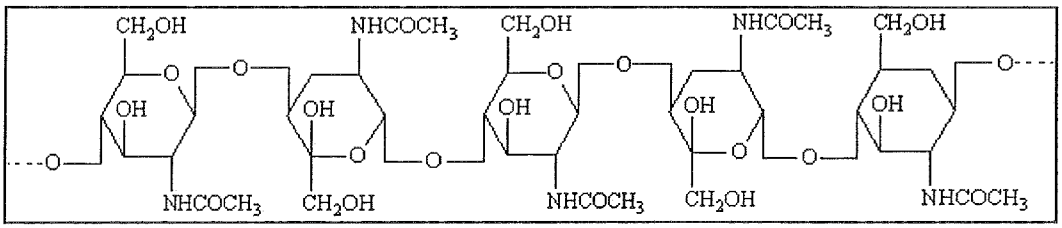
บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ของ *N*-acetyl glucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคลซิดิกแบบ β1⟶4 ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์

ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 10^{10} ถึง 10^{11} ตันต่อปี (Gooday, 1994) ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเภสัชกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ

เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร เช่นโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง โรงงานอาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมข้างเคียงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะนี้การย่อยสลายไคตินโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมี ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิกิริยาการย่อยสลาย

ในธรรมชาติการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์สองชนิดด้วยกัน กล่าวคือขั้นตอนแรกไคตินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนส (EC3.2.1.14) ได้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์และให้ผลิตผลสุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ขั้นตอนต่อมาคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็น

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์บีต้าเอนอะซิทิลกลูโคซะมินิเดส หรือไคโตไบเอส (β-N-acetyl glucosaminidase/chitobiase) (EC 3.2.1.29) (Davis & Eveleigh, 1984)

เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไปเช่น ที่ส่วนต่าง ๆ ของพืช ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล สัตว์เคี้ยวเอื้อง และมนุษย์ หน้าที่ของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีแตกต่างกันไป เช่น เกี่ยวข้องในขบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา (Papavizas, 1985; Cabib, 1987; Kuranda & Robbins, 1991) มีส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่ (Sivan & Chet, 1989; Srivastava, et al., 1985) มีส่วนช่วยในการย่อยสารอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลง ปลาชนิดต่าง ๆ เช่น ปลาทอง ปลาเทร้า ปลาซีบาส เป็นต้น (Okutani, 1977; Okutani, et al., 1967) นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) เก่าที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา Spindler-Barth, 1993) ในพืชเอนไซม์ไคติเนสมีส่วนร่วมในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช (Boller et al., 1983; Pleban et al., 1997) และขบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช (de Jong et al., 1992) ส่วนในคนพบว่า acidic chitinase มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิดโรคภูมิแพ้ได้ (Wills-Karp & Karp, 2004)

ตามหลักเกณฑ์ที่เสนอโดย Henrissat (Henrissat & Bairoch, 1993) โดยอาศัยความใกล้เคียงของลำดับของกรดอะมิโนเป็นหลักจำแนกเอนไซม์ไคติเนสออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ (1) ไคติเนสแฟมิลี 18 พบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่แบคทีเรีย ไปจนถึงพืชและสัตว์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีลักษณะเชิงโครงสร้างที่สำคัญคือมีบริเวณเร่งประกอบด้วย 2 motifs มาประกอบเป็นโครงสร้าง $(\alpha/\beta)_8$-TIM barrel และมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ substrated-assisted mechanism (Papanikolau et al., 2001; Bortone, et al., 2002; Sasaki et al., 2002) และ (2) ไคติเนสแฟมิลี 19 พบเฉพาะในพืชและแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Streptomyces* (Cohen-Kupiec & Chet 1998; Ohno et al., 1996) ลักษณะของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือมีบริเวณเร่งเป็นแบบ bilobal α+β folding motif และมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ inversion hydrolytic mechanism (Robertus & Monzingo, 1999)

เชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) ในแฟมิลี *Vibrionaceae* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอ ซึ่งเป็นสมาชิกของไคติเนสแฟมีลี 18 ในปริมาณมาก แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ออกนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในทะเลเช่น สาหร่ายสีเขียว ไดอะตอม เป็นต้น ให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (Yu et al. 1991; Montgomery & Kirchman, 1993; Bassler et al., 1991) ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้ถือว่าเป็นแหล่งเอนไซม์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของกากไคติน มีการวิจัยหลายชิ้นรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและชีววิทยาเชิงโมเลกุลและองค์ประกอบของยีนไคติเนสในแบคทีเรีย (Watanabe et al., 1990; Svityl et al., 1997) แต่การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนส เอ นี้มีเพียงในเชื้อแบคทีเรียที่สกัดจากดิน *Serratia marcescens* (Perraki et al., 1994) และส่วน catalytic domain ของไคติเนส เอ จาก *Bacillus circulans*

