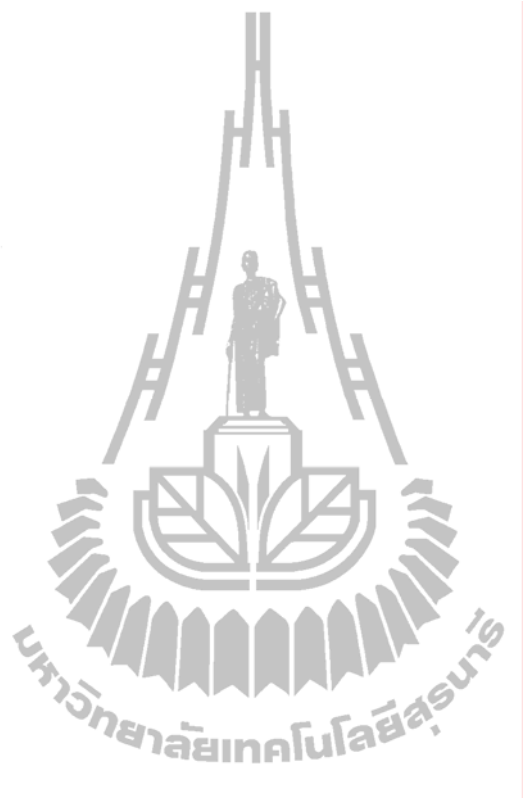
PHORNSIRI PECHSRICHUANG : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT *BACILLUS SUBTILIS* CHITOSANASE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 97 PP.

CLONING/RECOMBINANT CHITOSANASE/EXPRESSION/ SECRETION/CHITOOLIGOSACCHARIDE/*BACILLUS SUBTILIS*

Chitosanases (Csn) are enzymes that catalyse the hydrolysis of β-1,4 glycosidic bond of chitosan. One of the most important applications of chitosanases is for the bioconversion of chitosan into chitooligosaccharides (COS), which have various applications in medical, agricultural, or food industries. The objectives of this study were to clone, express, purify, and characterize the recombinant chitosanase from *Bacillus subtilis* 168. Two forms of recombinant chitosanase (Csn) were constructed by PCR-based cloning into pMY202 expression vector and overexpressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) to compare the secretion efficiency and specific activity. For the first construct (CsnOmpApMY202), the native signal peptide of *B. subtilis* Csn was replaced with that of *E. coli* OmpA signal peptide by sub-cloning the DNA inserts into *Hind*III and *Bgl*II sites of the expression vector (OmpA-Csn). For the second construct (CsnNativepMY202), the native signal peptide was retained by sub-cloning the entire gene of *B. subtilis* Csn into *Nde*I and *Bgl*II sites of pMY202 vector (Native-Csn). Both of the recombinant Csn constructs were fused with C-terminal deca-histidine tag to facilitate one-step affinity purification using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The gene was overexpressed in *E. coli* TOP10 under the control of *tac* promoter. The specific activities of both recombinant

enzymes in three different compartments, i.e., cytoplasm, periplasmic space, and culture broth were analyzed. Our result demonstrated that the yield and specificity of the recombinant OmpA-Csn were higher than those of Native-Csn in all three compartments. Most importantly, at 20 h after induction, the amount of OmpA-Csn that was secreted into the culture broth was approximately 5-fold higher than that obtained from Native-Csn. Therefore, the construct CsnOmpApMY202 was used for the subsequent experiments. The enzyme was overexpressed by induction with 0.1 mM IPTG, and purified to homogeneity by Ni-NTA affinity column chromatography, and characterized. A total activity of approximately 45,000 U from culture supernatant and 12,000 U from cell lysate (periplasmic and cytosol) could be obtained from 1-L shake flask cultures. The specific activity of the purified enzyme when using low MW chitosan as substrate was 904.8 units/mg. The optimal pH of the enzyme was between pH 5.0-6.0, whereas the optimal temperature was between 40-50 ˚C. The recombinant Csn was stable within pH 2-11 after incubation for 3 hr, and within pH 2-9 after incubation for 24 hr, at 30˚C. In an absence of substrate, the enzyme was stable up to 40^{o}C for 30 min, and completely inactivated at 50^{o}C. However in the presence of substrates, the enzyme was thermostable with a half-life time of activity ($\tau 1/2$) of approximately 19 hr at 50˚C and pH 5.5. Analysis of hydrolytic products by thin layer chromatography (TLC) revealed that the recombinant *B. subtilis* chitosanase is an endo-chitosanase that prefers substrate longer than G3. Analysis of hydrolytic products using various types of chitosan by thin layer chromatography indicated that the enzyme could be used efficiently for the production of various lengths of chitooligosaccharides, ranging from dimer to hexamer (G2-G6). In conclusion, this research reports an efficient *E. coli* expression system for the expression, secretion,

and purification of a relatively thermo- and pH stable chitosanase from *B. subtilis*, suitable for various biotechnological applications.



School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2011 Advisor's Signature_____

พรศิริ เพชรศรีช่วง : การผลิต และศึกษาคุณสมบัติของไคโตซานเนสจาก *บาซิลลัส สับติลิส* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT *BACILLUS SUBTILIS* CHITOSANASE)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ยมาภัย, ๙๗ หน้า.

