



การศึกษาการจำลองพลศาสตร์ระดับโมเลกุลของปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ปาเปนเพื่อ  
ประยุกต์ใช้ทางเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์



โดย  
นายภูมิพัฒน์ ทำดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2

ภาควิชาเคมี

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาการจำลองพลศาสตร์ระดับโมเลกุลของปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์  
ปาเปนเพื่อประยุกต์ใช้ทางเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2

ภาควิชาเคมี

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION STUDY OF PAPAIN STABILITY FOR  
ENZYME-BASED BIOSENSOR PURPOSE



By  
MR. Poomipat TAMDEE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for Master of Science CHEMISTRY  
Department of CHEMISTRY  
Academic Year 2024  
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ การศึกษาการจำลองพลศาสตร์ระดับโมเลกุลของปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียร  
ของเอนไซม์ปาเปนเพื่อประยุกต์ใช้ทางเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์  
โดย นายภูมิพัฒน์ ทำดี  
สาขาวิชา เคมี แผนก ก แบบ ก 2  
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตนภา ศิริรักษ์

---

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรงค์ ฉิมพาลี)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนพล เจริญวงษ์ไพบูลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตนภา ศิริรักษ์)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก  
(ดร. กรัณท์ วังไพบูลย์)



650720043 : เคมี แผน ก แบบ ก 2

คำสำคัญ : ไปโอเซนเซอร์, ปาเปน, การจำลองเชิงพลศาสตร์ระดับโมเลกุล, ตัวทำละลายอินทรีย์

นาย ภูมิพัฒน์ ทำดี: การศึกษาการจำลองพลศาสตร์ระดับโมเลกุลของปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ปาเปนเพื่อประยุกต์ใช้ทางเอนไซม์ไปโอเซนเซอร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตนภา ศิริรักษ์

ไปโอเซนเซอร์ เป็นอุปกรณ์สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) สูง โดยได้มีการนำเอนไซม์มาเป็นส่วนประกอบเป็น เอนไซม์-ไปโอเซนเซอร์ ความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้เป็นไปโอเซนเซอร์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพและความแม่นยำของผลลัพธ์ที่ได้ โดยในงานวิจัยนี้ได้สนใจเอนไซม์ปาเปน เป็นกลุ่มของโปรทีเอสเอนไซม์ที่พบมากในมะละกอ (*Carica papaya* L.) และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในหลายสาขา มีกลไกที่เข้าใจง่ายและคุ้มค่า มาประยุกต์ใช้ในการทำเป็นไปโอเซนเซอร์ โดยใช้ซับสเตรตที่ชื่อว่า  $N\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroaniline (BAPNA) ซึ่งเป็นซับสเตรตที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทางสี (colorimetric analysis) นำมาใช้เป็นตัวติดตาม activity ของปาเปน ซึ่งงานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการศึกษาผลของอะซิโตไนโตรล ใช้เป็น co-organic solvent ในระบบของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และน้ำที่มีความเสถียรของระบบระหว่างเอนไซม์ปาเปนและ BAPNA โดยใช้การจำลอง Molecular Dynamics (MD) ในการศึกษาตลอดระยะเวลา 300 นาโนวินาที โดยใช้ระบบปฏิบัติการ Amber20 จากผลการศึกษาพบว่า ระบบ 10:90 %v/v และ 50:50 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และน้ำ โมเลกุลของ BAPNA ยังสามารถเข้าจับกับบริเวณ active site ของปาเปนได้ตลอด 300 นาโนวินาที และเมื่อทำการเติมอะซิโตไนโตรลในระบบเป็น 10:10:80 %v/v ของอะซิโตไนโตรล, ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และน้ำ ผลการจำลองจะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปทรงของ BAPNA ที่ใช้ในการเข้าจับกับ active site ของปาเปน แต่ยังสามารถจับอยู่ในบริเวณ active site ได้ตลอดระยะเวลาในการจำลอง นอกจากนี้ยังทำการเพิ่มปริมาณของอะซิโตไนโตรลเป็น 50:10:40 %v/v ของอะซิโตไนโตรล, ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และน้ำ ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะรูปทรงของ BAPNA ค่อยๆเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาในการจำลอง และสุดท้าย BAPNA หลุดออกจากบริเวณ active site ของปาเปน ซึ่งสามารถบอกได้ว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณของอะซิโตไนโตรลเล็กน้อย ระบบของปาเปน-BAPNA ยังสามารถทำงานได้ แต่ถ้ามีปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลต่อการเข้าจับระหว่างปาเปนและ BAPNA ซึ่งจะส่งผลต่อความแม่นยำในการติดตาม activity ของปาเปน โดยผลการศึกษาสามารถนำไปเป็นแนวทางสำหรับการประยุกต์ใช้อะซิโตไนโตรลในไปโอเซนเซอร์เพื่อเพิ่มความสามารถในการใช้ในการตรวจสอบยาฆ่าแมลงที่ใช้ในการเกษตรที่มีความหลากหลายมากขึ้นในอนาคต

650720043 : Major CHEMISTRY

Keyword : Biosensors, Papain, Molecular dynamics simulations, organic solvents

MR. Poomipat TAMDEE : MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION STUDY OF PAPAIN STABILITY FOR ENZYME-BASED BIOSENSOR PURPOSE Thesis advisor : Assistant Professor Jitnapa Sirirak, Ph.D.

Biosensors are devices used for sample analysis with high sensitivity and selectivity. They are often combined with enzymes to create enzyme-based biosensors. However, the stability of the enzymes used in biosensors plays a vital role in determining the efficiency and accuracy of the analysis results. In this work, papain is investigated as an enzyme in biosensors. Papain is a protease enzyme found in papaya (*Carica papaya* L.). It offers various benefits and is applied in multiple fields due to its straightforward mechanism and cost-effectiveness. Moreover, N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine-p-nitroaniline (BAPNA) serves as a popular substrate utilized in colorimetric analysis that detected the activity of papain. The goal of this work is to study the effect of acetonitrile as a co-organic solvent in a mixture of dimethyl sulfoxide and water on the stability of the interaction between papain and BAPNA through molecular dynamics (MD) simulations over 300 ns using Amber20. The results showed that BAPNA remained bound to the active site of papain throughout the simulation in the 10:90 %v/v and 50:50 %v/v dimethyl sulfoxide and water systems. After adding acetonitrile, although BAPNA exhibited a conformational change while binding to papain's active site in the 10:10:80 %v/v acetonitrile, dimethyl sulfoxide, and water system, it remained bound to the active site for the entire 300 ns. Furthermore, in the 50:10:40 %v/v acetonitrile, dimethyl sulfoxide, and water system, the conformation of BAPNA gradually changed over the simulation time. Ultimately, BAPNA dissociated from papain's active site. These results indicate that a minimal amount of acetonitrile does not affect the stability of the papain-BAPNA complex. In contrast, an excessive amount of acetonitrile disrupts the binding between papain and BAPNA, potentially affecting the efficiency and accuracy of papain's activity detection. Therefore, this study provides guidelines for the application of acetonitrile in biosensors to enhance pesticide detection in various agricultural industries in the future.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือ การสนับสนุน และคำแนะนำจากบุคคลและองค์กรหลายฝ่าย ผู้เขียนขอแสดงความขอบคุณอย่างสุดซึ้งต่อทุกท่านที่มีส่วนสำคัญในกระบวนการศึกษาและวิจัยครั้งนี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตตภา ศิริรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักของผู้เขียน ที่ได้ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ชี้แนะแนวทางวิจัย และสนับสนุนทั้งในด้านวิชาการและด้านกำลังใจมาโดยตลอด ความเอาใจใส่และความกรุณาของอาจารย์เป็นแรงบันดาลใจสำคัญที่ทำให้ผู้เขียนสามารถก้าวผ่านความท้าทายต่าง ๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้ไปได้ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณิชนันท์ สิริสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่คอยแนะนำ และอธิบายข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการเขียนงานวิจัยในครั้งนี้อีกด้วย

นอกจากนี้ ขอขอบคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนพล เจริญวงศ์ ไพบุลย์ และ ดร.กรัณท์ วังไพบุลย์ ที่ได้เสียสละเวลาตรวจสอบ และให้คำแนะนำซึ่งช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ผู้เขียนขอขอบคุณภาคีวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้มอบทรัพยากรทางวิชาการ ห้องปฏิบัติการ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงโอกาสที่เปิดกว้างให้ผู้เขียนได้พัฒนาตนเองในด้านวิชาการ และผู้เขียนยังขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่ได้มอบทุนการศึกษาเพื่อสนับสนุนการศึกษาวิจัย ทำให้การดำเนินการในครั้งนี้สำเร็จลงได้ตามเป้าหมายที่ตั้งไว้

ท้ายที่สุดนี้ ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ครอบครัว และเพื่อนๆ ที่ได้เป็นกำลังใจสำคัญมาโดยตลอด ด้วยความรักและการสนับสนุนจากครอบครัว ทำให้ผู้เขียนมีกำลังใจในการเผชิญกับอุปสรรคและความยากลำบากจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

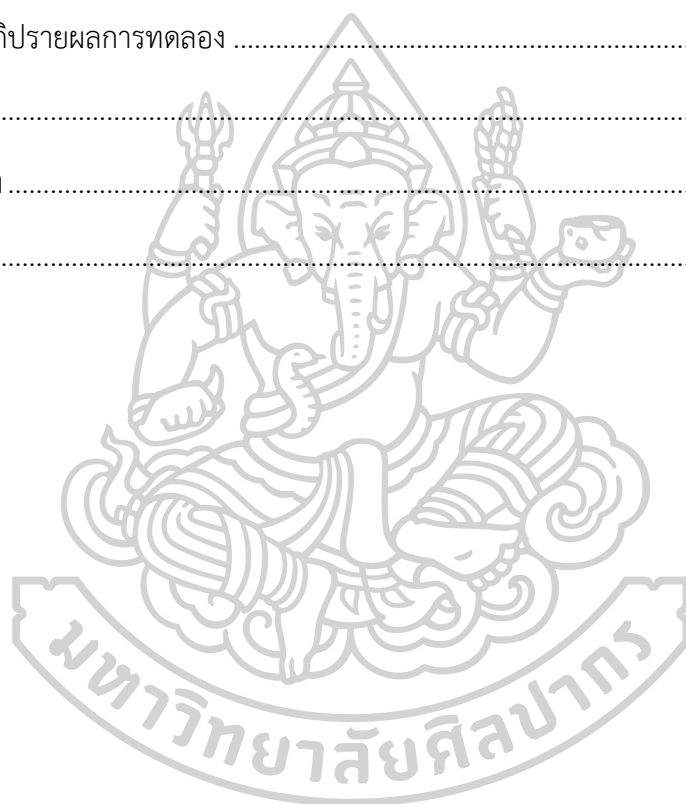
ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการวิชาการและการวิจัย รวมถึงผู้ที่สนใจในสาขาเคมีเชิงคำนวณในอนาคต

ภูมิพัฒน์ ทำดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐาน .....	3
1.4 ขอบเขตงานวิจัย .....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 .....	4
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ปาเปน (Papain).....	4
2.3 Molecular dynamics (MD) simulations .....	6
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
บทที่ 3 .....	8
วิธีการดำเนินการวิจัย .....	8
3.1 การเตรียมโปรตีน ลิแกนด์ และ Molecular Dynamics (MD) simulation.....	8

3.2 การวิเคราะห์ผลโดยใช้ CPPTRAJ module ของ AMBER20.....	9
บทที่ 4 .....	10
ผลการทดลองและอภิปรายผล .....	10
4.1 แบบจำลองของปาเปน – BAPNA ในระบบสารละลายต่าง ๆ .....	10
4.2 การวิเคราะห์ผลปัจจัยความเสถียรของแต่ละระบบโดยใช้ CPPTRAJ module.....	12
บทที่ 5 .....	27
สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง .....	27
แหล่งอ้างอิง .....	28
รายการอ้างอิง .....	30
ประวัติผู้เขียน .....	32



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวทำละลายในแต่ละระบบที่ใช้ในการสร้างโมเดลของแต่ละระบบ .....	9
ตารางที่ 2 กรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับปาเปนในระบบ 10:90 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์กับน้ำ ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที.....	17
ตารางที่ 3 จำนวนโมเลกุลของน้ำ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที.....	18
ตารางที่ 4 กรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับปาเปนในระบบ 50:50 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์กับน้ำ ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที.....	20
ตารางที่ 5 จำนวนโมเลกุลของน้ำ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที.....	20
ตารางที่ 6 กรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับปาเปนในระบบ 10:10:80 %v/v ของอะซิโตไนไตรล์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ กับน้ำ ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที .....	22
ตารางที่ 7 จำนวนโมเลกุลของน้ำ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และอะซิโตไนไตรล์ ที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที .....	23
ตารางที่ 8 กรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับปาเปนในระบบ 50:10:40 %v/v ของอะซิโตไนไตรล์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที .....	25
ตารางที่ 9 จำนวนโมเลกุลของน้ำ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และอะซิโตไนไตรล์ ที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที.....	26

## สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 กลุ่มโครงสร้างยากำจัดศัตรูพืช ได้แก่ (ก) พาราควอต (Paraquat) (ข) คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) และ(ค) ไกลโฟเซต (Glyphosate).....	1
รูปที่ 2 โครงสร้างของตัวอย่างยากำจัดศัตรูพืชที่มีวงอะโรมาติก (ก) DDT (ข) DDD และ(ค) Chlorobenzilate.....	2
รูปที่ 3 โครงสร้างปาเปน (PDB ID:6PAD) ประกอบด้วย L-domain (สีแดง) และ R-domain (สีน้ำเงิน).....	4
รูปที่ 4 แสดงกลไกการเกิดการเร่งปฏิกิริยาของปาเปน .....	5
รูปที่ 5 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ BAPNA โดยใช้ปาเปนในการเร่งปฏิกิริยา .....	6
รูปที่ 6 Effect of organic solvent on $k_{cat}$ (■) and $K_m$ (●) for the hydrolysis of (A) benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) and (B) benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) at 30°C and Values of $k_{cat}$ are based on the concentration of active sites determined by active site titration. ....	7
รูปที่ 7 ระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ ที่ ก) 0 นาโนวินาที และ ข) 300 นาโนวินาที โดยสีแดงแสดงโมเลกุลของน้ำ สีเหลืองแสดงโมเลกุลไดเมทิลซัลฟอกไซด์ สีส้มแสดงโครงสร้างปาเปน และสีชมพูแสดงโครงสร้าง BAPNA .....	10
รูปที่ 8 ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ ที่ ก) 0 นาโนวินาที และ ข) 300 นาโนวินาที โดยสีแดงแสดงโมเลกุลของน้ำ สีเหลืองแสดงโมเลกุลไดเมทิลซัลฟอกไซด์ สีส้มแสดงโครงสร้างปาเปน และสีชมพูแสดงโครงสร้าง BAPNA .....	11
รูปที่ 9 ระบบ 10:10:80 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-น้ำ ที่ ก) 0 นาโนวินาที และ ข) 300 นาโนวินาที โดยสีแดงแสดงโมเลกุลของน้ำ สีเหลืองแสดงโมเลกุลไดเมทิลซัลฟอกไซด์ สีน้ำเงินแสดงโมเลกุลของอะซิโตไนไตรล์ สีส้มแสดงโครงสร้างปาเปน และสีชมพูแสดงโครงสร้าง BAPNA.....	11
รูปที่ 10 ระบบ 50:10:40 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ ที่ ก) 0 นาโนวินาที และ ข) 300 นาโนวินาที โดยสีแดงแสดงโมเลกุลของน้ำ สีเหลืองแสดงโมเลกุลได	

เมทิลซัลฟอกไซด์ สีนํ้าเงินแสดงโมเลกุลของอะซิโตไนไตรล์ สีส้มแสดงโครงสร้างปาเปน และสีชมพูแสดงโครงสร้าง BAPNA..... 12

รูปที่ 11 ค่า RMSD ของระบบปาเปน-BAPNA ในสารละลายระบบต่าง ๆ โดยระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า เป็นระบบควบคุม (เส้นสีดำ) เปรียบเทียบกับ ก) ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า (เส้นสีฟ้า, ข) ระบบ 10:10:80 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า (เส้นสีเขียว) และ ค) ระบบ 50:10:40 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า (เส้นสีเหลือง)..... 13

รูปที่ 12 ค่า RMSF ของระบบปาเปน-BAPNA ในสารละลายระบบต่าง ๆ โดยระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า เป็นระบบควบคุม (เส้นสีดำ) เปรียบเทียบกับ ก) ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า (เส้นสีฟ้า, ข) ระบบ 10:10:80 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)- นํ้า (เส้นสีเขียว) และ ค) ระบบ 50:10:40 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)- นํ้า (เส้นสีเหลือง)..... 14

