247392

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247392

รายงานการวิจัย

การผลิตปริมาณสูงและการตรึงเอนไซม์อะลิฟาติกอะมิเดส สำหรับประยุกต์ใช้ในกระบวนการสลายอะคริลาไมด์และอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะคริลิก

High-level production and immobilization of an aliphatic amidase for application in acrylamide degradation and industrial production of acrylic acid

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

b00252680 247392

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247392

รายงานการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การผลิตปริมาณสูงและการตรึงเอนไซม์อะลิฟาติกอะมิเดส สำหรับประยุกต์ใช้ในกระบวนการสลายอะคริลาไมด์และอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะคริลิก

High-level production and immobilization of an aliphatic amidase for application in acrylamide degradation and industrial production of acrylic acid

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การผลิตปริมาณสูงและการตรึงเอนไซม์อะลิฟาติกอะมิเดส สำหรับประยุกต์ใช้ในกระบวนการสลายอะคริลาไมด์และอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะคริลิก" สำเร็จลงด้วยดีเนื่องจากได้รับเงินสนับสนุนงานวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ในส่วนของมหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ตามสัญญาเลขที่ 28/2554 ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ผศ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช

สิงหาคม 2554

บทคัดย่อ

247392

การใช้สารพิษอะคริลาไมด์ที่มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็งในคนอย่างกว้างขวางส่งผลให้พบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ในความเป็นพิษของอะคริลาไมด์ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้พลังงานจากอะคริลาไมด์ในการเจริญได้ โดยเกิดการสลายอะคริลาไมด์เป็นแอมโมเนียและกรดอะคริลิก จากการทำงานของเอนไซม์อะมิเดสหรืออะมิโดไฮโดรเลส (EC 3.5.1.4) ด้วยปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่น ในรายงานวิจัยนี้ได้มุ่งเป้าไปที่การใช้เทคนิคพีซีอาร์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *Enterobacter aerogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ชนิดใหม่ที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งชุมชนใกล้บริเวณนิคมอุตสาหกรรมในจังหวัดชลบุรี และมีศักยภาพในการสลายอะคริลาไมด์สูงที่สุดในจำนวนแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่มีในห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา การทดลองเริ่มต้นจากการใช้ดีเจนเนเรซีไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของยีนอะมิโดไฮโดรเลสในแบคทีเรียสกุล *Enterobacter* spp. เพิ่มปริมาณและโคลนยีนอะมิเดสช่วงปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 297 และ 354 คู่เบสตามลำดับ เข้าสู่พลาสมิด pUC118 และทรานส์ฟอร์มเข้า *Escherichia coli* DH5α นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้มาออกแบบไพรเมอร์ชุดใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะลิฟาติกอะมิเดสในช่วงกลางและช่วงปลาย 3' ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ย้อนกลับแบบจำเพาะ โคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เข้าสู่พลาสมิด pTG19-T และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ผลการทดลองที่ได้พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes* ขนาด 726 คู่เบส ที่สามารถคาดเดาเป็นกรดอะมิโนจำนวน 242 ตัว และมีความคล้ายคลึงมากกว่าร้อยละ 80 กับยีนของเอนไซม์ในกลุ่มไนไตร์เลส/ไซยาไนด์ ไฮโดรเลสและอะมิเดสของ Enterobacteriaceae ที่มีในฐานข้อมูลโลก และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้พบความเหมือนมากกว่าร้อยละ 88 กับเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกัน เมื่อใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจำลองเป็นโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสจาก *E. aerogenes* พบว่าเอนไซม์มีโครงสร้างเป็นโปรตีนก้อนกลมแบบ α/β ที่ประกอบด้วย แอลฟา-ฮีลิกซ์ จำนวน 6 เกลียวและบีตา-ชีท 6 สายที่จับกันเป็นแผ่นเรียบ 2 แผ่น ที่มีความคล้ายคลึงร้อยละ 45 กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไนตราเลสจาก *Xanthomonas camprestis* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่ใช่พันธะเพปไทด์ ผลการทดลองที่ได้แสดงถึงความสำเร็จในการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณชิ้นยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการโคลนและแสดงออกยีนดังกล่าวในระบบโปรคาริโอตต่อไป

คำสำคัญ อะลิฟาติกอะมิเดส, การสลายอะคริลาไมด์, การผลิตกรดอะคริลิก, การตรึงรูปเอนไซม์, การโคลนยีน

