ศุภนิดา วรแก่นทราย : ไฮทรูพุทสกรีนนิงโดยใช้สารตัวแทนที่ถูกออกแบบสำหรับการวิศวกรรมเอนไซม์แฟททีแอลดีไฮด์รีดักเตส (HIGH-THROUGHPUT SCREENING USING DESIRED SURROGATES FOR FATTY ALDEHYDE REDUCTASE ENGINEERING) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ่ง-ยี ไลย์, 84 หน้า.

คำสำคัญ: ไขมันแอลกอฮอล์ ไขมันแอลดีไฮด์รีดักเตส ไฮทรูพุทสกรีนนิง การวิศวกรรมโคเอนไซม์

ไขมันแอลกฮอล์คือสารตั้งต้นของอุตสาหกรรมที่สำคัญมากซึ่งส่วนใหญ่ถูกผลิตมาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล อย่างไรก็ตาม การใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นระยะเวลายาวนานได้สร้างความกังวลเป็นอย่างมากเกี่ยวกับการลดลงของเชื้อเพลิงฟอสซิลและภาวะโลกร้อน เพื่อที่จะจัดการกับปัญหาเหล่านี้ นักวิทยาศาสตร์ใช้ชีววิทยาสังเคราะห์เพื่อวิศวกรรมจุลินทรีย์ในการผลิตไขมันแอลกอฮอล์ ขั้นตอนสุดท้ายของชีวสังเคราะห์ของไขมันแอลกอฮอล์คือการรีดิวซ์ไขมันแอลดีไฮด์เป็นไขมันแอลกอฮอล์ที่เร่งปฏิกิริยาโดยไขมันแอลดีไฮด์รีดักเตส การเพิ่มกิจกรรมของไขมันแอลดีไฮด์รีดักเตสคือหนึ่งวิธีเพื่อให้ผลผลิตของไขมันแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น วิธีการพื้นฐานสำหรับใช้ตรวจสอบกิจกรรมของไขมันแอลดีไฮด์รีดักเตสคือการดูการลดลงของ NAD(P)H โดยใช้เครื่องสเปคโตร UV-Vis ที่ 340 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้ใช้แรงงานที่มากและใช้เวลานานทำให้ไม่เหมาะสมสำหรับไฮทรูพุทสกรีนนิง วิทยานิพนธ์นี้ได้พัฒนาสารตัวแทนของไขมันแอลดีไฮด์สำหรับไฮทรูพุทสกรีนนิงของไขมันแอลดีไฮด์รีดักเตส สารตัวแทนของเฮกซานาลและออคทานาลคือ T6 และ T8 ซึ่งมีหมู่ฟอร์มิลไธโอเอสเทอร์ สารตัวแทนสามารถถูกรีดิวซ์โดยไขมันแอลดีไฮด์รีดักเตส YahK จากนั้นเกิดเป็นฟอร์มาลดีไฮด์ ฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับสารเพอพาล์ดแล้วให้เป็นสารที่มีสีม่วงซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาหรือหาปริมาณได้ด้วยวัดการดูดกลืนแสงช่วง 550 นาโนเมตร เพื่อสาธิตการใช้ประโยชน์ของสารตัวแทนนี้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการประยุกต์สารตัว T6 เพื่อคัดกรอง library ของ YahK ที่เกิดการกลายจำนวน 2 variants ที่มีความจำเพาะต่อ NADH เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type ของ YahK

สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนักศึกษา ศุภนิดา วรแก่นทราย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Rung-Yi Lai

SUPHANIDA WORAKAENSAI : HIGH-THROUGHPUT SCREENING USING DESIGNED SURROGATES FOR FATTY ALDEHYDE REDUCTASE ENGINEERING. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RUNG-YI LAI, Ph.D. 84 PP.

Keywords: Fatty alcohol, Fatty aldehyde reductase, High-throughput screening, Coenzyme engineering

Fatty alcohols are crucial industrial precursors majorly produced from fossil fuels. However, long-term usage of fossil fuels generates substantial concerns about fossil fuel depletion and global warming. Researchers used synthetic biology to engineer microorganisms to produce fatty alcohols to overcome these issues. The last step of fatty alcohol biosynthesis is to reduce a fatty aldehyde to the corresponding fatty alcohol, which is catalyzed by fatty aldehyde reductase (FALR). To achieve higher yields of fatty alcohol, improvement of FALR activity is one approach. The standard assay to characterize FALR activity is to monitor NAD(P)H consumption by purified FALR by UV-Vis spectroscopy at 340 nm. This is laborious and time-consuming, making it unsuitable for high-throughput screening (HTS). This thesis developed the fatty aldehyde surrogates for HTS of FALR. The surrogates of hexanal and octanal are T6 and T8, which contain a formyl thioester group. The surrogates were reduced by *E. coli* YahK to generate formaldehyde. The resulting formaldehyde was derivatized by Purpald to yield a purple adduct, which is simply observed by the naked eye or quantified by UV-vis spectroscopy at 550 nm. To demonstrate the applicability of the surrogates, I successfully applied the surrogate T6 to screen a YahK FALR library to identify two variants with improved NADH specificities compared to YahK wild type preferring NADPH.

School of Chemistry
Academic Year 2022

Student's Signature สุภนิดา วรแก่นทราย
Advisor's Signature Rung-Yi Lai