รูปที่ 13 ค่า Rg ของระบบปาเปน-BAPNA ในสารละลายระบบต่าง ๆ โดยระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) – นํ้า เป็นระบบควบคุม (เส้นสีดำ) เปรียบเทียบกับ ก) ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า (เส้นสีฟ้า, ข) ระบบ 10:10:80 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)- นํ้า (เส้นสีเขียว) และ ค) ระบบ 50:10:40 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า (เส้นสีเหลือง)..... 15

รูปที่ 14 ค่า distance of center of mass ของระบบปาเปน-BAPNA ในสารละลายระบบต่าง ๆ โดยระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า เป็นระบบควบคุม (เส้นสีดำ) เปรียบเทียบกับ ก) ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-นํ้า (เส้นสีฟ้า, ข) ระบบ 10:10:80 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-นํ้า (เส้นสีเขียว) และ ค) ระบบ 10:50:40 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-นํ้า (เส้นสีเหลือง)... 16

รูปที่ 15 แสดง binding position (ก), บริเวณ active site ของปาเปน (ข) และ ลักษณะ binding conformation และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างปาเปน (สีส้ม) และ BAPNA (สีชมพู) (ค) ที่ได้จากการทำ Molecular Dynamics (MD) simulation ของระบบที่มี 10:90 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และนํ้า (สีแดง) ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที ..... 17

รูปที่ 16 แสดงโมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ในระยะภายใน 8 Å ในบริเวณที่ active site ของ BAPNA-papain complex (ข) ที่ได้จากการจำลอง Molecular Dynamics (MD)

simulation ของปาเปน (สีส้ม)-BAPNA (สีชมพู) complex ของระบบที่มี 10: 90 %v/v ของน้ำ (สีแดง), ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) ที่ 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที ..... 18

รูปที่ 17 แสดง binding position (ก), บริเวณ active site ของปาเปน (ข) และ ลักษณะ binding conformation และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างปาเปน (สีส้ม) และ BAPNA (สีชมพู) (ค) ที่ได้จากการทำ Molecular Dynamics (MD) simulation ของระบบที่มี 50:50 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที ..... 19

รูปที่ 18 แสดงโมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ในระยะภายใน 8 Å ในบริเวณที่ active site ของ BAPNA-papain complex (ข) ที่ได้จากการจำลอง Molecular Dynamics (MD) simulation ของปาเปน (สีส้ม)-BAPNA (สีชมพู) complex ของระบบที่มี 50:50 %v/v ของน้ำ (สีแดง) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) ที่ 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที ..... 20

รูปที่ 19 แสดง binding position (ก), บริเวณ active site ของปาเปน (ข) และลักษณะ binding conformation และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างปาเปน (สีส้ม) และ BAPNA (สีชมพู) (ค) ที่ได้จากการทำ Molecular Dynamics (MD) simulation ของระบบที่มี 10:10:80 %v/v ของ อะซิโตนไตรล (สีน้ำเงิน) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที..... 22

รูปที่ 20 แสดงโมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ในระยะภายใน 8 Å ในบริเวณที่ active site ของ BAPNA-papain complex (ข) ที่ได้จากการจำลอง Molecular Dynamics (MD) simulation ของปาเปน (สีส้ม) และBAPNA (สีชมพู) complex ของระบบที่มี 10:10:80 %v/v ของ อะซิโตนไตรล (สีน้ำเงิน) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่ 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที ..... 23

รูปที่ 21 แสดง binding position (ก), บริเวณ active site ของปาเปน (ข) และ ลักษณะ binding conformation และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างปาเปน (สีส้ม) และBAPNA (สีชมพู) (ค) ที่ได้จากการทำ Molecular Dynamics (MD) simulation ของระบบที่มี 50:10:40 %v/v ของ อะซิโตนไตรล (สีน้ำเงิน), ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที..... 25

รูปที่ 22 แสดงโมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ในระยะภายใน 8 Å ในบริเวณที่ active site ของ BAPNA-papain complex (ข) ที่ได้จากการจำลอง Molecular Dynamics (MD) simulation ของปาเปน (สีส้ม)-BAPNA (สีชมพู) complex ของระบบที่มี 50:10:40 %v/v ของ อะซิ

โตนไตรีล (สีน้ำเงิน), ไดมิลลัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่ 0, 100, 200 และ 300 นา  
โนวินาที..... 26

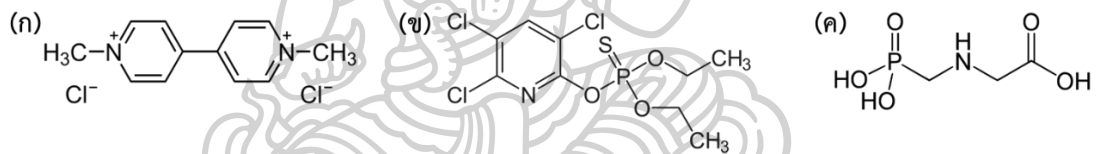


## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ยากำจัดศัตรูพืช เป็นสารเคมีที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเกษตรมาอย่างยาวนานในการควบคุมและกำจัดแมลงซึ่งอาจจะมารบกวนหรือทำลายผลผลิตทางเกษตร โดยปัจจุบันมีการใช้ยากำจัดศัตรูพืชมากขึ้น เนื่องจากเกษตรกรได้ผลผลิตที่สวยงาม และขายได้ในราคาสูง [1] แต่สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบนั้นส่งผลกระทบต่อร่างกายมนุษย์และกระจายตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นจำนวนมาก สารเคมีบางชนิดใช้เวลาย่อยสลายยาวนาน ตัวอย่างของยากำจัดศัตรูพืชที่นิยมใช้ ได้แก่ คาร์โบฟูราน (Carbofuran) เมโทมิล (Methomyl) ไดโครโตฟอส (Dicrotophos) อีพีเอ็น (EPN) [2] ในปัจจุบันมีกฎหมายห้ามใช้ยากำจัดศัตรูพืช 3 ชนิดที่มีอันตรายต่อมนุษย์ ได้แก่ พาราควอต (Paraquat) คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) และไกลโฟเซต (Glyphosate) [3] ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 1 แต่เกษตรกรก็ยังคงมีความจำเป็นในการใช้ยากำจัดศัตรูพืช ทำให้อาจมียากำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรและส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ดังนั้นการตรวจวัดหาปริมาณของยากำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรจึงมีความสำคัญ

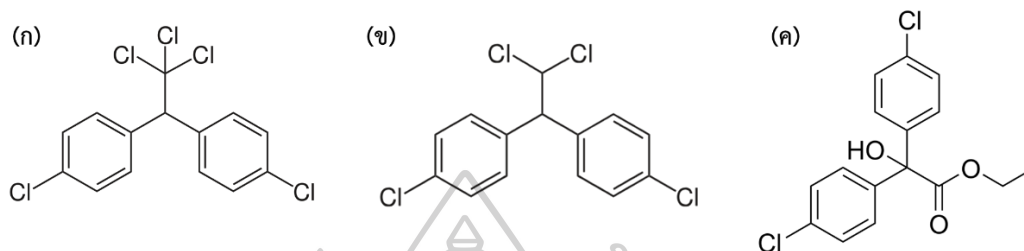


รูปที่ 1 กลุ่มโครงสร้างยากำจัดศัตรูพืช ได้แก่ (ก) พาราควอต (Paraquat) (ข) คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) และ (ค) ไกลโฟเซต (Glyphosate)

ไบโอเซนเซอร์ หรือ ตัวตรวจวัดทางชีวภาพ เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณสารตัวอย่างได้อย่างเฉพาะเจาะจง วิเคราะห์สารได้หลากหลาย รวดเร็ว และถูกต้อง ทำให้ไบโอเซนเซอร์ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น การตรวจสอบคุณภาพอาหาร ยา หรือ การตรวจหาเชื้อโรค หรือ สารพิษ ไบโอเซนเซอร์ สามารถเตรียมได้จากองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ องค์ประกอบทางชีวภาพ (Bioreceptor) เช่น เอนไซม์ แอนติบอดี จุลินทรีย์ ทรานสดิวเซอร์ (Transducer) เป็นส่วนที่ใช้ในการแปลงปฏิกิริยาที่เกิดเป็นสัญญาณต่าง ๆ เช่น อิเล็กโตรเคมี (Electrochemical) ออปติคัล (optical) หรือสี (colorimetric) และระบบการแปลผลสัญญาณ (Signal processor) ทำหน้าที่แปลผลสัญญาณที่ได้รับจากทรานสดิวเซอร์ให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์และแสดงผลได้ โดยปัจจุบันมีการใช้ไบโอเซนเซอร์มากขึ้น เนื่องจากเป็นอุปกรณ์ที่มีขนาดเล็ก พกพาสะดวก มีต้นทุนต่ำ และแสดงผลที่มีความแม่นยำ ในงานวิจัยนี้ได้สนใจการนำไปเป็นองค์ประกอบของไบโอเซนเซอร์ [4, 5]

ปาเปน (Papain) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Protease) ที่พบมากในมะละกอ มีกลไกที่เข้าใจง่าย ไม่ซับซ้อน ราคาต้นทุนต่ำ อุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา โดยโครงสร้างของปาเปนประกอบด้วยสองโดเมนที่มีรอยแยกตรงกลางระหว่างสองโดเมนคือ L-domain และ R-domain ซึ่งเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ที่มี catalytic triad อยู่ ประกอบด้วย Cys25 His159 และ Arg175 และยังประกอบด้วย

กรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) อยู่ในบริเวณโพรงซึ่งสามารถเกิดแรงอันตรกิริยา (interaction) กับอะตอมที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกหรืออะตอมที่ไม่มีขั้วกับสารที่เราสนใจได้ [6, 7] ปาเปนมีความจำเพาะกับซับสเตรดที่มีวงอะโรมาติก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับกลุ่มยากำจัดศัตรูพืชที่มีวงอะโรมาติก ตัวอย่างเช่น Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) Dichlorodiphenyldichloroethane (DDD) หรือ Chlorobenzilate ดังแสดงในรูปที่ 2 เพื่อนำมาใช้เป็นตัวรับสารชีวภาพของไบโอเซนเซอร์



รูปที่ 2 โครงสร้างของตัวอย่างยากำจัดศัตรูพืชที่มีวงอะโรมาติก (ก) DDT (ข) DDD และ (ค) Chlorobenzilate

ความเสถียรของเอนไซม์เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ โดยความเสถียรขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ pH เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา หรือตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากในการสกัดยาฆ่าแมลงจะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดออกมา ปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้จึงส่งผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งส่งผลต่อความถูกต้องของในการตรวจวัดหาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชได้ ดังนั้นการหาปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทต่าง ๆ ที่มีต่อการจับกันระหว่างปาเปนกับเบนโซอีลอาร์จินิน พาราไนโตรอะนิลีน (BAPNA) [4] ซึ่งทำหน้าที่เป็นซับสเตรดที่ใช้ในการติดตามการเกิดปฏิกิริยาของปาเปน โดยใช้เทคนิค Molecular Dynamics (MD) simulation และโปรแกรม AMBER20 [5] และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยการหาค่าต่าง ๆ เช่น Root-Mean-Square Deviation (RMSD) Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF) และ Important Distances Binding Free Energy Conformational variation of protein–ligand complexes เพื่อที่จะทำให้เข้าใจการดำเนินไปของปฏิกิริยาและผลกระทบในระดับโมเลกุลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเอนไซม์ต่อชนิดของสารละลายอินทรีย์ที่เกิดขึ้นได้ดีมาก

## 1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

- 1) ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความเสถียรและโครงสร้างของเอนไซม์โดยอาศัย Molecular Dynamics (MD) simulation
- 2) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง activity ของปาเปน BAPNA และการจับกันของโมเลกุลตัวทำละลายในบริเวณ active site ของปาเปน เพื่อให้เข้าใจถึงผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

### 1.3 สมมติฐาน

- 1) ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อความเสถียรและโครงสร้างของปาเปน
- 2) ตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อการเข้าจับของ BAPNA อาจทำให้เกิดผลที่มีความคลาดเคลื่อนจากผลการทดลองจริง

### 1.4 ขอบเขตงานวิจัย

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ศึกษา ได้แก่ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และอะซิโตนไตรีล

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทำให้ทราบผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อการทำงานของปาเปน
- 2) สามารถนำผลที่ได้มาใช้อธิบายภาพของการทำงานของเอนไซม์ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในไบโอเซนเซอร์

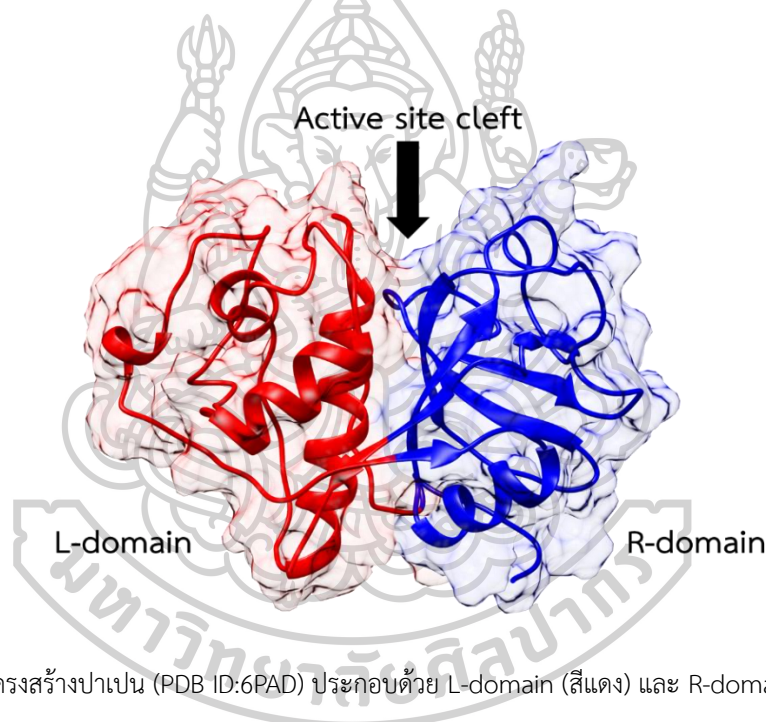


## บทที่ 2

### ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ปาเปน (Papain)

ปาเปนเป็นเอนไซม์ประเภทซิสทีอินโพรทีเอส (EC 3.4.22.2) ซึ่งแยกได้มาจากยางมะละกอ (*Carica papaya* L.) ซึ่งมีความสามารถเกี่ยวกับ proteolytic activity ที่สามารถย่อยโปรตีนให้มีสายเปปไทด์ที่สั้นลง หรือบริเวณที่เชื่อมกันระหว่างหมู่เอสเทอร์กับหมู่เอไมด์ โดยจะไปตัดพันธะเปปไทด์ที่บริเวณหมู่อะมิโน arginine lysine ตามด้วย phenylalanine ปาเปนจะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงค่า pH ตั้งแต่ 4 ถึง 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การทำงานอยู่ในช่วงตั้งแต่ 50 ถึง 65 องศาเซลเซียส [6, 7] ปาเปนมี activity ที่หลากหลายทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลาย ๆ ด้าน เช่น อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมยา และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น [8, 9]



รูปที่ 3 โครงสร้างปาเปน (PDB ID:6PAD) ประกอบด้วย L-domain (สีแดง) และ R-domain (สีน้ำเงิน)

โครงสร้างของปาเปน (รูปที่ 3) มีลักษณะเป็นสาย polypeptide สายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 กรดอะมิโนซึ่งขดพับออกเป็น 2 โดเมนที่ขนาดเท่ากันแต่ conformation ต่างกัน ได้แก่ L-domain (10–111 และ 208–212) และ R-domain (1–9 and 112–207) [10, 11] ซึ่งตรงกลางของทั้งสองโดเมนจะมีรอยแยกซึ่งเป็นบริเวณของ active site โดยบริเวณตรงกลางจะมีกลุ่ม sulfhydryl group และมี disulfide bridge อยู่ 3 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญมากในการทำงานของปาเปนและทำให้เอนไซม์มีความเสถียร กรดอะมิโนที่สำคัญที่อยู่ในบริเวณ active site ของปาเปน ได้แก่ Cys25 His159 Asn175 และ Gln19 [12] โดยกรดอะมิโน Cys25 His159 และ Asn175 เป็นตำแหน่งของ Catalytic triad [13] ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการตัดพันธะเปปไทด์ Asn175 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับ His159 โดย Asn175 จะช่วยปรับตำแหน่งวงแหวนอิมิดาโซลของ His159 ให้เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาและยังช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ ส่วน Cys25 และ His159 จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเป็นไปตามรูปที่ 4 โดยมีขั้นตอนดังนี้ [14]

