



## รายงานการวิจัย

การค้นหาเปปไทด์ที่จำเพาะต่อแป้งมันสำปะหลังและไคติน โดยใช้เทคโนโลยีการแสดง  
โปรตีนบนผิวฟาจ

**Isolation of peptide specific to cassava starch and chitin from phage displayed  
peptide library**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว





## รายงานการวิจัย

การค้นหาเปปไทด์ที่จำเพาะต่อแป้งมันสำปะหลังและไคติน โดยใช้เทคโนโลยีการแสดง  
โปรตีนบนผิวฟาจ

**Isolation of peptide specific to cassava starch and chitin from phage displayed  
peptide library**

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑารพ ยมาภย์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๕๑

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม/๒๕๕๕

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๕๐ ผู้วิจัยขอขอบคุณ Mr. Feisal Khoushab นักศึกษามหาบัณฑิต จากประเทศอิหร่าน ที่ได้เริ่มทำการวิจัยเรื่องนี้ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ และนักวิจัยหลังปริญญาเอกอีก ๒ ท่านคือ ดร. นันทนิจย์ จารุเสรณี และ ดร. วราภรณ์ ตัณฑนุช ที่ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมต่อจาก Feisal จนทำให้มีผลงานเพียงพอในการตีพิมพ์ได้ รวมทั้งขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน เป็นอย่างดี

## บทคัดย่อ

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจในการคัดหาได้เพียงเส้นเปปไทด์ที่จำเพาะต่อโคติน แต่ไม่สามารถหาเปปไทด์ที่จับกับแป้งได้ ทั้งนี้เนื่องจาก ธรรมชาติของแป้งและโคตินนั้นเป็นรูปพหุสามารถจับกับเฟจแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้เป็นจำนวนมาก จนทำให้ไม่สามารถคัดแยกเฟจที่จับอย่างจำเพาะออกมาได้ เมื่อทำการคัดหา (biopanning) ในหลอดทดลองแบบต่างๆ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยสามารถหาวิธีการตรึงโคตินให้อยู่บนจาน ELISA ได้ในปริมาณเพียงพอจนสำเร็จ จึงทำให้สามารถคัดหาเฟจที่แสดงเปปไทด์ที่มีขนาดความยาว ๑๒ กรดอะมิโน ที่จับกับโคตินได้ เรียกเปปไทด์นั้นว่า ChiBP จากนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อแสดงความสามารถในการใช้เปปไทด์ในการทำพันธกิจของวัสดุชีวภาพ โดยได้แก่การแสดงความสามารถในการจับกับเม็ดโคตินแล้วทำให้เม็ดเหี่ยวลง การเชื่อม ChiBP เปปไทด์กับอนุภาคไฮดรอกซีอะลิวมินาไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปจับกับเม็ดโคติน และท้ายที่สุดได้แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่คัดหามาได้ สามารถชักนำให้โคติน ในรูปแบบ คอลลอยด์ และ โคตินสัณฐานขนาดมหึมา รวมตัวเป็นแผ่นบางเคลือบบนผิวพลาสติกได้ เมื่อให้ความร้อนที่ ๘๒ องศาเซลเซียส โดยการสังเกตจากภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจในการคัดหาเปปไทด์ต่อเป้าหมายหลากหลายชนิด รวมทั้งเปปไทด์ที่จำเพาะต่อโคตินที่คัดหามาได้จากการทดลองนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเชิง นาโนเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง เพราะโคตินเป็นวัสดุชีวภาพที่มีศักยภาพทางเทคโนโลยีอย่างหลากหลาย ทั้งการแพทย์ เกษตร และสิ่งแวดล้อมความสำเร็จของการแสดงได้จากการที่ผลงานวิจัยนี้ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ต้องผ่านการประเมินของผู้ทรงคุณวุฒิ และได้ทำการยื่นขอสิทธิบัตรของเปปไทด์ไปแล้วด้วย

## ABSTRACT

We were able to isolate a peptide specific to chitin, but not starch. This was because of the nature of chitin and starch that are porous and can trap large amount of non-specific binder phage, after various methods of *in vitro* biopanning have been done. Fortunately, we were able to develop a method for immobilizing of chitin in wells of microtiter plate, therefore a chitin-binding peptide from a 12-mer random peptide library was successfully isolated. The potential of using the selected chitin targeting peptide to functionalize biomaterial were demonstrated. The synthetic chitin binding peptide (ChiBP) could bind to chitin beads and disrupt their structure. This selected peptide was successfully used to immobilize alkaline phosphatase on chitin. In addition, the peptide could induce colloidal chitin in water to form a chitin coat on the surface of plastic tubes. Scanning electron microscopy (SEM) revealed that the peptide could induce colloidal chitin and chitohexaose to form networks when the temperature was raised to 42°C. The outcome of this research clearly demonstrates that phage display technology is one of the most powerful techniques for selecting specific peptides for a wide variety of targets. In addition this peptide can be used for various applications in nanobiotechnology because chitin is a biopolymers that have applications in agricultural, medical and environmental fields. The success of this project was evident as a publication in peer-review international journal as well as an application for a national patent.

## สารบัญ

<b>บทนำ</b>	<b>2</b>
ความเป็นมา	2
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตการวิจัย	3
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	3
<b>เนื้อเรื่อง</b>	<b>5</b>
การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	5
เอกสารอ้างอิง	6
วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการทดลอง	7
<b>ข้อวิจารณ์</b>	<b>16</b>
<b>สรุป และข้อเสนอแนะ</b>	<b>17</b>
<b>ภาคผนวก</b>	<b>18</b>
ก. การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการจากโครงการวิจัยนี้	18
ก.๑ การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มี peer review (impact factor 2.444)	18
ก.๒ การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ	18
ก.๓ การผลิตบัณฑิต	18
<b>ประวัตินักวิจัย</b>	<b>19</b>
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้	19

## บทนำ

### ความเป็นมา

ในปัจจุบันงานวิจัยด้านนาโนเทคโนโลยี เป็นงานวิจัยที่ได้รับความนิยมและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ในประเทศไทยมีวัสดุหลากหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของวัสดุนาโน เช่น แป้งมันสำปะหลัง ไคติน ไคโตซาน เป็นต้น แป้งมันสำปะหลังเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีปริมาณมากในประเทศไทย หากพัฒนาให้สามารถใช้เป็นวัสดุนาโนได้ในอนาคต จะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรของไทย นอกจากนี้แล้วขยะเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการส่งออกอาหารทะเลแช่แข็ง พบว่ามีไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่มาก ถ้าหากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ จะช่วยลดปริมาณขยะและเป็นการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่อย่างคุ้มค่า โดยเฉพาะไคติน ซึ่งได้รับความสนใจในแง่ที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตสารสำคัญทางการแพทย์ เครื่องสำอาง[1] และสารอาหารชนิดต่างๆ ดังนั้นหากสามารถหาเปปไทด์ที่สามารถจับกับวัสดุทางชีวภาพเหล่านี้ได้อย่างจำเพาะเจาะจง จะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มศักยภาพในการทำพันธกิจ (functionalization) ของวัสดุทางชีวภาพต่างๆ เพื่อการประยุกต์ใช้ในงานเชิงนาโนเทคโนโลยีชีวภาพได้อย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เทคโนโลยีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการคัดหาเปปไทด์ที่สามารถมีอันตรกิริยากับวัสดุชีวภาพ คือเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จึงจะได้นำเทคโนโลยีนี้มาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มศักยภาพในการทำพันธกิจของวัสดุชีวภาพ โดยเลือกวัสดุชีวภาพ ๒ อย่าง คือแป้งมันสำปะหลัง และ ไคติน เพราะหาได้ง่ายและมีราคาถูก อย่างไรก็ตามเทคนิคการคัดหาเปปไทด์ (biopanning) ที่จับจำเพาะกับวัสดุที่ไม่ใช่โปรตีนนั้นทำได้ยาก เพราะไม่สามารถยึดติดกับพลาสติกบนจาน ELISA ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการทำ biopanning สำหรับวัสดุชีวภาพที่ไม่ใช่โปรตีนมาก่อน จากนั้นจึงจะได้ออกแบบเพื่อแสดงความสามารถในการนำเปปไทด์ที่คัดหาได้ไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยและพัฒนาทางนาโนเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

### วัตถุประสงค์

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักคือ การค้นหาเปปไทด์ที่มีความสามารถจับกับแป้งมันสำปะหลังและไคตินได้อย่างจำเพาะ เพื่อนำวัสดุทั้งสองชนิดไปใช้作为วัสดุชีวภาพในงานวิจัยและพัฒนาทางนาโนเทคโนโลยีชีวภาพ ต่อไป แบ่งเป็นวัตถุประสงค์ย่อยได้ดังนี้

1. พัฒนาเทคนิคในการค้นหาเปปไทด์ ที่สามารถจับกับวัสดุอื่น ที่ไม่ใช่โปรตีน
2. แสดงศักยภาพในการนำเปปไทด์ที่ได้ซึ่งเป็นวัสดุนาโน ไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยและพัฒนาทางนาโนเทคโนโลยีชีวภาพ

## ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้คลังของเปปไทด์บนฟาจที่ได้สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยหลัก มาค้นหาเปปไทด์ที่มีความสามารถจับกับแป้งมันสำปะหลังและโคตินอย่างจำเพาะเจาะจง

## ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเป็นเทคโนโลยีที่มีศักยภาพสูงในการคัดเลือกลำโพงโปรตีนซึ่งเป็นโมเลกุลในระดับนาโน ที่มีความสามารถในการมีอันตรกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจงต่อโมเลกุลหลากหลายประเภท โดยสามารถผลิตโปรตีนขนาดต่างๆ ตั้งแต่ เส้นเปปไทด์ที่มีความยาวเพียง 7 กรดอะมิโน ไปจนถึงโปรตีนที่มีขนาดใหญ่และซับซ้อนเช่น แอนติบอดี หรือเอ็นไซม์ โดยเปปไทด์หรือโปรตีนที่มีโครงสร้างต่างกันเป็นจำนวนมาก ( $10^{6-11}$ ) จะถูกเก็บรวบรวมไว้ในคลังของฟาจ จากนั้นนักวิทยาศาสตร์สามารถทำการคัดเลือกลำโพงโปรตีนที่สามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการอย่างเฉพาะเจาะจงโดยการทำการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคที่ง่าย ภายในเวลาอันรวดเร็ว เมื่อได้เปปไทด์หรือโปรตีนที่ต้องการแล้วก็สามารถสกัดเอ็นเอที่ควบคุมการสร้างเปปไทด์หรือโปรตีนนั้นๆ แล้วนำไปผลิตให้ได้เป็นจำนวนมากหรือปรับเปลี่ยนให้มีคุณสมบัติพิเศษอื่นๆ ตามต้องการได้ ด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้เทคโนโลยีนี้เป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวาง โดยในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้านั้นมีคลังของฟาจที่แสดงเปปไทด์ และแอนติบอดีส่วนที่มีหน้าที่จับกับแอนติเจน (อาจเรียกได้ว่า นาโนบอดี) ที่มีคุณภาพดี ทั้งที่ข้าพเจ้าได้สร้างขึ้นเองและได้มาจากบริษัท จึงมีความพร้อมที่จะใช้ในการคัดหา ทั้งแอนติบอดี และเปปไทด์ที่สามารถประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เทคโนโลยีชีวภาพนาโนหลายประเภท

ในโครงการวิจัยที่เสนอมานี้ ข้าพเจ้าจะทำการคัดเลือกเปปไทด์ จากคลังของฟาจที่ได้สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการโดยการคัดเลือกและศึกษาเปปไทด์ที่มีความสามารถในการจับกับวัสดุนาโนชนิดต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นาโนที่มีคุณสมบัติเลียนแบบธรรมชาติ (biomimetics)<sup>2</sup> ดังที่กล่าวข้างต้นนั้นจะสามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาเป็นวัสดุนาโนที่มีศักยภาพสูงต่อไป รวมทั้งยังสร้างให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ทางด้านนี้เพิ่มขึ้นอีกด้วย

การค้นหาเปปไทด์ โดยวิธีคัดเลือกจากเปปไทด์ที่แสดงบนฟาจ เป็นวิธีหนึ่งในการศึกษาโปรตีนที่สามารถจับกับโปรตีนเองหรือวัสดุอื่นๆ ซึ่งมีรายงานการค้นหาเปปไทด์ที่สามารถจับกับวัสดุที่ไม่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตมากมาย ทั้งสารกึ่งตัวนำ โลหะประเภทต่างๆ เช่น เงิน ทอง ไททาเนียม แพทตินัม เป็นต้น [13,14] และมีรายงานการใช้ การแสดงโปรตีนบนฟาจ โดยทำการแสดงเอ็นไซม์อิมโมเลส เพื่อค้นหาเอ็นไซม์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ โดยใช้แป้งเป็นตัวคัดเลือกเอ็นไซม์ [15] ดังนั้น การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนฟาจ ในการค้นหาเปปไทด์ต่อแป้งมันสำปะหลังและโคติน จะมีประโยชน์ในการพัฒนาวัสดุนาโนด้วยเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

## วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยทั้งหมดเป็นลักษณะการปฏิบัติการในห้องทดลอง ห้องปฏิบัติการที่ใช้คือห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส) รวมทั้งอุปกรณ์

และเครื่องมือของศูนย์เครื่องมือของ มทส โดยจะนำคลังของเปปไทด์ที่แสดงบนฟาจที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการมาใช้ในการค้นหาเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ

### ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

1. การขยายปริมาณคลังของฟาจที่แสดงเปปไทด์ โดยนำคลังของเปปไทด์มาเพิ่มปริมาณ โดยเลี้ยงกับแบคทีเรีย *E. coli* K12 F' เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วจึงปั่นเพื่อแยกคลังของเปปไทด์ที่ได้ เก็บไว้ใช้ต่อไป
2. การค้นหาเปปไทด์ที่มีความสามารถจับกับแป้งมันสำปะหลังและไคติน อย่างจำเพาะเจาะจง เริ่มจากตรึงแป้งมันสำปะหลังและไคติน แล้วจึงเติมคลังของเปปไทด์ เพื่อคัดเลือกตามวิธีมาตรฐานตามที่อ้างอิงจากเอกสาร [6] โดยทำการคัดเลือก 3 รอบ เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจง จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบคุณสมบัติการมีอันตรกิริยา ( affinity และ specificity) โดยวิธี ELISA
3. การหาลำดับของกรดอะมิโนที่แสดงบนฟาจที่สามารถจับกับแป้งมันสำปะหลังและไคติน เริ่มจากการแยกพลาสมิดออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นจึงทำการหาลำดับเบส โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ แล้วจึงวิเคราะห์หาลำดับของกรดอะมิโนที่แสดงบนฟาจ

## เนื้อเรื่อง

### การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจ และได้รับการพัฒนาเป็นอย่างดีในช่วงเวลา 10 กว่าปีที่ผ่านมา ทั้งนี้เป็นเพราะเทคโนโลยีนี้มีข้อเด่นที่สำคัญคือสามารถคัดเลือกได้ทั้งยีนและโปรตีนจากยีนนั้น ที่มีความสามารถในการมีอันตรกิริยา (interaction) ที่ต้องการได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยใช้วิธีการคัดเลือกความสามารถในการจับกับสารเป้าหมาย (target) ที่สะดวกและรวดเร็ว ภายในห้องทดลอง (*in vitro*) [2] โปรตีนที่กล่าวมานี้อาจเป็นเปปไทด์ (peptide) เส้นสั้นๆ หรือโปรตีนขนาดต่างๆกันตั้งแต่ความยาว 10-500 กรดอะมิโน รวมทั้งแอนติบอดีประเภทต่างๆ [3] ดังนั้นจึงพบว่าได้มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในการศึกษาการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนหลายประเภท เช่น การจับกันของเปปไทด์กับโปรตีนโดเมนชนิดต่างๆ หรือการใช้เป็นแหล่งคลังของ cDNA เพื่อใช้ในการค้นหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา [4] คลังของฟาจที่แสดงเปปไทด์เส้นสั้นๆยังถูกใช้เป็นแหล่งในการหาตัวกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ เปปไทด์เส้นสั้นๆที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการพัฒนา ยา (drug lead) ต่อไปได้ [5, 6]

การแสดงออกของโปรตีนบนฟาจ สามารถทำได้โดยใช้เทคโนโลยีพื้นฐานทางการตัดต่อยีนและทางชีวจุลินทรีย์ ในการเชื่อมต่อโปรตีนที่ต้องการกับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผิวฟาจ (capsid) เปปไทด์หรือโปรตีนที่มีความหลากหลายจำนวนมาก ซึ่งถูกถอดรหัสมาจากสายนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) นี้จะเชื่อมอยู่กับส่วนปลายทางด้านอะมิโน (N-terminus) ของโปรตีนหลักที่ชื่อ pVIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 2500 ชิ้น หรือโปรตีนรองชื่อ pIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 5 ชิ้น บนผิวของฟาจของแบคทีเรีย (bacteriophage) ชนิด M13, fi หรือ fd

คลังของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีความแตกต่างกันเป็นจำนวนมากคือประมาณ  $10^8$  -  $10^{11}$  ชนิด สามารถถูกสร้างขึ้น โดยการนำเวกเตอร์จำนวนมากที่ได้ถูกตัดต่อขึ้นใส่ลงไป (transform) แบคทีเรีย *E. coli* โดยวิธีการผ่านทางกระแสไฟฟ้า (electroporation) นับตั้งแต่เทคโนโลยีนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นได้มีการตีพิมพ์ผลงานจำนวนมากที่แสดงความสำเร็จ ในการประยุกต์ใช้คลังของฟาจที่แสดงเปปไทด์ที่มีความหลากหลายสูงที่มีความยาวตั้งแต่ 6-43 กรดอะมิโน ในงานวิจัยด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง [7,8-12]

มีรายงานจำนวนมากที่ได้แสดงถึงความสำเร็จในการคัดเลือกเปปไทด์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายชนิดต่างๆ เช่น แอนติบอดี, รีเซปเตอร์บนผิเซลล์ โปรตีนภายในเซลล์ และเอ็นไซม์ ชนิดต่างๆ [11] ซึ่งเปปไทด์ที่ได้รับการคัดเลือกมาเหล่านี้จะนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการพัฒนา ยาต่อไป [11]

## เอกสารอ้างอิง

1. Rachel C-K and Ilan C. **The molecular biology of chitin digestion.** *Current Option in Biotechnology.* 1998,**9**:270-277.
1. Smith GP: **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** *Science* 1985, **228**:1315-1317.
2. Kay BK, Winter G, McCarthy BJ (eds.): *Phage Display of Peptides and Proteins*, 1 edn. San Diego: Academic Press; 1996.
3. Rodi DJ, Makowski L, Kay BK: **One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies.** *Curr Opin Chem Biol* 2002, **6**:92-96.
4. Kay BK, Hamilton PT: **Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries.** *Comb Chem High Throughput Screen* 2001, **4**:535-543.
5. Kay BK, Kasanov J, Yamabhai M: **Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries.** *Methods (Duluth)* 2001, **24**:240-246.
6. Winter G, Milstein C: **Man-made antibodies.** *Nature* 1991, **349**:293-299.
7. Chames P, Baty D: **Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **189**:1-8.
8. Clark M: **Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'?** *Immunol Today* 2000, **21**:397-402.
9. Gavalondo JV, Larrick JW: **Antibody engineering at the millennium.** *Biotechniques* 2000, **29**:128-132, 134-126, 138 passim.
10. Baca M, Presta LG, O'Connor SJ, Wells JA: **Antibody humanization using monovalent phage display.** *J Biol Chem* 1997, **272**:10678-10684.
11. Vaughan TJ, Osbourn JK, Tempest PR: **Human antibodies by design.** *Nat Biotechnol* 1998, **16**:535-539.
13. Sarikaya M, Tamerler C, Jen A. K, Schulten K and Baneyx F: **Molecular biomimetics: nanotechnology through biology.** *Nature Materials* 2003, **2**: 577-585.
14. Kriplani U and Kay BK: **Selecting peptides for use in nanoscale material using phage-displayed combinatorial peptide libraries.** *Current option in Biotechnology* 2005, **16**: 470-475.
15. Verhaert RMD, Beekwilder J, Olsthoorn R, Duin JV and Quax WJ: **Phage display selects for amylases with improved low pH starch-binding.** *Biotechnology* 2002, **96**: 103-118.

