

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

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน (คัลโคซิเนส) สามารถสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิได้เท่านั้น ซึ่งตรงกันข้ามกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากมัน
ลำปะหลัง (ลินามาเรส) ที่สามารถใช้ได้ทั้งแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิและตติยภูมิเป็นตัวรับ
กลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติเฉพาะตัว คือ คัลโคซิโน-กลู
โคไซด์ และลินามาริน ตามลำดับ การกลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่งในบริเวณจับสับสเตรท ของ
เอนไซม์คัลโคซิเนส ไปเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส สามารถลดความจำเพาะต่อคัลโคซิ
โน-กลูโคไซด์ได้ แต่ยังไม่สามารถสลายลินามารินได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์คัลโคซิเนส
กลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการปรับปรุงปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้ดีขึ้น คือ I185A, N189F และ
V255F ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการกลายพันธุ์ครั้งละ 2-3 ตำแหน่ง ในบริเวณจับสับสเตรท ของ
เอนไซม์คัลโคซิเนส ด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส คือ I185A-N189F, I185A-V255F,
N189F-V255F และ I185A-N189F-V255F เพื่อตรวจสอบอันตรกิริยาของกรดอะมิโนที่มีผลต่อ
ความจำเพาะในการสลายสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส พบว่า ทั้งตำแหน่ง I185,
N189 และ V255 ในเอนไซม์คัลโคซิเนส มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาสลายคัลโคซิโน-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
ผลิตอัลคิลกลูโคไซด์โดยใช้ *iso-propanol* ได้ดี อย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เอนไซม์คัลโคซิเนสกลาย
พันธุ์ N189F-V255F มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ
เอนไซม์กลายพันธุ์ครั้งละ 1 ตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ยังไม่สามารถ
สังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์โดยใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับกลูโคสได้