



รายงานการวิจัย

การใช้เทคโนโลยีเอนไซม์เพื่อการเพิ่มมูลค่าของเหลือจากอุตสาหกรรมกุ้ง
Application of Enzyme Technology for Value-added Products from Shrimp
Wastes

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมมาลัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

1. น.ส. ปุณศรีกา เกสัชชา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๔๘-๒๕๕๐
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน/๒๕๕๓

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๔๘ - ๒๕๕๐ รวมทั้งยังได้รับเงินทุนสนับสนุนเพิ่มเติมจาก International Foundation for Sciences (IFS) และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) โครงการทุนวิจัยมหัศจรรย์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (TRF-MAG)

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วินเซนท โอัจซิงค์ และ ศาสตราจารย์ ดร. คิฐูมา हालทิช ที่ได้ช่วยกรุณาให้คำแนะนำในเรื่องการวิเคราะห์เอนไซม์ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยวิจัย ๒ ท่าน คือ ดร. ชมภูษ สงสิริฤทธิกุล และ นางสาวศศิธร ลาบุญเรือง และนางสาวพรศิริ เพชรศรีช่วง ที่ได้ตั้งใจทำการวิจัยเป็นอย่างดี และคุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ได้ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้เป็นการวิจัยและพัฒนาเอนไซม์ โคโคตินเอส เพื่อให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ใน ระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะสำหรับการย่อยสลายกากโคโคตินจากเปลือกกุ้งที่ถูกทิ้งออกมาเป็นจำนวนมากจาก โรงงานอุตสาหกรรมส่งออกกุ้งแช่แข็ง ซึ่งเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่มีมูลค่าในการส่งออกสูงเป็น ลำดับต้นของประเทศ โครงการเริ่มต้นจากการคัดหาแหล่งของเอนไซม์ที่ดี ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย บาซิลลัส ไค นีฟอร์มิส ดีเอสเอ็ม ๘๗๘๕ และ ๑๓ จากนั้นใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรมในการโคลนยีนขึ้นมาด้วยเทคโนโลยี พีซีอาร์ แล้วจึงนำยีนที่ได้ไปแสดงออกเพื่อผลิตให้ได้เป็นเอนไซม์จำนวนมากด้วยระบบการแสดงออกที่เหมาะสมใน แบคทีเรีย อี โคไล โดยผู้วิจัยสามารถพัฒนาระบบการแสดงออกที่เหมาะสม ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้ เป็นจำนวนมาก และบริสุทธิ์ รวมทั้งยังมีประสิทธิภาพดีในการทำกิจกรรม จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ เอนไซม์ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ และ ทางชีวเคมี จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยโคโคติน ซึ่ง พบว่าเอนไซม์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ รวมทั้งการ เปลี่ยนโคโคตินที่เตรียมได้จากเปลือกกุ้งให้เป็นสารที่มีมูลค่าสูง คือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เอน อะเซททิล กลูโคซามีน และโคโคโกลิโกแซคคาไรด์ ต่อไป นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยยังประสบความสำเร็จในการนำเทคนิคการสลับสับเปลี่ยน ดีเอ็นเอ ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการมาใช้ในการพัฒนาเอนไซม์ด้วยวิธีการอณูวิวัฒนาการ ให้ได้เป็นเอนไซม์ ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด คือมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาคิดกว่าเอนไซม์ดั้งเดิม ๒.๗ เท่า ที่ค่า ความเป็นกรดต่าง ๓ ซึ่งเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นมาได้นี้จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในกระบวนการย่อยสลายโคโคตินใน ระดับอุตสาหกรรมจริงต่อไป ผลสำเร็จจากโครงการวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ๒ เรื่อง และ เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทของนักศึกษา ๑ เรื่อง รวมทั้งเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัย หลังปริญญาเอกของนักวิจัย ๑ ท่าน เอนไซม์ต้นแบบทั้งหมดที่ได้พัฒนาขึ้นจะถูกนำไปต่อยอดเพื่อการวิจัยประยุกต์ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ABSTRACT

This project involves the research and development of enzyme chitinase for industrial application, especially for the hydrolysis of chitin waste from shrimp shell that has been discharged in a large amount from frozen shrimp processing factory, which is one of the key agricultural sectors that generated high income for the country. The project started from identifying an appropriate source of the enzyme, i.e., bacteria *Bacillus licheniformis* strain DSM 8785 and DSM 13. Then, genetic engineering approached based on polymerase chain reaction (PCR) technique was used to clone the genes of these enzymes. Subsequently, the enzymes were produced by using *E. coli* expression system. In this research we were able to develop an efficient method for the production of high amount of pure and active enzyme. Analysis of purified recombinant enzymes both by bioinformatic method and biochemical characterization revealed that the enzymes are highly attractive for various biotechnological applications. These include bioconversion of chitin waste from shrimp shell into value-added products such as N-acetylglucosamine sugar or chito-oligosaccharides. Moreover, we also succeeded in applying DNA shuffling technique that has been developed in our laboratory for the development of enzyme property using directed evolution technique. The improved chitinase showed 2.7-fold higher activity at low pH (3.0) than the wild-type enzyme. This enzyme will also be beneficial for bioprocessing of chitin in an industrial scale in the future. In addition to three recombinant enzymes that are appropriate for industrial uses, the outcomes from this project also included two publications in international journals as well as parts of one master thesis and output of one postdoctoral researcher.

สารบัญ

สารบัญภาพ	3
บทที่ ๑	5
๑.๑ ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	5
๑.๒ วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
๑.๓ ขอบเขตของการวิจัย	6
๑.๔ ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	6
๑.๕ คำสำคัญ	6
๑.๖ หมายเหตุ	6
บทที่ ๒	7
๒.๑ การทบทวนวรรณกรรม	7
๒.๑.๒ การกำกับวิวัฒนาการ (Directed Evolution)	8
๒.๑.๓ เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยน DNA (DNA Shuffling Technology)	10
๒.๒ ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework)	11
๒.๓ วิธีการดำเนินการวิจัย	12
๒.๓.๑ การค้นหาแหล่งของเอนไซม์ chitinase	12
๒.๓.๒ การสกัดแยกยีนที่สร้างเอนไซม์ และการโคลนเข้าไปในพลาสมิดที่เหมาะสม	12
๒.๓.๓ การพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ chitinase เพื่อปรับใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม	12
๒.๓.๔ ทำการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ด้วยวิธีการสลับสับเปลี่ยน ดีเอ็นเอ (DNA Shuffling)	12
๒.๓.๕ ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมา	13
บทที่ ๓	15
๓.๑ ผลการวิจัย เกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี Directed Evolution ในการพัฒนาเอนไซม์ chitinase	15
๓.๒ ผลการวิจัย เกี่ยวกับการพัฒนาและคุณสมบัติของเอนไซม์ chitinase จากเชื้อ B. licheniformis	25

บทที่ ๔	35
๔.๑ สรุปผลการวิจัยทั้งหมด	35
๔.๒ ข้อวิจารณ์	36
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก.....	41
ภาคผนวก ก: การเผยแพร่ผลงานวิจัย.....	41
๑. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	41
๒. ผลงานนำเสนอในงานประชุมทางวิชาการต่างๆ	41
ภาคผนวก ข: รายการครุภัณฑ์	42
ภาคผนวก ค: สารเคมีที่ใช้.....	43
ภาคผนวก ง: ลำดับเส้น DNA และ โปรตีนของเอนไซม์ chitinase ทั้งหมดในการทดลองนี้.....	45
ลำดับเส้น DNA ในรูปแบบ FASTA	45
ลำดับเส้นโปรตีนในรูปแบบ FASTA.....	46
ประวัตินักวิจัย.....	49
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้.....	49

สารบัญภาพ

รูปที่ ๑	โครงสร้างของไคติน และ กลูโคซามีน.....	5
รูปที่ ๒	ขั้นตอนหลักในการทำการกำกับวิวัฒนาการอื่น.....	7
รูปที่ ๓	ทฤษฎีการวิวัฒนาการของอินและสิ่งมีชีวิตยุคใหม่.....	8
รูปที่ ๕	ขั้นตอนการค้นหาเอนไซม์แบบ high-throughput ที่ได้พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้.....	11

บทที่ ๑

บทนำ

๑.๑ ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกกุ้งแช่แข็งเป็นจำนวนมาก โดยมีรายได้จากการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งจากรายได้ทั้งหมดของผลผลิตรวมทางการเกษตรของประเทศ จากข้อมูลของธนาคารเพื่อการส่งออกในปีพ.ศ. ๒๕๔๗ ประเทศไทยมีการส่งออกกุ้งแช่แข็งประมาณ ๑๖๐,๗๖๐ ตัน ซึ่งในระหว่างกระบวนการผลิตกุ้งแช่แข็งนี้ จะมีเปลือกและ/หรือ ส่วนหัวกุ้ง เป็นเศษเหลือทิ้งถึงประมาณร้อยละ ๓๐ - ๕๐ (ที่มา: กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กรมประมง <http://www.fisheries.go.th/foreign/INDEX2.htm>) และเนื่องจากการย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นสารประกอบหลักของเปลือกกุ้งตามธรรมชาตินั้น ต้องใช้เวลานานมาก เศษเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมส่งออกกุ้งเหล่านี้ จึงสะสมเป็นของเสียที่ไม่มีมูลค่า และยังก่อให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมตามแหล่งอุตสาหกรรมต่างๆเป็นอันมาก

การนำเปลือกกุ้งมาใช้ประโยชน์ โดยนำไปแปรรูปเป็นไคโตซาน เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มมูลค่าของเหลือจากอุตสาหกรรมกุ้งได้ดี แต่วิธีการโดยทั่วไปในการแปรรูปไคตินเป็นไคโตซานนั้นต้องใช้ปฏิกิริยาเคมีที่รุนแรง เพราะต้องใช้กรดไฮโดรคลอริกภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเหลว (Hayes et al., 2008b) ดังนั้นหากเปลี่ยนไปใช้เทคโนโลยีเอนไซม์ในการแปรรูปเปลือกกุ้ง ซึ่งสามารถทำได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง จะเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อม และลดอันตรายต่อมนุษย์ รวมทั้งช่วยลดค่าใช้จ่ายในระยะยาวได้ ไคตินที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไคตินเอสได้เป็นโมโนเมอร์ หรือ โพลีเมอร์ของ N-Acetyl-glucosamine นั้น สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งทางด้าน การแพทย์ เกษษ การเกษตร และในอุตสาหกรรมอาหาร (Khoushab and Yamabhai, 2010) จึงเป็นการเพิ่มมูลค่ากากของเหลือไคตินได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้แล้วยังเป็นการช่วยลดปริมาณของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมกุ้ง ซึ่งเป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อม การแปรรูปเปลือกกุ้งให้เป็นสารที่มีมูลค่าสูงโดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์จึงเป็นการสร้างงานและรายได้ให้กับชุมชน รวมทั้งเพิ่มโอกาสการส่งออกสินค้าที่มีมูลค่าสูง อันจะทำให้เกิดการพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งซึ่งเป็นอุตสาหกรรมหลักของชาติให้ยั่งยืนต่อไป

๑.๒ วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตเอนไซม์ chitinase ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเปลือกกุ้ง ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริกและสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เพื่อเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายกากของเหลือจากอุตสาหกรรมกุ้งในประเทศให้เป็นสารที่มีมูลค่าสูงต่อไป โดยแบ่งเป็นวัตถุประสงค์ย่อยได้ดังนี้

๑.๒.๑ เพื่อประเมินและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase ได้ดี

๑.๒.๒ เพื่อทำการสกัดแยกยีนที่สร้างเอนไซม์ chitinase จากจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกมา และโคลนเข้าไปในพลาสมิดที่เหมาะสม

๑.๒.๓ เพื่อทำการพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ chitinase ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้เอนไซม์ในปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ และปรับใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

๑.๒.๔ เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคการสลับสับเปลี่ยน ดีเอ็นเอ ในการพัฒนาเอนไซม์ไคตินเอสให้ทำงานได้ดีขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด เพื่อลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม

๑.๒.๕ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบื้องต้น เพื่อประเมินความเหมาะสม และแนวทางการนำเอนไซม์ ที่ได้พัฒนาขึ้นไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

๑.๓ ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้เป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเอนไซม์ (enzyme technology) และเทคนิคการสลับสับเปลี่ยน ดีเอ็นเอ (DNA shuffling) ที่ได้รับการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการ มาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของ เอนไซม์ ไคตินเอส โดยจะทำการผลิตเอนไซม์ในเซลล์ที่เหมาะสม แล้วทำการพัฒนาคุณภาพให้มีประสิทธิภาพดี เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการย่อยเปลือกกุ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริกและ สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ รวมทั้งจะได้ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วย

๑.๔ ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

- ๑.๔.๑ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ chitinase ที่ดี
- ๑.๔.๒ ยีนของเอนไซม์ chitinase
- ๑.๔.๓ ระบบการผลิตเอนไซม์ chitinase ที่ดี
- ๑.๔.๔ วิธีการที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณสมบัติเอนไซม์ตามแนวทาง directed evolution ด้วย เทคนิค DNA shuffling
- ๑.๔.๕ เอนไซม์ chitinase ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในกระบวนการ bioconversion กากไคติน ในระดับอุตสาหกรรม
- ๑.๔.๕ ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการระดับนานาชาติ
- ๑.๔.๕ ส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท และงานวิจัยหลังปริญญาเอก

๑.๕ คำสำคัญ

เอนไซม์ไคตินเอส, ไคติน, กากของเสียจากอุตสาหกรรมกุ้ง, การกำกับวิวัฒนาการ, เอนไซม์, การสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ

Chitinase, Chitin, Shrimp Waste, Directed Evolution, enzyme, DNA shuffling

๑.๖ หมายเหตุ

๑.๖.๑ เนื่องจากงบประมาณของโครงการวิจัยนี้ถูกตัดลงไปมาก ตามแนวนโยบายการบริหารเงินทุนวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจากสภาวิจัยแห่งชาติ ผ่านการบริหารจัดการของ มทส. คือลดลงไปเกินกว่ากึ่งหนึ่งของงบประมาณที่ขอไป ผู้วิจัยจึงทำงานวิจัยได้เฉพาะการศึกษาวิจัยเอนไซม์ chitinase ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น

๑.๖.๒ ในการรายงานวิจัยนี้ ในส่วนที่เป็นรายละเอียดความรู้วิทยาศาสตร์เชิงลึก จะทำการรายงานเป็นภาษาอังกฤษ ในรูปแบบผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการจริงๆ เพราะเป็นบทความที่ได้ผ่านการคัดกรองโดยผู้ทรงคุณวุฒิมาอย่างดีแล้ว เพื่อความประหยัด และรัดกุม

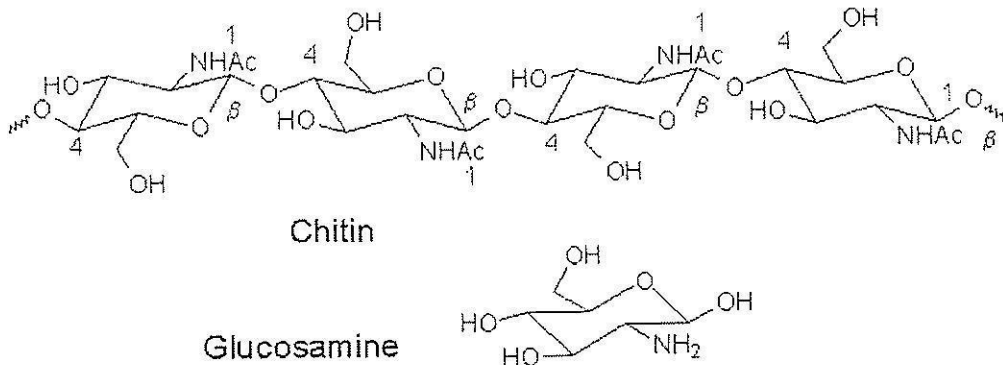
บทที่ ๒ พื้นฐานงานวิจัย

๒.๑ การทบทวนวรรณกรรม

๒.๑.๑ ไคติน และเอ็นไซม์ ไคตินเนส

ไคติน (Chitin)

ไคตินคือชีวโพลิเมอร์ (biopolymer) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลชนิด *N*-acetylglucosamin (GlcNAc) ที่เชื่อมต่อกันอยู่ด้วยพันธะ $\beta(1-4)$ ดังแสดงในรูปที่ ๑ ไคตินเป็นส่วนประกอบหลักของโครงสร้างของสัตว์จำพวก แมลง กุ้ง ปลาหมึก และรา มีการประมาณว่าไคตินเป็นชีวโพลิเมอร์ที่มีจำนวนมากเป็นอันดับสองในโลก รองจากเซลลูโลส ดังนั้นไคติน จึงได้รับความสนใจในแง่ที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบราคาถูกในการสร้างเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มอาทิเช่น ไคโตซาน กลูโคซามีน และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีประโยชน์ทั้งในทาง การเกษตร การแพทย์ อาหาร และยา อย่างกว้างขวาง (Khoushab and Yamabhai, 2010) โดยในประเทศไทย อุตสาหกรรมการส่งออก ผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง ประเภท กุ้ง ปู ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีไคตินสูง จัดเป็นอุตสาหกรรมหลักที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศ แต่มีปัญหาคือยังไม่มียุทธศาสตร์การจัดการของเสียซึ่งมีปริมาณไคตินสูงนี้ที่มีประสิทธิภาพดีเท่าที่ควร ส่วนใหญ่แล้วกากอาหารเหล่านี้จะถูกนำไปทิ้งบนพื้นดินหรือลงสู่ทะเล จึงเป็นการสูญเสียทรัพยากรธรรมชาติ รวมทั้งยังทำลายสภาวะแวดล้อม เพราะไคตินเป็นสารที่ถูกย่อยสลายโดยวิธีการทางธรรมชาติได้ยากมาก ไม่สามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (Muzzarelli, 1998) แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการเพิ่มมูลค่าให้แก่ไคตินคือการใช้เทคโนโลยีเอ็นไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา bioconversion เพื่อเปลี่ยน chitin ให้เป็น น้ำตาลโมล็ดกลูเตียว เอ็น อะเซททิล กลูโคซามีน และน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ซึ่งมีคุณสมบัติอย่างกว้างโดยเฉพาะในทางการแพทย์และการเกษตร (Aam et al., 2010; Khoushab and Yamabhai, 2010)



รูปที่ ๑ โครงสร้างของไคติน และ กลูโคซามีน

เอ็นไซม์ไคตินเนส

เอ็นไซม์ไคตินเนส (EC.3.2.1.14) เป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินซึ่งโดยเอ็นไซม์นี้มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ $\beta(1,4)$ -*N*-acetylglucosidic และสามารถแบ่งออกตามลักษณะการสลายพันธะเป็น ๒ กลุ่ม คือ (Patil et al., 2000)

๑) Endochitinase หรือ chitinase (EC 3.2.1.14) ทำหน้าที่สลายพันธะ β -1,4-N-acetylglucosamine ภายในโครงสร้าง โกลิตินอย่างสุ่ม ได้เป็น มัลติเมอร์ของ N-acetylglucosamine เช่น chitotetraose , chitotriose และ di-acetylchitobiose

๒) Exo-chitinase ซึ่งแบ่งออกได้เป็น ๒ กลุ่ม คือ Chitobiosidases (EC 3.2.1.29) ทำหน้าที่ย่อยสลายที่ปลาย non-reducing ของ di-acetylchitobiose ซึ่งเกิดขึ้นจากการถูกย่อยสลาย chitin ด้วย endochitinase และ 1-4- β -N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.30) ทำหน้าที่ย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโดยเอนไซม์ endochitinase และ chitobiosidases ให้ได้เป็น โมโนเมอร์ของ N-acetylglucosamine

แหล่งที่มา

เอนไซม์ chitinase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดตั้งแต่เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ และเมื่อไม่นานมานี้ นักวิทยาศาสตร์ ณ ภาควิชาชีวทางทะเล มหาวิทยาลัย Mary Land ประเทศสหรัฐอเมริกาได้พบว่าสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ตั้งแต่ปลา สัตว์เลื้อยคลาน นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดก็มีเอนไซม์ chitinase ด้วย (Jollès and Muzzarelli, 1999) จนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาเป็นอันมากเกี่ยวกับเอนไซม์ chitinase จากแบคทีเรียในทะเล โดยเฉพาะในสายพันธุ์ *Vibrio* spp ได้มีการตั้งสมมุติฐานว่าแบคทีเรียประเภทนี้มีความสำคัญต่อ ห่วงโซ่อาหารและพลังงานในท้องทะเล เพราะทำหน้าที่ย่อยสลาย และเปลี่ยนไคตินจำนวนมากให้กลับเป็นแหล่งของคาร์บอน และไนโตรเจน ทั้งนี้ได้เคยมีรายงานการนำเอนไซม์จากจุลชีพมาใช้ในการกำจัดกากของเหลือจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลมาก่อน (Dahiya et al., 2006) เช่น เอนไซม์ไคตินเนสจาก *Aspergillus* sp S1-13 (Rattanakit et al., 2003) หรือการใช้เอนไซม์ร่วมกันจากเชื้อ *Trichoderma atroviride/Serratia marcescens* (Donzelli et al., 2003) โดยส่วนมากเป็นจุลชีพที่พบตามท้องทะเล เช่น *Vibrio* sp. *Alteromonas* sp. *Pseudoalteromonas* sp. *Aeromonas hydrophila* *Aeromonas caviae* *Serratia marcescens*. เป็นต้น ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ตีให้กรย่อยสลาย chitin ที่พบในส่วนห่อหุ้มร่างกายของสัตว์ทะเล (Cohen-Kupiec and Chet, 1998)

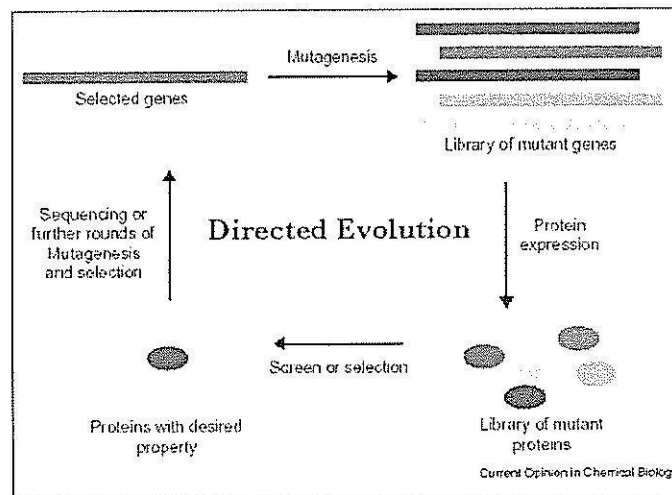
คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี

เอนไซม์ chitinase มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างกันอย่างกว้างขวางและหลากหลาย ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมของชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ จากรายงานพบว่าค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่ 2-10 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0-100 °C โดยขึ้นกับสายพันธุ์และแหล่งที่พบ (Dahiya et al., 2006; Patil et al., 2000) ผลการศึกษาโครงสร้างของ chitinase ที่พบในแบคทีเรียโดยผลึกโปรตีนด้วยแสง x-ray พบว่าเอนไซม์นี้มีโครงสร้างเป็น $(\alpha/\beta)_8$ - barrel structure โดยประกอบไปด้วย ๓ โดเมน คือ โดเมนแรก คือ ส่วนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (catalytic domain) โดเมนที่สองมีหน้าที่จับกับสารเข้าทำปฏิกิริยา (chitin-binding domain) โดเมนที่สามคือ Fibronectin Type III-like domain เป็นส่วนที่เร่งการปฏิกิริยา hydrolysis ของไคติน (Koga et al., 1999) น้ำหนักโมเลกุล ของเอนไซม์แปรเปลี่ยนได้ตั้งแต่ 15-95kDa (Bhattacharya et al., 2007) ข้อมูลโดยละเอียดของคุณสมบัติของเอนไซม์ chitinase สามารถหาอ่านได้จากงานที่ตีพิมพ์ไว้เป็นจำนวนมากทั่วไป (Bhattacharya et al., 2007; Dahiya et al., 2006; Khoushab and Yamabhai, 2010)

๒.๑.๒ การกำกับวิวัฒนาการ (Directed Evolution)

การนำเทคโนโลยีการกำกับวิวัฒนาการ (directed evolution) โดยเฉพาะวิธีการสลับสับเปลี่ยน DNA (DNA shuffling) เพื่อทำการปรับปรุงคุณภาพโปรตีน หรือเอนไซม์ ให้มีคุณสมบัติเหมาะสมตามต้องการนั้น ได้เริ่มต้นขึ้นในช่วงเวลาไม่เกิน 10 ปีที่ผ่านมา โดยนับตั้งแต่ Stemmer, WPC ได้รายงานความสำเร็จในการนำเทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยน DNA มาใช้ในการกำกับวิวัฒนาการของโปรตีนในปี 2537 (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b) ได้มีผู้นำเทคโนโลยีนี้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนา ยา วัคซีน (Patten et al., 1997) และเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Farinas et al., 2001) เป็นอันมาก จึงเห็นได้ว่าเทคโนโลยีนี้เป็นนวัตกรรมที่มีศักยภาพสูง สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพโปรตีนชนิดต่าง ๆ (Ryu and Nam, 2000) ได้จริงเหมาะแก่การนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาคุณภาพเอนไซม์หลายชนิดที่มีความสำคัญต่อ เศรษฐกิจและสังคมของประเทศไทย

ขั้นตอนที่สำคัญในการกำกับวิวัฒนาการเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติตามต้องการนั้น มี ๒ ขั้นตอนหลัก คือ (๑) การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ด้วยวิธีต่างๆ และ (๒) การทำการคัดเลือก (selection or screen) ดังแสดงในรูปที่ ๒

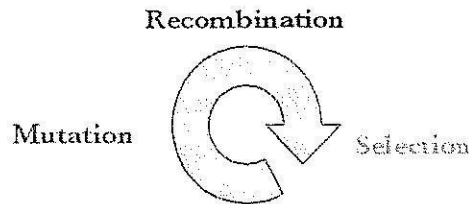


รูปที่ ๒ ขั้นตอนหลักในการทำการกำกับวิวัฒนาการเอนไซม์

เหตุผลประการสำคัญที่ทำให้เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยน DNA เป็นที่นิยมและมีประสิทธิภาพสูงในการนำมาใช้ปรับปรุงคุณภาพเอนไซม์หลายชนิดได้ดีกว่าวิธีการที่ใช้กันอยู่ในอดีต เป็นเพราะนอกจากวิธีการใหม่นี้ จะใช้เวลาในการปรับปรุงคุณภาพสั้นกว่าวิธีการดั้งเดิมแล้ว ยังสามารถใช้คัดเลือกเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดีกว่าเดิมได้หลายเท่าเมื่อเทียบกับวิธีการมาตรฐานที่เคยใช้กันอยู่ (Arnold and Volkov, 1999; Bloom et al., 2005) ทั้งนี้ เพราะเทคโนโลยีนี้เป็นการผนวกรวมวิธีการที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดอย่างไม่เฉพาะเจาะจง (random point mutation) เข้ากับการผสมข้ามสายพันธุ์ของ DNA ส่วนที่คล้ายกัน (homologous recombination) ซึ่งผลที่ได้จากการกระทำนี้จะคล้ายกับวิธีการวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นในธรรมชาติดังรูปที่ ๒ หากแต่ถูกนำมากำกับควบคุมให้เกิดขึ้นตามทิศทางที่ต้องการ ในหลอดทดลองภายในเวลาที่สั้นกว่าการคัดเลือกตามธรรมชาติหลายล้านเท่า (Bloom et al., 2005)

Modern Evolutionary Theory

RA Fisher, S Wright, JBS Haldane



รูปที่ ๓ ทฤษฎีการวิวัฒนาการของยีนและสิ่งมีชีวิตยุคใหม่ โดย Ronald Fisher, JBS Haldan และ Sewall Wright ประกอบด้วยเหตุการณ์ที่สำคัญ ๓ อย่าง คือ การกลายพันธุ์ (mutation) การผสมข้ามสาย DNA (recombination) และการคัดเลือก (selection) โดยเหตุการณ์เหล่านี้จะเกิดขึ้นซ้ำกันหลายครั้งจนกว่าจะได้ยีนหรือสิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับสภาวะที่ใช้ในการคัดเลือกนั้นๆ

๒.๑.๓ เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยน DNA (DNA Shuffling Technology)

วิธีการในการสลับสับเปลี่ยน DNA อย่างคร่าวๆ แสดงดังรูปที่ ๔ ในขั้นแรก เส้น DNA ชนิดต่างๆที่มีความต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ หรือกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำงานในขบวนการเดียวกัน จะถูกนำมาตัดออกเป็นชิ้นใหญ่ๆ อย่างไม่เฉพาะเจาะจงด้วยเอนไซม์ *Dnase I* หลังจากนั้นในขั้นที่ ๒ ชิ้นส่วนของ DNA เหล่านี้ จะถูกนำไปแยกออกให้เป็น DNA สายเดี่ยวด้วยอุณหภูมิสูง ก่อนนำมาผสมกันแล้วนำมาจับรวมให้เป็น DNA สายคู่อีกครั้ง โดยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ ในขั้นตอนนี้สาย DNA จากเส้น DNA เริ่มต้นที่ต่างกันจะมาผสมรวมกันอย่างสุ่ม จากนั้นทำการสังเคราะห์ DNA สายคู่ใหม่จาก DNA ที่ถูกนำมาผสมกันด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) หลังจากทำการ PCR เป็นจำนวนหลายรอบแล้ว ก็จะได้ DNA กลุ่มใหม่ที่ได้รับการสลับสับเปลี่ยน และมีความหลากหลายสูง ในขั้นที่ ๓ นำ DNA กลุ่มใหม่นี้ไปทำการคัดเลือกหาสาย DNA ที่แสดงโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ ด้วยวิธีการที่เหมาะสมต่าง ๆ ขึ้นกับคุณสมบัติของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ต่อไป

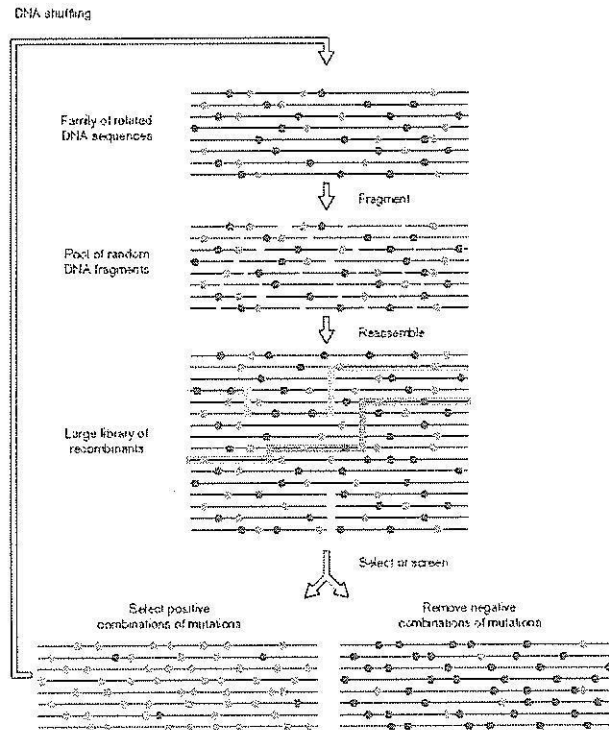
ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยน DNA คือ ความแตกต่างกันของยีนที่นำมาทำการสับเปลี่ยน จากการศึกษาพบว่า ถ้ายีนมีความแตกต่างกันมาก เช่นเป็นแบคทีเรียคนละสายพันธุ์ ก็จะสามารถทำการพัฒนาให้ได้เป็นเอนไซม์ที่ดีขึ้นกว่าและในเวลาที่รวดเร็วกว่าการทำการสลับเปลี่ยนโดยใช้ยีนที่มีความใกล้เคียงกัน (Pelletier, 2001; Zhao and Arnold, 1997) แต่ในทางเทคนิคการทำการสลับสับเปลี่ยนโดยใช้ยีนที่แตกต่างกันนั้นทำได้ยาก ดังนั้นจึงต้องพยายามเลือกปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการพัฒนาและทรัพยากรที่มีอยู่ (Coco et al., 2001) โดยจะเห็นได้ว่านับตั้งแต่ได้มีความคิดเรื่องการนำเทคนิคการสลับสับเปลี่ยนมาใช้ในการพัฒนาเอนไซม์นั้น ก็ได้มีวิธีการใหม่ๆ ในการทำการสลับสับเปลี่ยน DNA ขึ้นเป็นจำนวนมาก วิธีการเหล่านี้เป็นการพัฒนาขึ้นจากวิธีการพื้นฐานของ Stemmer โดยมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการทำ จำนวนยีนตั้งต้น และความคล้ายกันของแต่ละยีน วิธีการโดยละเอียดไม่ขอกล่าวในข้อเสนอโครงการนี้ แต่สามารถสืบค้นได้จากเอกสารอ้างอิงที่ได้แจ้งไว้ ตัวอย่างของวิธีการเหล่านี้เช่น

Exon Shuffling (Kolkman and Stemmer, 2001)

RACHITT : Random chimeragenesis on transient templates (Pelletier, 2001)

StEP : Staggered extension process (Zhao et al., 1998)

- CLERY : Combinatorial libraries enhanced by recombination in yeast (Sieber et al., 2001)
- SHIPREC : Sequence-homology-independent protein recombination (Ostermeier et al., 1999)
- ITCHY : Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes (Lutz and Patrick, 2004)
- THIO-ITCHY : Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes with phosphothiolate deoxynucleotide triphosphate (Ostermeier, 2003)



รูปที่ ๔ ขั้นตอนของกระบวนการสลับสับเปลี่ยน DNA

ขั้นตอนที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการทำการปรับปรุงคุณภาพเอนไซม์ด้วยเทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยน DNA คือวิธีที่ใช้ในการคัดเลือก (screening) หาเอนไซม์ดังที่ได้กล่าวข้างต้น วิธีการที่จะใช้คัดเลือกนี้มีได้หลายแบบ ตั้งแต่วิธีการที่สะดวกและง่าย คือการคัดหาจากโคโลนีของเชื้อที่สามารถโตได้บนจานเลี้ยงเชื้อหรือจากโคโลนีของเชื้อที่ปล่อยเอนไซม์ออกมาภายนอก เพื่อย่อยสลายสารเข้าทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมโดย สังเกตจากวงใสที่เกิดขึ้น นอกจากวิธีการอย่างง่ายนี้แล้วยังมีวิธีการที่ซับซ้อนและใช้เทคโนโลยีขั้นสูงที่เป็นแบบ high-throughput คือสามารถตรวจหาคุณสมบัติเอนไซม์เป็นจำนวนมากได้ในคราวเดียว วิธีการเหล่านี้สามารถค้นหาได้จากเอกสารอ้างอิงข้างท้าย (Arnold and Georgiou, 2003)

๒.๒ ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework)

ไคตินมีโครงสร้างเป็นโครงร่างผลึกที่แข็งแรง (highly ordered crystalline structure) ไม่สามารถละลายน้ำได้ ต้องละลายในกรดที่แรงเช่น HCl (pH 2.0) แล้วจึงล้างกรดออกด้วยน้ำเป็นจำนวนมาก (Muzzarelli, 1977) ใน

กระบวนการเตรียมไคตินจากเปลือกกุ้งเปลือกปูที่เหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล มักทำการกำจัดโปรตีนก่อนด้วยการใช้ด่าง เพราะโปรตีนที่ติดมากับส่วนเปลือกมักจะเสียได้ง่ายและทำให้เกิดกลิ่น นอกจากนั้นแล้วโปรตีนที่กำจัดออกไปนี้สามารถนำไปทำอาหารสัตว์ได้แล้วจึงทำการล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำ จากนั้นจึงใช้กรดไฮโดรคลอริกดึงเอาแร่ธาตุออกจากโครงผลึกของเปลือกกุ้งทำให้ได้ไคตินที่บริสุทธิ์ (Hayes et al., 2008a) หากต้องการย่อยสลายไคตินให้ได้เป็นอนุพันธ์ที่มีมูลค่าเพิ่มด้วยเอนไซม์ ต้องทำให้ไคตินอยู่ในสภาพสารละลายก่อนเรียก colloidal chitin ซึ่งต้องใช้กรด ส่วนการทำปฏิกิริยา hydrolysis โดยนั้น การทำที่อุณหภูมิสูงมีข้อดีคือ ทำให้อัตราการทำงานของเอนไซม์สูง และลดโอกาสการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ดังนั้นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูง จะช่วยลดค่าใช้จ่ายหากนำมาประยุกต์ใช้ย่อยสลายไคตินในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ทั้งนี้มียารายงานที่แสดงว่าโปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ สามารถถูกนำมาปรับเปลี่ยนให้มีลักษณะต่าง ๆ กันได้อย่างหลากหลาย แล้วนำไปคัดเลือกหาคุณสมบัติใหม่ที่ต้องการ (Arnold and Volkov, 1999) วิธีนี้จึงเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพและน่าสนใจในการปรับปรุงเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นทั้งในด้านความสามารถในการจับกับสารเข้าทำปฏิกิริยา หรือความสามารถในการทำกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ ทั้งนี้เอนไซม์ chitinase ที่ผลิตขึ้นและขายในท้องตลาดนั้นไม่มีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูงและทำงานได้ดีในสภาวะกรด อีกทั้งในเมืองไทยยังไม่มีการค้าเลือกเชื้อที่สามารถทนสภาวะกรด pH 3.0 ได้ในประเทศไทย ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีการกำกับวิวัฒนาการมาปรับปรุงให้มีคุณสมบัติตามที่ได้กล่าวไว้แล้วในช่วงต้นนั้นจึงมีประโยชน์ต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารทะเลในแง่การนำกากของเหลือมาใช้ให้เกิดมูลค่าเพิ่ม ส่งเสริมให้เกิดรายได้เพิ่มและลดปัญหาการสะสมกากของเหลือจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล

๒.๓ วิธีการดำเนินการวิจัย

๒.๓.๑ การคัดหาแหล่งของเอนไซม์ chitinase

ทำการศึกษาข้อมูล และค้นหาแบคทีเรียที่จะเป็นต้นแบบในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส โดยเน้นจากการค้นหาจากแหล่งเก็บเชื้อ (culture collection) ทั่วโลกที่ได้มีการบ่งชี้สายพันธุ์ไว้ชัดเจนแล้ว รวมทั้งทำการค้นคว้าจากเอกสารทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับเอนไซม์นี้ ที่ได้รับการตีพิมพ์ทั่วโลก

๒.๓.๒ การสกัดแยกยีนที่สร้างเอนไซม์ และการโคลนเข้าไว้ในพลาสมิดที่เหมาะสม

ทำการสกัดแยกยีนด้วยวิธี PCR หรือโดยทำการออกแบบ primers เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนจากข้อมูลของยีนของแบคทีเรียหรือรา ที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล Genbank จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิดสำหรับการผลิตโปรตีนในแบคทีเรียที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ pFLAG-CTS และ pET-21d(+) (Yamabhai et al., 2011)

๒.๓.๓ การพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ chitinase เพื่อปรับใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

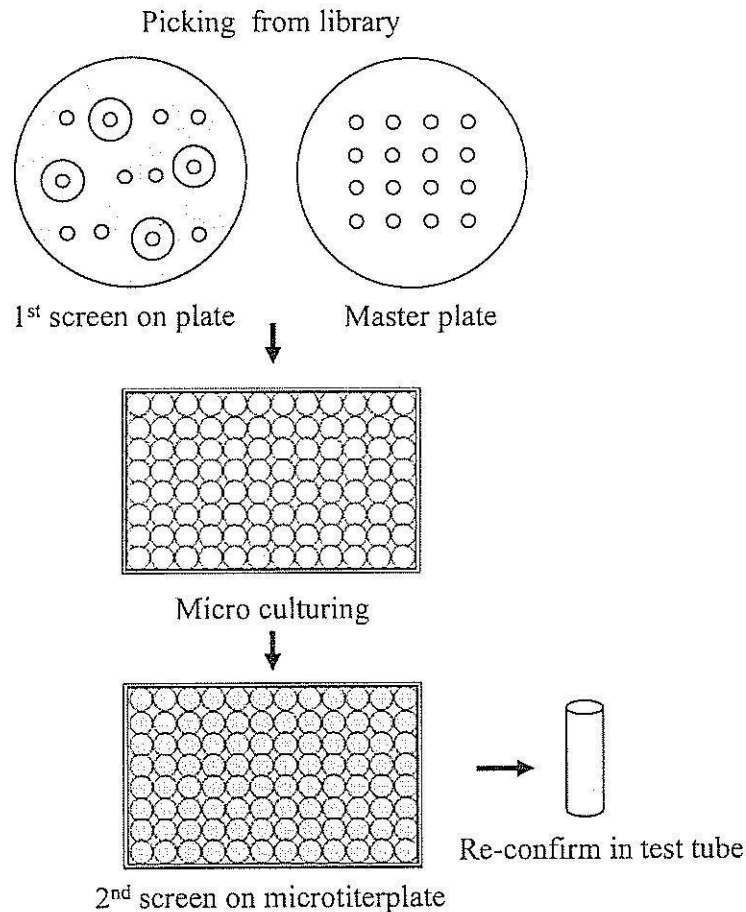
ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำการแสดงออกของยีนเอนไซม์ไคตินเนสให้ได้ในปริมาณมาก และทำงานได้ดี ที่สุด โดยทำการปรับตัวแปรต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของ IPTG, ระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ โดยจะตรวจสอบทั้งเอนไซม์ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วน periplasm และ cytosol ตามแนวทางที่ได้พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย (Yamabhai et al., 2008)

๒.๓.๔ ทำการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ด้วยวิธีการสลับสับเปลี่ยน ดีเอ็นเอ (DNA Shuffling)

หลังจากที่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแสดงออกยีนของเอนไซม์ chitinase ได้แล้ว จึงทำการใช้เทคโนโลยี directed evolution ในการปรับปรุงเอนไซม์ให้ทำงานได้ดีขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด (pH 3) โดยใช้วิธีการ DNA shuffling ในการสร้างความหลากหลายของยีน โดยจะต้องทำการหา protocol ที่มีประสิทธิภาพสูงในการประเมินคุณสมบัติเอนไซม์แบบ high-throughput ก่อน (รูปที่ ๕) จากนั้นจึงทำการคัดหาเอนไซม์ แล้วจึงศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ปรับปรุงขึ้นมาเทียบกับเอนไซม์ตั้งต้น

๒.๓.๕ ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมา

ขั้นตอนนี้เป็นการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยวิธีการ immobilized metal affinity chromatography (IMAC) เนื่องจากเอนไซม์ที่จะพัฒนาขึ้นจะทำการตัดต่อให้มีกรดอะมิโน histidine ๖ ตัวเชื่อมอยู่ที่ส่วนท้าย (carboxy terminal) ทั้งนี้เพื่อประเมินความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม โดยจะทำการศึกษาคุณสมบัติด้วยการใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ (bioinformatics) และวิธีการทางชีวเคมี เพื่อหา น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ความสามารถในการแตกตัว (isoelectric point) ความเหมือนกับเอนไซม์อื่น (sequence alignment) ผลของอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดต่อความสามารถในการทำกิจกรรม คุณสมบัติทางพลจลศาสตร์ (kinetics) รวมทั้งการตรวจสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย chitin ด้วยวิธีการ thin layer chromatography



รูปที่ ๕ ขั้นตอนการคัดหาเอนไซม์แบบ high-throughput ที่ได้พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัยนี้

วิธีการทดสอบ activity ของเอนไซม์หลังจากที่ได้สร้างคลังสายพันธุ์ของเอนไซม์ขึ้นมาแล้ว คือการนำไป คัดหา ๒ ขั้นตอน ขั้นแรกเป็นการคัดหาบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี substrate ของ chitinase จากนั้นจึงเลือกเฉพาะตัวที่ยัง ทำงานได้มาเลี้ยงในหลุมเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก แล้วนำไปตรวจ activity ใน microtiter plate เมื่อได้ hit หรือตัวที่มีค่า OD หรือ activity สูงขึ้นแล้ว ต้องทำการยืนยันผลโดยการเลี้ยงปริมาณในหลอดทดลองต่อไป

บทที่ ๓ ผลการวิจัย

๓.๑ ผลการวิจัย เกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี Directed Evolution ในการพัฒนาเอนไซม์ chitinase

รายงานผลการวิจัยนี้นำเสนอในรูปแบบรายงานการตีพิมพ์ในวารสาร Biotechnology Journal ซึ่งเป็นวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มีต้องผ่านการกลั่นกรองโดยผู้ทรงคุณวุฒิ ซึ่งเพิ่งออกมาใหม่ ได้รับการยอมรับให้อยู่ในฐานข้อมูล Thomson-Reuters ISI/SCIE Web of Science เมื่อเดือน มกราคม ๒๕๕๓ มีค่า impact factor อย่างไม่เป็นทางการ 2.1 โดยข้าพเจ้าเป็นผู้เขียนหลัก (corresponding author)

Songsirithigul, C., Pesatcha, P., Eijsink, V.G., Yamabhai, M., (2009) Directed evolution of a *Bacillus chitinase*. *Biotechnol J* 4, 501-509.