## วิธีการดำเนินการวิจัย และ ผลการทดลอง

*การทำการคัดหาเฟจ (biopanning) ที่จับกับแบ็ง และโคตินอย่างจำเพาะเจาะจง ด้วยวิธีการทั่วไป*

วิธีการทำ biopanning ทำตามวิธีการมาตรฐานสำหรับการคัดหาเฟจจากคลังเปปไทด์ [5] แต่เนื่องจากไม่สามารถตรึงแบ็ง หรือ โคติน ลงบนจาน ELISA ได้เหมือนกับโปรตีน จึงมีความจำเป็นต้องทำการคัดหาโดยการผสมเฟจ กับแบ็ง หรือโคติน ที่อยู่ในสภาพสารแขวนลอย แล้วปั่นแยกออกจากเฟจที่ไม่จับกับแบ็ง หรือโคติน โดยการปั่นตกตะกอน แล้วล้างเฟจที่จับอย่างไม่จำเพาะที่อยู่ในส่วนของเหลวใสด้านบนออก อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบคือ มีเฟจที่จับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงจำนวนมากที่ติดมากับโคติน และแบ็ง เพราะสารทั้งสองมีลักษณะเป็นพูน ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่สามารถทำการคัดแยกเฟจที่จับกับสารทั้ง ๒ อย่างเจาะจง ออกจากเฟจที่จับอย่างจำเพาะได้ไม่ว่าจะได้ทำการปรับเปลี่ยนปัจจัยในการทำ biopanning อย่างไร ทั้ง ปริมาณสารและคลังที่ใช้ อุณหภูมิที่ใช้ในบ่ม จำนวนครั้ง และสถานะในการล้างเฟจออก ทั้งอุณหภูมิ ระยะเวลาบ่มและความแรงในการเขย่าระหว่างล้าง รวมทั้งสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการล้าง รวมทั้งภาวะในการบรรจุวัสดุ ทั้งหลอดพลาสติกขนาดเล็ก (microcentrifuge tube, immunotube) และ วิธีการ biopanning แบบ column chromatography

ทั้งนี้รายละเอียดเกี่ยวกับ ปัจจัยต่างๆ ในการทำ biopanning นั้น สามารถหาได้จาก รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง การศึกษาคุณสมบัติด้านอันตรกิริยาของโดเมน SH3 ในโปรตีน อินเตอร์เซกติน และโดเมน ENTH โดยใช้เทคโนโลยีการแสดงออกของเปปไทด์ หรือ โปรตีนบนผิวเฟจ (Identification and characterization of peptide ligand preferences of Intersectin SH3 and ENTH domains by phage display technology / มณฑารพ ยมาภัย และ อุฬยวรรณ์ อุสันสา ๒๕๔๔ ซึ่งเก็บอยู่ที่ ฝ่ายบริการความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เลขที่ รว. 000132 2544 Barcode 0000000859905

อย่างไรก็ตามในขณะที่อยู่ในระหว่างพยายามทำการหาวิธีในการทำ biopanning นั้น ผู้วิจัยได้ค้นพบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับวิธีการในการตรึงโคตินบนจาน ELISA โดยการตรึง chitosan ก่อน จากนั้นจึงทำการเติมกลุ่มอะเซททิล (acetylation) แต่วิธีการในรายงานวิจัยนั้น ได้ปริมาณ โคตินน้อยเกินไป ไม่เพียงพอสำหรับการทำ biopanning ผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับเปลี่ยนสถานะ และความเข้มข้นของโคโตซานตั้งต้น จนสามารถตรึงในปริมาณมากพอ จนทำให้สามารถทำการ biopanning ได้สำเร็จ สามารถคัดหาเปปไทด์ที่สามารถจับกับโคติน อย่างจำเพาะเจาะจงได้ รายละเอียดทั้งหมดของ วิธีการทดลอง และผลการวิจัย ได้ถูกนำไปตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ที่ต้องผ่านการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิอย่างเข้มข้น ซึ่งเป็นวารสารที่เน้นเกี่ยวกับงานวิจัยทางด้าน วัสดุชีวภาพ และ นาโนเทคโนโลยี โดยเฉพาะคือ International Journal of Biological macromolecule เรียบร้อยแล้วดังนี้คือ

Khoushab F, Jaruseranee N, Tanthanuch W, Yamabhai M. Formation of chitin-based nanomaterials using a chitin-binding peptide selected by phage-display. Int J Biol Macromol. 2012; 50, 1267-74.

(8 หน้า)

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac)

## International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijbiomac](http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac)

## Formation of chitin-based nanomaterials using a chitin-binding peptide selected by phage-display

Feisal Khoushab<sup>a,1</sup>, Nanthnit Jaruseranee<sup>a,1</sup>, Waraporn Tanthanuch<sup>b</sup>, Montarop Yamabhai<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Phage Display Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Thailand

<sup>b</sup> Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Thailand

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 January 2011

Received in revised form 21 March 2012

Accepted 22 March 2012

Available online 30 March 2012

## Keywords:

Phage display

Peptide

Chitin

Nanomaterial

Nanobiotechnology

## ABSTRACT

Targeting polymers with peptides is an efficient strategy to functionalize biomaterials. Phage display technology is one of the most powerful techniques for selecting specific peptides for a wide variety of targets. A method to select a chitin-binding peptide from a 12-mer random peptide library was successfully performed against chitin immobilized in wells of microtiter plates. The synthetic chitin binding peptide (ChiBP) could bind to chitin beads and disrupt their structure. This selected peptide was successfully used to immobilize alkaline phosphatase on chitin. In addition, the peptide could induce colloidal chitin in water to form a chitin coat on the surface of plastic tubes. Scanning electron microscopy (SEM) revealed that the peptide could induce colloidal chitin and chitohexaose to form networks when the temperature was raised to 42 °C.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chitin, a poly- $\beta$ -1,4-*N*-acetylglucosamine (GlcNAc), is one of most abundant biopolymers in nature, because it is the main component of the exoskeleton of arthropods, such as insects, arachnids and crustaceans, and is a structural polysaccharide in fungal cell walls [1,2]. It is a cheap renewable biomaterial that is biocompatible, biodegradable and bio-absorbable with antibacterial, wound-healing and immuno-modulating activities; consequently there have been many reports on its biotechnological applications in various fields [3]. Recent research in nanomaterial sciences has suggested potential roles for chitin and its derivatives in the emerging field of nanobiotechnology, which relies on non-specific interactions with chitin [4–10]. Therefore, identifying a method to harness chitin properties, such as assembly, recognition and specificity, will greatly enhance the functionality of this cheap biopolymer. Peptides have been shown to be an effective means to functionalize biomaterials [11]. Selections of various combinatorial phage display peptide libraries have been used to identify peptides that bind to a wide range of inorganic materials and nanostructures [12]. However, so far, there have been no studies on the selection of

short peptides that binds to chitin polymers. This is the first study on the identification of chitin binding peptides from affinity selection of a phage display 12-mer random peptide library. Biopanning procedures, the structure of chitin binding peptides (ChiBP) and their interactions with chitin are reported. In addition, we also demonstrated the potential of using this peptide as an efficient strategy to functionalize chitin, which could be developed in the future for use as nanoparticles for drug delivery, surface coating or scaffold for tissue engineering.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Immobilization of chitin onto a 96-well plate

Three hundred milligrams of chitosan (product number 417963,  $\geq 75\%$  degree of deacetylation (DDA), Sigma–Aldrich) were dissolved in 50 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.0). Dissolution occurred slowly and was facilitated by putting the material in a capped plastic 50-ml centrifuge tube and rocking at low speed on a rotating platform overnight at room temperature. The resulting material was diluted 1:10 in 0.1 M acetic acid (pH 5.0), and 125- $\mu$ l aliquots (6  $\mu$ g) were added into each well of a 96-well microtiter plate (Nunc, Denmark). Following the addition of 35  $\mu$ l of acetic anhydride, the plate was placed in a fume hood and allowed to dry overnight. The wells were then filled with 1x phosphate-buffered saline (PBS) (4 mM KCl, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.14 M NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2), which was replaced a few minutes later with 200  $\mu$ l of the same buffer containing 2% skimmed milk at 37 °C for

\* Corresponding author at: Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. Tel.: +66 44 224152-4/224388; fax: +66 44 224150.

E-mail addresses: [montarop@sut.ac.th](mailto:montarop@sut.ac.th), [montarop@gmail.com](mailto:montarop@gmail.com) (M. Yamabhai).

<sup>1</sup> These authors contributed equally.

1 h. This neutralized the surface and blocked nonspecific adsorption sites from remaining in the wells. Following removal of this solution, the plates were ready to use in the next step of the biopanning process. Three wells of three microtiter plates were treated in this way. Plate 1 was used in the first round of biopanning, while Plates 2 and 3 were used for the second and third round of biopanning, respectively.

## 2.2. Biopanning of chitin binding peptide

Three rounds of biopanning were undertaken with chitin that had been immobilized in wells of microtiter plates according to a previously published protocol [13]. Briefly, each well was washed three times with PBST (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20) before adding 25  $\mu$ l of the 12-amino acid-long random peptide library (SUT12,  $\sim 10^{10}$  pfu) in 125  $\mu$ l of PBST, and incubating at room temperature for 2 h. The wells were then washed five times with PBST, and the bound phages were eluted by adding 50  $\mu$ l of 50 mM glycine-HCl, pH 2.0. Solutions were then neutralized with 200 mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 7.5). The eluted phages were amplified by infecting a log-phase *Escherichia coli* K12F', before being subjected to the second round of biopanning. The eluted phages from the second round of biopanning were used directly for the third round without overnight amplification. After three round of biopanning, individual phage clones were isolated to confirm their specific bindings using Phage ELISA. The phage display library of a random peptide was constructed by cloning DNA inserts assembled from synthetic degenerate oligonucleotides (NN(G/T)<sub>12</sub>) into an M13 vector, such that the random peptides were expressed as N-terminal fusions to the M13 minor coat protein pIII. The complexity of the library is  $\sim 10^9$  members [14].

## 2.3. Phage ELISA

Chitin was coated onto triplicate wells of microtiter plate as described in the previous section. The wells were washed three times with PBST, and then 200  $\mu$ l of each culture supernatant containing individual phage clones was added into the appropriate wells. Following incubation at room temperature for 1 h, the wells were washed five times with PBST. To detect the bound phage, 100  $\mu$ l of a 1:5000 dilution of horseradish peroxidase (HRP)-anti-M13 in PBST was added into each well and the plate was incubated at room temperature for 1 h. After that, the wells were washed five times with PBST, and then 100  $\mu$ l of 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) substrate containing 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added into each well. After a 20-min incubation, the optical density (OD) at 405 nm on each well was measured with a microtiter plate reader (TECAN, Austria GmbH).

