บทคัดย่อ

เอนไซม์ไคโตไบเอสหรือเอ็น อะซิทิลกลูโคซามินิเดสจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไกลโคซิลไฮโดรเสล แฟมิลี 3 หรือแฟมิลี 20 ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองแฟมิลีมีความแตกต่างกันทั้งลำดับของกรดอะมิโนและกลไกในการเร่งปฏิกิริยา ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการแยกยีนของเอนไซม์เอ็น อะซิทิลกลูโคซามินิเดสแฟมิลี GH-20 สองตัวคือ VhNag1 และ VhNag2 จากจีโนมของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (ชื่อเดิมคือ *V. carchariae*) สายพันธุ์ 650 ต่อมาได้ทำการโคลนยีนทั้งสองเข้า pQE60 exression vector ซึ่งสามารถทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน E. coli เจ้าบ้านสายพันธุ์ M15 ได้ การวิเคราะห์สายโพลีเพปไทด์ของ VhNag1 มีขนาด 88,849 Da มีค่า pI เท่ากับ 4.9 มีค่า pH optimum ในช่วงกว้างคือ 6.5-7.5 ส่วนสายโพลีเพปไทด์ของ *Vh*Nag2 polypeptide มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 73,143 Da มีค่า pI เท่ากับ 5.4 และมีค่า pH optimum เท่ากับ 7.0 การศึกษาการย่อยสลายสับสเตรทพบว่ารีคอมบิแนนท์ *Vh*Nag1 และ *Vh*Nag2 ที่ถูกผลิตโดย *E. coli* สามารถย่อยไคตินสับสเตรทได้ทุกชนิด แต่ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเอนไซม์ *Vh*Nag2 ดีกว่าเอนไซม์ *Vh*Nag1 อย่างน้อย 10 เท่า ผลการทดสอบทางชีวเคมีและข้อมูลทางจลนพลศาสตร์พบว่าเอนไซม์ *Vh*Nag2 สามารถย่อยไคตินโอลิโกแซคคาร์ไรด์แบบเป็นลำดับและให้ผลิตผลสุดท้ายเป็น GlcNAc ซึ่งบ่งบอกว่า VhNag2 มีลักษณะเป็น exolytic enzyme นอกจากผลการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสับสตเรทต่าง ๆ พบว่า VhNAg2 ย่อย pNP-$GlcNAc_2$ ได้ดีที่สุด ส่วนเมื่อเทียบกับไคตินโอลิโกแซคคาร์ไรด์ด้วยกันพบว่าไคโตเตตระโอสเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดของ VhNag2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ABSTRACT

Chitobiases or β-N-acetylglucosaminidases are classified into glycosyl hydrolases family 3 (GH-3) or family 20 (GH-20), both are different in sequence identity and mode of enzyme action. In this study, two genes corresponding to GH-20 GlcNAcase homologues (namely *Vh*Nag1 and *Vh*Nag2) were successfully isolated from the genome of *V. harveyi* (formerly classified as *V. carchariae*) type strain 650. Both genes were cloned into pQE50 expression vector, which could be expressed in *E. coli* M15 host cells. The *Vh*Nag1 polypeptide has a molecular weight of 88,849 Da, a pI of 4.9 and a broad range of pH optimum from 6.5 to 7.5, whereas the *Vh*Nag2 polypeptide has a molecular weight of 73,143 Da, a pI of 5.4 and a pH optimum of 7.0. The recombinant *Vh*Nag1 and *Vh*Nag2 expressed by *E. coli* were found to degrade all the tested chitin substrates with *Vh*Nag2 being at least ten fold more active than *Vh*Nag1. The results obtained from different biochemical assays and kinetic characterization consistently suggested that *Vh*Nag2 degraded chitin oligosaccharides in a sequential manner, generating GlcNAc as the final end product, which suggests that VhNag2 is an exolytic enzyme. VhNag2 acts most efficiently on pNP-$GlcNAc_2$. For chitin oligosaccharide, chitotetraose was found to be the best substrate.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี