พรศิริ เพชรศรีช่วง : การผลิตและฤทธิ์ทางชีวภาพของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (คอซ) ที่ถูกสร้างขึ้นด้วยเทคโนโลยีเอนไซม์ (PRODUCTION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CHITO-OLIGOSACCHARIDE GENERATED BY ENZYME TECHNOLOGY) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ยมาภัย, 126 หน้า.

ไคตินและไคโตซานเป็นโพลิเมอร์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ พบในโครงสร้างของสัตว์ขาปล้อง ปลาหมึก และผนังเซลล์ของรา แหล่งวัตถุดิบหลักทางอุตสกรรมที่ใช้ในการผลิตไคตินและไคโตซาน มาจากกากของเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล เนื่องจากไคตินและไคโตซานไม่สามารถละลายในน้ำได้ ดังนั้นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์หรือ คอซ ซึ่งเป็นน้ำตาลสายสั้น ที่ผลิตจากไคตินและไคโตซานจึงเป็นที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้มากกว่าไคตินและไคโตซาน เพราะ คอซ มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถเข้ากันดีกับสภาวะชีวภาพ ไคโตซานเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตคอซที่ประกอบด้วยหมู่อะซิติลบางส่วน ซึ่งอาจนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆอย่างหลากหลาย งานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไคโนซานเนส ตระกูล 46 จาก *บาซิลลัส สับติลิส* (*Bs*Csn46A) เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพสูงสำหรับการใช้งานในทางอุตสาหกรรม โดยได้ทำการสร้างเอนไซม์ *Bs*Csn46A จาก *บาซิลลัส สับติลิส* สองรูปแบบ ได้แก่ ไคโตซานเนสที่มีเปปไทด์นำทางของ *บาซิลลัส* และไคโตซานเนสที่มีเปปไทด์นำทางของแบคทีเรีย *เอสเชอริเชีย โคไล* (*อี. โคไล*) ชื่อว่า OmpA จากนั้นเอนไซม์ทั้งสองรูปแบบได้ถูกทำให้แสดงออกเป็นจำนวนมากใน *อี. โคไล* เพื่อประเมินประสิทธิภาพการหลั่ง ผลการทดลองพบว่า ไคโตซานเนสที่มีเปปไทด์นำทางดั้งเดิมเมื่อหลั่งออกมา จะถูกตัดออกเป็นเอนไซม์สมบูรณ์แบบที่มีโครงสร้างเหมือนกันหมด และมีลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายเอ็นเช่นเดียวกับแบคทีเรียชนิดดั้งเดิม ขณะที่ *Bs*Csn46Aที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณOmpAนั้นเมื่อถูกตัดออก จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายเอ็นที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า *Bs*Csn46A ที่มีเปปไทด์ส่งสัญญาณ *อี. โคไล* OmpA มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่ามีเปปไทด์ส่งสัญญาณ *บาซิลลัส* ดังนั้น *Bs*Csn46A ที่ประกอบด้วยสัญญาณเปปไทด์ OmpA จึงถูกนำมาใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป คือการศึกษาคุณสมบัติเชิงลึกในการทำปฏิกิริยาของ *Bs*Csn46A และความสามารถในการย่อยสลายไคโตซานที่มีสัดส่วนของหมู่อะเซติล (F_A) ที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟี่แบบแยกโดยขนาด (SEC), โปรตอนนิวเคลียร์แมกทิกแรโซแนนซ์ (^{1}H-NMR) และ แมสสเปกโตรเมทรี (MS) ผลการศึกษารูปแบบการจับของเอนไซม์แสดงให้เห็นว่า *Bs*Csn46A ชอบจับตำแหน่ง D ที่ตำแหน่ง-1 อย่างไรก็ตามเอนไซม์นี้สามารถสลายพันธะไกลโคสิดิคที่ตำแหน่ง A ได้เช่นเดียวกัน โดย *Bs*Csn46A จะสลายพันธะจากด้านในแบบไม่จับยึดแน่น จึงทำให้สามารถย่อยสลายไคโตซานที่มีจำนวนหมู่อะซิติลที่แตกต่างกันให้เป็นคอซที่มีความยาว และองค์ประกอบหลากหลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารตั้งต้นและสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา สิ่งที่โดดเด่นของงานวิจัยนี้คือ *Bs*Csn46A น่าจะเป็นหนึ่งในไคโตซานเนสที่ทำปฏิกิริยาได้เร็วมากที่สุด โดยพบว่ากิจกรรมจำเพาะในช่วงเริ่มต้นปฏิกิริยามีค่า 5.5×10^3 และ 8.4×10^3 ต่อนาที เมื่อใช้ไคโตซานที่มีค่า F_A 0.15 และ F_A 0.3 ตามลำดับ ขั้นตอน

