

การโคลนและศึกษาลักษณะสมบัติของโคตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01
และการศึกษาเปรียบเทียบกับโคตินเนสชนิดอื่น



นายสุรเกตุ เนาสราญวงศ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

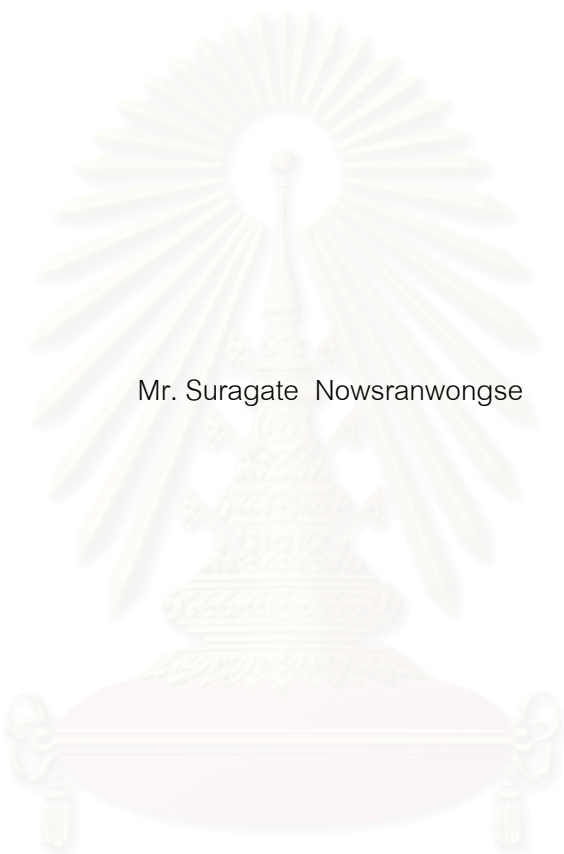
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1074-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE FROM *Bacillus licheniformis* RN01
AND COMPARATIVE STUDY WITH OTHER CHITINASES



Mr. Suragate Nowsranwongse

สภามหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1074-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนและศึกษาลักษณะสมบัติของโคตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01 และการศึกษาเปรียบเทียบกับโคตินเนสชนิดอื่น

โดย นายสุรเกตุ เนาสราญวงค์

สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. รัฐ พิษญาญกูร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. รัฐ พิษญาญกูร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพนิชยกิจ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ธีรพงษ์ บัวบูชา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุรเกต์ เนาสราญวงษ์: การโคลนและศึกษาลักษณะสมบัติของไคติเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01 และการศึกษาเปรียบเทียบกับไคติเนสชนิดอื่น (CLONING AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE FROM *Bacillus licheniformis* RN01 AND COMPARATIVE STUDY WITH OTHER CHITINASES) อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร. รัฐ พิชญางกูร
110 หน้า, ISBN 974-53-1074-4

ไคติเนส (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคติเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อน จังหวัดระนอง ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงสุดในวันที่ 2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ colloidal chitin minimum medium เอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ pH 6 - 10 และเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 – 60 °C สับสเตรตที่เอนไซม์ย่อยได้ดีที่สุดคือ PNAC (partial-N-acetylated chitin) รองลงมาคือ คอลลอยด์คัลไคติเนส, β -ไคติเนส และ powder chitin ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยคอลลอยด์คัลไคติเนสได้ chitobiose เป็นผลิตภัณฑ์หลัก เมื่อทำการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE และย้อมแอกติวิตี พบโปรตีนที่มี ไคติเนสแอกติวิตี 3 แถบที่มีขนาดต่าง ๆ คือ 70, 65 และ 58 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อนำ genomic DNA ของ *Bacillus licheniformis* RN01 มาโคลนยีนไคติเนสโดยวิธี PCR cloning พบว่า DNA ที่โคลนได้มีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,964 นิวคลีโอไทด์ สามารถ translate ออกมาเป็นกรดอะมิโนได้ 598 กรดอะมิโน ซึ่งมีขนาดประมาณ 66,134 ดาลตัน (Da) มี isoelectric point เท่ากับ 5.17 เอนไซม์ไคติเนสที่โคลนได้ให้ชื่อว่า ChiRN1 พบว่าเอนไซม์ที่โคลนได้ประกอบด้วยโดเมน 3 โดเมน ได้แก่ catalytic domain (CatD), fibronectin type III-like domain (FnIII_D) และ chitin binding domain (ChBD) เมื่อทำการศึกษสมบัติบางประการของเอนไซม์ ChiRN1 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ pH 6 - 10 อุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีอยู่ที่ 60 – 70 °C สับสเตรตที่เอนไซม์ย่อยได้ดีที่สุดคือ PNAC รองลงมาคือ คอลลอยด์คัลไคติเนส และ β -ไคติเนส ผลจาก SDS-PAGE และย้อมสีแอกติวิตีพบแถบโปรตีนที่มีไคติเนสแอกติวิตี 3 แถบ มีขนาด 70, 65 และ 58 kDa เหมือนกับ *B. licheniformis* RN01 และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคอลลอยด์คัลไคติเนสได้ chitobiose เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และเมื่อทำไคติเนสลูกผสมโดยนำเอาส่วน FnIII_D และ ChBD ของ ChiRN1 ไปต่อข้างหลังเอนไซม์ Chi60 ที่มี 2 โดเมน ได้แก่ N-terminal domain และ catalytic domain พบว่าเอนไซม์ลูกผสมมีกรดอะมิโนจำนวน 708 กรดอะมิโน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคอลลอยด์คัลไคติเนสด้วยเอนไซม์ลูกผสมเป็น chitobiose เพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับเอนไซม์ Chi60 สรุปได้ว่า FnIII_D และ ChBD ที่ต่อเพิ่มไปบนเอนไซม์ Chi60 ไม่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง monomer และ dimer ของผลิตภัณฑ์

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา	2547	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4572553123: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : CHITINASE / *Bacillus licheniformis* RN01 / CLONING / CHARACTERIZATION /
COMPARATIVE STUDY

SURAGATE NOWSRANWONGSE : CLONING AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE
FROM *Bacillus licheniformis* RN01 AND COMPARATIVE STUDY WITH OTHER
CHITINASES. THESIS ADVISOR : RATH PICHYANGKURA, Ph. D., 110pp.
ISBN 974-53-1074-4.

Chitinases (EC 3.2.1.14), a group of glycosyl hydrolase enzymes, hydrolyze the β 1 \rightarrow 4 linkages of N-acetyl-D-glucosamine polymers of chitin. *Bacillus licheniformis* RN01, isolated from hot spring in Ranong province, produced the highest activity of chitinase on the second-day of incubation in colloidal chitin minimum medium. The enzyme can function well in pH 6 - 10, at temperature 50 – 60 °C. Substrate specificity of the enzyme varied from high to low was on PNAC (partial-N-acetylated chitin), colloidal chitin, β -chitin and powder chitin, respectively. *Bacillus licheniformis* RN01 chitinases hydrolyzed colloidal chitin and chitobiose was produced as a major product. Protein from the culture medium of *Bacillus licheniformis* RN01 was analyzed by SDS-PAGE. Chitinase activity was identified using activity staining method. Three bands of protein which possessed chitinase activity were found with molecular weight of 70, 66 and 58 kDa. PCR cloning of chitinase gene from genomic DNA of *Bacillus licheniformis* RN01 yielded an open reading frame comprising 1946 nucleotides, encoding for 598 amino acids. The predicted molecular weight was 66,134 Da and pI was 5.17. The cloned chitinase, ChiRN1, contained 3 domains, Catalytic domain (CatD), fibronectin type III-like domain (FnIIIID) and chitin binding domain (ChBD). ChiRN1 had the high activity in pH 6 – 10, at temperature 60 – 70°C, and had high substrate specificity on PNAC, colloidal chitin and β -chitin. Like that of *Bacillus licheniformis* RN01, the cloned enzyme where activities lane showed three bands of chitinase activity of 70, 66 and 58 kDa. Colloidal chitin digested by ChiRN1 also produced chitobiose as a major product. Chimeric chitinase was constructed by inserting FnIIIID and ChBD from ChiRN1 into Chi60. This chimeric enzyme contained 708 amino acids. Both chimeric chitinase and Chi60 hydrolyzed colloidal chitin into chitobiose as the only product. This result indicated that the FnIIIID and ChBD domain may not be involved in the regulation of hydrolytic products of the enzyme.

Field of study Biochemistry

Student's signature.....

Academic year 2004

Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ และ อาจารย์ ดร. ธีรพงษ์ บัวบุชา ที่กรุณาให้คำแนะนำต่อผู้เขียน รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอบคุณพี่ก๊ง พี่เชลล์ พี่นุ้ม น้องนก น้องปุย (สมาชิกห้อง709) เป็นพิเศษ ที่ให้ความเป็นกันเอง คอยให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และกำลังใจขณะทำวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกด้านเอกสารและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณคุณพ่อและคุณแม่ ที่ให้ความรัก กำลังใจ ความเข้าใจ และคอยให้ความอนุเคราะห์ทุก ๆ ด้านอย่างสมบูรณ์ตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
คำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ไคติน.....	1
ไคตินกับการประยุกต์ใช้.....	4
ไคตินเนส.....	7
ไคตินเนสกับการประยุกต์ใช้.....	13
2 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง.....	18
เครื่องมือและอุปกรณ์.....	18
สารเคมี.....	19
เอนไซม์.....	21
ไพรเมอร์.....	21
พลาสติก เวกเตอร์.....	22
แบคทีเรีย.....	22
อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	22
วิธีการทดลอง.....	23
การโคลนยีนไคตินเนสจาก genomic DNA ของ <i>Bacillus licheniformis</i> RN01	23
การโคลนยีน 16s rRNA ของ <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	24
ศึกษาลักษณะสมบัติของไคตินเนสจากไคตินเนสจาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01 และไคตินเนสที่โคลนจาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	25
กลายพันธุ์ไคตินเนสโดยสร้างไคตินเนสลูกผสม.....	27

	หน้า
3 ผลการทดลอง.....	28
การโคลนยีน 16s rRNA ของ <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	28
การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของโคตินเนสอย่างหายาบบที่ผลิตจาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	31
การโคลนยีนโคตินเนสจาก genomic DNA ของ <i>Bacillus licheniformis</i> RN01	39
การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของโคตินเนส ChiRN1.....	47
การศึกษาเปรียบเทียบกับโคตินเนสชนิดอื่น.....	54
การกลายพันธุ์โคตินเนสโดยทำโคตินเนสลูกผสม.....	62
4 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	73
5 สรุปผลการทดลอง.....	80
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	89
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	94

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ไคตินแต่ละรูปแบบที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ.....	3
1.2	การนำไคตินและอนุพันธ์ไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่าง ๆ.....	6



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างของไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส.....	2
1.2	แบบจำลองของเส้นใยไคตินรูปแบบอัลฟา บีตา และแกมมา.....	2
1.3	โครงสร้าง 3 มิติของไคติเนส.....	9
1.4	กลไกการเร่งปฏิกิริยาของ Chitinase A จาก <i>Serratia marcescens</i>	10
1.5	แบบจำลองการจัดเรียงลำดับของโดเมนในไคติเนสจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ.....	11
1.6	โครงสร้าง Chitin-binding domain และ Fibronectin type III-like domain ของ <i>Bacillus circulans</i> WL-12.....	14
1.7	aromatic residue บน CatD ของ ChiA1 ที่ทำหน้าที่จับกับสายของสับสเตรต.....	15
1.8	model ในการจับกับ β -chitin โดยใช้ aromatic residue ของ ChiA.....	15
3.1	รูป <i>Bacillus licheniformis</i> RN01 ที่มี clear zone รอบโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCMM.....	29
3.2	แสดงยีน 16s rRNA จาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01 ที่เพิ่มจำนวนโดยการทำให้ PCR.....	30
3.3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA.....	32
3.4	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน 16s rRNA ของ <i>Bacillus licheniformis</i> RN01 กับ <i>Bacillus licheniformis</i> M1-1.....	33
3.5	ลักษณะการเจริญและลักษณะการผลิตเอนไซม์ของ <i>Bacillus licheniformis</i> RN01..	35
3.6	แอกติวิตีของไคติเนสอย่างหยาบจาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	36
3.7	แอกติวิตีของไคติเนสอย่างหยาบจาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01 ที่ pH ต่าง ๆ....	36
3.8	ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่างๆของไคติเนสอย่างหยาบจาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	37
3.9	แสดงผลที่สังเกตเห็นได้หลังจากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์อย่างหยาบที่ผลิตจาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	38
3.10	แสดงยีนไคติเนส จาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01 ที่ได้จากวิธี PCR cloning....	40
3.11	แสดงยีนไคติเนสที่โคลนได้ด้วยวิธี PCR cloning โดยใช้ primer BP-19F และ BP-20R เข้าสู่ pGEM-T Easy แล้วนำมาตัดตรวจทดสอบโดยตัดด้วย restriction enzyme <i>Not I</i>	42

	หน้า
3.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>chiRN1</i>	43
3.13 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ ChiRN1.....	44
3.14 รูปโครงสร้าง 3 มิติของ catalytic domain และ fibronectin type III-like domain ของเอนไซม์ ChiRN1.....	46
3.15 ลักษณะการผลิตโคติเนส ChiRN1.....	48
3.16 แอคติวิตีของโคติเนส ChiRN1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	48
3.17 แอคติวิตีของโคติเนส ChiRN1 ที่ pH ต่าง ๆ.....	49
3.18 ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่างๆของโคติเนส ChiRN1.....	49
3.19 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์ ChiRN1.....	50
3.20 SDS-PAGE แสดงแถบของโปรตีนและแถบแอคติวิตีของโคติเนส จาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01 และ ChiRN1.....	51
3.21 SDS-PAGE แสดงแถบของโปรตีนและแถบแอคติวิตีของโคติเนส จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	52
3.22 แสดงวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ <i>E.coli</i> Top10 ที่มี plasmid pW2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC.....	53
3.23 ผลการทำ multiple sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโน ChiA1, Chi65, Chi66 และ ChiRN1.....	56
3.24 โครงสร้าง 3 มิติแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนสำคัญ ของ ChiA1 จาก <i>Bacillus circulans</i> WL-12 เปรียบเทียบกับ ChiRN1 ที่โคลนได้จาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	57
3.25 ผลการทำ multiple sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโน ChiB, Chi60, ChiA1, Chi65, Chi66 และ ChiRN1.....	58
3.26 โครงสร้าง 3 มิติแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนสำคัญที่ทำหน้าที่จับกับสายของโคตินของ Chi60 จาก <i>Serratia liquefaciens</i> เปรียบเทียบกับ ChiRN1 ที่โคลนได้จาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	60
3.27 โครงสร้าง 3 มิติแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนสำคัญของ ChiB จาก <i>Serratia marcescens</i> เปรียบเทียบกับ Chi60 จาก <i>Serratia liquefaciens</i> และ ChiRN1 จาก <i>Bacillus licheniformis</i> RN01.....	61
3.28 แผนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ PCR เพื่อสร้างโคติเนสลูกผสม.....	62

	หน้า
3.29 ลำดับโดเมนของโคติเนสลูกผสม.....	63
3.30 แสดงชิ้น DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เพื่อสร้างโคติเนสลูกผสม.....	64
3.31 แสดงพลาสมิดที่มียื่นสำหรับสร้างโคติเนสลูกผสม.....	65
3.32 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pKKchi60b13.....	66
3.33 แสดงวงโครโมโซมโคโลนีของเชื้อ <i>E.coli</i> Top10 ที่มี plasmid pChi60b13 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC.....	68
3.34 วงโครโมโซมโคโลนีของเชื้อ <i>E.coli</i> Top10 ที่มี plasmid pKKchi60, pW2 และ pChi60b13 เปรียบเทียบกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC หลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 3 วัน.....	70
3.35 SDS-PAGE แสดงแถบของโปรตีนและแถบแอกติวิตีของโคติเนส จาก Chi60, โคติเนสลูกผสม และ ChiRN1.....	71
3.36 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการย่อยสับเซตรัตด้วยเอนไซม์ลูกผสม.....	72

คำย่อ

A	Absorbance
bp	Base pair(s)
CatD	Catalytic domain
CCMM	Colloidal chitin minimum medium
ChBD	Chitin-binding domain
cm	Centimetre(s)
°C	Degree celcius
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
FnIIID	Fibronectin type III-like domain
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB-CC	Luria Bertani - colloidal chitin medium
M	Molar
µg	Microgram
µL	Microlitre
mg	Milligram
ml	Millilitre
mU	Milliunit
min	Minute
ng	Nanogram
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Revolution per minute
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine
(GlcNAc) ₂	N,N'-diacetyl-D-glucosamine (chitobiose)

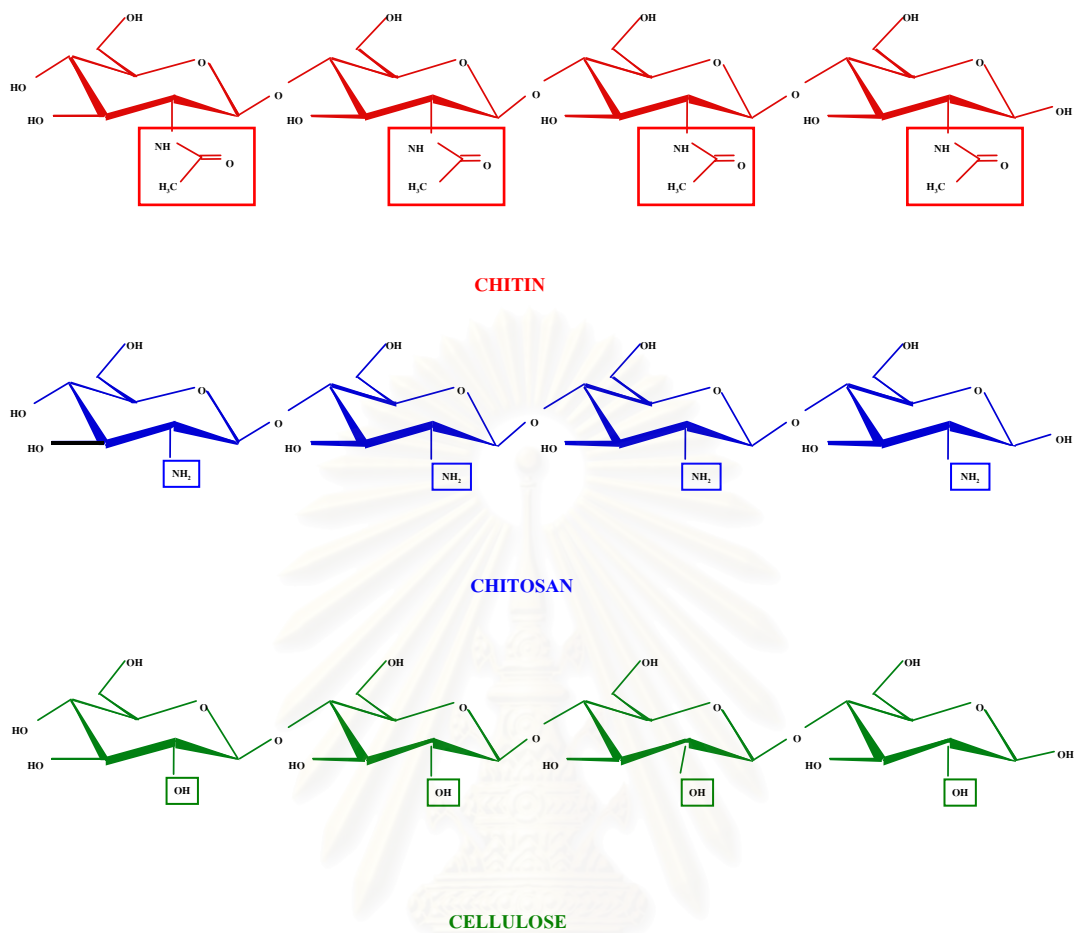
บทที่ 1

บทนำ

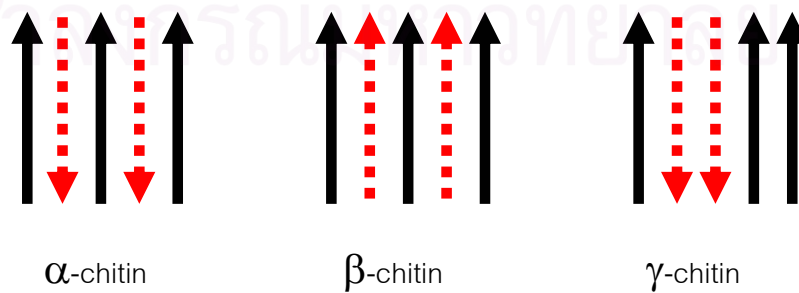
ไคติน เป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ในธรรมชาติจะพบไคตินได้ในผนังเซลล์และเปลือกหุ้มร่างกายที่มีโครงสร้างแข็ง ในสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดรา และสัตว์จำพวกที่มีข้อมีปล้อง (arthopods) เช่น กุ้ง ปู และแมลงต่างๆ เป็นต้น รวมถึงในแบคทีเรียบางชนิด (1) โครงสร้างของไคตินเป็นโฮโมพอลิเมอร์สายยาวและไม่มีกิ่ง มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลอะมิโนที่เรียกว่า เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-D-glucosamine หรือ 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose, GlcNAc) แต่ละหน่วยย่อยจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic linkage ไคตินและเซลลูโลสมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันมาก ต่างกันเพียงที่คาร์บอนตัวที่ 2 ของเซลลูโลสเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) แต่ของไคตินเป็นหมู่อะเซตทามิโด (acetamido group)

เมื่อนำผลึกไคตินมาศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิคการกระจายแสงรังสีเอกซ์ (X-ray diffraction) (2) พบว่าไคตินมีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีขนาดเล็กมาก จัดเรียงตัวอยู่ในผลึกไคตินอย่างเป็นระเบียบมาก (3) แต่ละเส้นใยจะมีปฏิสัมพันธ์กันผ่านพันธะไฮโดรเจน ผลึกของไคตินจากแหล่งที่มาต่างกันก็จะมีรูปแบบการจัดเรียงตัวของเส้นใยต่างกัน เราสามารถแบ่งรูปแบบการจัดเรียงของเส้นใยได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบอัลฟา (α -form) รูปแบบบีตา (β -form) และรูปแบบแกมมา (γ -form)

รูปแบบอัลฟาเป็นรูปแบบที่พบได้ทั้งใน พวกเห็ดรา แมลง และสัตว์พวก crustacean จัดเป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใยไคตินรูปแบบนี้ จะมีทิศทางการจัดเรียงตัวในทิศทางตรงกันข้ามกัน เส้นใยในรูปแบบนี้จะค่อนข้างอยู่ชิดกันมากและสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับเส้นใยข้าง ๆ ทำให้มีความแข็งแรงมากกว่าแบบอื่น (4) ในขณะที่รูปแบบบีตาสามารถพบได้ในแกนกลางลำตัวของปลาหมึก และในพวก diatom เส้นใยไคตินในรูปแบบนี้จะจัดเรียงตัวไปในทิศทางเดียวกัน (5) เส้นใยจะอยู่ชิดกันน้อยกว่าแบบอัลฟา จึงมีความแข็งแรงน้อยกว่าด้วย ส่วนรูปแบบแกมมานั้น มีรายงานว่าสามารถพบได้ใน stomach lining ของ *Loligo* และ ในพวก Coelenterata (2) การจัดเรียงตัวจะเป็นรูปแบบผลมระหว่างแบบอัลฟาและบีตา (4, 5)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส



รูปที่ 1.2 แบบจำลองของเส้นใยไคตินรูปแบบอัลฟา บีตา และแกมมา

ตารางที่ 1.1 ไคตินแต่ละรูปแบบที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (1)

Sources of chitin	(%) chitin	Type of chitin
Crustacea (shrimp)		α -chitin
• Crangon	69.1	
• Alaskan	28.0	
Insect		α -chitin
• May beetle	16.0	
• Pieris (sulfur butterfly)	64.0	
• Colcoptera (beetle)	27-35	
• Diptera (true fly)	54.8	
• Bombyx (silk worm)	44.2	
• Calleria (wax worm)	33.7	
Mollusca		β -chitin
• Squid ,Octopus	41	
• Oyster shell	3.6	
• Clamshell	6.1	
Fungi		α -chitin
• Aspergillus niger	42.0	
• Aspergillus phoenicis	23.7	
• Pennicilium notatum	18.5	
• Histoplasma capsulatum	25.8	
• Histroplasma farciminosum	40.0	
• Mucor rouxi	44.5	
• Mortierella vinacea	22.0	

ในแต่ละปีธรรมชาติจะผลิตไคตินขึ้นเองในประมาณปีละ $10^{10} - 10^{11}$ ตัน โดยแหล่งที่จะพบไคตินมากที่สุดคาดว่าจะอยู่ตามเปลือกชั้นนอกของสัตว์พวก crustacean ดังนั้นเปลือกของสัตว์กลุ่มนี้จึงถูกใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไคติน เราสามารถสกัดไคตินจากเปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนปลาหมึกได้ในปริมาณมาก โดยทั่วไปแล้วเปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนในของปลาหมึกจะมีปริมาณไคตินอยู่ราว 10-30 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ โดยองค์ประกอบที่เหลือจะเป็นเกลือแร่ หินปูน และ โปรตีน การสกัดไคตินนี้ทำได้ไม่ยาก และมีขั้นตอนหลัก ๆ ของกระบวนการอยู่สองขั้นตอนคือ การกำจัดหินปูนและเกลือแร่ (deminceralization) และการกำจัดโปรตีน (deproteinization) ในเปลือกสัตว์ทะเลบางชนิดเช่น กุ้ง และปู จะมีรงควัตถุอยู่มากซึ่งอาจสกัดแยกออกได้โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และแอลกอฮอล์บางชนิด

ไคตินสามารถนำมาสร้างอนุพันธ์ที่เรียกว่าไคโตซานได้ โดยการกำจัดหมู่อะซิทิลออกจาก GlcNAc โดยการใช้เอนไซม์หรือสารละลาย NaOH 40-50% (W/W) ผลที่ได้ คือ co-polymer ของ GlcNAc และน้ำตาลกลูโคซามีน (GlcN) (6) การกำจัดหมู่อะซิทิลออกนี้จะเกิดขึ้นมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการบ่มไคตินกับเอนไซม์หรือสารละลาย NaOH หรือ ธรรมชาติของสารตั้งต้นที่นำมาใช้ ซึ่งจะทำได้ผลิตภัณฑ์ที่มีอัตราส่วนของ GlcNAc และ GlcN ต่าง ๆ กัน

สารไคติน/ไคโตซานถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย อาทิเช่น ด้านการเกษตร ไคติน/ไคโตซานสามารถนำมาเคลือบเมล็ดพันธุ์และผลผลิตทางการเกษตร (7) เพื่อป้องกันการชุกชืด ยืดอายุ ควบคุมการเน่าเสีย (8) และป้องกันโรค และแมลง (9, 10) ใช้ผสมในปุ๋ยน้ำสำหรับพืชไม้ดอก เนื่องจากยึดติดกับผิวของพืช ผิวดินได้ดี และทนต่อการถูกชะล้าง เพื่อลดการระเหยของน้ำ สามารถเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยสารอาหาร และยาให้กับพืช ทำให้การกระจายตัวของปุ๋ยน้ำดีขึ้นและมีความคงตัวสูง ใช้เป็นปุ๋ยไนโตรเจนสำหรับพืชตระกูลถั่ว โดยไนโตรเจนจากไคติน/ไคโตซานสามารถถูกปลดปล่อยออกมาตามความต้องการของพืช ทำให้ได้ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเร่งการเกิดปมรากถั่วและการตรึงไนโตรเจน (11) นอกจากนี้ยังเป็นสารยับยั้งการติดเชื้อไวรัสในพืช (7) ด้านเภสัชกรรม ได้มีการใช้ไคโตซานในระบบควบคุมการปลดปล่อยยา และด้านเครื่องสำอาง ใช้ไคโตซานเป็นส่วนประกอบในสบู่ ยาสระผม ครีมบำรุงผิว และครีมกันแดด โดยเป็นตัวให้ความชุ่มชื้น ซึ่งสามารถติดผิวได้ดี ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ สามารถทำหน้าที่เป็นฟิล์มบาง ๆ เคลือบบนผิวหนัง ลดการระเหยของน้ำบนผิวหนัง เพิ่มการจับตัวของน้ำ ทำให้ผิวหนังกระชับขึ้น และสามารถเป็นตัวป้องกันรังสีให้ผิวหนังได้อีกชั้นหนึ่ง ด้านการแพทย์สามารถนำมาใช้ผลิตพลาสติกออร์ปิดแผล ผ้าพันแผล ไหมละลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส (12) ทำผิวหนังเทียมจาก chitosan-collagen (13) ผลิตคอนแทคเลนส์ ผลิตแผ่นกรองสำหรับการฟอกเลือด หลอดเลือดเทียม และ *N*-hexanoyl และ *N*-octanoylchitosan ซึ่งทำเป็นเส้นใยสำหรับแผ่นปิดแผลห้ามเลือด (13)

นอกจากนี้อนุพันธ์ซัลเฟตของไคติน/ไคโตซานมีแนวโน้มในการนำมาใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในกระบวนการฟอกเลือด ด้านอาหาร ไคติน/ไคโตซานนำมาใช้เป็นตัวเชื่อมในอาหารสัตว์ เป็นเส้นใยอาหารของสัตว์ปีกจำพวกไก่ ทำให้ไข่ไก่มีสีแดงขึ้น ไก่มีความเครียดลดลง น้ำหนักตัวเพิ่ม (14, 15) เป็นอาหารเสริมเพื่อลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด ด้านสิ่งทอและกระดาษ บริษัทในประเทศญี่ปุ่นหลายแห่งได้ทำการผลิตเส้นใยสังเคราะห์ เช่น เส้นใยอะคริลิก ที่เคลือบด้วยไคติน/ไคโตซาน ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีสมบัติในการควบคุมความชื้น ทนต่อการซัก สีติดทน และยังป้องกันเชื้อราและแบคทีเรีย นอกจากนี้จะถูกนำไปใช้เป็นเส้นใยโดยตรงแล้วยังถูกใช้เป็นตัวเชื่อมในหมึกพิมพ์ และสีย้อม เพื่อให้สีติดดี แข็งเร็ว ทนต่อน้ำและตัวทำละลาย และยังมีรายงานการวิจัยว่า ไคโตซานมีส่วนเพิ่มความแข็งแรงให้กระดาษ และส่งผลให้งานพิมพ์คมชัดเมื่อใช้ร่วมกับหมึกพิมพ์ที่มีประจุลบ (16) ด้านการบำบัดน้ำ ได้นำไคโตซานมาใช้เพื่อใช้เป็นตัวดูดซับสี ไอออนของโลหะต่าง ๆ และแยกสารกัมมันตรังสีจากน้ำเสีย และดักจับยูเรเนียม (16)

ไคตินสายสั้น ๆ พวกไคโตโอลิโก (chito-oligosaccharide) สามารถนำมาใช้เป็นสารยับยั้งการเกิดเนื้องอกและมะเร็ง (17) และใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ glycol chitin และ colloidal chitin ยังนำมาใช้เป็นสับสเตรตในการวัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วย (18, 19)

การนำไคติน/ไคโตซานมาประยุกต์ใช้จำเป็นต้องแปรขนาดความยาวของสายไคติน/ไคโตซานให้มีขนาดที่เหมาะสม เพราะความยาวของสายจะมีผลต่อสมบัติทางชีวภาพและกายภาพของไคตินและไคโตซาน ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่แตกต่างกันได้ วิธีที่จะแปรขนาดความยาวของสายไคตินเราสามารถทำได้โดยนำไคตินมาย่อยในกรดไฮโดรคลอริก หรือจะย่อยโดยใช้เอนไซม์ก็ได้ การย่อยในกรดเราจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดไม่สม่ำเสมอ ส่วนใหญ่จะได้พอลิเมอร์ขนาดเล็ก ๆ ควบคุมปฏิกิริยาได้ยาก ต้องนำมาผ่านกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์แต่ละขนาดออกจากกัน และยังได้ของเสียที่เป็นกรดออกมาซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนการใช้เอนไซม์ เราจะควบคุมปฏิกิริยาได้ง่ายกว่า ให้ขนาดของสายได้หลายขนาดและมีผลิตภัณฑ์มีขนาดจำเพาะ ซึ่งสามารถนำมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดสั้น ๆ (1-10 หน่วย) ได้ดี (20)

ตารางที่ 1.2 การนำไคตินและอนุพันธ์ไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่าง ๆ

<p>Medical;</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Bandages, Sponges ● Artificial Blood Vessels ● Blood Cholesterol Control ● Tumor Inhibition ● Membranes ● Dental/Plaque Inhibition ● Skin Burns/Artificial Skin ● Eye Humor Fluid ● Contact Lens ● Controlled Release of Drugs ● Bone Disease Treatment <p>Pulp and Paper;</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Surface Treatment ● Photographic Paper ● Carbonless Copy Paper <p>Membranes;</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Reverse Osmosis ● Permeability Control ● Solvent Separation <p>Water Treatment;</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Removal of Metal Ions, dyes, Pesticides and phenols ● Flocculant/Coagulant: ● Proteins, amino Acids ● Filtration 	<p>Food industries;</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Removal of Dyes, Solids, Acids ● Preservatives ● Color Stabilization ● Animal Feed Additive ● Emulsifying agent ● Dietary fibre <p>Agriculture;</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Seed Coating ● Leaf Coating ● Hydroponics/Fertilizer ● Controlled Agrochemical Release <p>Cosmetics and Toiletries;</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Make-up Powder ● Nail Polish ● Moisturizers ● Bath Lotion ● Face, Hand and Body Creams ● Toothpaste ● Foam Enhancing <p>Biotechnology;</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Enzyme Immobilization ● Protein Separation ● Chromatography ● Cell Recovery ● Cell Immobilization ● Ultrafiltration membranes
---	---

โคติเนส (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิล ไฮโดรเลส ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโคติน สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย, พืช, รา และสัตว์ต่าง ๆ บทบาทของโคติเนสในสิ่งมีชีวิตพวกนี้มีหลากหลาย (21) โดยในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต้องการโคติเนสในการสลายเปลือกนอกเพื่อการเจริญเติบโต ในราผลิตโคติเนสเพื่อเปลี่ยนแปลงโคติน ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ ในแบคทีเรียผลิตโคติเนสย่อยโคตินเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนในพืชชั้นสูงจะผลิตโคติเนสเพื่อใช้ในการต้านเชื้อรา (22)