Abstract

247392

A widespread use and indiscriminate discharge of acrylamide, a neurotoxicant and probably human carcinogen has led to their presence in environment. In spite of its general toxicity, some microorganisms can derive energy from acrylamide for growth. In its catabolism, acrylamide is deaminated to ammonia and acrylic acid, a process catalyzed by amidase or amidohydrolase (EC 3.5.1.4). In this study, an attempt has been tried to identify an aliphatic amidase gene from *Enterobacter aerogenes*, a novel acrylamide-degrading bacterium isolated from domestic wastewater in Chonburi. The amidase gene from this bacterium was initially identified by PCR using degenerate primers designed from conserved amino acid sequences of amidohydrolase genes of *Enterobacter* spp. Amino- and carboxy-terminal fragment of the gene consisted of 297 and 354 nucleotides, respectively were successfully amplified and cloned into pUC118. The ligation products were transformed into *Escherichia coli* DH5α and nucleotide sequencing of the gene was carried out. Then, new sets of primer were designed according to the obtained sequences. The internal fragment and the unknown 3'-franking region of the gene were amplified with nested-inverse PCR method. After that, the obtained PCR products were cloned into pTG19-T. The open reading frame of the gene consisted of 726 nucleotides (242 deduced amino acids) were obtained. BLAST analysis showed more than 80% similarity to that of several amidase and nitrilase/cyanide hydrolase genes from Enterobacteriaceae submitted to Genbank. The deduced amino acid sequences revealed more than 88% homology to other amidases in the same family. The three-dimensional structure of *E. aerogenes* amidase was predicted based on homology modeling. The enzyme was a α/β globular protein comprising mainly six α helices and two six-stranded β sheets and showed 45% identity with nitrilase, a nonpeptide C-N hydrolyzing enzyme, from *Xanthomonas camprestis*. These results highlight the potential of PCR technique to identify the amidase gene from *E. aerogenes*. The obtained gene has been expected to use for further cloning and high-level expression of amidase in prokaryotic system.

Keywords: Aliphatic amidase, Acrylamide degradation, Acrylic acid production, Enzyme immobilization, Gene cloning

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ 2
บทคัดย่อภาษาไทย 3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ 4
สารบัญเรื่อง 5
สารบัญตาราง 6
สารบัญภาพ 7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อยที่ใช้ในการวิจัย 9
บทที่
1 บทนำ 10
2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 14
3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 19
4 ผลการวิจัย 25
5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย 39
6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 41
บรรณานุกรม 42
ภาคผนวก
1 แผนที่ตัดจำเพาะและบริเวณโคลนของ pUC118 47
2 แผนที่ตัดจำเพาะและบริเวณโคลนของ pTG19-T 48
ประวัติและผลงานผู้วิจัย 49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของยีนอะมิเดสจาก *Enterobacter* spp.	20
2	ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากยีนอะลิฟาติกอะมิเดสของ *E. aerogenes*	22
3	ผล BLASTn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi3 และ EnAmi4 เทียบกับฐานข้อมูลโลก	26
4	ผล BLASTp ของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi3 และ EnAmi4 เทียบกับฐานข้อมูลโลก	26
5	ผล BLASTn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi1 และ EnAmi2 เทียบกับฐานข้อมูลโลก	28
6	ผล BLASTp ของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากคู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi1 และ EnAmi2 เทียบกับฐานข้อมูลโลก	28
7	ผล BLASTn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้ในงานวิจัยนี้ เทียบกับฐานข้อมูลโลก	35
8	ผล BLASTp ของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้ในงานวิจัยนี้ เทียบกับฐานข้อมูลโลก	35

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การหาบริเวณอนุรักษ์จากการเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดส ใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W	19
2	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่หาได้เมื่อใช้คู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi3 และ EnAmi4	25
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เมื่อใช้คู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi3 และ EnAmi4 และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้	25
4	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่หาได้เมื่อใช้คู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi1 และ EnAmi2	27
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เมื่อใช้คู่ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์ EnAmi1 และ EnAmi2 และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้	25
6	การเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* ด้วยการใช้ดีเจนเนอเรซีไพรเมอร์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W	29
7	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ย้อนกลับแบบจำเพาะปฏิกิริยาที่ 2 ที่หาได้ เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ NI-EnAmi2 + CI-EnAmi2 ทำปฏิกิริยา	30
8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ NI-EnAmi1 + CI-EnAmi1 และ NI-EnAmi2 + CI-EnAmi2 ในปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 ของการทำพีซีอาร์ย้อนกลับแบบจำเพาะ และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้	31
9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ NI-EnAmi3 + CI-EnAmi1 และ NI-EnAmi4 + CI-EnAmi2 ในปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 ของการทำพีซีอาร์ย้อนกลับแบบจำเพาะ และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้	31
10	การเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคพีซีอาร์ย้อนหลังแบบจำเพาะกับลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W	32
11	ผลการตัดพลาสมิดสายผสม pTG19-T ที่บรรจุยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI	33
12	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดสของ *E. aerogenes* ที่หาได้ในงานวิจัยนี้	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	การเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดสใน *E. aerogenes* ที่หาได้ในงานวิจัยนี้กับลำดับกรดอะมิโนของยีนอะมิเดสใน *Enterobacter* spp. โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W	36
14	โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อะมิเดสจาก E. aerogenes ที่หาได้จากการสร้างแบบจำลองความเหมือนด้วยโปรแกรม PDB	37

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

%	=	ร้อยละ
Å	=	อังสตอม
α	=	แอลฟา (alpha)
β	=	บีตา (beta)
μ	=	ไมโคร (micro)
bp	=	คู่เบส (basepair)
kb	=	กิโลคู่เบส (kilobasepair)
mM	=	มิลลิโมลาร์