## 2.4. Binding assay on chitin beads

Two hundreds microliters of 50% slurry of chitin beads (catalog number S6651S, New England Biolab) in a microcentrifuge tube were centrifuged at 4000 rpm for 30 s, and the supernatant was discarded. The beads were then washed with de-ionized water five times before incubation, and with 2% skimmed milk for 1 h to block non-specific binding. After that, the beads were washed three times with 1x PBS (137 mM NaCl 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), following which 200  $\mu$ l of culture supernatant containing individual phage was added. After overnight incubation at 4 °C, the beads were washed five times with 1xPBS before the bound phages were detected by adding 200  $\mu$ l of 1:5000 HRP-anti-M13 and incubated for 1 h at room temperature. After washing three times with PBST, 150  $\mu$ l of ABTS-0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to the tubes and incubated at room temperature for 20 min before the chitin beads were

spun down and the supernatants were taken to measure an OD at 405 nm.

To determine the binding of free peptides, 100  $\mu$ l of 0.5 mM N-terminal biotinylated peptides (ChiBP3 or Control peptide) was incubated with 100  $\mu$ l of the chitin beads that had been blocked with 2% skimmed milk in a micro-centrifuge tube. After incubation for 2 h at room temperature, the beads were washed five times with TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween). Bound peptides were detected by adding 100  $\mu$ l of streptavidin-alkaline phosphates (SA-AP), followed by washing with TBST five times. Then, 100  $\mu$ l of p-NPP substrate (Sigma Fast TM) was added and incubated at room temperature for 20 min before the chitin beads were spun down and the supernatants were taken to measure an OD at 405 nm.

## 2.5. Construction and binding of alkaline phosphatase (AP) fusion peptides

Synthetic oligonucleotides encoding wild type and G  $\rightarrow$  R mutant ChiBP3 peptides were annealed to generate double strand DNA fragments containing appropriate 5' overhangs for cloning into the pKP300deltaIII expression vector that was pre-digested with *MfeI* and *SalI* restriction enzymes. The expression of peptide-AP fusions was under the control of a *phoA* promoter and could be induced by lowering the concentration of phosphate in the medium [15]. Integrity of the constructs was confirmed by automated DNA sequencing (Macrogen, Korea). AP-fusion peptides were collected from the cell lysate after induction for  $\sim 10$  h. Bound AP fusion-peptides were detected by using para-nitrophenylphosphate (p-NPP) substrate as described above.

## 2.6. Formation of macroscopic structure

### 2.6.1. Colloidal chitin and ChiBP3

A solution of colloidal chitin at a concentration of 5 mg/ml in water was prepared according to a previously published method [16]. One hundred microliters of this solution was mixed with 100  $\mu$ l of various concentrations of peptides, i.e., 1  $\mu$ g/ml (0.7  $\mu$ M), 100  $\mu$ g/ml (70  $\mu$ M), and 200  $\mu$ g/ml (140  $\mu$ M). They were placed in a thermomixer (Eppendorf), which had been set at 42 °C. After 15 h, the tubes containing the solution were taken and left at room temperature. The SEM images were taken after the samples were left at room temperature for 15 h.

### 2.6.2. Chitohexaose and ChiBP3

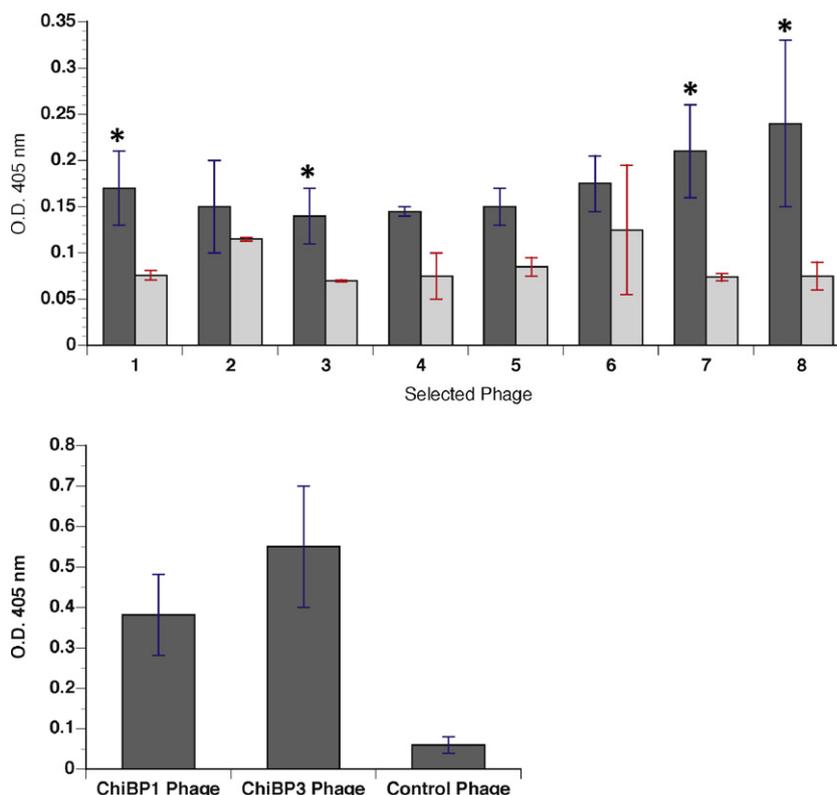
One hundred  $\mu$ l of 0.7  $\mu$ M (100  $\mu$ g/ml) ChiBP3 peptide in water and 100  $\mu$ l of 5  $\mu$ M chitohexaose (Seikagaku, Tokyo, Japan) in water were mixed and incubated at 42 °C for 15 h before being subjected to scanning electron microscopy (SEM) analysis.

## 2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

Glutaraldehyde was added to the samples for about 2 h before being removed. Samples were first washed by phosphate buffer and then by increasing the concentration of alcohol (ethanol, 30, 50, 70, 90, 95, and 100%, respectively). After putting the samples in critical point drying machine (CPD, samdri-PVT-3B, TOASIMIS CO), they were then coated with gold (JOEL, JFC-1100) in preparation for photomicrography by SEM; JEOL, JSM-6400.

## 2.8. FTIR spectroscopy

The ChiBP3 peptide was dissolved in distilled water at 10  $\mu$ g/ml. Its secondary structure was determined at different temperatures



**Fig. 1.** Specific binding of phage to chitin. Top panel: eight phages from the third round of biopanning were picked and tested for their binding to chitin by Phage ELISA, as described in Section 2. Triplicate wells of microtiter plate were coated with chitin (dark bar) or skimmed milk (light bar) and incubated with the selected phage. Phage clones that showed a binding signal two times higher than the control are indicated by an asterisk, and were subjected to DNA sequence analysis. Average  $OD_{405\text{ nm}}$  values are shown with standard error. Bottom panel: confirmation of specific binding of ChiBP1 and ChiBP3 phage clones was demonstrated using chitin beads. The control phage was the phage that was selected from the same library. Binding of the phage to chitin beads was detected immunologically with an anti-phage antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP), followed by colorimetric reaction with ABTS substrate. Average OD values at 405 nm are shown for duplicate tubes, along with standard error.

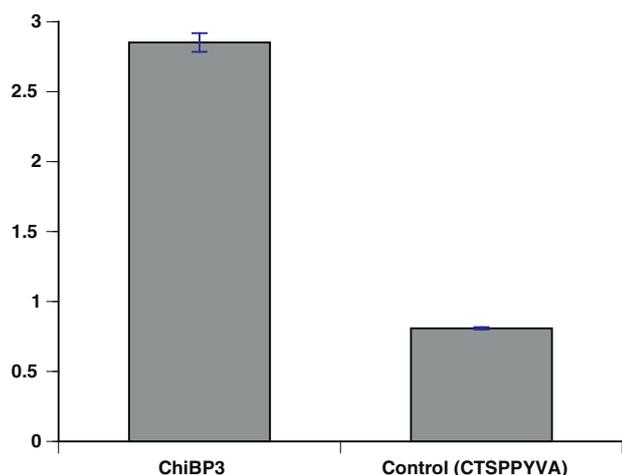
by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. The measurement was performed at the Synchrotron Light Research Institute (SLRI), Nakhon Ratchasima, Thailand, using a Bruker Vertex 70 FTIR spectrometer (Bruker Optics Inc., Ettlingen, Germany) equipped with a nitrogen cooled MCT (HgCdTe) detector over a measurement range of  $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ . The protein ChiBP3 solution was introduced in a sealed flow-through liquid cell AquaSpec (optical window: calcium fluoride, 4 mm thick) with  $7\text{ }\mu\text{m}$  path length, including a mount for a thermostat controlled at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . FTIR spectra were recorded with a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  and 64 scans. The peptide secondary structure was analyzed from the shape of the amide I band by non-linear regression fitting of Lorentzian and Gaussian peaks to the original spectra. Before curve-fitting was performed on the amide I band, a straight baseline passing through the ordinates at  $1760$  and  $1600\text{ cm}^{-1}$  was subtracted manually using scattering correction mode.

The best fit for decomposing the amide I band was obtained by Gaussian and Lorentzian components using OPUS 6.5 software (Bruker Optics Ltd., Ettlingen, Germany). The band position corresponding to the  $\alpha$ -helix structure was fixed at  $1656\text{ cm}^{-1}$ ; the  $\beta$ -sheet structures were fixed at  $1629\text{ cm}^{-1}$  and  $1693\text{ cm}^{-1}$ ; the  $\beta$ -turn structure was fixed at  $1668\text{ cm}^{-1}$  and  $1680\text{ cm}^{-1}$ ; and the random coil structures were fixed at  $1643\text{ cm}^{-1}$ . The curve fitting process was performed automatically until a satisfactory fit between the computed and experimental band was obtained. The percentages of these secondary structure components were calculated as the ratio of the corresponding peak areas to the total of the amide I peaks.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Affinity selection of chitin binding peptide

Target immobilization on solid support is the key step for biopanning of a phage display library. In this research, the first challenge was to find a method to immobilize chitin onto the wells of a microtiter plate. Previous work by Bernard et al. [17] has shown that simultaneous treatment of microtiter plates with chitosan, a deacetylated form of chitin, and acetic anhydride can produce a surface-bound film of chitin. However, we were not able to isolate any specific phage clone using the amount of immobilized chitin described by this method. Therefore, we have optimized the immobilizing protocol by increasing the amount of chitosan and acetic anhydride per well to  $6\text{ }\mu\text{g}$  and  $35\text{ }\mu\text{l}$ , respectively, as well as by increasing the time of drying from 12 to 18 h, under laminar flow. This method yielded a sufficient amount of immobilized chitin for successful affinity selection of specific chitin binding phage after three rounds of biopanning. The Phage ELISA result for eight selected phage clones from the third round of biopanning is shown in Fig. 1 (top panel). Four phage clones that showed binding signals two times higher than the background were selected for DNA sequence analysis. The amino acid sequences of the four clones are shown in Table 1. Clone 3 and clone 7 were the same clones as they have an identical DNA sequence. Clones 1 and 3 were selected for further analysis because they shared certain similarities, i.e. both were rich in glycine and glutamic acid, as well as amino acids that can provide salt bridges, such as glutamic acid, aspartate, and lysine.