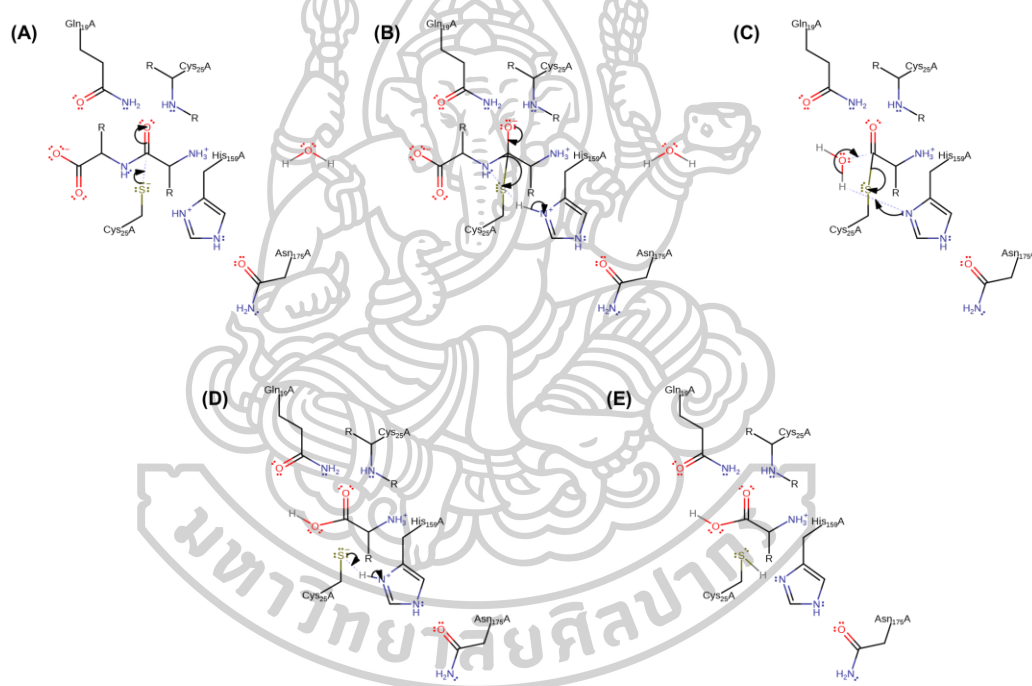
(A) หมู่ thiolate ของ Cys25 เกิด nucleophilic addition กับคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของพันธะเปปไทด์ทำให้เกิดพันธะเดี่ยวระหว่างคาร์บอนกับออกซิเจนทำให้เกิด Tetrahedral transition state

(B) หลังจากนั้นเกิด oxyanion เริ่มทำการกำจัดที่ตัดพันธะเปปไทด์ออก โดยทำ deprotonate บริเวณปลาย N ของโปรตีนออกจาก His159

(C) His159 ทำ deprotonate กับโมเลกุลน้ำ โดยเข้าไปชนกับคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของ Cys25 ที่จับอยู่กับ intermediate ในการเกิด nucleophilic substitution ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์บริเวณปลายคาร์บอนและ Cys25 กลับสู่ ground state อีกครั้ง

(D) Cys25 รับโปรตอนจาก His159 แล้วกลับเข้าสู่ native state ในบริเวณ active site

(E) รูปผลิตภัณฑ์หลังจากการเกิดปฏิกิริยา

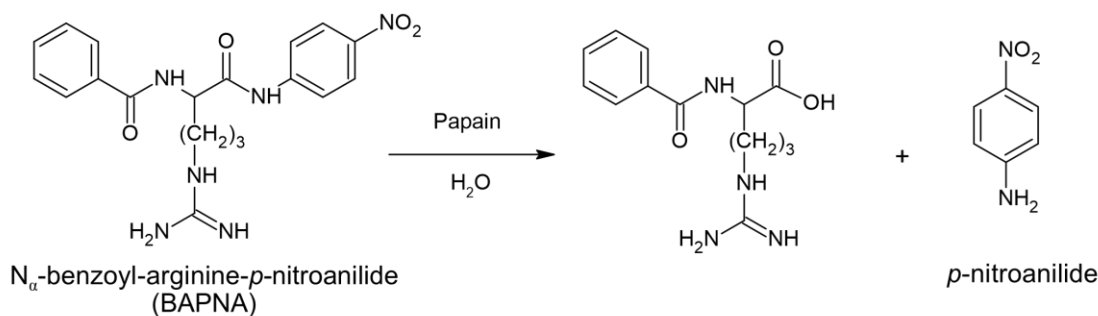


รูปที่ 4 แสดงกลไกการเกิดการเร่งปฏิกิริยาของปาเปน

(<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/m-csa/entry/174/>)

## 2.2 $N\alpha$ -benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA)

$N\alpha$ -benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) เป็นสารที่ไม่มีสี ซึ่งเมื่อถูกไฮโดรไลซ์โดยปาเปนจะให้ผลิตภัณฑ์ คือ *p*-nitroaniline ที่มีสีเหลือง ทำให้สามารถติดตามการทำงานของปาเปนได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลาย [15]



รูปที่ 5 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ BAPNA โดยใช้ปาเปนในการเร่งปฏิกิริยา

### 2.3 Molecular dynamics (MD) simulations

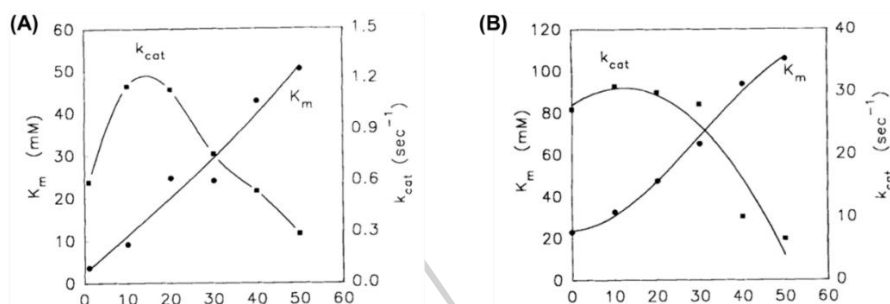
การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular dynamics (MD) simulation) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำลองชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญและเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางในการใช้ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติทางด้านโครงสร้าง ด้านไดนามิก (Dynamical) และเทอร์โมไดนามิกของโมเลกุลที่เราสนใจ MD simulation มักถูกนำมาใช้ในการศึกษาสารชีวโมเลกุล จำพวก โปรตีน หรือเอนไซม์ เช่น การศึกษาพฤติกรรมแบบไดนามิกของลิแกนด์ที่จับอยู่กับโปรตีน การศึกษาพฤติกรรมของโครงสร้างเอนไซม์ในสภาวะต่าง ๆ เป็นต้น [16]

Molecular dynamics (MD) เป็นเทคนิคทางเคมีคอมพิวเตอร์ที่เข้าใจง่าย ไม่ซับซ้อน ใช้ความสามารถของคอมพิวเตอร์ในการจำลองการเคลื่อนที่ของอะตอมทั้งหมดในระบบ โดยจะพิจารณาตำแหน่งเริ่มต้นของอะตอมทั้งหมด แล้วคำนวณแรงที่อะตอมแต่ละตัวได้รับจากอะตอมอื่น ๆ และใช้กฎของนิวตันทำนายตำแหน่งของแต่ละอะตอมตามฟังก์ชันของเวลา โดยมีพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณ เรียกว่า Force Field ซึ่งพารามิเตอร์นี้จะขึ้นอยู่กับลักษณะทางเรขาคณิตและกลศาสตร์ของโมเลกุล ค่าคำนวณโดยใช้หลักการของ Molecular mechanics ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ Bonded interaction ที่ประกอบด้วย bond angle dihedral และ Non-bonded interaction ที่ประกอบด้วย van der Waals และ Coulombic force โดยผลรวมของการคำนวณจะได้ออกมาในรูปของพลังงานของโมเลกุลในแต่ละขั้นของเวลา โดยมี software ที่ใช้ในการจำลองหลากหลายประเภท เช่น CHARMM AMBER GROMACS และ OPLS โดยแต่ละอันจะมีพารามิเตอร์ที่ให้กับแต่ละประเภทของอะตอมที่ต่างกันตามอัลกอริทึมของแต่ละอัน การจำลองด้วย MD ใช้เวลาในการทำงานเป็นหลายล้านหรือพันล้านขั้น โดยแต่ละขั้นจะใช้เวลาเพียงไมโครวินาทีเท่านั้น (10-15 ไมโครวินาที) ซึ่งอาจทำให้ต้องใช้เวลานานหลายวันหรือหลายสัปดาห์เพื่อจำลองการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนในทางชีวเคมีจะเกิดขึ้นในหน่วยของวินาทีหรือนาโนวินาที ทำให้การจำลอง MD ต้องใช้คอมพิวเตอร์ระดับสูง (Supercomputer) เพื่อให้การศึกษาดำเนินการได้อย่างต่อเนื่อง [17-19]

### 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

M. M. Fernandez et al., (1990) [20] ได้ศึกษาการทำงานของปาเปนที่ละลายอยู่ใน water-miscible organic solvent ในสัดส่วน 7:3 (v/v) ของตัวทำละลายอินทรีย์สองชนิด คือ N,N-dimethylformamide (DMF) และ dimethylsulfoxide (DMSO) โดยติดตาม amidase และ esterase activity ของปาเปนผ่านซับสเตรต 2 ชนิด คือ  $\text{N}_\alpha\text{-benzoyl-L-arginine-}p\text{-nitroanilide}$  (BAPNA) และ  $\text{N}_\alpha\text{-benzoyl-L-arginine ethyl ester}$  (BAEE) จากผลการศึกษาพบว่า ในช่วงความเข้มข้นต่ำถึงปานกลาง จะส่งผลให้ค่า  $k_{\text{cat}}$  (catalytic rate constant) เพิ่มขึ้น

แต่เมื่อถึงจุดหนึ่งค่า  $k_{cat}$  จะลดลงถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้น และจากค่า  $K_m$  ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์จะส่งผลให้การเข้าจับระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตลดลง ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลต่อ activity ของเอนไซม์และอาจรบกวนการจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตทำให้ทำงานได้น้อยลงได้



**รูปที่ 6** Effect of organic solvent on  $k_{cat}$  (■) and  $K_m$  (●) for the hydrolysis of (A) benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) and (B) benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) at 30°C and Values of  $k_{cat}$  are based on the concentration of active sites determined by active site titration.

M. Szabelski et al., (2001) [21] ได้ศึกษา papain activity ที่อยู่ใน water-organic solvent mixtures โดยใช้ Dabcyl-Lys-Phe-Gly-Gly-Ala-Ala-Edans เป็นซับสเตรต กับตัวทำละลายอินทรีย์ 7 ชนิด ได้แก่ methanol (MeOH), ethanol (EtOH), 2-propanol (iPrOH), 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), acetonitrile (MeCN), 1,2-dimethoxyethane (MeO)<sub>2</sub>Et และ dimethylformamide (DMF) จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ใน solvent mixture จะทำให้ initial rate of papain-catalyzed hydrolysis ลดลง ซึ่งตัวทำละลายที่ทำให้ค่า initial rate ลดลงอย่างรวดเร็ว คือ (MeO)<sub>2</sub>Et และ DMF ในช่วงความเข้มข้น 1 – 3 % v/v และสำหรับ MeOH ค่า initial rate ค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ อีกทั้งยังได้มีการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อจำนวนของ active site ของปาเปน โดยทดสอบกับสองตัวทำละลายคือ DMF กับ MeOH พบว่า เมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น จำนวนของ active site ลดลง โดย methanol เกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

A. Szabó et al., (2006) [22] ได้ทำการศึกษาความเสถียรของปาเปนใน aqueous organic solvents ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ ethanol, 1,4-dioxane, tetrahydrofuran (THF) และ acetonitrile (ACN) พบว่า ปาเปนมีความเสถียรสูงในตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ ethanol, 1,4-dioxane และ acetonitrile (ACN) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 60% ค่า activity ของเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลง แต่สำหรับ tetrahydrofuran (THF) ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ (5-10%) ค่า activity ของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ จากการศึกษาผลตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ พบว่า tetrahydrofuran (THF) และ 1,4-dioxane ที่ความเข้มข้นสูง ๆ (80-90%) จะเหนี่ยวนำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิ (tertiary structure) ทำให้ค่า activity ของเอนไซม์ลดลง แต่สำหรับ ethanol และ acetonitrile (ACN) จะทำให้  $\alpha$ -helical conformation เพิ่มขึ้น แต่โครงสร้างทุติยภูมิโดยรวมนั้นยังคงเท่าเดิม

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การเตรียมโปรตีน ลิแกนด์ และ Molecular Dynamics (MD) simulation

ในการศึกษาเพื่อดูความเสถียรของโครงสร้างเอนไซม์และ BAPNA ภายใต้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่หลากหลายด้วยวิธี Molecular dynamics (MD) simulation โดยใช้โปรแกรม AMBER20 และใช้โครงสร้างของปาเปน (PDB ID: 6PAD) ที่ดาวน์โหลดจาก Protein Data bank และโครงสร้างของ BAPNA (CID 13494) ที่ได้จากการศึกษา molecular docking ก่อนหน้านี้โดยอาศัยโปรแกรม iGemdock2.1

ปาเปน (PDB ID: 6PAD) จะถูกนำมาทำการปรับ protonation states ของกรดอะมิโน โดยปรับค่า pH เท่ากับ 7 โดยใช้ H++ server ในส่วนของการสร้าง topology files สำหรับระบบ อาศัย antechamber program และ frcmod file อาศัย parmchk2 ที่อยู่ใน AMBER20 software package สำหรับการสร้าง topology parameter files และ initial coordinates ของอะตอมของ complex ใช้ Leap module และโปรตีนใช้ ff14SB force field ในแต่ละ complex ถูกวางไว้ใน periodic boundary box และล้อมรอบด้วยตัวทำละลายความหนา 12 Å ได้แก่ น้ำโดยใช้ TIP3P water ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และอะซิโตไนไตรล์ (ACN) โดยใช้ packmol [26] ในการสร้างโครงสร้าง custom box และสร้าง library file โดยใช้ Leap module แล้วทำการล้อมรอบ complex จาก library file ที่สร้างขึ้นโดยใช้วิธีเดียวกันกับการล้อมตัวทำละลายโดย TIP3P water Chloride ions (Cl) ถูกเพิ่มเข้าไปเพื่อทำให้ระบบเป็นกลาง โดยจะทำโครงสร้างของโปรตีนในระบบที่เป็นน้ำก่อนและนำโครงสร้างของโปรตีนที่ทำ simulation ในน้ำแล้วมาเป็นโครงสร้างเริ่มต้นในตัวทำละลายอื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบผล

ขั้นต่อไปเป็นการเริ่มทำ minimization 5 ขั้น โดยเริ่มต้นจากการทำ steepest descent minimization 2500 ขั้น ตามด้วย conjugate gradient minimization 2500 ขั้น (MAXCYC - NCYC) ในการทำทั้งหมด 2500 ขั้นของ conjugate gradient steps แต่ละขั้น อาศัยการทำโดยใช้ sander module โดยในแต่ละขั้นมีวิธีการดังนี้

Step 1: Heavy atoms of the protein were restrained with a force constant of  $10 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}^2$ ,

Step 2: Backbone atoms of the protein were restrained with a force constant of  $10 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}^2$ ,

Step 3: Backbone atoms of the protein were restrained with a force constant of  $5 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}^2$ ,

Step 4: Backbone atoms of the protein were restrained with a force constant of  $1 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}^2$ ,

Step 5: No restraint.

