



รายงานการวิจัย

การพัฒนาและประยุกต์ใช้ระบบการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิต
โปรตีนปรับแต่งพันธุกรรมสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร
Development and Application of food-grade expression
system for the production of recombinant proteins

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนาและประยุกต์ใช้ระบบการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิต
โปรตีนปรับแต่งพันธุกรรมสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร
Development and Application of food-grade expression
system for the production of recombinant proteins

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ เกษีกรหญิง ดร. มณฑารพ ยมาภัย

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ

๒๕๕๗ - ๒๕๖๑

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม ๒๕๖๓

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘ ถึง ๒๕๖๒ โดยมีกรรมการจากสภาวิจัยแห่งชาติเป็นผู้ประเมินข้อเสนอโครงการ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ดิฐธума หาลทิช ที่ได้ให้คำปรึกษา ให้ สารและชีววัตถุ สำหรับงานวิจัย เป็นอย่างดี ขอขอบคุณลูกศิษย์ นักศึกษาปริญญาโท นางสาวปิณิดา นามวิจิตร นายชายน้อย เข้ม และ นักศึกษาปริญญาเอก นายสุทธิพงศ์ ศักดิ์อุบล ที่เป็นผู้ช่วยวิจัยหลัก ในการทำวิจัยนี้ และ ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลในเรื่องงานการเงิน และงานธุรการ เป็นอย่างดีตลอดมา



บทคัดย่อภาษาไทย

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก เป็นโรงงานระดับเซลล์ที่น่าสนใจ ในการใช้ผลิต โปรตีน และเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพราะ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้รับการรับรองว่ามีสถานะ ปลอดภัย และเพาะเลี้ยงได้ง่าย แบคทีเรียแลคโตบาซิลัส แพลนทาร์ม เป็นแบคทีเรียที่ ปลอดภัย และมีประวัติการใช้ในอาหารมายาวนาน

ในส่วนแรกของการวิจัย เป็นการผลิตเอนไซม์ โคโตซานเนส (CsnA) และ เบต้าแมนนาเนส (ManB) จากเชื้อ บาซิลัส ออกจากแลคโตบาซิลัส แพลนทาร์ม ผลการทดลองพบว่า ทั้ง ManB และ CsnA สามารถถูกผลิต และหลั่งออกมาจากเซลล์ได้เป็นอย่างดี โดยการใช้ระบบ pSIP ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน เมื่อใช้ทั้ง ยีนต้านยาปฏิชีวนะ อีริโทรมัยซิน และ ยีน *clr* เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก

ในส่วนที่ ๒ ของโครงการวิจัย เป็นการแสดงเอนไซม์ทั้ง ๒ บนผิวของ แลคโตบาซิลัส แพลนทาร์ม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สำหรับเป็นตัวเร่งทางชีวภาพแบบ ทั้งเซลล์ ผลการศึกษาพบว่า เอนไซม์ สามารถยึดอยู่กับผิวเซลล์ แลคโตบาซิลัส แพลนทาร์ม โดยยังมีฤทธิ์ย่อย แมนแนน และ โคโตซาน ได้ ดังนั้นจึงอาจใช้เซลล์ประเภทนี้ ในกระบวนการผลิตต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารได้

ในส่วนสุดท้ายของโครงการวิจัย เป็นการแสดงความสำเร็จในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ระบบการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิตโปรตีนปรับแต่งพันธุกรรม สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ของโครงการวิจัยนี้ โดยเป็นการใช้ เอนไซม์สำหรับอาหาร ที่ได้พัฒนาขึ้นในการผลิต คอช ที่ละลายน้ำได้ จาก โคโตซาน ที่สกัดได้จากเปลือก กุ้ง ในปฏิกิริยาที่มีกรดแลคติก ผลการศึกษาวิจัยพบว่า สามารถผลิต คอช ที่มีโครงสร้างสม่ำเสมอ ชัดเจน ด้วยระบบการผลิตเอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ ซึ่งคอช เหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดสำหรับอุตสาหกรรม อาหารคนและสัตว์ได้ต่อไป