(Watanabe et al., 2001) เป้าหมายหลักของงานวิจัยทางด้านโครงสร้างเพื่อเข้าใจกลไกการทำงานการของเอนไซม์โดยละเอียดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เช่นการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา ทางการเกษตร (Wang et al., 1997; Lorito et al., 1998; Carroad & Tom, 1978; Cosio et al., 1982) การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่าง ๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่ว อ้อย ให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านโรคราต่าง ๆ และทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การกำจัดกากของเสียไคตินและนำผลิตผลจากการย่อยไคตินไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และการเกษตร (Carroad & Tom, 1978; Cosio et al., 1982)

การศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยพบว่าเชื้อแบคทีเรียในทะเล *V. carchariae* ผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอ เป็นหลักเพื่อการสลายไคติน (Suginta et al., 2000; Suginta, 2007) โดยเอนไซม์นี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยเดียวมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63 kDa ที่คุณสมบัติเป็นเอนโดไคติเนสที่สามารถสลายพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งต่าง ๆ ภายในสายไคตินโพลีเมอร์ได้ผลิตผลที่เป็นไคโตโอลิโกเมอร์มีความยาวตั้งแต่ 2-6 หน่วย แต่ผลิตผลของการย่อยสุดท้ายคือไคโตไบโอส จากการศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีความชอบ (affinity) ต่อไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์มากขึ้นเมื่อสายของไคโตโอลิโกเมอร์ยาวขึ้นซึ่งแสดงถึงโครงสร้างของบริเวณเร่งที่มีลักษณะเป็น multiple binding subsites (Suginta et al., 2005) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องจากเอนไซม์ไคติเนส เอ ของ *Serratia marcescens* (SmChiA)พบว่ากรดอะมิโนหลายตัว ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะ conserved และมีคุณสมบัติไม่มีขั้วหรือเป็นวงแหวนอะโรมาติกได้แก่ Typ167, Tyr170, Typ275, Phe396, Tyr418 และ Typ539 จากโครงสร้างสามมิติของ (SmChiA) พบว่ากรดอะมิโนเหล่านี้มีบทบาทในการสร้างสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีขั้วที่บริเวณเร่งทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้ดี (Aronson et al., 2003) จากข้อมูลนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนในบทบาทของกรดอะมิโนเหล่านี้ในต่อความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไคติเนส เอ ของเชื้อ *V. carchariae* โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาโมเลกุลของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมและในการสลายไคตินและมีความจำเพาะสูงต่อการสร้างไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่ต้องการ

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก 4 ประการคือ

1. เพื่อเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้วที่บริเวณเร่งและบริเวณ Chitin Binding Domain ของเอนไซม์ไคติเนสเอ จากเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae* โดยเทคนิค site-directed mutagenesis
2. เพื่อศึกษาการสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 และการทำบริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี
3. เพื่อศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของไคติเนส เอ กลายพันธุ์เทียบกับ wild-type โดยเทคนิค quantitative HPLC

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขอบเขตเริ่มที่การสร้างไคติเนส เอ ที่กลายพันธุ์ จากเชื้อ *V. carchariae* โดยจะทำการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วที่บริเวณเร่งและบริเวณ Chitin Binding Domain โดยเทคนิค site-directed mutagenesis หลังจากนั้นจะทำการศึกษาการแสดงออกของไคติเนส และทำการสกัดโปรตีนเพื่อนำมาศึกษาสมบัติทางจลศาสตร์เพื่อเปรียบเทียบความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์กลายพันธุ์และเลือกคัดเอนไซม์ที่ให้ความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงสุดในการสลายไคติน

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้มี 4 ประการหลักคือ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัย เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินงานมาก่อน จึงคาดว่าผลสัมฤทธิ์จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor มากกว่า 1.5 ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง
2. องค์ความรู้ที่ได้รับในระหว่างการทำงานวิจัยสามารถถ่ายทอดให้นักวิจัยรุ่นเยาว์ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. เป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์เนื่องจากงานวิจัยนี้มีเป้าหมายหลักคือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนสที่มีความสามารถในการย่อยไคตินโดยขบวนการทางชีวภาพดีขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตสารไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเชิงการค้าและเภสัชกรรมต่อไป
4. เป็นการส่งเสริมการท่องเที่ยวและการรักษาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากกากไคตินเป็นของเสียทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล การใช้ประโยชน์จากไคตินจะช่วยบรรเทาปัญหาสิ่งแวดล้อมชายฝั่งทะเล

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
3. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
4. กรมส่งเสริมการการส่งออก กระทรวงพาณิชย์
5. กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
6. หน่วยงานเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากไคติน-ไคโตซาน