**Fig. 2.** Binding of free ChiBP3 peptide to chitin beads. Biotinylated ChiBP3 peptide or control peptide (CTSPPYVA) was incubated with chitin beads in a microcentrifuge tube at 4 °C, overnight. Bound peptide was detected by colorimetric assay using streptavidin–alkaline phosphatase (SA–AP) followed by para-nitrophenyl phosphatase (pNPP) substrate. Average OD values at 405 nm are shown for duplicate tubes, along with standard error.

**Table 1**

Amino acid sequence of various peptides in this study.

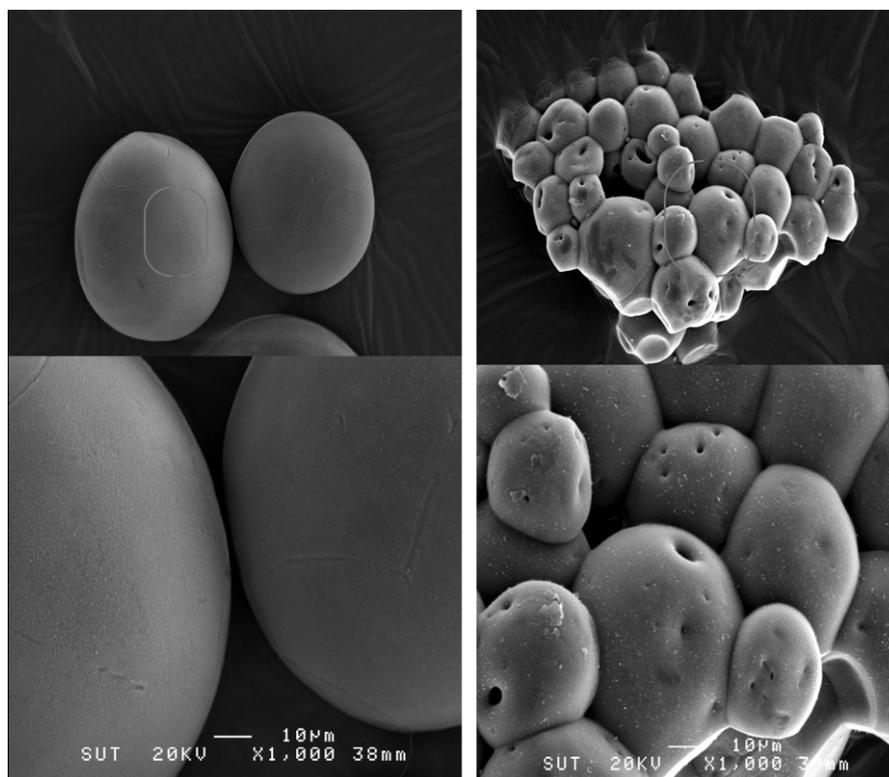
ChiBP1	GEVGEQEAKRVG
ChiBP3	EGKGVEAVGDGR <sup>a</sup>
ChiBP7	EGKGVEAVGDGR <sup>a</sup>
ChiBP8	AEPDATGWRS LG
mtCBP	EGKRVEAVGDGR
Control free peptide	CTSPPYVA
Control phage displayed peptide	EGVNKSGAQNIS

<sup>a</sup> These two clones are identical.

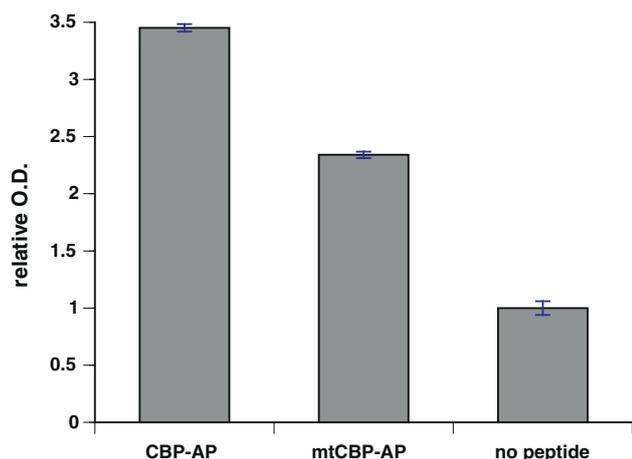
This is the first report on the selection of chitin binding peptides from a phage display peptide library. The reason for our success might be that a sufficient amount of chitin could be stably immobilized on a well of an ELISA plate, allowing simple biopanning on a microtiter plate, which is the most common and efficient method for performing affinity selection [13]. Immobilization of chitin as beads, which are not equal in size, tends to trap non-specific interaction, causing high background and retrieval of non-specific binders. Moreover, the main interaction between peptides and neutral sugars is one of hydrogen bonding, which is not a full-charge electrostatic interaction, and is therefore rather weak [18]. Previous biopanning attempts could only isolate peptide that interacted with chitotriose in an oxidized state. In that protocol, media including organic solvent were used in order to emphasize hydrogen bonding during the biopanning of a random 9-mer peptide library against chitotriose-agarose, packed in a column [18].

### 3.2. Specific binding of chitin binding peptide (ChiBP)

To confirm specific binding of selected phage clones to chitin, we performed binding experiments using chitin in different formats. Fig. 1 (lower panel) illustrates specific binding of phage displaying ChiBP1 and ChiBP3 to chitin beads when compared to the control, which was the non-binder phage selected from the same library against a non-related target (Table 1). The result clearly showed that only ChiBP1 and ChiBP3 phage clones could bind to chitin beads. In the next step, to demonstrate that the chitin binding activity of ChiBP is independent of the phage coating, we performed an experiment using a synthetic peptide. The ChiBP3 sequence was selected for this assay because it showed a higher binding signal and was selected twice from biopanning. As shown in Fig. 2, N-terminal biotinylated ChiBP3 showed specific binding to chitin beads when compared to a control peptide (CTSPPYVA), which was available in our laboratory. We would like to note that ChiBP3 is



**Fig. 3.** Shape of chitin beads. Scanning electron microscopy (SEM) images of chitin beads in the absence (left panel) or presence (right panel) of 50 µg/ml of chitin binding peptide (ChiBP3). The upper panel shows images at 350× magnification and the lower panel shows images at 1000× magnification. Magnifications are also shown in bars.



**Fig. 4.** Binding of alkaline phosphatase (AP)-fusion peptides. Crude *E. coli* lysate containing AP-fusions of chitin binding peptide ChiBP3 (CBP-AP) or G → R mutated peptide (mtCBP-AP) were incubated with chitin beads in a micro-centrifuge tube at 4 °C, overnight. Bound peptide was detected by colorimetric assay using paranitrophenyl phosphatase (pNPP) as substrate. Average OD values at 405 nm are shown for duplicate tubes, along with standard error.

hydrophilic and can be dissolved in water, whereas the control peptide had to be dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO); therefore, this experiment was performed in the presence of equal amounts of DMSO to rule out the possibility that DMSO could interfere with the binding.

To observe the effect of the peptide on chitin beads at a macro-molecular scale, scanning electron microscopy (SEM) was carried out. The result displayed in Fig. 3 shows that the ChiBP peptides could aggregate the beads and change their shape. We suspect that peptide could cross-link the beads and glue them together. Moreover, it might be able to self-assemble, strengthening the network of the beads. We suspect that the binding of the peptides might have disrupted the chitin organization of the beads, creating holes and leakage of the fluid from inside, and consequently shrunk them. Nevertheless, the actual mode of this interaction remains to be explored.

### 3.3. Binding of chitin binding peptide-AP fusion

To confirm specific binding of ChiBP3 peptide and to demonstrate its application in the functionalization of chitin nanomaterial, the wild type ChiBP3 peptide was fused to the N-terminal of bacterial alkaline phosphatase (AP) by a genetic engineering technique (CBP-AP), as described in the Materials and Methods section. In addition, a mutant ChiBP3 peptide, of which one glycine (G) was replaced with arginine (R), was also generated (see Table 1). G was a small non-polar amino acid that is abundant in the ChiBP3 peptide; whereas R is a relatively long, basic amino acid, and is likely to interfere with the interaction of the peptide with chitin. The chitin binding activities of wild type and mutant peptide-AP fusions were demonstrated on chitin beads, as shown in Fig. 4. *E. coli* cell lysates containing peptide-AP fusion were used directly in the binding experiment, as has been previously reported [15,19,20]. The OD<sub>405 nm</sub> of the AP fusion to wild type ChiBP3 peptide (CBP-AP) showed approximately 3.5 folds higher than the control (*E. coli* lysate expressing empty expression vector); whereas the binding signal of the G-R mutant, ChiBP3 (mtCBP-AP), decreased to ~30%. This result suggested that glycine plays a role in the interaction of ChiBP3 to chitin. In addition, it also indicated that this peptide could be used to functionalize chitin by fusion to various molecules.

**Table 2**

Effect of temperature on the secondary structure of ChiBP3 protein.