ผลงานวิจัยนี้นำไปสู่การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติที่มีผลกระทบสูง ๒ เรื่อง และใช้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ นักศึกษาปริญญาเอก และ โท อย่างละ ๒ คน

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Lactic acid bacteria are interesting cell factories for the expression of hydrolytic enzymes as many of them are generally recognized as safe and require only a simple cultivation process. *Lactobacillus plantarum* is considered as a potential cell factory because of its GRAS (generally recognized as safe) status and long history of use in food applications.

The first part of the research project involves the overexpression of a chitosanase (CsnA) and a β -mannanase (ManB), from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, respectively, in *Lactobacillus plantarum*. ManB and CsnA could be efficiently produced and secreted in *L. plantarum* using pSIP-based expression vectors containing either an erythromycin resistance or the *alr* gene as selection marker.

The second part of the research project involved the display the two enzymes on the surface of *L. plantarum* for potential application as whole-cell biocatalysis. The results indicated that mannanolytic and chitinolytic enzymes can be anchored to the cell surface of *L. plantarum* in active forms. This approach, with the enzyme of interest being displayed on the cell surface of a food-grade organism can be applied in various production processes relevant for food industry.

Finally, in the last part of the research project, we demonstrate the success in the development and application of food-grade expression system for the production of recombinant proteins, of which a food-grade enzyme technology developed in our laboratory was used for the production of soluble CHOS from chitosan, derived from chitin of shrimp and prawn shells, in a lactic acid solution. The results indicated that well-characterized chitosan oligosaccharides could be produced using well developed food-grade enzyme technology in our laboratory. The CHOS products could be further applied for food and feed industry.

The information and knowledge created from this research project were used for 2 publications in a high-impact international journal, and in 2 Ph.D. and 2 Master Thesis.

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
เอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Food Enzyme)	4
ระบบการแสดงออกของยีนสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Food-grade Expression System) ใน Lactic acid bacteria	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย ผลการวิจัย และการวิเคราะห์วิจารณ์ผลที่ได้	11
3.1 การพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ beta-mannanase และ chitosanase ด้วย <i>Lactobacillus plantarum</i> food grade expression system โดยให้เอนไซม์หลั่งออกมาภายนอก	11
3.2 การพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ beta-mannanase และ chitosanase ด้วย <i>Lactobacillus plantarum</i> food grade expression system โดยให้แสดงอยู่บนผิวของเซลล์ <i>Lactobacillus</i>	24
3.3 การใช้เอนไซม์ chitosanase ที่ผลิตจาก <i>Lactobacillus plantarum</i> food grade expression system ไปใช้เพิ่มมูลค่าโคโตซาน โดยการเปลี่ยนไปเป็น โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ คอซ	39
บทที่ 4 บทสรุป	47
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	47
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	48
ประวัติหัวหน้าโครงการ	50
ภาคผนวก	51
ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร	51
ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน	52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ระบบการผลิตโปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Food-grade expression system) เป็นระบบการแสดงออกของยีนในจุลชีพที่นับวันจะมีความสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะในปัจจุบันที่ได้มีการค้นคว้าและวิจัยเพื่อพัฒนาเอนไซม์ และโปรตีนใหม่ๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มขึ้นให้กับผลิตภัณฑ์อาหารในรูปแบบต่างๆ ทั้งนี้ เนื่องจากเอนไซม์ หรือโปรตีน โดยเฉพาะที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมาใหม่ๆ สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น ไม่ว่าจะเตรียมได้จาก สิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ หรือจากการปรับแต่งพันธุกรรม จะมีความเกี่ยวข้องกับสุขภาพของผู้บริโภคโดยตรง ก่อนจะนำมาใช้จึงต้องได้รับการรับรองโดยสถาบันที่เกี่ยวข้องก่อน เช่นสถาบัน FDA (Food and Drug Administration) ในประเทศ สหรัฐอเมริกา หรือ EFSA (European Food Safety Authority) ในกลุ่มประเทศประชาคมยุโรป ส่วนในประเทศไทยองค์กรที่ควบคุมคือ อย (องค์การอาหารและยา) ในปัจจุบันมีเอนไซม์ ๓๖ ชนิดที่ผลิตขึ้นจากสิ่งมีชีวิตที่ผ่านการตัดแปลงพันธุกรรม หรือ GMO (genetically modified organism) ที่มีรายชื่ออยู่ในรายการเอนไซม์ที่ได้รับการรับรองสำหรับอุตสาหกรรมอาหารที่จัดทำโดย AMFEP (Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products) (Olempska-Beer et al., 2006)