สุดท้ายของงานวิจัยนี้ คือ การเตรียมคอซที่มีค่า F_A ที่แตกต่างกันสามชนิด โดยใช้ *Bs*Csn46A ในการย่อยสลายไคโตซานที่มีค่า F_A 0.15 และ F_A 0.3 และ เอนไซม์ไคติเนสจาก*บาซิลลัส ไลเคนนิฟอร์มิส* ที่ถูกปรับปรุงโดยการทำให้กลายพันธุ์ (*Bl*ChiA3) เพื่อย่อยสลายไคโตซานที่มีหมู่อะซิติลสูง (F_A 0.6) จากนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของคอซที่มีระดับของหมู่อะซิติลที่แตกต่างกัน (F_A0.15, 0.3 และ 0.6) ผลการศึกษาพบว่าคอซมีฤทธิ์ปกป้องSH-SY5Yเซลล์จากสารก่อพิษในระบบประสาทได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการทดลองศึกษาผลของ คอซ ต่อกระบวนการเกิด autophagyในเซลล์ SH-SY5Y พบว่าคอซที่มีสัดส่วนของหมู่อะซิติลที่แตกต่างกันนั้นมีกิจกรรมทางชีวภาพที่แตกต่างกัน รวมถึงยังมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทด้วย จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า *Bs*Csn46A เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไคโตซานที่มีสัดส่วนของหมู่อะซิติลที่แตกต่างให้เป็นคอซที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์อย่างหลากหลายได้ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา Phornsiri P.

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

PHORNSIRI PECHSRICHUANG : PRODUCTION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CHITO-OLIGOSACCHARIDE PRODUCED BY ENZYME TECHNOLOGY. THESIS ADVISOR : PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 126 PP.

CHITIN/CHITOSAN/CHITOSANASE/CHITO-OLIGOSACCHARIDE/CHOS/ BACILLIS/ANTIOXIDANT/AUTOPHAGY

Chitin and chitosan are bioactive polymers found in the exoskeleton of arthropods, cephalopods, and cell walls of fungi. The main industrial sources of chitin and chitosan are wastes from seafood processing industries. Since chitin and chitosan have poor solubility in water. Chito-oligosaccharides (CHOS), oligomers of chitin and chitosan, are more interesting for a wide variety of applications because they are water soluble, non-toxic, and biocompatible. Chitosanase can be used to produce partially acetylated CHOS for several applications. Previously, the family 46 chitosanase from *Bacillus subtilis* (*Bs*Csn46A) has been shown to possesses high potential for industrial applications. In this, two forms of recombinant *Bs*Csn46A from *B. subtilis* containing the native *Bacillus* or *Escherichia coli* OmpA signal peptide were constructed and overexpressed in *E. coli* to evaluate their secretion efficiency. The results showed that only the construct with the native signal peptide could be cleaved homogenously, generating the same *N*-terminal sequence as in the wild type bacteria, whereas, secreted *Bs*Csn46A from the construct containing the OmpA signal peptide was heterogeneous. However, the expression level of *Bs*Csn46A generated from the construct containing the *E. coli* OmpA signal peptide was much higher compared to the native *Bacillus* signal peptide. Therefore, the construct *Bs*Csn46A with OmpA signal peptide was used for the subsequent experiments. In-depth characterization of the mode of action of *Bs*Csn46A and

its ability to degrade chitosans with various fractions of *N*-acetylation (F_A) were performed, using size exclusion chromatography, ^{1}H-NMR, and mass spectrometry (MS) methods. The results showed that *Bs*Csn46A has subsite binding preference for D-units in the -1 subsite, although the enzyme can also hydrolyze glycosidic linkages following an A-unit. Utilizing the non-processive endo-mode fashion, *Bs*Csn46A can efficiently convert chitosans with different degrees of acetylation into mixtures of CHOS with varying chain lengths and compositions, depending on the substrate and the reaction conditions. Notably, this enzyme seems to be one of the fastest chitosanases so far. The initial specific activities of chitosan degradation were $5.5x10^3$ and $8.4x10^3$ min^{-1} for chitosans with F_A 0.15 and F_A 0.3, respectively. Finally, CHOS with various F_A were produced by enzymatic hydrolysis using *Bs*Csn46A for chitosan with F_A 0.15 and F_A 0.3, or a mutant of *B. licheniformis* chitinase (*Bl*ChiA3) with improved properties for highly acetylated chitosan (F_A 0.6). Then, the biological activities of various degrees of acetylation of CHOS with F_A0.15, 0.3 and 0.6 on a model cell line for neuronal function and differentiation were studied. The results suggested that CHOS effectively protect the SH-SY5Y cells from a neurotoxic agent. Interestingly, CHOS could enhance autophagy activity in SH-SY5Y cells. CHOS with different degrees of acetylation showed different biological activities including neuroprotective effects. In conclusion, *Bs*Csn46A is a suitable enzyme for the bioconversion of chitosans with various degrees of acetylation into value-added CHOS for different applications.

School of Biotechnology

Academic Year 2017

Student's Signature Phornsiri P.

Advisor's Signature