Conformational element	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Area (%)		
		4 °C	25 °C	42 °C
α-Helix	1656	16.1	17.3	18.2
β-Sheet	1629, 1693	27.5	26.0	23.6
Random coil	1643	15.6	14.7	13.4
β-Turn	1668, 1680	40.8	42.0	44.7

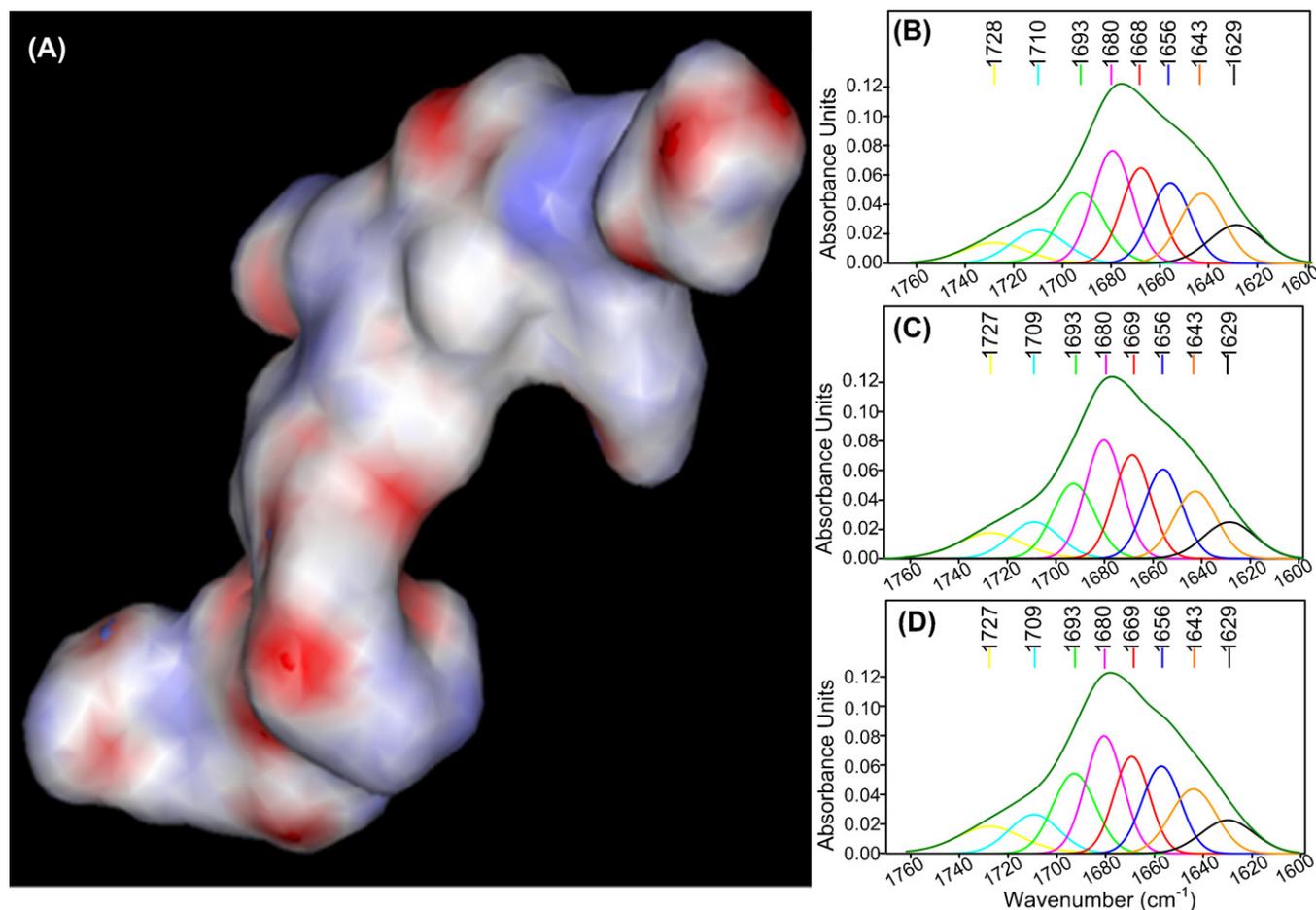
### 3.4. Analysis of chitin binding peptide

Amino acid sequence analysis of ChiBP3 revealed that the peptide has a molecular weight of 1173.25 and isoelectric point of 4.43. The peptide is acidic with a total charge of -1. To imagine the structure of this peptide, different programs were used, since there is no specific and precise program with high enough reliability to predict the secondary structure of such a short peptide. Analysis using Network Protein Sequence [21] indicated that both ends of the peptide have a coil structure, while its middle part has a sheet structure. By using information from this predicted secondary structure, an artistic impression of the peptide was drawn using ChemOffice and WebLab View software, as indicated in Fig. 5, left panel. This model was obtained after energy minimization and running a molecular dynamics (MD) simulation in an aqueous condition. We speculate that the acidic and basic charge residues at both ends of the peptide are responsible for electrostatic interaction with the chitin polymer. In addition, the acidic and basic residues might be able to make a salt bridge, which stabilizes the conformation of the peptide in solution; the peptide might therefore be able to self-assemble via the middle hydrophobic section [22,23].

In addition to computational analysis, secondary structure alteration of ChiBP3 protein under temperature change was determined by FTIR spectroscopy. The FTIR (amide I region) spectra and the Gaussian and Lorentzian curve-fitting of the amide I spectrum of the ChiBP3 protein at different temperature are shown in Fig. 5, right panel. The individual fitting bands are presented according to their assignments: α-helix, 1656 cm<sup>-1</sup>; the β-sheet, 1629 cm<sup>-1</sup>, and 1693 cm<sup>-1</sup>; the β-turn, 1668 cm<sup>-1</sup>, and 1680 cm<sup>-1</sup>. The two extra bands (1709 and 1727 cm<sup>-1</sup>) presented in the fitting curve can be ascribed to the C=O vibration of glutamic acid (two residues) and aspartic acid (one residue) in the peptide chain, and were thus not included in the protein secondary structure calculation. The result of this fit suggested that over 40% of ChiBP3 contains β-turn structure and ~27% of β-sheet, ~15% random coil, and approximately 16% of α-helix structure. This result was in accordance with the secondary structure predicted by Network Protein Sequence Analysis as described above, which indicated that the beta sheet was a dominant structure. The effect of temperature on the change of ChiBP3 secondary structure is presented in Table 2. The raising of α-helix structure was observed when the temperature was increased. The partial loosening of the β-sheet and random coil structure was detected when the temperature was increased from 4 °C to 42 °C. At 42 °C, the β-turn structure was increased significantly.

### 3.5. Peptide-induced surface coating of colloidal chitin

Specific interaction of ChiBP3 to chitin-coated wells and chitin beads from the previous experiments prompted us to test its activity on colloidal chitin, which is the cheapest form of chitin that can be dissolved in water [16]. We suspected that the peptide might be able to induce colloidal chitin to form a network, hence inducing it to form a coat over a specified surface. To test this hypothesis, a solution of 0.5% colloidal chitin in water was incubated overnight for 15 h at 42 °C with various concentrations of ChiBP3. Then, the tubes were laid down and the temperature was lowered to room



**Fig. 5.** Structure of chitin binding peptide ChiBP3. Left panel: the image of the ChiBP3 peptide was created using ChemOffice and WebLab View software [21]. The peptide comprises coil structures at both ends and a sheet structure in the middle. Charged residues are found at both ends, while its middle part mainly contains hydrophobic residues. Right panel: secondary structure analysis of ChiBP3 protein measured by FTIR at 4 °C (top), 25 °C (middle), and 35 °C (bottom) is shown. The original spectrum and the result of Lorentzian and Gaussian curve-fitting of the amide I spectrum of the ChiBP3 protein are presented in the coincident full line. The individual fitting bands are presented according to their assignments: 1656 cm<sup>-1</sup>:  $\alpha$ -helix; 1629 cm<sup>-1</sup> and 1693 cm<sup>-1</sup>:  $\beta$ -sheet; 1643 cm<sup>-1</sup>: random coil; 1668 and 1680 cm<sup>-1</sup>:  $\beta$ -turn.

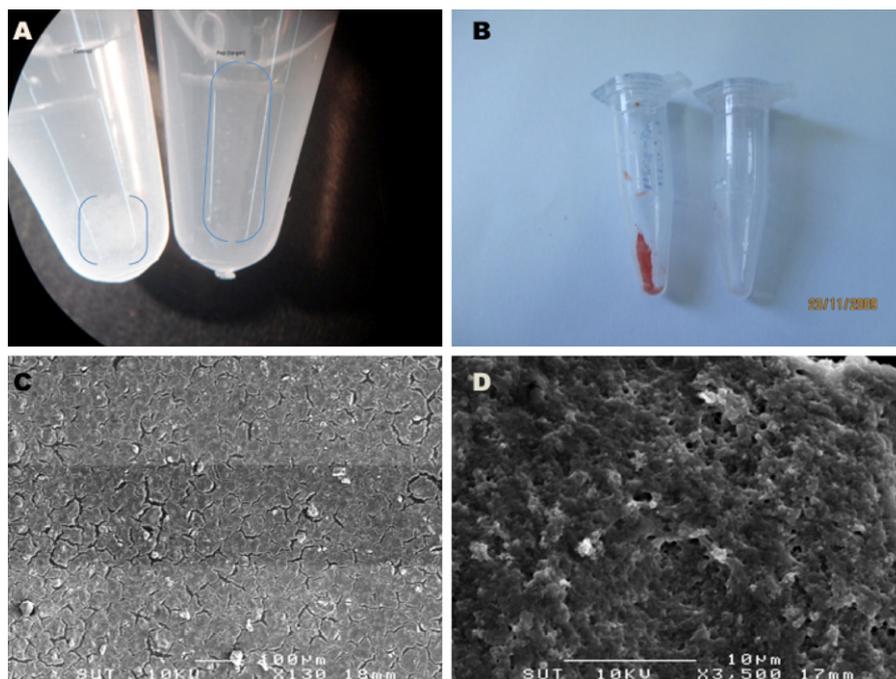
temperature. During this time, we observed a patch of chitin only on the side of the tube with  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$  peptide (Fig. 6A). After discarding the contents inside the tubes and adding Congo red solution, the chitin coat on the side of the tube could be clearly observed, as shown in Fig. 6B. Investigation of this chitin coat using SEM revealed that it appeared as a tightly packed porous structure (Fig. 6C and D), which is attractive for tissue engineering [2,5,24]. This result suggested that the peptide could be used to induce the formation of chitin coat on any desired surface. This strategy is simple, versatile and easy to modify. More importantly, no special solvent is needed; therefore, it might be applicable for numerous surface-coating purposes.

