232025

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG 5180185

ชื่อโครงการ : การพัฒนาการแสดงออกของ chitinase จาก *Bacillus circulans* No.4.1 บนผิวยีสต์

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.สิริพรรณ ลิ้มศิริชัยกุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

E-mail Address : **limsirichaikul@hotmail.com**

ระยะเวลาโครงการ : ตั้งแต่วันที่ 11 มิถุนายน 2551 ถึงวันที่ 15 พฤษภาคม 2553

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่สามารถย่อยสารไคตินซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในแมลงและเชื้อรา มีผู้วิจัยใช้ไคติเนสในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเพื่อช่วยลดปัญหาการดื้อยา และการปนเปื้อนของสารเคมีต่อสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบการนำไคติเนสมาใช้นั้นอาจยังไม่มีประสิทธิภาพพอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเสนอการนำไคติเนสจากเชื้อ *Bacillus circulan* No.4.1 มาใช้ในรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์บนผิวของยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) โดยการนำยีนไคติเนสจากเชื้อดังกล่าวต่อกับ 3' half agglutinin and glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored signal และควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ GAPDH นอกจากนั้นได้ใช้ EGFP ต่อด้าน N-terminal เพื่อความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ จากการตรวจวิเคราะห์ด้วย colorimetry โดยมี 4-methylumbelliferyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose และ p-nitrophenyl-diacetyl-chitobiose เป็นสารตั้งต้นพบว่า ไคติเนสที่แสดงที่ผิวของยีสต์สามารถทำงานได้ผลมากกว่ายีสต์ที่ไม่มีไคติเนสถึง 7 เท่า และ 4 เท่าตามลำดับ และผลจากการทำ Immunofluorescent และสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นว่าไคติเนส สามารถแสดงออกที่ผิวของยีสต์และสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยใช้ราที่ก่อโรคในพืช พบว่าไคติเนสที่แสดงออกบนผิวยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีโดยเฉพาะผลต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* ดังนั้นการแสดงออกของเอนไซม์ไคติเนส บนผิวยีสต์นี้มีศักยภาพที่จะพัฒนาใช้เป็นตัวควบคุมโดยชีววิธีได้ในอนาคต

232025

Abstract

Project Code : MRG 5180185

Project Title : Yeast surface display of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1

Investigator : Dr. Siripan Limsirichaikul Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

E-mail Address: **limsirichaikul@hotmail.com**

Project Period : June 11, 2010 – May 15, 2010

Chitinase, one of chitinolytic enzymes, mainly digests chitin which is a major component in various organisms, including fungus and insect. Chitinase is promising for biocontrol instead of chemical pesticide which produced many following problems about resistance and environment contamination. However, the implementation of bacterial chitinase has some constraints. We adopted new approach of utilizing chitinase for biocontrol application by immobilized and presented chitinase on the yeast cell surface in consideration to enhance its biocontrol efficacy. To display on surface of *Saccharomyces cerevisiae*, gene of chitinase from *Bacillus circulan* was fused with 3' half agglutinin and glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored signal, and then expressed under regulation of GAPDH promoter. To monitor surface expression, enhanced green fluorescent protein (EGFP) was conjugated at N-terminal of chitinase. Yeast surface display of chitinase showed very high activity against 4-methylumbelliferyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose up to seven-fold higher than parent strain of *S. cerevisiae*. Yeast surface display of chitinase also hydrolyzed p-nitrophenyl-diacetyl-chitobiose up to 3-4 folds higher than no anchoring fragment. It suggested that chitinase was successfully expressed on yeast with active form and revealed higher activity than control. In addition, chitinase on yeast surface display show an antifungal activity against plant pathogenic fungi, especially, *Fusarium oxysporum*; this chitinase-yeast surface display may prove as a potential biocontrol for plant pathogenic fungi.