ชมพูนุท พรเจริญนพ 2550: การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์จากพะยูง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D. 140 หน้า

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในส่วนของหมู่อะไกลโคน เอนไซม์ดัลโคซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูงมีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติดัลโคชินินกลูโคไซด์ ขณะที่เอนไซม์ลินามาเรสซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง มีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติลินามาริน เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้นอกจากจะเร่งปฏิกิริยาการสลายได้แล้ว ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย และปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสได้อีกด้วย โดยเอนไซม์ดัลโคซิเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายได้ดี และสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และทุติยภูมิเป็นตัวรับได้ แต่ไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับได้ ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ลินามาเรสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิเป็นตัวรับได้ แต่เร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายไม่ได้ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพื่อหาตำแหน่งของกรดอะมิโนในบริเวณช่องจับกับหมู่อะไกลโคน ที่น่าจะมีความสำคัญต่อความจำเพาะต่อสับสเตรท และการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ในงานวิจัยนี้ได้สร้างเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 4 ชนิด คือ I185A V255F G367S และ E455I โดยการแทนที่กรดอะมิโนในบริเวณที่คาดว่าทำหน้าที่จับกับหมู่อะไกลโคนของเอนไซม์ดัลโคซิเนส ด้วยกรดอะมิโนของเอนไซม์ลินามาเรส ทำการโคลน และให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* จากนั้นสกัดให้บริสุทธิ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A V255F G367S และ E455I ไม่ทำให้เอนไซม์สลายลินามารินได้ แต่ลดค่า K_m ในการสลายดัลโคชินินกลูโคไซด์ เอนไซม์กลายพันธุ์ I185A และ E455I ทำให้ค่า K_m ในการสลาย *para*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการสลายดัลโคชินินกลูโคไซด์ และ *p*NP-Glc น้อยลงมาก เมื่อศึกษาการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสพบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A และ V255F เพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิเป็นตัวรับ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ทั้ง 4 ชนิด ยังไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ตติยภูมิเป็นตัวรับได้เลย ดังนั้นจึงคาดว่าหากทำการกลายพันธุ์ที่มากกว่า 1 ตำแหน่ง จะทำให้ได้เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ชนิดใหม่ที่สามารถทำงานได้คล้ายกับเอนไซม์ลินามาเรสมากขึ้น

ชมพูนุท พรเจริญนพ — ลายมือชื่อนิสิต

ประชุมพร คงเสรี — ลายมือชื่อประธานกรรมการ

18 / 05 / 2550