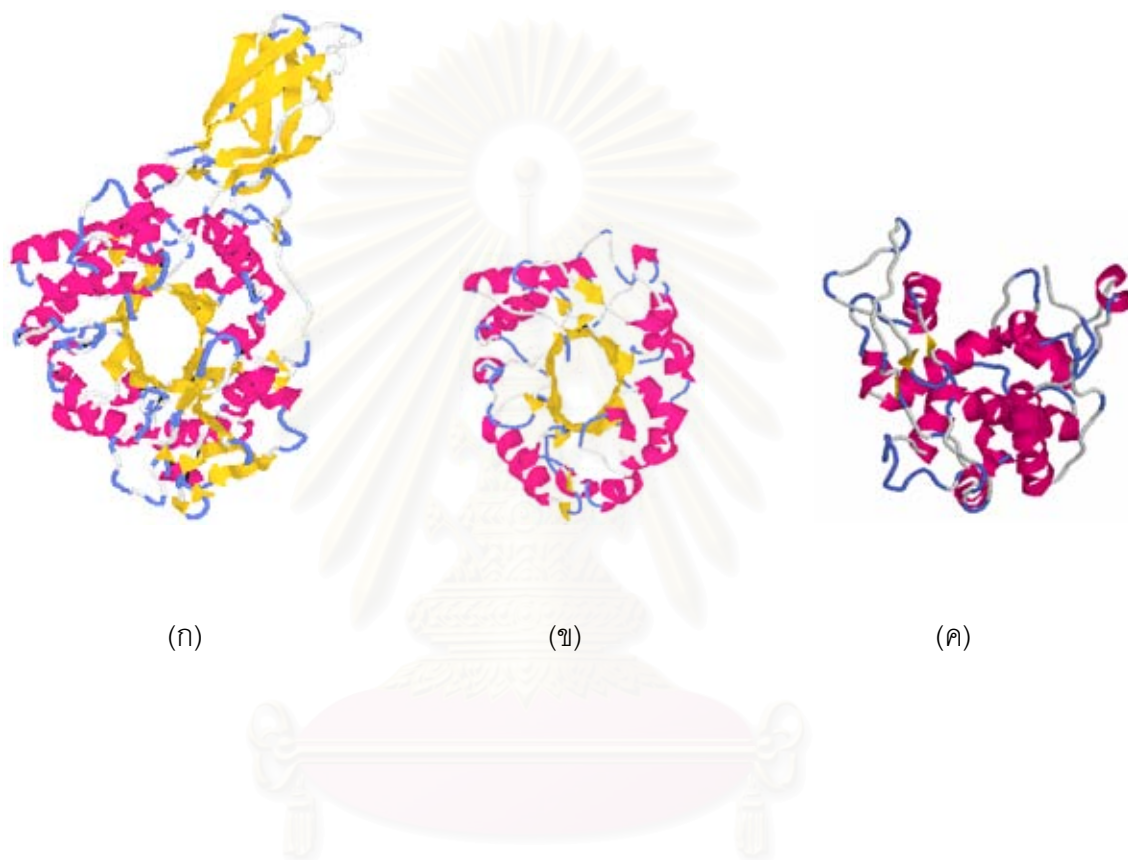
โคติเนสสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใน glycosyl hydrolase families ตามกลไกการเกิดปฏิกิริยา และลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ catalytic domain คือ family 18 และ family 19 (23) family 18 ประกอบด้วยโคติเนสจากแบคทีเรีย, รา, ไวรัส และสัตว์ และโคติเนสจาก class III และ V จากพืชชั้นสูง โครงสร้างของโคติเนสใน family นี้จะมีโครงสร้างเป็น $(\alpha/\beta)_8$ barrel ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ใน family 18 ยกตัวอย่างเช่น chitinase B จาก *Serratia marcescens* (24), hevamine จาก *Heveabrasiliensis* (25), endo- β -N-acetyl-glucosaminidase F1 จาก *Flavobacterium meningosepticum* (26) และ endo- β -N-acetyl-glucosaminidase H จาก *Streptomyces plicatus* (27) เป็นต้น ส่วนโคติเนสใน family 19 มีลักษณะโครงสร้างส่วนใหญ่เป็น α -helices โดยโคติเนสกลุ่มนี้ไม่ได้มีเพียงโคติเนสจากพืชเท่านั้นแต่ยังพบในแบคทีเรียด้วย เช่น chitinase C จาก *Streptomyces griseus* HUT 6037 (28)

นักวิทยาศาสตร์ได้นำ Chitinase A (ChiA) จาก *Serratia marcescens* ที่ทราบโครงสร้าง 3 มิติแล้ว (29) มาเป็นแบบจำลองในการศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่ากรดอะมิโนสำคัญที่อยู่ในบริเวณเร่ง (active site) และจำเป็นต่อการทำงานของ ChiA คือ กลูตามิก 315 (Glu315) มีรายงานว่าเมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งนี้ของ ChiA1 จาก *Bacillus circulans* WL-12 เปลี่ยนจากกลูตามิกเป็นกลูตามีน ส่งผลให้ ChiA1 สูญเสียความสามารถในการทำงานไป (30) ในปี ค.ศ. 2001 Papanikolau และคณะ (31) ได้เสนอกลไกการทำงานของโคติเนสเอาไว้ว่า นอกจาก Glu315 แล้ว Asp313 และ Tyr390 ก็ยังมีส่วนร่วมในการเร่งปฏิกิริยา โดยในสภาพที่ไม่มีซับสเตรต Glu315 จะอยู่ในสภาพถูก protonate จาก Asp313 ที่อยู่ใกล้ ๆ กัน เมื่อมีซับสเตรตเข้ามาจับกับเอนไซม์ เอนไซม์จะบังคับให้ซับสเตรตเข้าสู่สภาพเปลี่ยน (transition state) โดยในบริเวณเร่ง เอนไซม์จะมีโครงสร้างที่บิดให้น้ำตาลตำแหน่ง -1 เปลี่ยน conformation จาก chair form ไปเป็น boat form ซึ่งเป็น conformation ที่ไม่เสถียร ใน conformation แบบนี้ โมเลกุลน้ำที่เกาะอยู่กับ Tyr390 จะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NH ของน้ำตาลตำแหน่ง -1 ได้ (รูปที่ 1.4ก) จากนั้น Glu315 ที่ถูก protonate อยู่ จะเป็นตัวให้โปรตรอนไปยังอะตอม O-4 ของน้ำตาลตำแหน่ง +1 ซึ่งเป็นการตัดสายของน้ำตาลโดยทำลายพันธะ glycosidic ระหว่างอะตอม C-1 ของน้ำตาลตำแหน่ง -1 กับ อะตอม O-4 ของน้ำตาลตำแหน่ง +1 ส่งผลให้อะตอม C-1 ของ

น้ำตาลตำแหน่ง -1 มีประจุเป็นบวก อยู่ในสภาพคาร์โบเนียมไอออนซึ่งเป็นสารที่สภาพเปลี่ยน (transition state intermediate) ในตอนนี้หมู่ acetamido ของน้ำตาลตำแหน่ง -1 กับโมเลกุลน้ำ จะมีการสลับตำแหน่งกันเพื่อให้ตำแหน่งโมเลกุลของน้ำเข้ามาอยู่ใกล้กับกรดอะมิโน Glu315 (รูปที่ 1.4ข) โมเลกุลน้ำจะเป็นตัวให้ไฮดรอกซีไอออนแก่คาร์โบเนียมไอออน และเป็นตัวให้ไฮโดรเจนไอออนแก่ Glu315 จากนั้นโมเลกุลของสับสเตรตก็จะหลุดออกจากเอนไซม์ (รูปที่ 1.4ค) แต่ในกรณีของสับสเตรตที่เป็นสายยาว เราพบว่าหลังจากเกิดไฮโดรไลซิสแล้ว น้ำตาลตำแหน่ง -1, -2, -3 ก็ยังจับอยู่บนเอนไซม์ และจะเลื่อนเข้าไปยังบริเวณเร่งต่อไปจนกว่าจะย่อยจนสุดสาย

โคติเนสจากแบคทีเรีย ส่วนใหญ่จะเป็นโคติเนสที่อยู่ใน family 18 นอกจาก catalytic domain (CatD) ที่ทำหน้าที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis แล้ว เรายังสามารถพบโดเมนอื่น ๆ ในโมเลกุลเอนไซม์ได้อีก เช่น chitin-binding domain (ChBD), Fibronectin type III-like domain (FnIIID) (32), Pro/Thr rich linker (33) และ cadherin-like domain (34) เป็นต้น โดเมนเหล่านี้ เรายังไม่ทราบกลไกและหน้าที่การทำงานที่ชัดเจน

โคติเนสแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงลำดับของโดเมนต่าง ๆ แตกต่างกันไป เช่น Chitinase A1 (ChiA1) จาก *Bacillus circulans* WL-12 มีปลายด้านอะมิโนเป็น CatD ปลายด้านคาร์บอกซีเป็น ChBD และ FnIIID 2 โดเมน (32) Chitinase D จาก *Bacillus circulans* WL-12 มีปลายด้านอะมิโนเป็น ChBD และ FnIIID ปลายด้านคาร์บอกซีเป็น CatD (40) Exochitinase Chi36 จาก *Bacillus cereus* มีเฉพาะ CatD เพียงโดเมนเดียว (41) ChiA จาก *Vibrio cholerae* มีปลายด้านอะมิโนเป็น ChBD และ FnIIID 2 โดเมน ต่อกัน 2 ชุด ส่วนปลายด้านคาร์บอกซีเป็น CatD (42) ChiA จาก *Serratia marcescens* มีปลายด้านอะมิโนเป็นโดเมนที่เรียกว่า N-terminal ปลายด้านคาร์บอกซีเป็น CatD (43) ChiB จาก *Serratia marcescens* มีปลายด้านอะมิโนเป็น CatD และปลายด้านคาร์บอกซีเป็น ChBD (44) เป็นต้น (รูปที่ 1.5) ถึงแม้ว่าโดเมนต่าง ๆ ที่ไม่ใช่ CatD ที่ปรากฏอยู่บนโมเลกุลของโคติเนสจะไม่ได้ทำหน้าที่ย่อยสลายสายของโคติน แต่มีรายงานว่าโดเมนเหล่านี้จะไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ให้มีความสามารถในการทำงานมากขึ้น (35) โดยคาดว่าโดเมนที่เพิ่มความสามารถในการจับกับสับสเตรต เช่น ChBD และ FnIIID น่าจะมีส่วนสำคัญต่อขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโคตินด้วยโคติเนส

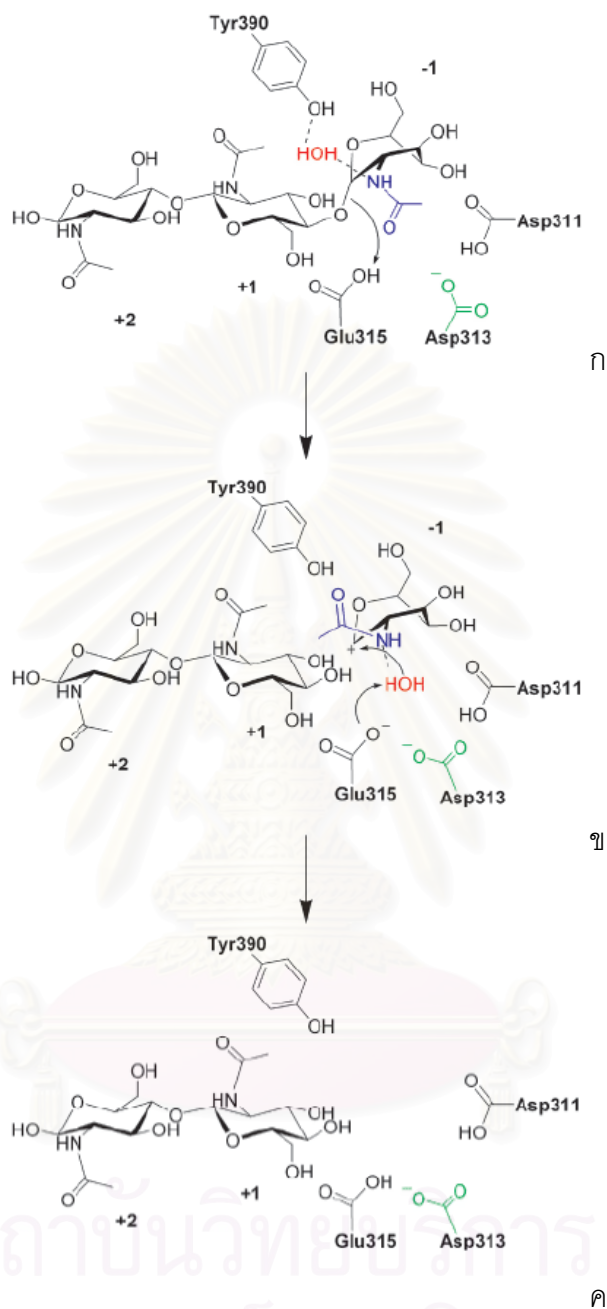


รูปที่ 1.3 โครงสร้าง 3 มิติของโคติเนส (แบบการ์ตูน)

(ก) Chitinase A จาก *Serratia marcescens* (family 18)

(ข) Chitinase จาก hevamine (family 18)

(ค) Chitinase จาก barley (family 19)



รูปที่ 1.4 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของ Chitinase A จาก *Serratia marcescens* ที่เสนอไว้โดย Papanikolau และคณะ (31)



รูปที่ 1.5 แบบจำลองการจัดเรียงลำดับของโดเมนในไคตินเนสจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ



ในปัจจุบัน chitin-binding domain เป็นโดเมนที่มีการศึกษาวิจัยไปมากที่สุดรองจาก catalytic domain โดยมีรายงานว่าใน Chitinase A1 (ChiA1) จาก *Bacillus circulans* WL-12 เมื่อไม่มี chitin-binding domain จะทำให้เอนไซม์ย่อยสลายสเตรตที่ไม่ละลายน้ำได้ไม่ดี แต่ถ้าไม่มีทั้ง chitin-binding domain และ fibronectin type III-like domain จะส่งผลถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ โดยจะทำให้เอนไซม์มี activity น้อยลงทั้งในสับสเตรตที่ละลายน้ำและไม่ละลาย จึงพอจะสรุปได้ว่า chitin-binding domain ใน ChiA1 ทำหน้าที่ในการจับกับพวก insoluble substrate เมื่อจับแล้วจะทำให้ ChiA1 สามารถย่อยพวก insoluble substrate ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่ fibronectin type III-like domain ไม่ได้มีหน้าที่หลักที่เกี่ยวข้องกับการจับกับสับสเตรตโดยตรง แต่น่าจะมีบทบาทต่อการเกิด hydrolysis เมื่อเอนไซม์จับกับสับสเตรตประเภทที่ไม่ละลายน้ำ (32, 35, 36) โดย chitin-binding domain จะใช้กรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic ring residue เป็นตัวจับกับสับสเตรต (37, 38) ส่วน fibronectin type III-like domain ถึงแม้จะหาโครงสร้าง 3 มิติได้แล้ว แต่หน้าที่การทำงานยังไม่ทราบแน่ชัด (39)

นอกจากนี้ยังพบว่า กรดอะมิโนที่เป็น aromatic ring residue ได้แก่ phenylalanine, tyrosine และ tryptophan จะทำหน้าที่สำคัญในการจับกับสับสเตรต ซึ่งเราสามารถพบกรดอะมิโนที่เป็น aromatic ring residue ได้ทั้งใน catalytic domain, chitin-binding domain และ fibronectin type III-like domain โดยมีงานวิจัยรายงานออกมาว่า ใน CatD ของ ChiA1 มีกรดอะมิโนที่เป็น aromatic residue ทำหน้าที่เสมือนเป็นรางที่จับกับสับสเตรต และพาสับสเตรตเข้าไปใน active site และเมื่อทำการเปลี่ยน residue เหล่านี้เป็น alanine พบว่า ทำให้ ChiA1 มีแอคติวิตีกับสับสเตรตชนิดที่ไม่ละลายน้ำลดลงอย่างมาก (รูปที่ 1.7) (36, 45) นอกจากนี้เรายังพบกรดอะมิโนที่เป็น aromatic residue บน chitin-binding domain ของ ChiA1 ด้วยเช่นเดียวกัน และพบว่า การกลายพันธุ์ conserve aromatic residue บางตัวบน ChBD ของ ChiA1 จะทำให้ ChBD สูญเสียความสามารถในการจับกับสับสเตรตไป (39, 37) อีกทั้งยังมี model ในการจับกับ crystalline substrate ของ ChiA จาก *Serratia marcescens* ที่ Uchiyama และคณะ (43) ได้เสนอเอาไว้ว่า aromatic residue บน N-terminal domain และ catalytic domain ที่ expose ออกมาอยู่ที่ผิวของเอนไซม์ จะทำหน้าที่ในการจับกับสายของสับสเตรตและทำหน้าที่เสมือนรางที่จะนำสับสเตรตเข้าไปติดใน active site ของเอนไซม์ (รูปที่ 1.8)

นอกจากนั้น เมื่อพิจารณาถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยโคติเนส เราพบว่าโคติเนสแต่ละชนิด สามารถย่อยสับสเตรตแล้วให้ผลิตภัณฑ์ออกมาไม่เหมือนกัน ยกตัวอย่างเช่น ChiA จาก *Serratia marcescens* จะให้ผลิตภัณฑ์เป็น dimer ($[\text{GlcNac}]_2$), ChiB จาก *Serratia marcescens* จะให้ผลิตภัณฑ์เป็น trimer ($[\text{GlcNac}]_3$) ส่วน ChiA1 จาก *Bacillus circulans* WL-12 จะให้ผลิตภัณฑ์เป็น monomer (GlcNac) ผสมกับ dimer ($[\text{GlcNac}]_2$) การที่โคติเนสแต่ละ

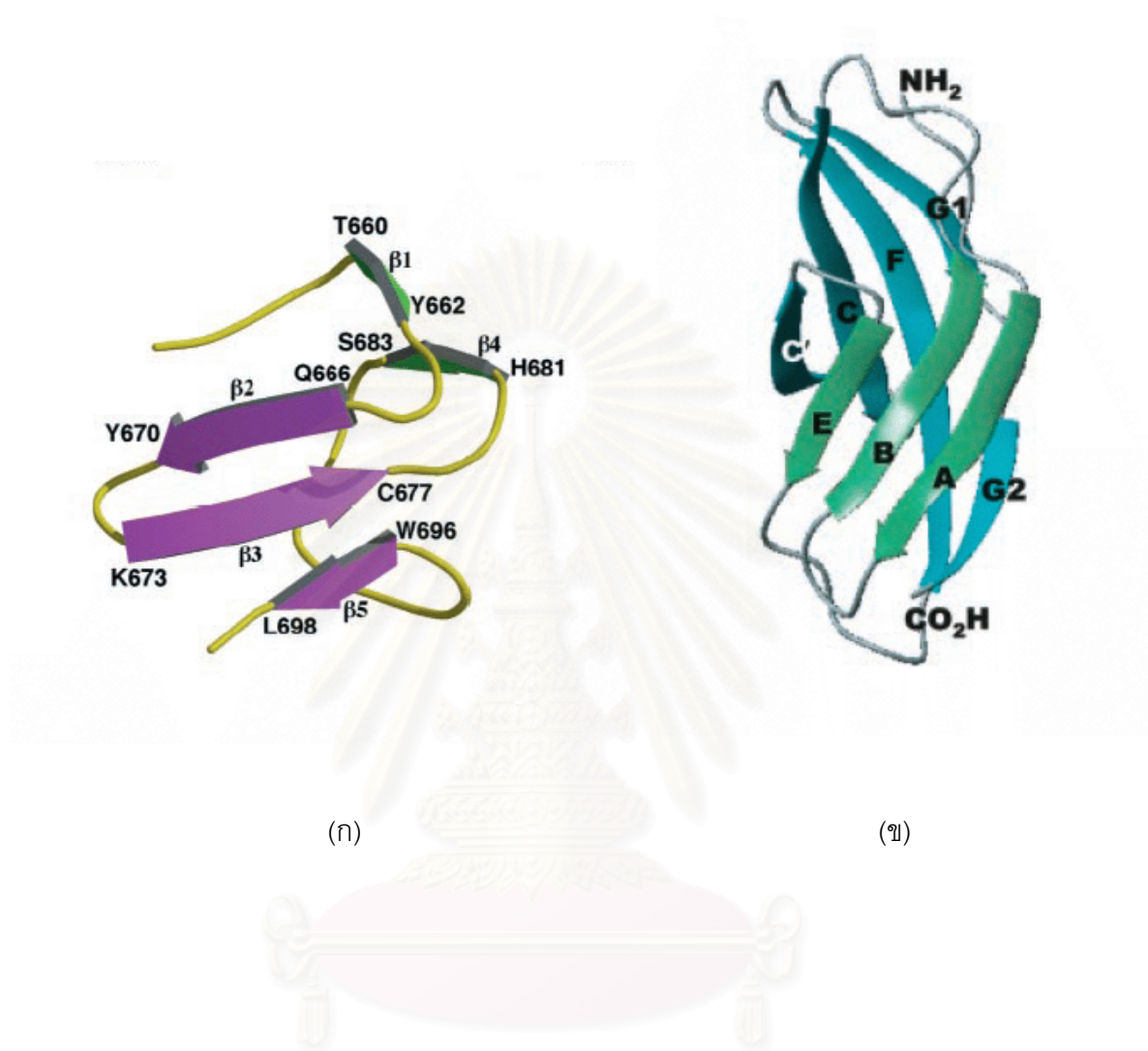
ชนิดเมื่อย่อยสลายแล้วให้ผลิตภัณฑ์ออกมาแตกต่างกันนั้น อาจเกี่ยวข้องกับการจัดเรียงลำดับของโดเมนที่แตกต่างกันบนโคติเนสแต่ละชนิดก็เป็นได้

ปัจจุบัน ได้มีการนำโคติเนสมาประยุกต์ใช้หลายทางด้วยกัน เช่น ใช้ในการเตรียม protoplast จากรา (46) ใช้เป็นสารป้องกัน plant-pathogenic fungi (47) และผลิต chito-oligosaccharides เพื่อใช้เป็นสารทางชีวภาพ (biologically active substance) (48)

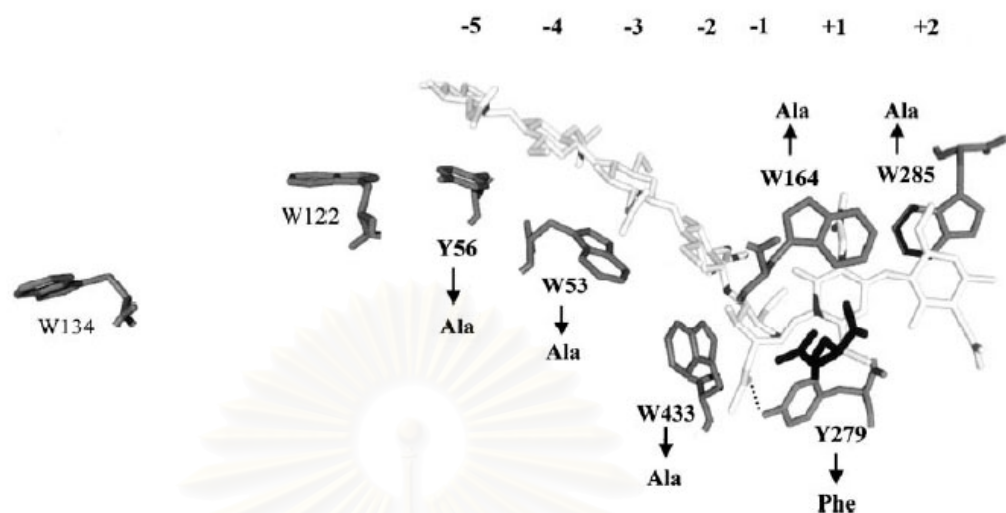
เนื่องจากโคติเนสมีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้หลายชนิด จึงนิยมนำมาใช้ในการเตรียม protoplast จากรา (49) เช่น โคติเนสจาก *Streptomyces* นิยมนำมาใช้ในการเตรียม protoplast จาก *Aspergillus oryzae* และ *Fusarium solani* (50) ในด้านเกษตรกรรม ได้มีการนำแบคทีเรียที่ผลิตโคติเนสได้มาใช้ในกระบวนการต่อต้านศัตรูพืช เช่น *Aeromonas caviae* สามารถใช้ควบคุมไม่ให้ต้นฝ้าย (cotton) เป็นโรคจากการติดเชื้อ *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium oxysporum* โคติเนสจาก *Serratia marcescens* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และตัวอ่อนในระยะ larvae ของ *Galleria mellonella* (51) เป็นต้น

ในทางธุรกิจโคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ค่อนข้างมีราคา ยกตัวอย่างเช่น ในสหรัฐอเมริกา โคติเนสที่ขายโดยบริษัท Sigma Chemical Co. (USA) มีราคาประมาณ 105\$ ต่อโคติเนส 10 units (400-1200 units/g solid) ดังนั้นการที่เราจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้เอง จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

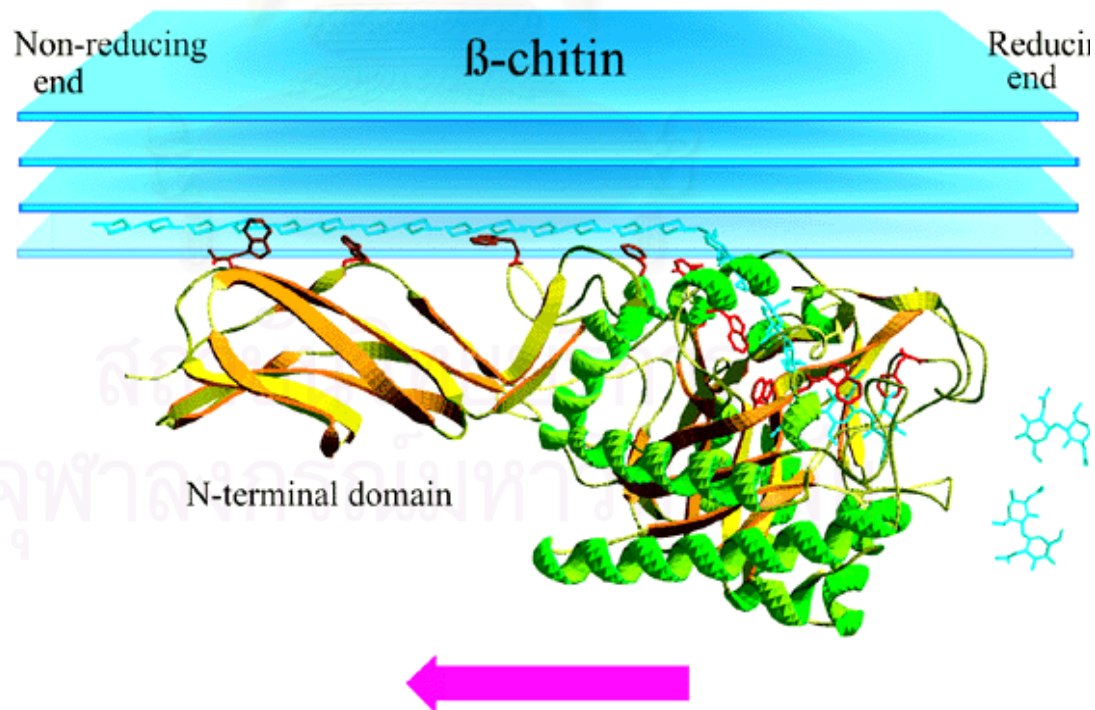
ตลอดหลายปีมานี้ นักวิทยาศาสตร์หลายท่านสามารถคัดเลือกจุลชีพในธรรมชาติที่ผลิตโคติเนสได้หลายชนิด เช่น *Bacillus circulans* WL-12 (52) *Serratia marcescens* (53) *Aeromonas* sp. 10S-24 (54) *Bacillus circulans* No.4.1 (55) ฯลฯ เป็นต้น ซึ่งพบว่าโคติเนสที่ผลิตโดยจุลชีพเหล่านี้จะมีขนาดโมเลกุล (molecular weight) อยู่ในช่วง 30-120 กิโลดาลตัน (kDa) สามารถทำงานได้ในช่วง pH 4-10 และในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 37-80 °C นอกจากนี้ นักวิทยาศาสตร์ยังสามารถโคลนยีนที่เก็บรหัสพันธุกรรมสำหรับสร้างเป็นโคติเนสได้หลายชนิด เช่น Chitinase A1 และ C จาก *Bacillus circulans* WL-12 (52) Chitinase C จาก *Serratia marcescens* (56) เป็นต้น



รูปที่ 1.6 โครงสร้าง Chitin-binding domain (ก) และ Fibronectin type III-like domain (ข) ของ *Bacillus circulans* WL-12



รูปที่ 1.7 แสดง aromatic residue บน CatD ของ ChiA1 ที่ทำหน้าที่จับกับสายของสับสเตอร์ด



รูปที่ 1.8 model ในการจับกับสับสเตอร์ด β -chitin โดยใช้ aromatic residue ของ ChiA จาก *Serratia marcescens*

ในปัจจุบัน วิทยาการทางชีวภาพมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว เอนไซม์เข้ามามีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากขึ้น รวมถึงอุตสาหกรรมแปรรูปไคตินและไคโตซานด้วย โดยส่วนใหญ่จะสนใจไคตินเนสที่ได้จากแบคทีเรีย เนื่องจากเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย และเนื่องจากในอุตสาหกรรมมักจะเกิดปัญหาเกี่ยวกับอุณหภูมิซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่วนใหญ่จะเกิดจากความร้อนทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ดังนั้นจึงสนใจศึกษาไคตินเนสที่ทนร้อนได้ ซึ่งมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านให้ความสนใจทำการศึกษาค้นคว้าไคตินเนสทนร้อน เช่น Takigichi and Shimahara (57) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนที่ผลิต N, N'-Diacetylchitobiose จากไคติน โดยเมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์ แล้วพบว่า เป็น *Bacillus licheniformis* X-7u ซึ่งเมื่อ Takayanagi และคณะ (58) ได้ทำการทดลองนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปแยกให้บริสุทธิ์ พบโปรตีน 4 ชนิด เรียก chitinase I (89 kDa), II (76 kDa), III (66 kDa) และ IV (59 kDa) โดย chitinase II, III และ IV สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง ๆ (70-80 °C) และเสถียรที่อุณหภูมิสูง การศึกษาไคตินเนสที่ได้จาก *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 พบว่ามีโปรตีน 3 ชนิดที่มีแอกติวิตีของไคตินเนส ซึ่งมีขนาด 25 (Chi25), 30 (Chi30) และ 40 (Chi40) กิโลดาลตัน เมื่อทำ Chi30 และ Chi40 ให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปศึกษาสมบัติ พบว่า Chi30 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4 ที่อุณหภูมิ 60 °C และเสถียรในช่วงความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6-8 ที่อุณหภูมิ 60 °C (59) และ Chi40 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 8-10 ที่ช่วงอุณหภูมิ 70-80 °C และเสถียรที่ความร้อนสูง (60) เมื่อทำการโคลน Chi30 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ ChiA จาก *S. lividans* และ ChiA จาก *S. coelicolor* (59) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ Gomes และคณะ (61) ได้ทำการศึกษา thermostable endochitinase จาก *Streptomyces* RC1071 ที่แยกได้จากดิน โดยเมื่อทำให้เอนโดไคตินเนสบริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ตัวนี้มีขนาดโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน โดยมี pI เท่ากับ 6.1 สามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ที่ 40 °C และมีเสถียรภาพในช่วงความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4-9 และอุณหภูมิ 30-70 °C ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช (phytopathogenic fungi) ได้ เป็นต้น

ก่อนหน้านี้คณะวิจัยสามารถโคลนยีนและศึกษาสมบัติบางประการของไคตินเนสจากแบคทีเรียที่อยู่ในดินตามธรรมชาติได้หลายชนิด เช่น Chi65 จาก *Bacillus licheniformis* PR-1 (62), Chi66 จาก *Bacillus licheniformis* SK-1 (63) และ Chi60 จาก *Burkholderia cepacia* TU09 (64) เมื่อทำการศึกษสมบัติบางประการของไคตินเนสเหล่านี้ พบว่า Chi65 ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 596 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 65,100 ดาลตัน สภาวะที่ Chi65 ทำงานมีแอกติวิตีมากที่สุดอยู่ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สับสเตรตที่ Chi65 ย่อยได้ดีที่สุด คือ คอลลอยด์ไคติน (colloidal chitin) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยคอลลอยด์ไคตินด้วย Chi65 คือ ไคโตไบโอส (N,N'-diacetyl chitobiose) และ N-acetylglucosamine ผสม

กัน ส่วน Chi66 เมื่อทำการศึกษาศสมบัติบางประการ พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 598 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน สภาวะที่ Chi66 สามารถทำงานแล้วมีแอกติวิตีสูงสุดอยู่ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สับสเตรตที่ Chi66 ย่อยได้ดีที่สุดคือ คอลลอยด์ลโคติน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยคอลลอยด์ลโคตินจะได้ *N,N'*-diacetyl chitobiose เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อทำการศึกษาศสมบัติบางประการของ Chi60 พบว่า Chi60 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 564 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 60,942 ดาลตัน มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ chitinase A (ChiA) ของ *Serratia marcescens* (32) ถึง 99% สภาวะที่ Chi60 สามารถทำงานแล้วมีแอกติวิตีสูงสุดอยู่ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0-6.0 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส สับสเตรตที่ Chi60 ย่อยได้ดีที่สุดคือคอลลอยด์ลโคติน และเมื่อนำ Chi60 ไปย่อยคอลลอยด์ลโคตินพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยจะได้ *N,N'*-diacetyl chitobiose เป็นส่วนใหญ่ เมื่อพิจารณาโครงสร้างของโคติเนสเหล่านี้พบว่า Chi65 และ Chi66 จะพบ CatD อยู่ที่ปลายด้านอะมิโน ตามด้วยส่วนของ FnIIID และ ChBD แต่ Chi60 จะพบส่วนของ ChiN อยู่ทางด้านปลายด้านอะมิโน ตามด้วย CatD เช่นเดียวกับ ChiA จาก *Serratia marcescens* และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วย Chitinase A จาก *Serratia marcescens* ก็ได้เป็น *N,N'*-diacetyl chitobiose (43) เช่นเดียวกับ Chi60 จึงคาดว่าการทำงานของเอนไซม์และการเรียงลำดับที่ต่างกันของโดเมนเหล่านี้อาจจะมีส่วนในการกำหนดขนาดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

โครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสออกมานอกเซลล์ได้ คือ *Bacillus licheniformis* RN01 จากแหล่งน้ำพุร้อนจังหวัดระนอง โดยสมบัติทั่วไปของ *Bacillus licheniformis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างของเซลล์เป็นแท่ง (rod-shaped) ซึ่งสามารถสร้างสปอร์และเอนไซม์แคตทาลิซิสได้ โดยผลงานวิจัยเบื้องต้นพบว่า เอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) ของแบคทีเรียนี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง 50-60°C และช่วงความเป็นกรดเป็นด่างที่กว้าง ซึ่งทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ดีในอุตสาหกรรม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องทำการโคลนยีนโคติเนสจากแบคทีเรียนี้มาศึกษาถึงโครงสร้างของยีนและโปรตีน และศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์นี้ เพื่อที่จะเข้าใจการทำงานของเอนไซม์นี้มากขึ้น และยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเราได้โคลนของเอนไซม์แล้วก็จะสามารถนำมาทำการกลายพันธุ์ (mutagenesis) นำไปศึกษาเปรียบเทียบกับโครงสร้างโคติเนสชนิดอื่น เพื่อพัฒนาหรือปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์ และศึกษาถึงโครงสร้างที่น่าจะมีส่วนในการกำหนดขนาดของผลิตภัณฑ์

บทที่ 2

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

Autoclave: Model H-88LL, Kokusan Ensinki Co., Ltd., Japan

Autopipette: Pipetman, Gilson, France

Centrifuge, refrigerated centrifuge: Model J-21C, Beckman Instrument Inc., U.S.A.