MD simulations ดำเนินการโดยภายใต้เงื่อนไข periodic boundary อาศัย PMEMD module ของ AMBER20 พันธะทั้งหมดที่เชื่อมกันแบบโควาเลนต์กับอะตอมไฮโดรเจนถูกจำกัดไว้โดย the SHAKE algorithm (NTC=2, NTF=2) ในแต่ละการจำลอง โดยใช้ time step เท่ากับ 0.002 ps สำหรับการจำลองแบบ nonbonded และ long-range electrostatic interactions วิธี particle mesh Ewald ถูกนำมาใช้ในการกำหนดค่า cut-off distance มีค่าเท่ากับ 12 Å ในการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการทำการจำลอง ใช้ค่า Berendsen thermostat

(NTT=1) และในแต่ละระบบทำการให้ความร้อนตั้งแต่ 0 ถึง 298 เคลวิน (K) เป็นเวลา 100 ps ภายใต้ NVT ensemble (NTB=1) ตามด้วยการทำ equilibration ภายใต้ NPT ensemble (NTB=2) ที่อุณหภูมิ 298 เคลวิน โดยใช้ isotropic position scaling เพื่อรักษาความดันให้คงที่ (NTP=1) และใช้ relaxation time เท่ากับ 0.5 ps (TAUP=0.5) เป็นเวลา 400 ps โดยไม่มีการ restraint และในขั้นตอนนี้สุดท้ายทำการจำลองระบบเป็นเวลา 1000 ns ภายใต้ NPT ensemble (NTB=2, barostat=2) ที่ 298 เคลวิน โดยใช้ isotropic position scaling เพื่อรักษาความดันให้คงที่ (NTP=1) และใช้ relaxation time of 2.5 ps (TAUP=2.5)

ระบบของปาเปน-BAPNA ที่นำมาทำการจำลอง มี 4 ได้แก่

1. 10:90% v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ
2. 50:50% v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ
3. 10:10:80% v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-อะซิโตนไตรรล์ (Acetonitrile)-น้ำ
4. 10:50:40% v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-อะซิโตนไตรรล์ (Acetonitrile)-น้ำ

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวทำละลายในแต่ละระบบที่ใช้ในการสร้างโมเดลของแต่ละระบบ

Molecular dynamic box details	10:90% v/v DMSO-น้ำ	50:50% v/v DMSO-น้ำ	10:10:80% v/v DMSO-อะซิโตนไตรรล์-น้ำ	10:50:40% v/v DMSO-อะซิโตนไตรรล์-น้ำ
Mole ratio	1:36	1:4	1:1:32	7:1:15
จำนวนโมเลกุลของ DMSO	80	600	90	130
จำนวนโมเลกุลของ อะซิโตนไตรรล์	-	-	90	910
จำนวนโมเลกุลของน้ำ	2920	2400	2820	1960

### 3.2 การวิเคราะห์ผลโดยใช้ CPPTRAJ module ของ AMBER20

- 1) ความเสถียรของระบบ ได้แก่ Root-Mean-Square Deviation (RMSD) Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF) และ Radius of gyration (Rg)
- 2) จำนวนอะตอมของลิแกนด์ที่เกิดพันธะกับกรดอะมิโนที่อยู่ภายใน active site ของปาเปน
- 3) ระยะห่างของกรดอะมิโนที่สำคัญระหว่างปาเปนกับ BAPNA
- 4) การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างปาเปนกับ BAPNA

### 3.3 การวิเคราะห์สิ่งแวดลอมบริเวณ active site และ BAPNA

การสังเกตสภาพแวดลอมที่เปลี่ยนแปลงไปทำโดยการวิเคราะห์ตัวทำละลายที่เกี่ยวข้องได้แก่ น้ำ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และอะซิโตนไตรรล์ ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเวลาผ่านไปในบริเวณ active site ของปาเปนและรอบๆ BAPNA โดยใช้โปรแกรม Discovery Studio Visualizer และ UCSF chimera software

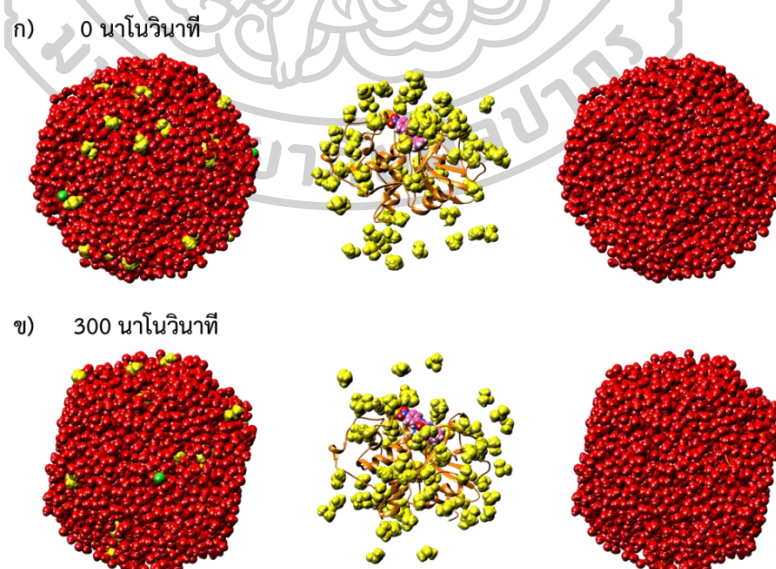
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลได้นำมาใช้ในการศึกษาระบบ co-organic solvent ทั้งหมด 4 ระบบ โดยในสองระบบแรก: ระบบของไดเมทิลซัลฟอกไซด์และน้ำ ในสัดส่วน 10:90 %v/v ระบบของไดเมทิลซัลฟอกไซด์และน้ำ ในสัดส่วน 50:50 %v/v เพื่อศึกษาผลของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่มีต่อการจับของ BAPNA ในปาเปน และอีกสองระบบที่สัดส่วนของ อะซิโตไนไตรล์, ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ เป็น 10:10:80 %v/v และ 50:10:40 %v/v เพื่อศึกษาผลของอะซิโตไนไตรล์ที่มีต่อการจับของ BAPNA ในปาเปน โดยระยะเวลาที่ใช้ในการจำลอง คือ 300 นาโนวินาที หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้ trajectory analysis เพื่อคำนวณหาค่า stability factor ต่าง ๆ ได้แก่ Root-Mean-Square Deviation (RMSD) Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF) Radius of gyration (Rg) และ Distance center of mass นอกจากนี้ยังทำการศึกษ้อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง BAPNA และกรดอะมิโนของปาเปน และการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลของสารละลายแต่ละชนิดที่อยู่ล้อมรอบ BAPNA

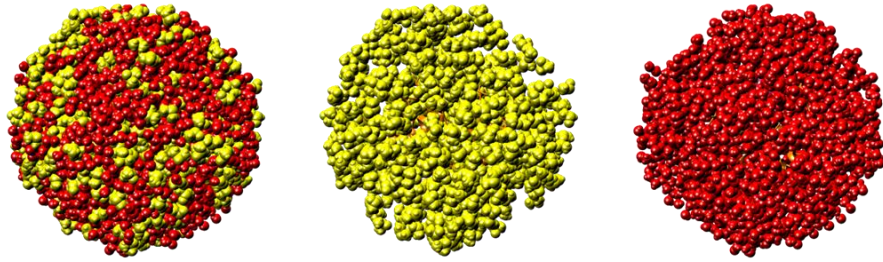
#### 4.1 แบบจำลองของปาเปน – BAPNA ในระบบสารละลายต่าง ๆ

จากการจำลองระบบของปาเปน-BAPNA ในสารละลายต่าง ๆ โดยทำการคำนวณปริมาณโมเลกุลของสารละลายจากอัตราส่วนที่ใช้ในการทดลองจริง พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 300 นาโนวินาที ในระบบที่มีการผสมไดเมทิลซัลฟอกไซด์กับน้ำ ในอัตราส่วน 10:90 %v/v และ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์สามารถผสมเข้ากันได้ดีกับน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8 นอกจากนี้ในระบบที่มีการเพิ่มอะซิโตไนไตรล์เป็น co-organic solvent ที่มีอัตราส่วนของอะซิโตไนไตรล์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ เป็น 10:10:80 %v/v และ 50:10:40 %v/v พบว่า โมเลกุลของตัวทำละลายทั้งสามชนิดสามารถผสมเข้ากันได้ดีตลอด 300 นาโนวินาที ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10

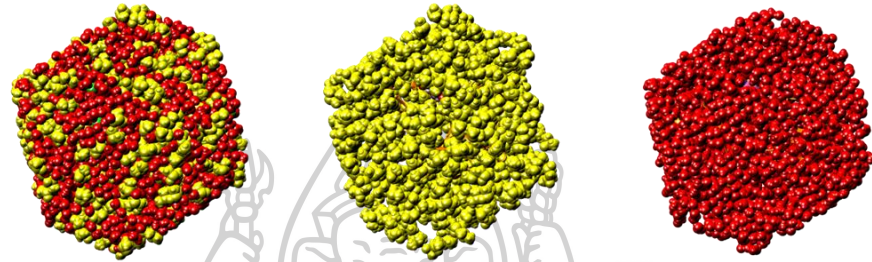


รูปที่ 7 ระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ ที่ ก) 0 นาโนวินาที และ ข) 300 นาโนวินาที โดยสีแดงแสดงโมเลกุลของน้ำ สีเหลืองแสดงโมเลกุลไดเมทิลซัลฟอกไซด์ สีส้มแสดงโครงสร้างปาเปน และสีชมพูแสดงโครงสร้าง BAPNA

ก) 0 นาโนวินาที

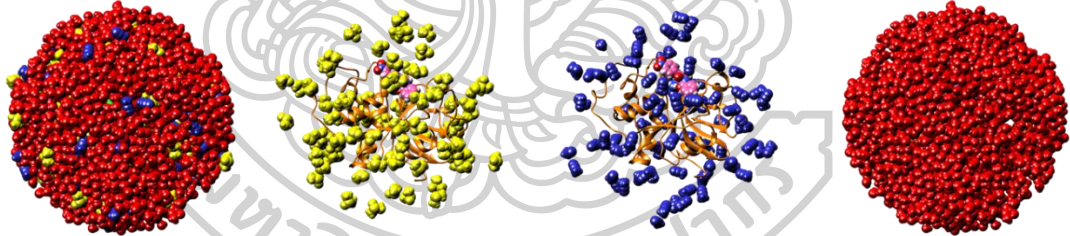


ข) 300 นาโนวินาที

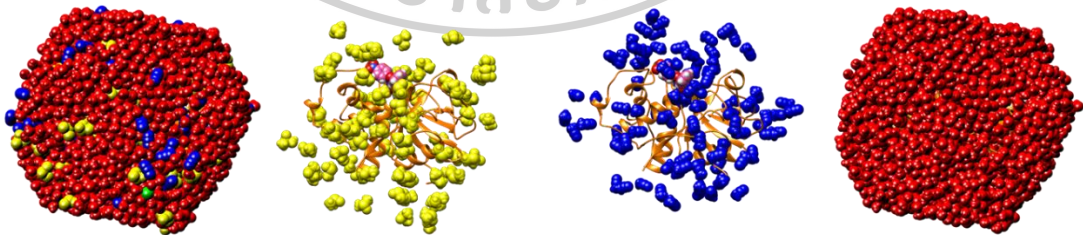


รูปที่ 8 ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ ที่ ก) 0 นาโนวินาที และ ข) 300 นาโนวินาที โดยสีแดงแสดงโมเลกุลของน้ำ สีเหลืองแสดงโมเลกุลไดเมทิลซัลฟอกไซด์ สีส้มแสดงโครงสร้างปาเปน และสีชมพูแสดงโครงสร้าง BAPNA

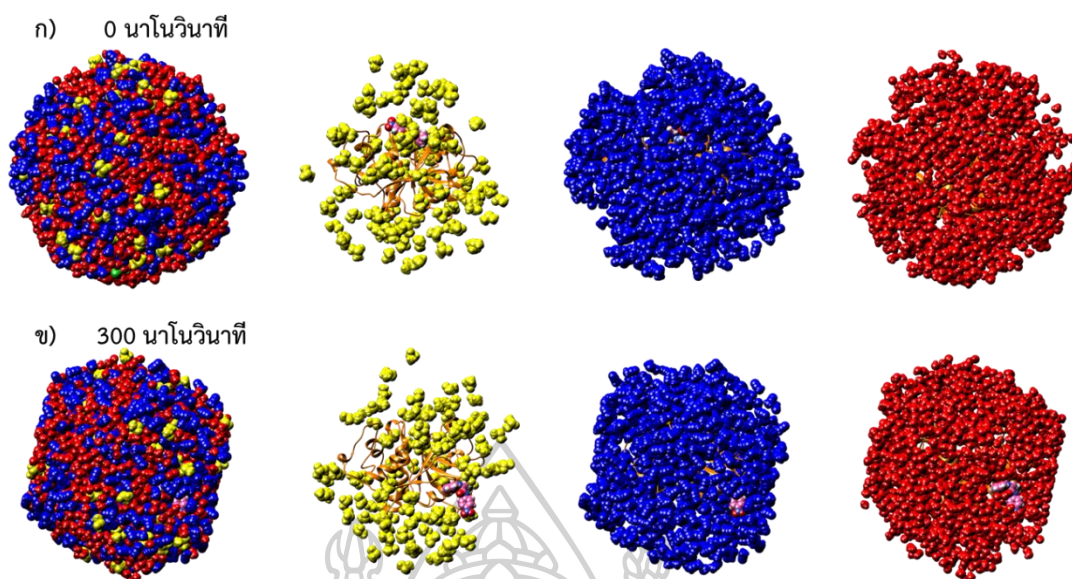
ก) 0 นาโนวินาที



ข) 300 นาโนวินาที



รูปที่ 9 ระบบ 10:10:80 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-น้ำ ที่ ก) 0 นาโนวินาที และ ข) 300 นาโนวินาที โดยสีแดงแสดงโมเลกุลของน้ำ สีเหลืองแสดงโมเลกุลไดเมทิลซัลฟอกไซด์ สีน้ำเงินแสดงโมเลกุลของอะซิโตไนไตรล์ สีส้มแสดงโครงสร้างปาเปน และสีชมพูแสดงโครงสร้าง BAPNA



รูปที่ 10 ระบบ 50:10:40 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-โดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ ที่ ก) 0 นาโนวินาที และ ข) 300 นาโนวินาที โดยสีแดงแสดงโมเลกุลของน้ำ สีเหลืองแสดงโมเลกุลโดเมทิลซัลฟอกไซด์ สีน้ำเงินแสดงโมเลกุลของอะซิโตไนไตรล์ สีส้มแสดงโครงสร้างปาเปน และสีชมพูแสดงโครงสร้าง BAPNA

#### 4.2 การวิเคราะห์ผลปัจจัยความเสถียรของแต่ละระบบโดยใช้ CPPTRAJ module

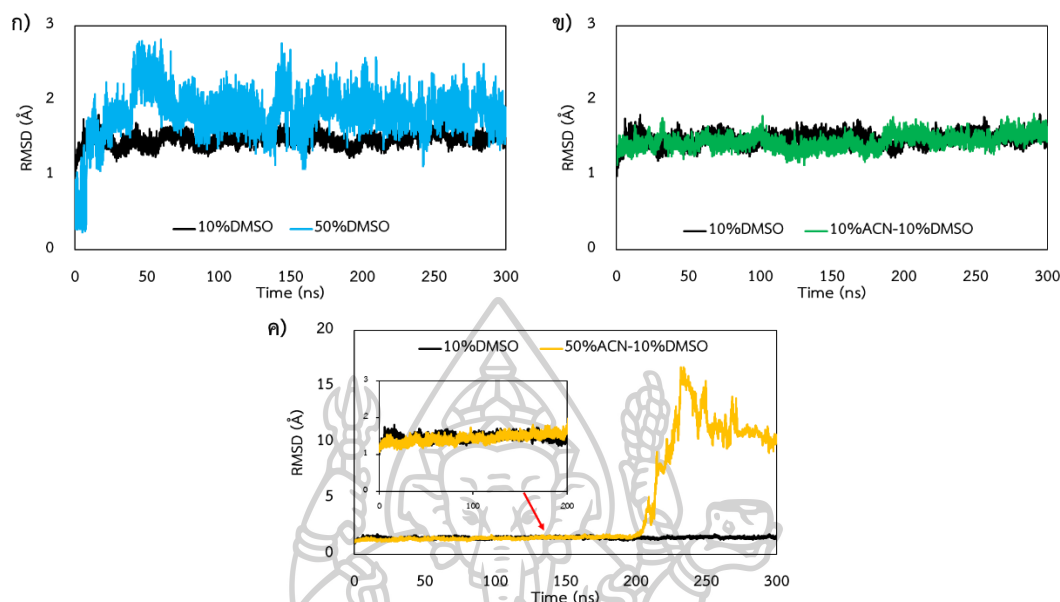
การวิเคราะห์ปัจจัยความเสถียรของระบบที่ทำการจำลอง จะอาศัยการวัดจากค่าปัจจัยความเสถียรต่าง ๆ ดังนี้

##### 4.2.1 Root-Mean-Square Deviation (RMSD)

ค่า Root-Mean-Square Deviation (RMSD) เป็นค่าที่ใช้ในการวัดระยะเฉลี่ยระหว่างตำแหน่งของอะตอมหรือสารชีวโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับตำแหน่งอ้างอิง (reference position) ของสารประกอบนั้น ค่า RMSD เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างของโมเลกุล โดยค่า RMSD ที่ต่ำแสดงถึงความคล้ายคลึงระหว่างโครงสร้างดั้งเดิมและโครงสร้างที่ได้จากการจำลอง ในขณะที่ค่า RMSD ที่สูงบ่งบอกถึงความเบี่ยงเบนหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่มากขึ้น [23] จากรูปที่ 11 จะเห็นได้ว่าระบบที่มี 10% โดเมทิลซัลฟอกไซด์ มีค่า RMSD ที่ค่อนข้างคงที่อยู่ที่ 1.5 Å แต่ระบบที่มีการเพิ่มปริมาณของโดเมทิลซัลฟอกไซด์ เป็น 50% จะมีค่า RMSD ที่สูงกว่าและมีความผันผวนค่อนข้างสูงอยู่ที่ประมาณ 2-3 Å ตลอดการระยะเวลาการจำลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณโดเมทิลซัลฟอกไซด์ส่งผลต่อความเสถียรของระบบปาเปน-BAPNA