ผู้ซึ่งลงมือทำงานวิจัยนี้คือ ดร. ชมกฤษ สงศิริทธิกุล และ นางสาวปณทริกา เกศัชชา โดยส่วนหนึ่งของผลงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทของ ปณทริกา ด้วย ผลงานนี้เป็นรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคการกำกับวิวัฒนาการ หรือ directed evolution ในการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ chitinase จากแบคทีเรียให้มีคุณสมบัติดีขึ้น โดยในที่นี้คือการทำให้สามารถทนสภาวะที่เป็นกรด (pH 3.0) ได้ดีขึ้น เพราะในขั้นตอนการสกัดโคตินจากเปลือกกุ้งนั้น มีขั้นตอนที่ต้องใส่กรดลงไป ดังนั้นถ้าเอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นที่สภาวะนี้ จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย แต่ที่สำคัญที่สุดคือการแสดงให้เห็นว่าผู้วิจัยสามารถนำเทคโนโลยี directed evolution และ DNA shuffling ซึ่งเป็นเทคโนโลยีขั้นสูงและสมัยใหม่ มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเอนไซม์ chitinase ได้ในระดับหนึ่ง โดยผู้วิจัยได้คิดค้นวิธีการคัดหาเอนไซม์แบบ high-throughput ซึ่งเริ่มต้นตั้งแต่การพัฒนาระบบการแสดงออกของเอนไซม์ที่เหมาะสม และสามารถปรับใช้เพื่อการผลิตแบบ high-throughput ได้ รวมทั้งได้พัฒนาวิธีการในการคัดหาเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดีขึ้นแบบ high-throughput ด้วย โดยทำเป็น ๒ ชั้น ในขั้นแรกทำการคัดหาบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีสารตั้งต้นของเอนไซม์ก่อน จากนั้นจึงทำการวัด activity ของเอนไซม์ใน microtiter plate ขั้นตอนการวิจัยเริ่มตั้งแต่การสร้างคลังเอนไซม์ที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งต่างๆ โดยวิธีการ error-prone PCR โดยใช้ชิ้นของเอนไซม์ chitinase จากเชื้อ *B. licheniformis* DSM13 และ DSM8785 เป็นยีนตั้งต้น จากนั้นจึงนำยีนทั้งหมดมาผสมรวมกันอีกทีด้วยวิธีการ DNA shuffling แล้วจึงนำไปแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* Top10 เพื่อทำการคัดหาเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ผลการวิจัยพบว่าผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการปรับปรุงเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติดีขึ้นด้วยเทคโนโลยีนี้ ดังรายละเอียดในผลงานตีพิมพ์ที่ปรากฏในหน้าต่อไป (๕ หน้า)

Research Article

Directed evolution of a *Bacillus* chitinase

Chomphonuch Songsirithigul¹, Putarika Pesatcha², Vincent G.H. Eijsink³ and Montarop Yamabhai²

¹ National Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, Thailand

² School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

³ Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway

Chitinases have potential in various industrial applications including bioconversion of chitin waste from crustacean shells into chito-oligosaccharide-based value-added products. For industrial applications, obtaining suitable chitinases for efficient bioconversion processes will be beneficial. In this study, we established a straightforward directed evolution method for creating chitinase variants with improved properties. A library of mutant chitinases was constructed by error-prone PCR and DNA shuffling of two highly similar (99% identical) chitinase genes from *Bacillus licheniformis*. Activity screening was done in two steps: first, activity towards colloidal chitin was screened for on culturing plates (halo formation). This was followed by screening activity towards the chitotriose analogue *p*-nitrophenyl- β -1,4-*N,N'*-diacetyl-chitobiose at various pH in microtiter plates. From a medium-throughput screening (517 colonies), we were able to isolate one mutant that demonstrated improved catalytic activity. When using *p*-nitrophenyl- β -1,4-*N,N'*-diacetyl-chitobiose as substrate, the overall catalytic efficiency, k_{cat}/K_m of the improved chitinase was 2.7- and 2.3-fold higher than the average k_{cat}/K_m of wild types at pH 3.0 and 6.0, respectively. The mutant contained four residues that did not occur in either of the wild types. The approach presented here can easily be adopted for directed evolution of suitable chitinases for various applications.

Received 11 October 2008

Revised 19 November 2008

Accepted 17 December 2008

Keywords: *Bacillus licheniformis* · Chitinase · Directed evolution · DNA shuffling · Error-prone PCR

1 Introduction

Chitinases (EC 3.2.1.14) belong to glycosyl hydrolase (GH) family 18 and 19 [1]. They comprise a group of enzymes that hydrolyze chitin by cleaving its β -1,4 *N*-glycosidic bond. Endochitinases cleave randomly at internal sites of chitin, generating soluble low mass multimers of GlcNAc such as chitotetraose, chitotriose, and chitobiose [2, 3]. Chitinases have potential in various industrial applications, including degradation of chitin into chi-

tooligosaccharides of different lengths, which are useful in food and pharmaceutical applications [4, 5]. In Thailand, crustaceans (prawn, crab, shrimp, and lobster) constitute one of the main agricultural products and they represent an abundant source of chitinous co-products. Traditional methods for chitin waste disposal include landfill, incineration, and ocean dumping. These methods are costly, inefficient, and, most importantly, harmful to the environment. An alternative method for the exploitation of chitin-rich co-products is using enzymes to convert the chitin into useful products [6]. The process of extracting chitin from crustaceans requires the use of HCl to extract minerals and NaOH to degrade proteins [7]. Thus, obtaining chitinases that are active under acidic or alkaline conditions, in addition to being stable and thermo-tolerant, will be beneficial for the exploitation of these enzymes in industrial applications.

Recent advances in molecular biology and genetic engineering have led to rapid methods for im-

Correspondence: Professor Montarop Yamabhai, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
E-mail: montarop@sut.ac.th
Fax: +66-44-224150

Abbreviation: GlcNAc, N-acetylglucosamine; GH, glycosyl hydrolase; *p*-NP-(GlcNAc)₂, *p*-nitrophenyl- β -1,4-*N,N'*-diacetyl-chitobiose; ChBD, Chitin binding domain; FnIII, fibronectin type III domain

proving protein and enzyme properties [8]. One current technology, termed directed evolution, mimics the natural selection process, where genes are evolved through recursive rounds of mutation, recombination, and selection [9]. One of the most efficient methods used to direct the evolution of proteins is DNA shuffling [10]. This method allows a much larger spectrum of diversity to be generated than by natural recombination or mutational mechanisms, because two or more homologs from multiple species in different ratios are used for recombination [11, 12]. Successful applications of DNA shuffling and other directed evolution techniques for the improvement or alteration of proteins and enzymes for various purposes have been reported [9, 13]. Application of this technology for the improvement of chitinases for bioremediation and bioconversion of chitin waste is attractive. One of the key issues is to develop methods that permit high-throughput screening of chitinase properties at reasonable costs.

In this study, we have established a simple screening method that permits relatively straightforward directed evolution of chitinases. The method uses FLAG vectors that direct secretion of the chitinase. For testing the method we used a *Bacillus* chitinase for which we previously demonstrated efficient expression and secretion in *E. coli* [14]. Starting off with two almost identical chitinase genes (*chiA*) from *Bacillus licheniformis* (strains DSM13 and DSM8785), a mutant library was constructed by a combination of error-prone PCR and DNA shuffling. To demonstrate the feasibility of the method, we performed a medium-throughput screening, which yielded one mutant with improved catalytic activity.

2 Materials and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

B. licheniformis DSM13/ATCC 14850 [15], and DSM8785, which were used as the templates for chitinase genes, were obtained from American Type Culture Collection and Prof. Dietmar Haltrich, respectively. The bacteria were grown and kept in M1 medium at 30°C. *E. coli* strains TOP10 were used as a host for library construction and protein expression. *E. coli* strains were cultured in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with shaking.

2.2 Construction of mutant chitinase library

2.2.1 Error-prone PCR

Error-prone PCR was performed according to a published protocol [16]. Recombinant chitinase genes from *B. licheniformis* strain DSM13 and DSM8785 (*chiA13*, GenBank accession number AAU21943, & *chiA8785*, GenBank accession number FJ465148, respectively) [14] were used as the templates to amplify the chitinase genes under conditions promoting misincorporations of nucleotides. The PCR reaction mixtures consisted of 10 ng DNA template, dNTPs (New England Biolabs) at concentrations of 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 1.0 mM dCTP, 1.0 mM dTTP, 2.9 mM MgCl₂, 0.15 mM MnCl₂, 5 U Taq DNA polymerase (New England Biolabs), 1× Taq DNA polymerase buffer, and 0.3 μM of each of the primers: *chiHind3* (5'-CTG TGC AAG CTT TTG TCA TGT TGC TGA GCT TGT CAT TTG-3') and *chiXhoI* (5'-CTG TGC CTC GAG TCC ATT TGA CTT TCT GTT ATT CGC AGC CTC-3'). The reactions were run in a PCT-200 Peltier Thermo cycler (MJ Research). Preheating at 95°C for 2 min was followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 50 s, and extension at 72°C for 2 min, with final extension at 72°C for 10 min. The products (designated Er13 and Er8785) were verified for correct size on an agarose gel, and purified using the QIA PCR purification Kit (Qiagen).

2.2.2 DNA shuffling

The second part of evolution involved the shuffling of the mutant genes from the first step according to Joern J.M [17]: approximately 5 μg of each PCR product (Er13 and Er8785) were digested with 0.1 U DNaseI (Fermentas) in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MnCl₂ at 15°C for 7 min. The reaction was terminated by addition of ice-cooled 0.5 M EDTA pH 8.0. The DNA fragments sizes between 25 and 250 bp (designated DNaseEr13 and DNaseEr8785) were isolated from the polyacrylamide gel, following the Crush and Soak method [18]. Fragment reassembly and PCR amplification of reassembled products were done according to previously published protocol [19]. The purified SH13/8785 products were then cloned into the pFLAG-CTS vector and the constructs were transformed into *E. coli* TOP10 by electroporation as described by Sambrook and Russell [18], using an Electroporator 2510 (Eppendorf, Germany). The cloning of the library of mutant chitinases was done such that the mature enzymes were fused with *E. coli* OmpA signal peptide of the pFLAG-CTS (sigma) expression vector, as described previously [14].

2.3 Medium-throughout screening of mutant chitinases

2.3.1 First round screening on plate

E. coli transformants carrying a library of SH13/8785 genes were grown in parallel on two types of LB agar plates containing 100 µg/mL of ampicillin and 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The screening plate contained 0.2% colloidal chitin, whereas the master plate did not. After incubating the plates at 37°C for 18 h, 0.2% Congo Red (Sigma) was poured onto the screening plate. Colonies that produced clear zones (positive clone) were selected for a second round screening. *E. coli* carrying pFLAG-CTS constructs with the wild-type genes (pFchi13 and pFchi8785) and the pFLAG-CTS vector, were used as positive and negative controls, respectively. Chitinase-positive clones were picked from the master plate to produce 15% glycerol stocks, which were kept at -20°C for further analysis.

2.3.2 Second round screening in microtiter plate

The positive colonies from the first round of screening, as well as the two positive controls and the negative control were inoculated into 0.5 mL LB medium containing 100 µg/mL ampicillin in 96-deep well plates (Eppendorf, Germany), and incubated at 37°C with shaking. After 6 h of incubation, enzyme production was induced by adding 0.5 mL LB medium containing 100 µg/mL ampicillin and 2 mM IPTG (final concentration was 1 mM). After another 16 h of incubation at 37°C with shaking, the cultures were chilled in an icebox for 5 min and then centrifuged at 4000 rpm for 20 min at 4°C to collect the cells. The cells were resuspended in 50 µL cold (4°C) spheroplast buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM sucrose, and 20 µg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSE). After incubation for 5 min on ice, bacterial cells were collected by centrifugation at 4000 rpm at 4°C for 20 min and re-suspended in 25 µL cold sterile water supplemented with a protease inhibitor (PMSE, from Sigma). The cell suspension was incubated for 45 s on ice and subsequently mixed with 1.67 µL 20 mM MgCl₂. This procedure yielded a periplasmic extract of nearly 60 µL that was collected by centrifugation at 4000 rpm at 4°C for 20 min. To measure catalytic activity in microtiter plates (Nunc, Denmark), 10 µL periplasmic fraction was added to 100 µL 0.18 mM *p*-NP-(GlcNAc)₂ in 50 mM buffer (glycine-HCl, pH 3.0; sodium phosphate, pH 6.0, and glycine-NaOH, pH 10.0) and the mixture was incubated at 37°C for 1 h. The enzyme reaction was terminated by adding 10 µL 1 N NaOH, and the amount of *p*-nitrophenyl released from *p*-

NP-(GlcNAc)₂ was measured by recording the absorbance at 405 nm. Control measurements showed that the wild-type enzymes converted less than 20% of the substrate under these conditions.

2.4 Chitinase expression and purification

To avoid artifacts, the screening and selection procedure was done using ChiA without any affinity tag. To purify ChiA variants, the wild-type and 128mt genes were fused to a C-terminal His-tag and inserted into the pFLAG-CTS expression vector by PCR cloning using chiHind3 and chi6HXho (5'-GCA CAG CTC GAG TCA GTG GTG GTG GTG GTG TTC GCA GCC TCC GAT CAG CCG CC-3') as primers. The reverse primer contains a hexahistidine tag for affinity purification of the recombinant ChiA. The PCR thermal profile consisted of an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 30 cycles of 95°C for 45 s, 56°C for 55 s, and 72°C for 2 min, followed by final extension step at 72°C for 10 min. The constructs were transformed into *E. coli* Top10. Transformants containing the correct constructs were cultured in LB medium overnight before transferring into 500 mL LB medium containing 100 µg/mL ampicillin. After culturing at 37°C until OD₆₀₀ reached 1.0, cells were induced with IPTG at a final concentration of 1 mM, followed by further culturing at 28°C for 4 h. The cells were then harvested by centrifugation at 8000 rpm at 4°C for 20 min. Crude enzyme was prepared from bacterial cells by resuspending in 1–2 mL lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 10 mM imidazole, pH 8.0), followed by sonication (Ultrasonic Processor; 60 amplitude, pulses of 6 s, for 2 min) on ice. The cell debris was then spun down at 10 000 × *g* and the supernatant was collected as the cell lysate. The supernatant containing soluble chitinase was used for further purification using Ni-NTA resins according to Qiagen's protocol. The resin was washed with washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 40 mM imidazole, pH 8.0), and eluted with elution buffer containing 250 mM imidazole. Fractions containing eluted chitinase were pooled and concentrated using Vivaspin membrane concentrators (MW cut-off 30 000). Concentrated enzyme solutions were divided into aliquots and kept at -20°C in sodium phosphate buffer, pH 6.0 containing 15% glycerol for further analysis.

2.5 Chitinase assay

To determine kinetic parameters, enzyme reactions were set up consisting of 0.4 µg pure enzyme and 0.008–0.7 mM of the substrate, *p*-NP-(GlcNAc)₂, in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), with a

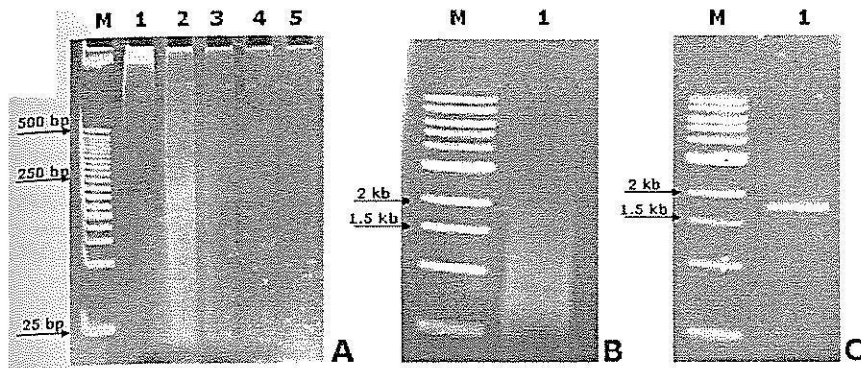


Figure 1. DNA shuffling of ChiA. Error-prone PCR products of ChiA genes from *B. licheniformis* strain DSM13 and DSM8785 were shuffled together. (A) The results of DNaseI digestion at various concentrations; M, 25-bp DNA ladder; 1, DNaseI 0.0 U/μg; 2, DNaseI 0.02 U/μg; 3, DNaseI 0.04 U/μg; 4, DNaseI 0.07 U/μg; and 5, DNaseI 0.5 U/μg. (B) Products after reassembly using Pfu DNA polymerase. (C) The shuffled ChiA genes (1.7-kb band) that have been amplified by PCR in the presence of specific primers.

total volume of 100 μL, unless otherwise stated. After incubation at 37°C for 30 min, the reaction was terminated by adding 10 μL 1 N NaOH, and the amount of *p*-nitrophenol released from *p*-NP-(GlcNAc)₂ was measured by recording absorbance at 405 nm, using a standard curve for pNP. Before determining the kinetic parameters, it was established that product formation was linear over time under the conditions of this assay. Reaction conditions were such that the amount of substrate converted was below 20% of the total amount of substrate added, at all substrate concentrations used in this study. The values of the kinetic constants were calculated from the Michaelis-Menten plot using a non-linear curve fitting method (GraphPad Prism 5).

3 Results

3.1 Construction of a library of mutant chitinases

Since *chiA* genes from *B. licheniformis* DSM 13 and DSM 8785 were highly similar with only five base pairs and three amino acid differences, we decided to create more diversity in the population of the genes by error-prone PCR before DNA shuffling. The *chiA* genes [14] were first cloned into the pFLAG-CTS vector and used as templates for error-prone PCR, using low fidelity buffer conditions. DNA sequence analysis of a population of the PCR products revealed that the mutation rate was approximately 0.3% (which would correspond to about five point mutations for the *chiA* gene). The mutations comprised all types of substitutions (*i.e.*, A→G, G→A, T→C, and C→T) and were distributed over the entire gene. Testing of chitinase activity in ten randomly picked clones yielded both variants where the catalytic activity was completely lost and variants that were still active. For example, one variant without chitinase activity had four substitutions (Glu157Gly, Ser193Asp, Ala216Val, and

Pro565Ser). These observations suggest that the error-prone PCR had worked well and could be used to generate diversity in the enzyme library.

After the error-prone PCR, a library of mutant chitinase genes was created by DNA shuffling, as described in Materials and methods. Results from the key steps in this procedure are depicted in Fig. 1. The shuffled genes were cloned into pFLAG-CTS, where they are fused to the *E. coli* OmpA signal peptide that directs secretion to the periplasmic space [14]. This greatly facilitates the screening process in the next step.