ข้อได้เปรียบประการสำคัญของการประยุกต์ใช้โปรตีน โดยเฉพาะเอนไซม์ตัดแปลงพันธุกรรม (recombinant enzyme) ในอุตสาหกรรมอาหารคือ สามารถผลิตได้ในปริมาณสูงกว่าการผลิตจากแหล่งธรรมชาติมาก ทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า จึงมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า รวมทั้งมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนจากสารอื่นๆ เช่น mycotoxin ได้น้อยกว่า อีกทั้งยังสามารถใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรมขั้นสูงในการพัฒนาโปรตีน หรือเอนไซม์ ให้มีคุณสมบัติจำเพาะที่เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยเทคนิค directed evolution [19] ส่วนข้อจำกัดประการสำคัญ คือไม่สามารถใช้วิธีการผลิต recombinant protein ทั่วๆ ไป ที่ใช้ antibiotic เป็น selection marker ได้ จึงต้องทำการพัฒนาระบบการผลิต จำเพาะเพื่อใช้สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Food-grade expression system) คือต้องไม่ใช้ antibiotic เป็น selection marker และควรสร้างขึ้นด้วยวิธีการ self-cloning จึงจะทำให้ได้รับการยอมรับในกลุ่มผู้บริโภค (Peterbauer et al., 2011) นอกจากนั้นแล้วเซลล์เจ้าบ้าน หรือ host ที่จะใช้ในกระบวนการผลิต recombinant enzyme นั้น ควรเป็นจุลชีพที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย หรือมีสถานะ GRAS (generally recognized as safe) อาทิเช่น *Bacilli* หรือ Lactic acid bacteria ที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ มาเป็นเวลายาวนาน (Konings et al., 2000) ในปัจจุบัน ประเทศในกลุ่มที่พัฒนาแล้ว ได้มีการวิจัยและพัฒนาระบบการผลิต recombinant protein โดยเฉพาะ เอนไซม์ ด้วย food grade expression system มากพอควร ส่วนในประเทศไทย ไม่พบมีรายงานการผลิตและการประยุกต์ใช้ food-grade expression system ในการผลิต เอนไซม์ หรือโปรตีน สำหรับอุตสาหกรรมอาหารมาก่อน ทั้งๆ ที่วาระการเพิ่มมูลค่าสินค้าทางเกษตร และอาหาร เป็นวาระที่สำคัญของชาติ