สำหรับระบบเมื่อมีการเพิ่ม 10% ของอะซิโตไนไตรล์ลงไปเพิ่มเป็น 10:10:80 %v/v ของอะซิโตไนไตรล์, โดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ จะมีค่า RMSD ค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาที่ทำการจำลองอยู่ที่ประมาณ 1.5 Å ซึ่งมีความใกล้เคียงกับค่า RMSD ของระบบที่ไม่มีการเพิ่มอะซิโตไนไตรล์ลงไป (10:90 %v/v โดเมทิลซัลฟอกไซด์-น้ำ) แสดงให้เห็นว่าปริมาณของอะซิโตไนไตรล์ที่เพิ่มลงไปเล็กน้อยไม่ส่งผลต่อระบบของปาเปน-BAPNA ในทางตรงกันข้ามเมื่อเพิ่มปริมาณของอะซิโตไนไตรล์เป็น 50% ค่า RMSD ของระบบใน 200 นาโนวินาทีแรก จะอยู่ที่ประมาณ 1.5 Å แต่

หลังจากนั้น ค่า RMSD จะเพิ่มขึ้นเป็น 15 Å ที่ 230 ns และลดลงอยู่ที่ประมาณ 10 Å ในช่วง 50 ns สุดท้ายของการจำลอง แสดงให้เห็นว่าปริมาณของอะซิโตไนไตรล์ที่มีมากขึ้นส่งผลต่อความเสถียรของระบบปาเปน-BAPNA

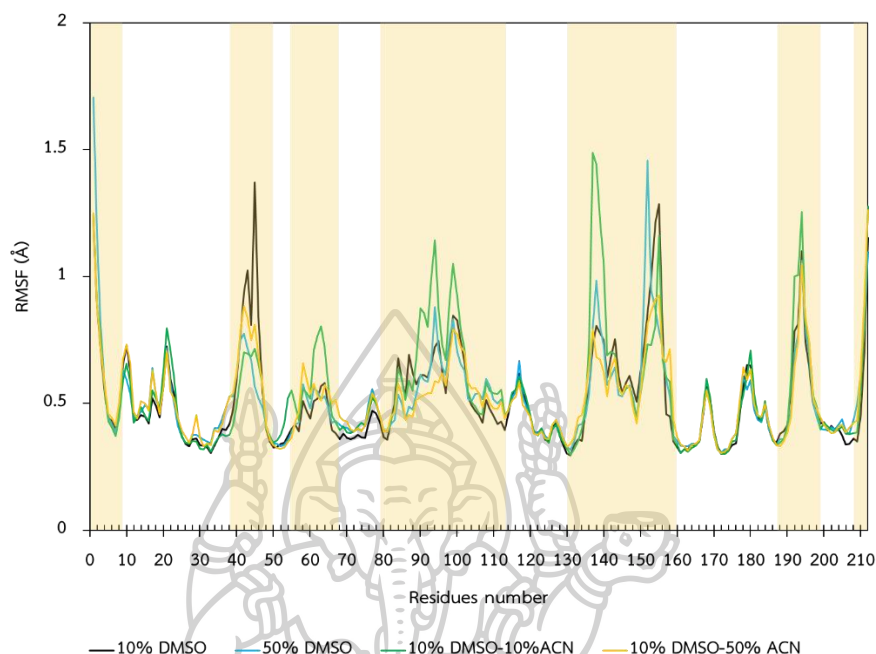


**รูปที่ 11** ค่า RMSD ของระบบปาเปน-BAPNA ในสารละลายระบบต่าง ๆ โดยระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ เป็นระบบควบคุม (เส้นสีดำ) เปรียบเทียบกับ ก) ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ (เส้นสีฟ้า), ข) ระบบ 10:10:80 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ (เส้นสีเขียว) และ ค) ระบบ 50:10:40 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ (เส้นสีเหลือง)

#### 4.2.2 Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF)

ค่า Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF) เป็นการวัดการเบี่ยงเบนเฉลี่ยของตำแหน่งอะตอมจากตำแหน่งเฉลี่ยของอะตอมนั้น ๆ ในช่วงเวลาหนึ่งระหว่างการจำลองพลศาสตร์โมเลกุล (Molecular Dynamics (MD) simulation) ค่า RMSF ให้ข้อมูลเกี่ยวกับความยืดหยุ่นและการเคลื่อนไหวของโครงสร้างโปรตีน สามารถใช้ในการบ่งบอกถึงความเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีนว่าบริเวณหรือตำแหน่งของกรดอะมิโนใดมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งค่า RMSF ที่ต่ำแสดงว่าตำแหน่งนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับตำแหน่งน้อย แสดงว่าช่วงบริเวณนั้นมีความไม่ยืดหยุ่น (rigid) ส่วนตำแหน่งที่มีค่า RMSF สูง บ่งบอกถึงการเบี่ยงเบนจากตำแหน่งเฉลี่ยสูง แสดงว่าบริเวณนั้นมีการเคลื่อนไหวและผันแปรของโครงสร้างสูง [23] จากรูปที่ 12 จะเห็นได้ว่ามีบริเวณที่มีความผันแปรสูงอยู่ประมาณ 7 ช่วง คือ ช่วงลำดับอะมิโนที่ 1-8 ซึ่งเป็นบริเวณปลายสายฝั่ง N-terminal ช่วงลำดับอะมิโนที่ 38-40 และ 54-68 เป็นบริเวณ loop ฝั่ง L-domain ช่วงลำดับอะมิโนที่ 80-113 เป็นบริเวณของ loop และ  $\alpha$ -helix ช่วงลำดับอะมิโนที่ 130-160 เป็นบริเวณของ  $\beta$ -sheet และ loop ช่วงลำดับอะมิโนที่ 188-199 เป็นบริเวณ loop และช่วงลำดับอะมิโนที่ 208-212 เป็นบริเวณของปลายสายฝั่ง C-terminal โดยจะสังเกตได้ว่าบริเวณที่มีการผันแปรสูงจะเป็นบริเวณของโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น loop หรือ random coil ซึ่งเป็นบริเวณของเอนไซม์ที่มีความยืดหยุ่นทาง

โครงสร้างสูง แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างหลักของปาเปนยังคงสภาพปกติได้ในสภาวะการจำลองของแต่ละระบบสารละลายที่แตกต่างกัน



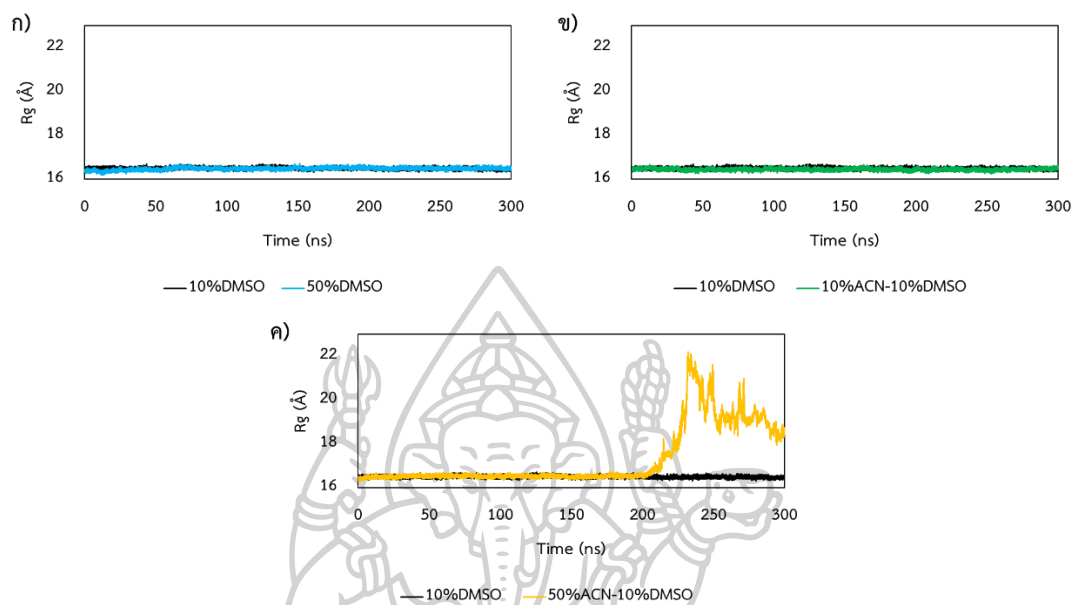
**รูปที่ 12** ค่า RMSF ของระบบปาเปน-BAPNA ในสารละลายระบบต่าง ๆ โดยระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ เป็นระบบควบคุม (เส้นสีดำ) เปรียบเทียบกับ ก) ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ (เส้นสีฟ้า), ข) ระบบ 10:10:80 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ (เส้นสีเขียว) และ ค) ระบบ 50:10:40 %v/v อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ (เส้นสีเหลือง)

#### 4.2.3 Radius of gyration (Rg)

ค่า Radius of gyration (Rg) เป็นค่าที่แสดงถึงค่าเบี่ยงเบนของระยะทางเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งศูนย์กลางมวล ใช้บ่งบอกถึงลักษณะรูปร่าง ความหนาแน่น (compactness) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของระบบโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถใช้ในการวิเคราะห์การจับกันระหว่างโปรตีน-ลิแกนด์ได้ โดยค่า Rg ต่ำ แสดงถึงโครงสร้างมีการรวมตัวกันแน่น แต่ถ้า Rg มีค่าสูงแสดงว่าโครงสร้างหรือการเข้าจับมีการขยายตัว บ่งบอกได้ว่าระบบมีการสูญเสียการรวมตัวกัน [23] จากรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่าระบบที่มี 10% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ จะมีค่า Rg โดยเฉลี่ยที่ประมาณ 16.5 Å และเมื่อเพิ่มไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เป็น 50% ค่า Rg ของระบบมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจากประมาณ 16.3 Å ในช่วง 50 นาโนวินาทีแรก และคงที่ที่ระยะ 16.5 Å แสดงให้เห็นว่าระบบของปาเปน-BAPNA ยังมีการรวมตัวกันได้ดี

เมื่อทำการเพิ่ม 10% อะซิโตไนไตรล์เข้าไปในระบบเป็น 10:10:80 %v/v ของอะซิโตไนไตรล์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ ค่า Rg ของระบบมีค่าอยู่ที่ระยะเฉลี่ยประมาณ 16.5 Å และเมื่อเพิ่มปริมาณอะซิโตไนไตรล์เป็น 50% จะเห็นได้ว่าในช่วง 200 นาโนวินาทีแรก ค่า Rg ของระบบอยู่ที่ประมาณ 16.5 Å แต่หลังจากนั้นระยะเพิ่มขึ้น

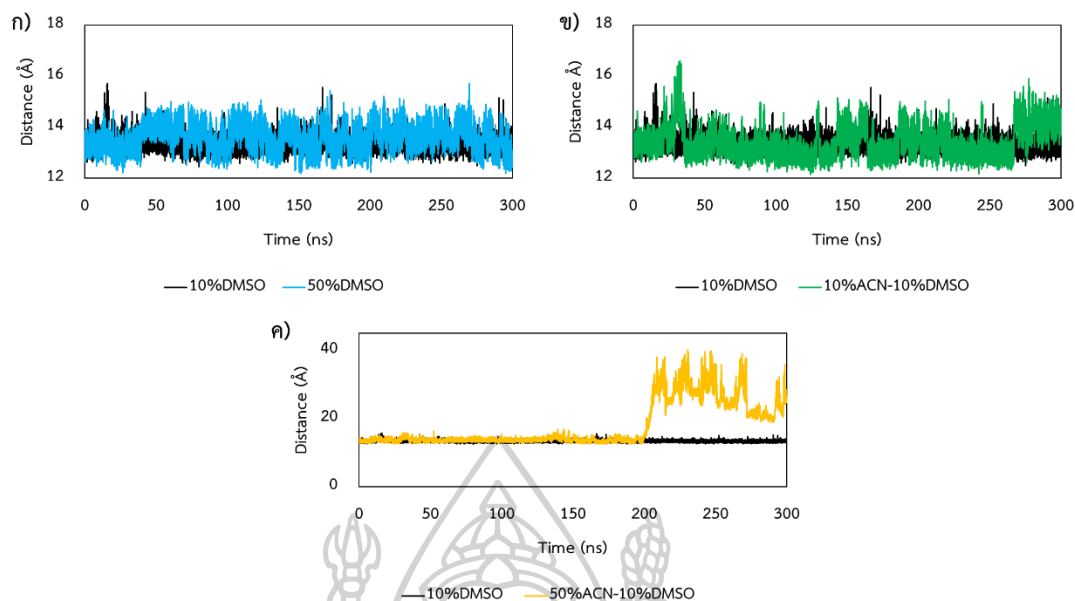
ไปสูงถึง 22 Å และค่อย ๆ ลดลง อยู่ที่ประมาณ 18 Å จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มอะซิโตไนโตรล์เล็กน้อย ไม่ส่งผลต่อการเกิด complex ระหว่างปาเปน-BAPNA แต่เมื่อมีปริมาณมากเกินไปก็ทำให้เกิดผลกระทบต่อการเข้าจับของ BAPNA กับปาเปน



**รูปที่ 13** ค่า Rg ของระบบปาเปน-BAPNA ในสารละลายระบบต่าง ๆ โดยระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) – น้ำ เป็นระบบควบคุม (เส้นสีดำ) เปรียบเทียบกับ ก) ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)–น้ำ (เส้นสีฟ้า, ข) ระบบ 10:10:80 %v/v อะซิโตไนโตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)- น้ำ (เส้นสีเขียว) และ ค) ระบบ 50:10:40 %v/v อะซิโตไนโตรล์ (Acetonitrile)-ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ (เส้นสีเหลือง)

#### 4.2.4 Distance of center of mass

ค่าระยะห่างของศูนย์กลางมวล เป็นค่าที่วัดระยะห่างของลิแกนด์กับโปรตีนเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของการจับของลิแกนด์ จากรูปที่ 14 ค่าระยะห่างของศูนย์กลางมวลของระบบ 10% ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ มีค่าอยู่ที่ประมาณ 13.5 Å และค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาในการทำการจำลอง เช่นเดียวกับระบบที่มีปริมาณของไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็น 50% จะเห็นว่ามีความผันผวนเฉลี่ยประมาณ 13.5 Å แต่จะมีความผันผวนมากกว่าระบบของ 10% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ส่วนระบบที่มีการเพิ่ม 10% อะซิโตไนโตรล์เข้าไปในระบบจะเห็นว่าระยะห่างมีความผันผวนสูงในช่วงเริ่มต้น โดยมีค่าระยะห่างเฉลี่ยประมาณ 13.5-16 Å แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอะซิโตไนโตรล์ทำให้ BAPNA มีการขยับมากขึ้น และระบบที่เพิ่มปริมาณ 50% ของอะซิโตไนโตรล์จะสังเกตเห็นได้ว่าในช่วง 200 นาโนวินาทีแรก ระยะห่างมีค่าคงที่ประมาณ 13.5 Å ก่อนที่จะมีค่าสูงขึ้นและผันผวนอยู่ที่ประมาณ 20-40 Å ตลอดระยะเวลาการจำลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า BAPNA ได้หลุดออกจากบริเวณ active site ของปาเปน



**รูปที่ 14** ค่า distance of center of mass ของระบบปาเปน-BAPNA ในสารละลายระบบต่าง ๆ โดยระบบ 10:90 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ เป็นระบบควบคุม (เส้นสีดำ) เปรียบเทียบกับ ก) ระบบ 50:50 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-น้ำ (เส้นสีฟ้า), ข) ระบบ 10:10:80 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-น้ำ (เส้นสีเขียว) และ ค) ระบบ 10:50:40 %v/v ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)-อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)-น้ำ (เส้นสีเหลือง)