3.2 Screening for improved chitinases

In the primary screening, chitinase activity was tested by plating transformants on LB agar plates containing 0.2% colloidal chitin (Fig. 2). Approximately 60% of the colonies (293 clones) showed en-

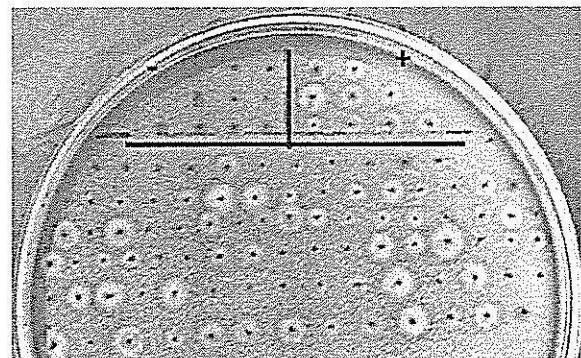


Figure 2. Primary screening on agar plate. *E. coli* transformants were arrayed on an LB/ampicillin plate containing 0.2% colloidal chitin. Colonies producing active chitinases show a clearing zone, after staining with 0.2% Congo Red. Positive (+) and negative (-) controls were plated in the triangles in the upper right and the upper left part of the plate, marked with + and -, respectively. Note that the colonies of the positive control (all expressing the wild-type pFchi8785) show different halo sizes, indicating that there is a limited correlation between halo size and enzyme-specific activity.

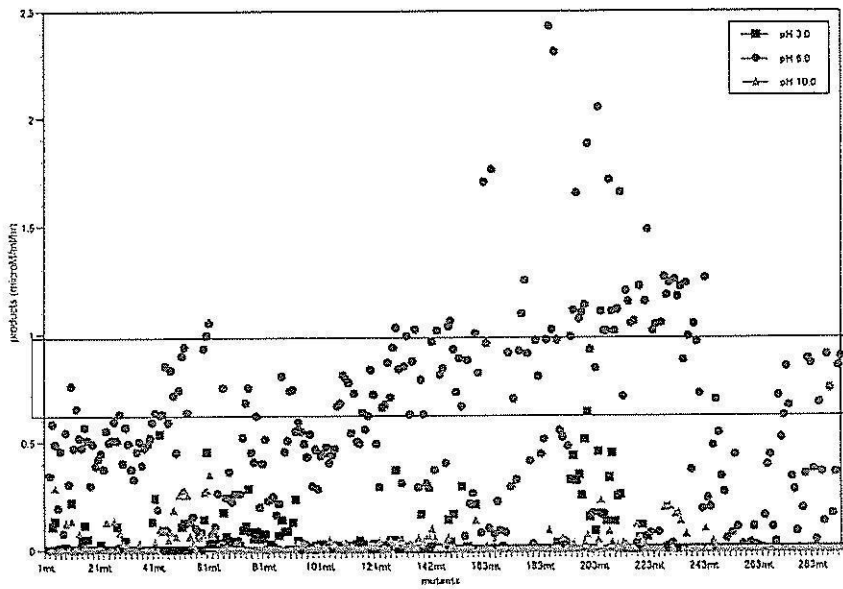


Figure 3. Secondary screening in microtiter plates. Chitinase activity was measured for 293 variants, at three different pH values, using *p*-NP-(GlcNAc)₂ as substrate. Activities are expressed as total product release per hour (μM/mL/h). Squares, pH 3; circles, pH 6.0, triangles, pH 10.0. The box indicates the range of activities measured at pH 6.0 for clones expressing the wild-type enzymes (in total 293 samples of each of the two wild-type enzymes were analyzed). Only trace amount of enzyme activity of the wild-type enzymes could be detected at pH 3.0 (0.042 μmol/mL/h), or pH 10.0. (0.030 μmol/mL/h).

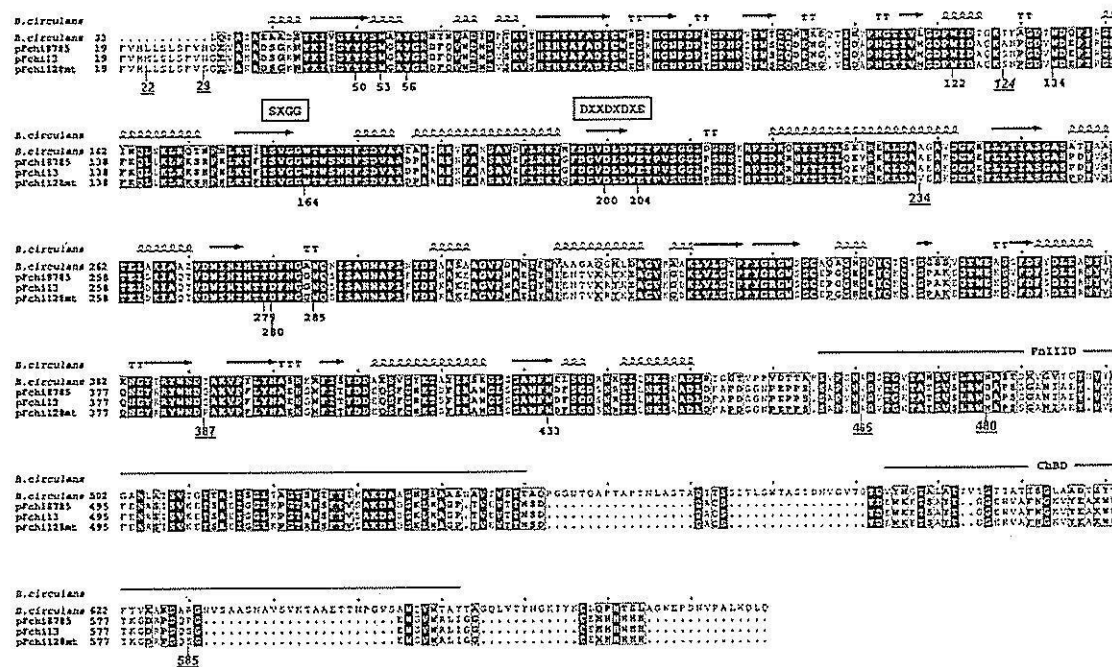


Figure 4. Amino acid sequence alignment of wild-type and mutant *B. licheniformis* chitinases and ChiA1 from *B. circulans*. The picture shows the sequences of recombinant wild-type ChiA from *B. licheniformis* strains DSM13 (pFchi13) and DSM8785 (pFchi8785) and of the selected mutant pFchi128mt. The sequence of the catalytic domain is annotated for secondary structure using the 3-D structure of the catalytic domain of ChiA1 from *B. circulans* as a template [27]. α helices and β strands are displayed as squiggles and arrows, respectively. TT and TTT indicate turns. Fully conserved residues are printed as white characters on black background. Similar but not fully conserved residues are boxed. The amino acid sequences of the three *B. licheniformis* chitinases start with the remaining part of the (predicted) leader peptides [see [14] for further details]. Residues that have been reported to be important for catalytic activity of this type of enzymes are numbered without underline [26, 28–31], according to the numbering of the *B. licheniformis* enzymes. Two diagnostic sequence motifs are shown in boxes, above the sequence. The mutated residues in 128mt are marked by underlined sequence numbers. Residues that are different between the two wild-type enzymes are marked by underlined sequence numbers in italics. ChBD and FlnIII indicate the chitin binding domain and the fibronectin type III domain, respectively, as predicted by Pfam, [32]). The sequence alignment was made using CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment software [33], then ESPrnt [34] was linked to display the secondary structure of the template selected (*B. circulans* ChiA1; pdb code; 1ITX).

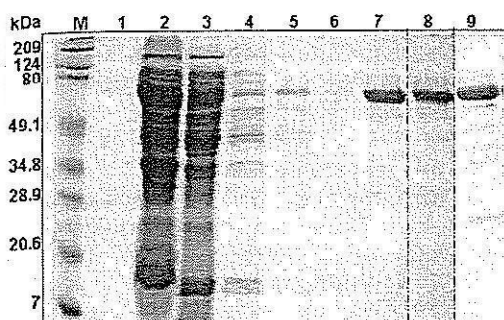


Figure 5. Expression and purification of recombinant chitinases. The picture shows SDS-PAGE gels stained by Coomassie. All lanes concern purification of pFchi13, unless stated otherwise. M, size markers; 1, culture supernatant; 2, cell lysate; 3, flowthrough; 4–6, 40 mM imidazole wash; 7, eluted pFchi13; 8, eluted pFchi8785; 9, eluted pFchi128mt.

zymatic activity as indicated by the appearance of a clearing zone. Repetitive plating of the positive controls showed considerable variation in halo sizes (Fig. 2), indicating that the halo radius only gave limited quantitative information about activity (enzymes purified from cultures inoculated with wild-type colonies giving large or small clearing zones had identical specific activities; data not shown).

After the primary screening, 293 positive clones were picked from agar plates and subjected to secondary screening in microtiter plates at three different pHs (3.0, 6.0, and 10.0). The results from the secondary screening are shown in Fig. 3. Since obtaining an enzyme with activity at low pH was most interesting for our application, we picked five clones from the three plates that showed relatively high activity at pH 3.0 (43mt, 128mt, 197mt, 199mt, 204mt). These clones were cultured in 10 mL LB supplemented with ampicillin to confirm enzyme activity. Enzyme preparations, obtained from cell lysates, prepared as described in Materials and methods, were then used to study specific activity towards colloidal chitin at pH 3.0. Whereas four of

the enzymes showed wild-type activity, one (128mt) could hydrolyze colloidal chitin better than the wild-type at pH 3.0 (approximately three times faster), while showing near wild-type activity at pH 6.0. The 128mt clone contained five residues that differed from both of the wild types: Ser29 (Asn), Val234 (Ala), Arg387 (Gln), Ala465 (Val) and Asn480 (Asp). Two of these mutations (A234V and Q387R) are in the catalytic domain, two are located in the fibronectin type III domain (FnIII) (V465A and D480N) and one (N29S) is located in the remaining part of the N-terminal signal peptide of the chitinase (see legend to Fig. 4 and below for further discussion).

3.3 Analysis of an improved enzyme

To further characterize the potentially improved enzyme, genes encoding the two wild-type ChiA from *B. licheniformis* strains DSM13 and DSM8785, and the gene encoding the 128mt mutant were subcloned into a pFLAG-CTS expression vector such that a hexa-histidine tag was fused to the C terminus of the enzyme. These recombinant chitinases were designated pFchi8785, pFchi13, and pFchi128mt. All recombinant enzymes could be over expressed and affinity purified using Ni-NTA column chromatography to apparent homogeneity as shown in Fig. 5. Both wild-type and mutant chitinases showed optimal activity in the temperature range of 45–60°C, and had an optimal pH for activity at 6 (data not shown), indicating that the mutant generally had properties similar to those of the wild-types. To elucidate in more detail the properties of each enzyme, Michaelis-Menten type kinetic parameters were determined using *p*-NP-chitobiose as a substrate (Table 1). Kinetic parameters were determined from a subset of the data spanning the 0.008–0.18 mM substrate concentration range because substrate inhibition became apparent at higher substrate concentrations (as is quite

Table 1. Kinetic parameters of wild-type chitinases and the selected mutant, determined with *p*-nitrophenyl-chitobiose as a substrate^{a)}

Enzyme	K_m (mM)	V_{max} (mM/min)	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m s^{-1}/mM
pH 3.0				
pFchi13	0.10±0.004	0.15±0.004	0.17±0.004	1.69±0.024
pFchi8785	0.11±0.025	0.12±0.033	0.14±0.037	1.36±0.667
128mt	0.06±0.001	0.21±0.059	0.23±0.067	4.10±1.240
pH 6.0				
pFchi13	0.06±0.011	0.38±0.113	0.43±0.126	7.55±0.745
pFchi8785	0.03±0.003	0.28±0.063	0.31±0.070	10.30±3.236
128mt	0.03±0.001	0.59±0.172	0.65±0.191	19.40±4.578

^{a)} Assays were carried out as described in material and methods. The SDs were determined from four independent experiments.

common for this type of chitinases [20, 21]). Kinetic analysis revealed that the 128mt mutant was more effective in hydrolyzing *p*-NP-chitobiose than the wild-type enzymes at both at pH 6.0 and 3.0. The overall catalytic efficiency, $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ of 128mt was approximately 2.7- and 2.3-fold higher than the average value for the wild-type enzymes at pH 3.0 and 6.0, respectively. Table 1 also shows that the two wild-type enzymes have similar properties. The difference between 128mt and each of the wild types is larger than the difference between the wild types.

4 Discussion

An efficient method for directed evolution of chitinases has been established by taking advantage of the ability to secrete *Bacillus* hydrolytic enzymes into the culture medium [14]. Secretion of the chitinases allowed the use of a simple, cheap agar-plate-based first screening step for pre-selection of active enzyme variants only. This pre-screening reduces the number of more laborious microtiter-plate-based enzyme assays required subsequently. Access to such a pre-screen also facilitates the use of higher mutation frequencies, since inactive mutants are discarded before expensive enzyme assays are run. It is important to note that we found that the halo size did not correlate well with enzyme activity, whereas the size of the clearing zone has been used successfully for estimating enzyme activity in other publications [22, 23]. The different sizes of the clearing zones could simply be the result of differences in the expression and/or secretion levels that are caused by local variation on the (hand-picked) plates or the size of the inocula. Thus, the simple plate assay described here was only used to discard clones that did not show any activity at all. In the second screening we use a microtiter-plate-based assay that allowed us to screen for enzyme activity at three different pH values. Clearly, this screening procedure not only identifies improved variants, but is also affected by mutational effects on and variation in protein expression and/or secretion. Therefore, clones that seemed most promising in the microtiter-plate-based screen were cultured on a larger scale and a more optimal temperature with respect to expression for further analysis. This led to selection of one clone producing an improved chitinase as proven by subsequent kinetic characterization. The measurement of enzyme activity in microtiter plates has a number of advantage, mainly because many enzyme properties can be screened for at the same time, as demonstrated in this report, where catalytic

activity at both high and low pH could be screened for simultaneously. However, a limitation of the microtiter plate assay is that the plate is not resistant to high temperature or certain organics solvent, unless special plates are used [24].

Since the two starting genes were highly similar (Fig. 4), and since the two wild-type enzymes have similar properties (Table 1), there was no *a priori* reason to include DNA shuffling into the protocol for diversity generation. We included this step to demonstrate that it could be implemented in the new method for directed evolution of chitinases that we present. Interestingly, the selected mutant, 128mt, is in fact most likely the result of shuffling of the two wild-type genes (see Fig. 4; residue 22 in 128mt comes from DSM8785, whereas residues 124 and 585 come from DSM13) as well as from the changes introduced through error-prone PCR.

The chitinases used in this study belong to glycosyl hydrolase family 18 [25] for which there is ample structure-function information, at least for the catalytic domain. Thus, it is easy to get an impression of the approximate structural location of the selected mutations by simply aligning the sequence of the *B. licheniformis* enzymes with a structure-based alignment of family 18 chitinases (as in for example Horn *et al.* [6]) or by aligning the *B. licheniformis* enzymes with the closely related chitinase ChiA1 from *B. circulans* for which the structure is known (Fig. 4). The 128mt mutant contains two mutations in the catalytic domain (A→V at position 234 and Q→R at position 387). Inspection of the ChiA1 structure showed that the A234V mutation affects the C-terminal end of helix four in the $(\beta/\alpha)_8$ barrel of the catalytic domain and is thus located on the side of the barrel that is opposite from the active site. Inspection of the ChiA1 structure further suggested that residue 234 may be involved in the interaction between helix four and helix three of the barrel and this interaction may be affected by the mutation. The other mutation, at position 387, is located in the so-called $\alpha+\beta$ domain that is inserted in the $(\beta/\alpha)_8$ barrel between strand seven and helix seven [26]. Residue 387 is likely to be positioned on the surface of the protein and point into solution on a side of the $\alpha+\beta$ domain that is not in contact with the substrate. Inspection of the ChiA1 structure suggested that a change from Gln (or Thr as in ChiA1) to Arg at this surface-located site far from the catalytic center would have no effects other than the charge difference. All in all, there are no obvious explanations for the observed mutational effects, as is often the case for mutants coming out of directed evolution experiments [23, 25, 33]. Probably, the changes in activity are caused by effects that are difficult to capture by

structural inspection, such as subtle long-range structural changes and changes in dynamics (conceivable for the Ala 234→Val mutation) or changes in long-range electrostatic effects (conceivable for the Gln 387→Arg mutation).

The 128mt variant also had two mutations (V465A and D480N) in the FNIII domain, which, remarkably, are the same amino acid substitutions found in ChiA1. *A priori*, mutations in the FNIII domain are not expected to affect activity towards the small oligomeric substrate pNP-chitobiose, but they may affect activity towards certain forms of chitin [31, 32]. Further studies are necessary to study whether this is the case. FNIII domains tend to interact strongly with the catalytic domains as shown by the crystal structure of chitinase A from *Serratia marcescens*, which has an FNIII domain coupled to the N terminus of the catalytic domain [26]. So, at least in the case of chitinase A, it is possible that mutations on the FNIII domain have subtle effects on the catalytic center itself and, thus, perhaps on activity towards pNP-chitobiose. Unfortunately, there is no such structural information for a family 18 chitinase with a C-terminally located FNIII that could shed light on the situation for the *B. licheniformis* enzymes.

Generally, rationalizing the outcome of directed evolution experiments is often difficult. Selected mutants with beneficial properties often contain several mutations with no obvious structural and functional implications. Clearly, the selection for non-obvious but useful mutations is one of the powers of directed evolution. The latter is also illustrated by the present study, where a simple and straightforward procedure for expression, mutation and selection of chitinases resulted in identification of a mutant with improved properties after screening less than 600 colonies only. The method described in this study can be used for directed evolution of chitinases and other hydrolytic enzymes in the future.

This research was supported by International Foundation for Science (IFS) grant F/3415-1, 2; National Research Council of Thailand (NRCT); National center for genetic engineering and biotechnology (BIOTEC); and Thailand Research Fund (TRF).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Coutinho, P. M., Henrissat, B. (Eds.), *Carbohydrate-Active Enzymes: An Integrated Database Approach*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1999.
- [2] Howard, M. B., Ekborg, N. A., Weiner, R. M., Hutcheson, S. W., Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 30, 627–635.
- [3] Koga, D., Mitsutomi, M., Kono, M., Matsumiya, M., Biochemistry of chitinases. *EXS* 1999, 87, 111–123.
- [4] Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R. K., Bacterial chitinases: Properties and potential. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2007, 27, 21–28.
- [5] Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G. S., Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 71, 773–782.
- [6] Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaae-Kolstad, G. et al., Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 18089–18094.
- [7] Hayes, M., Carney, B., Slater, J., Bruck, W., Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan. Part B. Applications. *Biotechnol. J.* 2008, 3, 878–889.
- [8] Williams, G. J., Nelson, A. S., Berry, A., Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, 61, 3034–3046.
- [9] Farinas, E. T., Bulter, T., Arnold, F. H., Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001, 12, 545–551.
- [10] Stemmer, W. P., DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 10747–10751.
- [11] Kurtzman, A. L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J. T. et al., Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: Applications to therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001, 12, 361–370.
- [12] Patten, P. A., Howard, R. J., Stemmer, W. P., Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8, 724–733.
- [13] Arnold, F. H., Volkov, A. A., Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, 3, 54–59.
- [14] Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P. et al., Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *J. Biotechnol.* 2008, 133, 50–57.
- [15] Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J. et al., The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 7, 204–211.
- [16] Cirino, P. C., Mayer, K. M., Umeno, D., Generating mutant libraries using error-prone PCR, in: Arnold, F. H., Gerogiou, G. (Eds.), *Directed Evolution Library Creation*, vol. 231. Humana Press, Totowa 2003, pp. 3–9.
- [17] Joern, J. M., DNA shuffling, in: Arnold, F. H., Gerogiou, G. (Eds.), *Directed Evolution Library Creation*, vol. 231. Humana Press; Totowa 2003, pp. 85–89.
- [18] Sambrook, J., Russell, D. W., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 3 edn, Cold Spring Harbor, New York 2001.
- [19] Zhao, H., Arnold, F. H., Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 1307–1308.
- [20] Brurberg, M. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 1996, 142, 1581–1589.
- [21] Synstad, B., Gaseidnes, S., Van Aalten, D. M., Vriend, G. et al., Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271, 253–262.

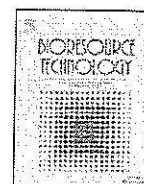
- [22] Fan, Y., Fang, W., Xiao, Y., Yang, X. *et al.*, Directed evolution for increased chitinase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, *76*, 135–139.
- [23] Lee, S. H., Ryu, E. J., Kang, M. J., Wang, E.-S. *et al.*, A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT). *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2003, *26*, 119–129.
- [24] Arnold, F. H., Georgiou, G. (Eds.), *Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods*. Humana Press, Totowa 2003.
- [25] Henrissat, B., Classification of chitinases modules. *EXS* 1999, *87*, 137–156.
- [26] Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B. *et al.*, Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 1994, *2*, 1169–1180.
- [27] Matsumoto, T., Nonaka, T., Hashimoto, M., Watanabe, T., Mitsui, Y., Three-dimensional structure of the catalytic domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 at a very high resolution. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 1999, *75*, 269–274.
- [28] van Aalten, D. M., Synstad, E., Brurberg, M. B., Hough, E. *et al.*, Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, *97*, 5842–5847.
- [29] Watanabe, T., Ariga, Y., Sato, U., Toratani, T. *et al.*, Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin. *Biochem. J.* 2003, *376*, 237–244.
- [30] Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T. *et al.*, Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J. Biol. Chem.* 1993, *268*, 18567–18572.
- [31] Watanabe, T., Uchida, M., Kobori, K., Tanaka, H., Site-directed mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 residues in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994, *58*, 2283–2285.
- [32] Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C. *et al.*, The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2008, *36* (Database issue), D281–288.
- [33] Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R. *et al.*, Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007, *23*, 2947–2948.
- [34] Gouet, P., Robert, X., Courcelle, E., ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2003, *31*, 3320–3323.