เอนไซม์ไคโตซานเนส คือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิคของไคโตซานในสภาวะที่มีน้ำ การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไคโตซานเนสที่สำคัญที่สุดประการหนึ่งคือการใช้ย่อยไคโตซานด้วยวิธีทางชีวภาพ ให้เป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ คอซ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆได้อย่างหลากหลาย ทั้งทางด้านการแพทย์ การเกษตร การอาหาร วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยนี้คือ การโคลน การแสดงออก การทำให้บริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคโตซานเนส จาก*บาซิลลัส สับติสิส* (*Bacillus subtilis*) สายพันธุ์ ๑๖๘ ที่สร้างขึ้นจากการดัดแปลงพันธุกรรม โดยในขั้นแรกเอนไซม์ไคโตซานเนสที่เกิดจากการดัดแปลงพันธุกรรมนี้ ถูกสร้างขึ้นมาเป็นสองรูปแบบ เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการปลดปล่อยเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ การสร้างเอนไซม์ทำโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วจึงโคลนยีนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ ชื่อว่า pMY202 เพื่อให้สามารถแสดงออกได้ในแบคทีเรีย *เอสเชอริเชีย โคไล* หรือ *อี. โคไล* (*Escherichia coli* : *E. coli*) เอนไซม์รูปแบบแรก (CsnOmpA pMY202) สร้างขึ้นโดยตัดเปปไทด์ส่งสัญญาณของไคโตซานเนสที่ใช้ใน*บาซิลลัส สับติลิส* ออกแล้วแทนที่ด้วยเปปไทด์ส่งสัญญาณของ *อี. โคไล* ชื่อว่า OmpA จากนั้นโคลนชิ้นยีนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Bgl*II เรียกเอนไซม์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมนี้ว่า OmpA-Csn สำหรับการสร้างเอนไซม์ในรูปแบบที่สอง (CsnNativepMY202) สร้างโดยการโคลนยีนไคโตซานเนสที่ยังมีเปปไทด์ส่งสัญญาณของ *บาซิลลัส สับติลิส อยู่* เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pMY202 ที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Bgl*II เรียกเอนไซม์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมนี้ว่า Native-Csn ซึ่งเอนไซม์ไคโตซานเนสทั้งสองรูปแบบสามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียว ด้วยวิธีการโครมาโตกราฟฟีคอลัมน์แบบจับจำเพาะกับโลหะที่ตรึงอยู่กับที่ (IMAC) เนื่องจากมีกรดอะมิโนฮิสทิดีนจำนวนสิบโมเลกุลต่ออยู่ที่ปลายคาร์บอกซีของโปรตีน จากนั้นยีนไคโตซานเนสได้ถูกทำให้แสดงออกเป็นจำนวนมากใน *อี. โคไล* สายพันธุ์ทอปเทน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองรูปแบบที่สกัดจากสามส่วนคือ ไซโตพลาสซึมบริเวณช่องว่างระหว่างผนังเซลล์ และในน้ำเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของ OmpA-Csn สูงกว่า Native-Csn ในทั้งสามส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกเป็นเวลา ๒๐ ชั่วโมง OmpA-Csn สามารถถูกปลดปล่อยออกมา

สู่ภายนอกเซลล์แบคทีเรียไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากกว่า Native-Csn ประมาณ ๕ เท่า ดังนั้นจึงเลือกใช้ CsnOmpApMY202 ในการทดลองขั้นต่อไป โดยจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพบว่า OmpA-Csn ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณมากที่สุด เมื่อใช้ IPTG ความเข้มข้น ๐.๑ มิลลิโมล่าร์ และกระตุ้นให้แสดงออกเป็นเวลา ๒๐ ชั่วโมง จากนั้นได้ทำการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการโครมาโตกราฟฟีคอลัมน์แบบจับจำเพาะ (Ni-NTA) ผลจากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ *อี. โคไล* ที่มียีนไคโตซานเนส ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ ๑ ลิตร ให้กิจกรรมเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ ๔๕,๐๐๐ หน่วย และในสารสกัดจากเซลล์ประมาณ ๑๒,๐๐๐ หน่วย ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์มีค่า ๘๐๔.๘ หน่วยต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง ๕ ถึง ๖ ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงอุณหภูมิ ๔๐ ถึง ๕๐ องศาเซลเซียส ส่วนเสถียรภาพของเอนไซม์ พบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถทนต่อค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง ๒ ถึง ๑๑ เป็นเวลา ๓ ชั่วโมง และที่ค่าความเป็นกรดด่าง ๒ ถึง ๙ เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ส่วนเสถียรภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ ๔๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที และถูกยับยั้งกิจกรรมโดยสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มเอนไซม์กับสารตั้งต้น เอนไซม์จะมีความทนต่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยมีค่าครึ่งชีวิตที่ประมาณ ๑๙ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง ๕.๕ จากการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายในสภาวะที่มีน้ำของเอนไซม์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง (TLC) พบว่าไคโตซานเนสจาก *บาซิลลัส สับติลิส* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม เป็นเอนไซม์ที่ตัดจากภายใน และมีความจำเพาะต่อไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีสายยาวมากกว่า ๓ หน่วยย่อย (G3) ทั้งนี้จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเมื่อใช้ไคโตซานชนิดต่างๆ เป็นสารตั้งต้นนั้น พบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในช่วงความยาว ๒ ถึง ๖ หน่วย (G2-G6) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า งานวิจัยนี้ได้แสดงถึงประสิทธิภาพในการใช้ระบบการแสดงออกของยีนใน *อี. โคไล* เพื่อการผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งยังแสดงถึงประสิทธิภาพในการใช้ระบบนี้ในการหลั่งเอนไซม์ที่ต้องการออกสู่ภายนอกเซลล์ และวิธีที่มีประสิทธิภาพในการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งเอนไซม์ไคโตซานเนสที่สร้างจากการดัดแปลงทางพันธุกรรมนี้มีคุณสมบัติที่ค่อนข้างทนต่ออุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูงจึงความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ ต่อไป

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____