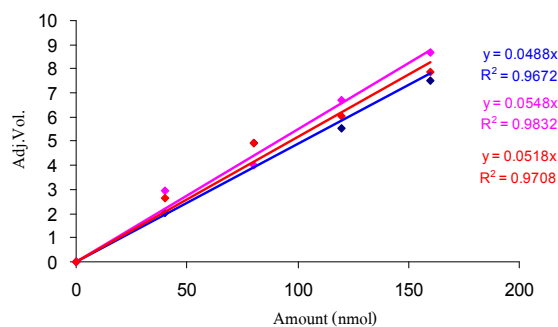
7. กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *sec*-butanol



ภาพผนวกที่ ข7 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *sec*-butanol

โดย ◆ คือ glucose; ◆ คือ เมทิล กลูโคไซด์; ◆ คือ *p*NP-Glc

8. กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *tert*-butanol



ภาพผนวกที่ ข8 กราฟมาตรฐานของ TLC สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ *tert*-butanol

โดย ◆ คือ glucose; ◆ คือ เมทิล กลูโคไซด์; ◆ คือ *p*NP-Glc

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางนุสรา ทองทับทิม
วัน เดือน ปี เกิด	วันที่ 27 เมษายน 2527
สถานที่เกิด	ปทุมธานี
ประวัติการศึกษา	วทบ.สาขาชีววิทยาประยุกต์ (จุลชีววิทยา) สถาบันราชภัฏสวนสุนันทา
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา (พ.ศ.2551)