Centrifuge, microcentrifuge high speed: Model MC-15A, TOMY SEIKO CO.LTD., TOKYO, Japan

Electrophoresis Unit: 2050 MIDGET, LKB, Sweden and Mini-protein, Bio-Rad, U.S.A.;

Submarine Agarose Gel Electrophoresis unit

GeneAmp PCR System 2400, PERKIN-ELMER, U.S.A.

Gene Pulser™: Bio-Rad, U.S.A.

HPLC Model water™ 600 system

Incubator: Model 1H-100, Gallenkamp, England

Incubator shaker controlled environment: Psycho-threm, New Brunswick Scientific Co., U.S.A.

Incubator shaker: Model G76, New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, U.S.A.

Incubator, water bath: Model M20S, Lauda, Germany

Magnetic stirrer: Model Fisherbrand, Fisher Scientific, U.S.A.

Magnetic stirrer and heater: Model IKAMA® GRH, JANKE&KUNKEL GMBH&CO.KG, Japan

Microcentrifuge tube 1.5 mL, Bioactive, Thailand

pH meter: Model PHM95, Radiometer Copenhagen, Denmark

Power supply: Model POWER PAC 300, Bio-Rad, U.S.A.

Sonicator: Model W375, Heat systems-ultrasonics, U.S.A.

Spectrophotometer: Spectronic 2000, Bausch&Lomp, U.S.A.

Spectrophotometer UV-240, Shimadzu, Japan, and DU Series 650, Beckman, U.S.A.

Spectrophotometer UV-240, Shimadzu, Japan, and Du series 1050, Beckman, U.S.A.

Thin-wall microcentrifuge tubes 0.2 mL, Axygen Hayward, U.S.A.

UV transilluminator: Model 2011 Macrovue, SanGabriel California, U.S.A.

Vortex: Model K-550-GE, Scientific Industries, U.S.A.

Water bath: Charles Hearson Co., Ltd., England

Water bath, shaking: Heto lab Equipment, Denmark

สารเคมี

Acetonitrile: (Methyl cyanide) Sigma, U.S.A.

Acrylamide: Merck, U.S.A.

Agarose: SEAKEM LE Agarose, FMC Bioproducts, U.S.A.

Aqua sorb: Fluka, Switzerland

Ammonium persulphate: Sigma, U.S.A.

Ammonium sulphate: Sigma, U.S.A.

Ampicillin: Sigma, U.S.A.

Bacto-Agar: DIFCO, U.S.A.

BlueRanger[®] Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix: PIERCE, U.S.A.

β -mercaptoethanol: Fluka, Switzerland

5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (X-gal): Sigma, U.S.A.

Bovine serum albumin (BSA): Sigma, U.S.A.

Bromphenol blue: Merck, Germany

Chloroform: BDH, England

Coomassie brilliant blue R-250: Sigma, U.S.A.

Dialysis tubing: Sigma, U.S.A.

di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous: Carlo Erba Reagenti, Italy

di-Sodium ethylenediaminetetra acetate: M&B, England

DNA marker: Lamda(λ)DNA digest with Hind III: GIBCOBRL, U.S.A.

Ethidium bromide: Sigma, U.S.A.

Ethyl alcohol absolute: Carlo Erba Reagenti, Italy

Ficoll type 400: Sigma, U.S.A.

Flake chitin: Sigma, U.S.A.

Fluorescent Brightener 28: Sigma, U.S.A.

Glacial acetic acid: Carlo Erba Reagenti, Italy

Glycine: Sigma, U.S.A.

Glycol chitin: Seikagaku Corporation, Japan

Glucose: BDH, England

Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG): Sigma, U.S.A.

Low molecular weight calibration kit for SDS electrophoresis: Amersham, U.S.A.

100 bp ladder: GIBCOBRL, U.S.A.

Magnesium sulphate 7 hydrate: BDH, England

Magnesium chloride: BDH, England

Methanol: Merck, Germany

N, N'-dimethyl-formamide: Fluka, Switzerland

N, N'-methylene-bis-acrylamide: Sigma, U.S.A.

NNN'N'-tetramethyl-1,2-diaminoethane (TEMED): Carlo Erba Reagenti, Italy

Phenol: BDH, England

Phosphoric acid: Mallinckrodt, U.S.A.

Potassium ferricyanide: BDH, England

Potassium phosphate monobasic: Carlo Erba Reagenti, Italy

QIAquick Gel Extraction Kit: QIAGEN, Germany

QIAquick Plasmid Extraction Kit: QIAGEN, Germany

Sodium carbonate anhydrous: Carlo Erba Reagenti, Italy

Sodium citrate: Carlo Erba Reagenti, Italy

Sodium chloride: Carlo Erba Reagenti, Italy

Sodium dodecyl sulfate (SDS): Boehringer Mannheim GmbH, Germany

Sodium hydroxide: Merck, Germany

Sucrose: Sigma, U.S.A.

Tris (hydroxymethyl) aminomethane: Carlo Erba Reagenti, Italy

TritonX-100: Merck, Germany

Tryptone: DIFCO, U.S.A.

Xylene cyanole FF: Sigma, U.S.A.

Yeast extract: DIFCO, U.S.A.

เอนไซม์

DNA polymerase I (Klenow): New England Biolabs, Inc., U.S.A.

Lysozyme: Sigma, U.S.A.

Pfu DNA Polymerase: Promega, U.S.A.

Proteinase K: Sigma, U.S.A.

Restriction enzymes: GIBCOBRL, U.S.A. and New England Biolabs, Inc., U.S.A.

RNase: Sigma, U.S.A.

Taq DNA polymerase: Pacific science, France

T4 DNA ligase: New England Biolabs, Inc., U.S.A.

Vent DNA polymerase: New England BioLabs, Inc., U.S.A

ไพรเมอร์ (Primer)

BP-19F : GTTTTCCCTTGTTGTCTTC ($T_m = 54^\circ\text{C}$)

BP-20R : CTCTTTATCGTTTTCTATCC ($T_m = 54^\circ\text{C}$)

สำหรับโคลนยีนไคตินเนสจาก *Bacillus licheniformis*

RN-Seq-I : TTGCTGGGAGGGAAGGC ($T_m = 56^\circ\text{C}$)

RN-Seq-II : CGGTTTTCAAATGACACG ($T_m = 52^\circ\text{C}$)

RN-Seq-III : CAGAAGCAAAGACGGC ($T_m = 52^\circ\text{C}$)

RN-Seq-IV : CGTAGAACGGTGTTC ($T_m = 50^\circ\text{C}$)

RN-Seq-V : AGCAAACGGATTAAGCGG ($T_m = 54^\circ\text{C}$)

สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคตินเนส

pA : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ($T_m = 60^\circ\text{C}$)

pH' : AAGGAGGTGATGCAGCCGCA ($T_m = 64^\circ\text{C}$)

สำหรับโคลนยีน 16s rRNA

pD : CAGCAGCCGCGTAATAC ($T_m = 58^\circ\text{C}$)

pE : AAACCTCAAAGGAATTGACGG ($T_m = 56^\circ\text{C}$)

สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA

BEN1 : GCTCCGATCCAATCTACAACCG ($T_m = 68^\circ\text{C}$)

BEN5 : CAGGCTGGCGTTCATGCTGT ($T_m = 64^\circ\text{C}$)

BEN4 : GTTTTGGATCCGTTTGACTTTCTC ($T_m = 64^\circ\text{C}$)

BEN6 : GATTTTGCACCGGACGGAGG ($T_m = 64^\circ\text{C}$)

สำหรับทำเอนไซม์ลูกผสมโดยนำเอาส่วนยีน FnIID กับ ChBC ของโคติเนสที่โคลนจาก *Bacillus licheniformis* RN01 มาต่อเข้ากับส่วนท้ายของยีนโคติเนส *chi60*

พลาสมิด เวกเตอร์

Plasmid pGEM[®]-T Easy (Promega) สำหรับโคลนยีนโคติเนสและยีน 16s rRNA เข้าสู่เซลล์ *E. coli*

แบคทีเรีย

Bacillus licheniformis RN01 ที่แยกมาจากแหล่งน้ำพุร้อน จังหวัดระนอง เพื่อนำมาศึกษาและโคลนยีนโคติเนส

Escherichia coli JM109 ที่มี genotype F' [traD36, proAB, lacIqZM15], λ , endA1, gyrA96, hsdR17(r_K - m_K), mcrB⁺, recA1, relA1, Δ (lac-proAB), thi, supE44 ที่ซื้อมาจาก GIBCOBRL, U.S.A.

Escherichia coli TOP10 ที่มี genotype F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZM15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG ที่ซื้อมาจาก Invitrogen[™], U.S.A.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Luria-Bertani (LB) medium

ประกอบด้วย tryptone 1.0% yeast extract 0.5% และ NaCl 0.5% สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง จะเติมผงวุ้น (agar) ลงไป 1.5%

Colloidal chitin minimum medium (CCMM)

ประกอบด้วย colloidal chitin 0.02% (w/v) yeast extract 0.05% (NH₄)₂SO₄ 0.1% MgSO₄·7H₂O 0.03% KH₂PO₄ 0.6% และ K₂HPO₄ 1.0% สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จะเติมผงวุ้น (agar) ลงไป 1.5% และเพิ่มปริมาณ colloidal chitin จาก 0.02% เป็น 0.1%

LB-colloidal chitin medium (LB-CC)

จะเตรียมโดยมีส่วนประกอบเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งและจะเติม colloidal chitin ลงไปด้วย 0.1% (w/v)

วิธีการทดลอง

การโคลนยีนไคตินเนสจาก genomic DNA ของ *Bacillus licheniformis* RN01

เริ่มต้นจะต้องสกัด genomic DNA ของ *Bacillus licheniformis* RN01 (65) โดยนำ *Bacillus licheniformis* RN01 มา 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 10 ml ที่ 37°C เขย่า 250 rpm ข้ามคืน เทน้ำเลี้ยงเชื้อในหลอด microcentrifuge 1.5 ml นำไปปั่น (centrifuge) เพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 5,000 rpm 5 นาที เทน้ำใสด้านบนทิ้ง กระจายเซลล์ใน SET buffer [25 mM (w/v) Tris-HCl pH8, 10 mM (w/v) EDTA, 50mM (w/v) sucrose] ปริมาตร 100 μ l จากนั้นเติม SET buffer ที่มี lysozyme 5 mg ผสมอยู่ลงไป 400 μ l นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม 10% (w/v) SDS ลงไป 5 μ l ตามด้วยเติม 20 mg/ml protinase K ลงไป 3 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่ 50°C ข้ามคืน

จากนั้นแยกเศษเซลล์ออกโดยนำไปปั่นที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม 3 M Sodium acetate ลงไป 50 μ l ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดเบา ๆ แล้วเติม phenol chloroform [phenol:chloroform:isoamyl alcohol, 25:24:1 (v,v,v)] ลงไปปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีอยู่ นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm 10 นาที สารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้นและจะมีเศษโปรตีนเป็นชั้นสีขาวอยู่ระหว่างกลาง ให้ดูดเฉพาะส่วนใสส่วนบนไปยังหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม phenol chloroform ลงไป ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วเอาไป centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสไปยังหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ทำเหมือนเดิมจนกว่าจะไม่เห็นชั้นโปรตีนสีขาวระหว่างสารละลายทั้ง 2 ชั้น

ส่วนใสส่วนบนที่ได้ นำไปเติม absolute ethanol ที่อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องลงไป 2.5 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที genomic DNA จะตกตะกอนลงมาอยู่ที่ก้นหลอด ให้เท absolute ethanol ด้านบนทิ้งแล้วล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol ลงไป 500 μ l (ถ้าตะกอนหลุดจากก้นหลอดตอนเติม 70% ethanol ให้เอาไป centrifuge ใหม่) แล้วเทออก จากนั้นนำไประเหย ethanol ออกโดยนำไปอบไว้ในตู้อบ 37°C ให้แห้งหมาด ๆ แล้วละลายตะกอน genomic DNA โดยเติม TE buffer [10 mM (w/v) Tris-HCl pH 8 และ 1 mM (w/v) EDTA pH 8] ลงไป 100 μ l นำไปบ่มข้ามคืนที่ 37°C แล้วเก็บสารละลาย DNA ไว้ที่ 4°C

นำสารละลาย DNA ที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบในการทำ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อโคลนยีนไคตินเนส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ BP-19F และ BP-20R ที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนไคตินเนสได้ครบทั้งยีน (62) และใช้ *Vent* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ในการเพิ่มจำนวนยีนไคตินเนส โดยจะใส่สารต่าง ๆ ในการทำ PCR ดังนี้ *Vent* DNA polymerase 1 Unit, $MgSO_4$ 2 mM, BP-19F และ BP-20R อย่างละ 0.4 μ M, dNTP 200 μ M, genomic DNA 200 ng ในสารละลายปริมาตรสุทธิ 50 μ l และตั้งโปรแกรมทำ PCR ดังนี้ ขั้น pre-denature 94°C 4:00 นาที, ขั้น denature 94°C 1:00 นาที, ขั้น annealing 52°C 1:00 นาที, ขั้น extension 72°C 2:10 นาที โดยจะทำ PCR 25 รอบ แล้วทำขั้น post-extension ที่ 72°C อีก 5:00 นาที

นำ PCR product ที่ได้มาสกัด phenol chloroform (65) และตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethanol ระเหย ethanol ออก แล้วนำไปทำ A-tailing โดยนำตะกอน DNA มาละลายในสารละลายที่มี $MgSO_4$ 1.5 mM, dATP 10 mM ThermoPol buffer เข้มข้น 1X และ *Taq* DNA polymerase 1 U ปริมาตรรวม 20 μ l โดยนำไปบ่มที่ 72°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารละลายมา run 0.7% agarose gel electrophoresis แล้วตัดเจลตรงชิ้น PCR product ที่คาดว่าเป็นยีนไคตินเนส นำ DNA มา elute ออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit จากนั้นทำการเชื่อมยีนไคตินเนสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy แล้วถึงนำยีนไคตินเนสที่เชื่อมกับเวกเตอร์แล้วมาถ่ายเข้าสู่เซลล์ (transformation) *E. coli* Top10 โดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) นำเชื้อที่ทำ electroporation แล้วมากระจายเซลล์ลงบน plate อาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มีแอมพิซิลลิน (ampicillin) 100 μ g/ml, IPTG 1.4 mg และ X-GAL 0.8 mg นำไปเลี้ยงที่ 37°C 1-3 คืน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มียีนไคตินเนสโดยสังเกตจากวงใสรอบโคนี (clear zone) และวิธี blue/white colony screening

เลือกโคโลนีสีขาวที่เกิด clear zone นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (LB broth) ที่มี ampicillin 100 μ g/ml นำมาสกัดพลาสมิด (66) แล้วนำพลาสมิดที่ได้มาทำแผนที่ยีน และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคตินเนส

การโคลนยีน 16s rRNA ของ *Bacillus licheniformis* RN01

นำ genomic DNA ที่สกัดได้จาก *Bacillus licheniformis* RN01 มาเพิ่มจำนวนยีน 16s rRNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ pA และ pH' (67) และใช้ *Vent* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ในการเพิ่มจำนวนยีน 16s rRNA โดยจะใส่สารต่าง ๆ ในการทำ PCR ดังนี้ *Vent* DNA polymerase 1 Unit, $MgSO_4$ 2 mM, pA และ pH' อย่างละ 0.4 μ M, dNTP 200 μ M, genomic DNA 200 ng ในสารละลายปริมาตรสุทธิ 50 μ l ตั้งโปรแกรมทำ PCR ดังนี้ ขั้น pre-denature

94°C 4:00 นาที, ขั้น denature 94°C 1:00 นาที, ขั้น annealing 60°C 1:00 นาที, ขั้น extension 72°C 2:00 นาที โดยจะทำ PCR 25 รอบ แล้วทำขั้น post-extension ที่ 72°C อีก 2:00 นาที

จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy ด้วยวิธีการแบบเดียวกับวิธีที่โคลนยีนไคตินเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy จนกระทั่งถึงขั้นตอน electroporation เมื่อ transform พลาสมิดที่มีชิ้นยีน 16s rRNA เข้าสู่เซลล์ *E. coli* JM109 แล้ว จะทำการกระจายเซลล์ลงบน plate อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มี แอมพิซิลิน 100 µg/ml, IPTG 1.4 mg และ X-GAL 0.8 mg แล้ว คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นยีน 16s rRNA โดยวิธี blue/white colony screening คัดเลือกโคโลนีสีขาว มาสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ศึกษาลักษณะสมบัติของไคตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01 และ ไคตินเนสที่โคลนจาก *Bacillus licheniformis* RN01 (ChiRN1)

การทดลองในส่วนนี้จะศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะการผลิตไคตินเนสของ *Bacillus licheniformis* RN01 ที่คัดเลือกมาจากธรรมชาติ ศึกษาลักษณะการผลิตไคตินเนสที่โคลนได้จาก *Bacillus licheniformis* RN01 ศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์ ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรต ศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วยไคตินเนส และหาขนาดโมเลกุลของไคตินเนส

ในการศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะการผลิตไคตินเนสของ *Bacillus licheniformis* RN01 ที่คัดเลือกมาจากธรรมชาติ เราจะ inoculate เชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 1 ml ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB มาแล้วข้ามคืน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CCMM 100 ml ใน flask ขนาด 1000 ml เลี้ยงที่ 50°C เขย่า 250 rpm แล้วดูคน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดอัตราการเจริญเติบโตและวัดแอกติวิตี โดยดูคน้ำเลี้ยงเชื้อที่เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง มา 1 ml แบ่งมา 100 µl เอาไปเจือจางจนได้ความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสม แล้วนำไป spread บน plate อาหารเลี้ยงเชื้อ LB เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหลือเอามาปั่นตกตะกอนเซลล์ แล้วนำส่วนน้ำใสมาวัดแอกติวิตีของไคตินเนส โดยวิธีของ Schale (68) โดยนำเอนไซม์มา 100 µl

ในการศึกษาลักษณะการผลิตไคตินเนสที่โคลนได้จาก *Bacillus licheniformis* RN01 โดย inoculate *E. coli* Top10 ที่มีพลาสมิด ที่มียีนไคตินเนส 1 ml มาเลี้ยงในอาหาร LB 100 ml ใน flask 1000 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 250 rpm แล้วดูคน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ml มาวัดแอกติวิตี ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน โดยนำมาวัดด้วยวิธีของ Schale (68)

การหา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคตินเนส จะทำโดยนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาวัดแอกติวิตี (68) ที่บัฟเฟอร์ต่าง ๆ กัน โดยทำการวัดใน 100 mM citrate buffer pH 3-6, 100 mM phosphate buffer pH 6-8 และ 100 mM Tris-HCl buffer pH 8-10 จากนั้นนำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30 - 80°C โดยใช้ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

การหาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรต จะทำโดยนำเอนไซม์มาวัดแอกติวิตี (68) โดยใช้สับสเตรตต่าง ๆ ได้แก่ ไคตินจากเปลือกกุ้ง, ไคตินจากเปลือกปู, ไคตินจากแกนปลาหมึก, ไคตินจากแกนปลาหมึกปั้น, powder chitin, colloidal chitin, PNAC (partial-N-acetylated chitin), 70% DD chitosan และ 90% DD chitosan ใน 100 mM citrate buffer pH 6 บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที โดยสับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ ไคตินจากเปลือกกุ้ง, ไคตินจากเปลือกปู, ไคตินจากแกนปลาหมึก และไคตินจากแกนปลาหมึกปั้น จะใช้ปริมาณ 10 mg/ml ส่วนสับสเตรตที่ละลายน้ำ ได้แก่ colloidal chitin, PNAC (partial-N-acetylated chitin), 70% DD chitosan และ 90% DD chitosan จะใช้ปริมาณ 1 mg/ml

การหาขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วยไคตินเนส ทำโดยนำเอนไซม์ 200 μ l (50 mU) มาย่อยสับสเตรต colloidal chitin 5 mg/ml ใน 100 mM citrate buffer pH 6 ในปริมาตรทั้งหมด 1.5 ml บ่มไว้ที่ 50°C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้ม 15 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 12000 rpm 10 นาที นำส่วนใสมา 300 μ l ผสมกับ acetonitrile 700 μ l แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 micron จากนั้นนำส่วนที่กรองผ่าน filter แล้ว 20 μ l ไปฉีด HPLC โดยใช้คอลัมน์ Shodex Asahipak NH2P-50 โดยใช้ น้ำ 30% : acetonitrile 70% เป็น mobile phase ใช้ flow rate 1.0 ml/min ที่อุณหภูมิ 25°C

การหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน จะทำการแยกโปรตีนโดยอาศัย SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Trudel และ Asselin (69) โดยเตรียม 10%-12.5% พอลิอะคริลาไมด์เจลที่ผสม 0.01% ไกลคอลไคติน (glycol chitin) เต็มโปรตีนตัวอย่างลงบนเจล โดยทำเป็น 2 ชุด สำหรับย้อมโปรตีน 1 ชุด และสำหรับย้อมแอกติวิตี 1 ชุด จากนั้นนำไปทำ electrophoresis เมื่อเสร็จแล้วตัดเจลส่วนหนึ่งมาย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อดูแถบโปรตีน เจลอีกส่วนหนึ่งนำมากำจัด SDS ออกเพื่อคืนสภาพธรรมชาติ (re-nature) ของโปรตีนในแผ่นเจล โดยแช่ใน 100 mM citrate buffer pH 6 ที่มี 1% triton X-100 ผสมอยู่ ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วจึงนำมาทำการย้อมแอกติวิตีด้วย 0.01% (w/v) Fluorescent Brightener 28 ที่ละลายใน 0.5 M Tris-HCl buffer pH 8.9 เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออก

ด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง นำไปส่องดูแถบแอดคิวิตีภายใต้แสง UV เพื่อดูว่าแถบโปรตีนที่มีแอดคิวิตีของโคติเนส

กลายพันธุ์โคติเนสโดยสร้างโคติเนสลูกผสม

เราจะสร้างโคติเนสลูกผสมโดยนำเอาชิ้นส่วนของยีนจาก pW2 ที่เป็นส่วนสำหรับสร้าง FnIII_D และ ChBD มาต่อเข้ากับยีนที่สร้างเป็น Chi60 จาก pKKChi60 โดยจะทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนจาก pKKChi60 ด้วยการทำให้ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ BEN1 และ BEN5 จะทำการเติมสารต่าง ๆ ดังนี้ *Pfu* DNA polymerase 1.5 Unit, ไพรเมอร์ BEN1 และ BEN5 อย่างละ 0.4 μ M, dNTP 200 μ M, plasmid pKKChi60 200 ng ในสารละลายปริมาตรทั้งหมด 50 μ l ตั้งโปรแกรมทำ PCR ดังนี้ ขั้น pre-denature 94°C 4:00 นาที, ขั้น denature 94°C 1:00 นาที, ขั้น annealing 62°C 1:00 นาที, ขั้น extension 72°C 11:15 นาที โดยจะทำ PCR 25 รอบ แล้วทำขั้น post-extension ที่ 72°C อีก 7:00 นาที ส่วนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนจาก pW2 จะทำโดยใช้คู่ไพรเมอร์ BEN4 และ BEN6 จะทำการเติมสารต่าง ๆ ดังนี้ *Pfu* DNA polymerase 1.5 Unit, ไพรเมอร์ BEN4 และ BEN6 อย่างละ 0.4 μ M, dNTP 200 μ M, plasmid pW2 200 ng ในสารละลายปริมาตรทั้งหมด 50 μ l ตั้งโปรแกรมทำ PCR ดังนี้ ขั้น pre-denature 94°C 4:00 นาที, ขั้น denature 94°C 1:00 นาที, ขั้น annealing 60°C 1:00 นาที, ขั้น extension 72°C 1:15 นาที โดยจะทำ PCR 25 รอบ แล้วทำขั้น post-extension ที่ 72°C อีก 3:00 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *Bam*H I นำทั้งหมดไปทำ 0.7% agarose gel electrophoresis แล้วตัดเจลบริเวณที่มีชิ้น DNA อยู่ นำมา elute ออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction kit แล้วนำชิ้นส่วน DNA ที่ได้ทั้ง 2 ชิ้นมาเชื่อมกันโดยเติม T4 DNA ligase แล้วมาถ่ายเข้าสู่เซลล์ (transformation) *E. coli* Top10 โดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) นำเซลล์ที่ transform แล้วมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มีแอมพิซิลิน 100 μ g/ml เลี้ยงเชื้อที่ 37°C 2 วัน คัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสมาสกัดพลาสมิด แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีน

นำโคโลนีที่มีพลาสมิดที่เราสร้างได้มาเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโคติเนสลูกผสม โดยเอาเชื้อ 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเชื้อเหลว LB 2 ml ที่ 37°C ข้ามคืน จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 ml ลงใน flask 500 ml ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 200 ml เลี้ยงที่ 37°C 4 วัน แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไป centrifuge ที่ความเร็ว 8000 rpm 15 นาที เก็บส่วน supernatant มาหาขนาดของโปรตีนด้วยการทำ SDS-PAGE (69) และนำเอนไซม์มาย่อยสับสเตรตแล้วนำไปฉีด HPLC เพื่อหาขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโคติเนสลูกผสม

บทที่ 3

ผลการทดลอง

การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบ 16s rRNA

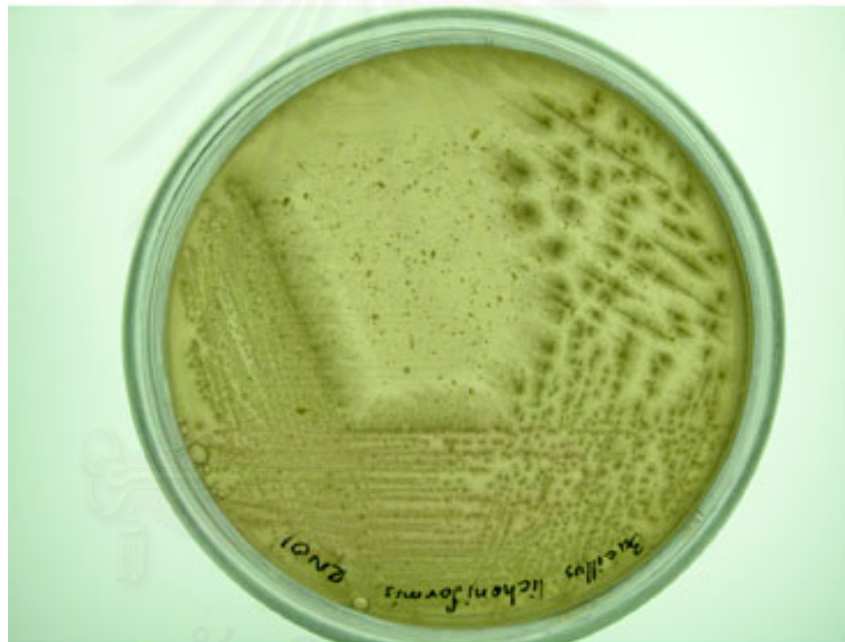
ในโครงการนี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโคทิเนสได้ โดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเมื่อนำไปศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีแล้วพบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน จีโนสและสปีชีส์ *Bacillus licheniformis* ดังนั้นเราจะทำการระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 (รูปที่ 3.1) เพิ่มเติมโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ซึ่งจะทำการทดลองโดยทำ polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มจำนวนชิ้นยีน 16s rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ pH' (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') โดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังนี้

	ปริมาณที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้
2 U/ μ L Vent DNA Polymerase	1 U	0.5 μ L
10X ThermoPol Buffer	1X	5 μ L
100mM MgSO ₄	2 mM	1 μ L
10 pmole/ μ L pA	0.4 μ M	2 μ L
10 pmole/ μ L pH'	0.4 μ M	2 μ L
10 mM dNTP	200 μ M	1 μ L
Genomic DNA template	200 ng	0.5 μ L
Ultrapure water		38 μ L
Total volume		50 μ L

แล้วตั้งโปรแกรมดังนี้

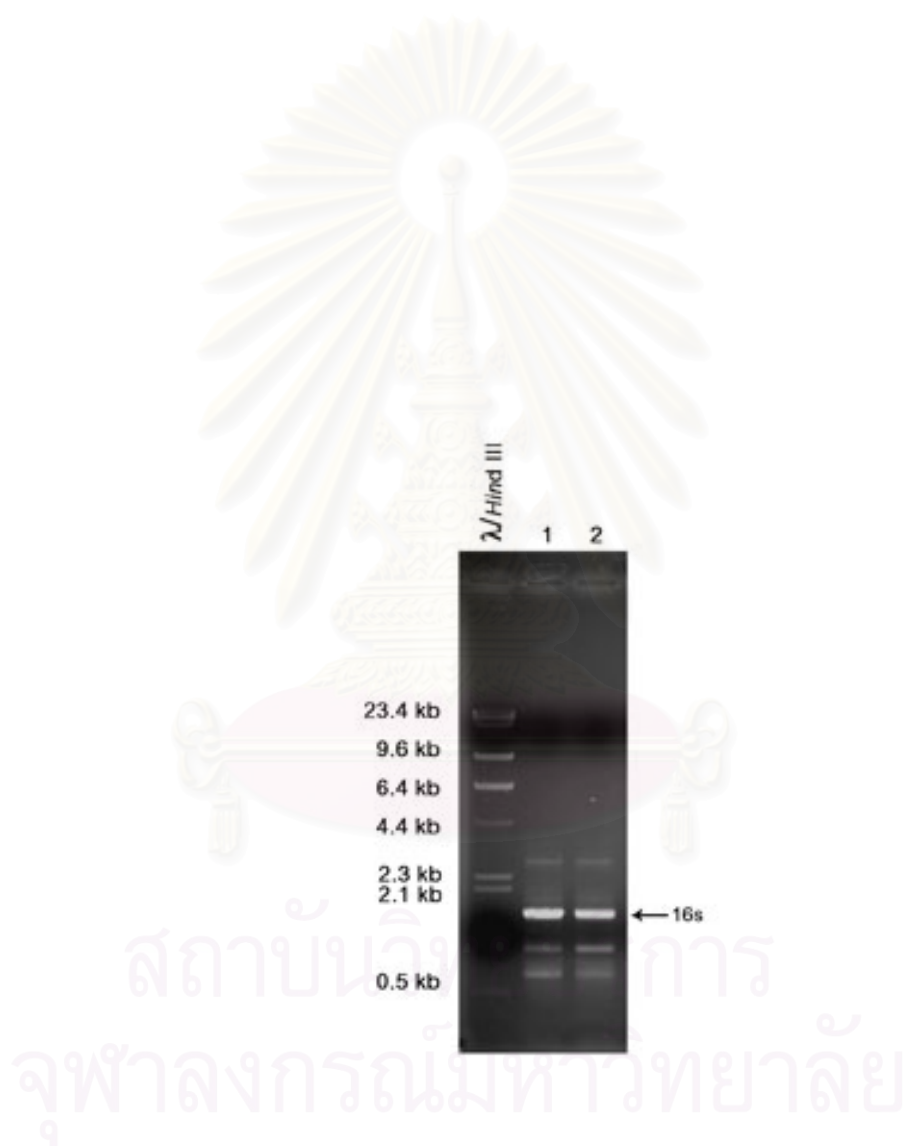
- | | | | | | |
|-----------------|-------------|------|----------|------|------|
| 1. pre-denature | ที่อุณหภูมิ | 94°C | เป็นเวลา | 4:00 | นาที |
| 2. denature | ที่อุณหภูมิ | 94°C | เป็นเวลา | 1:00 | นาที |
| 3. annealing | ที่อุณหภูมิ | 60°C | เป็นเวลา | 1:00 | นาที |
| 4. extension | ที่อุณหภูมิ | 72°C | เป็นเวลา | 2:00 | นาที |

ทำ PCR โดยตั้งโปรแกรมให้เครื่อง ThermoCycler ทำงานในขั้นตอน 2-4 จำนวน 25 รอบ และในรอบสุดท้ายจะตั้งโปรแกรมให้เครื่อง ThermoCycler ทำงานที่ 72°C ต่อไปอีก 2 นาที จากนั้นนำ PCR product มา run 0.7% agarose gel electrophoresis ได้ผลดังรูปที่ 3.2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.1 รูป *Bacillus licheniformis* RN01 ที่มี clear zone รอบโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCMM



รูปที่ 3.2 แสดงยีน 16s rRNA จาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่เพิ่มจำนวนโดยการทำให้ PCR โดยใช้ primer pA และ pH' กำหนดให้ lane 1 และ 2 คือ PCR product

นำชิ้นยีนที่เพิ่มจำนวนได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy แล้วนำ plasmid transform เข้าสู่ *E. coli* JM109 จากนั้นสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นยีนที่เพิ่มจำนวนได้นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นดังรูปที่ 3.3

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มจำนวนได้มีจำนวน 1565 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มาเข้าโปรแกรม BLAST จะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มจำนวนจาก genomic DNA ของ *Bacillus licheniformis* RN01 มีความคล้ายคลึงกับยีน 16s rRNA ของ *Bacillus licheniformis* M1-1 (AB039328) ที่มีความยาว 1,549 bp อยู่ 99% (รูปที่ 3.4)

การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของโคติเนสอย่างหยาบ (crude chitinase) ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01

การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus licheniformis* RN01 จะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CCMM แล้วดูค่าน้ำเลี้ยงมาวัดอัตราการเจริญและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 เจริญเข้าสู่ stationary phase เมื่อเลี้ยงเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และมีการผลิตโคติเนสออกมามากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 2 วัน (รูปที่ 3.5)

เมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่า โคติเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50-60°C (รูปที่ 3.6) ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เราพบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ pH 6 - 11 (รูปที่ 3.7)

เมื่อนำเอนไซม์ไปย่อยสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โคตินจากเปลือกกุ้ง, โคตินจากเปลือกปู, โคตินจากแกนปลาหมึก, โคตินจากแกนปลาหมึกป่น, powder chitin, colloidal chitin, PNAC (partial-N-acetylated chitin), 70% DD chitosan และ 90% DD chitosan พบว่า โคติเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 สามารถย่อย PNAC ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ colloidal chitin และ โคตินจากแกนปลาหมึกป่น ส่วนสับสเตรตที่เอนไซม์ย่อยไม่ได้คือ โคตินจากเปลือกปู (รูปที่ 3.8)

หลังจากนำเอนไซม์ไปย่อยสับสเตรตแล้วนำมาหาขนาดของผลิตภัณฑ์โดยนำมาฉีด HPLC พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น GlcNAc และ dimer ของ N-acetylglucosamine (chitobiose) ผสมกัน โดยมีผลิตภัณฑ์หลักเป็น chitobiose (รูปที่ 3.9)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGATG
 GGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG
 ATAACTCCGGGAAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAAGGTGG
 CTTTCAGCTACCACTTGCAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
 CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGA
 AGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTGTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGA
 CGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTC
 AACCGGGGAGGGTCATTGGAAAAGCTGGGGAAGTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGC
 GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTG
 AGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCT
 AAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGG
 TCGCAAGACTGAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGCA
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCCTTCGG
 GGGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAA
 CGAGCGCAACCCCTTAGTCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGCTACAATG
 GGCAGAACAAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC
 AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
 TTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC
 CTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGG
 AAGGTGCGGCTGCATCACCTCCTTA