The rationale behind the above-mentioned experiment is based on observation of the biological self-assembly system of various types of peptides [25,26]. Zhang and Altman [27] suggest that there are three types of self-assembling peptides that have been engineered. Type I peptides undergo intermolecular self-assembly; Type II peptides undergo self-assembly and disassembly, i.e. intermolecular and intramolecular self-assembly under the influence of various conditions. Type III peptides undergo self-assembly onto surfaces [27]. Therefore, we propose that the ChiBP3 peptide is a Type II peptide that undergoes self-assembly and disassembly, i.e. intermolecular and intramolecular self-assembly under the influence of different temperatures. The 42 °C temperature used in this study was arbitrary. We suspected that by alleviating the temperature, the peptide would possess a structure that favors

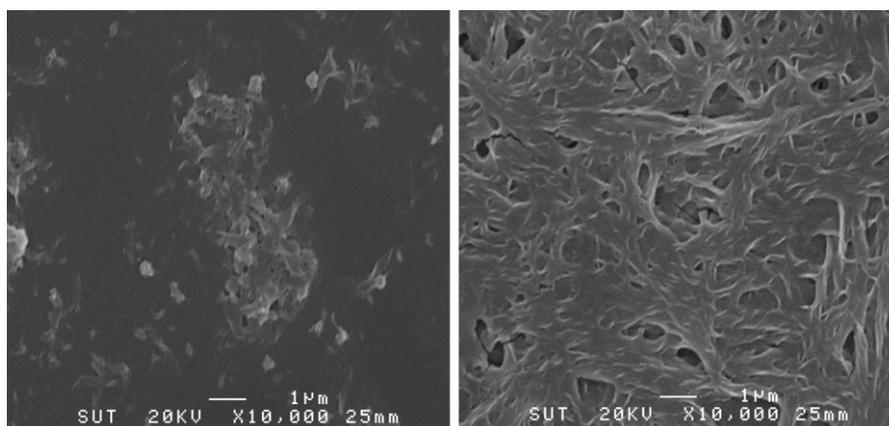
interaction with colloidal chitin and, upon cooling down, a patch of peptide–chitin network could be formed via cross-linking or self-assembly of the peptides. In fact, we found that the peptide could not induce chitin coat formation if the tube was left at room temperature without prior heating (data not shown). The actual mechanism of peptide-aided coating of colloidal chitin and the optimal conditions for forming desired coats must be further explored.

### 3.6. Formation of peptide–chitohexaose macromolecular network

In addition to chitin polymer, we also investigated the activity of the peptide on chito-oligosaccharide. ChiBP3 peptide was mixed with chito-hexamer in a similar fashion, as had been peptide and colloidal chitin in the previous experiment. After an overnight incubation at 42 °C, a structure of the network formed by ChiBP and chitohexaose could be observed by SEM, as shown in Fig. 7. The network is porous but less dense than that of ChiBP3 and colloidal chitin. This biomolecular network is clearly induced by the peptide ChiBP3 because it could only be found in the presence of 50  $\mu\text{g/ml}$  of the peptide (right panel). This result indicated that, in addition to chitin polymer, the ChiBP peptide could also interact with chito-oligosaccharide, and induce the formation of a biomacromolecular network. Since chitin and chito-oligosaccharide [28] are biodegradable, biocompatible and non-toxic, the porous structure formed by peptide-induced chitin or chitin derivatives could serve as a scaffold for tissue engineering or an attractive platform for targeted



**Fig. 6.** Peptide-induced coating of colloidal chitin. A simple coating experiment was demonstrated in a microcentrifuge tube. (A) The left tube contained only 0.25% colloidal chitin, whereas the right tube contained both 0.25% chitin and 50 µg/ml (35 µM) of ChiBP3 peptide. A chitin patch could only be observed after an overnight incubation of colloidal chitin (in water) in the presence of ChiBP3 peptide at 42 °C. (B) After the content inside the tube was discarded, the chitin coat on the surface of the tube can be clearly seen as a red patch after staining with Congo red. (C) and (D) are SEM images of the chitin coat at 130× and 3500× magnification, respectively. Magnifications are also shown in bars. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)



**Fig. 7.** Peptide-induced formation of chitohexaose network. SEM images of samples after incubating 5 µM chitohexaose in the absence (left panel) or presence of 50 µg/ml (35 µM) ChiBP3 peptide (right panel) at 42 °C, overnight. Biomacromolecular network could only be seen in the sample that contained both peptide and chitohexaose.

drug delivery [5]. Further optimization of various factors such as temperature, time, pH, salt, and ratio between peptide and chitin or chitin-derivatives, needs to be undertaken in order to obtain a biomacromolecular network of desired properties for various applications.

#### 4. Conclusions

This research reports an efficient technique for the identification of a novel short chitin binding peptide (ChiBP) by applying phage display technology. There have been previous reports on the identification and characterization of chitin binding domains (CBD) [29,30] or chitin binding proteins (CBP) [31,32] from different organisms. In addition, protein purification kits based on the interaction between CBD-tagged protein and chitin beads are available commercially [17]. However, the ChiBP peptide presented in

this study is much smaller than these chitin-binding domains or proteins, and therefore its applications are different. In this work, peptide-aided formation of chitin-based nanomaterial was demonstrated for the first time. Since peptides are biocompatible and can be easily engineered to tag any interesting proteins, this finding could provide a new approach to chitin research and accelerate the development of chitin-based nanoparticles for numerous applications in nanobiotechnology in the future.

#### Acknowledgments

This work was financially supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission and Suranaree University of Technology (SUT) and National Research Council of Thailand (NRCT). We would like to thank Miss Suchintana

Chumseng for excellent technical assistance. FK thanks James Ketudat Cairns, Kenneth Haller and Kritsana Sagarik for their useful discussions.

## References

- [1] R.A.A. Muzzarelli, Chitin, Pergamon Press, Oxford, UK, 1977.
- [2] E. Khor, L.Y. Lim, *Biomaterials* 24 (2003) 2339–2349.
- [3] F. Khoushab, M. Yamabhai, *Mar. Drugs* 8 (2010) 1988–2012.
- [4] N.K. Gopalan, A. Dufresne, *Biomacromolecules* 4 (2003) 657–665.
- [5] R. Jayakumar, M. Prabakaran, S.V. Nair, H. Tamura, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 142–150.
- [6] J.-Y. Je, Y.-S. Cho, S.-K. Kim, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3448–3451.
- [7] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 641–678.
- [8] R. Shelma, P. Willi, S.C.P. Sharma, *Trends Biomater. Artif. Organs* 22 (2008) 111–115.
- [9] J.N. Vournakis, J. Eldridge, M. Demcheva, R.C. Muise-Helmericks, *J. Vasc. Res.* 45 (2008) 222–232.
- [10] B. Wang, C. Tian, L. Wang, R. Wang, H. Fu, *Nanotechnology* 21 (2010) 025606.
- [11] A.B. Sanghvi, K.P. Miller, A.M. Belcher, C.E. Schmidt, *Nat. Mater.* 4 (2005) 496–502.
- [12] M. Sarikaya, C. Tamerler, D.T. Schwartz, F.O. Baneyx, *Annu. Rev. Mater. Res.* 34 (2004) 373–408.
- [13] B.K. Kay, J. Kasanov, M. Yamabhai, *Methods* 24 (2001) 240–246.
- [14] N.B. Adey, W.P. Stemmer, B.K. Kay, in: B.K. Kay, G. Winter, J. McCafferty (Eds.), *Phage Display of Peptides and Proteins*, Academic Press, San Diego, 1996, pp. 280–293.
- [15] K. Pershad, M.A. Sullivan, B.K. Kay, *Anal. Biochem.* 412 (2011) 210–216.
- [16] C. Songsiriritthigul, S. Lapboonrueng, P. Pechsrichuang, P. Pesatcha, M. Yamabhai, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4096–4103.
- [17] M.P. Bernard, D. Cao, R.V. Myers, W.R. Moyle, *Anal. Biochem.* 327 (2004) 278–283.
- [18] E.I. Fukusaki, K. Ogawa, A. Okazawa, S.-i. Kajiyama, A. Kobayashi, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 28 (2004) 181–184.
- [19] M. Yamabhai, in: F.W. Richter (Ed.), *Biotechnology: Research, Technology and Applications*, NOVA Science Publishers, Inc, Hauppauge, NY, 2008, pp. 327–345.
- [20] M. Yamabhai, B.K. Kay, *Anal. Biochem.* 247 (1997) 143–151.
- [21] C. Combet, C. Blanchet, C. Geourjon, G. Deleage, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 147–150.
- [22] S. Abeln, D. Frenkel, *PLoS Comput. Biol.* 4 (2008) e1000241.
- [23] S. Marqusee, R.L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 8898–8902.
- [24] M. Swetha, K. Sahithi, A. Moorthi, N. Srinivasan, K. Ramasamy, N. Selvamurugan, *Int. J. Biol. Macromol.* 47 (2010) 1–4.
- [25] H. Cui, M.J. Webber, S.I. Stupp, *Biopolymers* 94 (2010) 1–18.
- [26] X. Zhao, F. Pan, H. Xu, M. Yaseen, H. Shan, C.A. Hauser, S. Zhang, J.R. Lu, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 3480–3498.
- [27] S. Zhang, M. Altman, *React. Funct. Polym.* 41 (1999) 91–102.
- [28] B.B. Aam, E.B. Heggset, A.L. Norberg, M.S. Ørli, K.M. Vårum, V.G.H. Eijsink, *Mar. Drugs* 8 (2010) 1482–1517.
- [29] B. Henrissat, *EXS* 87 (1999) 137–156.
- [30] T. Watanabe, Y. Ito, T. Yamada, M. Hashimoto, S. Sekine, H. Tanaka, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 4465–4472.
- [31] X. Huang, W. Xie, Z. Gong, *FEBS Lett.* 478 (2000) 123–126.
- [32] G. Vaaje-Kolstad, D.R. Houston, A.H. Riemen, V.G. Eijsink, D.M. van Aalten, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 11313–11319.