โครงการวิจัยนี้จะใช้เอนไซม์ ๒ ชนิด คือ เอนไซม์ beta mannanase (ManB) และ chitosanases (Csn) เป็นแบบจำลองในการพัฒนาระบบการแสดงออกของยีนสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้ผ่านการวิจัยและพัฒนามาก่อนหน้านี้แล้วในห้องปฏิบัติการอนุเทคโนโลยีชีวภาพของ หัวหน้าโครงการวิจัย โดยในด้านเอนไซม์ได้ทำการวิจัยและพัฒนาเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolase ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร มาแล้วหลายชนิด อาทิเช่น เอนไซม์ mannanase (Songsiriritthigul et al., 2010a), chitinase (Songsiriritthigul et al., 2010b), chitosanase (Pechsrichuang et al., 2013), protease (subtilisin) (Phrommao et al., 2011) , transglutaminase, (Sinsuwan et al., 2012) beta-galactosidase (Juajun et al., 2011; Maischberger et al., 2010) เป็นต้น รวมทั้งได้ทำการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแอนติบอดีแบบใหม่ โดยไม่ต้องใช้สัตว์ทดลองอีกด้วย (Pansri, 2009) โดยทั้งเอนไซม์ และแอนติบอดีส่วน scFv ที่ได้พัฒนาขึ้น เป็นโปรตีนปรับแต่งพันธุกรรมที่ถูกผลิตด้วยระบบการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Yamabhai et al., 2011) ที่มีประสิทธิภาพ ทั้งแบบที่ผลิตภายในเซลล์ และหลังออกมาออกเซลล์ อีกทั้งยังได้มีการพัฒนาเทคนิคพื้นฐานในการปรับปรุงคุณสมบัติเอนไซม์ และ โปรตีนด้วยเทคนิค DNA shuffling (Songsiriritthigul et al., 2009) และ เทคโนโลยีชีวภาพบนผิวเฟจ (Kay et al., 2001) ทำให้ในปัจจุบัน ห้องปฏิบัติการมีเอนไซม์ และแอนติบอดี ที่น่าสนใจหลายชนิด ที่ควรนำไปปรับใช้เพื่อให้สามารถผลิตได้จากระบบ Food-grade expression system เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้ได้จริงในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งในการแปรรูปอาหารให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่าเพิ่ม หรือสร้างผลิตภัณฑ์อาหารแบบใหม่ ซึ่งถือเป็นนวัตกรรมที่อาจพัฒนาเป็น แนวทางการป้องกัน และรักษาโรคแบบใหม่ โดยการใช้แบคทีเรีย LAB ที่มีแอนติบอดีที่สามารถกำจัดเชื้อโรค หรือสารพิษ อีกทั้งการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมอาหารที่จะได้พัฒนาขึ้นมา นี้ ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนอื่นๆ เพื่ออุตสาหกรรมอาหารในอนาคตต่อไปอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนา และประยุกต์ใช้ระบบการแสดงออกของยีนสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร food-grade expression system ในการผลิตเอนไซม์ สำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยแบ่งเป็นวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

- 1.2.1 เพื่อทำการโคลนยีนของเอนไซม์ ที่มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ใน อุตสาหกรรมอาหารที่ได้พัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้แล้วในห้องปฏิบัติการอนุเทคโนโลยีชีวภาพของหัวหน้าโครงการ เช่น เอนไซม์ chitosanase และ/หรือ beta-galactosidase และ/หรือ mannanase เข้าในพลาสมิด pSIP409 เพื่อแสดงออกใน Food grade expression system ที่มี *Lactobacillus plantarum* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยเปรียบเทียบการโคลนยีนทั้งแบบที่มีหรือไม่มี native signal peptide เพื่อดูว่าโครงสร้างแบบใดจะทำให้ได้ผลผลิตมากที่สุด
- 1.2.2 เพื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ในการชักนำให้เอนไซม์ และแอนติบอดีผลิตออกมามากที่สุด โดยการปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของ สารชักนำ สภาวะต่างๆ ในการผลิต เช่น อุณหภูมิ ปริมาณ oxygen ค่า pH และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นและเก็บเกี่ยว

- 1.2.3 เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงชีวเคมี (Biochemical analysis) ของเอนไซม์ และแอนติบอดีที่ ถูกผลิตขึ้นด้วยระบบที่ได้พัฒนาขึ้นมา และ แสดงศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้จริงใน อุตสาหกรรมอาหาร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ เป็นการวิจัยเฉพาะในระดับห้องปฏิบัติการ โดยจะใช้เฉพาะเอนไซม์ ที่ได้พัฒนาขึ้นมาแล้วในห้องปฏิบัติการของหัวหน้าโครงการ ๒ ชนิด มาเปรียบเทียบกับ โดย Food-grade expression system ที่ใช้มีเซลล์เจ้าบ้าน หรือ host cell คือ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเป็นระบบที่ใช้ Alanine Racemase (alr) เป็น selection marker และใช้กระบวนการชักนำแบบ quorum sensing ด้วย peptide pheromone ชนิด SpplP