รูปที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ที่เพิ่มจำนวนจาก genomic DNA ของ *Bacillus*
licheniformis RN01 ด้วยไพรเมอร์ pA และ pH' โดย DNA ที่เพิ่มจำนวนได้มีจำนวน 1565 bp

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำ pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W (1.82)

```

M1-1      ATTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGT 60
RN01      ATTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGT 55
          *****

M1-1      CGAGCGGACCGAGGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG 120
RN01      CGAGCGGACCGAGGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG 115
          *****

M1-1      GGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTG 180
RN01      GGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTG 175
          *****

M1-1      ATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAAGGTGGCTTTAGCTACCACTTCAGATGGACCC 240
RN01      ATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAAGGTGGCTTTAGCTACCACTTCAGATGGACCC 235
          *****

M1-1      GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC 300
RN01      GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC 295
          *****

M1-1      TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC 360
RN01      TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC 355
          *****

M1-1      AGTAGGGAATCTTCGCAATGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA 420
RN01      AGTAGGGAATCTTCGCAATGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA 415
          *****

M1-1      GGTTCGATCGTAAACTCTGTGTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGG 480
RN01      GGTTCGATCGTAAACTCTGTGTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGG 475
          *****

M1-1      TACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT 540
RN01      TACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT 535
          *****

M1-1      ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTT 600
RN01      ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTT 595
          *****

M1-1      AAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGTCAACCGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAAGTGG 660
RN01      AAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGTCAACCGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAAGTGG 655
          *****

M1-1      AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG 720
RN01      AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG 715
          *****

M1-1      AACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGG 780
RN01      AACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGG 775
          *****

M1-1      GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT 840
RN01      GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT 835
          *****

M1-1      AGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGAGTAC 900
RN01      AGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGAGTAC 895
          *****

M1-1      GGTGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG 960
RN01      GGTGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG 955
          *****

M1-1      GTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAG 1020
RN01      GTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAG 1015
          *****

M1-1      AGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT 1080
RN01      AGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT 1075
          *****

M1-1      GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCA 1140

```

```

RN01          GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCA 1135
*****

M1-1          TTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT 1200
RN01          TTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT 1195
*****

M1-1          CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGG 1260
RN01          CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGG 1255
*****

M1-1          GCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTC 1320
RN01          GCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTC 1315
*****

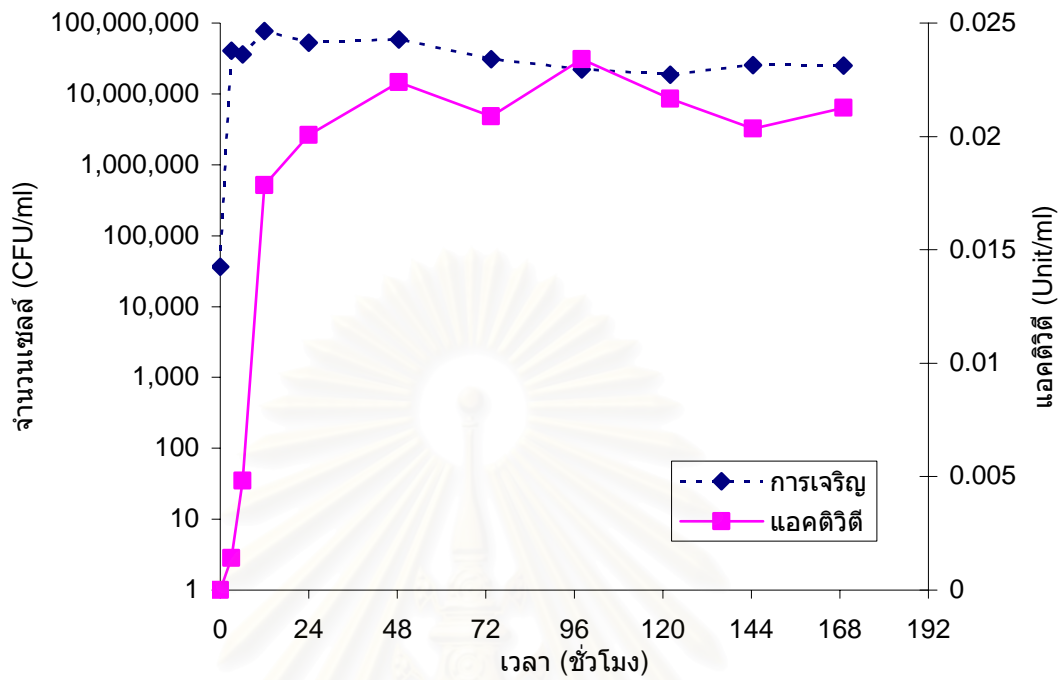
M1-1          TGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGA 1380
RN01          TGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGA 1375
*****

M1-1          ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCCGAA 1440
RN01          ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCCGAA 1435
*****

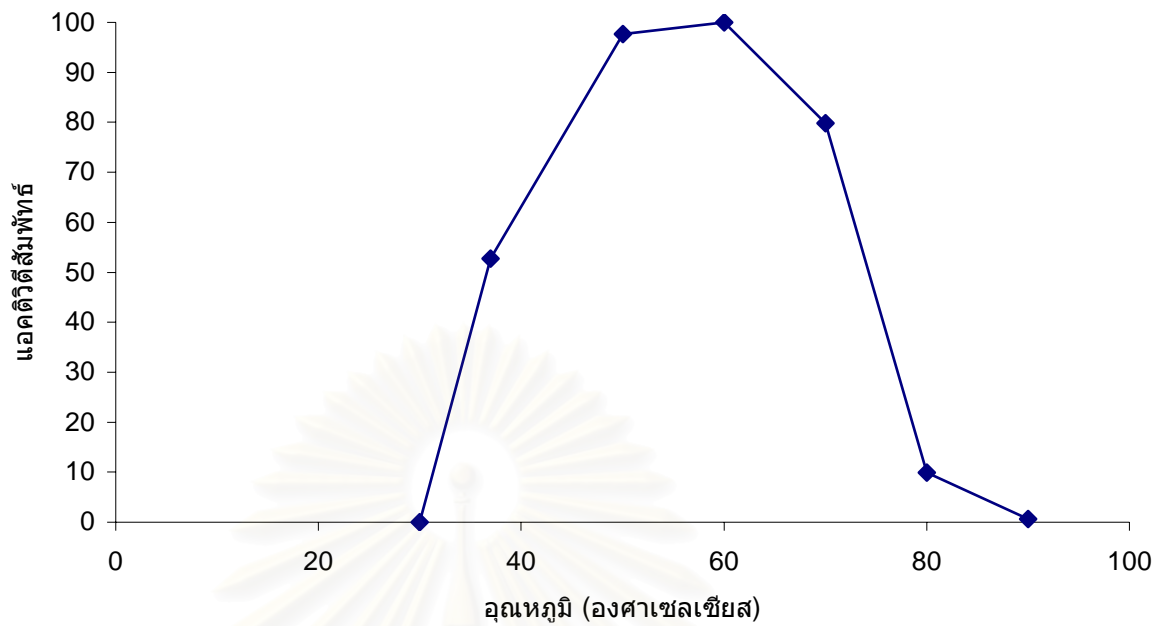
M1-1          GTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAG 1500
RN01          GTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAG 1495
*****

M1-1          TCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTA 1549
RN01          TCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTA 1543
*****
    
```

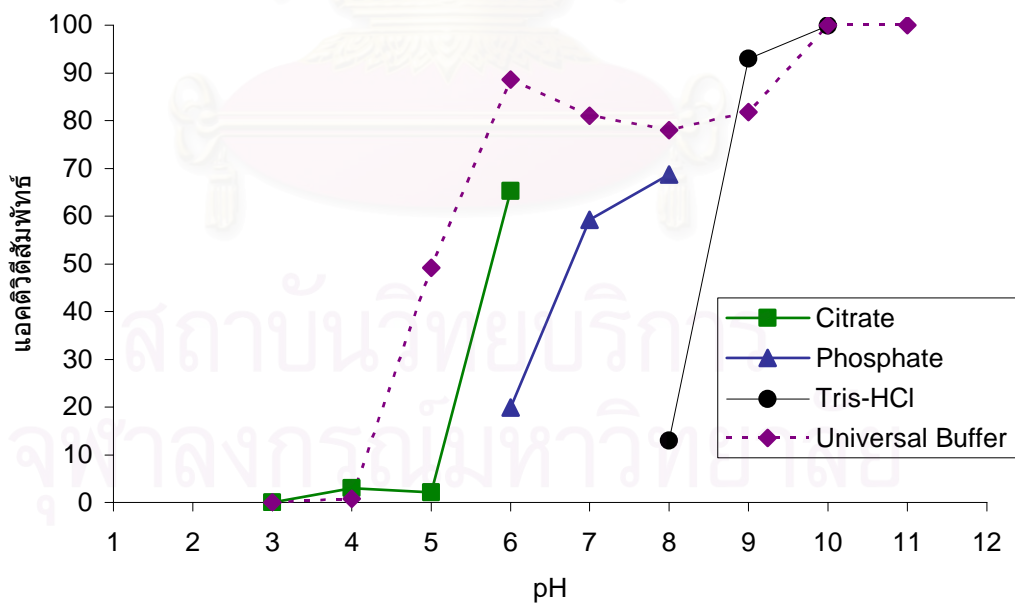
รูปที่ 3.4 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน 16s rRNA ของ *Bacillus licheniformis* RN01 กับ *Bacillus licheniformis* M1-1 โดยการทำให้ pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W (1.82) โดยตำแหน่งที่ระบายสีเอาไว้จะเป็นตำแหน่งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน

ลักษณะการเจริญและการผลิตโคติเนสของ *Bacillus licheniformis* RN01รูปที่ 3.5 ลักษณะการเจริญและลักษณะการผลิตโคติเนสของ *Bacillus licheniformis* RN01

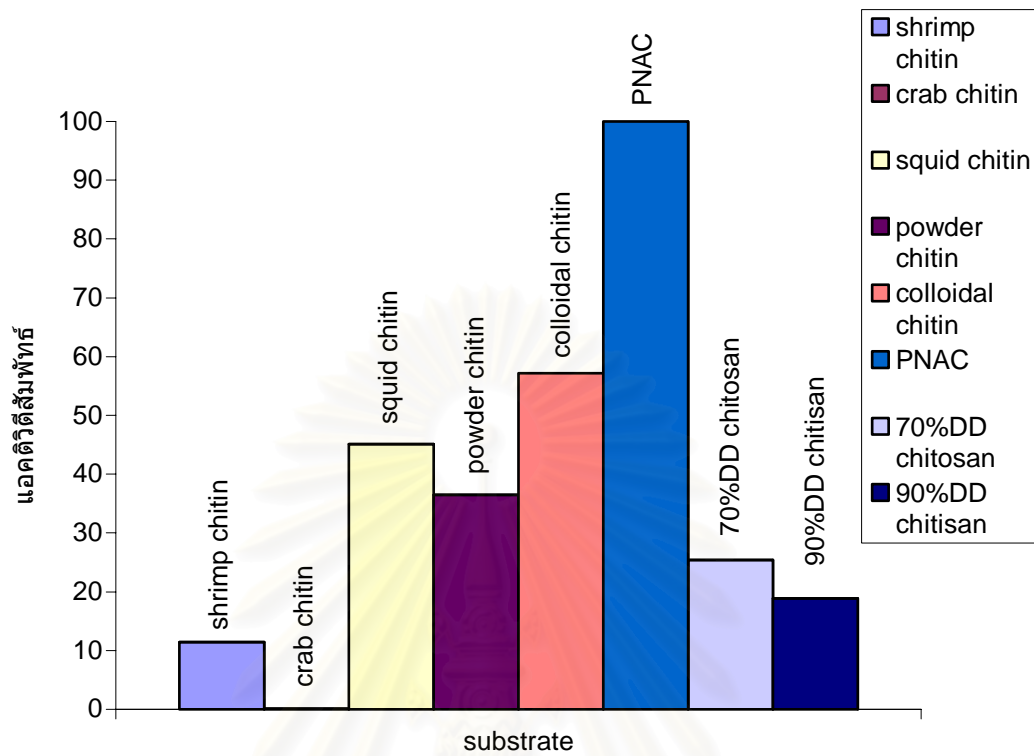
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



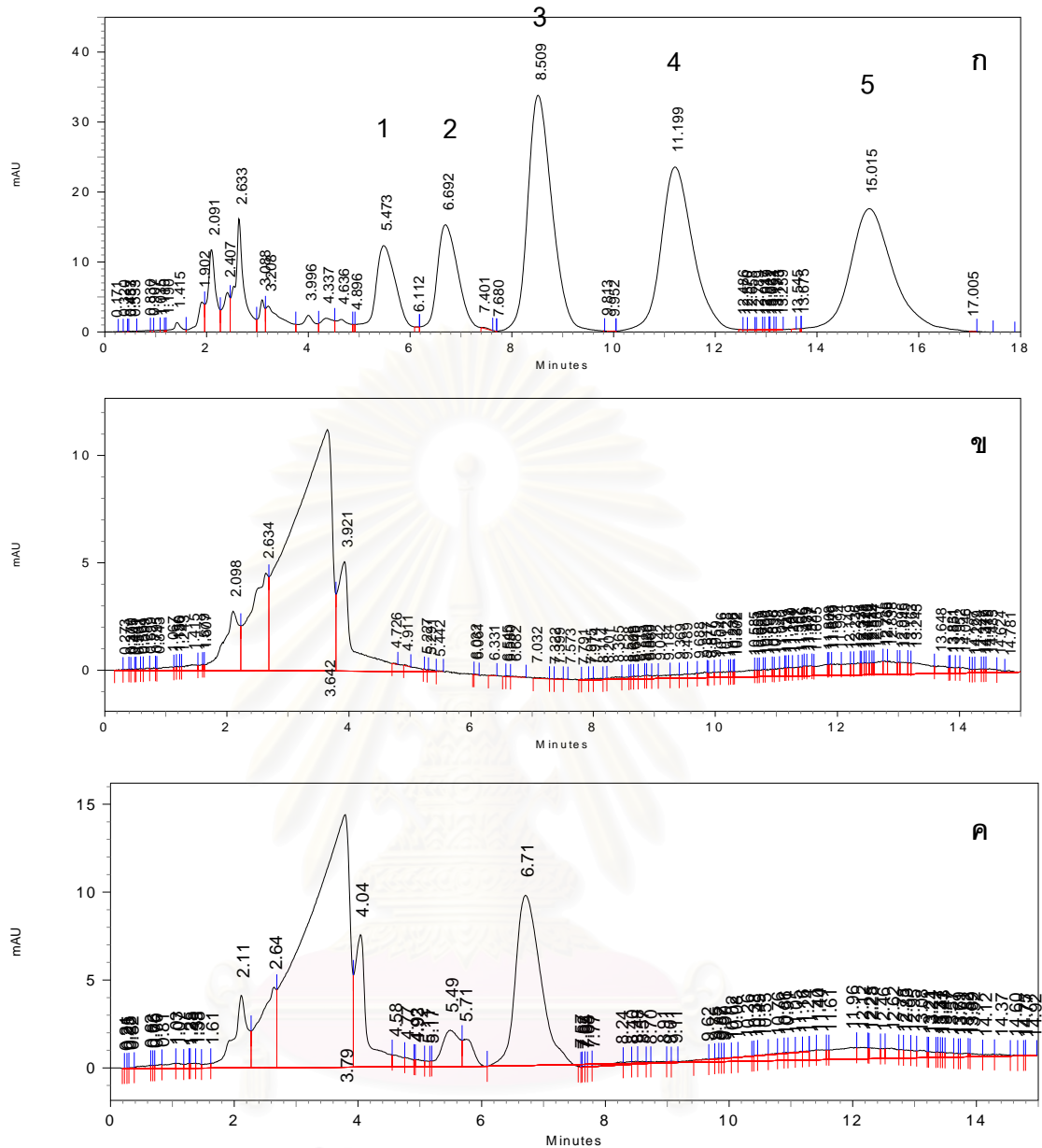
รูปที่ 3.6 แอดซอร์บชันของไคตินเนสอย่างหยาบจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยนำเอนไซม์ 25 mU มาบ่มกับ colloidal chitin ใน citrate buffer pH 6 ที่อุณหภูมิ 30, 37, 50, 60, 70, 80 และ 90°C เป็นเวลา 20 นาที



รูปที่ 3.7 แอดซอร์บชันของไคตินเนสอย่างหยาบจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่ pH ต่างๆ โดยนำเอนไซม์ 25 mU มาบ่มกับ colloidal chitin ที่อุณหภูมิ 50°C ใน buffer pH ต่างๆ เป็นเวลา 20 นาที



รูปที่ 3.8 ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของโคติเนสอย่างหยาบจาก *Bacillus licheniformis* RN01 โดยนำเอนไซม์ 25 mU มาบ่มกับสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ใน citrate buffer pH 6 ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที



รูปที่ 3.9 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการย่อยสลายเส้นตรงด้วยเอนไซม์อย่างหยาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01 โดยรูป ก เป็น chitooligosaccharide มาตรฐาน : 1 เป็น monomer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc), 2 เป็น dimer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc)₂, 3 เป็น trimer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc)₃, 4 เป็น tetramer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc)₄ และ 5 เป็น pentamer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc)₅ รูป ข เป็นชุดควบคุม คือสับสเตรตที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ส่วนรูป ค เป็นสับสเตรตที่ย่อยด้วยเอนไซม์อย่างหยาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น chitibiose

การโคลนยีนโคติเนสจาก genomic DNA ของ *Bacillus licheniformis* RN01

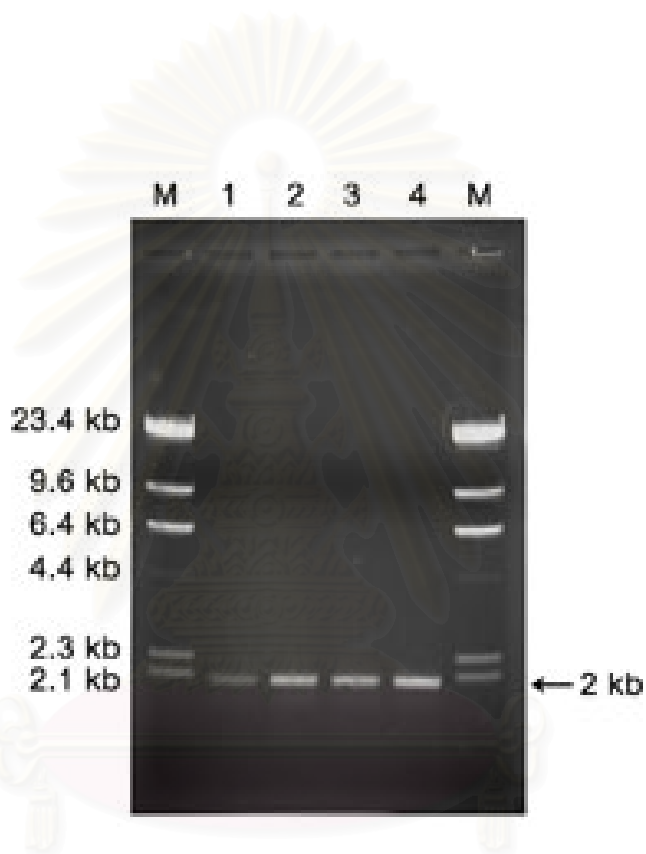
การโคลนยีนที่ผลิตโคติเนสในงานวิจัยนี้ได้ทำโดยการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BP-19F และ BP-20R ที่ออกแบบโดยการใส่ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนโคติเนส Chi65 ที่โคลนได้จาก *Bacillus licheniformis* PR-1 (60) เป็นต้นแบบ ซึ่งบริเวณที่ไพรเมอร์คู่นี้จับกับ DNA ต้นแบบนั้น จะจับคร่อมอยู่ระหว่างตำแหน่งบริเวณก่อน promoter (อยู่เหนือ start codon ประมาณ 120 base pair) และอีกตำแหน่งจะอยู่ที่ส่วนท้ายของยีน โดยอยู่หลังจาก stop codon ประมาณ 30 base pair โดยคุณประภากรได้ทำการทดสอบแล้วว่า ไพรเมอร์คู่นี้มีความจำเพาะต่อยีนโคติเนส family 18 ของ *Bacillus spp.* ซึ่งสามารถใช้เพิ่มจำนวนยีนโคติเนสของ *Bacillus spp.* ได้ครบทั้งยีน สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR เป็นดังนี้

	ปริมาณที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้
2 U/ μ L Vent DNA Polymerase	1 U	0.5 μ L
10X ThermoPol Buffer	1X	5 μ L
100mM MgSO ₄	2 mM	1 μ L
10 pmole/ μ L primer BP-19F	0.4 μ M	2 μ L
10 pmole/ μ L primer BP-20R	0.4 μ M	2 μ L
10 mM dNTP	200 μ M	1 μ L
Genomic DNA template	200 ng	0.5 μ L
Ultrapure water		38 μ L
Total volume		50 μ L

แล้วตั้งโปรแกรมดังนี้

1. pre-denature	ที่อุณหภูมิ	94°C	เป็นเวลา	4:00	นาที
2. denature	ที่อุณหภูมิ	94°C	เป็นเวลา	1:00	นาที
3. annealing	ที่อุณหภูมิ	52°C	เป็นเวลา	1:00	นาที
4. extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	เป็นเวลา	2:10	นาที

ทำ PCR โดยตั้งโปรแกรมให้เครื่อง ThermoCycler ทำงานในขั้นตอน 2-4 จำนวน 25 รอบ และในรอบสุดท้ายจะตั้งโปรแกรมให้เครื่อง ThermoCycler ทำงานที่ 72°C ต่อไปอีก 5 นาที นำ PCR product มา run 0.7% agarose gel electrophoresis แสดงผลดังรูปที่ 3.10



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.10 แสดงยีนโคติเนส จาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่ได้จากวิธี PCR cloning โดยใช้ primer BP-19F และ BP-20R กำหนดให้ lane M คือ λ DNA/*Hind* III marker , lane 2 - 4 คือ PCR product

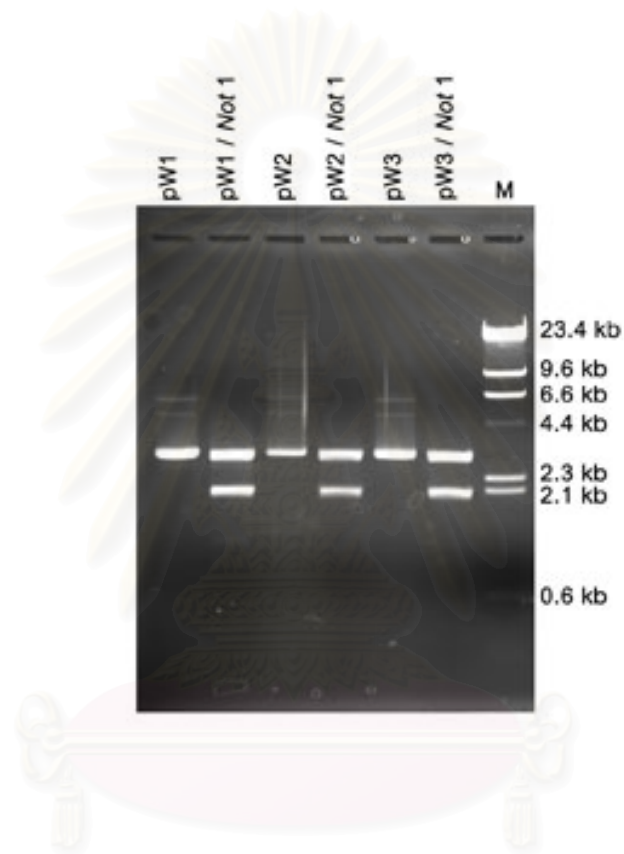
จากรูปที่ 3.10 จะเห็นว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 2 kb ซึ่งมีขนาดตามที่คาดไว้ แต่ PCR product ที่ได้จะมีปลายเป็น blunt end ในการทดลองนี้เราได้นำ PCR product ที่ได้มาทำให้ปลายของ PCR product มี overhang A เพื่อให้โคลนขึ้นยีนที่ต้องการได้ง่ายขึ้น โดยนำมาทำ A-tailing ด้วย *Taq* Polymerease แล้วจึงนำ PCR product ที่เติม overhang A แล้วมาทำให้บริสุทธิ์โดยนำมาแยกโดย 0.7% agarose gel electrophoresis จากนั้น elute แถบขนาดประมาณ 2 kb ออกมาโดยใช้ QIAquick gel extraction kit จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับ vector pGEM-T Easy แล้วจึง transform เข้าเซลล์ *E.coli* Top10

ทำการคัดเลือกหาโคลนที่ได้รับ plasmid ที่มีขึ้นยีนแทรกอยู่ด้วยวิธี blue-white screening และดูจากวงใส (clear zone) รอบโคลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มี 0.01% ampicillin, IPTG 1.4 mg และ X-GAL 0.8 mg เลือกโคลนสีขาวที่มีวงใสมาทำการสกัดพลาสมิด นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดตรวจรสกับด้วย *Not* I แล้วนำไป run 0.7% agarose gel พบว่าได้แถบขนาดประมาณ 3 kb ของ pGEM-T easy และ แถบขนาดประมาณ 2 kb ซึ่งเป็นยีนโคติเนสที่โคลนได้ ผลแสดงดังรูปที่ 3.11 โดยพลาสมิดที่มีขนาดถูกต้องเราให้ชื่อว่า pW1, pW2 และ pW3

เมื่อนำพลาสมิด pW1 และ pW2 ที่เราโคลนยีนโคติเนส (ให้ชื่อว่า *chiRN1* gene) เข้าไปได้ มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยไพรมเมอร์ RN-Seq-I, RN-Seq-II, RN-Seq-III, RN-Seq-IV, RN-Seq-V, M13 forward และ M13 reverse พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *chiRN1* ที่โคลนได้เป็นดังรูปที่ 3.12

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเข้าโปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับยีนโคติเนสจาก *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (CP000002) อยู่ 99% นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ORF finder พบว่า ยีน *chiRN1* สามารถแปลรหัสออกมาเป็นกรดอะมิโนได้ 598 กรดอะมิโน โดยมีลำดับของกรดอะมิโนดังรูปที่ 3.13 เมื่อนำมาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้โปรแกรม ProtCalc พบว่า เอนไซม์ ChiRN1 มีน้ำหนักโมเลกุล 66134.52 ดาลตัน (Da) และมี theoretical pI เท่ากับ 5.17

จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนมาการทำนายโครงสร้าง 3 มิติ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในอินเทอร์เน็ต (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>) ให้ข้อมูลออกมาว่าโครงสร้างของเอนไซม์ ChiRN1 มีอยู่ 3 โดเมนด้วยกัน ได้แก่ Catalytic domain (CatD), fibronectin type III-like domain (FnIIIID) และ chitin binding domain (ChBD) โดยฐานข้อมูลสามารถทำนายและสร้างโครงสร้าง 3 มิติ ของ CatD และ FnIIIID ออกมาได้ดังรูปที่ 3.14 แต่โครงสร้าง 3 มิติของ ChBD ฐานข้อมูลไม่สามารถทำนายโครงสร้างออกมาได้



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.11 แสดงยีนไคลดเนสที่โคลนได้ด้วยวิธี PCR cloning โดยใช้ primer BP-19F และ BP-20R เข้าสู่ pGEM-T Easy แล้วนำมาตัดตรวจสอบโดยตัดด้วย restriction enzyme *Not* I โดย lane pW1, pW2 และ pW3 คือ plasmid ที่สกัดมาได้ที่ยังไม่ได้ตัดด้วย restriction enzyme ส่วน lane pW1/*Not* I, pW2/*Not* I และ pW3/*Not* I คือ plasmid pW1, pW2 และ pW3 ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Not* I

TGTTTTCCCTTGTTGTCTTCAATGTATCTGCTGCTATTAGATGACAAGGAAAAATATAAAACCAGCAAA
 AAAGGCGGTGAGGAAAAAGAGAGTTCTAGTTTCATAGCTTGCCAAAAAATTGCTTGTAAGGAGATGAA
 AATCGTGGTGGATCAACAAAAGCAAAAAGTTTTTCGTTTTTTCTTTCATTTTTGTTATGATGCTGAGCCT
 CTCATTTGTGAATGGGGAAAGTTGCAAAAGCCGATTCGGGAAAAAACTATAAAATCATCGGCTACTATCC
 ATCATGGGGTGCTTATGGAAGGGATTTTTCAAGTTTGGGATATGGACGTTTTCGAAAGTCAGCCACATTAA
 TTATGCCTTTGCTGATATTTGCTGGGAGGGAAAGGCATGGGAAACCCTGATCCGACAGGCCCAATCCTCA
 AACGTGGTCATGCCAGGATGAAAAACGGAGTGATCGACGCGCCAAATGGAACAATCGTGATGGGCGATCC
 CTGGATTGACGCACAAAAGGCAAAATCCCGGGGATGTCTGGGATGAACCGATCCGCGGCAACTTTAAACA
 ATTGTTGAAGCTGAAAAAGAGCCACCCTCATTTGAAAAAGTTTCATATCGGTCGGGGGGTGGACTTGGTC
 TAACCGCTTTTCAGATGTGCGGCAGATCCTGCGGCAAGGAGAAATTCGCCGCTTCGGCCGTTGAGTT
 TTTAAGGAAATACGGGTTTGACGGGGTCGATCTTGACTGGGAATATCCGGTCAGCGGAGGATTGCCGGG
 GAACAGCACACGTCCGGAAGATAAAAGAAACTACACGCTGCTCCTGCAAGAGGTGCGCAAAAAACTTGA
 CGCTGCAGAAGCAAAAGACGGCAAGGAATACTTGCTGACGATCGCATCCGGCGCAAGTCCCGATTATGT
 AAGCAACACTGAGCTCGATAAAATCGCTCAAAACCGTGGATTGGATTAACATTATGACCTATGACTTTAA
 TGGCGGATGGCAAAGCATAAGCGCCATAATGCACCCTGTTCTATGATCCAAAAGCGAAAGAAGCAGG
 CGTTCCAAACCGCTGAGACCTACAATATTGAAAACTGTGAAACGCTACAAGGAAGCCGGTGTCAAGGG
 TGACAAATTAGTGCTTGGAAACACCGTTCTACGGAAGGGCTGGAGCGGTTGTGAACCAGGGGGCACGG
 AGAATATCAGAAATGCGGACCGGCTAAAGAAAGGACATGGGAAAAGGGCGTATTCGATTTTTTCAGATCT
 TGAAAGGAACATATGTAATCAAAACGGCTATAAAAGGTATTGGAACGATCAAGCAAAAAGTGCCTTTTT
 GTATAATGCGGAAAATGGCAATTTCACTTATGATGATGAACAATCATTGCGCCACAAAACGGATTTT
 TATTAAGCAAAACGGATTAAGCGGAGCAATGTCTGGGATTTTCAGCGGCGATTCCAATCGGACGCTTCT
 CAATAAATTGGCAGCCGATTTAGATTTTTGCACCGGACGGAGGCAATCCGGAGCCGCTTTCATCGGCACC
 TGTGAATGTGCGTGTAAACCGGAAAAACTGCTACAAGTGTGACCTGGCGTGGGATGCGCCGAGCAGCGG
 AGCAAAACATTGCGGAATATGT**CGTGTCAATTTGAAAACCGG**TCGATATCTGTAAGAAACATCAGCGGA
 AATAGGCGGCTTGAAGCCGGTACGGCCTACTCATTTACTGTTTCAGCAAAGGATGCGGATGGAAAGCT
 CCATGCCGACCAACGGTAGAGGTCACGACGAATTTGACCAAGCCTGTTTCATATGACGAATGGAAAGA
 GACGAGCGCATAACAGGCGGAGAGCGGGTTGCATTTAACGGAAGTGTATGAAGCGAAATGGTGGAC
 GAAAGGCGACCGCCTGATCAATCCGGTGAATGGGGCTATGGCGGCTGATCGGAGGCTGCCAATAAGA
 GAAAGTCAAAAT**GGATAGAAAACGATAAAGAG**A

รูปที่ 3.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *chiRN1* มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1964 นิวคลีโอไทด์

โดย **TGTTTTCCCTTGTTGTCTTCA** คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BP-19F

GGATAGAAAACGATAAAGAG คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ complementary กับ BP-20R

TTGCTGGGAGGGAAAGGC คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RN-Seq-I

CGTGTCAATTTGAAAACCG คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ complementary กับ RN-Seq-II

CAGAAGCAAAAGACGGC คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RN-Seq-III

GGAAACACCGTCTACG คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ complementary กับ RN-Seq-VI

AGCAAAACGGATTAAGCGG คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RN-Seq-V

1 - TGTTTTCCCTTGTGTCTTCAATGTATCTGCTGCTATTAGATGACAAGGAAAAATATAAA - 60

61 - ACCAGCAAAAAAGGCGGTGAGGAAAAAGAGAGTTCTAGTTTCATAGCTTGCCAAAAAATT - 120

121 - GCTTGTAAGGAGATGAAAATCGTGTGATCAACAAAAGCAAAAAGTTTTTCGTTTTTTC - 180
M K I V L I N K S K K F F V F S

181 - TTTCATTTTTGTTATGATGCTGAGCCTCTCATTGTGAATGGGAAGTTGCAAAAAGCCGA - 240
- F I F V M M L S L S F V N G E V A K A D

241 - TTCCGAAAAAACTATAAAATCATCGGCTACTATCCATCATGGGGTGCTTATGGAAGGGA - 300
- S G K N Y K I I G Y Y P S W G A Y G R D

301 - TTTTCAAGTTTGGGATATGGACGTTTTCGAAAGTCAGCCACATTAATTATGCCTTTGCTGA - 360
- F Q V W D M D V S K V S H I N Y A F A D

361 - TATTTGCTGGGAGGGAAGGCATGGGAACCCTGATCCGACAGGCCCAATCCTCAAACGTG - 420
- I C W E G R H G N P D P T G P N P Q T W

421 - GTCATGCCAGGATGAAAACGGAGTGATCGACGCGCCAAATGGAACAATCGTGATGGGCGA - 480
- S C Q D E N G V I D A P N G T I V M G D

481 - TCCCTGGATTGACGCACAAAAGGCAAATCCCGGGGATGTCTGGGATGAACCGATCCGCGG - 540
- P W I D A Q K A N P G D V W D E P I R G

541 - CAACTTTAAACAATTGTTGAAGCTGAAAAAGAGCCACCCTCATTGAAAACGTTTCATATC - 600
- N F K Q L L K L K K S H P H L K T F I S

601 - GGTCCGGGGGTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCAGATGTCGCGGCAGATCCTGCGGCAAG - 660
- V G G W T W S N R F S D V A A D P A A R