๓.๒ ผลการวิจัย เกี่ยวกับการพัฒนาและคุณสมบัติของเอนไซม์ chitinase จากเชื้อ *B. licheniformis*

รายงานผลการวิจัยนี้นำเสนอในรูปแบบรายงานการตีพิมพ์ในวารสาร Bioresource Technology ซึ่งเป็นวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มีต้องผ่านการกลั่นกรองโดยผู้ทรงคุณวุฒิ มีค่า impact factor โดย ISI = 4.253 คือ ซึ่งข้าพเจ้าเป็นผู้เขียนหลัก (corresponding author)

Songsiriritthigul, C., Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P., Yamabhai, M., (2010) **Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste.** Bioresour Technol 101, 4096-4103.

งานวิจัยนี้ทำโดยผู้ช่วยวิจัยหลายท่าน ได้แก่แก่นักวิจัยหลังปริญญาเอก คือ ดร. ชมภูษุช ส่งสิริฤทธิกุล โดยมีผู้ช่วยวิจัยคือ นางสาวศศิธร ลาบุญเรือง และนักศึกษาปริญญาโทอีก ๒ ท่านคือ นางสาวพรศิริ เพชรศรีช่วง และนางสาวปณทริกา เกสัชชว เป็นงานวิจัยศึกษาเอนไซม์ chitinase ที่สกัดได้มาจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* DSM 13 และ DSM 8785 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมหลายชนิด แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาเอนไซม์ chitinase จากเชื้อนี้มาก่อน งานวิจัยเริ่มต้นตั้งแต่การ ตรวจสอบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง ๒ สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase ได้ จากนั้น ทำการโคลนยีน chitinase ด้วยวิธีการ PCR แ ล้วนำยีนที่ได้ไปโคลนเข้าไปในพลาสมิดสำหรับการแสดงออกโดย *Escherichia coli* expression system ๒ แบบ จากนั้นทำการเปรียบเทียบและหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ และการทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ แล้วไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติต่างๆ ผลการวิเคราะห์พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้จำนวนมาก เอนไซม์มีคุณสมบัติทนความร้อน และทนความเป็นกรดต่าง ดี รวมทั้งมีค่าความสามารถในการทำกิจกรรมสูง เหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ดังรายละเอียดในผลงานตีพิมพ์ที่ปรากฏในหน้าต่อไป (๘ หน้า)



Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste

Chomphonuch Songsiritthigul^a, Sasithorn Lapboonrueng^{a,b}, Phornsiri Pechsrichuang^b,
Puntarika Pesatcha^b, Montarop Yamabhai^{b,*}

^a Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^b School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2009

Received in revised form 5 January 2010

Accepted 8 January 2010

Available online 4 February 2010

Keywords:

Chitinase

Bacillus licheniformis

Bioconversion

Chitin

Waste

ABSTRACT

Chitinase (EC 3.2.1.14) is an enzyme with multiple industrial applications. These include bioconversion of chitin waste, a highly resistant and abundant biopolymer from crustacean food industry, into glucosamine and chito-oligosaccharide value-added products. This paper reports on the expression of endochitinase (ChiA) from *Bacillus licheniformis* strain DSM8785 in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. Recombinant ChiA could efficiently convert colloidal chitin to *N*-acetyl glucosamine and chitobiose at pH 4.0, 6.0 and 9.0 at 50 °C and retained its activity up to 3 days under these conditions, suggesting that this enzyme is suitable for bioconversion of chitin waste.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chitin (β -1,4 linked *N*-acetylglucosamine) is the major structural polysaccharide in insects, crustaceans, and fungi; therefore, it is one of the most abundant biopolymers on earth. Each year, a vast amount of chitin waste is released from the aquatic food industry in Thailand, where crustaceans (prawn, crab, shrimp and lobster) constitute one of the main agricultural products. This creates a serious environmental problem, because chitin is very difficult to biodegrade (Hayes et al., 2008a,b). Chitinases (EC 3.2.1.14) are enzymes that hydrolyze chitin by cleaving its β -1,4 *N*-glycosidic bond (Coutinho and Henrissat, 1999; Fujita et al., 2006), and endo-chitinases cleave randomly at internal sites of chitin, generating soluble low mass multimers of GlcNAc such as chitotetraose, chitotriose, and chitobiose (Howard et al., 2003). One of the potential applications of these types of enzymes is for the bioremediation and bioconversion of chitin wastes from food processing industry into pharmacological active products, namely *N*-acetylglucosamine (NAG) and chito-oligosaccharides (Hayes et al., 2008a,b; Horn et al., 2006). Production of chitin derivatives with suitable enzyme is more appropriate for a sustainable environment than using chemical reactions. In addition, they can be used as anti-fungal agents (Tsuji et al., 2003) and for the preparation of protoplasts of filamentous fungi (Dahiya et al., 2006). Potential roles of chitinase in bio-control of insects and

mosquitoes and in production of single cell protein (SCP) have also been suggested (Dahiya et al., 2006; Hayes et al., 2008a,b). Thus, there have been many reports on cloning, expression and characterization of chitinases from various organisms, including bacteria, fungi, plant and animals (Dahiya et al., 2006; Howard et al., 2003).

B. licheniformis strain DSM 8785 has been used extensively in industry for the production of various enzymes and metabolites (Schallmeyer et al., 2004; Veith et al., 2004); however, the chitinases from this bacterium have apparently not been studied. This article describes the cloning, expression and characterization of recombinant chitinase from *B. licheniformis* strain DSM8785 using an *Escherichia coli* expression system. The *N*-terminus of the mature enzyme was fused with the *E. coli* OmpA signal peptide, allowing the secretion of the enzyme into the periplasmic space; its C-terminus was fused with a hexa-histidine tag to facilitate affinity purification using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Characterization of its biochemical properties suggested that this recombinant *B. licheniformis* chitinase is appropriate for various industrial applications, including bioconversion of colloidal chitin into *N*-acetyl glucosamine and chitobiose.

2. Methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

B. licheniformis DSM8785, which was used as the source of chitinase gene, was obtained from DSMZ; German Collection of

* Corresponding author. Tel.: +66 44 224152 4; fax: +66 44 224150.
E-mail address: montarop@sut.ac.th (M. Yamabhai).

Microorganisms and Cell Culture (Braunschweig, Germany). *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen) was used as a host for cloning and protein expression. *E. coli* was cultured in Luria–Bertani (LB) medium at 37 °C with shaking.

2.2. Preparation of colloidal chitin

Colloidal chitin was prepared according to the modified method of Shimahara and Takiguchi (1988). Ten grams of chitin flakes from crab shells (Sigma–Aldrich, C9213) were mixed with 200 ml concentrated HCl on ice with vigorous stirring for 3–4 h and continued incubation on ice overnight. Then, the mixture was filtered through cheesecloth and dropped slowly into 600 ml of 50% ice-cold ethanol with rapid stirring on ice. Then, the colloidal chitin was collected by centrifugation at 8000g, for 30 min at 4 °C and washed several times with tap water until the pH was neutral (pH 7.0). Alternatively the filtrate was re-filtered with suction through Whatman No. 1 filter paper and washed with water until the washing solution was neutral. The colloidal chitin was kept at 4 °C until used.

2.3. Molecular cloning of *B. licheniformis* ChiA gene

The oligonucleotide primers for the cloning of the ChiA gene from *B. licheniformis* strains DSM8785 were designed from the genomic database of *B. licheniformis* strains DSM13 (Rey et al., 2004), according to the DNA sequence of gene, YvbX (NCBI Accession Number AAU21943.2), which are hypothetical protein for Glycoside Hydrolase (GH) family 18. To clone the gene of mature ChiA, a single colony of *B. licheniformis* strain DSM8785 was boiled in ultra pure water and used as the template for amplification. The gene was amplified by *Pfu* DNA polymerase using chiHind3 (5'-CTG TGC AAG CTT TGC TCA TGT TGC TGA GCT TGT CAT TTG-3') and chi6HX-ho (5'-GCA CAG CTC GAG TCA GTG GTG GTG GTG GTG TTC GCA GCC TCC GAT CAG CCG CC-3') as primers. The reverse primer contains a hexa-histidine tag for affinity purification of the recombinant ChiA. The PCR thermal profile consisted of an initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 45 s, 56 °C for 55 s, and 72 °C for 2 min, followed by final extension step at 72 °C for 10 min. The gene was then cloned into the *Hind* III and *Xho* I sites of the pFLAG-CTS vector (Sigma, St. Louise, USA) such that the native signal peptide of *B. licheniformis* ChiA was replaced by the *E. coli* OmpA signal peptide to facilitate the secretion of the recombinant enzyme as previously described (Yamabhai et al., 2008). The integrity of the construct was confirmed by automated DNA sequencing (Macrogen, Korea). The construct was transformed into *E. coli* strain Top 10 for expression of the gene in the next step.

2.4. Structural based sequence alignment

Multiple sequence alignment was done by CLUSTALW (Larkin et al., 2007) followed by ESPript (Gouet et al., 2003) to display the secondary structure of the template selected.

2.5. Protein expression and purification

To express the recombinant *B. licheniformis* ChiA, a single colony of *E. coli* Top10 harbouring recombinant plasmid was grown at 37 °C in Luria Bertani (LB) medium containing 100 µg/ml ampicillin until OD₆₀₀ reached approximately 1.5. After that, the culture was cooled down to 25 °C before chitinase expression was induced by the addition of 1 mM isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG). After continuing incubation at 25 °C for 18 h the cell pellet was collected by centrifugation at 4500g for 45 min. The freshly-prepared cell pellet was resuspended in 10 ml of lysis buffer (20 mM Tris-

HCl buffer, pH 8.0, containing 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), and 1.0 mg/ml lysozyme), then lysed on ice using an Ultrasonic Processor; 60 amplitude, pulser 6 s, for 2 min. Unbroken cells and cell debris were removed by centrifugation at 12,000g for 30 min. The supernatant was immediately applied to a Ni-NTA agarose affinity column containing 1–2 ml of bed volume (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), and the chromatography was carried out gravitationally at 4 °C, following the QIAGEN's protocol. The column was washed two times with 50 ml of wash buffer (20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 and 150 mM NaCl) containing 5 mM and 20 mM imidazole, respectively. Ni-NTA-bound enzyme was eluted with 250 mM imidazole in the same buffer. The eluted fractions were then centrifugally dialyzed using Vivaspin-20 ultrafiltration membrane concentrators (*M_r* 10,000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) to remove imidazole. The enzyme was stored at –25 °C in the presence of 20% glycerol until used. The level of purification was calculated from the specific activities (Unit/mg protein) of the purified enzyme and crude enzyme preparation, using *p*-NP-chitobiose as substrate (Howard et al., 2003).

2.6. Determination of protein concentration

Protein concentrations were determined by the method of Bradford (Bradford, 1976), according to the manufacturer's protocol (Biorad). The standard calibration curve was constructed from 0 to 10 µg of Bovine serum albumin (BSA).

2.7. SDS-PAGE analysis and Zymogram

Ten microliter of purified enzyme (3 µg) was analyzed on a 12% SDS-PAGE, according to the method of Laemmli (1970). The protein samples were mixed with gel loading buffer containing β-mercaptoethanol before loading. Protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue R-250. The molecular weight markers were from Amersham Pharmacia Biotech (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Zymogram was performed as previously described (Yamabhai et al., 2008).

2.8. Chitinase activity assay using *p*-NP-chitobiose (*p*-NP-(GlcNAc)₂)

The relative activity of the chitinase was determined by pre-incubating 0.5 mM of *p*-NP-chitobiose in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0 at 37 °C (or 50 °C) for 5 min with constant agitation in a Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). After adding 1 µg of the purified enzyme (0.015 nmol), the reaction was incubated at 37 °C with shaking for 30 min (standard assay condition) or at 50 °C for 10 min, then terminated by adding 50 µl of 1 M NaOH into 100 µl of enzyme reaction at 50 °C or 37 °C, depending on the assay condition. The amount of *p*-nitrophenol released from *p*-NP-(GlcNAc)₂ was detected by measuring the absorbance at 405 nm, using a standard calibration curve constructed with varying concentration of *p*-NP from 0 to 30 nmol.

One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme that liberates 1 µmol *p*-NP per minute under the experimental conditions.

2.9. Effect of pH and temperature on enzyme activity

The optimal pH of the chitinase activity was measured between pH 2.0–12.0 under standard assay conditions, using 100 mM of each buffer: phosphoric-phosphate (pH 2.0–3.0), glycine-HCl (pH 2.0–4.0), acetate (pH 4.0–6.0), potassium phosphate (pH 6.0–8.0), Tris-HCl (pH 7.0–9.0) and glycine-NaOH (pH 9.0–12.0). To determine the pH stability of chitinases, the enzyme samples were incubated at various pH values using the same buffer system at 20 °C

for 30 min or 18 h, and then the remaining enzyme activity was measured at 37 °C under the standard assay condition.

The optimum temperature of chitinase activity was studied by incubating the enzyme samples with the substrate at temperature ranging from 0 to 100 °C in 100 mM phosphate buffer pH 6.0. Thermal stability of the enzyme was determined by incubating the enzyme samples in 100 mM phosphate buffer, pH 6.0 at various temperatures ranging from 0 to 100 °C for 30 min, then the remaining enzyme activities were measured under standard assay conditions.

In addition, the residual enzyme activities after incubation in 100 mM phosphate buffer, pH 6.0 at 50 °C without substrate at 0, 0.5, 3, 6, 24, 48, 96 and 120 h were assayed at 37 °C under standard conditions.

2.10. Chitinase activity assay using colloidal chitin

To determine chitinase activity using colloidal chitin as substrate, the reaction containing 300 µl of 10 mg/ml colloidal chitin in 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 was mixed with 75 µl of the buffer and pre-incubated for 30 min (at 37 °C or 50 °C). Then, 25 µl of 1.0 mg/ml of purified enzyme was added and further incubated at 37 °C or 50 °C for 30 and 10 min, respectively. The reaction was terminated by boiling at 100 °C for 10 min. Then the reaction mixture was centrifuged at 12,000g for 5 min to precipitate the remaining chitin. The reducing sugar liberated in the enzyme reaction was assayed by mixing 100 µl of the supernatant with 100 µl of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) solution, boiling at 100 °C for 20 min, cooling on ice and measuring the absorbance at 540 nm, using a standard curve constructed with varying concentration of *N*-acetylglucosamine (NAG, or G1) or (di-*N*-acetyl chitobiose, or G2).

2.11. Kinetic analysis

Enzyme kinetic parameters were determined by setting up reaction mixture consisting of 0.4 µg pure enzyme and 0.008–0.7 mM of *p*-NP-(GlcNAc)₂ and assayed under standard condition at 37 °C as previously described (Songsiririthigul et al., 2009). The kinetic constants were calculated by nonlinear regression, and the obtained data were fitted to the Henri-Michaelis-Menten equation (GraphPad Prism 5).

2.12. Hydrolytic analysis by TLC

Hydrolysis of chito-oligosaccharides (G2–G6) was carried out in a 30-µl of reaction mixture, containing 10 nmol substrate and 500 ng of purified enzyme in 0.1 M phosphate buffer pH 6.0. The reaction was incubated at 37 °C with shaking for 10 min, 1 h and 18 h, and then terminated by boiling for 10 min. To analyze the product by TLC, each reaction mixture was applied five times (1 µl each) onto a Silicagel 60 F₂₅₄ aluminum sheet (6.0 × 10.0 cm) purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and chromatographed two times (1 h each) in a mobile phase containing *n*-butanol: methanol: 28% ammonia solution: H₂O (10:8:4:2) (v/v). The products were detected by wiping the TLC plate with a cotton ball soaked with 5% sulphuric acid followed by baking at 180 °C for 3 min. The standard mixture of 10 nmol chito-oligosaccharides (G2–G6) was used. To analyze the hydrolysis products using colloidal chitin as substrate, 3 mg of colloidal chitin suspended in 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 was pre-incubated for 30 min at 37 °C before 25 µg of purified enzyme was added and incubated at 37 °C. The actual reaction comprised 75 µl of 0.1 M phosphate buffer pH 6.0, 300 µl of 10 mg/ml colloidal chitin in the same buffer, and 25 µl of 1.0 mg/ml enzyme. The sample was taken for TLC analysis at various time points (2, 5, 10, 15, 30 and 60 min).

Product analysis when colloidal chitin was used as substrate at different pHs was done in reaction mixtures containing 30 mg of colloidal chitin suspended 0.1 M of each buffer (glycine-HCl, pH 4.0; potassium phosphate buffer, pH 6.0 and Tris-HCl, pH 9.0). After pre-incubation at 50 °C for 30 min, 50 µg of chitinase was added and further incubated at 50 °C for different durations (1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h) prior to termination by boiling for 10 min. The actual reaction comprised 150 µl of 0.1 M buffer (glycine-HCl buffer pH 4.0, phosphate buffer pH 6.0 and Tris-HCl pH 9.0), 600 µl of 50 mg/ml colloidal chitin, and 50 µl of 1.0 mg/ml enzyme. Products released from the reactions were subsequently analyzed by TLC as described above.

3. Results and discussion

3.1. Amino acid sequence analysis of chitinase (ChiA) from *B. licheniformis* strain DSM8785

The *chiA* gene from *B. licheniformis* strain DSM8785 (GenBank Accession Number FJ465148) and *B. licheniformis* strain DSM13 (GenBank Accession Number AAU21943) (Rey et al., 2004) are highly similar (99% identity) with only five base pairs and three amino acid differences. Comparison of the specific activity and expression level of the two recombinant enzymes indicated that the enzyme from strain DSM 8785 was slightly better (data not shown); therefore ChiA from *B. licheniformis* strain DSM8785 was selected for further study. Amino acid sequence alignment between these two strains of *B. licheniformis* can be found in the previous publication (Songsiririthigul et al., 2009).

Comparison of amino acid sequence of *B. licheniformis* ChiA with other chitinases revealed that the N-terminal catalytic domain of *B. licheniformis* ChiA (pFchi8785) has highest identity (48.80%) to catalytic domain (CatD) of chitinase A1 (ChiA1) from *Bacillus circulans* WL-12; followed by chitinase B1 (ChiB1) from *Aspergillus fumigatus* (24.79%); chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* (23.42%); chitinase B (ChiB) from *Serratia marcescens* (22.42%); human chitotriosidase (21.05%); chitinase A (ChiA) from *Vibrio harveyi* (20.28%); chitinase A (ChiA) from *Serratia marcescens* (19.80%) and acidic mammalian chitinase (18.74%). The enzyme belongs to glycosyl hydrolase (GH) family 18, according to the CAZy (Carbohydrate-Active eNzymes) system (Coutinho and Henrissat, 1999) and shows the TIM (β/α)₈-barrel architecture that is typical to this class of hydrolases. It comprises N-terminal catalytic domain, one fibronectin type III (FnIII)-like domain and one C-terminal chitin binding domain (ChBD).

The gene was cloned into the expression vector such that the hypothetical native signal peptide was replaced with the *E. coli* OmpA signal peptide that was included in the pFLAG-CTS vector. In addition, the DNA sequence encoding hexa-histidine and stop codon was incorporated into the reverse primers to create His-tagged fusion enzyme for further purification step. The integrity of the construct was confirmed by automated DNA sequencing.

3.2. Enzyme expression and purification

The gene of the recombinant *B. licheniformis* ChiA was under the control of *tac* promoter and could be efficiently expressed after induction with 1 mM IPTG. The enzyme could be purified to apparent homogeneity as seen as a band of approximately 66 kDa on SDS-PAGE (Fig. 1A) and Zymogram analysis (Fig. 1B). These results correspond to hypothetical M_r of 66.801 kDa as predicted by Scan-site program (Obenauer et al., 2003).

The mature ChiA gene was fused with *E. coli* OmpA signal peptide for efficient secretion using *E. coli* expression system as has been previously described (Yamabhai et al., 2008). In this report,

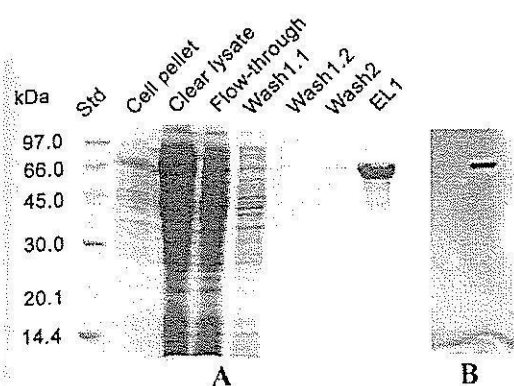


Fig. 1. Expression and purification of recombinant *B. licheniformis* ChiA. Panel A illustrates SDS-PAGE analysis of recombinant ChiA from various purification steps. Approximately 10 μ l of samples were loaded onto each lane and stained by Coomassie brilliant blue. Zymogram analysis of purified enzyme is shown in panel B.

we harvested the recombinant enzyme from both cytosol and periplasm after induction with 1 mM IPTG for 18 h. This is the optimized condition for a small-scale preparation as performed in this study. Routinely we obtain about 20 mg of purified enzyme from 1-liter culture. The purification fold was 5.4 (this value was calculated from the specific activity, using *p*-NP-chitobiose as sub-

strate, which was 0.054 and 0.294 U/mg for crude extract and purified enzyme, respectively). We have found that the enzyme could be kept in 20% glycerol at -25°C for as long as one year with more than 80% residual activity, when compared to freshly-prepared enzyme. For a large-scale production, further optimization is needed and it may be more convenient to harvest the enzyme from culture medium or periplasmic space (Pines and Inouye, 1999). Since the C-terminus of the enzyme was fused with hexa-histidine tag, the enzyme can be easily purified to apparent homogeneity by affinity chromatography such as Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). For industrial scale, it might be more cost-effective to purify the enzyme from periplasmic extract, by ammonium sulfate precipitation and anion-exchange chromatography, as has been previously described (Chen et al., 2004).

