195794

อมรรัตน์ อ่อนเปี่ยม 2550: การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะในช่องจับอะไกลโคนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) สาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี ประธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D. 124 หน้า

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสไม่เพียงแต่สลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิคเท่านั้น แต่บางชนิดยังสามารถเร่งปฏิกิริยาข้อนการสลายและปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับลินามาเรสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง เอนไซม์ดัลโคชิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูงทำหน้าดีกว่าในปฏิกิริยาข้อนการสลาย แต่ด้อยกว่าในปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส เอนไซม์ทั้งสองชนิดต่างมีความจำเพาะกับสับสเตรทธรรมชาติของตัวเอง (ดัลโคชินินกลูโคไซด์และลินามาริน ตามลำดับ) ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสองชนิดจึงมีความแตกต่างทั้งในการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะต่อสับสเตรท แม้ว่าจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันถึง 70% งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส โดยใช้เอนไซม์ดัลโคชิเนสและลินามาเรสเป็นตัวอย่างศึกษา โดยการแทนที่กรดอะมิโนในช่องจับอะไกลโคนของดัลโคชิเนสด้วยกรดอะมิโนของลินามาเรส (M195V H253F N323Q และ K402Y) ทำการแสดงออกดัลโคชิเนสกลายพันธุ์ในยีสต์ *Pichia pastoris* และทำให้บริสุทธิ์ ดัลโคชิเนสกลายพันธุ์ทุกชนิดมีลักษณะคล้ายกับดัลโคชิเนสก่อนกลายพันธุ์โดยการวิเคราะห์โดยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคลิลาไมด์เจล เวสเทอร์นอิมมูโนวิเคราะห์ และอิเลคโตรโฟรีซิสแบบนอนดีแนชเชอริงพอลิอะคริลาไมด์เจล เมื่อศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ดัลโคชิเนส พบว่าค่า K_m ของ M195V N323Q และ K402Y ต่อดัลโคชินินกลูโคไซด์ลดลง แต่ไม่เปลี่ยนแปลงสำหรับ K_m ของ H253F และเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดมีค่า K_m ต่อ *para*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside ลดลง แต่เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิดยังคงไม่สามารถสลายลินามารินได้ จากการศึกษาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสเอนไซม์กลายพันธุ์ทุกชนิด พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์เหล่านี้สามารถใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิบางตัวเป็นตัวรับน้ำตาลได้ดีกว่าดัลโคชิเนสธรรมชาติและรีคอมบิแนนท์ดัลโคชิเนส โดย M195V สามารถใช้ *iso*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี H253F และ N323Q สามารถใช้ methanol *n*-butanol *iso*-butanol และ *iso*-propanol เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี และ K402Y สามารถใช้แอลกอฮอล์ *n*-butanol *iso*-butanol และ iso-propanol เป็นตัวรับน้ำตาลได้ดี แต่เอนไซม์กลายพันธุ์ทุกตัวยังคงไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับน้ำตาลได้ สรุปได้ว่าตำแหน่งที่เลือกมาทำการกลายพันธุ์ในการทดลองนี้มีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรท และปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส เพราะทำให้คุณสมบัติของเอนไซม์เปลี่ยนไป อาจเป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้ได้เอนไซม์กลายพันธุ์ที่สามารถสลายลินามาริน และใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับน้ำตาลได้ ดังนั้นถ้าทำการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่งอาจทำให้เอนไซม์ดัลโคชิเนสกลายพันธุ์ที่ได้สามารถสลายลินามาริน และสามารถย้ายหมู่น้ำตาลไปให้ทั้งแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิได้

195794

Amornrat Onpium 2007: Site-directed Mutagenesis in the Aglycone Binding Pocket of Thai Roeswood Beta-Glucosidase. Master of Science (Biochemistry), Major Field: Biochemistry, Department of Biochemistry. Thesis Advisor: Mrs. Prachumporn Kongsaeree, Ph.D. 124 pages.

β-Glucosidases not only hydrolyze of β-glucosidic linkage, but some also catalyze reverse hydrolysis and transglucosylation. Dalcochinase (Thai rosewood β-glucosidase) was better for reverse hydrolysis, but poorer for transglucosylation, when compared with linamarase (cassava β-glucosidase). Both enzymes also exhibit specificities for their natural substrates (dalcochinin glucoside and linamarin, respectively). So they show differences in catalytic properties and substrate preferences, despite sharing 70% amino acid sequence identity. This research aims to identify key amino acid residues for function of β-glucosidases, using dalcochinase and linamarase as models. Amino acid residues in the aglycone binding pocket of dalcochinase were replaced with the corresponding residues of linamarase (M195V, H253F, N323Q and K402Y). Mutant enzymes were expressed in *Pichia pastoris* and purified. All mutants appeared similar to wild-type recombinant dalcochinase as judged by SDS-PAGE, western blot and activity staining on non-denaturing PAGE. Kinetic studies of all mutants, compared with recombinant wild-type dalcochinase, showed a decrease in K_m of M195V, N323Q and K402Y for hydrolysis of dalcochinin glucoside but the same K_m of H253F. K_m of all mutants decreased for hydroysis of *para*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside. No mutant could hydrolyze linamarin. From transglucosylation reaction studies, all mutants could use some primary and secondary alcohols as glucosyl acceptors better than wild-type natural and recombinant dalcochinase. M195V could transfer glucose to *iso*-propanol. H253F and N323Q could transfer glucose to methanol, *n*-butanol, *iso*-butanol and *iso*-propanol. K402Y could transfer glucose to *n*-butanol, *iso*-butanol and *iso*-propanol. Still, none of them could use tertiary alcohol as glucosyl acceptor. So, all mutations selected in this project are important for catalyzing substrate hydrolysis and transglucosylation since they could alter enzyme properties. It is possible that mutation at only 1 position is not enough to generate dalcochinase mutant that can hydrolyze linamarin and use tertiary alcochols as glucosyl acceptor. So, if mutations are made at more than 1 position, the resulting dalcochinase mutant may be able to hydrolyze linamarin and transfer glucose to primary, secondary and tertiary alcohols.