661 - GGAGAATTTCCGCCCTTCGGCCGTTGAGTTTTTAAGGAAATACGGGTTTGACGGGGTTCGA - 720
- E N F A A S A V E F L R K Y G F D G V D

721 - TCTTGACTGGGAATATCCGGTCAGCGGAGGATTGCCGGGGAACAGCACACGTCGGGAAGA - 780
- L D W E Y P V S G G L P G N S T R P E D

781 - TAAAAGAACTACACGCTGCTCCTGCAAGAGGTGCGCAAAAACTTGACGCTGCAGAAGC - 840
- K R N Y T L L L Q E V R K K L D A A E A

841 - AAAAGACGGCAAGGAATACTTGCTGACGATCGCATCCGGCGCAAGTCCCGATTATGTAAG - 900
- K D G K E Y L L T I A S G A S P D Y V S

901 - CAACACTGAGCTCGATAAAATCGCTCAAACCGTGGATTGGATTAACATTATGACCTATGA - 960
- N T E L D K I A Q T V D W I N I M T Y D

961 - CTTTAATGGCGGATGGCAAAGCATAAGCGCCATAATGCACCGCTGTTCTATGATCCAAA - 1020
- F N G G W Q S I S A H N A P L F Y D P K

1021 - AGCGAAAGAAGCAGGCGTTCAAACGCTGAGACCTACAATATGAAAACACTGTGAAACG - 1080
- A K E A G V P N A E T Y N I E N T V K R

1081 - CTACAAGGAAGCCGGTGTCAAGGGTGACAAATTAGTGCTTGGAACACCGTTCTACGGAAG - 1140
- Y K E A G V K G D K L V L G T P F Y G R

1141 - GGGCTGGAGCGTTGTGAACCAGGGGGGCACGGAGAATATCAGAAATGCGGACCGGCTAA - 1200
- G W S G C E P G G H G E Y Q K C G P A K

1201 - AGAAGGGACATGGGAAAAGGCGTATTTCGATTTTTTCAGATCTTGAAAGGAACTATGTGAA - 1260
- E G T W E K G V F D F S D L E R N Y V N

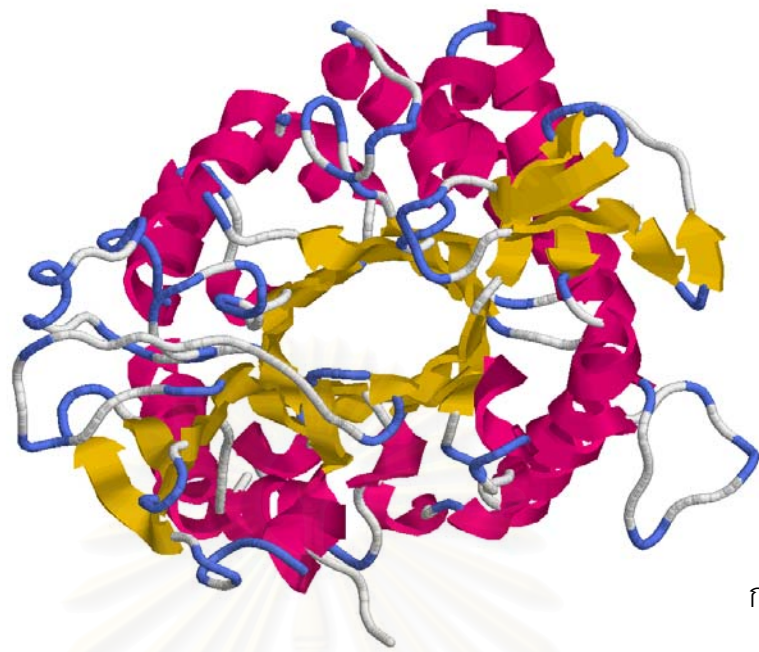
1261 - TCAAAACGGCTATAAAAGGTATTGGAACGATCAAGCAAAAGTGCCGTTTTTGTATAATGC - 1320
- Q N G Y K R Y W N D Q A K V P F L Y N A

1321 - GGAAAATGGCAATTTTCATCACTTATGATGATGAACAATCATTCCGCCACAAAACGGATTT - 1380
- E N G N F I T Y D D E Q S F G H K T D F

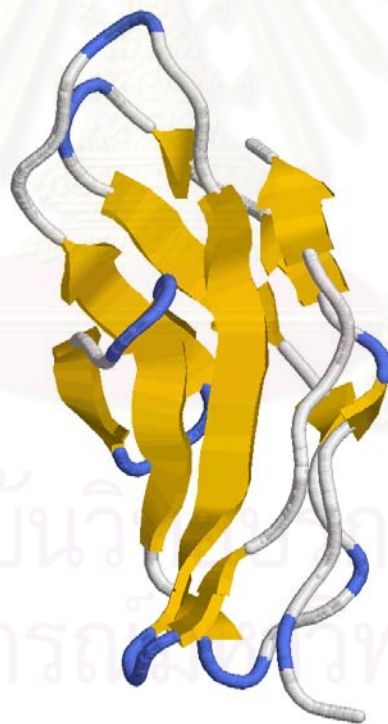
1381 - TATTAAGCAAACGGATTAAGCGGAGCAATGTTCTGGGATTTAGCGGGGATTCCAATCG - 1440
 - I K A N G L S G A M F W D F S G D S N R
 1441 - GACGCTTCTCAATAAATTGGCAGCCGATTTAGATTTTGCACCGGACGGAGGCAATCCGGA - 1500
 - T L L N K L A A D L D F A P D G G N P E
 1501 - GCCGCCTTCATCGGCACCTGTGAATGTGCGTGTAAACCGGAAAACTGCTACAAGTGTGAG - 1560
 - P P S S A P V N V R V T G K T A T S V S
 1561 - CCTGGCGTGGGATGCGCCGAGCAGCGGAGCAAACATTGCGGAATATGTCGTGTCATTTGA - 1620
 - L A W D A P S S G A N I A E Y V V S F E
 1621 - AAACCGGTCGATATCTGTAAAAGAAACATCAGCGGAAATAGGCGGCTTGAAGCCGGGTAC - 1680
 - N R S I S V K E T S A E I G G L K P G T
 1681 - GGCCTACTCATTTACTGTTTCAGCAAAGGATGCGGATGGAAAGCTCCATGCCGGACCAAC - 1740
 - A Y S F T V S A K D A D G K L H A G P T
 1741 - GGTAGAGGTCACGACGAATTCTGACCAAGCCTGTTTCATATGACGAATGGAAAGAGACGAG - 1800
 - V E V T T N S D Q A C S Y D E W K E T S
 1801 - CGCATAACAGGCGGAGAGCGGGTTGCATTTAACGGAAAAGTGTATGAAGCGAAATGGTG - 1860
 - A Y T G G E R V A F N G K V Y E A K W W
 1861 - GACGAAAGGCGACCGGCCTGATCAATCCGGTGAATGGGGCGTATGGCGGCTGATCGGAGG - 1920
 - T K G D R P D Q S G E W G V W R L I G G
 1921 - CTGCGAATAAGAGAAAGTCAAATGGATAGAAAACGATAAAGAGA - 1964
 - C E *

รูปที่ 3.13 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ ChiRN1 ที่แปลรหัสจากยีน *chiRN1* โดยใช้โปรแกรม
 ORF finder ซึ่งพบว่า เอนไซม์ ChiRN1 มีกรดอะมิโนจำนวน 598 ตัว

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



ข

รูปที่ 3.14 รูปโครงสร้าง 3 มิติของ catalytic domain (ก) และ fibronectin type III-like domain (ข) ของเอนไซม์ ChiRN1 ที่ทำนายจากฐานข้อมูล PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>)

การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของไคตินเนส ChiRN1

การศึกษาลักษณะการผลิตไคตินเนสที่โคลนได้จาก *Bacillus licheniformis* RN01 จะเลี้ยงเชื้อ *E.coli* Top10 ที่มีพลาสมิดที่มียีนไคตินเนส pW2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มีแอมพิซิลิน 100 µg/ml แล้วดูน้ำเลี้ยงวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อ *E.coli* Top10 ที่มีพลาสมิด pW2 มีการผลิตไคตินเนส ChiRN1 ออกมาปริมาณมากเมื่อเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 4 วัน (รูปที่ 3.15)

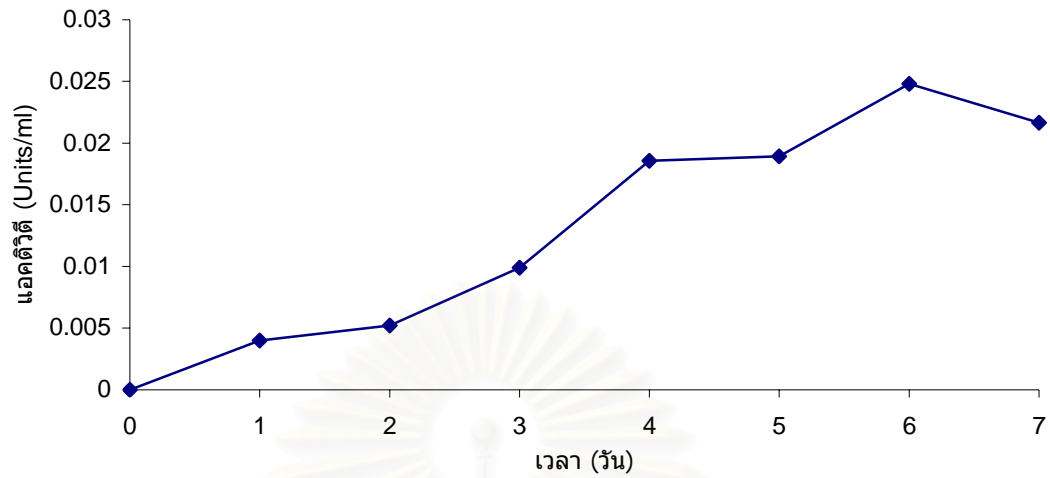
เมื่อนำ ChiRN1 มาหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ChiRN1 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60°C (รูปที่ 3.16) ส่วนการหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ ChiRN1 เราพบว่า ChiRN1 สามารถทำงานได้ในช่วงกว้าง ตั้งแต่ pH 6 – 11 (รูปที่ 3.17)

เมื่อนำ ChiRN1 ไปย่อยสับสเตรตชนิดต่างๆ ได้แก่ ไคตินจากเปลือกกุ้ง, ไคตินจากเปลือกปู, ไคตินจากแกนปลาหมึก, powder chitin, colloidal chitin, PNAC (partial-N-acetylated chitin) พบว่า ChiRN1 สามารถย่อย PNAC ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ colloidal chitin และ ไคตินจากแกนปลาหมึก ตามลำดับ ส่วนสับสเตรตที่ ChiRN1 ย่อยได้ไม่ดีคือ ไคตินจากเปลือกกุ้งและไคตินจากเปลือกปู (รูปที่ 3.18)

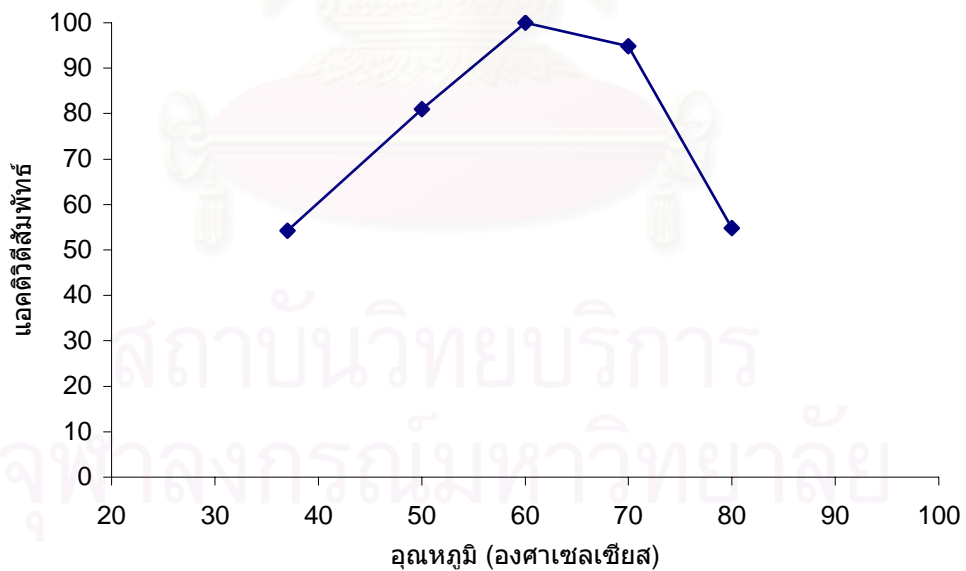
หลังจากนำ ChiRN1 ไปย่อยสับสเตรตแล้วนำมาหาขนาดของผลิตภัณฑ์โดยนำมาฉีด HPLC พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น GlcNAc และ chitobiose ผสมกัน โดยมีผลิตภัณฑ์หลักเป็น chitobiose (รูปที่ 3.19)

นำ crude enzyme ของไคตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01 และ ChiRN1 มาทำ SDS-PAGE เพื่อดูขนาดไคตินเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 เปรียบเทียบกับไคตินเนส ChiRN1 ที่โคลนได้ เมื่อดูจากเจล SDS-PAGE ที่นำมาย้อมแอกติวิตี พบว่า มีแถบแอกติวิตีอยู่ 3 ขนาด ได้แก่ ขนาดประมาณ 70, 66 และ 58 kDa (รูปที่ 3.20)

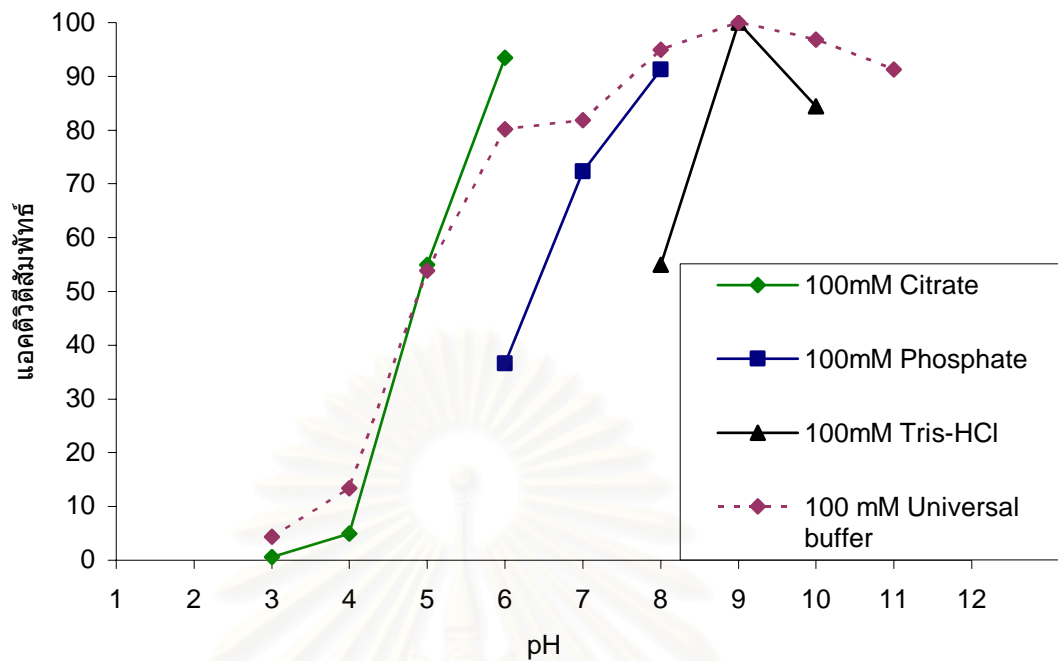
เมื่อนำไคตินเนสที่โคลนได้ นำไป absorb บน colloidal chitin แล้วนำส่วน unbound ที่ไม่ absorb มา run SDS-PAGE พบว่า ใน lane ของ unbound เมื่อดูจากแถบแอกติวิตี จะเห็นว่า แถบขนาดประมาณ 70 kDa มีความเข้มจางที่สุด ตามมาด้วยแถบขนาด 66kDa และแถบขนาด 58 kDa จะเข้มที่สุด (รูปที่ 3.21)



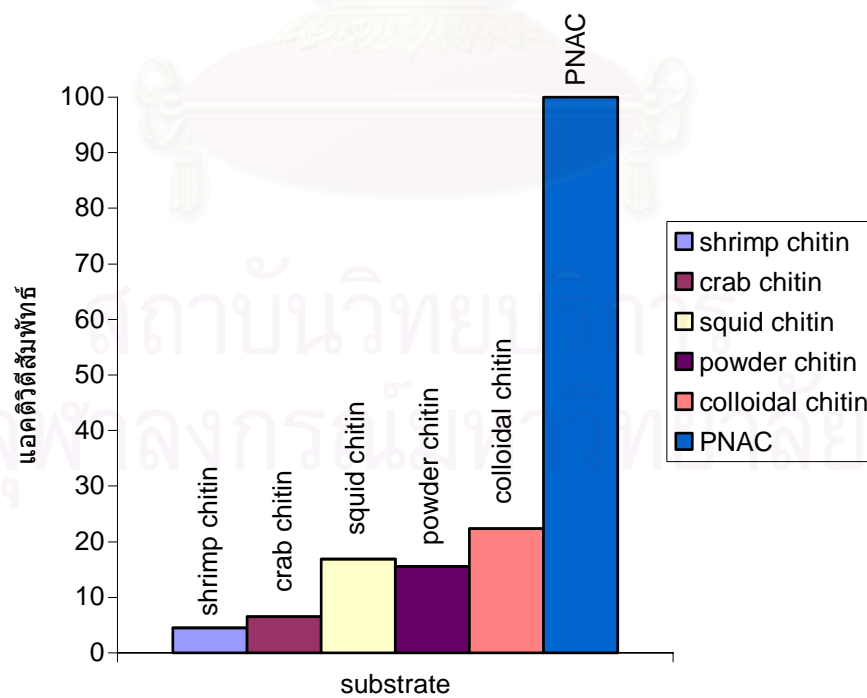
รูปที่ 3.15 ลักษณะการผลิตโคติเนส ChiRN1 จากเชื้อ *E. coli* Top10 โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อ มาวัดแอกติวิตีโดยบ่มกับ colloidal chitin ใน citrate buffer pH 6 ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะติดตามการผลิตเอนไซม์เป็นเวลา 7 วัน



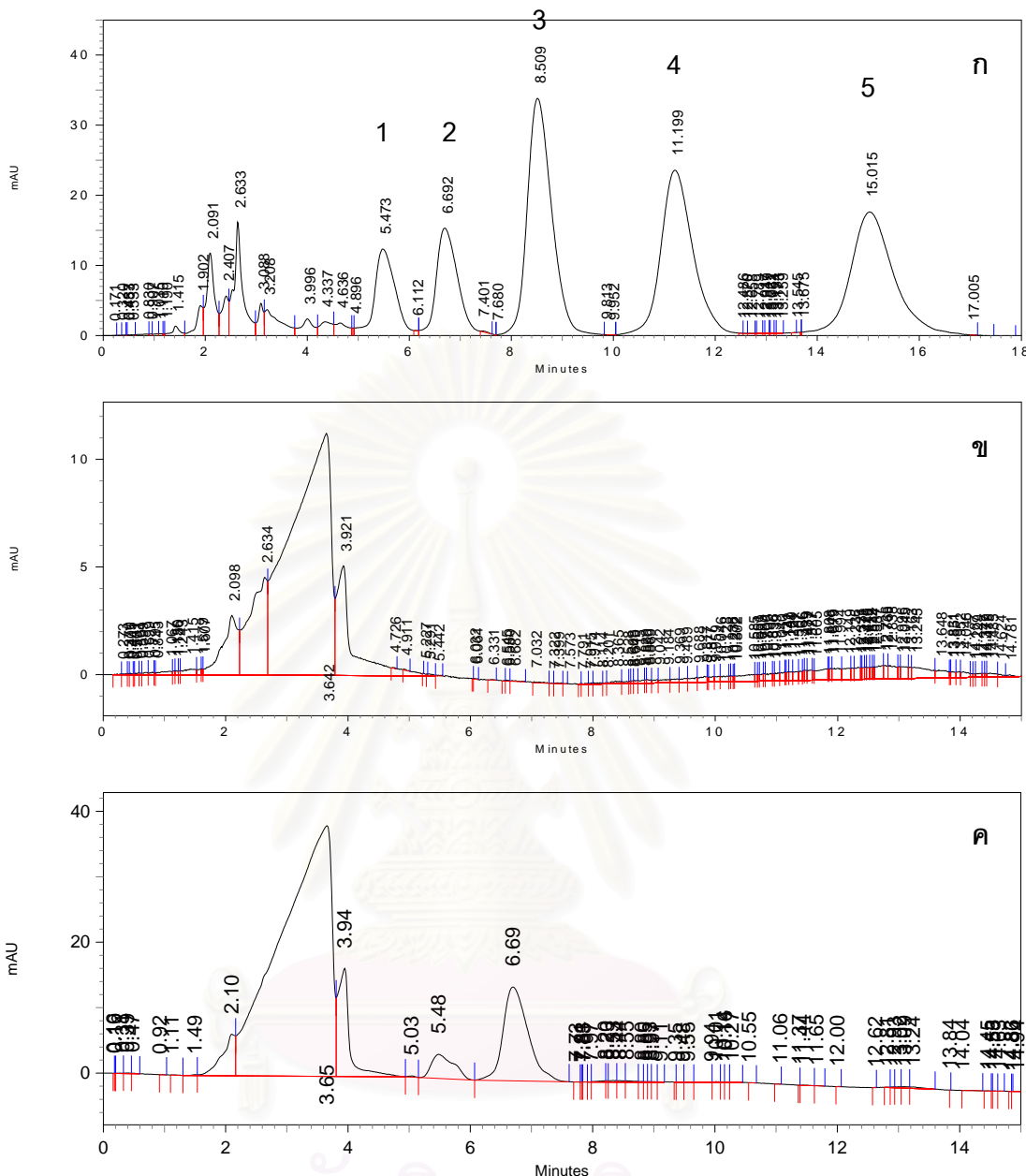
รูปที่ 3.16 แอกติวิตีของโคติเนส ChiRN1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยนำเอนไซม์ 20 mU มาบ่มกับ colloidal chitin ใน citrate buffer pH 6 ที่อุณหภูมิ 37, 50, 60, 70 และ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที



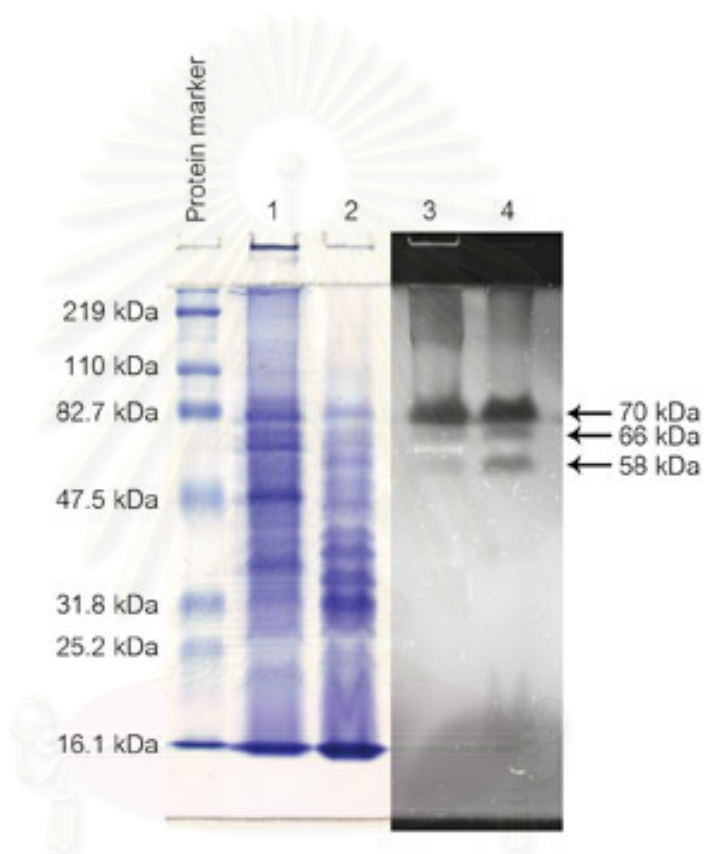
รูปที่ 3.17 แอกติวิตีของไคติเนส ChiRN1 ที่ pH ต่าง ๆ โดยนำเอนไซม์ 20 mU มาป่มกับ colloidal chitin ที่อุณหภูมิ 50°C ใน buffer pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที



รูปที่ 3.18 ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของไคติเนส ChiRN1 โดยนำเอนไซม์ 20 mU มาป่มกับสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ใน citrate buffer pH 6 ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที



รูปที่ 3.19 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการย่อยสับเสตรตด้วยเอนไซม์ ChiRN1 ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์หลักออกมาเป็น chitobiose รูป ก เป็น chitooligosaccharide มาตรฐาน : 1 เป็น monomer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc), 2 เป็น dimer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc)₂, 3 เป็น trimer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc)₃, 4 เป็น tetramer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc)₄ และ 5 เป็น pentamer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc)₅ รูป ข เป็นชุดควบคุมคือสับเสตรตที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ส่วนรูป ค เป็นสับเสตรตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ChiRN1 ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น chitibiose



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

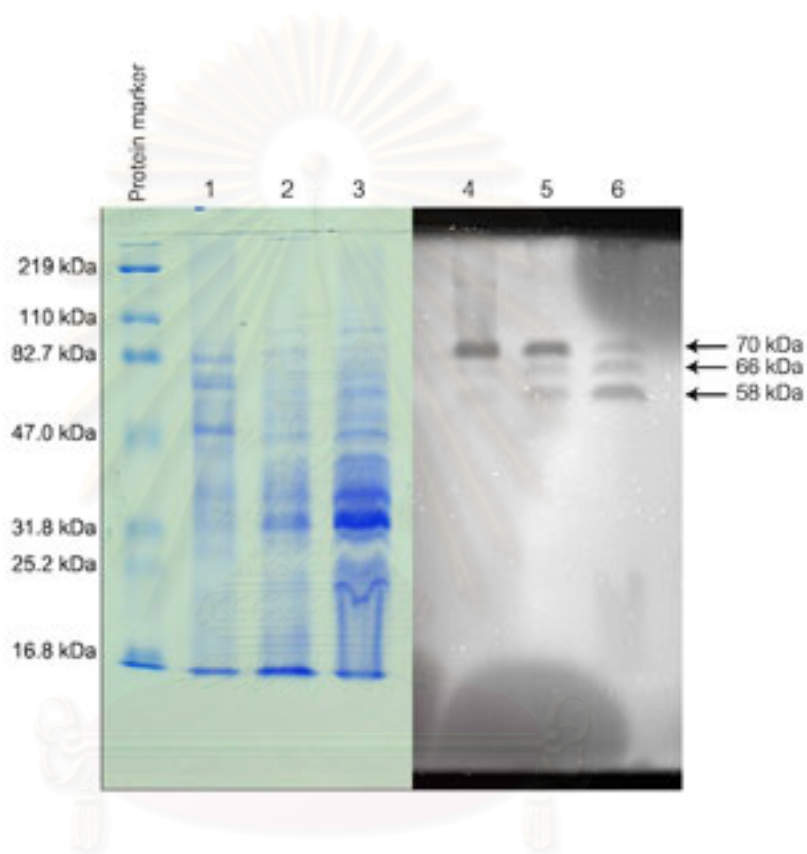
รูปที่ 3.20 SDS-PAGE แสดงแถบของโปรตีนและแถบแอกติวิตีของไคตินเนส จาก *Bacillus licheniformis* RN01 และ ChiRN1

โดย lane 1 คือ ไคตินเนสอย่างหยาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่ย้อมสีโปรตีน

lane 2 คือ ไคตินเนสอย่างหยาบ ChiRN1 ที่ย้อมสีโปรตีน

lane 3 คือ ไคตินเนสอย่างหยาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่ย้อมแอกติวิตี

lane 4 คือ ไคตินเนสอย่างหยาบ ChiRN1 ที่ย้อมแอกติวิตี



รูปที่ 3.21 SDS-PAGE แสดงแถบของโปรตีนและแถบแอกติวิตีของไคตินเนส จากการนำเอนไซม์ไป absorb บน colloidal chitin

- โดย
- lane 1 คือ ไคตินเนสอย่างหยาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่ย้อมสีโปรตีน
 - lane 2 คือ ไคตินเนสอย่างหยาบ ChiRN1 ที่ย้อมสีโปรตีน
 - lane 3 คือ ส่วนที่ไม่จับกับ colloidal chitin ของไคตินเนส ChiRN1 ที่ย้อมสีโปรตีน
 - lane 4 คือ ไคตินเนสอย่างหยาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ที่ย้อมแอกติวิตี
 - lane 5 คือ ไคตินเนสอย่างหยาบ ChiRN1 ที่ย้อมแอกติวิตี
 - lane 6 คือ ส่วนที่ไม่จับกับ colloidal chitin ของไคตินเนส ChiRN1 ที่ย้อมแอกติวิตี



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.22 แสดงวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *E.coli* Top10 ที่มี plasmid pW2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC

การศึกษาเปรียบเทียบกับไคติเนสชนิดอื่น

จากข้อมูลที่มีอยู่ เราทราบว่า ไคติเนสแต่ละชนิดมีการจัดเรียงลำดับของโดเมนที่แตกต่างกัน และสามารถย่อยสับสเตรตแล้วได้ผลิตภัณฑ์แตกต่างกันด้วย ยกตัวอย่างเช่น ChiA จาก *Serratia marcescens* มีปลายด้านอะมิโนเป็น N-terminal domain ส่วนปลายด้านคาร์บอกซีเป็น CatD เมื่อนำ ChiA ไปย่อยสับสเตรต จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น dimer ($[\text{GlcNAc}]_2$) เช่นเดียวกับ Chi60 จาก *Serratia liquefaciens* ที่ทางห้องปฏิบัติการสามารถโคลนได้ ก็มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับ ChiA ถึง 99% และให้ผลิตภัณฑ์เป็น dimer ส่วน ChiB จาก *Serratia marcescens* มีปลายด้านอะมิโนเป็น CatD และปลายด้านคาร์บอกซีเป็น ChBD ผลิตภัณฑ์ที่ ChiB ย่อยได้จะเป็น trimer ($[\text{GlcNAc}]_3$) ส่วน Chi65, Chi66 และ ChiRN1 ที่สามารถโคลนได้จาก *Bacillus licheniformis* PR-1, SK-1 และ RN01 ตามลำดับ จะมีปลายด้านอะมิโนเป็น CatD ตามด้วย FnIID และ ChBD ที่อยู่ปลายด้านคาร์บอกซี สามารถย่อยสับสเตรตแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็น monomer ผสม dimer ในขณะที่ ChiA1 จาก *Bacillus circulans* WL-12 มีปลายด้านอะมิโนเป็น CatD ถัดมาจะเป็น FnIID ต่อกัน 2 โดเมน และปลายด้านคาร์บอกซีจะเป็น ChBD จะเห็นว่า ChiA1 มีการเรียงลำดับของโดเมนคล้ายๆกับ Chi65, Chi66 และ ChiRN1 ดังนั้นเราจึงลองทำการศึกษาเปรียบเทียบไคติเนสทั้ง 6 ชนิดนี้ ได้แก่ ChiA1, Chi65, Chi66, ChiRN1, Chi60 และ ChiB โดยนำลำดับกรดอะมิโนมาทำ multiple sequence alignment โดยเราจะทำ multiple alignment ลำดับกรดอะมิโนของไคติเนสที่ผลิตจากกลุ่ม *Bacillus spp.* เปรียบเทียบกันก่อน (รูปที่ 3.23) จะเห็นว่า Chi65, Chi66 และ ChiRN1 มีลำดับกรดอะมิโนที่ค่อนข้างจะเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ ChiA1 ที่ทราบโครงสร้างและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญอยู่แล้ว จะเห็นว่า มีลำดับกรดอะมิโนช่วงหนึ่งของ ChiA1 (ตำแหน่ง 553 – 652) ที่ไม่พบในลำดับกรดอะมิโนของ Chi65, Chi66 และ ChiRN1 ซึ่งลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่ง 553 – 652 ของ ChiA1 ช่วงนั้นจะเป็นช่วงของ FnIID โดเมนที่ 2 ของ ChiA1 แต่ Chi65, Chi66 และ ChiRN1 จะมี FnIID เพียงโดเมนเดียว เมื่อเราพิจารณาโครงสร้าง 3 มิติ โดยเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญใน CatD ระหว่าง ChiA1 กับ ChiRN1 เราพบว่า ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญของ ChiA1 (ได้แก่ W134, W122, Y56, W53, W433, W164, W284, Y279 และ E204) และ ChiRN1 (ได้แก่ W130, W118, Y53, W50, W428, W160, W281, Y275 และ E200) อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (รูปที่ 3.24)

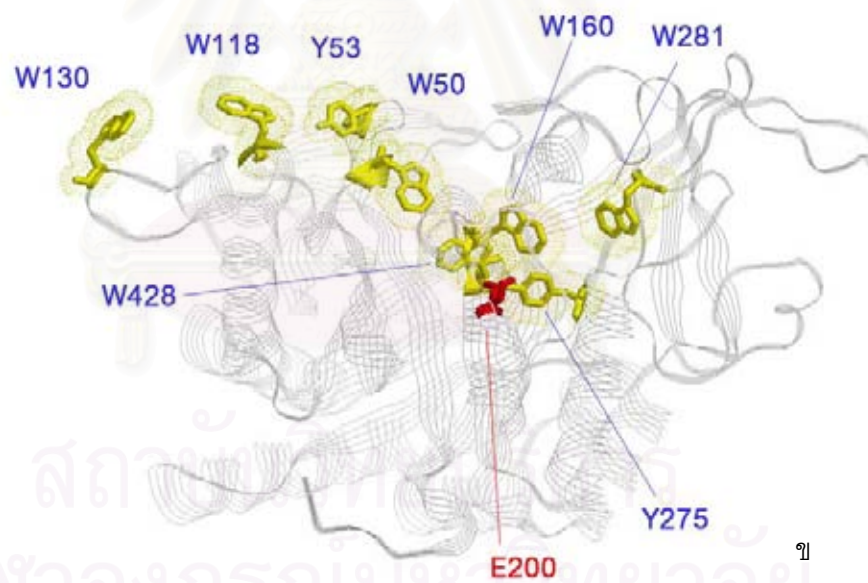
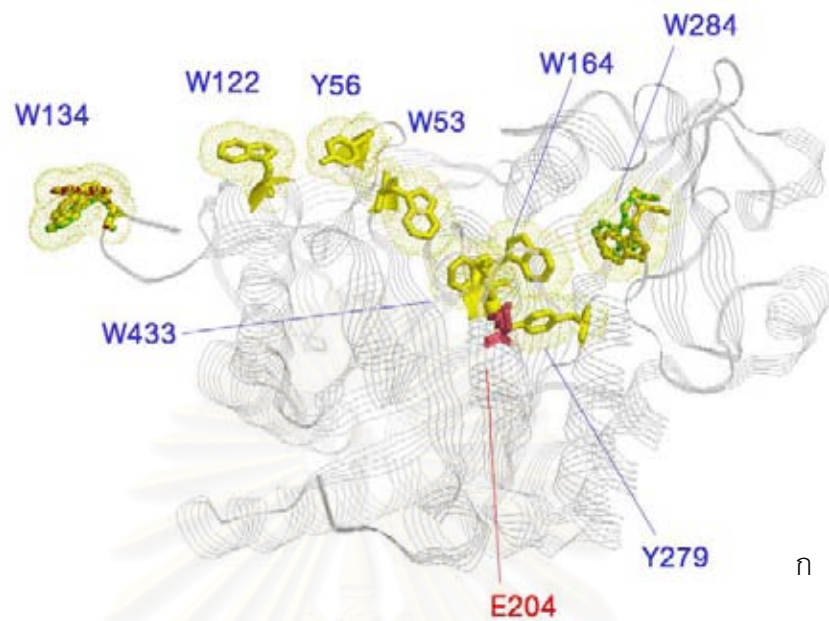
จากนั้นเราจะทำ multiple alignment ลำดับกรดอะมิโนของไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* เปรียบเทียบกับ ChiB และ Chi60 (รูปที่ 3.25) จะเห็นว่า จะมีลำดับของกรดอะมิโนมีความเหมือนกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น โดยตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมือนกันนั้นเราพบว่า จะเป็นกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่สำคัญในการจับกับสับสเตรต และสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ที่อยู่บริเวณ active site ยกตัวอย่างเช่น กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 196 – 206 ของ ChiA1, ตำแหน่ง 192 – 204 ของ Chi65, Chi66 และ ChiRN1, ตำแหน่ง 307 – 317 ของ Chi60 และ ตำแหน่ง 136