3.3. Effect of pH and temperature

The relative activities of the enzyme at various pHs were measured at 37°C after incubation for 30 min (standard assay condition). The optimal pH of ChiA was 6.0 (Fig. 2A). The enzyme is more active when using glycine-HCl than acetate buffer at pH 4.0. The enzyme was stable within pH 4–11 after incubation for 30 min to 18 h without substrate (Fig. 2B). At pH 12, its remaining activity was decreased to 68% after incubation for 18 h. The residual activity of the enzyme at pH 3.0, after incubation for 0.5 h, was slightly (and non-significant) better than that at pH 4.0, whereas the residual activity at pH 3.0, after incubation for 18 h, was much

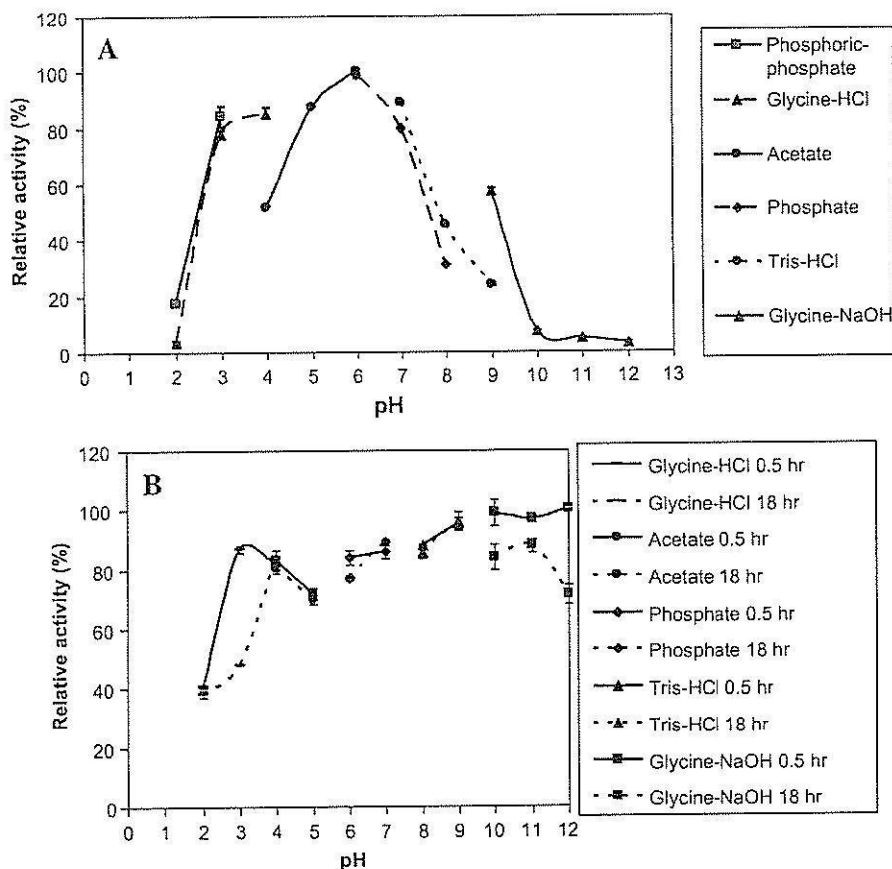


Fig. 2. Effect of pH on catalytic activity. (A) The optimal pH was determined at 37°C in 100 mM of different buffers as indicated under the standard assay condition. (B) The pH stability was determined by measuring the residual activity of ChiA after incubation at various pHs at 20°C for 30 (solid line) min or 18 h (broken line) without substrate.

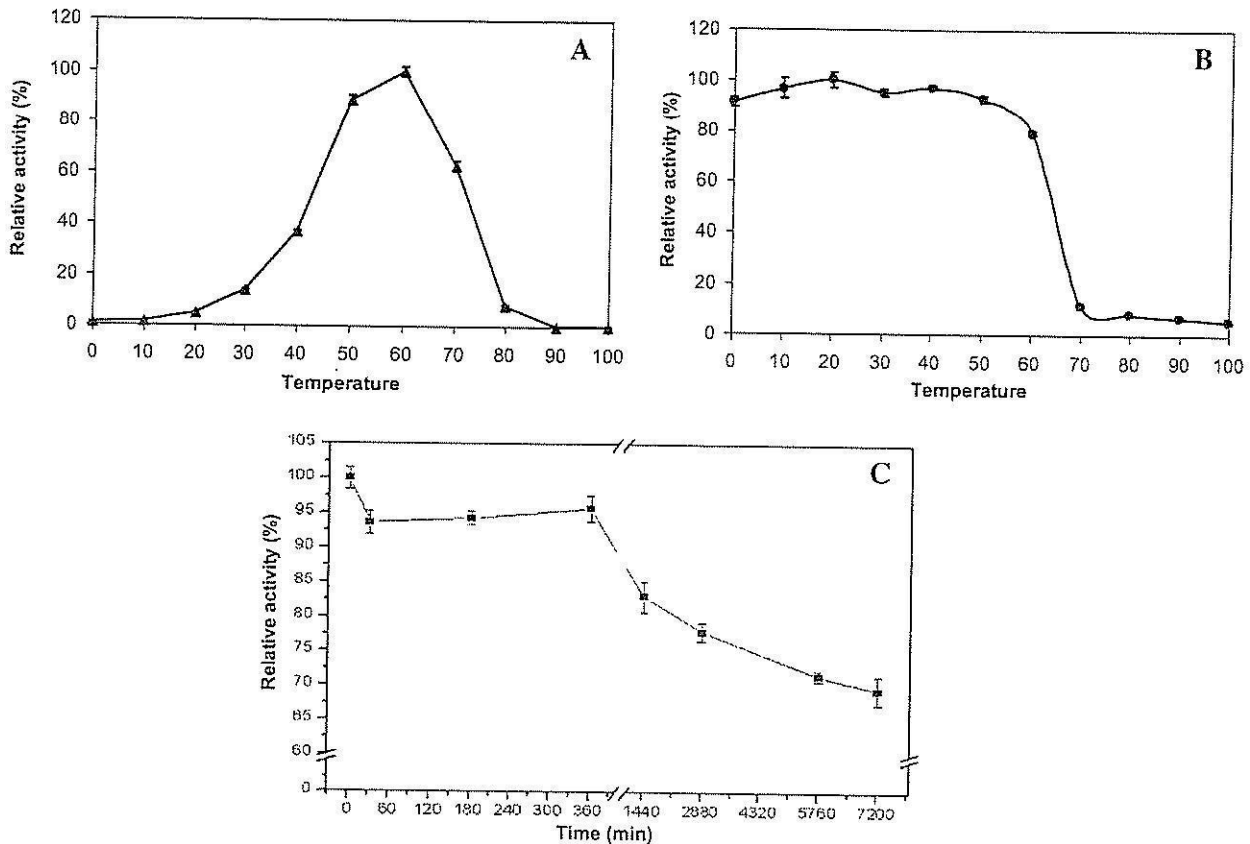


Fig. 3. Effect of temperature on catalytic activity. (A) The optimal temperature was determined under standard assay conditions. (B) The temperature stability was determined by measuring the remaining activity after incubation at various temperatures at pH 6.0 for 30 min without substrate. (C) The remaining activities after incubation at 50 °C without substrate at various time points were reported.

worse (significant) than that at pH 4.0. We have used two buffer systems to test enzyme stability at pH 4.0, i.e. glycine-HCl and acetate buffers. The actual relative activity of the enzyme when incubated at pH 4.0 using acetate buffer after 0.5 h was 82.93 ± 3.48 . This value overlapped with the relative activity of the enzyme when incubated at pH 3.0 using glycine-HCl buffer after 0.5 h, which was 86.72 ± 1.329 . Thus, we conclude that the stability of the enzyme after incubation for 0.5 h was the same (not significantly different) at pH 3.0 or pH 4.0, whereas at 18 h after incubation, the enzyme was more stable at higher pH (4.0). The optimal temperature for ChiA1 was 60 °C (Fig. 3A). It was stable up to 60 °C (more than 80% residual activity) after incubation for 30 min at pH 6.0 (Fig. 3B) without substrate. After incubation at 50 °C for 5 days without substrate, approximately 70% of the activity was retained (Fig. 3C).

Analysis of biochemical properties of the purified enzyme as described above revealed that the *B. licheniformis* ChiA is relatively thermostable when compared to other bacterial enzymes that have been suggested to be appropriate for bioconversion of colloidal chitin (Dahiya et al., 2006; Kudan and Pichyangkura, 2009; Lee et al., 2007; Yuli et al., 2004). Moreover, it showed the widest pH stability, ranging from pH 4.0–12.0, (Dahiya et al., 2006; Kudan and Pichyangkura, 2009; Yuli et al., 2004). Purification and characterization of wild-type chitinase from *B. licheniformis* Mb-2, which has identical N-terminal amino acid sequence and same molecular weight to our recombinant enzyme, has previously been reported (Toharisman et al., 2005). The properties of the wild-type and recombinant ChiA were similar except that the optimal temperature of the wild-type ChiA was 70 °C, instead of 60 °C for recombinant

enzyme. However, this difference might be because of the different in the method of enzyme assay.

3.4. Enzyme activity and kinetic analysis

Specific activities of recombinant *B. licheniformis* ChiA, when using *p*-NP-chitobiose and colloidal chitin as substrates at 37 °C or 50 °C, are reported in Table 1. In addition, Michaelis-Menten type kinetic parameters were determined using 0.008–0.18 mM of *p*-NP-chitobiose as a substrate. This substrate concentration range was used because substrate inhibition became apparent at higher substrate concentration as previously shown for this type of chitinases (Brurberg et al., 1996; Synstad et al., 2004). Kinetic analysis revealed that K_m , V_{max} , and k_{cat} values of recombinant *B. licheniformis* chitinase were 0.03 ± 0.003 mM, 0.28 ± 0.063 mM/min, and 0.31 ± 0.070 s⁻¹, respectively. The overall catalytic efficiency, k_{cat}/K_m of the enzyme was 10.30 ± 3.236 s⁻¹/mM.

Table 1
Specific activities of recombinant *B. licheniformis* ChiA.

Substrate	Specific activity (Unit/mg) ^a	
	37 °C	50 °C
<i>p</i> -NP-chitobiose ^b	0.294 ± 0.009	0.946 ± 0.030
Colloidal chitin ^{b,c}	1.50 ± 0.20 (4.84 ± 0.04)	5.11 ± 0.20 (15.67 ± 0.37)

^a Unit means micromole of pNP released per minute.

^b Unit means micromole of G1 (in parenthesis) released per minute.

^c Unit means micromole of G2 (in parenthesis) released per minute.

^d The enzyme assay was done at two temperatures as described in Section 2.

3.5. Hydrolytic analysis by thin layer chromatography (TLC)

Product analysis by thin layer chromatography (TLC) using various substrates was performed to determine the hydrolytic activity of *B. licheniformis* ChiA. When the enzyme was incubated with G2, no detectable products were observed even after 18 h of incubation (Fig. 4), suggesting that G2 was not the substrate of this en-

zyme. With G3 substrate, G2 could be detected after 10 min of incubation, and after incubation for 18 h, the band of G3 disappeared, indicating that *B. licheniformis* ChiA has activity toward G3. When G4 was used as substrate, G2 was the major product, suggesting that the enzyme efficiently cleaved the middle glycosidic bond of the tetrameric chain. When longer oligomers (G4–G6) were used to study, distinct patterns of product formation

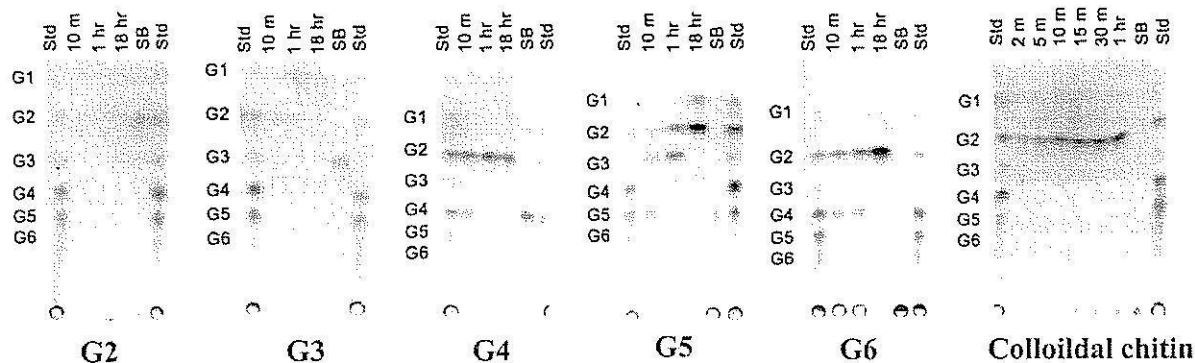


Fig. 4. TLC analysis of hydrolytic products. TLC analysis of chito-oligosaccharides (G2–G6) and colloidal chitin hydrolysis. The reaction products after incubation for different durations are indicated. Std: a standard mixture of G1–G6; SB: substrate blank; m: minute; hr: hour. The hydrolytic reaction was carried out at 37 °C for up to 18 h. The reactions comprised 100 nM chito-oligosaccharide substrates and 0.5 µg enzyme in 30-µl reaction volume, or 3 mg colloidal chitin and 25 µg enzyme in 400-µl reaction volume.

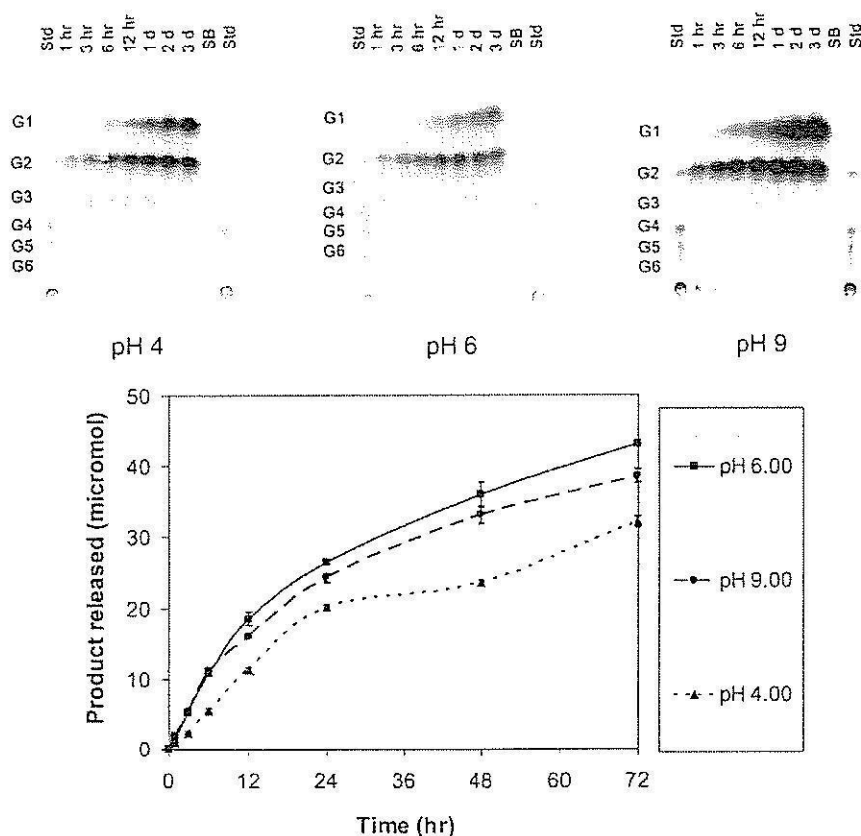


Fig. 5. Analysis of reaction products in various buffers. Upper panel illustrates TLC analysis of colloidal chitin hydrolysis by *B. licheniformis* ChiA1 at three different buffers. The hydrolytic reaction was carried out at 50 °C for up to 3 days in the presence of 30 mg colloidal chitin and 50 µg enzyme in 800-µl reaction volume. The reaction products after incubation for 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 1 day, 2 day and 3 day are shown. Std: a standard mixture of G1–G6; SB: substrate blank; hr: hour; d: day. The contrast and brightness of the pictures were enhanced by Image J software (Abramoff et al., 2004). Quantitative analysis of products released at various time points, determined by DNS method (Miller, 1959), is depicted in the lower panel.

could be observed. Using G5, G2 and G3 were released as intermediates, and then G3 was further hydrolyzed to G1 and G2. The hydrolysis of G6 initially yielded G2, G3 and G4. Then, G4 and G3 were further hydrolyzed to G2 and G1.

The hydrolytic activity of ChiA1 against colloidal chitin was also studied at various incubation times. The TLC result showed that G2 was rapidly formed only after 2 min of the incubation. At the end of the reaction, G2 was also observed as the major product. Taken together from the patterns of product formation, we concluded that *B. licheniformis* ChiA is an endochitinase that can efficiently cleave chitinous substrates that are equal or longer than tri-oligomers. The absence of longer lengths of chito-oligosaccharide when chitin was used as substrate suggested that the enzyme could not get access to the compact structure of colloidal chitin.

3.6. Product analysis at different conditions

To determine the applicability of the recombinant enzyme as a biocatalyst for the production of *N*-acetylglucosamine (NAG) and chito-oligosaccharides, the enzyme was incubated with colloidal chitin in three different pHs at 50 °C for up to 3 days. We performed an experiment at this temperature because higher temperature will reduce the chance of microbial contaminations and the overall catalytic activity of the enzyme is higher. The reaction was sampled at various time points to measure product released. The *B. licheniformis* ChiA appeared to be stable during the course of the study. Product analysis by TLC (Fig. 5 upper panel) revealed that G1–G3 could be produced at both pH 4.0 and pH 6.0; whereas, only G1 and G2 were obtained at alkaline condition (pH 9.0). It is worthwhile to note that TLC analysis can only be used to estimate the quantity of reaction productions. Proper evaluation of hydrolytic products has to be done by more sophisticated technique such as HPLC analysis (Horn et al., 2006) (Vincent Eijsink's personal communication). In addition to determination of hydrolytic product by TLC, the amounts of reducing sugar released from various pHs were quantitatively determined as shown in Fig. 5, lower panel. The enzyme performed equally well at pH 6 and 9, and was slightly less active at pH 4, indicating that at 50 °C the enzyme was more stable at pH 9.0 than at pH 4.0. These results were consistent with the results shown in Fig. 4B, which showed that the enzyme was significantly more stable at pH 9.0 than at pH 4.0 after incubation at 20 °C for either 0.5 h or 18 h. Taken together, our results indicated that *B. licheniformis* ChiA could be efficiently used to convert colloidal chitin to G1 and G2 as major products, and G3 as a minor product. This result is similar to small-scale (50- μ l reaction) hydrolysis products obtained from using chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 (Lee et al., 2007).

Thus, TLC analysis indicated that the enzyme is an endochitinase that prefers substrate longer than tri-saccharide. When the enzyme was incubated with colloidal chitin at 50 °C in three pH conditions (pH 4.0, 6.0 and 9.0), the only 2 major products that could be obtained were NAG and chitobiose (G2). This result supported the observation that chitin is a highly recalcitrant raw material and additional proteins are needed so that chitinase can gain access to the inside of the chitin fiber, in order to obtain a longer chito-oligosaccharide or used directly on the solid chitin (Eijsink et al., 2008). Nevertheless, the fact that the enzyme could be efficiently used for bioconversion of colloidal chitin from crab shells into NAG and chitobiose for up to 3 days at 50 °C in acidic, neutral or alkaline conditions, made this enzyme attractive for industrial applications. NAG has been shown to possess anti-inflammatory effects and has been used to treat ulcerative colitis and other gastrointestinal inflammations (Russell, 1999). In addition, it can also be used as a nutritional substrate for pediatric chronic inflammatory bowel disease (Salvatore et al., 2000). The derivative of NAG, glucosamine, has been shown to help regenerate

joint cartilage and has been used extensively to treat osteoarthritis (Huskisson, 2008). Chitobiose can be used as a building block for transglycosylation reaction to generate longer chito-oligosaccharides (Kobayashi et al., 1997) or further modified to produce an enzyme inhibitor (Terayama et al., 1993). Other applications of chitinase include bio-control of plant pathogens and mosquitoes, single cell protein production and protoplast preparation (Hayes et al., 2008a,b).

4. Conclusions

In conclusion, endochitinase from *B. licheniformis* (ChiA) was cloned and efficiently produced using *E. coli* expression system. Characterization of biochemical properties suggested that the enzyme is thermo and pH-stable, suitable for various biotechnological applications, including biocoverion of colloidal chitin into NAG and chitobiose.

Acknowledgements

This research was supported by Suranaree University of Technology (SUT), National Research Council of Thailand (NRCT), Thailand Research Fund (TRF) and International Foundation for Sciences (IFS), Grant Number F/3415-1.2.