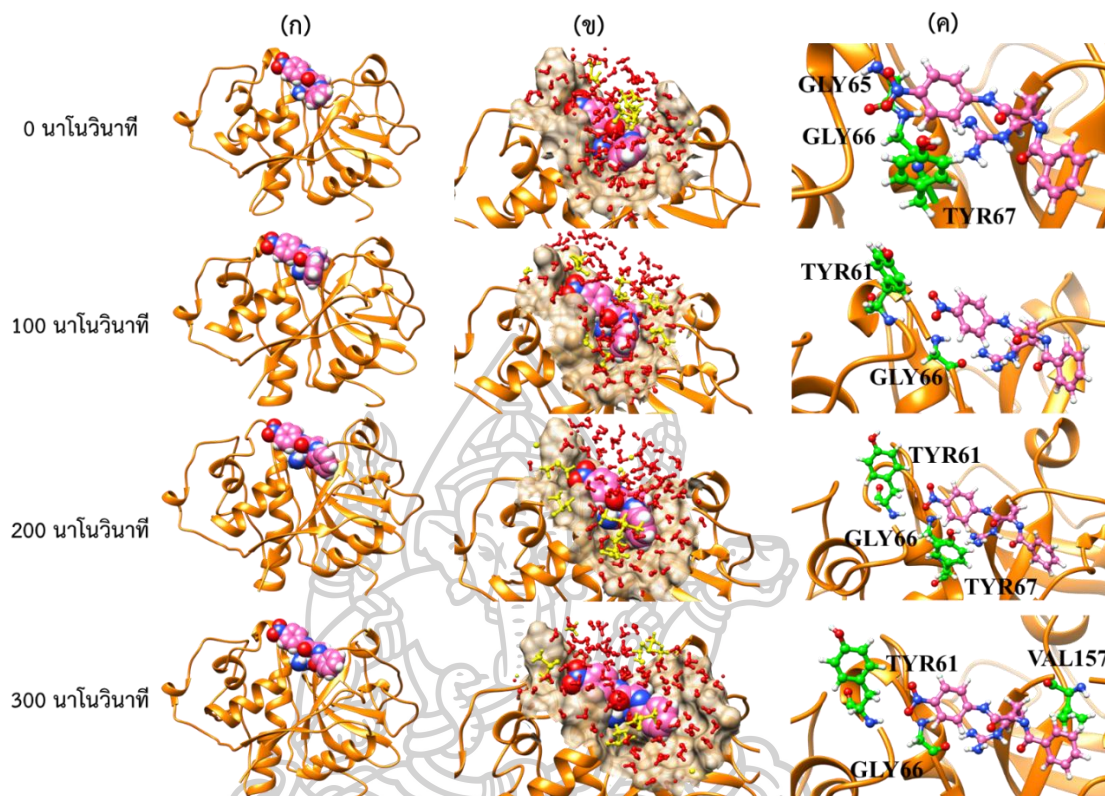
#### 4.2.5 การเกิดอันตรกิริยาและการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของสารละลายต่อปาเปน-BAPNA complex

##### 4.2.5.1 ระบบ 10:90 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ

จากรูปที่ 15 แสดงตำแหน่งการเข้าจับของ BAPNA ในบริเวณ active site ของปาเปน ในระบบของสารละลาย 10:90 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์กับน้ำ จะเห็นได้ว่า BAPNA สามารถจับในตำแหน่งบริเวณ active site ได้ตลอดในระยะเวลาการทำการจำลอง โดยลักษณะ conformation ของ BAPNA อยู่ในรูปทรงลักษณะ V-shaped คล้ายเดิม เมื่อทำการสังเกตสารละลายที่อยู่ในบริเวณ active site จะเห็นว่า บริเวณนี้จะถูกรอบครองด้วยโมเลกุลของน้ำเป็นส่วนใหญ่ โดยมีไดเมทิลซัลฟอกไซด์อยู่เพียงเล็กน้อย สำหรับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นนั้น BAPNA เกิดอันตรกิริยาที่สำคัญกับกรดอะมิโนหลักได้แก่ TYR61 GLY65 GLY66 TYR67 และ VAL157 (ตารางที่2)

จากตารางที่ 3 แสดงจำนวนของโมเลกุลของน้ำ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA จะเห็นได้ว่าตลอดระยะเวลาการจำลอง BAPNA มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำเป็นหลัก และเกิดกับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 1 โมเลกุล ที่ 100 นาโนวินาที พันธะไฮโดรเจนกับน้ำลดลง เหลือเพียง 2 โมเลกุล และหลังจากนั้นมีจำนวนครั้งที่ 4 โมเลกุล ส่วนการเกิดอันตรกิริยากับไดเมทิลซัลฟอกไซด์มีจำนวนลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสอดคล้องกับรูปที่ 16 แสดงภาพให้เห็นว่าโมเลกุลที่ล้อมรอบ BAPNA ส่วนมากจะเป็นโมเลกุลของน้ำและจำนวน

โดเมนที่จับฟอกไซด์ล้อมรอบใน 0 นาโนวินาทีมีเพียงเล็กน้อย ก่อนที่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 4-5 โมเลกุลตลอดการจำลอง



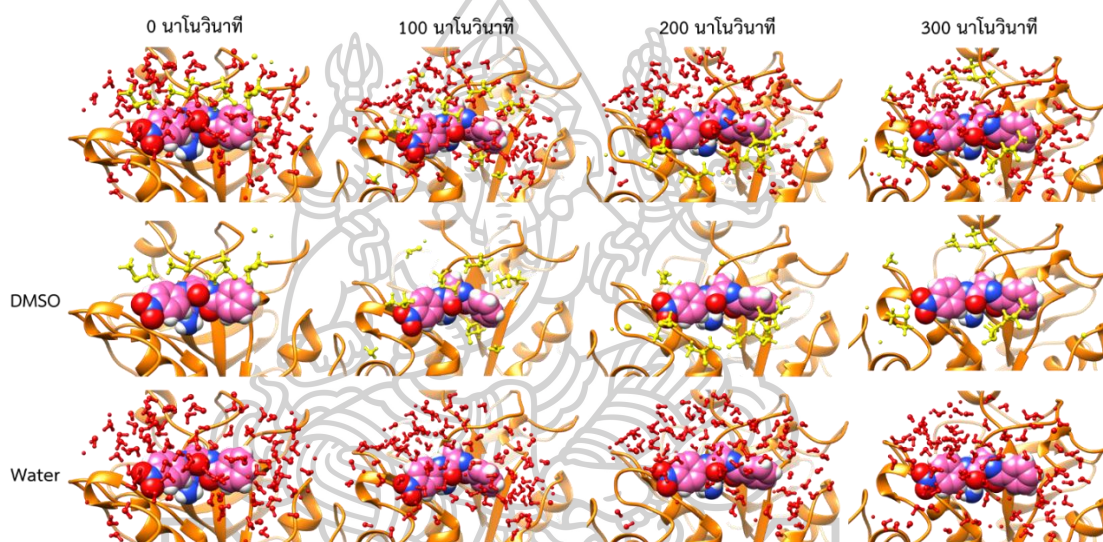
รูปที่ 15 แสดง binding position (ก), บริเวณ active site ของปาเปน (ข) และ ลักษณะ binding conformation และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างปาเปน (สีส้ม) และ BAPNA (สีชมพู) (ค) ที่ได้จากการทำ Molecular Dynamics (MD) simulation ของระบบที่มี 10:90 %v/v ของโดเมนที่จับฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ตารางที่ 2 กรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับปาเปนในระบบ 10:90 %v/v ของโดเมนที่จับฟอกไซด์กับน้ำ ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ระยะเวลาการจำลอง (นาโนวินาที)	กรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยา	
	Hydrogen bond	Hydrophobic interaction
0	GLY66	TYR67, GLY65
100	TYR61, GLY66	-
200	TYR61, GLY66	TYR67
300	TYR61, GLY66	VAL157

ตารางที่ 3 จำนวนโมเลกุลของน้ำ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ระยะเวลาการจำลอง (นาโนวินาที)	จำนวนของตัวทำละลายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA			
	Hydrogen bond		Hydrophobic interaction	
	น้ำ	DMSO	น้ำ	DMSO
0	5	1	0	0
100	2	1	0	0
200	4	0	0	1
300	4	0	0	0



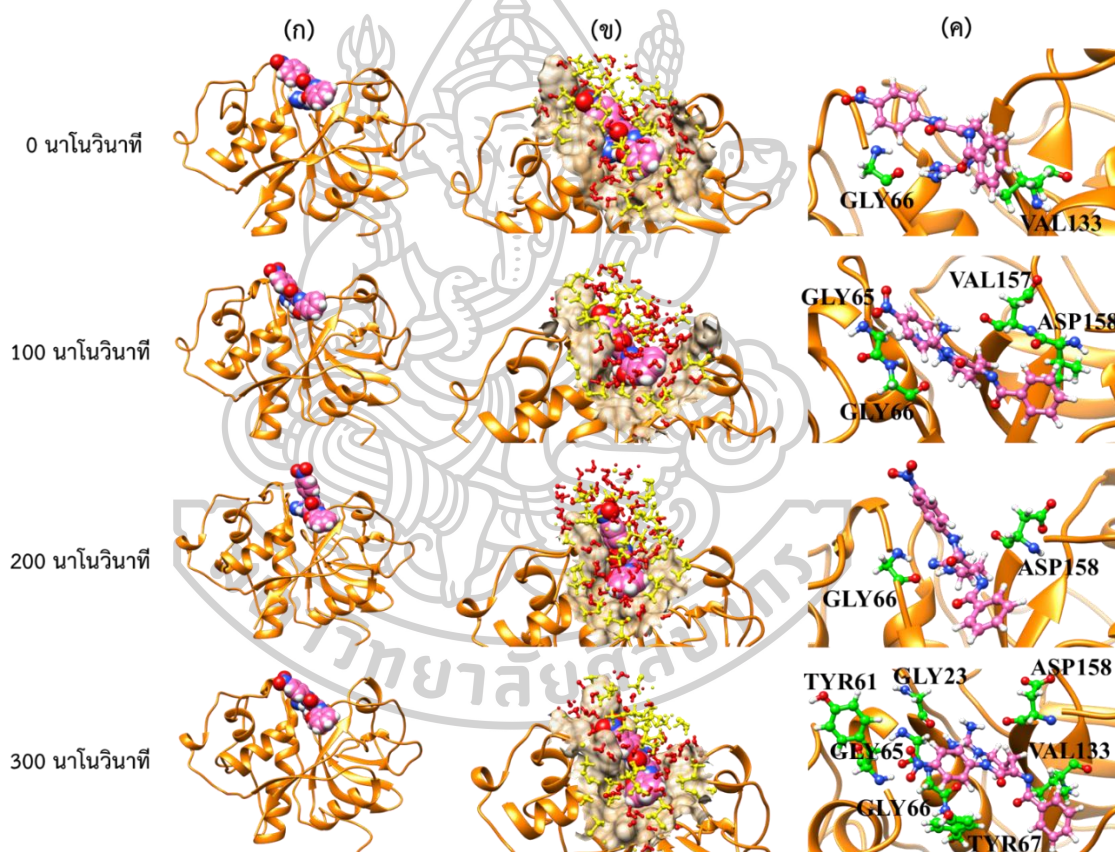
รูปที่ 16 แสดงโมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ในระยะภายใน 8 Å ในบริเวณที่ active site ของ BAPNA-papain complex (ข) ที่ได้จากการจำลอง Molecular Dynamics (MD) simulation ของปาเปน (สีส้ม)-BAPNA (สีชมพู) complex ของระบบที่มี 10: 90 %v/v ของน้ำ (สีแดง), ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) ที่ 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

#### 4.2.5.2 ระบบ 50:50 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ

สำหรับระบบ 50:50 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์และน้ำ จากรูปที่ 17 จะเห็นได้ว่าที่ 100 นาโนวินาที แรก BAPNA จับกับปาเปนที่บริเวณ active site ในลักษณะ V-shaped ก่อนที่จะเปลี่ยนรูปทรงเป็น T-shaped ที่เวลา 200 นาโนวินาที และกลับมาในลักษณะทรง V-shaped อีกครั้งที่ 300 นาโนวินาที และบริเวณ active site จะเห็นได้ว่าโมเลกุลของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ครอบครองพื้นที่ในบริเวณนี้มากกว่าโมเลกุลน้ำ การเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนของปาเปนและ BAPNA จะเห็นว่าที่ 100 นาโนวินาทีแรก มีการเกิดพันธะไฮโดรเจน GLY66 และ ASP158 และ hydrophobic กับ GLY65 VAL133 VAL157 และที่ 200 นาโนวินาทีที่มีการเปลี่ยนรูปทรงในการจับจะเห็นว่าการเกิดเพียงพันธะไฮโดรเจนกับ GLY66 และ ASP158 และเมื่อผ่านไป 300 นาโนวินาที จะเห็น

ว่ามีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ GLY23 และ TYR61 เพิ่มเติมและมีการเกิด hydrophobic กับ GLY65 GLY66 TYR67 และ VAL133

สำหรับจำนวนของตัวทำละลายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA จากตารางที่ 5 จะเห็นว่าการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปและมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโดเมทิลซัลฟอกไซด์จำนวน 1 โมเลกุล นอกจากนั้นที่ 0 นาโนวินาที มีการเกิด hydrophobic กับโดเมทิลซัลฟอกไซด์ 1 โมเลกุล และที่ 200 นาโนวินาที มีการเกิดกับโดเมทิลซัลฟอกไซด์จำนวน 2 โมเลกุล และรูปที่ 18 ก็แสดงให้เห็นว่าที่ 0 นาโนวินาทีโมเลกุลของโดเมทิลซัลฟอกไซด์มีการล้อมรอบใกล้ ๆ กับ BAPNA และเริ่มกระจายตัวออกห่างขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับโมเลกุลน้ำที่ช่วงแรกมีการกระจายห่างจากโมเลกุลของ BAPNA และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นโมเลกุลของน้ำมีการขยับเข้าไปใกล้โมเลกุลของ BAPNA มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่มีมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น



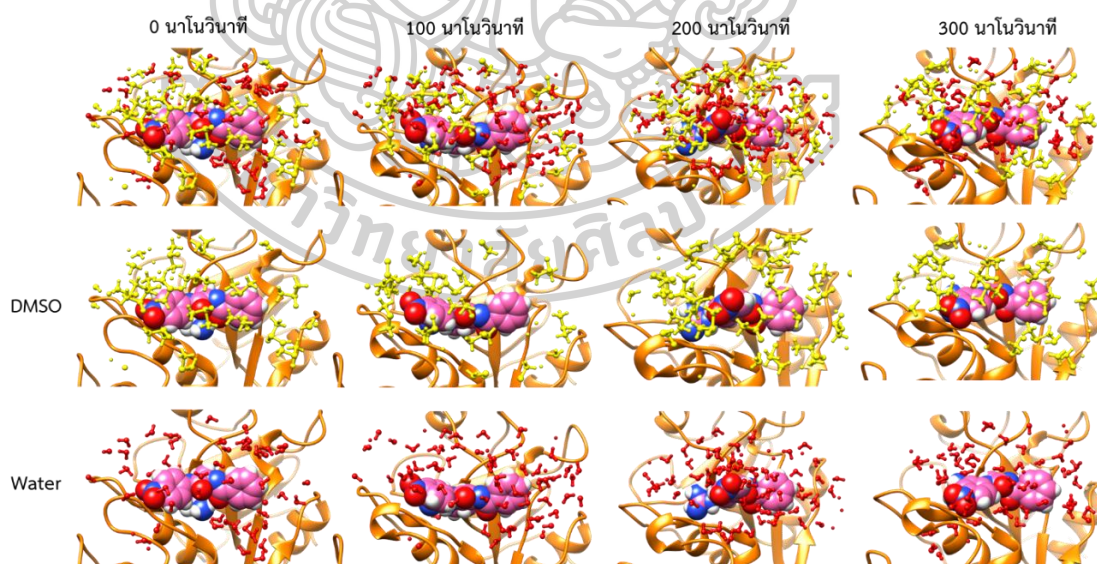
รูปที่ 17 แสดง binding position (ก), บริเวณ active site ของปาเปน (ข) และ ลักษณะ binding conformation และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างปาเปน (สีส้ม) และ BAPNA (สีชมพู) (ค) ที่ได้จากการทำ Molecular Dynamics (MD) simulation ของระบบที่มี 50:50 %v/v ของโดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ตารางที่ 4 กรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับปาเปนในระบบ 50:50 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์กับน้ำ ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ระยะเวลาการจำลอง (นาโนวินาที)	กรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยา	
	Hydrogen bond	Hydrophobic interaction
0	GLY66	VAL133
100	GLY66, ASP158	GLY65, VAL157
200	GLY66, ASP158	-
300	GLY23, TYR61, GLY66, ASP158	GLY65, GLY66, TYR67, VAL133

ตารางที่ 5 จำนวนโมเลกุลของน้ำ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ระยะเวลาการจำลอง (นาโนวินาที)	จำนวนของตัวทำละลายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA			
	Hydrogen bond		Hydrophobic interaction	
	น้ำ	DMSO	น้ำ	DMSO
0	3	1	0	1
100	4	0	0	0
200	6	1	0	2
300	4	0	0	0