- 146 ของ ChiB ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น FDGVD-DWE-P ซึ่งเป็น motif ที่ค่อนข้าง conserve และสำคัญบริเวณ active site ซึ่งเราจะสามารถพบ motif รูปแบบนี้ได้ในทุก ๆ โคติเนส นอกจากนี้ ลำดับกรดอะมิโนของ Chi60 ที่ตำแหน่ง 1 – 131 เราพบว่า เป็นตำแหน่งที่ไม่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโคติเนสตัวอื่นที่นำมาเปรียบเทียบกัน เนื่องจากว่าที่ตำแหน่ง 1 – 151 ของ Chi60 อยู่ในส่วนของ N-terminal domain และเมื่อนำโครงสร้าง 3 มิติ ของ Chi60 และ ChiRN1 มาเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญ ตำแหน่งกรดอะมิโนสำคัญของ Chi60 และ ChiRN1 อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (รูปที่ 3.26)

เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนของ ChiB เราพบว่า กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 – 454 อยู่ในส่วนของ CatD ส่วนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 456 – 499 จะเป็นส่วนของ ChBD และเมื่อนำโครงสร้าง 3 มิติ ของ ChiB, Chi60 และ Cat ของ ChiRN1 มาเปรียบเทียบโครงสร้างและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญ เราพบว่า ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญของ ChiB, Chi60 และ CatD ของ ChiRN1 อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3.27)

จากการเปรียบเทียบทั้งลำดับของกรดอะมิโน และตำแหน่งของกรดอะมิโนสำคัญในโครงสร้าง 3 มิติ ของทั้ง Chi60, ChiB และ ChiRN1 เราจะเห็นได้ว่า เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนั้น ถึงแม้จะมี accessory domain จัดเรียงตัวอยู่คนละตำแหน่งกัน แต่ทว่า โดเมนสำคัญสำหรับเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ก็ยังมีโครงสร้าง 3 มิติ และมีตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญ อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน แต่ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายสเตรตด้วย เอนไซม์ 3 ชนิดนี้มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการจัดเรียงตำแหน่งของ accessory domain ที่แตกต่างกัน

ดังนั้นเราได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่า accessory domain ต่าง ๆ เหล่านี้ที่จัดเรียงตัวอยู่บนโมเลกุลของเอนไซม์ที่ตำแหน่งต่างกัน อาจจะมีผลต่อการกำหนดขนาดของผลิตภัณฑ์ ดังนั้น เราจึงได้ลองสร้างโคติเนสลูกผสม โดยนำเอาส่วนของ FnIIID และ ChBD จาก ChiRN1 มาต่อเข้ากับเอนไซม์ Chi60 โดยเมื่อพิจารณาจาก model การเกิด hydrolysis ของ ChiA (รูปที่ 1.8) ที่มีลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้าง 3 มิติเหมือนกับ Chi60 ถึง 99% จะเห็นได้ว่าเมื่อจะเกิดการย่อยนั้น โมเลกุลของ ChiA จะเข้าไปจับกับสายของโคติเนส โดยใช้ aromatic residue ที่อยู่บน N-terminal และ CatD จับสายโคติเนสและพาสายโคติเนสเข้าไปย่อยใน active site โดยทิศทางในการย่อยสายโคติเนส จะย่อยจากปลายด้าน reducing end และจะให้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น dimer แต่ทว่า ChiRN1 ที่ไม่มี N-terminal domain อยู่ทางด้านหน้า แต่จะมี FnIIID และ ChBD ยื่นออกมาทางด้านหลังโมเลกุลของเอนไซม์แทน ถึงแม้ว่าทิศทางในการย่อยสายโคติเนส จะย่อยจากปลายด้าน reducing end เช่นเดียวกับ ChiA แต่ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้กลับได้เป็น monomer ผสม dimer จึงอาจเป็นไปได้ว่า การที่มี FnIIID และ ChBD ที่ยื่นออกไปทางด้านหลังโมเลกุลของเอนไซม์ อาจจะเป็นตัวหน่วงการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ไปบนสับสเตรต ทำให้เอนไซม์เคลื่อนที่ได้ช้าลง จึงทำให้ ChiA1 ย่อยสับสเตรตแล้วให้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น monomer ผสม dimer



รูปที่ 3.24 โครงสร้าง 3 มิติแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนสำคัญ ของ ChiA1 จาก *Bacillus circular* WL-12 (ก) เปรียบเทียบกับ ChiRN1 ที่โคลนได้จาก *Bacillus licheniformis* RN01 (ข)

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

ChiRN1      -----
Chi66SK1    -----
Chi65PR1    -----
ChiA1       -----
ChiB        -----
Chi60       MRKFNKPLLALLIGSTLCSAAQAAAPGKPTIAWGNTKFAIVEVDQAATAYNSLVKVKDAA 60

ChiRN1      -----MKIV 4
Chi66SK1    -----MKIV 4
Chi65PR1    -----MKIV 4
ChiA1       -----MINLNKHT 8
ChiB        -----
Chi60       DVSVSWNLWNGDTGTTAKVLLNGKEAWSGPSTGSSGTANFKVKNKGGRYQMQUALCNADGC 120

ChiRN1      LINKSKKFFVFSFIFVMMLSLSFVNGEVAKADSGKNYKIIG-YYPSWGAYGRDFQVWDM 63
Chi66SK1    LINKSKKFFVFSFIFVMMLSLSFVNGEVAKADSGKNYKIIG-YYPSWGAYGRDFQVWDM 63
Chi65PR1    LINKSKKFFVFSFIFVMMLSLSFVNGEVAKADSGKNYKIIG-YYPSWGAYGRDFQVWDM 63
ChiA1       AFKKTAKFFLGLSLLLSVIVPSFAL-QPATAEAADS YKIVG-YYPSWAAAYGRNYNVADID 66
ChiB        -----MSTRKAVIGYYFIP TNQINNYTETDTSVVP-FPVSN-----ITPAK 40
Chi60       SASDATEIVVADTDGSHLAPLKEP LLEKNKPYKQNSGKVVGSYFVVEGWVYGRNFTVDKIP 180
          :         : . . . . : : : : :

ChiRN1      VSKVSHINYAFADICWEGRHGNPDPTGPNPQTWSCQDENG-VIDAPNGTIVMGDPWIDAQ 122
Chi66SK1    VSKVSHINYAFADICWEGRHGNPDPTGPNPQTWSCQDENG-VIDAPNGTIVMGDPWIDAQ 122
Chi65PR1    VSKVSHINYAFADICWEGRHGNPDPTGPNPQTWSCQDENG-VIDAPNGTIVMGDPWIDAQ 122
ChiA1       PTKVTHINYAFADICWNGIHGNPDPSGPNPVTWTCQNEKSQTINVPNGTIVLGDWPIDTG 126
ChiB        AKQLTHINF SFLDINSN-----LECAWDPATN----- 67
Chi60       AQLNTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEGSFQALQRSCQG---REDFKVISIHDPFAALQ 236
          :::* : . * *

ChiRN1      KANP-GDVWDEPIRGNFKQLLKLKSHPHLKTFSVGGWTWSN-----RFSDVAADPA 174
Chi66SK1    KSNP-GDVWDEPIRGNFKQLLKLKSHPHLKTFSVGGWTWSN-----RFSDVAADPA 174
Chi65PR1    KANP-GDVWDEPIRGNFKQLLKLKSHPHLKTFSVGGWTWSN-----RFSDVAADPA 174
ChiA1       KTFAGDTWDQPIAGNINQLNKLKQTNPNLKTII SVGGWTWSN-----RFSDVAATAA 178
ChiB        -----DAKARDVVNRLTALKAHNPSLRIMFSIGGWYSNDLGVSHANYVNAVKTPA 118
Chi60       KAQKGVTAWDDPYKGNFGLMALKQAHPLDKILPSIGGWTLSDP-----FFFMGDKV 288
          * . . . : * * * : * * : : * : * * * * :

ChiRN1      ARENFAASAVEFLRKYG-FDGVDLDWEYPVSGGLPGNSTRPEDKRNYTLLQLQEVRRKCLDA 233
Chi66SK1    ARENFAASAVEFLRKYG-FDGVDLDWEYPVSGGLPGNSTRPEDKRNYTLLQLQEVRRKCLDA 233
Chi65PR1    ARENSAASPVEFLRKYG-FDGVDLDWEYPVSGGLPGNSTRPEDKRNYTLLQLQEVRRKCLDA 233
ChiA1       TREVFANSADVFLRKYN-FDGVDLDWEYPVSGGLDGNPKRPEDKQNYTLLSKIREKCLDA 237
ChiB        ARTKFAQSCVRIMKDYG-FDGVDLDWEYPQAAEVDG-----FIAALQEIRTLNQL 167
Chi60       KRDRFVGSVKEFLQTWKFFDGVDLDWEYFPGGKGANPNLGSPPQDGETYVLLMKELRAMLDQ 348
          * . . * . : : : * * * : * * * : : : : * *

ChiRN1      AEAKDGK---EYLLTIASGASPDYVSN--TELDKIAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHN 288
Chi66SK1    AEAKDGK---EYLLTIASGASPDYVSN--TELDKIAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHN 288
Chi65PR1    AEAKDGK---EYLLTIASGASPDYVSN--TELDKIAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHN 288
ChiA1       AGAVDGG---KYLLTIASGASATYAAN--TELAIAAIVDWINIMTYDFNGAWQKI SAHN 292
ChiB        QTIADGRQALPYQLTIAGAGGAFFLSRYYSKLAQIVAPLDYINLMTYDLAGPWEKITNHQ 227
Chi60       LSAETGR---KYELTSAISAGKDKIDK--VAYNVAQNSMDHIFLMSYDFYGAFLDKNLGH 403
          * : * * * * . . . : * * : * * * : * : : . :

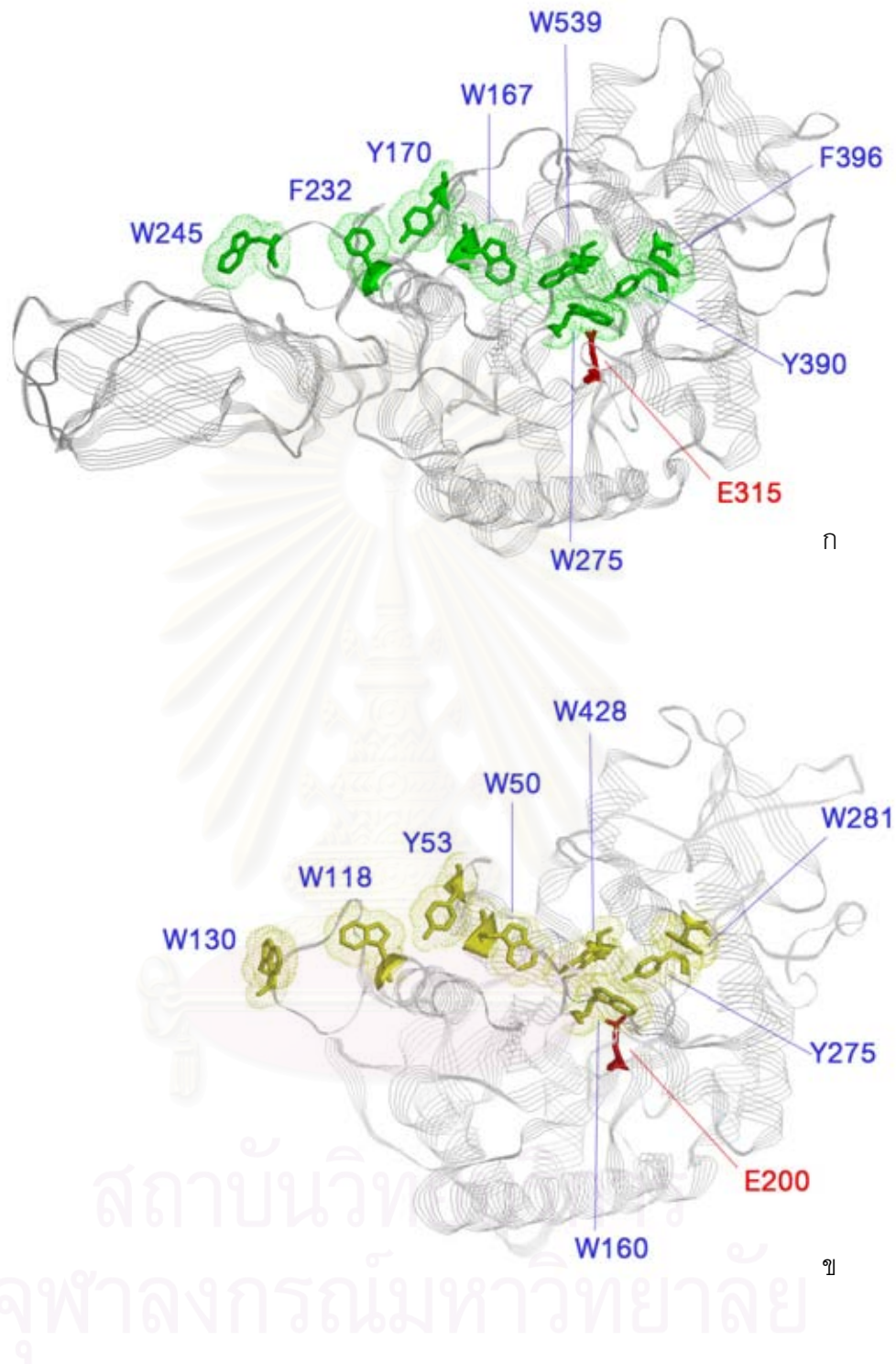
ChiRN1      APLFYDPKAKEAG-----VPNAETYNIENTVKRYKEAG-VKGDKLVL 329
Chi66SK1    APLFYDPKAKEAG-----VPNAETYNIENTVKRYKEAG-VKGDKLVL 329
Chi65PR1    APLFYDPKAKEAG-----VPNAETYNIENTVKRYKEAG-VKGDKLVL 329
ChiA1       APLNYDPAASAAG-----VPDANTFNVAAGAQQHLDAG-VPAAKLVL 333
ChiB        AALFGDAAGPTFYNALREANLGSWEELTRAFSPFSLTVDAAVQQHLMMEGVPSAKIVM 287
Chi60       QTALNAPAWKPDT-----AYTTVNGVNALLAQG-VKPGKIVV 439
          . . . . : . . : * * * :

ChiRN1      GTPFYGRGWSGCEPGGHGEYQKCG-----PAKEGTWEKGVDFDSLER 372
Chi66SK1    GTPFYGRGWSGCEPGGHGEYQKCG-----PAKEGTWEKGVDFDSLER 372
Chi65PR1    GTPFYGRAGAVVNPGGTENIRNAD-----RLKKGHGKRAYSIFQILKG 372
ChiA1       GVPFYGRGWDGCAQAGNGQYQCTG-----GSSVGTWEAGSFDYDLEA 377
ChiB        GVPFYGRAFKGVSGGNGGQYSSHSSTPGEDPYPNADYWLVCDECVRDKDPRIASRQLEQ 347
Chi60       GTAMYGRGWTGVNGYQNNIPFTGTAT-----GPVKGTWENGIVDYRQIAG 484
          * . . : * * * . . . . : : : :

