ปีณิดา นามวิจิตร : การผลิตและการส่งออกไคโตซาเนสจากบาซิลัสโดยการใช้ระบบการแสดงออกของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (PRODUCTION AND SECRETION OF *BACILLUS* CHITOSANASE IN *LACTOBACILLUS PLANTARUM* EXPRESSION SYSTEM) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ยมาภัย, 91 หน้า.

วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์นี้คือการพัฒนาระบบการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิตเอนไซม์ไคโตเนสจากเชื้อบาซิลัสที่เหมาะสมกับอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งอาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์ทางด้านอาหารในการผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต โดยในการศึกษาวิจัยนี้ เอนไซม์ไคโตซาเนสลูกผสม ถูกสร้างขึ้นด้วยการเชื่อมต่อกับเปบไทด์นำสัญญาณ 2 ชนิด คือ เปบไทด์นำสัญญาณตามธรรมชาติของเชื้อ *Bacillus subtilis* และเปบไทด์นำสัญญาณของโปรตีนเยื่อหุ้มชั้นนอกของเชื้อ *Escherichia coli* หรือ OmpA จากนั้นทำการโคลนยีนดังกล่าวเข้าสู่พาหะที่ใช้ในการแสดงออกของยีนชื่อเวคเตอร์ pSIP409 ด้วยวิธีการที่ต้องใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสปลายเหนียว เพื่อเชื่อมต่อชิ้นของยีนเข้าไปในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *NcoI* และ *XhoI* ของเวคเตอร์ pSIP409 ที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะอีริ-โทรมัยซินเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกเวตเตอร์ที่ถูกต้อง ทำให้ได้เวคเตอร์ใหม่ 2 ชนิด คือ pSIP409CSN_nt และ pSIP409CSN_OmpA จากนั้นนำยีนเอนไซม์ไคโตซาเนสดังกล่าวไปแสดงออกในเชื้อ *L. plantarum* WCFS1 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถใช้ในงานด้านอาหาร การแสดงออกของยีน *csn* จากเชื้อนี้ได้ถูกควบคุมโดยอาศัยตัวชักนำซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเปบไทด์ฟีโรโมน จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบระดับกิจกรรมเอนไซม์และประสิทธิภาพในการส่งออกของเอนไซม์ทั้งสองรูปแบบ

จากการวิเคราะห์พบว่า ผลผลิตของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่สภาวะเหมาะสม กิจกรรมเอนไซม์ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อมีประมาณ 10,700±25 ยูนิต และ 4,970±411 ยูนิต และมีประสิทธิภาพการส่งออกของเอนไซม์คิดเป็นร้อยละ 79.0 และ 89.0 สำหรับเอนไซม์ที่ใช้เปบไทด์นำสัญญาณจากธรรมชาติและเปบไทด์นำสัญญาณ OmpA ตามลำดับ ในขั้นตอนต่อไปได้ทำการสร้างเวคเตอร์สำหรับการผลิตเอนไซม์เพื่อสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยการแทนที่ตำแหน่งของยีนต่อต้านยาอิริโทรไมซินด้วยยีนอะลานีน ราซิเมส เรียกเวคเตอร์ใหม่ที่ได้สร้างขึ้นนี้ว่า pSIP609CSN_nt และ pSIP609CSN_OmpA ผลจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในเบื้องต้นโดยการเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่า ค่ากิจกรรมในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อวัดได้ประมาณ 12,600 ยูนิต (U) ต่อลิตร ผลสรุปจากการศึกษานี้แสดงว่า สามารถใช้เชื้อ *L. plantarum* ใน

การผลิตเอนไซม์ไคโตซาเนสจากเชื้อบาซิลัสได้ ซึ่งระบบการผลิตเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนชนิดอื่นๆ ได้ต่อไป

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

PEENIDA NAMVIJITR : PRODUCTION AND SECRETION OF *BACILLUS* CHITOSANASE IN *LACTOBACILLUS PLANTARUM* EXPRESSION SYSTEM. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 91 PP.

RECOMBINAT CHITOSANASE/*LACTOBACILLUS PLANTARUM*/SECRETION/ SIGNAL PEPTIDE

The goal of this study was to develop a food-grade expression system for the production of *Bacillus* chitosanse in *Lactobacillus plantarum* that could be applied for commercial production of food-grade enzyme in the future. Two forms of recombinant chitosanase (Csn) fused with different signal peptides, i.e., *Bacillus subtilis* Csn native signal peptide (SP) and the signal peptide of the *Escherichia coli* outer membrane protein (OmpA) were cloned into *NcoI* and *XhoI* sites of pSIP409 expression vector, harboring erythromycin resistant gene (*erm*), by a sticky PCR-based method. The two constructs, designated pSIP409CSN_nt and pSIP409 CSN_OmpA, were generated and over-expressed from *L. plantarum* WCFS1, which is a food-grade expression host. The *csn* gene expression was controlled by using a peptide pheromone as inducer, and both enzyme activity and secretion efficiency of the two constructs were compared. The yields from 500 mL of culture volume at the optimal condition were approximately 10,700±25 U and 4,970±411 U/L, when using the native and OmpA SP, respectively. The secretion efficiencies were approximately 79.0% and 89.0% for the constructs containing the native and the OmpA SP, respectively. Subsequently, food grade vector for the expression of the recombinant chitosanase was constructed

by replacing the erythromycin resistance gene with the alanine racemase (*alr*) gene, resulting pSIP609CSN_nt and pSIP609CSN_OmpA constructs. Preliminary analysis of the yield of recombinant Csn containing native signal peptide from 100 mL of cultivation was approximately 12,600 U/L, when culture in a shake-flask. In conclusion, an efficient system for the production and secretion of recombinant chitosanase in *L. plantarum* was successfully developed. This system may potentially be applied for the production of other proteins.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2014 Advisor's Signature_____