ปุณฑริกา เภสัชชา : การใช้เทคโนโลยีการกำกับวิวัฒนาการเพื่อการพัฒนาเอนไซม์ไคติเนสในอุตสาหกรรม (DIRECTED EVOLUTION OF CHITINASE FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภัย, 104 หน้า

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกยีนไคติเนสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* และใช้ *Escherichia coli* เป็นระบบในการแสดงออกของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อสายพันธุ์ DSM13 และสายพันธุ์ DSM8785 มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานระหว่าง 50-55°ซ และ 50-60°ซ ตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองสายพันธุ์มีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ pH 6.0 ยีนไคติเนสถูกทำให้กลายพันธุ์อย่างสุ่มด้วยวิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิ-เมอร์เรส (PCR)ในสภาวะที่มีความแม่นยำต่ำและเอื้อต่อความผิดพลาด (Error-prone PCR) ร่วมกับวิธีการสลับสับเปลี่ยนยีน (DNA Shuffling) คลังของยีนกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันของเอนไซม์ไคติเนสได้ถูกคัดเลือกเพื่อหาเอนไซม์ที่สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรด เอนไซม์ไคติเนสกลายพันธุ์ (128mt) ซึ่งแสดงค่ากิจกรรมที่ดีขึ้นในสภาวะที่เป็นกรดได้ถูกคัดเลือกเพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป เมื่อใช้ *p*-Nitrophenyl-di-*N*-acetyl-chitobiose เป็นสับสเตรท ค่า k_{cat}/K_m ที่ pH 6.0 ของเอนไซม์ไคติเนสสายพันธุ์ดั้งเดิมจากสายพันธุ์ DSM13, DSM8785 และเอนไซม์ไคติเนสกลายพันธุ์ (128mt) มีค่า 5.17, 6.35 และ 14.73 $s^{-1}mM^{-1}$ ในขณะที่ค่า k_{cat}/K_m ที่ pH 3.0 ของเอนไซม์ไคติเนสเหล่านี้มีค่า 1.69, 1.36 และ 4.10 $s^{-1}mM^{-1}$ ตามลำดับ ค่า specific activity ของเอนไซม์ไคติเนสเหล่านี้มีค่า 290.9, 302.2 และ 351.72 Unit/μg ตามลำดับ เมื่อใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรท เอนไซม์ไคติเนสกลายพันธุ์ (128mt) มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่แปรผันที่อุณหภูมิ 55 ถึง 60ºC และมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ pH 6.0 จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไคติเนสกลายพันธุ์ (128mt) แสดงให้เห็นว่ามีสองกรดอะมิโนที่ กลายพันธุ์ในส่วนของ catalytic domain ที่ตำแหน่ง 231 จากกรดอะมิโนอะลานีน(Ala) เปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนวาลีน (Val) และที่ตำแหน่ง 384 จากกรดอะมิโนกลูตามีน (Gln) เปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนอาจีนีน(Arg) ในส่วนของ fibronectin type III domain ที่ตำแหน่ง 462 จากกรดอะมิโนวาลีน (Val) เปลี่ยนไปเป็นอะลานีน (Ala) และที่ตำแหน่ง 477 จากกรดอะมิโนแอสปาติก (Asp) เปลี่ยนไปเป็นกรดอะโมแอสปาราจีน (Asn) จากผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าเทคนิคการกำกับวิวัฒนาการสามารถนำมาใช้พัฒนาเอนไซม์ไคติ-เนสกลายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีขึ้นโดยประมาณสองเท่าทั้งในค่า pH ที่เป็น

กลางและกรดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมเมื่อใช้ *p*-Nitrophenyl-Di-*N*-Acetyl-chitobiose เป็นสับสเตรท

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

PUNTARIKA PESATCHA : DIRECTED EVOLUTION OF CHITINASE FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 104 PP.

CHITINASE/ CHITIN/ DIRECTED EVOLUTION/ DNA SHUFFLING

In this research, the genes encoding chitinase from *Bacillus licheniformis* were isolated and expressed using an *Escherichia coli* expression system. The recombinant chitinase from *Bacillus licheniformis* strains DSM13 and DSM8785 have an optimal temperature between 50-55°C, and 50-60°C, respectively. Both of them have an optimal pH at 6.0. The genes were randomly mutated by a combination of error-prone PCR and DNA shuffling techniques. The library of variants of chitinases was then screened for the acidic tolerant activity. The mutant (128mt), which showed the improved activity, was selected for further study. When using *p*-Nitrophenyl-Di-*N*-Acetyl-chitobiose as a substrate, the k_{cat}/K_m value at pH 6.0 of wild type enzyme from strain DSM13, DSM8785 and mutated chitinase (128mt) were 5.71, 6.35 and 14.73 $s^{-1}mM^{-1}$, respectively, while the k_{cat}/K_m at pH 3.0 of wild type enzyme from strain DSM13, DSM8785 and mutated chitinase (128mt) were 1.69, 1.36 and 4.10 $s^{-1}mM^{-1}$, respectively. The specific activity of mutated chitinase (128mt) at pH 3.0 was 351.72 Unit/µg, while the specific activities of chitinase enzymes from strains DSM13 and DSM8785 were 290.9 and 301.2 Unit/µg, when using colloidal chitin as a substrate. The mutant (128mt) has an optimal temperature ranging from 55 to 60ºC, and an optimal pH at 6.0. Amino acid sequence analysis of this mutant chitinase reveals that two amino acids in catalytic domain (Ala231Val and Gln384Arg), and two amino acids in Fibronectin type III domain (Val426Ala and Asp477Asn) have been mutated.

These results indicated that the directed evolution technique has been used successfully to obtain a mutated chitinase with improved activity at both neutral and low pH, approximately 2-fold better than the wild type, when using *p*-Nitrophenyl-Di-*N*-Aceltyl-chitobiose as a substrate.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2007 Advisor's signature_____