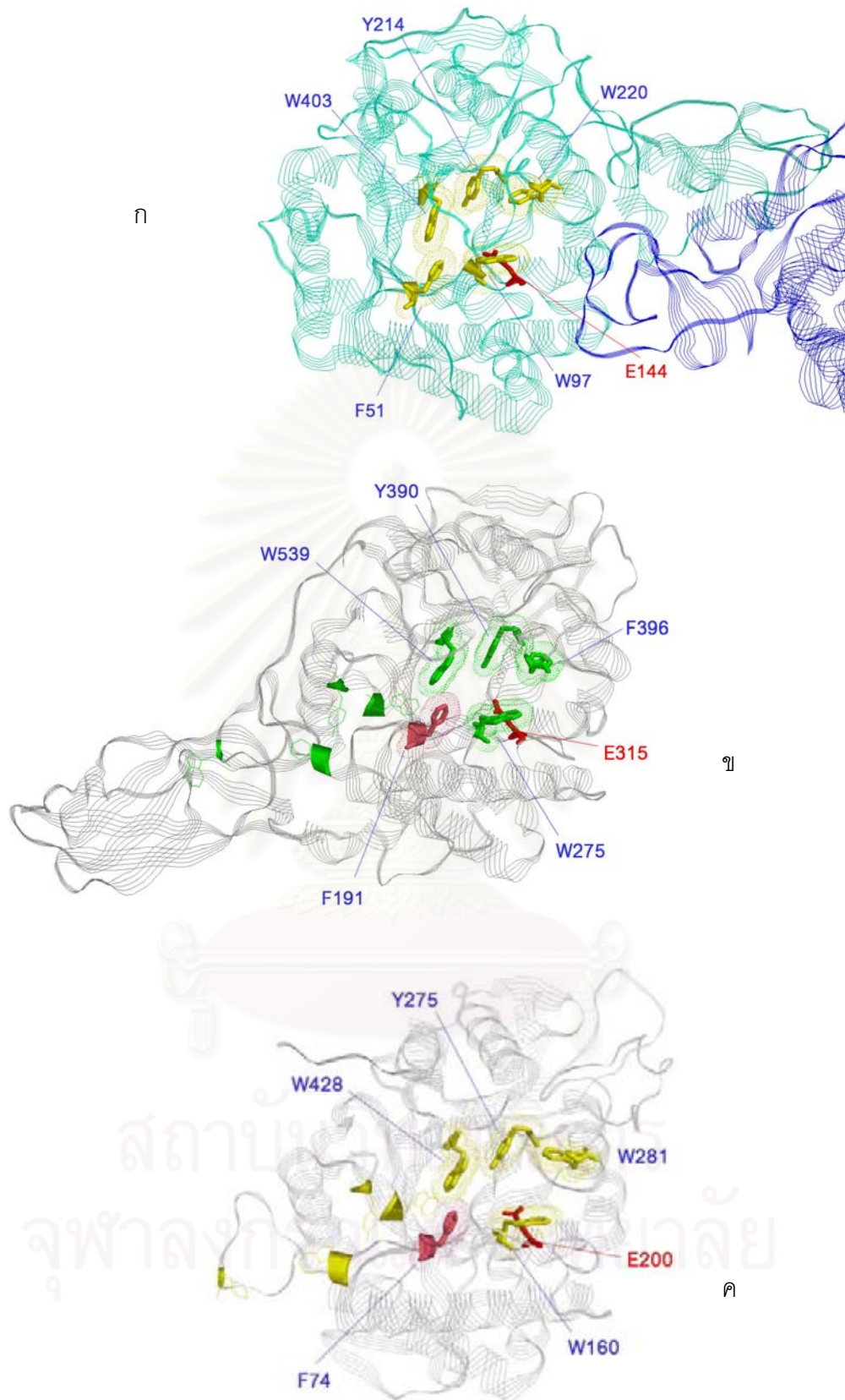
```

ChiRN1	NYVNQNGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFITYDDEQSFHGKTDFIKANGLSGAMFWDMSG	432
Chi66SK1	NYVNQNGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFITYDDEQSFHGKTDFIKANGLSGAMFWDMSG	432
Chi65PR1	TYVNQNGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFITYDDEQSFHGKTDFIKANGLSGAMFWDMSG	432
ChiA1	NYINKNGYTRYWNDTAKVPFLYNAENGNFITYDDEQSFHGKTDFIKSKGLGGAMFWELSG	437
ChiB	MLQGNQYQRLWNDKTKTPYLYHAQNGLFVTYDDAESFKYKAKYIKQQQLGGVMFWHLGQ	407
Chi60	QFMSG-EWQYTYDATAEAPYVFKPSTGDLITFDDARSVQAKGKYVLDKQLGGLFSWEIDA	543
	. : : : : * : : : . . . : : : * * . * . * : : : * . * : * . . .	
ChiRN1	DSNRTLLNKLAADLDFAPDGGNPEPPS-SAPVNVVRTGKTATSVSLAWDAPSSGANIAEY	491
Chi66SK1	DSNRTLLNKLAADLDFAPDGGNPEPPS-SAPVNVVRTGKTATSVSLAWDAPSSGANIAEY	491
Chi65PR1	DSNRTLLNKLAADLDFAPDGGNPEPPS-SAPVNVVRTGKTATSVSLAWDAPSSGANIAEY	491
ChiA1	DRNKTLQNKLKADLPTGGTVPPVDTTAPSVPGNARSTGVTANSVTLAWNASTDNVGVVTGY	497
ChiB	DNR---NGDLLAALDRYFNAADYDSDQLDMGTGLRYTGVGPGNLPIMTAP-----	454
Chi60	DNG-DILNSMNASLGNAGVQ-----	563
	* .. : * *	
ChiRN1	-VVSFENRSISVKETSAEIGGLKPGTAYSFTVSAKDADGKLHAGP-TVEVTTNSD-----	544
Chi66SK1	-VVSFENRSISVKETSAEIGGLKPGTAYSFTVSAKDADGKLHAGP-TVEVTTNSD-----	544
Chi65PR1	-VVSFENRSISVKETSAEIGGLKPGTAYSFTVSAKDADGKLHAGP-TVEVTTNSD-----	544
ChiA1	NVYNGANLATSVTGTTATISGLTAGTSYTFTIKAKDAAGNLSAASNAVTVSTTAQPGGDT	557
ChiB	-----	
Chi60	-----	
ChiRN1	-----	
Chi66SK1	-----	
Chi65PR1	-----	
ChiA1	QAPTAPTNLASTAQTSSITLSWTASTDNVGVVTGYDVYNGTALATTVTGTATTISGLAAD	617
ChiB	-----	
Chi60	-----	
ChiRN1	-----QACS-----YDEWKETSAYTGGERVAFNGKVYEA	573
Chi66SK1	-----QACS-----YDEWKETSAYTGGERVAFNGKVYEA	573
Chi65PR1	-----QACS-----YDEWKETSAYTGGERVAFNGKVYEA	573
ChiA1	TSYTFTVKAKDAAGNVSAASNAVSVKTAETTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTVYNGKTYKC	677
ChiB	-----AYVPGTTYAQGALVSYQGYVWQT	477
Chi60	-----	
ChiRN1	KWWTKGDRPDQSGEWGVWRLIGGCE	598
Chi66SK1	KWWTKGDRPDQSGEWGVWRLIGGCE	598
Chi65PR1	KWWTKGDRLINP----VNGAYGG--	592
ChiA1	LQPHTSLAGWEPSPALWQLQ---	699
ChiB	KWGYITSAPGSDSAWLKVGRLA---	499
Chi60	-----	

รูปที่ 3.25 ผลการทำ multiple sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโน ChiB, Chi60, ChiA1, Chi65, Chi66 และ ChiRN1



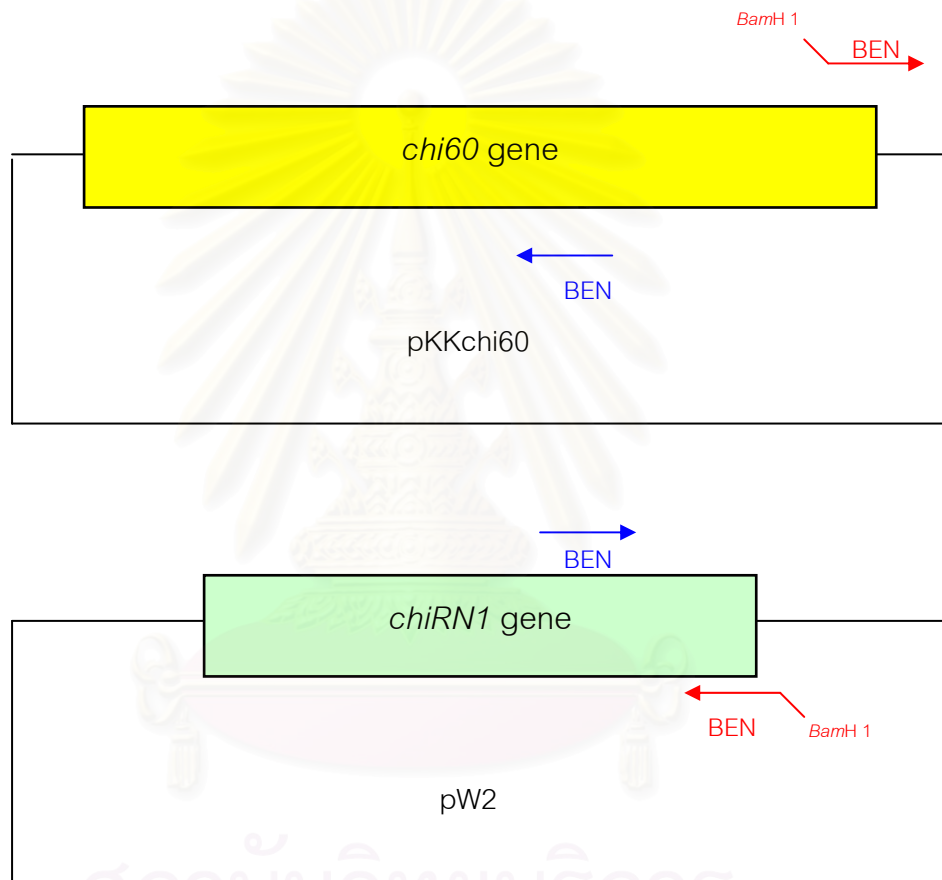
รูปที่ 3.26 โครงสร้าง 3 มิติแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนสำคัญที่ทำหน้าที่จับกับสายของไคตินของ Chi60 จาก *Serratia liquefaciens* (ก) เปรียบเทียบกับ ChiRN1 ที่โคลนได้จาก *Bacillus licheniformis* RN01 (ข)



รูปที่ 3.27 โครงสร้าง 3 มิติแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนสำคัญของ ChiB จาก *Serratia marcescens* (ก) เปรียบเทียบกับ Chi60 จาก *Serratia liquefaciens* (ข) และ ChiRN1 จาก *Bacillus licheniformis* RN01 (ค)

การกลายพันธุ์โคติเนสโดยทำโคติเนสลูกผสม

เราจะสร้างโคติเนสลูกผสมโดยนำเอาชิ้นส่วนของยีนจาก pW2 ที่เป็นส่วนสำหรับสร้าง FnIID และ ChBD มาต่อเข้ากับยีนที่สร้างเป็น Chi60 จาก pKKchi60 โดยจะทำการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนจาก pKKchi60 ด้วยการทำ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ BEN1 และ BEN5 ส่วนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนจาก pW2 จะทำโดยใช้คู่ไพรเมอร์ BEN4 และ BEN6



รูปที่ 3.28 แผนการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ PCR เพื่อสร้างโคติเนสลูกผสม

โดยโคติเนสลูกผสมที่ได้ จะมีการเรียงลำดับโดเมนจากปลายด้านอะมิโนถึงปลายด้านคาร์บอกซี เป็นดังรูปที่ 3.29



รูปที่ 3.29 การเรียงลำดับโดเมนของโคติเนสลูกผสมที่ทำโดยการนำส่วน FnIIID และ ChBD จาก เอนไซม์ ChiRN1 มาต่อเข้ากับเอนไซม์ Chi60

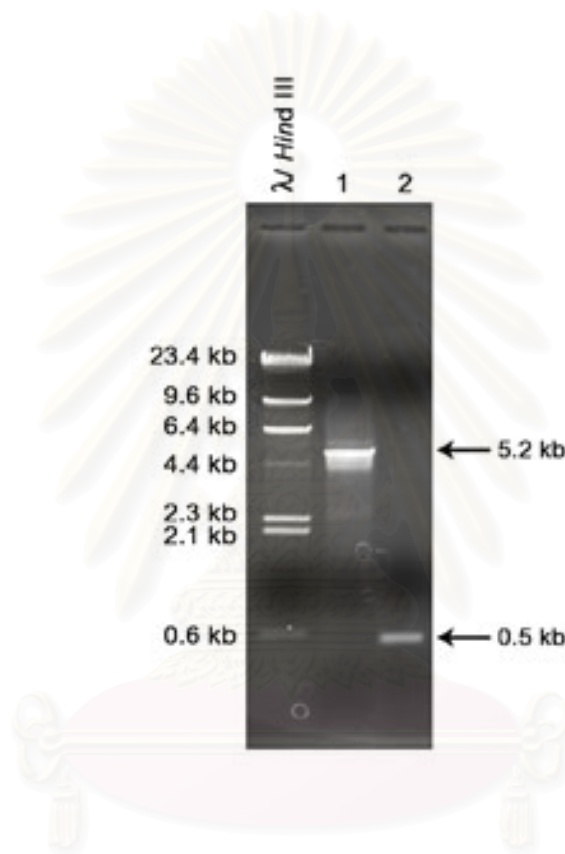
โดยกำหนดให้



เมื่อทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้น DNA แล้ว PCR product ที่เพิ่มจำนวนจาก pKKchi60 จะมีขนาดประมาณ 5.2 kb และ PCR product ที่เพิ่มจำนวนจาก pW2 มีขนาดประมาณ 0.5 kb โดยจะได้ผลดังรูปที่ 3.30

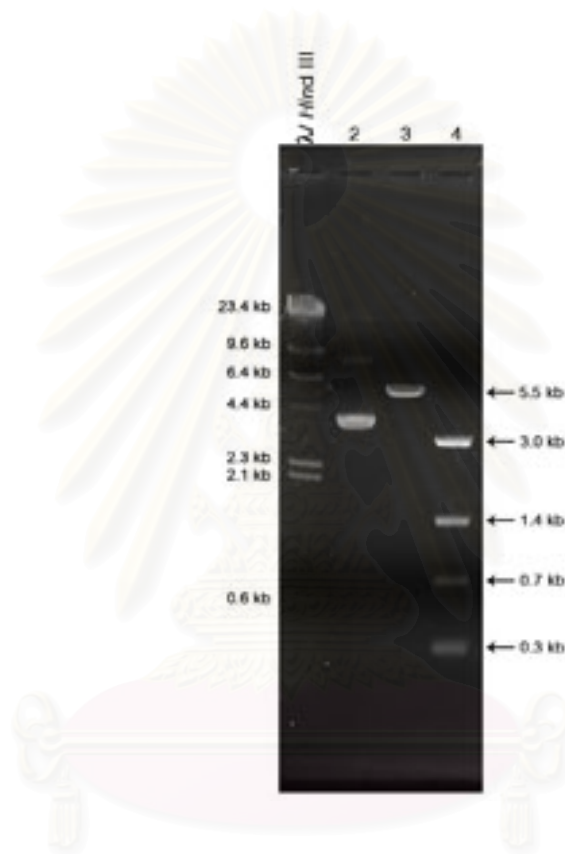
ทำการตัดแถบ DNA ขนาด 5.2 kb และ 0.5 kb ออกมาจากเจล แล้วนำมาเชื่อมกันโดยใช้ T4 DNA ligase จากนั้นนำไป transform เข้าสู่เชื้อ *E.coli* Top10 นำมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มีแอมพิซิลิน 100 µg/ml นำมาคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดที่ต้องการ โดยเลือกโคโลนีที่เจริญและมีวงใสรอบโคโลนีมาสกัดพลาสมิด จากนั้นตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดมาโดยการตัดด้วย restriction enzyme *Bam*H I และ *Pst* I โดยพลาสมิดที่คาดว่าถูกต้องนั้น เมื่อตัดด้วย *Bam*H I จะตัดได้ 1 ครั้ง และเมื่อตัดด้วย *Pst* I จะตัดได้ 4 ครั้งและจะได้แถบ DNA ขนาดประมาณ 1.4 kb ออกมาด้วย (รูปที่ 3.31)

หลังจากตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดโดยการตัดได้ด้วย *Bam*H I และ *Pst* I แล้ว เราให้ชื่อพลาสมิดที่มีรูปแบบการตัดที่ถูกต้องว่า pKKchi60b13 จากนั้นนำพลาสมิด pKKchi60b13 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pKKchi60b13 เป็นดังรูปที่ 3.32 โดยยีนของโคติเนสลูกผสมสามารถแปลรหัสพันธุกรรมออกมาแล้วได้เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ in-frame กันพอดี



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.30 แสดงชิ้น DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เพื่อสร้างโคตินเนสลูกผสม กำหนดให้ lane 1 คือ PCR product ที่เพิ่มจำนวนจาก pKKchi60 ด้วยไพรเมอร์ BEN1 และ BEN5 ส่วน lane 2 คือ PCR product ที่เพิ่มจำนวนจาก pW2 ด้วยไพรเมอร์ BEN4 และ BEN6



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.31 แสดงพลาสมิดที่มียื่นสำหรับสร้างโคติเนสลูกผสม โดย lane 1 คือ DNA marker $\lambda/Hind$ III, lane 2 คือ pKKchi60b13 ที่ไม่ได้ตัดด้วย restriction enzyme, lane 3 คือ pKKchi60b13 ที่ตัดด้วย *Bam*H I และ lane 4 คือ pKKchi60b13 ที่ตัดด้วย *Pst* I

1 - GCAGAGTGTGGTGCAATCCTGATAAATATTTATCTTTCCTTAATAAAAAAATTCACATC - 60
 -
 61 - CATATTTGTCGTGCTTTCCTTTATTTATATTTAAATAAATTCACGCTTGCTGAATAAAAC - 120
 -
 121 - CCAGTTGATAGCGCTCTTGT'TTTCACGCCTT'TTTATTTATAGTCTGAATGTACGCGGTG - 180
 -
 181 - GGAATGATTATTTGCCCACGTGAAAGACACTGTTGCTATTTATTGATTTTAACTTTTTCGA - 240
 -
 241 - GGATTATTGCGGAATTTTTCGCTTTCGGCAATGCATCGCGACGATTAACCTCTTTTATGTT - 300
 -
 301 - TATCCTCTCGGAATAAAGGAATCAGTTATGCGCAAATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTG - 360
 - M R K F N K P L L A L
 361 - TTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCGGCGCAGGCCGCGGCGCCGGGCAAGCCGACCATC - 420
 - L I G S T L C S A A Q A A A P G K P T I
 421 - GCCTGGGGCAATACCAAGTTCGCCATCGTTGAAGTTGACCAGGCGGCTACCGCTTATAAT - 480
 - A W G N T K F A I V E V D Q A A T A Y N
 481 - AGTTTGGTGAAGGTAAAAGATGCCGCCGATGTTTCGGTCTCCTGGAATTTATGGAATGGC - 540
 - S L V K V K D A A D V S V S W N L W N G
 541 - GACACCGGTACGACGGCAAAAGTTTATTAATGGCAAAGAGGCGTGGAGCGGCCCGTCA - 600
 - D T G T T A K V L L N G K E A W S G P S
 601 - ACCGGTCTTCCGGTACGGCGAATTTTAAAGTCAATAAAGGCGCCGTTATCAAAATGCAG - 660
 - T G S S G T A N F K V N K G G R Y Q M Q
 661 - GTGGCATTGTGCAATGCCGACGGCTGCAGCGCCAGCGACGCCACCGAAATTTGTTGGTGGCC - 720
 - V A L C N A D G C S A S D A T E I V V A
 721 - GACACCGACGGCAGCCATTTGGCGCGTTGAAAGAGCCGCTGCTGGAAAAGAATAAACCG - 780
 - D T D G S H L A P L K E P L L E K N K P
 781 - TATAAACAGAACTCCGGCAAAGTCGTCGGTTCTTATTTTCGTCGAGTGGGGCGTTTACGGG - 840
 - Y K Q N S G K V V G S Y F V E W G V Y G
 841 - CGCAATTTACCGTCGACAAGATCCCAGGCGCAGAACCTGACCCACCTGCTGTACGGCTTT - 900
 - R N F T V D K I P A Q N L T H L L Y G F
 901 - ATCCCGATCTGCGGCGGCAACGGCATCAACGACAGCCTGAAAGAGATCGAAGGCAGCTTC - 960
 - I P I C G N G I N D S L K E I E G S F
 961 - CAGGCGCTGCAGCGCTCCTGCCAGGGCCGCGAGGACTTCAAAGTCTCGATCCACGATCCG - 1020
 - Q A L Q R S C Q G R E D F K V S I H D P
 1021 - TTCGCCGCGCTGCAAAAAGCGCAGAAGGGCGTTACCGCCTGGGATGACCCCTACAAGGGC - 1080
 - F A A L Q K A Q K G V T A W D D P Y K G
 1081 - AACTTCGGCCAGCTGATGGCGCTGAAACAGGCGCATCCTGACCTGAAAATTTGCCGTCG - 1140
 - N F G Q L M A L K Q A H P D L K I L P S
 1141 - ATCGGCGGCTGGACGCTGTCCGACCCGTTCTTCTTCATGGGCGATAAGGTGAAGCGCGAT - 1200
 - I G G W T L S D P F F F M G D K V K R D
 1201 - CGCTTCGTCGGTTCGGTGAAGAGTTCCTGCAGACCTGGAAGTTCTTCGATGGCGTGGAT - 1260
 - R F V G S V K E F L Q T W K F F D G V D
 1261 - ATCGACTGGGAGTTCCTGGGCGGCAAAAGGCGCAACCCGAACCTGGGCAGCCCGCAGGAC - 1320
 - I D W E F P G G K G A N P N L G S P Q D
 1321 - GGGGAAACCTATGTGCTGCTGATGAAGGAGCTGCGGGCGATGCTGGATCAGCTGTCCGGC - 1380
 - G E T Y V L L M K E L R A M L D Q L S A

1381 - **GAAACCGCGCCGAAATATGAACTGACCTCCGCCATCAGCGCCGGCAAGGACAAGATCGAT** - 1440
 - E T G R K Y E L T S A I S A G K D K I D

1441 - **AAGGTGGCTTACAACGTTGCGCAGAACTCGATGGATCACATCTTCTGATGAGCTACGAC** - 1500
 - K V A Y N V A Q N S M D H I F L M S Y D

1501 - **TTCTATGGCGCCTTCGATCTGAAGAACCTGGGGCATCAGACCGCGCTGAATGCGCCGGCC** - 1560
 - F Y G A F D L K N L G H Q T A L N A P A

1561 - **TGGAAGCCGGACACCGCTTACACCACGGTGAACGGCGTCAATGCGCTGCTGGCGCAGGGC** - 1620
 - W K P D T A Y T T V N G V N A L L A Q G

1621 - **GTCAAGCCGGCAAGATCGTGGTGGCACC GCCATGTATGGCCGGCTGGACCGGGGTG** - 1680
 - V K P G K I V V G T A M Y G R G W T G V

1681 - **AACGGCTACCAGAACAACATTCCGTTACCGGTACCGCCACTGGGCCGGTCAAAGGCACC** - 1740
 - N G Y Q N N I P F T G T A T G P V K G T

1741 - **TGGGAGAACGGCATCGTGGACTACCGCCAAATCGCCGGCCAGTTCATGAGCGCGAGTGG** - 1800
 - W E N G I V D Y R Q I A G Q F M S G E W

1801 - **CAGTATACCTACGACGCCACGGCGGAAGCGCTTACGTGTTCAAACCTTCCACCGGCGAT** - 1860
 - Q Y T Y D A T A E A P Y V F K P S T G D

1861 - **CTGATCACCTTCGACGATGCCCGCTCGGTGCAGGCCAAAGGCAAGTACGTGCTGGATAAG** - 1920
 - L I T F D D A R S V Q A K G K Y V L D K

1921 - **CAGCTGGGCGGCCTGTTCTCTGGGAGATCGACCGGACAACGGCGATATTCTCAACAGC** - 1980
 - Q L G G L F S W E I D A D N G D I L N S

1981 - **ATGAACGCCAGCCTA**CTAGATTTGACCGGACGGAGGCAATCCGGAGCCGCCTTCATCG - 2040
 - M N A S L L D F A P D G G N P E P P S S

2041 - GCACCTGTGAATGTGCGTGTAAACGGAAAACTGCTACAAGTGTGAGCCTGGCGTGGGAT - 2100
 - A P V N V R V T G K T A T S V S L A W D

2101 - GCGCCGAGCAGCGGAGCAAACATTGCGGAATATGTCGTGTCATTTGAAAACCGGTCGATA - 2160
 - A P S S G A N I A E Y V V S F E N R S I

2161 - TCTGTAAAAGAAACATCAGCGGAAATAGGCGGCTTGAAGCCGGGTACGGCCTACTCATT - 2220
 - S V K E T S A E I G G L K P G T A Y S F

2221 - ACTGTTTTCAGCAAAGGATGCGGATGGAAAGTCCATGCCGGACCAACGGTAGAGGTCACG - 2280
 - T V S A K D A D G K L H A G P T V E V T

2281 - ACGAATTCTGACCAAGCCTGTTTCATATGACGAATGGAAAGAGACGAGCGCATAACAGGC - 2340
 - T N S D Q A C S Y D E W K E T S A Y T G

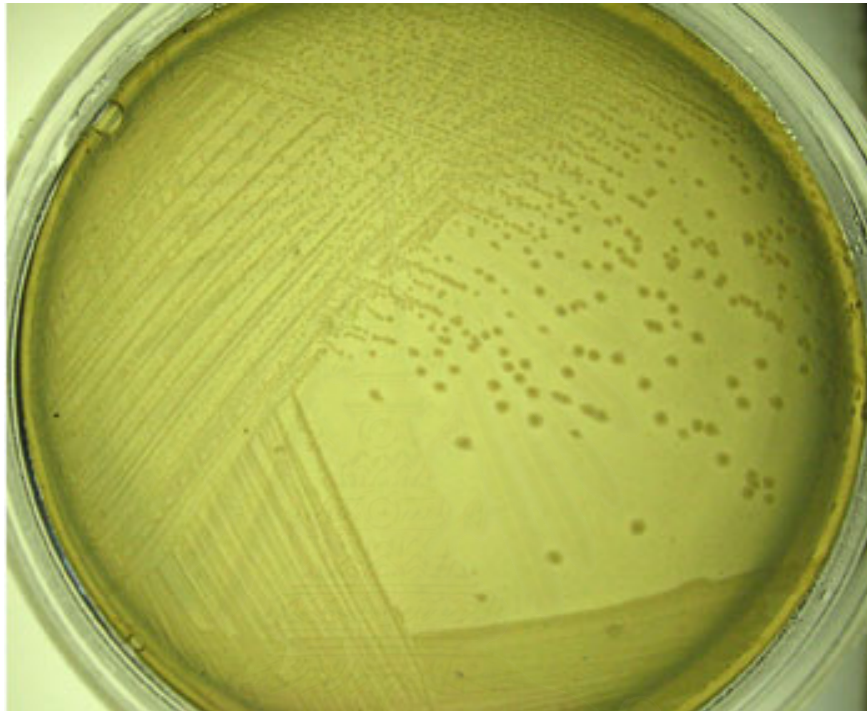
2341 - GGAGAGCGGGTTGCATTTAACGGAAAAGTGTATGAAGCGAAATGGTGGACGAAAAGGCGAC - 2400
 - G E R V A F N G K V Y E A K W W T K G D

2401 - CGGCCTGATCAATCCGGTGAATGGGGCGTATGGCGGCTGATCGGAGGCTGCCAATAAGAG - 2460
 - R P D Q S G E W G V W R L I G G C E *

2461 - AAAGTCAAACGGATCC**AATCTACAACCGGCTGGTTCGAATTCAAGACCGGCACCACCGAGC** - 2520
 -

2521 - **TGCAG** - 2525
 -

รูปที่ 3.32 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pKKchi60b13 ที่มียื่นลูกผสม สำหรับสร้างเป็นโคดีเนสลูกผสม โดยบริเวณที่ไม่ขีดเส้นจะเป็นส่วนยื่นจาก pKKchi60 ที่สร้างเป็น N-ter และ CatD ของ Chi60 บริเวณที่ขีดเส้นได้แบบที่บจะเป็นส่วนรอยต่อระหว่าง 2 ยีน และบริเวณที่ขีดเส้นได้แบบจุดจะเป็นส่วนยื่นที่สร้างเป็น FnIIID และ ChBD ของ ChiRN1



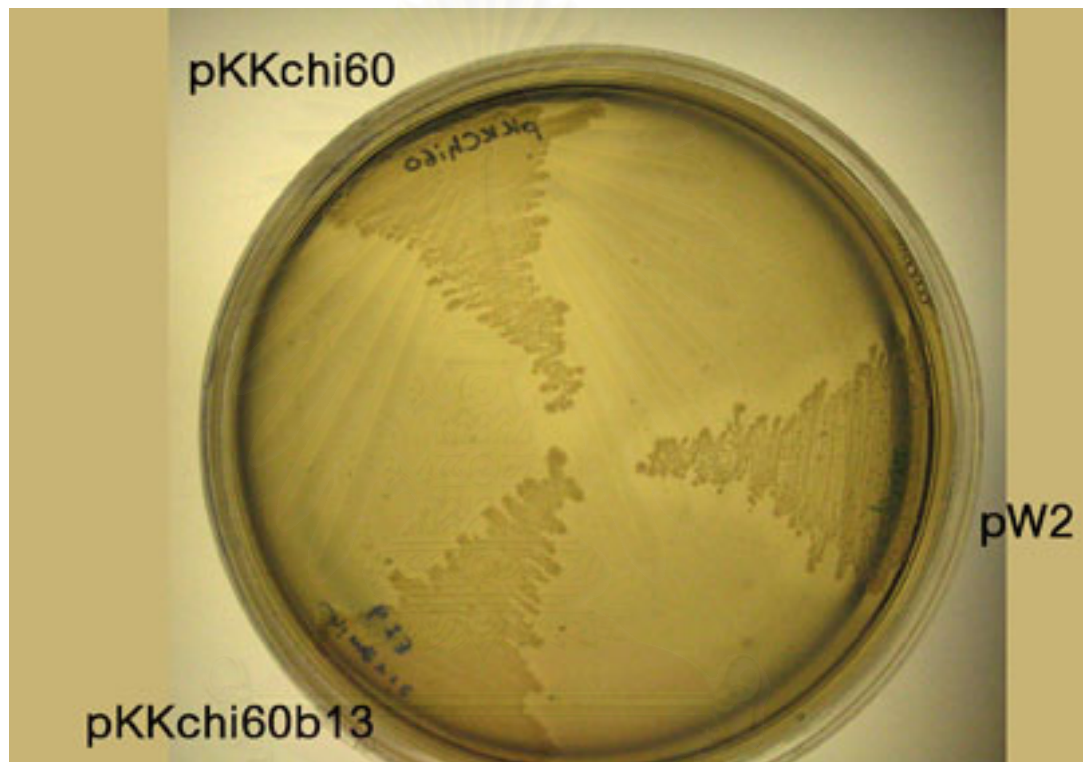
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.33 แสดงวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *E.coli* Top10 ที่มี plasmid pChi60b13 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *E. coli* Top10 ที่มีพลาสมิด pKKchi60 pW2 และ pKKchi60b13 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มี Ampicillin 100 mg/ml เป็นเวลา 3 วัน เพื่อดูวงใสรอบโคโลนีเปรียบเทียบกับ พบว่า เชื้อที่มีพลาสมิด pKKchi60 มีการสร้างวงใสได้กว้างที่สุดตามด้วย เชื้อที่มีพลาสมิด pW2 และ เชื้อที่มีพลาสมิด pKKchi60b13 ตามลำดับ (รูปที่ 3.34)

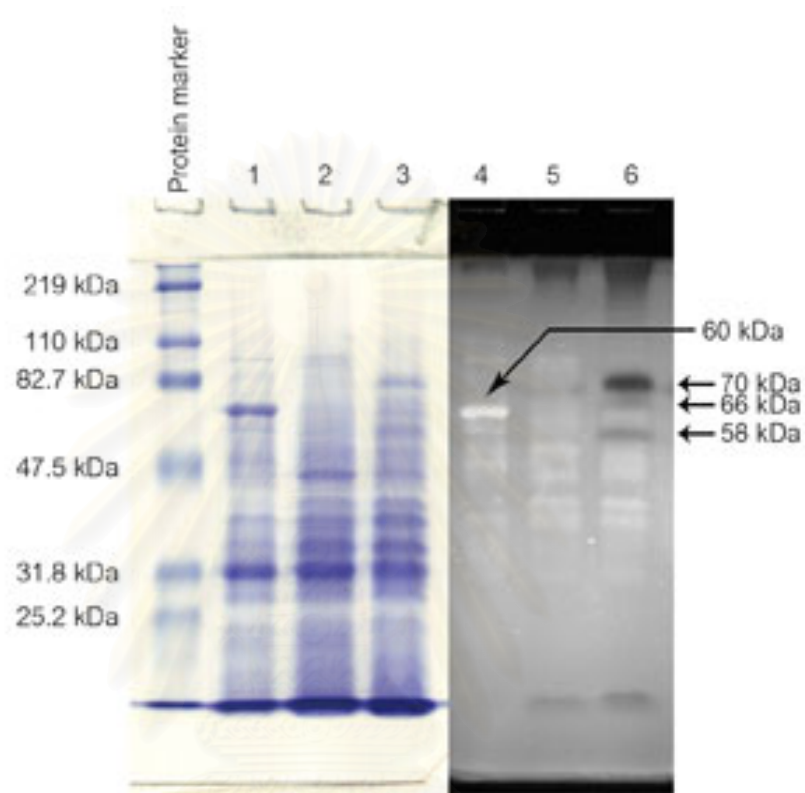
นำเชื้อ *E. coli* Top10 ที่มี pKKchi60b13 นำมาเลี้ยงให้ผลิตโคติเนสลูกผสมแล้วนำมาหาขนาดของโปรตีนโดยทำ SDS-PAGE แล้วย้อมแอกติวิตี (รูปที่ 3.35) ผลปรากฏว่าเราไม่พบแถบโคติเนสลูกผสมที่น่าจะมีขนาดประมาณ 80 kDa เนื่องจาก Chi60 และโคติเนสลูกผสมไม่ยอม refold

เมื่อนำโคติเนสลูกผสมมาย่อยสับสเตรตแล้วนำไปหาขนาดผลิตภัณฑ์โดยนำไปฉีด HPLC พบว่า ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสับสเตรตด้วยโคติเนสลูกผสมได้ chitobiose เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3.36) ซึ่งเหมือนกับ Chi60 ตัวเดิม



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.34 วงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *E.coli* Top10 ที่มี plasmid pKKchi60, pW2 และ pChi60b13 เปรียบเทียบกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC หลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 3 วัน



รูปที่ 3.35 SDS-PAGE แสดงแถบของโปรตีนและแถบแอกติวิตีของไคตินเนส จาก Chi60, ไคตินเนสลูกผสม และ ChiRN1

โดย lane 1 คือ ไคตินเนส Chi60 ที่ย้อมสีโปรตีน
 lane 2 คือ ไคตินเนสลูกผสม ที่ย้อมสีโปรตีน
 lane 3 คือ ไคตินเนส ChiRN1 ที่ย้อมสีโปรตีน
 lane 4 คือ ไคตินเนส Chi60 ที่ย้อมแอกติวิตี
 lane 5 คือ ไคตินเนสลูกผสม ที่ย้อมแอกติวิตี
 lane 6 คือ ไคตินเนส ChiRN1 ที่ย้อมแอกติวิตี

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA (65) ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 เราพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ที่ได้ เมื่อนำมาเข้าโปรแกรม BLAST แล้ว มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน 16s rRNA ของ *Bacillus licheniformis* M1-1 ถึง 99% ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเป็นแบคทีเรียในจีนัสและสปีชีส์ *Bacillus licheniformis*

ในการศึกษาสมบัติบางประการของโคตินเนสอย่างหยาบที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 จากการติดตามลักษณะการผลิตเอนไซม์เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเราสามารถวัดแอกติวิตีของโคตินเนสได้เกือบสูงสุดเมื่อเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CCMM ไปแล้วเป็นเวลา 2 วัน ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อให้ผลิตเอนไซม์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ เราสามารถเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CCMM เป็นเวลา 2-4 วันก็เพียงพอ

เมื่อนำเอนไซม์อย่างหยาบมาหาอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เราพบว่า โคตินเนสอย่างหยาบสามารถทำงานได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 - 60°C เนื่องจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 ได้คัดเลือกมาจากแหล่งน้ำพุร้อน ดังนั้น เอนไซม์ที่เชื้อชนิดนี้ผลิตได้จึงสามารถทำงานในช่วงอุณหภูมิสูงได้ ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น เราพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วง pH ตั้งแต่ pH 6 - 11 โดยในการหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น ในตอนแรกเราได้ใช้บัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ควบคุม pH ในช่วง pH 3 - 10 โดยใช้ citrate buffer ควบคุม pH ในช่วง pH 3 - 6 ใช้ phosphate buffer ควบคุม pH ในช่วง pH 6 - 8 และ ใช้ Tris-HCl buffer ควบคุม pH ในช่วง pH 8 - 10 จากผลการทดลอง (รูปที่ 3.7) พบว่า ใน citrate buffer และ phosphate buffer ที่ pH 6 และใน phosphate buffer และ Tris-HCl buffer ที่ pH 8 แอกติวิตีที่วัดได้มีความแตกต่างกันมาก สาเหตุที่ทำให้แอกติวิตีที่ pH เดียวกันแต่อยู่ในบัฟเฟอร์ต่างชนิดกันมีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากผลของ ionic strength ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเราพบว่า ionic strength ที่แตกต่างกัน มีผลต่อการทำงานของ Chi60 (รายงานที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ของ นางสาวกมลทิพย์ ชัตติยะวงศ์) เนื่องจากบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด มีค่า ionic strength ไม่เท่ากัน ดังนั้นเราจึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติม โดยเปลี่ยนมาใช้ universal buffer ที่มีค่า ionic strength ใกล้เคียงกันในทุก pH มาเป็นระบบในการหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้ผลของความแตกต่างของ ionic strength ในบัฟเฟอร์ลดลง ซึ่งผลจากการใช้ universal buffer มาเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้หาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เราพบว่า โคตินเนส อย่างหยาบ สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ pH 6 - 11 และจากกราฟ จะดูเหมือนว่าเอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีที่สุดใน pH 6 และ

pH 10 ซึ่งเราพบ peak การทำงานสูงสุดที่สอง pH นี้ สาเหตุที่เราพบ peak ในสอง pH เนื่องจากว่า เอนไซม์ที่เรานำมาวัดแอกติวิตีนั้นเป็น crude enzyme ซึ่งเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 อาจจะมีผลิตโคติเนสได้มากกว่า 1 ชนิด ที่ทำงานได้ดีที่ pH ต่างกัน เราจึงเห็น peak ออกมาเป็น 2 peak หรือ อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 ผลิตโคติเนสมาเพียงชนิดเดียว แต่ว่าโคติเนสที่เชื้อผลิตขึ้นมาสามารถทำงานได้ดีในทั้งสอง pH และจะเห็นได้อีกว่า เอนไซม์จะมีแอกติวิตีสูงในช่วง pH ที่เป็นต่าง มากกว่าในช่วง pH ที่เป็นกรด อาจเป็นเพราะว่า ผลของ pH ไม่ได้เพียงส่งต่อสถานะทางกายภาพของเอนไซม์เพียงอย่างเดียว ยังส่งผลกระทบต่อสถานะทางกายภาพของสับสเตรตอีกด้วย อาจเป็นไปได้ว่าในสภาวะที่เป็นต่าง สับสเตรตจะอยู่ในสภาพที่สามารถถูกย่อยได้ง่ายกว่า เราจึงพบแอกติวิตีในช่วง pH ที่เป็นต่างมากกว่า

ในการหาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ เราจะใช้สับสเตรตที่แตกต่างกัน 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มของ crystalline substrate ได้แก่ โคตินจากเปลือกกุ้ง โคตินจากเปลือกปู โคตินจากแกนปลาหมึก และ powder chitin กลุ่มของ amorphous substrate ได้แก่ colloidal chitin และกลุ่มของ soluble substrate ได้แก่ PNAC, 70% DD chitosan และ 90% DD chitosan โดยในกลุ่มของ crystalline substrate ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทได้อีก คือ สับสเตรตที่มีการจัดเรียงตัวของสายโคตินแบบอัลฟา (α -chitin) ได้แก่ โคตินจากเปลือกกุ้ง โคตินจากเปลือกปู และ powder chitin และสับสเตรตที่มีการจัดเรียงตัวของสายโคตินแบบบีตา (β -chitin) ได้แก่ โคตินจากแกนปลาหมึก ซึ่งสับสเตรตชนิด α -chitin จะมีความแข็งแรงมากกว่าชนิด β -chitin เนื่องสับสเตรตชนิด α -chitin จะมีการเรียงตัวที่เป็นระเบียบและสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายได้ ส่วนสับสเตรตในกลุ่ม amorphous substrate ถึงแม้จะเป็นสับสเตรตชนิดที่ไม่ละลายน้ำเช่นเดียวกับ crystalline substrate แต่ว่าสายของโคตินจะจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ จึงมีความแข็งแรงน้อยกว่า crystalline substrate และมีพื้นที่ผิวที่จะให้เอนไซม์ไปจับได้มากกว่า ดังนั้น เอนไซม์จะสามารถย่อยสับสเตรตชนิดนี้ได้ดีกว่า crystalline substrate ส่วนสับสเตรตในกลุ่ม soluble substrate ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ เอนไซม์จะสามารถเข้าถึงสับสเตรตได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเอนไซม์จะย่อยสับสเตรตในกลุ่มนี้ได้ดีมาก โดยจากผลการทดลอง (รูปที่ 3.8) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์สามารถย่อย PNAC ที่เป็น soluble substrate ได้ดีมากที่สุด รองลงมาเป็น colloidal chitin ที่เป็น amorphous substrate และถัดมาจะเป็นโคตินจากแกนปลาหมึก ที่เป็น crystalline β -chitin

เมื่อพิจารณาในกลุ่มของ crystalline substrate ที่เป็น α -chitin จะเห็นว่าเอนไซม์สามารถย่อย powder chitin ที่เตรียมมาจากโคตินจากเปลือกปูได้ดีใกล้เคียงกับโคตินจากแกนปลาหมึกที่เป็น β -chitin ทั้งนี้เนื่องจากว่า powder chitin ถึงแม้ว่าจะเป็นโคตินชนิด α -chitin แต่ก็ผ่านกระบวนการบดจนมีขนาดเล็กเพียง 3 ไมครอน ทำให้ powder chitin มีพื้นที่ผิวที่เอนไซม์จะ

เข้าไปจับและย่อยได้มากกว่าไคตินจากเปลือกกุ้งและเปลือกปูที่มีขนาดใหญ่กว่ามาก เราจึงวัดแอสติวิตีเมื่อนำเอนไซม์ไปย่อย powder chitin ได้มากกว่า ส่วนใน 70% และ 90% DD chitosan ถึงแม้ว่าจะเป็น soluble substrate แต่ว่าเราวัดแอสติวิตีในสัปดาห์ที่ 2 ชนิดนี้ได้น้อย เนื่องจากว่าเชื้อของเราไม่สามารถผลิตไคโตซานส์ได้นั่นเอง

เมื่อเรานำเอนไซม์มาปฏิกิริยากับสัปดาห์แล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสัปดาห์ด้วยเอนไซม์มาหาขนาด โดยนำไปฉีด HPLC เราพบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีอยู่ 2 ขนาดคือ monomer ของ N-acetylglucosamine หรือ (GlcNAc) และ dimer ของ N-acetylglucosamine ([GlcNAc]₂) หรือ chitobiose นั่นเอง โดยผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จะเป็น chitobiose

เมื่อเรานำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาหาขนาดโมเลกุลโดยนำมาทำ SDS-PAGE และย้อมแอสติวิตีเพื่อดูแอสติวิตีของไคตินเนสบนเจลพอลิอะคริลามิเด เราพบแถบแอสติวิตีอยู่ 3 แถบซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 70, 66 และ 58 kDa โดยสาเหตุที่เราพบแถบแอสติวิตีของไคตินเนสมากกว่า 1 แถบ อาจเป็นเพราะว่าเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 สามารถผลิตไคตินเนสออกมาได้มากกว่า 1 ชนิด หรือ อาจเกิดจาก degradation ของเอนไซม์ โดยแถบขนาด 66 kDa และ 58 kDa อาจจะเป็น proteolytic product ที่เกิดขึ้นจากการ degrade ของโมเลกุลขนาด 70 kDa

การโคลนยีนไคตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ในการทดลองนี้จะทำโดยวิธี PCR cloning โดยใช้คู่ไพรเมอร์ BP-19F และ BP-20R ที่สามารถใช้โคลนยีนไคตินเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. ได้ครบทั้งยีน (60) เมื่อเราทำ PCR เพิ่มจำนวนยีนไคตินเนสขึ้นมาได้แล้วด้วยเอนไซม์ Vent DNA Polymerase เราจะต้องนำยีนที่เราเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ มาเติม overhang A ที่ปลายด้าน 3' ด้วย Taq Polymerease ด้วย เพราะว่าจะได้โคลนเข้าเวกเตอร์ pGEM-T easy ที่มีปลายเป็น overhang T อยู่แล้วได้

ในการคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดที่เราเชื่อมยีนไคตินเนสเข้าไปแล้ว หลังจากที่เราพลาสมิดเข้าเซลล์ *E. coli* แล้ว จะคัดเลือกโดยการนำเชื้อมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มี 0.01% ampicillin, IPTG 1.4 mg และ X-GAL 0.8 mg โดยเชื้อที่ได้รับพลาสมิดเข้าไปในเซลล์จะสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มีแอมพิซิลลินได้ โคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มี insert จะเจริญแล้วได้โคโลนีสีขาว และโคโลนีที่ได้รับ plasmid ที่มี insert เป็นยีนไคตินเนส จะเจริญได้เป็นโคโลนีสีขาวและจะสามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีได้ เราจะคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีวงใสรอบโคโลนีมาเลี้ยงเพื่อสกัดพลาสมิดออกมามตรวจสอบโดยการตัดด้วย restriction enzyme Not I เนื่องจากพลาสมิดที่ถูกต้อง เมื่อตัดด้วย restriction enzyme Not I แล้วจะถูกตัดได้แถบ DNA ขนาดประมาณ 3 kb ของเวกเตอร์ pGEM-T easy และ 2 kb ของยีนไคตินเนสที่เราโคลนเข้าไปหลุดออกมา

เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับยีนไคตินเนส จาก *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 ถึง 99% เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปล

เป็นกรดอะมิโนโดยหา open reading frame ด้วยโปรแกรม ORF finder พบว่ายีน *chiRN1* ที่โคลนได้สามารถแปลรหัสพันธุกรรมออกมาเป็นกรดอะมิโนได้ 598 กรดอะมิโน และเมื่อคำนวณโดยใช้โปรแกรม ProtCalc พบว่าเอนไซม์ ChiRN1 มีน้ำหนักโมเลกุล 66,134.52 ดาลตัน (Da) และมี theoretical pI เท่ากับ 5.17

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาการทำ domain mapping โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในอินเตอร์เน็ต ซึ่งให้ข้อมูลออกมาว่าโครงสร้างของเอนไซม์ ChiRN1 มีอยู่ 3 โดเมนด้วยกัน ได้แก่ catalytic domain (CatD), fibronectin type III-like domain (FnIII_D) และ chitin binding domain (ChBD) และจากการทำนายโครงสร้าง 3 มิติ เราพบว่าโครงสร้าง 3 มิติของ CatD และ FnIII_D มีความคล้ายคลึงกับ CatD และ FnIII_D ของ ChiA1 จาก *Bacillus circulans* WL-12 แต่ว่าส่วนของ ChBD นั้น ไม่สามารถทำนายโครงสร้าง 3 มิติออกมาได้ เนื่องจากว่า ลำดับกรดอะมิโนในส่วน ChBD ของ ChiRN1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่ทราบโครงสร้างอยู่แล้วในฐานข้อมูลไม่ถึง 70%

จากการติดตามลักษณะการผลิตเอนไซม์ ChiRN1 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเราสามารถวัดแอกติวิตีของไคติเนสได้สูงสุดเมื่อเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pW2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี ampicillin 0.01% เป็นเวลา 4 วัน ต่อจากนั้นจะค่อนข้างคงที่ การที่เราสามารถวัดแอกติวิตีของไคติเนสพบหลังจากที่ต้องเลี้ยงเชื้อไปแล้วถึง 4 วันนั้น อาจเป็นเพราะไคติเนสที่ *E. coli* ผลิตไม่ได้ถูกส่งออกมานอกเซลล์ ดังนั้น เราจึงไม่พบแอกติวิตีในวันแรก ๆ และการที่เราพบแอกติวิตีของไคติเนสในวันหลัง ๆ นั้น อาจเป็นเพราะเซลล์ *E. coli* ที่เจริญในวันแรก ๆ ตายลงและเอนไซม์ถูกปลดปล่อยออกมาจากซากเซลล์ที่ตายนั้น เราจึงวัดแอกติวิตีพบได้

เมื่อนำเอนไซม์ ChiRN1 มาหาอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เราพบว่า ChiRN1 สามารถทำงานได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 - 70°C และที่ pH ตั้งแต่ pH 6 - 11 โดยเห็นว่าเอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุดในช่วง pH ที่เป็นด่าง ซึ่งเหมือนกับที่หาได้ในไคติเนสอย่างหายาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01

ในการหาความจำเพาะของเอนไซม์ ChiRN1 ต่อสับสเตรตชนิดต่างๆ เราพบว่า ChiRN1 มีแอกติวิตีบน PNAC ที่เป็น soluble substrate มากที่สุด รองลงมาคือ colloidal chitin ที่เป็น amorphous substrate และ ไคตินจากแกนปลาหมึก ที่เป็น crystalline β -chitin ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ ChiRN1 สามารถย่อยสับสเตรตประเภท soluble substrate ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสับสเตรตประเภท amorphous substrate และ crystalline substrate ตามลำดับ เช่นเดียวกับไคติเนสอย่างหายาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01

ในการหาขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์ ChiRN1 โดยการย่อยสับสเตรตแล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปฉีด HPLC เราพบว่า ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีอยู่ 2 ขนาดคือ

monomer ของ *N*-acetylglucosamine หรือ (GlcNAc) และ dimer ของ *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)₂ หรือ chitobiose โดยผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จะเป็น chitobiose เช่นเดียวกับไคตินเนสอย่างหายาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01

เมื่อเรานำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาหาขนาดโมเลกุลโดยนำมาทำ SDS-PAGE และย้อมแอกติวิตีเพื่อดูแอกติวิตีของไคตินเนสบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ เราพบแถบแอกติวิตีอยู่ 3 แถบซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 70, 66 และ 58 kDa เช่นเดียวกับที่พบในไคตินเนสอย่างหายาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ซึ่งเราคิดว่า ChiRN1 เป็นเอนไซม์ที่ได้จากการโคลน ดังนั้นจึงควรจะได้แถบแอกติวิตีเพียงแถบเดียว แต่เราก็ยังพบแถบแอกติวิตีถึง 3 แถบเช่นเดียวกับที่พบในไคตินเนสอย่างหายาบที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01 อีก จึงคาดว่าเอนไซม์ ChiRN1 ที่โคลนได้ สามารถ degrade ตัวเองได้ และแถบขนาด 66 kDa และ 58 kDa น่าจะเป็น proteolytic product ของแถบขนาด 70 kDa

