นารถชนก ศรีโท : การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่บริเวณแร่ง Aspartate 313 และ Tyrosine 435 ของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi* (MUTATIONAL ANALYSIS OF THE ACTIVE SITE RESIDUES ASPARTATE 313 AND TYROSINE 435 OF CHITINASE A FROM A MARINE BACTERIUM *Vibrio harveyi*) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 139 หน้า.

ไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคติน จากโครงสร้าง 3 มิติพบว่า กรดอะมิโน aspartate 313 และ tyrosine 435 อยู่ที่ตำแหน่งจับ -1 และ +2 เพื่อเข้าใจบทบาทและหน้าที่ของกรดอะมิโนดังกล่าว จึงทำการกลายพันธุ์แบบเฉพาะตำแหน่ง ได้แก่ โปรตีนกลายพันธุ์ D313A D313N Y435A และ Y435W โปรตีนดั้งเดิม มี pH ที่เหมาะสมที่ 6 การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Asp313 ทุกช่วง pH มีผลต่อค่า k_{cat} และค่า k_{cat}/K_m แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า K_m จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายตัวถูกย่อยและรูปแบบการย่อยสลายตัวถูกย่อยไคตินด้วยวิธี TLC ของโปรตีนกลายพันธุ์ D313A/N ทั้งสองนี้ทำให้การทำงานของเอนไซม์ไคติเนส เอ ลดลง สำหรับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Tyr435 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการเร่งปฏิกิริยาและการจับกับตัวถูกย่อยทั้งหมด โดยทำการทดลองจากโปรตีนกลายพันธุ์ Y435A กับเทคนิคทางชีวเคมีต่างๆ ในขณะที่การกลายพันธุ์ของ Tyr435 ด้วย Trp พบว่าการเร่งปฏิกิริยาและการจับกับตัวถูกย่อยลดลง จึงสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่ากรดอะมิโน Asp313 มีความสำคัญในการช่วยย่อยสลายตัวถูกย่อยโดยทำหน้าที่ช่วยทำให้สารตัวกลาง oxazolanium มีความสเถียร ส่วนกรดอะมิโน Tyr 435 ทำหน้าที่ในการเป็นตัวกั้นที่จุดปลายของน้ำตาลด้านปลายรีดิวซ์

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา นารถชนก

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

NATCHANOK SRITHO : MUTATIONAL ANALYSIS OF THE ACTIVE SITE RESIDUES ASPARTATE 313 AND TYROSINE 435 OF CHITINASE A FROM A MARINE BACTERIUM *Vibrio harveyi*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 139 PP.

CHITINASE A VIBRIO SITE-DIRECTED MUTAGENESIS KINETICS CHITIN

Chitinase A (EC 3.2.1.14) from *Vibrio harveyi* belongs to glycosyl hydrolase family-18. The X-ray structure of chitinase A in complex with $GlcNAc_6$ displays Asp313 at subsite −1 and Tyr435 at subsite +2. Site-directed mutagenesis at residues Asp313 and Tyr435 generated four mutants namely D313A, D313N, Y435A, and Y435W. The pH activity profiles revealed the optimum pH of the wild-type enzyme as 6.0 and the pK_a values of the two ionizable groups of 4 and 8. Mutation of Asp313 severely affected the k_{cat} and the k_{cat}/K_m over the entire range of pH, although it did not significantly change the K_m values. The dramatic effects of the Asp313 mutations on the hydrolytic and binding activities of *V. harveyi* chitinase A further confirmed the important role of this residue in stabilization of the transition state through the "substrate-assisted" mechanism. Regarding Tyr435 mutations, the Y435A mutant enzyme showed increased catalytic activity, suggesting that Ala substitution might partially remove the steric clash around the reducing subsites, thereby allowing the sugar chain to move beyond or to access the reducing end subsites more straightforwardly.

School of Biochemistry Student's Signature Natchanok.

Academic Year 2009 Advisor's Signature