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

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสไม่เพียงแต่สลายพันธะเบต้า-กลูโคซิดิคเท่านั้น แต่บางชนิดยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายและปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับลินามาเรสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง เอนไซม์ดัลโคชิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูงทำหน้าดีกว่าในปฏิกิริยาย้อนการสลาย แต่ด้อยกว่าในปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส เอนไซม์ทั้งสองชนิดต่างมีความจำเพาะกับสับสเตรทธรรมชาติของตัวเอง (ดัลโคชินินกลูโคไซด์และลินามาริน ตามลำดับ) ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสองชนิดจึงมีความแตกต่างทั้งในการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะต่อสับสเตรท แม้ว่าจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันถึง 70% งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสโดยใช้เอนไซม์ดัลโคชิเนสและลินามาเรสเป็นตัวอย่างศึกษา 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

____________________ ____________________ ____ / ____ /

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