References

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with image. *J. Biophotonics Int.* 11, 36–42.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G., 1996. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 142 (Pt 7), 1581–1589.
- Chen, C.T., Huang, C.J., Wang, Y.H., Chen, C.Y., 2004. Two-step purification of *Bacillus circulans* chitinase A1 expressed in *Escherichia coli* periplasm. *Protein Expr. Purif.* 37, 27–31.
- Coutinho, P.M., Henrissat, B., 1999. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: Gilbert, H.J., Davies, G., Henrissat, B., Svensson, B. (Eds.), *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3–12.
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S., 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 773–782.
- Eijsink, V.G., Vaaje-Kolstad, G., Varum, K.M., Horn, S.J., 2008. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends Biotechnol.* 26, 228–235.
- Fujita, K., Shimomura, K., Yamamoto, K.-i., Yamashita, T., Suzuki, K., 2006. A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 502–507.
- Gouet, P., Robert, X., Courcelle, E., 2003. ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucl. Acids Res.* 31, 3320–3323.
- Hayes, M., Carney, B., Slater, J., Bruck, W., 2008. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan – Part A: extraction methods. *Biotechnol. J.* 3, 871–877.
- Hayes, M., Carney, B., Slater, J., Bruck, W., 2008. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan – Part B: applications. *Biotechnol. J.* 3, 878–889.
- Horn, S.J., Sikorski, P., Cederkvist, J.B., Vaaje-Kolstad, G., Sorlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K.M., Eijsink, V.G., 2006. Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18089–18094.
- Horn, S.J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K.M., Eijsink, V.G., 2006. Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J.* 273, 491–503.
- Howard, M.B., Ekborg, N.A., Weiner, R.M., Hutcheson, S.W., 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 627–635.
- Huskisson, E.C., 2008. Glucosamine and chondroitin for osteoarthritis. *J. Int. Med. Res.* 36, 1161–1179.
- Kobayashi, S., Kiyosada, T., Shoda, S.-i., 1997. A novel method for synthesis of chitobiose via enzymatic glycosylation using a sugar oxazoline as glycosyl donor. *Tetrahedron Lett.* 38, 2111–2112.
- Kudan, S., Pichyangkura, R., 2009. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* SK-1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157, 23–35.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Lee, Y.-S., Park, I.-H., Yoo, J.-S., Chung, S.-Y., Lee, Y.-C., Cho, Y.-S., Ahn, S.-C., Kim, C.-M., Choi, Y.-L., 2007. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. *Bioresour. Technol.* 98, 2734–2741.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Obenauer, J.C., Cantley, L.C., Yaffe, M.B., 2003. Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucl. Acids Res.* 31, 3635–3641.
- Pines, O., Inouye, M., 1999. Expression and secretion of proteins in *E. Coli*. *Mol. Biotechnol.* 12, 25–34.
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jorgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5, R77.
- Russell, A.L., 1999. Glycoaminoglycan (GAG) deficiency in protective barrier as an underlying, primary cause of ulcerative colitis, Crohn's disease interstitial cystitis and possibly Reiter's syndrome. *Med. Hypotheses* 52, 297–301.
- Salvatore, S., Heuschkel, R., Tomlin, S., Davies, S.E., Edwards, S., Walker-Smith, J.A., French, I., Murch, S.H., 2000. A pilot study of *N*-acetyl glucosamine, a nutritional substrate for glycosaminoglycan synthesis, in paediatric chronic inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol. Ther.* 14, 1567–1579.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50, 1–17.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., 1988. Preparation of crustacean chitin. In: Willis, A.W., Scott, T.K. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 417–423.
- Songsirittthigul, C., Pesatcha, P., Eijsink, V.G., Yamabhai, M., 2009. Directed evolution of a *Bacillus* chitinase. *Biotechnol. J.* 4, 501–509.
- Synstad, B., Gaseidnes, S., Van Aalten, D.M., Vriend, G., Nielsen, J.E., Eijsink, V.G., 2004. Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *Eur. J. Biochem.* 271, 253–262.
- Terayama, H., Takahashi, S., Kuzuhara, H., 1993. Large-scale preparation of *N,N'*-Diacetylchitobiose by enzymic degradation of chitin and its chemical modifications. *J. Carbohydrate Chem.* 12, 81–93.
- Toharisman, A., Suhartono, M.T., Spindler-Barth, M., Hwang, J.-K., Pyun, Y.-R., 2005. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 733–738.
- Tsujibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K., Inamori, Y., 2003. Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardopsis prasina* OPC-131. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 894–900.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Bumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 204–211.
- Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N., Buranabanyat, B., 2008. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *J. Biotechnol.* 133, 50–57.
- Yuli, P.E., Suhartono, M.T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme Microbiol. Technol.* 35, 147–153.

บทที่ ๔ บทสรุป

๔.๑ สรุปผลการวิจัยทั้งหมด

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการวิจัยและพัฒนาเอนไซม์ chitinase ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มมูลค่า ไคติน ซึ่งเป็นกากของเหลือจากอุตสาหกรรมการส่งออกกุ้งแช่แข็ง โดยการนำไปใช้แปรรูป (bioconversion) กาก chitin ให้เป็น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว N-acetyl glucosamine และ น้ำตาลโมเลกุลสั้น chito-oligosaccharide ที่มีมูลค่าสูง เพราะมีประโยชน์ ทั้งทางการแพทย์ และนาโนเทคโนโลยี โดยสามารถพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคโนโลยี directed evolution ในการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ chitinase ให้ดีขึ้น โดยเริ่มต้นจากการสร้างคลังของเอนไซม์ chitinase ที่มีความหลากหลายสูง โดยวิธีการ error-prone PCR ร่วมกับ DNA shuffling ระหว่างยีนของเอนไซม์ chitinase จากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ๒ strain ที่มีความคล้ายคลึงกันมากคือมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันร้อยละ ๘๘ จากนั้นจึงนำยีนเหล่านี้ไปแสดงออกในระดับการแสดงออกของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ แล้วนำไปตรวจสอบ activity ด้วยวิธีการที่มี ๒ ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการคัดหาคัดหาเซลล์เชื้อที่มี colloidal chitin อยู่ โดยทำการตรวจสอบ activity ของเอนไซม์ จากวงใส จากนั้นจึงนำเชื้อที่แสดงวงใสทั้งหมดไปทดสอบต่อในขั้นที่ ๒ โดยการเลี้ยงในหลุมเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กแล้วตรวจสอบ activity ในการย่อย chitotriose โดยการใส่ p-nitrophenyl- β -1,4-N,N'-diacetyl-chitobiose เป็น substrate ที่ค่า pH ต่างๆ ใน microtiter plates ผลจากการวิเคราะห์เอนไซม์กลายพันธุ์ที่ยัง active ทั้งหมด ๕๑๗ แบบ พบว่ามีเอนไซม์ ๑ ตัวที่สามารถทำงานได้ดีเพิ่มขึ้น ตั้งชื่อว่า Chi128mt โดยเมื่อใช้ p-nitrophenyl- β -1,4-N,N'-diacetyl-chitobiose เป็น substrate พบว่า มีค่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาโดยรวม (overall catalytic activity, k_{cat}/K_m) ดีกว่าเอนไซม์ต้นแบบ ๒.๗ และ ๒.๓ เท่าที่ pH 3.0 และ 6.0 ตามลำดับ โดยเอนไซม์ที่ได้ปรับปรุงขึ้นมาเกิดจากการรวมกันของเอนไซม์จากเชื้อทั้ง ๒ strain และมีตำแหน่งกรดอะมิโนที่แตกต่างจากเอนไซม์ต้นแบบ ๔ จุด เอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นมาได้นี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยไคตินในสถานะที่เป็นกรดได้ต่อไป นอกจากนั้นแล้ววิธีการพัฒนาเอนไซม์ด้วยเทคโนโลยี directed evolution นี้ ยังสามารถนำไปปรับใช้ในการพัฒนาเอนไซม์ เพื่อวัตถุประสงค์อื่น หรือให้ดียิ่งขึ้นไปอีกได้ด้วย

นอกจากการวิจัยและพัฒนาใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมขั้นสูงในการพัฒนาเอนไซม์ chitinase ดังที่กล่าวข้างต้นแล้ว ผลงานวิจัยต่อมาคือการ พัฒนาระบบการแสดงออก และการวิเคราะห์ เอนไซม์ endochitinase (EC 3.2.1.14) ๒ ตัวที่เตรียมได้จากเชื้อ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ DSM13 และสายพันธุ์ DSM 8785 ซึ่งสั่งซื้อมาจากสถาบันเก็บรวบรวมจุลินทรีย์และเซลล์ประเทศ ประเทศสหพันธรัฐเยอรมัน เหตุที่ผู้วิจัยเลือกศึกษาเอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง ๒ ตัวนี้ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย และนิยมใช้มากในอุตสาหกรรมต่างๆ เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่มาจากเชื้อนี้มีคุณสมบัติ ทนความร้อนสูง อีกทั้งลำดับ DNA ของ genome ทั้งหมดได้ถูกวิเคราะห์และเผยแพร่ออกสู่สาธารณะแล้ว จึงไม่จำเป็นต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการค้นหาเชื้อขึ้นมาเอง เอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง ๒ สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมากคือมีกรดอะมิโนที่เหมือนกันเพียง ๓ กรดอะมิโน และมีคุณสมบัติที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยเริ่มต้นตั้งแต่การโคลนยีนขึ้นด้วยวิธีการ PCR และนำไปแสดงออกให้ได้เป็นจำนวนมาก ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งในระบบการแสดงออกของเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาี้ สามารถทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ ได้จากทั้ง ภายในเซลล์ ในส่วนช่องว่างระหว่างผนังเซลล์ (periplasmic space) หรือจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย

สามารถผลิตเอนไซม์ได้เป็นจำนวนมาก คือมีปริมาณ ๒๐ มิลลิกรัม จากการเลี้ยงในน้ำเลี้ยงปริมาตร ๑ ลิตร เอนไซม์ที่ได้จากวิธีการพันธุวิศวกรรมนี้มีโครงสร้าง 6xHis-tag เชื่อมอยู่ที่ปลาย C-terminus จึงสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายและสะดวกด้วยวิธีการเพียงขั้นเดียวโดยการใช้ immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ค่าจำเพาะในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ (specific activity) ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส เมื่อใช้ *p*-NP-chitobiose และ colloidal chitin เป็นสารตั้งต้นคือ 0.946 +/- 0.030 และ 5.11 +/- 0.20 units/mg ตามลำดับ โดยสถานะที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๖ เอนไซม์นี้สามารถทนค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง ๓ - ๑๒ ได้นาน ๓๐ นาที ที่อุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส และสามารถทนค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง ๔ - ๑๒ ได้นาน ๑๘ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส นอกจากนั้นแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ย่อย colloidal chitin ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๔, ๖ และ ๘ ได้นานถึง ๓ วัน โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายคือ *N*-acetyl glucosamine และ chitobiose

๔.๒ ข้อวิจารณ์

เนื่องจากมีข้อจำกัดด้านงบประมาณ ผู้วิจัยจึงสามารถทำได้เฉพาะการพัฒนาเอนไซม์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเอนไซม์ทั้ง ๓ ชนิด ที่ได้พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัยนี้ มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในการแปรรูปกากไคนิน ที่เตรียมได้จากของเหลือจากอุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็งในระดับอุตสาหกรรม เพราะสามารถทนความร้อนได้สูง ทนสถานะความเป็นกรด ต่าง ได้ในช่วงกว้าง รวมทั้งเอนไซม์ Chi128mt ยังสามารถทำงานที่ภาวะกรดได้ดีกว่าเอนไซม์อื่นๆ ซึ่งผู้วิจัยมีแนวความคิดว่าหากนำเอนไซม์ทั้ง ๓ ตัวที่ได้พัฒนาขึ้นมาใช้ร่วมกัน ก็น่าจะเกิดประโยชน์สูงสุด ในขั้นต่อไปผู้วิจัยจะได้นำเอนไซม์นี้ไปต่อยอดการวิจัยเพื่อให้ใช้ได้จริง แต่เนื่องจากผลจากการวิเคราะห์ product พบว่า สารหลักที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย colloidal chitin ด้วย chitinases คือ *N*-acetyl glucosamine (NAG) และ chitobiose ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุล เดี่ยว และโมเลกุลคู่ตามลำดับ แต่ยังไม่มีย่านน้ำตาลที่มีโมเลกุลยาวกว่านี้ ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไป ผู้วิจัยจะพยายามหาเอนไซม์ หรือสถานะอื่นที่เหมาะสมในการผลิตให้ได้ chito-oligosaccharide ที่มีสายยาวมากกว่านี้ เพราะเคยมีรายงานว่า chito-oligosaccharide ที่มีสายยาวนั้นมีฤทธิ์ทางชีววิทยาหลายอย่างดีกว่าแบบสายสั้น อย่างไรก็ตาม product ที่ได้จากการวิจัยนี้คือ NAG และ chitobiose ก็ถือเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มที่มีประโยชน์หลายอย่าง อาทิเช่น มีรายงานว่า NAG มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ และสามารถนำมาใช้รักษาโรค ulcerative colitis และ โรคทางเดินอาหารอักเสบได้ (Russell, 1999) นอกจากนั้นแล้วยังสามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารสำหรับรักษาโรค chronic inflammatory bowel disease ในเด็กได้ (Salvatore et al., 2000) นอกจากนั้นแล้ว อนุพันธ์ NAG คือ glucosamine ยังสามารถใช้เป็นโภชนเภสัชเพื่อการบรรเทาอาการข้อเสื่อมได้ (Huskisson, 2008) ส่วน chitobiose นั้นสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นใน ปฏิกิริยา transglycosylation เพื่อสร้าง chito-oligosaccharide สายยาว (Kobayashi et al., 1997) หรือใช้เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดได้ (Terayama et al., 1993)

ข้อดีของระบบการผลิต recombinant enzyme ตามที่อธิบายในโครงการวิจัยนี้คือเอนไซม์สามารถหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์หากจะนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากในขั้นตอน downstream processing เพราะการเก็บเกี่ยวเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเริ่มมีต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำกว่ามาก อย่างไรก็ตามในการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ปริมาณน้อยเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ การเก็บเกี่ยวเอนไซม์จาก whole cell lysate หรือ periplasm จะสะดวกกว่าเพราะเอนไซม์มีความเข้มข้นมากกว่า (Yamabhai et al., 2011) นอกจากนั้นระบบการแสดงออกของเอนไซม์นี้

ยังสะดวกในการปรับใช้ในการทำ high-throughput screening เพื่อหาโคลนที่มีเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติขึ้นที่สภาวะต่างๆ เพราะสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นแยกออกจากเซลล์ โดยไม่ต้องย่อยเซลล์ก่อน ทำให้ประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

องค์ความรู้ที่สำคัญอีกประการหนึ่งนอกเหนือจาก เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติ ๓ ตัวที่ได้จากโครงการวิจัยนี้คือ แนวทางการปรับปรุงเอนไซม์ chitinase ให้มีคุณสมบัติขึ้นสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ โดยเฉพาะในสวนวิธีการ screen เอนไซม์แบบ high-throughput ซึ่งสามารถปรับใช้กับเอนไซม์อื่นๆ ได้ โดยเฉพาะ hydrolytic enzymes นอกจากนั้นแล้วข้อมูลเชิงลึกทางพลศาสตร์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ จะเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาเชิงลึกในด้านความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และหน้าที่ของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ในระดับโมเลกุลต่อไป โดยในขณะนี้ผู้วิจัยได้กำลังศึกษาโครงสร้างเชิง ๓ มิติของเอนไซม์นี้อยู่

บรรณานุกรม

- Aam, B.B., Heggset, E.B., Norberg, A.L., SØrlie, M., Vårum, K.M., Eijsink, V.G.H., (2010) Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Mar Drugs* 8, 1482-1517.
- Arnold, F.H., Georgiou, G., (2003) Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods. In: Walker, J.M. (Ed.), *Methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Arnold, F.H., Volkov, A.A., (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 3, 54-59.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K., (2007) Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol* 27, 21-28.
- Bloom, J.D., Meyer, M.M., Meinhold, P., Otey, C.R., MacMillan, D., Arnold, F.H., (2005) Evolving strategies for enzyme engineering. *Curr Opin Struct Biol* 15, 447-452.
- Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H., Monticello, D.J., (2001) DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat Biotechnol* 19, 354-359.
- Cohen-Kupiec, R., Chet, I., (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9, 270-277.
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S., (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 773-782.
- Donzelli, B.G., Ostroff, G., Harman, G.E., (2003) Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. *Carbohydr Res* 338, 1823-1833.
- Farinas, E.T., Bulter, T., Arnold, F.H., (2001) Directed enzyme evolution. *Curr Opin Biotechnol* 12, 545-551.
- Hayes, M., Carney, B., Slater, J., Bruck, W., (2008a) Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan--Part A: extraction methods. *Biotechnol J* 3, 871-877.
- Hayes, M., Carney, B., Slater, J., Bruck, W., (2008b) Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan--Part B: applications. *Biotechnol J* 3, 878-889.
- Huskisson, E.C., (2008) Glucosamine and chondroitin for osteoarthritis. *J Int Med Res* 36, 1161-1179.
- Jollès, P., Muzzarelli, R.A.A., (1999) *Chitin and Chitinases*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Khoushab, F., Yamabhai, M., (2010) Chitin Research Revisited. *Marine Drugs* 8, 1988-2012.
- Kobayashi, S., Kiyosada, T., Shoda, S.-i., (1997) A novel method for synthesis of chitobiose via enzymatic glycosylation using a sugar oxazoline as glycosyl donor. *Tetrahedron Letters* 38, 2111-2112.
- Koga, D., Mitsutomi, M., Kono, M., Matsumiya, M., (1999) Biochemistry of chitinases. *EXS* 87, 111-123.
- Kolkman, J.A., Stemmer, W.P., (2001) Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nat Biotechnol* 19, 423-428.
- Lutz, S., Patrick, W.M., (2004) Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Current opinion in Biotechnology* 15, 291-297.
- Muzzarelli, R.A.A., (1977) *Chitin*. Pergamon Press, Oxford UK.
- Muzzarelli, R.A.A., (1998) Chitin and its derivatives: New trends of applied research. *Carbohydrate Polymers* 3, 53-75.

- Ostermeier, M., (2003) Theoretical distribution of truncation lengths in incremental truncation libraries. *Biotechnol Bioeng* 82, 564-577.
- Ostermeier, M., Nixon, A.E., Benkovic, S.J., (1999) Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7, 2139-2144.
- Patil, R.S., Ghormade, V.V., Deshpande, M.V., (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* 26, 473-483.
- Patten, P.A., Howard, R.J., Stemmer, W.P.C., (1997) Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 724-733.
- Pelletier, J., (2001) A RACHITT for our toolbox. *Nat Biotechnol* 19, 314-315.
- Rattanakit, N., Yang, S., Wakayama, M., Plikomol, A., Tachiki, T., (2003) Saccharification of chitin using solid-state culture of *Aspergillus* sp. S1-13 with shellfish waste as a substrate. *J Biosci Bioeng* 95, 391-396.
- Russell, A.L., (1999) Glycoaminoglycan (GAG) deficiency in protective barrier as an underlying, primary cause of ulcerative colitis, Crohn's disease interstitial cystitis and possibly Reiter's syndrome. *Medical Hypotheses* 52, 297-301.
- Ryu, D.D.Y., Nam, D.-H., (2000) Biomolecular engineering: a new frontier in biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10, 23-37.
- Salvatore, S., Heuschkel, R., Tomlin, S., Davies, S.E., Edwards, S., Walker-Smith, J.A., French, I., Murch, S.H., (2000) A pilot study of N-acetyl glucosamine, a nutritional substrate for glycosaminoglycan synthesis, in paediatric chronic inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 1567-1579.
- Sieber, V., Martinez, C., Arnold, F., (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat Biotechnol* 19, 456-460.
- Stemmer, W.P., (1994a) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10747-10751.
- Stemmer, W.P.C., (1994b) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370, 389-391.
- Terayama, H., Takahashi, S., Kuzuhara, H., (1993) Large-Scale Preparation of *N,N'*-Diacylchitobiose by Enzymic Degradation of Chitin and its Chemical Modifications. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 12, 81 - 93.
- Yamabhai, M., Buranabanyat, B., Jaruseranee, N., Songsiririthigul, C., (2011) Efficient *E. coli* expression systems for the production of recombinant β -mannanases and other bacterial extracellular enzymes. *Bioengineered bugs* 2.
- Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N., Buranabanyat, B., (2008) Secretion of recombinant *Bacillus hydrolytic* enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *J Biotechnol* 133, 50-57.
- Zhao, H., Arnold, F.H., (1997) Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res* 25, 1307-1308.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J., Arnold, F., (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol* 16, 258-261.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก: การเผยแพร่ผลงานวิจัย

๑. ผลงานตีพิมพ์ที่วารสารวิชาการนานาชาติ

1. Songsiriritthigul, C., Pesatcha, P., Eijsink, V.G., Yamabhai, M., (2009) Directed evolution of a Bacillus chitinase. Biotechnol J 4, 501-509.
2. Songsiriritthigul, C., Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P., Yamabhai, M., (2010) Expression and characterization of Bacillus licheniformis chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. Bioresour Technol 101, 4096-4103.

๒. ผลงานนำเสนอในงานประชุมทางวิชาการต่างๆ

1. Pesatcha, P., Yamabhai, m., (2005) Cloning and expression of Bacillus chitinase in Escherchia coli. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand 18-20 October 2005.
2. Pesatcha, P., Suginta, W., Yamabhai, M., (2006) Directed Evolution of Chitinase for Industrial Applications (oral). The 11th Biological Sciences Graduate Congress “Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future”, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
3. Pesatcha, P., Yamabhai, M., (2007) Directed Evolution of Chitinase for Industrial Applications (oral). การประชุมวิชาการโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (TRF-MAG), โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี, 20-22 เมษายน 2550.
4. Yamabhai, M., Pesatcha, P., (2007) Directed Evolution of Chitinase for Application in Food Industry. . Control and exploitation of enzymes for added-value products, COST Action 928 September 26-28, 2007 (poster), Vienna, Austria.
5. Yamabhai, M., Vincent G.H., E., Pesatcha, P., Songsiriritthigul, C., (2008) Improvement of endochitinase activity by directed evolution. ESF-EMBO Conference on Protein Design and Evolution for Biocatalysis, 25-30 October 2008. (poster), Sant Feliu de Guixols, Spain.
6. Yamabhai, M., Songsiriritthigul, C., Sukasem, S., Haltrich, D., (2009) High throughput screening for improved stability of hydrolytic enzymes. The 8th International Conference on Protein Stabilisation. ProStab2009 Graz University of Technology, Graz, Austria, April 14 - 17, 2009.