เพื่อยืนยันสมมติฐานนี้เรานำไคตินเนส ChiRN1 มา absorb กับ colloidal chitin ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis แล้วนำส่วน unbound ที่ไม่จับกับ colloidal chitin มา run SDS-PAGE (รูปที่ 3.18) จะเห็นว่าแถบแอกติวิตีใน lane ที่เราใส่ส่วน unbound ลงไป จะเห็นแถบขนาดประมาณ 70 kDa มีความเข้มจางที่สุด ส่วนแถบขนาด 66kDa จะเข้มมากขึ้น และแถบขนาด 58 kDa จะเข้มที่สุด เนื่องจากว่าแถบขนาด 58 kDa ที่คาดว่าเป็น form ที่ถูก proteolytic แล้วเหลือเพียง CatD เพียงโดเมนเดียว ทำให้ไม่มีโดเมนที่ทำหน้าที่ในการจับกับ colloidal chitin ดังนั้น จึงพบแถบขนาด 58 kDa ออกมาในส่วน unbound มากที่สุด จึงเห็นแอกติวิตีของแถบนี้เข้มที่สุด ส่วนแถบขนาด 66 kDa ที่คาดว่าเป็น form ที่เหลือ CatD และ FnIID แต่ส่วน ChBD ถูก degrade ไปนั้น จะยังคงจับอยู่บน colloidal chitin ได้บ้าง แต่เราก็ยังจับได้ดีที่สุดในส่วนของแถบขนาด 70 kDa ที่ไม่ถูก degrade เลยไม่ได้ ดังนั้นเราจึงพบขนาด 66 kDa มีความเข้มรองลงมา ส่วนแถบขนาด 70 kDa มีความเข้มน้อยสุด เนื่องจากว่าเอนไซม์ขนาด 70 kDa ส่วนใหญ่จับอยู่บน colloidal chitin และเพื่อเป็นการยืนยันอีกขั้นว่า แถบแอกติวิตีที่เราเห็นนั้นเกิดจากการย่อยของ ChiRN1 เพียงชนิดเดียว เราอาจจะทำการ purify โปรตีนทั้ง 3 ขนาด แล้วนำไปทำ N-terminal sequencing ซึ่งถ้าผลการทำ N-terminal sequencing ของโปรตีนทั้ง 3 ขนาด มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน ก็จะเป็นการยืนยันได้ว่าแถบแอกติวิตีทั้ง 3 แถบนั้น เกิดจากแอกติวิตีของ ChiRN1 เพียงตัวเดียว แต่ว่าแถบที่มีขนาดเล็กกว่า คือ แถบของ ChiRN1 ที่ถูก degrade

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ ChiA1 จาก *Bacillus circulans* WL-12, เอนไซม์ Chi 60 จาก *Serratia liquefaciens*, เอนไซม์ ChiB จาก *Serratia marcescens* และเอนไซม์ ChiRN1 จาก *Bacillus licheniformis* RN01 พบว่า ส่วนของ CatD ที่เป็นโดเมนสำคัญสำหรับเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของเอนไซม์ไคตินเนสทั้ง 4 ชนิด มีความเหมือนกัน ทั้งในด้านโครงสร้าง 3 มิติ และตำแหน่งของกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่สำคัญบนโมเลกุลของ

เอนไซม์ แต่ว่าเอนไซม์แต่ละชนิดเมื่อย่อยสับสเตรตแล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดแตกต่างกัน โดย ChiA1 และ ChiRN1 ให้ผลิตภัณฑ์เป็น monomer ผสม dimer ส่วน Chi60 ให้ผลิตภัณฑ์เป็น dimer เพียงอย่างเดียว และ ChiB ให้ผลิตภัณฑ์เป็น trimer ทั้ง ๆ ที่มีโดเมนหลัก คือ CatD ที่เหมือนกัน แต่เมื่อพิจารณาถึง accessory domain ต่าง ๆ เช่น ChBD และ FnIIID เราพบว่า accessory domain เหล่านี้ มีลำดับการจัดเรียงตัวอยู่บนโมเลกุลของโคติเนสที่แตกต่างกัน เช่น ChiB มี ChBD อยู่ปลายด้านคาร์บอกซี Chi60 มี N-terminal domain อยู่ที่ปลายด้านอะมิโน ChiA1 มี FnIIID 2 โดเมน และ ChBD อยู่ที่ปลายด้านคาร์บอกซี และ ChiRN1 มี FnIIID และ ChBD อยู่ที่ปลายด้านคาร์บอกซี ดังนั้นจึงคาดว่า accessory domain เหล่านี้ อาจจะมีผลต่อการกำหนดขนาดผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์

และเมื่อพิจารณาโครงสร้างของ Chi60 ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็น dimer อย่างเดียว กับโครงสร้างของ ChiRN1 ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็น monomer ผสม dimer จะเห็นว่า Chi60 มี N-terminal domain อยู่ทางด้านหน้า และ CatD อยู่ทางด้านหลัง ซึ่งในการเกิด hydrolysis สับสเตรตจะวิ่งเข้ามาใน active site ของ CatD โดยจะวิ่งเข้ามาทาง N-terminal domain ก่อน แล้วจึงเข้ามาที่ CatD เมื่อเกิด hydrolysis แล้ว เอนไซม์ก็จะปล่อยผลิตภัณฑ์ออกไป (รูปที่ 1.8) แต่ว่าในกรณีของ ChiRN1 ที่มี CatD อยู่ทางด้านหน้า ส่วน FnIIID และ ChBD อยู่ทางด้านท้าย เมื่อเกิด hydrolysis คาดว่าสับสเตรตก็จะเคลื่อนที่เข้าไปใน CatD ในทิศทางลักษณะเดียวกับที่เคลื่อนที่เข้าไปยัง CatD ของ Chi60 เช่นเดียวกัน เนื่องจากมีโครงสร้างและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ใช้จับกับสับสเตรตอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน แต่ทว่า การที่มี FnIIID และ ChBD มาอยู่ทางด้านท้าย จึงคาดว่า 2 โดเมนนี้อาจจะไปหน่วงการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เคลื่อนที่ไปบนสับสเตรตได้ช้าลง จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น monomer ผสม dimer ดังนั้น เพื่อทดสอบสมมติฐานนี้ จึงได้ออกแบบสร้างโคติเนสลูกผสมขึ้น โดยนำส่วน FnIIID และ ChBD ของ ChiRN1 มาต่อเข้าทางด้านท้ายโมเลกุลของ Chi60 โดยคาดว่า โคติเนสลูกผสมที่สร้างได้ จะย่อยสับสเตรตแล้วให้อัตราส่วนระหว่าง monomer และ dimer เปลี่ยนแปลงจาก Chi60 เดิม

ในการสร้างโคติเนสลูกผสม เราทำโดยนำส่วนของ FnIIID และ ChBD ของเอนไซม์ ChiRN1 มาต่อเข้ากับเอนไซม์ Chi60 ที่มีส่วนของ N-terminal domain และ CatD อยู่แล้ว ดังนั้นลำดับเอนไซม์ลูกผสมที่เราสร้างจะมีลำดับโดเมนที่เรียงจากปลายด้านอะมิโนดังนี้ คือ N-terminal domain, CatD, FnIIID และ ChBD ตามลำดับ โดยเราคาดว่า การที่มี FnIIID และ ChBD มาต่อเพิ่มบนโมเลกุลของ Chi60 น่าจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยมีอัตราส่วนระหว่าง monomer กับ dimer เปลี่ยนไปจากเดิม แต่เมื่อเราทำการสร้างโคติเนสลูกผสมและทดลองเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-CC ที่มี ampicillin 100 mg/ml แล้ว เปรียบเทียบกับ Chi60 และ ChiRN1 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน (รูปที่ 3.34) พบว่าเอนไซม์ลูกผสมสร้างวงใสรอบโคโลนีช้าและน้อยกว่า

Chi60 และ ChiRN1 มาก น่าจะเป็นเพราะว่าโดเมนที่เราเพิ่มเข้าไปบน Chi60 อาจทำให้การม้วนพับของเอนไซม์เปลี่ยนไป และส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์ Chi60, ChiRN1 และโคติเนสลูกผสม มาทำ SDS-PAGE และย้อมแอกติวิตีเพื่อดูขนาดของโปรตีน เราไม่สามารถพบแถบแอกติวิตีของ Chi60 และโคติเนสลูกผสม บนเจล SDS-PAGE ได้ อาจจะเป็นเพราะว่าเอนไซม์ Chi60 และโคติเนสลูกผสมไม่สามารถ refold บน SDS-PAGE ได้ แต่ว่าเอนไซม์ ChiRN1 สามารถ refold กลับมาได้เป็นปกติ จึงยังคงพบแถบแอกติวิตีบนเจล SDS-PAGE อยู่ ซึ่งก็ยังคงให้แถบแอกติวิตี 3 แถบเช่นเดิม

เมื่อนำเอนไซม์ลูกผสมมาย่อยสับสเตรตแล้วนำไปหาขนาดของผลิตภัณฑ์โดยนำไปฉีด HPLC เราพบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังคงเหมือนกับขนาดผลิตภัณฑ์จากการย่อยด้วย Chi60 (ภาคผนวก ง) เช่นเดิม คือได้เป็น chitobiose เพียงอย่างเดียว ดังนั้นโดเมน FnIID และ ChBD ที่เราเพิ่มเข้าไปบน Chi60 ไม่สามารถทำให้อัตราส่วนระหว่าง monomer กับ dimer เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 สามารถผลิตไคติเนสที่ทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง ตั้งแต่ pH 6 -10 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง pH ที่เป็นเบส และมีแอกติวิตีสูงในช่วงอุณหภูมิ 50 - 60°C สับสเตรตที่ไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* RN01 สามารถย่อยได้ดีที่สุดจะเป็นพวก soluble substrate รองลงมาเป็น amorphous substrate และ crystalline substrate ตามลำดับ เมื่อนำมาหาขนาดโมเลกุลโดยย้อมแอกติวิตีบนเจล SDS-PAGE จะพบแถบแอกติวิตีของไคติเนส มีขนาดโมเลกุล 70, 66 และ 58 kDa โดยขนาดที่เล็กกว่าคาดว่าเป็น proteolytic product ของขนาด 70 kDa ผลิตภัณฑ์ที่ไคติเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01 ย่อยได้ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็น monomer และ dimer ผสมกัน โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด dimer เป็นผลิตภัณฑ์หลัก

จากการโคลนไคติเนส (ChiRN1) จาก *Bacillus licheniformis* RN01 พบว่ายีนที่โคลนได้มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1964 นิวคลีโอไทด์ สามารถแปลรหัสพันธุกรรมออกมาเป็นกรดอะมิโนได้ 598 กรดอะมิโน ซึ่งมีขนาดประมาณ 66,134 ดาลตัน (Da) คำนวณค่า isoelectric point เท่ากับ 5.17 เมื่อนำไคติเนส ChiRN1 มาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน พบว่า ChiRN1 ทำงานได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ pH 6 – 10 และในช่วงอุณหภูมิ 60 – 70°C โดย ChiRN1 สามารถย่อยสับสเตรตประเภท soluble substrate ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ amorphous substrate และ crystalline substrate ตามลำดับ ขนาดโมเลกุลของ ChiRN1 ที่โคลนได้ควรจะมีขนาดประมาณ 66 kDa แต่เมื่อดูจากทำ SDS-PAGE แล้วย้อมแอกติวิตี เราพบแถบแอกติวิตี ที่มีขนาด 70, 66 และ 58 kDa โดยแถบที่มีขนาดเล็กกว่าคาดว่าเป็น proteolytic product ของขนาด 70 kDa และเมื่อนำผลิตภัณฑ์จากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์ ChiRN1 มาฉีด HPLC พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็น monomer และ dimer ผสมกัน โดยมีผลิตภัณฑ์หลักมีขนาดเป็น dimer เช่นเดียวกับไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* RN01

จากการเปรียบเทียบโครงสร้าง 3 มิติ และลำดับของกรดอะมิโนของไคติเนสชนิดต่าง ๆ พบว่า ไคติเนสจะมี catalytic domain เป็นโดเมนหลักสำหรับเร่งปฏิกิริยา hydrolysis และอาจจะมี accessory domain อื่น ๆ เช่น chitin-binding domain และ fibronectin type III-like domain เสริมขึ้นมาเพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ซึ่ง accessory domain เหล่านี้พบว่ามีการจัดเรียงตัวอยู่บนเอนไซม์ในตำแหน่งต่าง ๆ กัน โดยคาดว่า accessory domain เหล่านี้อาจจะมีส่วนในการกำหนดขนาดผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์

ในการสร้างไคติเนสถูกผสมโดยมีโครงสร้างหลักเป็นไคติเนสจาก Chi60 แล้วนำเอาโดเมน FnIID และ ChBD ของ ChiRN1 มาต่อเพิ่มเข้าไป พบว่าไคติเนสถูกผสมมีแคติวิตีลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับ Chi60 ตัวเดิม โดยคาดว่า FnIID และ ChBD ที่เพิ่มเข้าไ้ไปนั้นอาจจะไปรบกวนประสิทธิภาพการทำงานและการจับตัวของเอนไซม์ อีกทั้งยังไม่ทำให้อัตราส่วนระหว่าง monomer และ dimer ของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- (1) Muzzarelli, R. A. A. 1977. *Chitin*. Pergamon Press, Oxford, England.
- (2) Tracey, M. V. 1957. Chitin. *Rev Pure Appl Chem*. 7: 1-14.
- (3) Kramer, K., and Koga, D. 1986. Insect chitin. *Insect Biochem*. 16: 851-877.
- (4) Blackwell, J. 1988. Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. *Method Enzymol*. 161: 435-442.
- (5) Rudall, R. M. 1963. The chitin/protein complexes of insect cuticles. In: Beament, J.W.L, Treherne, J.E., and Wigglesworth, V.B., editors. *Advances in insect physiology*. London, New York: Academic Press. pp 257-313.
- (6) Subasinghe, S. 1995. The development of crustacean and mollusca industries for chitin and chitisan resources. In: Zakaria, M.B., Wan Muda, W.M., Abdullah, M.P., editors. *Chitin and Chitosan*. Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan. pp 27-34.
- (7) Struszczyk, H., Pospieszny, H., and Kotlinski, S. 1988. Some new applications of chitosan in agriculture, *Chitin and Chitosan: Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London. 733-742.
- (8) Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., and Jeon, Y-J. 1999. Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science & Technology*. 10, 37-51.
- (9) Hirano, S., Hayashi, M., Nishida, T., and Yamamoto, T. 1988. Chitinase activity of some seeds during their germination process, and its induction by treating with chitosan and derivatives, *Chitin and Chitosan: Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London. pp 743-747.
- (10) Hirano, S., Hayashi, M., and Okuno, S. 1996. Cellular response of cultured soybean calli and seeds to chitin and chitosan, *Chitin and chitosan: Proceedings of the 2nd Asia Pacific Symposium*, Bangkok. pp188-192.
- (11) Boonkerd, N., Chandkrachang, S., and Stevens, W. F. 1996. Effect of chitin on nodulation and N₂ fixation rhizobia-soybean symbiosis, *Chitin and Chitosan: Proceedings of the 2nd Asia Pacific Symposium*, Bangkok. pp 183-187.
- (12) H. K. and Meyers, S. P. 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan. *J. Aquatic Food Prod Technol*. 4: 27-52.

- (13) Hirano, S. 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. 48: 732-734.
- (14) Watkins, T. R. and Knorr, D. 1983. In vivo dye binding of chitin and its effect on gerbil growth and gut function. *Nutrition Reports International*. 27: 189-197.
- (15) Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E., and Zikakis, J. P. 1981. Chitin: new facets of Research. *Science*. 212: 749-753.
- (16) Hirano, S. 1996. Chitin biotechnology applications. *Biotechnology Annual Review*. 2: 237-258.
- (17) Flach, J., Pilet, P. E., and Jolles, P. 1992. What's new in chitinase research? *Experientia*. 48: 701-716.
- (18) Trudel, J. and Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 208: 74-79.
- (19) Reissig, J. L., Strominger, J. I., and Ieloir, L. F. 1995. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem*. 270: 956-966.
- (20) Aiba, S. 1994. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitosans. *Carbohydr Res*. 267: 297-306.
- (21) Jolles, P. and Muzzarelli, R. A. A. 1999. Chitin and Chitinases, Birkhäuser Verlag, Basel.
- (22) Boller, T. 1985. Cellular molecular and Molecular Biology of Plant Stress. Alan R. Liss Inc., New York.
- (23) Henrissat, B. and Bairoch, A. 1997. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J*. 293: 781-788.
- (24) Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, J., Wilson, K. S. and Vorgias, C. E. 1994. Crystal structure of a bacteria chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*. 2: 1169-1180.
- (25) Terwisscha van Scheltinga, A. C., Armand, S., Kalk, K. H., Lsogai, A., Henrissat, B. and Dijkstra, B. W. 1995. Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*. 34: 15619-15623.
- (26) Roey, P. V., Rao, V., Plummer, T. H. and Tarentino, A. 1994. Crystal structure of endo- β -N-acetyl-giucosaminidase F1, an α/β -barrel enzyme adapted for a complex substrate. *Biochemistry*. 33: 13989-13996.

- (27) Rao, V., Guan, C. and Roey, P. V. 1995. Crystal structure of endo- β -N-acetylglucosaminidase H at 1.9 Å resolution: active site geometry and substrate recognition. *Structure*. 3: 449-457.
- (28) Ohno, T., Aemand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M. and Watanabe, T. 1996. A molecular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J. Bacteriol.* 178: 5056-5057.
- (29) Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, J., Wilson, K. S., and Vorgias, C. E. 1994. Crystal structure of a bacteria chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*. 2: 1169-1180.
- (30) Watanabe, T., Kobori, K., Fujii, T., Sakai, M., Uchida, M., and Tanaka, H. 1993. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J. Biol Chem.* 268: 18567-18572.
- (31) Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B., and Petratos, K. 2001. High resolution structure analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry*. 40: 11338-11343.
- (32) Watanabe, T., Ito, Y., Yamada, T., Hashimoto, M., Sekine, S. and Tanaka, H. 1994. The Roles of the C-Terminal Domain and Type III Domains of Chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in Chitin Degradation. *J. Bacteriol.* 176: 4465-4472.
- (33) Shiro, M., Ueda, M., Kawaguchi, T., and Arai, M. 1996. Cloning of a cluster of chitinase genes from *Aeromonas* sp. no. 10S-24. *Biochim. Biophys. Acta.* 1305: 44-48.
- (34) Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., and Ohmiya, K. 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* 179: 7306-7314.
- (35) Hashimoto, M., Ikegami, T., Seino, S., Ohuchi, N., Fukada, H., Sugiyama, J., Shirakawa, M., and Watanabe, T. 2000. Expression and Characterization of the Chitin-Binding Domain of Chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Bacteriol.* 182: 3045-3054.

- (36) Watanabe, T., Ishibashi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Sugiyama, J., Matsumoto, T. and Nonaka, T. 2001. Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by *Bacillus circulans* chitinase A1. *FEBS Letters*. 494: 74-78.
- (37) Hardt, M. and Laine, R. A. 2004. Mutation of active site residues in the chitin-binding domain ChBD_{ChiA1} from chitinase A1 of *Bacillus circulans* alters substrate specificity: use of a green fluorescent protein binding assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 426: 286-297.
- (38) Ikegami, T., Okada, T., Hashimoto, M., Seino, S., Watanabe, T., and Shirakawa, M. 2000. Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *J. Biol. Chem.* 275: 13654-13661.
- (39) Jee, J. G., Ikegami, T., Hashimoto, M., Kawabata, T., Ikeguchi, M., Watanabe, T., and Shirakawa, M. 2002. Solution structure of the fibronectin type III domain from *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *J. Biol. Chem.* 277: 1388-1397.
- (40) Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Ohnishi, K., and Tanaka, H. 1992. Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* chitinases and class III plant chitinases. *J. Bacteriol.* 174: 408-414.
- (41) Wang, S.-Y., Wu, S.-J., Thottappilly, G., Locy, R.-D. and Singh, N. K. 2001. Molecular cloning and structural analysis of the gene encoding *Bacillus cereus* exochitinase Chi36. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 59-66.
- (42) Connell, T. D., Metzger, D. J., Lynch, J., and Folster, J. P. 1998. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the *eps*-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 180: 5591-5600.
- (43) Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. and Watanabe, T. 2001. Roles of the Exposed Aromatic Residues in Crystalline Chitin Hydrolysis by Chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. *J. Biol. Chem.* 276: 41343-41349.
- (44) Brurberg, M. B., Nes, I. F. and Eijsink, V. G. 1996. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*. 142: 1581-1589.
- (45) Watanabe, T., Ariga, Y., Sato, U., Toratani, T., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Kezuka, Y., Nonaka, T. and Sugiyama, J. 2003. Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin. *Biochem J.* 376: 237-244.

- (46) Yabuki, M., Kasai, Y., Ando, A., and Fujii, T. 1984. Rapid method of converting fungal cells into protoplast with a high regeneration frequency. *Exp. Mycol.* 8: 386-390.
- (47) Sundheim, L., Polawsky, A. R., and Ellingboe, A. H. 1998. Molecular cloning of two chitinase genes from *Serratia marcescens* and their expression in *Pseudomonas* species. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 33: 481-491.
- (48) Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K., and Ishido, Y. 1987. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochem Biophys Acta.* 923: 302-309.
- (49) Romaguera, A., Menge, U., Breves, R., and Diekmann, H. 1992. Chitinases of *Streptomyces olivaceoviridis* and significance of processing for multiplicity. 174: 3450-3454.
- (50) Skujins, J. J., Potgieter, H. J., Alexander, M. 1965. Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and β -(1,3)-glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 358-364.
- (51) Lysenko, O. 1976. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *J. Invert. Pathol.* 27: 385-386.
- (52) Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., and Tanaka, H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* 172: 4017-4022.
- (53) Nawani, N. N. and Kapadnis, B. P. 2001. One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. *J. Appl. Microbiol.* 90: 803-808.
- (54) Ueda, M., Fujiwara, A., Kawaguchi, T., and Arai, M. 1995. Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp. 10S-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2162-2164.
- (55) Chanpen, W., Siwayaprahm, P., and Bhumiratana, A. 1999. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. *J. Current Microbiology.* 39: 134-140.
- (56) Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B., and Watanabe, T. 1999. The third chitinase gene (ChiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacteria chitinases. *Biochem. J.* 343: 587-596.

- (57) Takiguchi, Y. and Shimahara, K. 1989. Isolation and Identification of a Thermophilic Bacterium Producing N, N'-Diacyetylchitobiose from Chitin. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1537-1541.
- (58) Takayanagi, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y., and Shimahara, K. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1078, 404-410.
- (59) Tsujibo, H., Hatano, N., Endo, H., Miyamoto, K., and Inamori, Y. 2000. Purification and Characterization of a Thermostable Chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and Cloning of the Encoding Gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 96-102.
- (60) Tsujibo H., Minoura, K., Miyamoto, K., Endo, H., Moriwaki, M., and Inamori, Y. 1993. Purification and Properties of a Thermostable Chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Biosci. Applied and Environmental Microbiology.* 59, 620-622.
- (61) Gomes, R. C., Sêmedo, L. T. A. S., Soares, R. M. A., Linhares, L. F., Ulhoa, C. J., Alviano, C. S., and Coelho, R. R. R. 2001. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology.* 90, 653-661.
- (62) Ruldeekulthamrong, P. 2001. Design of DNA primers for chitinase gene cloning from *Bacillus licheniformis* PR-1. Master thesis, Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- (63) Kudan, S. 2001. Chitinase from thermotolerant bacteria: enzyme characterization and gene cloning. Master thesis, Program in Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- (64) Kuttiyawong, K. 2001. Cloning and nucleotide sequencing of chitinase gene from *Burkholderia cepacia* TU09. Master thesis, Program in Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- (65) Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- (66) Sambrook, J. and Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- (67) Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., and Bottger, E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire gene. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Reserch*. 17: 7843-7853.
- (68) Imoto, T. and Yagishita, K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agr. Biol. Chem.* 35: 1154.
- (69) Trudel, J. and Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 208: 74-79.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

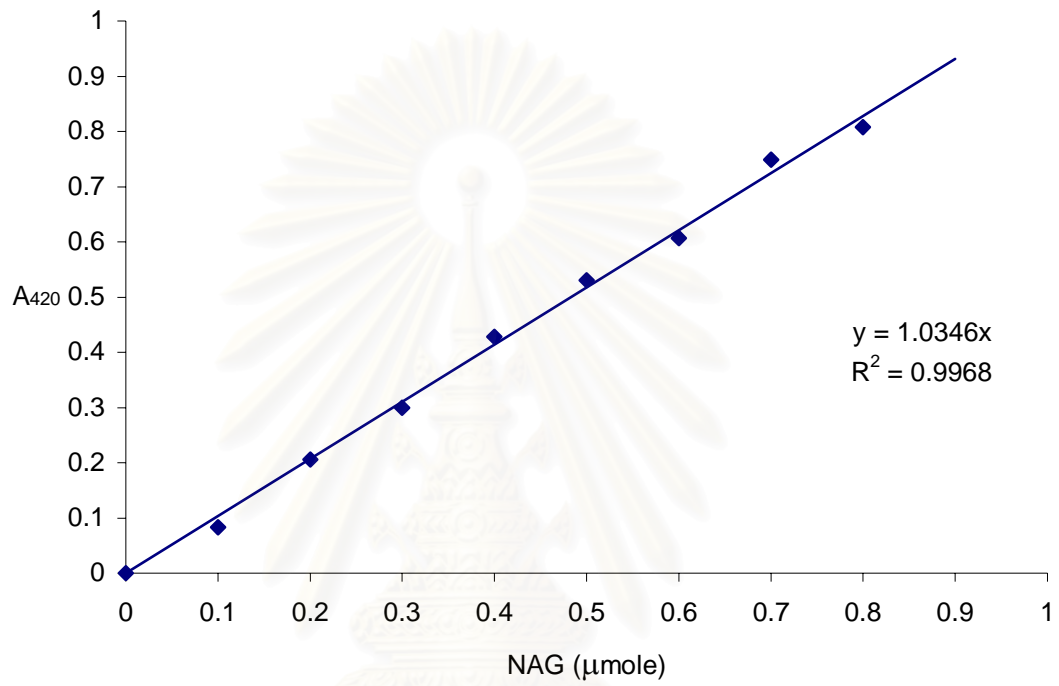
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การวัดแอกติวิตีของไคตินเอสด้วยวิธีของ Schale

การวัดแอกติวิตีของไคตินเอสจะทำโดยการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรตในหลอดทดลอง (ปรกติจะใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรต) ด้วยบัฟเฟอร์ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม ในปริมาตรทั้งหมด 1.5 ml โดยเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์และเวลาในการบ่มที่พอเหมาะ (20 - 60 นาที) ในการทำการทดลองจะแบ่งปฏิกิริยาออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกจะเป็นชุดควบคุม เราจะนำเอนไซม์ไปต้มฆ่าเอนไซม์ก่อนที่จะนำมาบ่มกับสับสเตรต ชุดที่ 2 เราจะนำเอนไซม์ที่มีแอกติวิตีอยู่มาบ่มกับสับสเตรตเลย จากนั้นจะนำทั้ง 2 ชุดมาหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย potassium ferric cyanide ลงไป 2 ml นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที เพื่อเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็น แล้วย้ายไป centrifuge ตกตะกอน colloidal chitin จากนั้นนำส่วนใสด้านบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm (A_{420}) นำค่า A_{420} ที่วัดได้จากชุดควบคุมมาลบกับชุดที่มีแอกติวิตี จากนั้นนำผลต่างที่ได้มาเทียบหาปริมาณ NAG ที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐาน NAG แล้วจึงนำมาคำนวณ หาแอกติวิตีของไคตินเอส โดยกำหนดให้หน่วย unit ของเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณ μmole ของ NAG ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้เอนไซม์ 1 ml ให้ทำงานเป็นเวลา 1 นาที

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน NAG



มีค่า slope = 1.0346

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

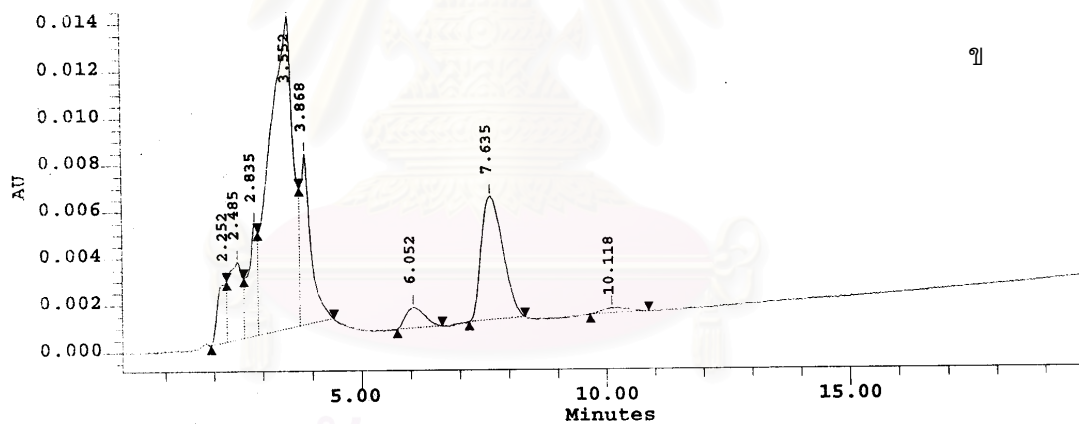
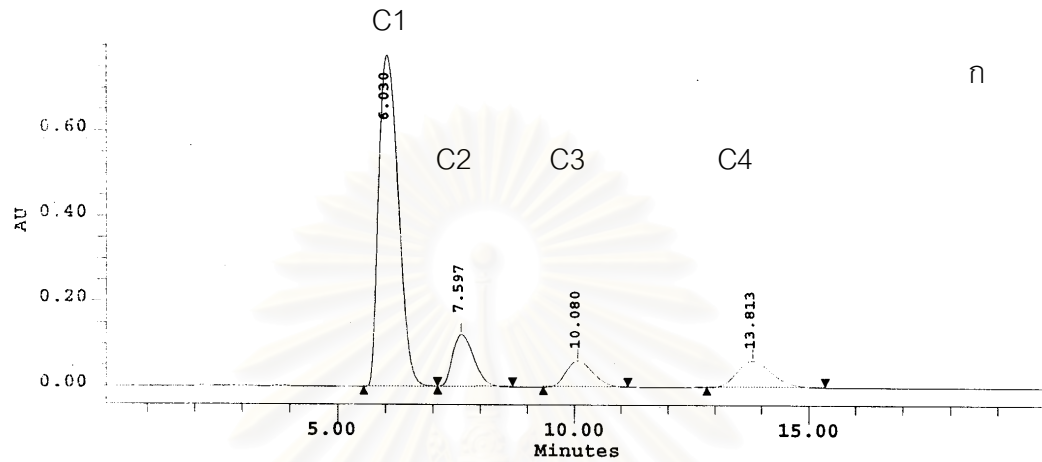
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *chi60*

CTGCAGAGTGTGGTGCAATCCTGATAAATATTTATCTTTCCTTAATAAAAAAATTCACTATCCATATTTG
 TCGTGCCTTCTTTTATTTATATTAAAATAAATTCACGCTTGCTGAATAAAACCCAGTTGATAGCGCTCTT
 GTTTTACGCCTTTTTTATTTATAGTCTGAATGTACGCGTGGGAATGATTATTTTCGCCACGTGGAAAAGA
 CACTGTTGCTATTTATTTGATTTTAATCTTCGAGGATTATTGCGGAATTTTTTCGCTTCGGCAATGCATCG
 CGACGATTAACCTTTTTATGTTTATCCTCTCGGAATAAAGGAATCAGTTATGCGCAAATTTAATAAACCG
 CTGTTGGCGCTGTTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCGCGCAGGCCGCGCGCCGGGCAAGCCGACCA
 TCGCCTGGGGCAATACCAAGTTCGCCATCGTTGAAGTTGACCAGGCGGCTACCGCTTATAATAGTTTGGT
 GAAGGTAAGATGCCGCCGATGTTTCGGTCTCCTGGAATTTATGGAATGGCGACACCGGTACGACGGCA
 AAAGTTTTATTAAATGGCAAAGAGGCGTGGAGCGGCCCTCAACCGGTTCTCCGGTACGGCGAATTTTA
 AAGTCAATAAAGGCGGCCGTTATCAAATGCAGGTGGCATGTGCAATGCCGACGGCTGCAGCGCCAGCGA
 CGCCACCGAAATTTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTTGGCGCGTTGAAAGAGCCGCTGCTGGAA
 AAGAATAAACCGTATAAACAGAACTCCGGCAAAGTCTGTCGGTTCTTATTTTCGTCGAGTGGGGCGTTTACG
 GGCGCAATTTACCGTTCGACAAGATCCCGCGCAGAACCCTGACCCACCTGCTGTACGGCTTTATCCCGAT
 CTGCGCGCGCAACGGCATCAACGACAGCCTGAAAGAGATCGAAGGCAGCTTCCAGGCGCTGCAGCGCTCC
 TGCCAGGCGCGGAGGACTTCAAAGTCTCGATCCACGATCCGTTCCGCGCGCTGCAAAAAGCGCAGAAGG
 GCGTTACCGCTGGGATACCCCTACAAGGGCAACTTCGGCCAGCTGATGGCGCTGAAACAGGCGCATCC
 TGACCTGAAAATTCGCGCTCGATCGGCGGCTGGACGCTGTCGACCCGTTCTTCTTCATGGGCGATAAG
 GTGAAGCGCGATCGCTTCGTCGGTTCGGTGAAAGAGTTCTTCGACACCTGGAAGTTCTTCGATGGCGTGG
 ATATCGACTGGGAGTTCCCGGGCGGCAAAGCGCCCAACCCGAACCTGGGCAGCCCGCAGGACGGGGAAAC
 CTATGTCTGCTGATGAAGGAGCTGCGGGCGATGCTGGATCAGCTGTGCGCGGAAACCGGCCGCAAATAT
 GAACTGACCTCCGCCATCAGCGCGGCAAGGACAAGATCGATAAGGTGGCTTACAACGTTGCGCAGAACT
 CGATGGATCACATCTTCTGATGAGCTACGACTTCTATGGCGCTTCGATCTGAAGAACCTGGGGCATCA
 GACCGCGCTGAATGCGCCGGCCTGGAAGCCGGACACCGCTTACACCACGTTGAACGGCGTCAATGCGCTG
 CTGGCGCAGGGCGTCAAGCCGGGCAAGATCGTGGTCCGGCACCGCCATGTATGGCCGCGGCTGGACCGGGG
 TGAACGGCTACCAGAACAACATTCCGTTACCCGGTACCGCCACTGGGCCGTTCAAAGGCACCTGGGAGAA
 CGGCATCGTGGACTACCGCAAATCGCCGGCCAGTTTCATGAGCGCGAGTGGCAGTATACCTACGACGCC
 ACGGCGGAAGCGCCTTACGTGTTCAAACCTTCCACCGCGATCTGATCACCTTCGACGATGCCCGCTCGG
 TGCAGGCCAAAGGCAAGTACGTGCTGGATAAGCAGCTGGGCGGCCTGTTCTCCTGGGAGATCGACGCGGA
 CAACGGCGATATCTCAACAGCATGAACGCCAGCCTGGGCAACAGCGCCGCGTTCATAAATCGGTTGCA
 GTGCGTTGCCGGGGGATATCCTTTTCGCCCCCGGCTTTTTTCGCCCGCGAAAGTTTTTTTTACGCCGCACAGA
 TTGTGGCTCTGCCCGGAGCAAAAACGCGCTCATCGGACTCACCTTTTTGGGTAATCCTTCAGCATTTCTCTC
 CTGCTTTAACGGCGATCACAATAAACCCTTCAGATAATTCATCATTACGCAACAAAGTTTTGGCGTTT
 TTTAACGGAGTTAAAAACCAGTAAGTTTGTGAGGTTTACAGCAATGCGCTAAAAATGGCCGCTTAGCATA
 AATTTTCATGCTGGAACGTAAACAAAAGGTTTTTTTTATGTTTGTGTTGCTGTTTCTCACAGTCTGCGTA
 AATCCCCACTGGTTATATGACGACACCCCAAACAGTTGGCAACTTGATAGCCTCAGGGGTAAGAGCGAG
 AGTTGTTGAGTGAATTCACGCGCTCAGACGTCCCGCGCGGATGCGTTCATCCGGCATCTCTTCTC
 GTACGCTTCTGCCTTCGGGCGCGATCGCACAGGCCACGCAATAAAAAATACAGGTCTGGCGGCAATTA
 CACACATCACATCACAAATGGAGCACTAACGATGACACGTTCTTGGGTAAATCGGGGATCTGAAAT
 CGGTATTGGGCTGATCGGCTGACCGTGGCGGCCAGCTACAGGCCAAGACGTTGTTTTACTGTTCTGAA
 GGTTCGCCGGAAGGTTCAACCCGAGCTGTTTACCTCCGGCACCACTATGACGCCAGCTCGGTACCAA
 TCTACAACCGGCTGGTCAATTCAAGACCGGCACCACCGAGCTGCAG

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ Chi60 ที่หาโดยการฉีด HPLC



ก คือ chromatogram ของ chito-oligosaccharide มาตรฐาน โดย C1 คือ GlcNAc, C2 คือ $(\text{GlcNAc})_2$, C3 คือ $(\text{GlcNAc})_3$, และ C4 คือ $(\text{GlcNAc})_4$.

ข คือ ขนาดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย colloidal chitin ด้วยเอนไซม์ Chi60

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสุรเกตุ เนาสราญวงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 24 พฤศจิกายน พ.ศ. 2522 สำเร็จการศึกษา ระดับชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนกรุงเทพคริสเตียนวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2544 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา ในสาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย