บทคัดย่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ T142951

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ เอนไซม์เปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตจากแบคทีเรียทนร้อน : จากการคัดเลือกและการจำแนกชนิดแบคทีเรียถึงลักษณะสมบัติของเอนไซม์และการตรวจสอบยีน

Carbohydrate-modifying enzymes from thermotolerant bacteria : From bacterial screening and identification to characterization of enzymes and detection of encoding genes

ชื่อผู้วิจัย 1. รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ 2. ผศ. ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์
3. ผศ. ดร. พีรดา มงคลกุล 4. อ. ดร. รัฐ พิชญางกูร
5. ย. ดร. มัญชุมาส เพราะสุนทร 6. Prof. Dr. Kenji Aoki
7. Assoc. Prof. Dr. Shuichiro Murakami

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Department of Biofunctional Chemistry, Faculty of Agriculture, Kobe University

หมายเลขโทรศัพท์ 02-2185419

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท โครงการความร่วมมือทางวิชาการระหว่างไทย-ญี่ปุ่น
ประจำปี 2544-2545

จำนวนเงิน 944,640 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ กุมภาพันธ์ 2544 ถึง มกราคม 2546

บทคัดย่อ

ปัจจุบันสารประเภทคาร์โบไฮเดรตมีศักยภาพสูงและถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภทโดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์คาร์โบไฮเดรตที่เราสนใจ คือ ไซโคลเดกซ์ทริน (CD) และไคทินโอลิโกแซคคาไรด์ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวัสดุการเกษตรราคาถูก คือ แป้งและไคทิน ตามลำดับ สำหรับไคทินยังเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งอีกด้วย การเปลี่ยนแป้งให้เป็น CD หรือไคทินให้เป็นไคทินโอลิโกเมอร์ ต้องอาศัยเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) และไคทิเนส ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้จากจุลชีพ และหากจุลชีพสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงระหว่างการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ก็จะเป็นข้อดีอันหนึ่ง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์ CGTase และไคทิเนสในปริมาณสูง พิสูจน์สายพันธุ์แบคทีเรีย หาสภาวะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เตรียมและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ และการสร้างไพรเมอร์ เพื่อติดตามยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ สำหรับวิธีดำเนินการในการคัดเลือกแบคทีเรียใช้อาหารจำเพาะและสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม การพิสูจน์สายพันธุ์ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ และการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA การทำเอนไซม์บริสุทธิ์ใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ศึกษาสมบัติของเอนไซม์โดยเทคนิคทางชีวเคมี และใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในการตรวจสอบยีน

ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิต CGTase คือ สายพันธุ์ RB01 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Peanibacillus* เจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ 40°ซ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้มี 3 รูปแบบ ขนาด 65 KDa มี *pI* 5.1-5.3 ให้ผลิตภัณฑ์ α:β:γ-CD ในอัตราส่วน 1.0:5.4:1.2 ใช้ CD ในธรรมชาติเป็นสับสเตรทได้ดีกว่า CD ในรูปอนุพันธ์ มีทริปโตเฟนและฮิสติดีนในบริเวณเร่งเป็นกรดอะมิโนสำคัญต่อแอคติวิตี โดยมีลักษณะเด่น คือ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างสูง คือ 70°ซ และมีความเสถียรดีมากในช่วง 55°ซ และสามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ได้โดยการเติมสับสเตรท นอกจากนี้เราได้สร้างไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของ CGTase ซึ่งสามารถใช้ในการติดตามยีน CGTase อย่างจำเพาะได้

ในส่วนแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตไคทิเนส ได้สายพันธุ์ AT01 ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าเป็น *B.licheniformis* เจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ 50°ซ เอนไซม์บริสุทธิ์มี 3 รูปแบบ ขนาด 72, 70 และ 58 KDa มีค่า *pI* 4.62 ให้ผลิตภัณฑ์เป็นโมโนเมอร์และไดเมอร์ของ *N*-acetylglucosamine ในอัตราส่วนใกล้เคียงกัน มีทริปโตเฟนเป็นกรดอะมิโนสำคัญต่อแอคติวิตีและคาดว่าอยู่ในบริเวณเร่ง มีลักษณะเด่น คือ ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างกว้าง 40-70°ซ และเสถียรมากในช่วง 40-50°ซ นอกจากนี้เราสามารถสร้างไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของไคทิเนสซึ่งใช้ในการติดตามยีนไคทิเนสอย่างจำเพาะได้

TE 142951

Abstract

At present carbohydrates have found high potentiality in many industrial applications especially in pharmaceutical, food and cosmetics. Cyclodextrin (CD) and chitin oligosaccharides, produced by the carbohydrate degradation, have attracted much attention because they can be produced from starch and chitin, the inexpensive agricultural materials. For chitin, it is also one of the waste materials from shrimp industries. The degradation of starch to CD and the degradation of chitin to chitin oligomers involve the use of microbial enzymes, cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) and chitinase respectively. It will be adventageous to use microorganisms that can be grown at high temperature for the production of enzyme. The aims of the project are then to screen and select thermotolerant bacteria that produce high amount of CGTase and chitinase, to identify the strains and to find the optimal conditions for bacterial growth. The project also includes the purification of the enzymes as well as the study of their biochemical properties and to construct primers for the identification of the genes that produce enzymes. The experimental procedures for screening of thermotolerant bacteria producing CGTase and chitinase involve the use of specific media and optimal temperature for growth. Bacterial strains were characterized by their physiological properties and analysis of 16S rRNA gene. For the enzyme purification, column chromatography was employed and the properties of the purified enzymes were then studied using biochemical techniques. The genetic engineering method was performed to detect the CGTase and chitinase genes.

From the results obtained, the thermotolerant bacteria producing CGTase was the isolate RB01 which was proved to be *Paenibacillus*. The optimal temperature for the bacterial growth and the production of the enzyme was at 40°C. The purified enzyme had 3 isoform patterns with the molecular weight of 65 KDa and the pI value of 5.1-5.3. The ratio of products produced α-, β- and γ-cyclodextrins was 1.0:5.4:1.2. The enzyme can use the native CD as its substrate better than the modified CD. The amino acids tryptophan and histidine at the active site were found to be important for the enzyme activity. Its remarkable characteristic was that it could work best at 70°C while the temperature stability was between 45-55°C and its stability could be improved by the addition of its substrate. The DNA primers designed from conserved sequences showed high specificity only to the CGTase gene. Hence, they can be used for the identification of bacteria producing CGTase.

For the production of chitinase form thermotolerant bacteria, the isolate AT01 which was characterized as *B.licheniformis* was grown and was able to produce the enzyme at temperature 50°C. The purified enzyme had 3 isoforms with the size of 72, 60 and 58 KDa and the pI value of 4.62. The products produced were in the form of monomer and dimer of N-acetylglucosamine with approximately in the same ratio. Tryptophan was found to be important for its activity and was anticipated to be in the active site. The important feature was that it could work best in the wide temperature range, 40-70°C while vary stable between 40-50°C. The DNA primers designed from conserved sequences of chitinase can be specifically used to identify the chitinase gene.