ภาคผนวก ข: รายการครุภัณฑ์

Autoclave:	Hiclave HA-3000MIV, Hirayama, Japan
Balance:	Precisa 205A, Precisa Instruments, Switzerland Precisa 3000C, Precisa Instruments, Switzerland
Centrifuge machine:	Sorvall RC5C plus, Kendro laboratory Products, USA Eppendorf centrifuge 5810 R, Eppendorf, US
Deep freezer - 70 °C:	Heto, Ultra Freeze, Denmark.
ELISA reader:	Sunrise, TECAN, Austria
Electroporator :	Eppendorf 2510, Eppendorf, USA
Freezer -20 ° C:	Heto, HLLF 370, Denmark. MyBio LFT420, DAIREI, Denmark
Gel Document set:	White/Ultraviolet Transilluminator GDS7500, UVP, USA Digital Graphic Printer UP-D890, Sony, Japan.
Gel dryer:	Drygel sr. SLAB GEL Dryer model SE1160, Hoefer Scientific Instruments, USA
Gel electrophoresis:	Mini Protean® 3 cell, BioRad, USA
Heat Box:	HB1, Wealtee Corp., USA
Incubator shaker:	C24 Incubator shaker, New Brunswick Scientific, USA
Incubator:	Memmert, BE 500, WTB Binder BD115, Shel-Lab 2020 Low Temperature Incubator, Sheidon, USA
Laminar hood:	Holten LaminAir HBB 2448, Denmark. BH2000 Series ClassII Biological Safety Cabinets, BHA120 & BHA180, Clyde-Apac,
Membrane transfer:	Semi Phor, Hoefer Scientific instruments, USA
Microcentrifuge:	Mini spin plus, Eppendorf, USA Eppendorf 54154, Eppendorf, Germany
pH meter:	Ultra Basic pH meter UB-10, Denver Instruments, Germany
PCR machine:	DNA Engine PTC 200 peltier Thermal cycler, MJ Research, USA
Rotator:	Certomat TCC, B. Braun Biotech International, Germany Rotator AG, Fine PCR, Korea
Shaker:	Innova 2300 platform shaker, New Brunswick Scientific, UK Certomat TC2, B. Braun Biotech International, Germany
Sonicator:	Waken GE100 Ultrasonic processor, Japan
Spectrophotometer:	Ultrospec 2000, Pharmacia biotech, UK
Stirrer:	Variomag Electronicrührer Poly 15, Germany Magnetic stirrer MSH300, USA Hot plate stirrer Labtech, Korea
Thermomixer:	Thermomixer compact, Eppendorf, USA

ภาคผนวก ค: สารเคมีที่ใช้

All chemicals were molecular grade or analytic grade.

1. Colloidal chitin

Ten gram of chitin from crab was hydrolyzed with 200 ml of cold conc. HCl acid and stir at 4 °C for overnight. Then, 50% ethyl alcohol was added and filtrated troughs filter paper and then washed by water until pH reach to pH 6.0.

2. 10X p-Dimethylaminobenzaldehyde (DMAB)

Stock Dimthylaminobenzaldehyde (DMAB) (Sigma) reagent: 10g DMAB was dissolved in 12.5% V/V concentrated hydrochloric acid in glacial acetic acid. Stock reagent was diluted 1: 10 with glacial acetic acid before use.

3. Reagent for PCR amplification

25 mM dNTP mix (New England BioLabs)

10X Pfu buffer (New England BioLabs)

4. Reagent for agarose gel electrophoresis

Agarose low EEO. Molecular biology grade (Research organics)

25 bp DNA ladder (Invitrogen)

1X TAE Buffer

1 Kb Ladder marker DNA (Bio Lab)

6X Loading dye Reagent for transformation

5. Congo Red (Sigma) Reagent for assay chitinase on plate

6. 30% polyacrylamide (BioRAD)

7. 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

8. 0.5 M Tris-HCl pH 6.0.8

9. 10% Amonium persulfate

10. 10% Sodium dodecylsulfate

11. 0.01% glycol chitin

12. PVDF membrane (BioRAD)

13. Reagent for Western Blot

14. HisProbe-HRP (PIERCE)

15. ECL solution

16. 30% Hydrogen Peroxide (Sigma)

17. Enzymes

Taq DNA polymerase (New England BioLabs)

Pfu DNA polymerase (New England BioLabs)

T4 ligase (New England BioLabs)

HindIII (New England BioLabs)

XhoI (New England BioLabs)

NcoI (New England BioLabs)

DNaseI (Fermentas)

18. Primer

chiHind3

(5'-CTGTGCAAGCTTTTGTGCATGTTGCTGAGCTTGTCAATTG-3')

chiXhoI

(5'-CTGTGCCTCGAGTCCATTTGACTTTCTGTTATTTCGCAGCCTC- 3')

chiNcoI

(5'-CTGTGCAAGCTTTTGTGCATGTTGCTGAGCTTGTCAATTG-3')

19. Reagent for enzymes purification

Ni-NTA resins (QIAGEN)

Lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 10 mM imidazole, pH 8.0)

Wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 40 mM imidazole, pH 8.0)

Elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 250 mM imidazole, pH 8.0)

20. Reagent for analysis of enzyme activity

4-nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose (Sigma)

1 N NaOH (Sigma)

Dimethylaminobenzaldehyde (DMAB)

ภาคผนวก ง: ลำดับเส้น DNA และโปรตีนของเอนไซม์ chitinase ทั้งหมดในการทดลองนี้

ลำดับเส้น DNA ในรูปแบบ FASTA

>pFChi13

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTTGCGCAAGCTTTT
GTCATGTTGCTGAGCTAGTCATTTGTGAATGGGGAAGTTGCAAAGCCGATTCCGGAAAAACTAT
AAAATCATCGGCTACTATCCATCATGGGGTGCTTATGGAAGGGATTTTCAAGTTTGGGATATGGAC
GTTTCGAAAGTCAGCCACATTAATTATGCCTTTGCTGATATTTGCTGGGAGGGAAGGCATGGAAC
CCTGATCCGACAGGCCCAATCCTCAAACGTGGTCAATGCCAGGATGAAAACGGAGTGATCGACGCG
CCAAATGGAACAATCGTGATGGGCGATCCCTGGATTGACGCACAAAAGTCAAATCCCGGGGATGTC
TGGGATGAACCGATCCGCGGCAACTTTAAACAATTGTTGAAGCTGAAAAGAGCCACCCTCATTTG
AAAACGTTTCATATCGGTTCGGGGGGTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCAGATGTCGCGGCAGATCCT
GCGGCAAGGGAGAATTTGCGCGCTTCGGCCGTTGAGTTTTTAAGGAAATACGGGTTTGACGGGGTC
GATCTTGACTGGGAATATCCGGTCAGCGGAGGATTGCCGGGGAACAGCACACGTCCGGAAGATAAA
AGAACTACACGCTGCTCCTGCAAGAGGTGCGCAAAAAACTTGACGCTGCAGAAGCAAAGACGGC
AAGGAATACTTGTGACGATCGCATCCGGCGCAAGTCCCGATTATGTAAGCAACACTGAGCTCGAT
AAAATCGCTCAAACCGTGGATTGGATTAACATTATGACCTATGACTTTAATGGCGGATGGCAAAGC
ATAAGCGCCATAATGCACCGCTGTTCTATGATCCAAAAGCGAAAAGAAGCAGGCGTTCCAAACGCT
GAGACCTACAATATTGAAAACACTGTGAAACGCTACAAGGAAGCCGGTGTCAAGGGTGACAAATTA
GTGCTTGGAACACCGTTCTACGGAAGGGGCTGGAGCGGTTGTGAACCAGGGGGGCACGGAGAATAT
CAGAAATGCGGACCGGCTAAAGAAGGGACATGGGAAAAGGGCGTATTCGATTTTTTCAGATCTTGAA
AGGAATATGTGAATCAAAACGGCTATAAAAGGTATTGGAACGATCAAGCAAAGTGCCGTTTTTG
TATAATGCGGAAAATGGCAATTTTCATCACTTATGATGATGAACAATCATTTCGGCCACAAAACGGAT
TTTATTAAGCAAACGGATTAAGCGGAGCAATGTTCTGGGATTTTCAGCGGCGATTCCAATCCGACG
CTTCTCAATAAATTGGCAGCCGATTTAGATTTTGCACCGGACGGAGGCAATCCGGAGCCGCCTTCA
TCGGCACCTGTGAATGTGCGTGTAACCGGAAAGACTGCTACAAGTGTGACCTGGCGTGGGATGCG
CCGAGCAGCGGAGCAAACATTGCGGAATATGTCGTGTCATTTGAAAACCGGTCGATATCTGTAAAA
GAAACATCAGCGGAAATAGGCGGCTTGAAGCCGGGTACGGCCTACTCATTTACTGTTTCAGCAAAG
GATGCGGATGGAAAGCTCCATGCCGGACCAACGGTAGAGGTCACGACGAATCTGACCAAGCCTGT
TCATATGACGAATGGAAAGAGACGAGCGCATAACAGGCGGAGAGCGGGTTGCATTTAACGGAAAA
GTGTATGAAGCGAAATGGTGGACGAAAGGCGACCGGCCTGATCAATCCGGTGAATGGGGCGTATGG
CGGCTGATCGGAGGCTGCGAACACCACCACCACCACCCTGACTCGACTACAAGGANCGATGA

>pF128mt

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTTGCGCAAGCTTTT
GTCATGTTGCTGAGCTTGTGATTTGTGAGTGGGGAAGTTGCAAAGCCGATTCCGGAAAAACTAT
AAAATCATCGGCTACTATCCATCATGGGGTGCTTATGGAAGGGATTTTCAAGTTTGGGATATGGAC
GTTTCGAAAGTCAGCCACATTAATTATGCCTTTGCTGATATTTGCTGGGAGGGAAGGCATGGAAC
CCTGATCCGACAGGCCCAATCCTCAAACGTGGTCAATGCCAGGATGAAAACGGAGTGATCGACGCG
CCAAATGGAACAATCGTGATGGGCGATCCCTGGATTGACGCACAAAAGTCAAATCCCGGGGATGTC
TGGGATGAACCGATCCGCGGCAACTTTAAACAATTGTTGAAGCTGAAAAGAGTCAACCTCATTTG
AAAACGTTTCATATCGGTTCGGGGGGTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCAGATGTCGCGGCAGATCCT
GCGGCAAGGGAGAATTTGCGCGCTTCGGCCGTTGAGTTTTTAAGGAAATACGGGTTTGACGGGGTC
GATCTTGACTGGGAATATCCGGTCAGCGGAGGATTGCCGGGGAACAGCACACGTCCGGAAGATAAA
AGAACTACACGCTGCTCCTGCAAGAGGTGCGCAAAAAACTTGACGCTGTAGAAGCAAAGACGGC
AAGGAATACTTGTGACGATCGCATCCGGCGCAAGTCCCGATTATGTAAGCAACACTGAGCTCGAT
AAAATCGCTCAAACCGTGGATTGGATTAACATTATGACCTATGACTTTAATGGCGGATGGCAAAGC
ATAAGCGCCATAATGCACCGCTGTTCTATGATCCAAAAGCGAAAAGAAGCAGGCGTTCCAAACGCT
GAGACCTACAATATTGAAAACACTGTGAAACGCTACAAGGAAGCCGGTGTCAAGGGTGACAAATTA

GTGCTTGGAAACACCGTTCTACGGAAGGGGCTGGAGCGGTTGTGAACCAGGGGGGCACGGAGAATAT
CAGAAATGCGGACCGGCTAAAGAAGGGACATGGGAAAAGGGCGTATTCGATTTTTTCAGATCTTGAA
AGGAACTATGTGAATCAAAACGGCTATAAAAAGGTATTGGAACGATCGAGCAAAAAGTGCCGTTTTTG
TATAATGCGGAAAATGGCAATTTTCATCACTTATGATGATGAACAATCATTTCGGCCACAAAACGGAT
TTTATTAAAGCAAACGGATTAAGCGGAGCAATGTTCTGGGATTTTCAGCGGCGATTCCAATCGGACG
CTTCTCAATAAATTGGCAGCCGATTTAGATTTTGCACCGGACGGAGGCAATCCGGAGCCGCCTTCA
TCGGCACCTGTGAATGCGCGTGTAAACCGGAAAACTGCTACAAGTGTGAGCCTGGCGTGGAAATGCG
CCGAGCAGCGGAGCAAACATTGCGGAATATGTCGTGTCATTTGAAAACCGGTCGATATCTGTAAAA
GAAACATCAGCGGAAATAGGCGGCTTGAAGCCGGGTACGGCCTACTCATTTACTGTTTCAGCAAAG
GATGCGGATGGAAAGCTCCATGCCGGACCAACGGTAGAGGTCACGACGAATTCTGACCAAGCCTGT
TCATATGACGAATGGAAAGAGACGAGCGCATAACAGGGCGGAGAGCGGGTTGCATTTAACGGAAAA
GTGTATGAAGCGAAATGGTGGACGAAAGGGCGACCGGCTGATCAATCCGGTGAATGGGGCGTATGG
CGGCTGATCGGAGGCTGCGAACACCACCACCACCACCCTGA

>pFchi8785

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTTCGCTACCGTTGCGCAAGCTTTT
GTCATGTTGCTGAGCTTGTCAATTTGTGAATGGGGAAGTTGCAAAAGCCGATTCGGGAAAAACTAT
AAAATCATCGGCTACTATCCATCATGGGGTGCTTATGGAAGGGATTTTCAAGTTTGGGATATGGAC
GTTTCGAAAGTCAGCCACATTAATTATGCCTTTGCTGATATTTGCTGGGAGGGAAGGCATGGGAAC
CCTGATCCGACAGGCCCAATCCTCAAACGTGGTCATGCCAGGATGAAAACGGAGTGATCGACCGG
CCAAATGGAACAATCGTGATGGGCGATCCCTGGATTGACGCACAAAAGGCAAATCCCGGGGATGTC
TGGGATGAACCGATCCGCGGCAACTTTAAACAATTGTTGAAGCTGAAAAAGAGCCACCCTCATTTG
AAAACGTTCATATCGGTCGGGGGGTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCAGATGTCGCGGCAGATCCT
GCGGCAAGGGAGAATTTGCGCGCTTCGGCCGTTGAGTTTTTAAGGAAATACGGGTTTGACGGGGTC
GATCTTGACTGGGAATATCCGGTCAGCGGAGGATTGCCGGGGAACAGCACACGTCGGGAAGATAAA
AGAACTACACGCTGCTCCTGCAAGAGGTGCGCAAAAAACTTGACGCTGCAGAAGCAAAAGACGGC
AAGGAATACTTGCTGACGATCGCATCCGGCGCAAGTCCCGATTATGTAAGCAACACTGAGCTCGAT
AAAATCGCTCAAACCGTGGATTGGATTAACATTATGACCTATGACTTTAATGGCGGATGGCAAAGC
ATAAGCGCCATAATGCACCGCTGTTCTATGATCCAAAAGCGAAAGAAGCAGGCGTTCCAAACGCT
GAGACCTACAATATTGAAAACACTGTGAAACGCTACAAGGAAGCCGGTGTCAAGGGTGACAAATTA
GTGCTTGGAAACACCGTTCTACGGAAGGGGCTGGAGCGGTTGTGAACCAGGGGGGCACGGAGAATAT
CAGAAATGCGGACCGGCTAAAGAAGGGACATGGGAAAAGGGCGTATTCGATTTTTTCAGATCTTGAA
AGGAACTATGTGAATCAAAACGGCTATAAAAAGGTATTGGAACGATCAAGCAAAAAGTGCCGTTTTTG
TATAATGCGGAAAATGGCAATTTTCATCACTTATGATGATGAACAATCATTTCGGCCACAAAACGGAT
TTTATTAAAGCAAACGGATTAAGCGGAGCAATGTTCTGGGATTTTCAGCGGCGATTCCAATCGGACG
CTTCTCAATAAATTGGCAGCCGATTTAGATTTTGCACCGGACGGAGGCAATCCGGAGCCGCCTTCA
TCGGCACCTGTGAATGTGCGTGTAAACCGGAAAACTGCTACAAGTGTGAGCCTGGCGTGGGATGCG
CCGAGCAGCGGAGCAAACATTGCGGAATATGTCGTGTCATTTGAAAACCGGTCGATATCTGTAAAA
GAAACATCAGCGGAAATAGGCGGCTTGAAGCCGGTAC

ลำดับเส้นโปรตีนในรูปแบบ FASTA

>pFchi13pt

MKKTAAIAVALAGFATVAQAFVMLLS-SFVNGEVAKADSGKNYKIIIGYPSWGAYGRD
FQVWMDVSKVSHINYAFADICWEGRHGNPDPTGPNPQTWSCQDENGVIDAPNGTIVMGD
PWIDAQKSNPGDVWDEPIRGNFKQLLKLKSHPHLKTFSVGGWTWSNRFS DVAADPAAR
ENFAASAVEFLRKYGFDGVDLDWEYPVSGGLPGNSTRPEDKRNITLLLQEVKRLDAAEA
KDGKEYLLTIASGASPDYVSNTLKDIAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHNAPLFYDPK
AKEAGVPNAETYNIENTVKRYKEAGVKGDKLVLTGTPFYGRGWSGCEPGGHGEYQKCGPAK

EGTWEKGVDFDFSDLERNYVNQNGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFITYDDEQSFHGKTD
IKANGLSGAMFWDFSGDSNRTLLNKLAADLDFAPDGGNPEPPSSAPVNVVVTGKTATSVS
LAWDAPSSGANIAEYVVSFENRSISVKETSAEIGGLKPGTAYSFTVSAKDADGKLHAGPT
VEVTTNSDQACSYDEWKETSAYTGGERVAFNGKVYEAKWWTKGDRPDQSGEWGVWRLIGG
CEHHHHHH

>pFchi128mtpt

MKKTATAIAVALAGFATVAQAFVMLLSLSFVSGEVAKADSGKNYKIIGYYPSWGAYGRD
FQVWMDVSKVSHINYAFADICWEGRHGNPDPTGPNPQTWSCQDENGVIDAPNGTIVMGD
PWIDAQKSNPGDVWDEPIRGNFQQLLKLKSHPHLKTFSVGGWTWSNRFSVAADPAAR
ENFAASAVEFLRKYGFDGVDLDWEYVVSGLPGNSTRPEDKRNYTLLLQEVRRKLDAVEA
KDGKEYLLTASGASPDYVSNTLKDIAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHNAPLFYDPK
AKEAGVPNAETYNIENTVKRYKEAGVKGDKLVLGTPFYGRGWSGCEPGGHGEYQKCGPAK
EGTWEKGVDFDFSDLERNYVNQNGYKRYWNDRAKVPFLYNAENGNFITYDDEQSFHGKTD
IKANGLSGAMFWDFSGDSNRTLLNKLAADLDFAPDGGNPEPPSSAPVNVVVTGKTATSVS
LAWNAPSSGANIAEYVVSFENRSISVKETSAEIGGLKPGTAYSFTVSAKDADGKLHAGPT
VEVTTNSDQACSYDEWKETSAYTGGERVAFNGKVYEAKWWTKGDRPDQSGEWGVWRLIGG
CEHHHHHH

>pFchi8785pt

MKKTATAIAVALAGFATVAQAFVMLLSLSFVNGEVAKADSGKNYKIIGYYPSWGAYGRD
FQVWMDVSKVSHINYAFADICWEGRHGNPDPTGPNPQTWSCQDENGVIDAPNGTIVMGD
PWIDAQKANPGDVWDEPIRGNFQQLLKLKSHPHLKTFSVGGWTWSNRFSVAADPAAR
ENFAASAVEFLRKYGFDGVDLDWEYVVSGLPGNSTRPEDKRNYTLLLQEVRRKLDAAEA
KDGKEYLLTASGASPDYVSNTLKDIAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHNAPLFYDPK
AKEAGVPNAETYNIENTVKRYKEAGVKGDKLVLGTPFYGRGWSGCEPGGHGEYQKCGPAK
EGTWEKGVDFDFSDLERNYVNQNGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFITYDDEQSFHGKTD
IKANGLSGAMFWDFSGDSNRTLLNKLAADLDFAPDGGNPEPPSSAPVNVVVTGKTATSVS
LAWDAPSSGANIAEYVVSFENRSISVKETSAEIGGLKPGTAYSFTVSAKDADGKLHAGPT
VEVTTNSDQACSYDEWKETSAYTGGERVAFNGKVYEAKWWTKGDRPDQSGEWGVWRLIGG
CEHHHHHH

ประวัตินักวิจัย

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ ๘ มกราคม ๒๕๑๐ เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อ่ำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตรบัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา ๑ ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี ๒๕๓๖ ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา ๕ เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ จากนั้นในปี พ.ศ. ๒๕๔๓-๒๕๔๕ ได้ทุนไปทำ post-doctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. ๒๕๔๖-๒๕๔๗ ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Institute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธ์รัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. คิฎฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ ๑๖ สิงหาคม ๒๕๔๗ และมีบุตร ๑ คน ชื่อ คณ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และ วิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) จนถึงปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ๒๘ เรื่อง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของมหาบัณฑิต ๔ คน และคุณวุฒิปริญญา ๔ คน และเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยทั้งหมด ๒๐ โครงการ แล้วเสร็จ ๑๕ โครงการ

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา ๓๐๐๐๐

โทร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๒-๔ ๒๒๔๒๓๔ หรือ ๒๔๔๓๘๘ โทรสาร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๐

Email: montarop@g.sut.ac.th