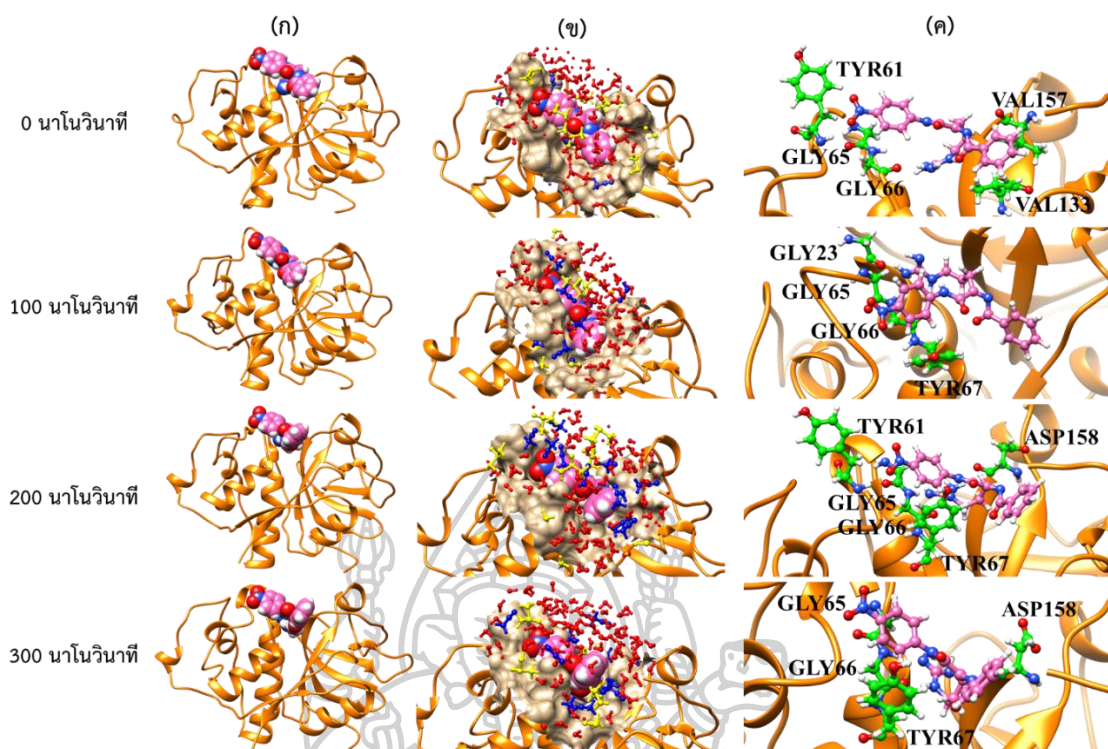


รูปที่ 18 แสดงโมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ในระยะภายใน 8 Å ในบริเวณที่ active site ของ BAPNA-papain complex (ข) ที่ได้จากการจำลอง Molecular Dynamics (MD) simulation ของปาเปน (สีส้ม)-BAPNA (สีชมพู) complex ของระบบที่มี 50:50 %v/v ของน้ำ (สีแดง) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) ที่ 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

#### 4.2.5.3 ระบบ 10:10:80 %v/v ของอะซิโตนไตรล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ

สำหรับระบบที่มีการเพิ่มอะซิโตนไตรลเป็น co-organic solvent โดยเริ่มจากระบบ 10:10:80 %v/v ของอะซิโตนไตรล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ จากรูปที่ 19 จะเห็นว่า BAPNA สามารถคงอยู่ในบริเวณของ active site ของปาเปนได้ตลอดระยะเวลาในการจำลอง ซึ่งจากการสังเกตลักษณะ conformation ของ BAPNA ที่ 0 และ 100 นาโนวินาที รูปร่างที่ใช้เข้าจับเป็นแบนราบ หลังจากนั้นที่ 200 นาโนวินาที เริ่มมีการเปลี่ยนท่าทางเป็นรูปทรง V-shaped และคงรูปทรงนี้จนครบ 300 นาโนวินาที โดยในบริเวณ active site จะเห็นได้ว่าในช่วงเริ่มต้นมีโมเลกุลของน้ำ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่อยู่ในบริเวณนี้เป็นส่วนใหญ่ มีอะซิโตนไตรลเพียงเล็กน้อย และเมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณของโมเลกุลอะซิโตนไตรลเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ สำหรับกรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องจากรูปที่ 19 และตารางที่ 6 จะเห็นว่าที่ 0 นาโนวินาทีมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน TYR61 และ GLY66 นอกจากนั้นยังมีการเกิด hydrophobic กับกรดอะมิโน GLY65 GLY66 VAL133 และ VAL157 ซึ่งเมื่อรูปทรงการจับที่เปลี่ยนแปลงไปก็ส่งผลให้มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนอื่น ๆ เช่น GLY23 (100 นาโนวินาที) ASP158 (200 และ 300 นาโนวินาที) และจำนวนการเกิด hydrophobic ลดลงและเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน GLY65 และ TYR67 เป็นหลัก

ในส่วนของจำนวนตัวทำละลายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยา จากรูปที่ 20 แสดงให้เห็นว่าที่ 0 นาโนวินาที โมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ส่วนมากคือ โมเลกุลของน้ำ และมีโมเลกุลของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ล้อมรอบเล็กน้อย แต่แทบจะไม่มีโมเลกุลของอะซิโตนไตรลที่ล้อมรอบโมเลกุล BAPNA เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น จะเห็นได้ว่ามีปริมาณของอะซิโตนไตรลล้อมรอบ BAPNA มากขึ้น แต่โมเลกุลของไดเมทิลซัลฟอกไซด์น้อยลง ส่วนโมเลกุลน้ำที่ล้อมรอบนั้นยังคงปริมาณล้อมรอบที่มากที่สุดอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นจากรางที่ 7 จะเห็นได้ว่ามีการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลน้ำกับ BAPNA ในปริมาณใกล้เคียงกันตลอด 300 นาโนวินาที และมีการเกิด hydrophobic กับอะซิโตนไตรลมากขึ้น จาก 1 โมเลกุล ที่ 0 นาโนวินาที เป็นประมาณ 3-4 โมเลกุลตลอดระยะเวลาในการจำลอง ซึ่งทำให้เห็นว่าโมเลกุลของอะซิโตนไตรลที่มีมากขึ้นน่าจะส่งผลต่อรูปทรงของ BAPNA ที่ใช้ในการเข้าจับกับปาเปน



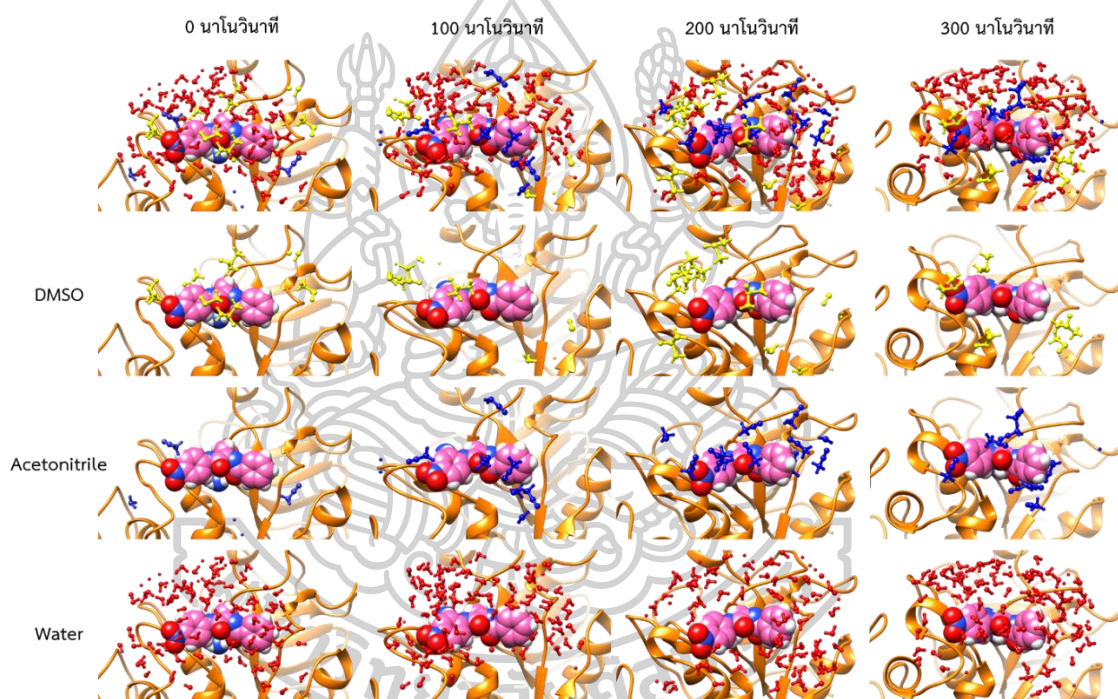
รูปที่ 19 แสดง binding position (ก), บริเวณ active site ของปาเปน (ข) และลักษณะ binding conformation และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างปาเปน (สีส้ม) และ BAPNA (สีชมพู) (ค) ที่ได้จากการทำ Molecular Dynamics (MD) simulation ของระบบที่มี 10:10:80 %v/v ของ อะซิโตไนด์โรล (สีน้ำเงิน) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ตารางที่ 6 กรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับปาเปนในระบบ 10:10:80 %v/v ของอะซิโตไนด์โรล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ กับน้ำ ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ระยะเวลาการจำลอง (นาโนวินาที)	กรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยา	
	Hydrogen bond	Hydrophobic interaction
0	TYR61, GLY66	GLY65, GLY66, VAL133, VAL157
100	GLY23, GLY66	TYR67, GLY65, GLY66
200	TRY61, GLY66, ASP158	TYR67, GLY65
300	GLY66, ASP158	TYR67, GLY65

ตารางที่ 7 จำนวนโมเลกุลของน้ำ โดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และอะซิโตไนไตรล์ ที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ระยะเวลาการจำลอง (นาโนวินาที)	จำนวนของตัวทำละลายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA					
	Hydrogen bond			Hydrophobic interaction		
	น้ำ	อะซิโตไนไตรล์	DMSO	น้ำ	อะซิโตไนไตรล์	DMSO
0	4	0	0	0	1	0
100	3	0	0	0	3	1
200	2	0	0	0	4	0
300	3	0	1	0	3	0

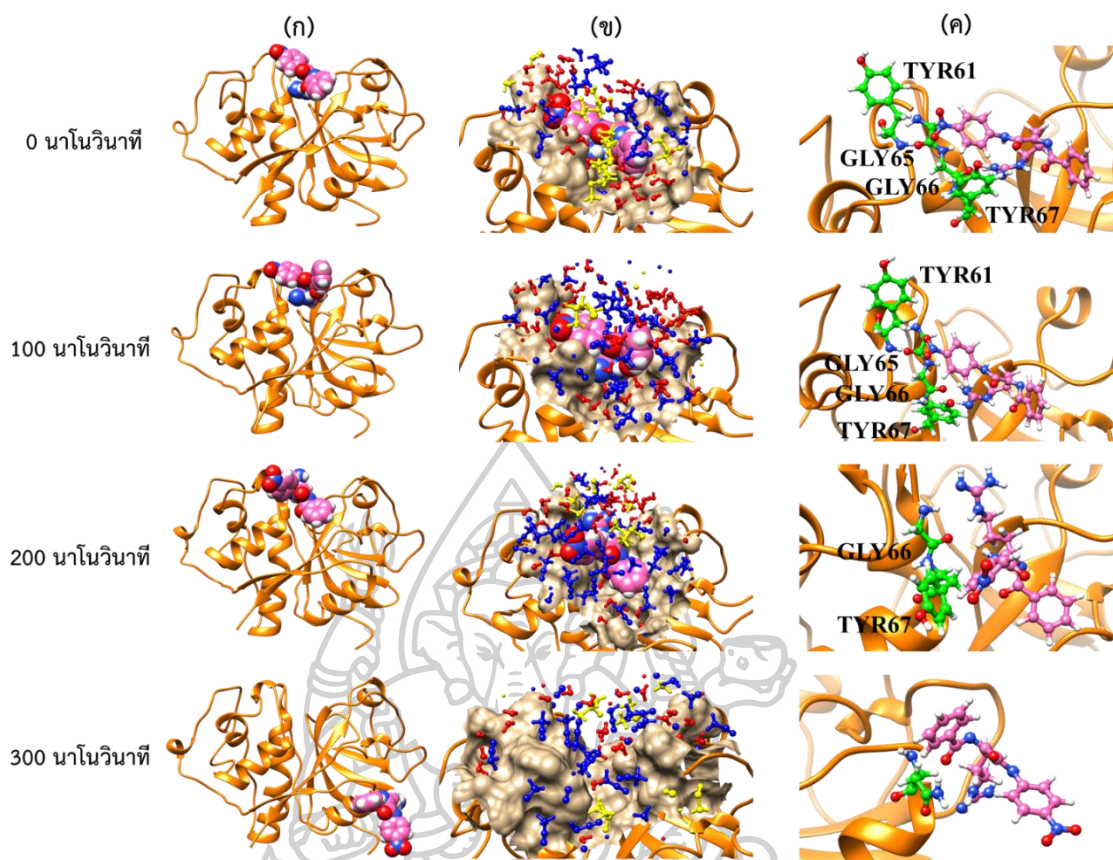


รูปที่ 20 แสดงโมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ในระยะภายใน 8 Å ในบริเวณที่ active site ของ BAPNA-papain complex (ข) ที่ได้จากการจำลอง Molecular Dynamics (MD) simulation ของปาเปน (สีส้ม) และ BAPNA (สีชมพู) complex ของระบบที่มี 10:10:80 %v/v ของ อะซิโตไนไตรล์ (สีน้ำเงิน) โดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่ 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

#### 4.2.5. ระบบ 50:10:40 %v/v ของอะซิโตนไตรล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ

เพื่อทำการพิสูจน์ว่าอะซิโตนไตรลมีผลต่อการเข้าจับของ BAPNA กับปาเปน จึงได้ทำการเพิ่มปริมาณของอะซิโตนไตรลเป็นอัตราส่วน 50:10:40 %v/v ของอะซิโตนไตรล, ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ จากรูปที่ 21 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าลักษณะ conformation ของ BAPNA ที่ใช้ในการเข้าจับกับปาเปนค่อย ๆ เริ่มเปลี่ยนไปจากที่ 0 นาโนวินาทีที่อยู่ในรูปทรงแบนราบ เริ่มเปลี่ยนรูปเป็นทรง V-shaped ที่ 100 นาโนวินาที และ T-shaped ที่ 200 นาโนวินาที ก่อนที่สุดท้ายจะหลุดออกจาก active site ของปาเปน และเมื่อสังเกตสภาพแวดล้อมบริเวณ active site จะเห็นว่าที่ 0 นาโนวินาที มีปริมาณของโมเลกุลน้ำ DMSO และอะซิโตนไตรล ใกล้เคียงกัน และที่ 100 และ 200 นาโนวินาที เริ่มมีปริมาณของอะซิโตนไตรลมากขึ้น และปริมาณของน้ำและ DMSO ลดลง ก่อนที่ 300 นาโนวินาที บริเวณ active site จะมีปริมาณของอะซิโตนไตรลอยู่เป็นส่วนใหญ่ ตามด้วยน้ำ และ DMSO ตามลำดับ สำหรับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนของปาเปนและ BAPNA ในช่วง 100 นาโนวินาทีแรก มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ TYR61 และ GLY66 และเกิด hydrophobic กับ GLY65 และ TYR67 หลังจากนั้นเหลือเพียง 1 พันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน GLY66 และ 1 hydrophobic กับกรดอะมิโน TYR67 และสุดท้าย BAPNA ก็หลุดออกจากบริเวณ active site

สำหรับจำนวนของตัวทำลายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยา จากตารางที่ 9 และรูปที่ 22 จะเห็นได้ว่าที่ 0 นาโนวินาที มีปริมาณของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ล้อมมากที่สุด แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณไดเมทิลซัลฟอกไซด์ค่อย ๆ ลดลงไปเรื่อย ๆ และแทบจะไม่มีอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ตรงกันข้ามกับปริมาณของอะซิโตนไตรลจะเห็นว่าในช่วงเริ่มต้นมีปริมาณของอะซิโตนไตรลเล็กน้อย และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นมีปริมาณของอะซิโตนไตรลล้อมรอบ BAPNA มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น โดยมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง BAPNA กับอะซิโตนไตรล 1 พันธะ และมีการเกิด hydrophobic 6-7 พันธะ ตั้งแต่ 100 นาโนวินาทีจนกระทั่งระยะเวลาการจำลอง ส่วนของโมเลกุลน้ำ จะเห็นว่าที่ 0 นาโนวินาทีมีน้ำล้อมรอบ BAPNA และเกิดพันธะไฮโดรเจน 1 พันธะ และ ที่ 100 นาโนวินาที มีปริมาณน้ำล้อมรอบมากขึ้นและเกิดพันธะไฮโดรเจนถึง 8 โมเลกุล แต่หลังจาก 200 นาโนวินาที จะเห็นได้ว่าโมเลกุลน้ำเริ่มออกห่างจากโมเลกุล BAPNA มากขึ้น ส่งผลให้มีพันธะไฮโดรเจนน้อยลง เหลือเพียง 2-3 พันธะ จนกระทั่งระยะเวลาในการจำลอง ซึ่งจากผลจะเห็นว่าปริมาณของอะซิโตนไตรลที่มากขึ้น ส่งผลให้มีการล้อมรอบโมเลกุลของ BAPNA มากขึ้น เนื่องจากลักษณะขั้วของอะซิโตนไตรลกับ BAPNA ที่ใกล้เคียงกัน จึงซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของรูปทรงที่ใช้ในการเข้าจับของ BAPNA กับ active site ของปาเปน ทำให้สุดท้าย BAPNA หลุดออกจาก active site ของปาเปน



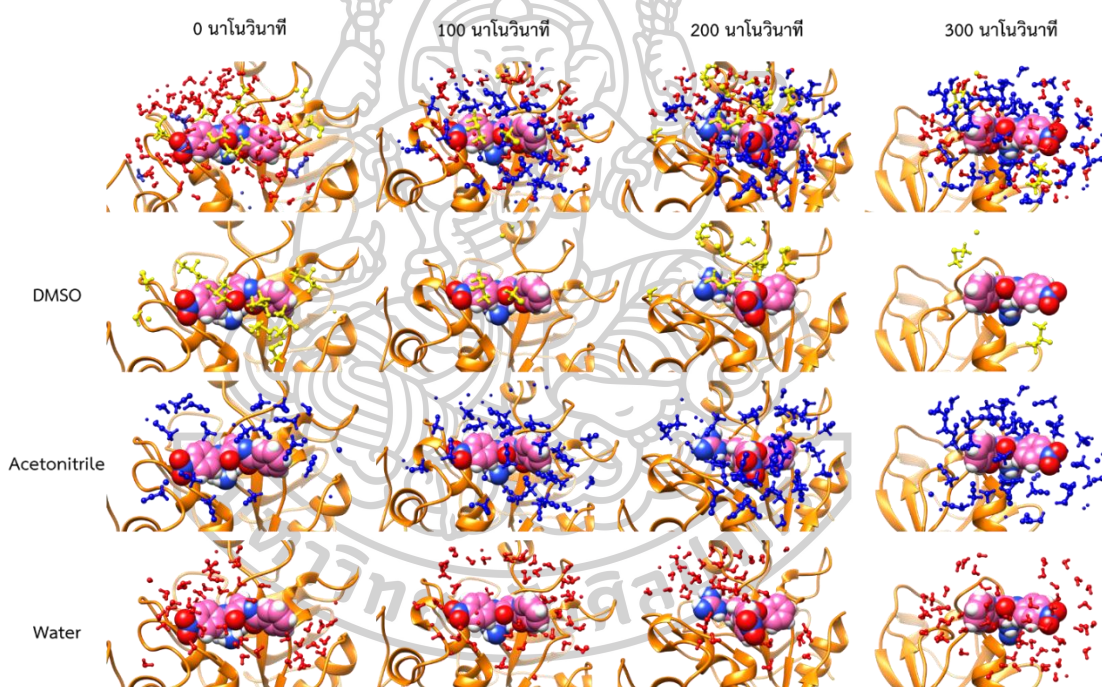
รูปที่ 21 แสดง binding position (ก), บริเวณ active site ของปาเปน (ข) และ ลักษณะ binding conformation และอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างปาเปน (สีส้ม) และ BAPNA (สีชมพู) (ค) ที่ได้จากการทำ Molecular Dynamics (MD) simulation ของระบบที่มี 50:10:40 %v/v ของ อะซิโตไนไตรล์ (สีน้ำเงิน), ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ตารางที่ 8 กรดอะมิโนของปาเปนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง BAPNA กับปาเปนในระบบ 50:10:40 %v/v ของอะซิโตไนไตรล์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ระยะเวลาการจำลอง (นาโนวินาที)	กรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยา	
	Hydrogen bond	Hydrophobic interaction
0	TYR61, GLY66	TYR67, GLY65, GLY66
100	TYR61, GLY66	TYR67, GLY65, GLY66
200	GLY66	TYR67
300	ASN117	-

ตารางที่ 9 จำนวนโมเลกุลของน้ำ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และอะซิโตไนไตรล์ ที่เกี่ยวข้องในการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA ที่เวลา 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

ระยะเวลาการจำลอง (นาโนวินาที)	จำนวนของสารละลายที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยากับ BAPNA					
	Hydrogen bond			Hydrophobic interaction		
	น้ำ	อะซิโตไนไตรล์	DMSO	น้ำ	อะซิโตไนไตรล์	DMSO
0	1	0	0	0	1	0
100	8	1	0	0	7	0
200	2	1	0	0	6	0
300	3	1	1	0	7	0



รูปที่ 22 แสดงโมเลกุลของตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA ในระยะภายใน 8 Å ในบริเวณที่ active site ของ BAPNA-papain complex (ข) ที่ได้จากการจำลอง Molecular Dynamics (MD) simulation ของปาเปน (สีส้ม)-BAPNA (สีชมพู) complex ของระบบที่มี 50:10:40 %v/v ของ อะซิโตไนไตรล์ (สีน้ำเงิน), ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (สีเหลือง) และน้ำ (สีแดง) ที่ 0, 100, 200 และ 300 นาโนวินาที

## บทที่ 5

### สรุปผลและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของ co-organic solvent ที่มีต่อความเสถียรของการจับกันระหว่างปาเปนกับ BAPNA โดยใช้การจำลอง Molecular dynamics (MD) โดยจะเปรียบเทียบระบบที่มีตัวทำละลายเป็นไดเมทิลซัลฟอกไซด์ อะซิโตไนโตรล และน้ำที่อัตราส่วนต่างกัน และวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ที่แสดงถึงปัจจัยความเสถียรต่าง ๆ ของระบบ เช่น Root-Mean-Square Deviation (RMSD) Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF) และ Radius of gyration (Rg) เป็นต้น จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าต่าง ๆ ที่แสดงถึงความเสถียรของระบบที่ทำการจำลอง จะเห็นได้ว่าระบบ 10:90 %v/v ของไดเมทิลซัลฟอกไซด์และน้ำ ที่ใช้เป็นระบบควบคุม มีค่า RMSD ที่ค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่าระบบมีความเสถียร แต่เมื่อทำการเพิ่ม DMSO เป็น 50% ค่า RMSD มีความผันผวนเล็กน้อย สำหรับระบบที่มี 10% อะซิโตไนโตรล 10% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และ 80% น้ำ จะค่อนข้างมีความเสถียรและใกล้เคียงกับระบบควบคุม แต่ในทางกลับกันเมื่อทำการเพิ่มเป็น 50% อะซิโตไนโตรล จะส่งผลให้เมื่อเวลาผ่านไปประยะหนึ่ง BAPNA จะหลุดออกจากตำแหน่ง active site ของปาเปน และเมื่อทำการวิเคราะห์การเกิดอันตรกิริยาและการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของสารละลายต่อ ปาเปน-BAPNA complex จะเห็นได้ว่าระบบที่มีเพียงไดเมทิลซัลฟอกไซด์ทั้ง 10% และ 50% รูปทรงของ BAPNA ที่ใช้ในการเข้าจับมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาที่ใช้ในการจำลอง โดยคงรูปทรงในลักษณะแบนราบในการจับกับ active site และยังคงมีการเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญกับกรด อะมิโนของปาเปน ได้แก่ TYR61 GLY65 GLY66 TYR67 VAL157 และ ASP158 ส่วนระบบที่มีการเติม 10% ของอะซิโตไนโตรลจะเห็นได้ว่ารูปทรงของ BAPNA มีการเปลี่ยนแปลงจากลักษณะแบนราบเป็นรูป V-shaped และมีโมเลกุลของอะซิโตไนโตรลล้อมรอบ BAPNA มากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป แต่ BAPNA ยังสามารถเข้าจับกับ active site ของปาเปนได้ตลอด 300 นาโนวินาที และมีการเกิดอันตรกิริยาที่สำคัญกับกรดอะมิโนของปาเปน ได้แก่ TYR61 GLY65 GLY66 TYR67 และ ASP158 เมื่อเพิ่มปริมาณอะซิโตไนโตรลเป็น 50% จะเห็นได้ในช่วงแรก BAPNA ยังสามารถจับกับ active site ของปาเปนโดยใช้รูปทรง V-shaped แต่เมื่อเวลา 200 นาโนวินาที รูปทรงของ BAPNA มีการเปลี่ยนแปลงเป็นทรง T-shaped และหลุดออกจาก active site ของปาเปนไป ซึ่งเมื่อมาสังเกตตัวทำละลายที่ล้อมรอบ BAPNA จะเห็นว่า มี อะซิโตไนโตรลล้อมรอบ BAPNA มากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งที่ 300 นาโนวินาทีจะเห็นได้ว่ามี อะซิโตไนโตรลล้อมรอบ BAPNA เป็นหลัก ซึ่งจากผลการจำลองนี้ก็แสดงให้เห็นว่าอะซิโตไนโตรลน่าจะมีส่วนที่ใกล้เคียงกับ BAPNA จึงทำให้ชอบอยู่ล้อมรอบ BAPNA ซึ่งส่งผลต่อลักษณะรูปทรงที่ใช้ในการเข้าจับกับ active site ของปาเปน และเมื่อมีปริมาณของอะซิโตไนโตรลที่มากเกินไปก็อาจจะส่งผลต่อความเสถียรของระบบปาเปนและ BAPNA นอกจากนั้น จากค่า RMSF ที่บอกถึงบริเวณที่มีความยืดหยุ่นของโครงสร้าง จะเห็นได้ว่าในช่วงบริเวณของลำดับกรดอะมิโนที่ 130-160 จะมีความเกี่ยวข้องกับบริเวณ active site ซึ่งน่าจะเป็นบริเวณที่สามารถทำ mutagenesis เพื่อลดความยืดหยุ่นลง ทำให้โครงสร้างสามารถคงรูปและคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากขึ้นในอนาคต

โดยสรุประบบที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการประยุกต์อะซิโตไนโตรลเป็น co-organic solvent คือ 10:10:80 %v/v ของอะซิโตไนโตรล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และน้ำ การจำลองนี้แสดงให้เห็นภาพในระดับโมเลกุลซึ่งสามารถอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นและทำให้เข้าใจมากขึ้น เพื่อนำอะซิโตไนโตรลไปประยุกต์ใช้ในระบบไปโอเซนเซอร์ของปาเปนและ BAPNA เพื่อใช้ในการตรวจจับยากำจัดศัตรูพืชที่มีความเหมาะสมกับระบบปาเปน-BAPNA มากขึ้นในอนาคต

## แหล่งอ้างอิง

1. อึ้งสูงเนิน, ส., *Environmental Impact from Pesticide Utilization*. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2015. **9**(1): p. 50-63.
2. Vattanaprteep, N., *Environmental and Health Impact of Agriculture Chemicals: Paragat, Chlorpyrifos and Glyphosate in Thailand*. Eco. Env. & Cons., 2022. **28**(2): p. 975-978.
3. Nupangtha, W., et al., *Experimental study of tap water activated by commercial fruit and vegetable purifier*. Journal of Physics, 2023. **2431**
4. Sirasunthorn, N., et al., *Cyantranilprole As Papain Inhibitor and Its Action in Molecular Docking Studies*. Agriculture and Natural Resources, 2022. **56**(6): p. 1191-1196.
5. Salo-Ahen, O.M.H., Ida Alanko, Rajendra Bhadane, Alexandre M. J. J. Bonvin, Rodrigo Vargas Honorato, Shakhawath Hossain, André H. Juffer, Aleksei Kabedev, Maija Lahtela-Kakkonen, Anders Støttrup Larsen, and et al., *Molecular Dynamics (MD) simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development*. Processes, 2021. **9**(1): p. 71.
6. Gustavo, T.-P.E., et al., *Chapter 22 - Novel vegetal enzymes used in the obtention of protein hydrolyzates and bioactive peptides derived from various sources of meat and meat by-products*. Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology. 2022.
7. Cornely, K., et al., *Kinetics of Papain: An Introductory Biochemistry Laboratory Experiment*. Journal of Chemical Education 1999. **76**(5): p. 644-645.
8. Amri, E. and F. Mamboya, *Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2012. **8**: p. 99-104.
9. Paul, B., Nasreen, M., Sarker, A., Isam, R. , *Isolation, purification and modification of papain enzyme to ascertain industrially valuable nature*. Int. J. Bot. Res, 2013. **3**: p. 11-22.
10. Sijwali, P.S. and M.A. Nivya, *Enzymes | Cysteine Proteases*. Encyclopedia of Biological Chemistry III, 2021. **3**: p. 270-279.
11. Islam, R., *Isolation, purification and modification of papain enzyme to ascertain industrially Valuable nature*. International Journal of Bio-Technology and Research, 2013. **3**: p. 11-22.
12. Proteopedia. *Papain*. Available from: <https://proteopedia.org/wiki/index.php/Papain>.
13. Holliday, G.L., et al. *Papain*. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/mcsa/entry/174/>.
14. Singh, P.K., N. Shrivastava, and B.K. Ojha, *Chapter 8 - Enzymes in the Meat Industry*. Enzymes in Food Biotechnology. 2019.

15. Fernandez, M.M., D.S. Clark, and H.W. Blanch, *Papain kinetics in the presence of a water-miscible organic solvent*. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 1991. **37**: p. 967-972.
16. Hollingsworth, S.A. and R.O. Dror, *Molecular Dynamics (MD) simulation for all*. Neuron, 2018. **99**(6): p. 1129-1143.
17. Collier, T.A., T.J. Piggot, and J.R. Allison, , *Molecular Dynamics (MD) simulation of proteins*. Methods Mol Biol, 2020. **2073**: p. 311-327.
18. Maier, J.A., et al., *ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB*. . Journal of chemical theory and computation, 2015. **11**(8): p. 3696-3713.
19. Shouket, H.A., et al., *Study on industrial applications of papain: A succinct review*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 2020. **614**.
20. Szabelski, M., K. Stachowiak, and W. Wicz, *Influence of organic solvents on papain kinetics*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(4): p. 1197-1201.
21. Szabó, A., et al., *Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006. **41**(1-2): p. 43-48.
22. Baudin, P. *Equilibration at MM and QMMM level using Amber and CPMD*. 2018; Available from:[https://pablito-playground.readthedocs.io/en/latest/tutorials/qmmm\\_amber\\_cpmd.html](https://pablito-playground.readthedocs.io/en/latest/tutorials/qmmm_amber_cpmd.html).
23. Bagewadi, Z.K., et al., *Molecular Dynamics and Simulation Analysis against Superoxide Dismutase (SOD) Target of Micrococcus luteus with Secondary Metabolites from Bacillus licheniformis Recognized by Genome Mining Approach*. Saudi Journal of Biological Sciences., 2023. **30**(103753.).

รายการอ้างอิง





## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ภูมิพัฒน์ ทำดี
วุฒิการศึกษา	2017 มัธยมศึกษา โครงการรวมว. โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยพะเยา 2022 ปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ผลงานตีพิมพ์	- "Enhancing the Efficacy of Monolaurin Against SARS-CoV-2 and Influenza A (H1N1) With a Nanoemulsion Formulation." Weerapol, Yotsanan & Manmuan, Suwisit & Limmatvapirat, Sontaya & Limmatvapirat, Chutima & Sirirak, Jitnapa & Tamdee, Poomipat & Tubtimsri, Sukannika. OpenNano. 2024, 17. 100207. - "Computational Insight of Phase Transformation and Drug Release Behaviour of Doxycycline-Loaded Ibuprofen-Based In-Situ Forming Gel". Puyathorn, Napaphol & Tamdee, Poomipat & Sirirak, Jitnapa & Okonogi, Siriporn & Phaechamud, Thawatchai & Chantadee, Takron. Pharmaceutics. 2023, 15. 2315. - "Ways to Assess and Regulate the Performance of a Bi-Mechanism-Induced Borneol-Based In Situ Forming Matrix" Lertsuphotvanit, Nutdanai & Sirirak, Jitnapa & Tamdee, Poomipat & Tuntarawongsa, Sarun & Phaechamud, Thawatchai & Chantadee, Takron. Pharmaceutics. 2023, 15. 2053. - "Cyantraniliprole as papain inhibitor and its action in molecular docking studies." Sirasunthorn, Nichanun, Jidapa Phornphakawat, Poomipat Tamdee, and Jitnapa Sirirak. Agriculture and Natural Resources. 2022, 56 (6), 1191–1196. - "New Approach for Preparing Solid Lipid Nanoparticles with Volatile Oil-Loaded Quercetin Using the Phase-Inversion Temperature Method." Yotsanan Weerapol, Suwisit Manmuan, Nattaya Chaothanaphat, Sontaya Limmatvapirat, Jitnapa Sirirak, Poomipat Tamdee, and Sukannika Tubtimsri. Pharmaceutics. 2022, 14(10), 1984. - "2,5-Diketopiperazine Derivatives as Potential Anti-Influenza (H5N2) Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Study." Chanakan Winyakul, Weerachai Phutdhawong, Poomipat Tamdee, Jitnapa Sirirak, Thongchai Taechowisan, and Waya S. Phutdhawong. Molecules. 2022,27,4200.

## รางวัลที่ได้รับ

2018-ปัจจุบัน นักศึกษาในโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)

2024 Best Poster Presentation Award หัวข้อ "THE EFFECT OF AN AQUEOUS-ORGANIC MEDIUM ON PAPAIN-SUBSTRATE BINDING AND PAPAIN ACTIVITY: MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS STUDY" งานประชุมวิชาการ The 50th International Congress on Science, Technology and Technology-based Innovation (STT50)