## ข้อวิจารณ์

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเทคโนโลยีการแสดงเปปไทด์บนผิวเฟืองไปประยุกต์ใช้ในการคัดหาเปปไทด์ที่สามารถจับกับ วัสดุชีวภาพ ที่ไม่ใช่โปรตีน ได้จริง แต่ต้องทำการหาวิธีการตรึง วัสดุนั้นกับภาชนะที่เหมาะสม เพราะหากเป็นวัสดุที่มีรูพรุน ย่อมเป็นการยากที่จะสามารถทำการ biopanning ได้ สำเร็จ ดังเช่นในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยสามารถหาเฟืองที่จับกับ โคลตินได้สำเร็จ เพราะหาวิธีในการตรึงโคลตินบนจาน ELISA ได้ ความสำเร็จครั้งนี้เป็นความสำเร็จครั้งแรก จึงสามารถนำผลงานไปตีพิมพ์ได้ ส่วนในกรณีของแป้งนั้น จนถึงปัจจุบัน ก็ยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการทำการ biopanning จนได้เฟืองที่แสดงเปปไทด์ที่จับกับแป้งอย่างจำเพาะได้ รวมทั้งในโครงการวิจัยนี้ ที่ผู้วิจัยได้พยายามเป็นเวลานาน แต่ก็ยังทำไม่ได้ ดังนั้นผู้วิจัยคิดว่า หากต้องการหาเปปไทด์ที่จับกับแป้งได้อย่างเจาะจง น่าจะต้องหาวิธีทางเคมีในการตรึงแป้งกับวัสดุให้ได้ก่อน อย่างไรก็ตาม เหตุที่ผู้วิจัยสนใจที่จะคัดหาเฟือง ต่อวัสดุทั้ง ๒ อย่างนี้เป็นเพราะ ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ที่ผ่านมามีการหาเฟืองที่จับกับทอง เงิน และโลหะหลายชนิด แต่ไม่มีรายงานการจับกับ polymer ทางชีวภาพ อื่นๆ ซึ่งเหตุผลที่ไม่มีอาจเป็นเหตุผลเดียวกับที่ผู้วิจัยประสบ ดังนั้นการที่ผู้วิจัยสามารถหาได้เพียงเปปไทด์ที่จับเฉพาะกับโคลติน แต่ไม่จับกับแป้ง จึงไม่ถือเป็นความล้มเหลวในการวิจัย แต่ประการใด แต่เป็นการยืนยันจากประสบการณ์ ของข้าพเจ้า และผู้เชี่ยวชาญในสาขา นี้ว่า การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟืองนั้น ผู้วิจัยมีโอกาที่จะประสบความสำเร็จในการหาเปปไทด์ ต่อ เป้าหมายที่สนใจ ร้อยละ ๓๐ ถึง ๕๐

ทั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบประโยชน์ที่จะได้รับ ระหว่าง เปปไทด์ ที่จับกับ แป้ง และ โคลติน แล้ว จะพบว่า เปปไทด์ที่จำเพาะต่อโคลตินนั้น มีความน่าสนใจกว่ามากเปปไทด์ที่จับกับแป้งมาก เพราะโคลติน และอนุพันธ์ของมัน มีคุณสมบัติทางชีววิทยา (biological activities) หลายประการ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย ทั้งทางการแพทย์ และ อาหาร อาทิเช่น ใช้สำหรับการส่งผ่านยา ส่งผ่าน ยีน และใช้ในการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันพืช และสัตว์ให้ทนโรคเป็นต้น ในปัจจุบันมีงานค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับ โคลติน และ โคลโตซานเป็นจำนวนมาก ดังนั้น หากสามารถเพิ่มความสามารถในการทำพันธกิจ (functionalize) ของ โคลติน และโคลโตซานแล้ว จะทำให้สามารถเพิ่มศักยภาพในการประยุกต์ใช้สารนี้ ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพได้อย่างหลากหลาย

เหตุที่ผู้วิจัยใช้เวลานานในการทำวิจัยเรื่องนี้ เป็นเพราะเหตุปัจจัยหลายประการ ประการแรก ผู้วิจัยใช้เวลา กว่า ๑ ปี (ซึ่งเป็นระยะเวลาของโครงการอย่างเป็นทางการ) ในการพยายามหาหนทางทำการ biopanning เพื่อให้ได้ เปปไทด์ที่จับกับ แป้ง และโคลติน แต่ล้มเหลว จนกระทั่งพบวิธีการตรึงโคลตินบนจาน ELISA ได้สำเร็จ ซึ่งผ่านไป ประมาณ ๒ ปี หลังจากเริ่มโครงการแล้ว อย่างไรก็ตามหลังจากที่ได้เปปไทด์แล้ว และได้ทำการสังเคราะห์ พบว่ามี คุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการจึงใช้เวลาทำการทดลองเพิ่มเติม โดยใช้เวลากว่า ๑ ปี จากนั้นได้เขียน manuscript เพื่อส่งไปตีพิมพ์ในวารสารที่เกี่ยวกับ nanobiotechnology ซึ่งหลังจากที่ผ่านการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิซึ่งเชี่ยวชาญในด้านนี้แล้ว พบว่า การทดลองยังขาดความน่าเชื่อถือ ผู้วิจัยจึงต้องทำการทดลองเพิ่มอีก โดยใช้เวลา ประมาณ ๑ ปี จึงสำเร็จ ซึ่งถึงแม้จะใช้เวลานานกว่าที่คาดไว้มาก แต่ผู้วิจัยคิดว่าผลงานที่ได้คุ้มกับเวลาที่เสียไป

## สรุป และข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวเฟจในการค้นหาได้เพียงเส้นเปปไทด์ที่จำเพาะต่อโคติน แต่ไม่สามารถหาเปปไทด์ที่จับกับแป้งได้ ทั้งนี้เนื่องจาก ธรรมชาติของแป้งและโคตินนั้นเป็นรูพรุนสามารถจับกับเฟจแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้เป็นจำนวนมาก จนทำให้ไม่สามารถคัดแยกเฟจที่จับอย่างจำเพาะออกมาได้ เมื่อทำการคัดหา (biopanning) ในหลอดทดลองแบบต่างๆ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยสามารถหาวิธีในการตรึงโคตินให้อยู่บนจาน ELISA ได้ในปริมาณเพียงพอจนสำเร็จ จึงทำให้สามารถค้นหาเฟจที่แสดงเปปไทด์ที่มีขนาดความยาว ๑๒ กรดอะมิโน ที่จับกับโคตินได้ เรียกเปปไทด์นั้นว่า ChiBP จากนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อแสดงความสามารถในการใช้เปปไทด์ในการทำพันธกิจของวัสดุชีวภาพ โดยได้แก่การแสดงความสามารถในการจับกับเม็ดโคตินแล้วทำให้เม็ดเหี่ยวลง การเชื่อม ChiBP เปปไทด์กับเอนไซม์ อัลคาไล ฟอสฟาเทส แล้วนำไปจับกับเม็ดโคติน และท้ายที่สุดได้แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่คัดหามาได้ สามารถชักนำให้โคติน ในรูปแบบ คอลลอยด์ และ โคตินสั้นขนาดหกหน่วย รวมตัวเป็นแผ่นบางเคลือบบนผิวพลาสติกได้ เมื่อให้ความร้อนที่ ๘๒ องศาเซลเซียส โดยการสังเกตจากภาพผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเฟจในการค้นหาเปปไทด์ต่อเป้าหมายหลากหลายชนิด รวมทั้งเปปไทด์ที่จำเพาะต่อโคตินที่คัดหามาได้จากการทดลองนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเชิง นาโนเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง เพราะโคตินเป็นวัสดุชีวภาพที่มีศักยภาพทางเทคโนโลยีอย่างหลากหลาย ทั้งการแพทย์ เกษตร และสิ่งแวดล้อมความสำเร็จของการแสดงได้จากการที่ผลงานวิจัยนี้ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ต้องผ่านการประเมินของผู้ทรงคุณวุฒิ และได้ทำการยื่นขอสิทธิบัตรของเปปไทด์ไปแล้วด้วย

## ภาคผนวก

### ก. การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการจากโครงการวิจัยนี้

#### ก.๑ การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มี *peer review* (impact factor 2.444)

Khoushab F, Jaruseranee N, Tanthanuch W, Yamabhai M. Formation of chitin-based nanomaterials using a chitin-binding peptide selected by phage-display. *Int J Biol Macromol.* 2012; 50, 1267-74. (impact factor 2.502)

#### ก.๒ การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Khoushab F, Yamabhai. M. Hunting for Chitin Binding Peptide from a Phage Display Combinatorial Peptide Library. The 4th International Symposium on Biomedical Engineering, IEEE ISBME 2009, December 14-18, 2009. Bangkok, Thailand: (oral), 2009.

Khoushab F, Yamabhai M. Peptide-Aided Chitin Coating. The 2010 TechConnect World Conference and Trade Show. Anaheim, California, U.S.A. : (oral), 2010.

Khoushab F, Yamabhai M, Haller KJ. Thermo Responsive Micro and Nano-sphere Formation Aided by Peptide Self-assembly. In International conference on material for advanced technologies (ICMAT 2011) : Nanotechnology with Soft Matter (Suntec Singapore 26 June - 1 July 2011).

#### ก.๓ การผลิตบัณฑิต

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ ได้ใช้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ของ นาย Feisal Khoushab นักศึกษาระดับมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## ประวัตินักวิจัย

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ ๘ มกราคม ๒๕๑๐ เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตรบัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา ๑ ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี ๒๕๓๖ ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา ๕ เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ จากนั้นในปี พ.ศ. ๒๕๔๑-๒๕๔๕ ได้ทุนไปทำ post-doctoral research ที่ ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Richard G.W. Anderson ณ. University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas และในปี พ.ศ. ๒๕๔๖-๒๕๔๗ ได้รับทุน Alexander von Humboldt Fellowship ไปทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการของ Prof. Dr. Kai Simons ณ. Max Planck Institute for Molecular Biology and Genetics กรุง Dresden ประเทศ สหพันธ์รัฐเยอรมัน สมรสกับ ศ.ดร. ศิณัฐมา หาลทิช เมื่อวันที่ ๑๖ สิงหาคม ๒๕๔๗ และมีบุตร ๑ คน ชื่อ ดญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นรองศาสตราจารย์ และหัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอนุ (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอนุวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) จนถึงปัจจุบันมีผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ ๓๖ เรื่อง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของมหาบัณฑิต ๔ คน และดุษฎีบัณฑิต ๔ คน และเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยทั้งหมด ๒๒ โครงการ แล้วเสร็จ ๑๘ โครงการ

### ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา ๓๐๐๐๐

โทร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๒-๔ ๒๒๔๒๓๔ หรือ ๒๔๔๓๘๘ โทรสาร ๐๔๔ ๒๒๔๑๕๐

Email: montarop@g.sut.ac.th