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ยีนของเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases ต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในระดับ อุตสาหกรรม และแสดงออกได้ดีใน *E. coli* ที่ได้พัฒนาแล้วขึ้นมาภายในห้องปฏิบัติการ สามารถนำมา แสดงออกใน Food-grade expression system ที่มี *Lactobacillus plantarum* เป็น host ได้ดีด้วย หลังจากปรับปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยง และการชักนำการแสดงออกของยีนให้เหมาะสม ทั้งนี้ในกรณีที่ต้องการบังคับให้หลั่งออกมาภายนอก อาจจำเป็นต้องมีการปรับและหา signal peptide ที่เหมาะสมสำหรับ ระบบการแสดงออกนี้ โดยระบบการผลิตเอนไซม์ใน *Lactobacillus plantarum* ที่ใช้พลาสมิด pSIP409 ซึ่ง ใช้ Alanine Racemase เป็น selection marker และใช้เปปไทด์ pheromone ชนิด SpplP เป็นตัวชักนำ ให้ยีนแสดงออกซึ่งเป็นระบบที่จะใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นระบบที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม อาหาร เพราะ ไม่ต้องเกี่ยวข้องกับ antibiotic อีกทั้ง *Lactobacillus plantarum* นั้นเป็นเชื้อที่มีสถานะ GRAS (generally recognized as safe) เพราะถูกใช้อยู่ในอุตสาหกรรมอาหารมานาน และมี promoter ที่ ใช้ pheromone ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการชักนำให้ยีนแสดงออก เพื่อผลิตให้ได้เอนไซม์ในปริมาณมาก โดย ไม่มีการรั่วไหล คือหากไม่ใส่ peptide SpplP กระตุ้น พบว่า promoter จะไม่ทำงานเลย ทำให้ควบคุมการ ผลิตเอนไซม์ได้ง่าย และอาจประยุกต์ใช้ในกรณีที่ เอนไซม์ที่ต้องการผลิต มีพิษต่อเซลล์ด้วย (Diep et al., 2009) อีกทั้งยังมีราคาไม่แพง จึงเหมาะสมต่อการนำไปใช้จริง

เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นให้สามารถผลิตเอนไซม์อาจนำไปใช้ใน กระบวนการหมักเพื่อแปรรูปอาหาร เช่นการผลิต oligosaccharide ชนิด GOS, COS, หรือ MOS ซึ่งเป็น สารประเภท prebiotics ทั้งโดยการนำเอนไซม์ที่สกัดออกมาไปใช้ หรือใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ได้ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมโดยตรงในกระบวนการหมัก ส่วนเชื้อที่ผลิตแอนติบอดี จะเป็นแบบจำลองของ การสร้างนวัตกรรม ที่เป็นทางเลือกใหม่ในการ ลดการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา และการป้องกันและรักษา โรค ในแนวทางเดียวกับการใช้ข้าวปรับแต่งพันธุกรรม (GM rice) ในการผลิตแอนติบอดี ต่อเชื้อ rotavirus ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรคท้องร่วงในเด็กในประเทศยากจน ที่เพิ่งมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ (Tokuhara et al., 2013)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Food Enzyme) (James and Simpson, 1996)

เอนไซม์ เป็นสารทางชีวภาพ ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เป็นจำนวนมาก เพราะเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตหลากหลายสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่มีของเสียถูกขับออกมาจากระบบ ทำให้เทคโนโลยีเอนไซม์ เป็นเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ สะอาด เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เหมาะกับการพัฒนาที่ยั่งยืน เอนไซม์กลุ่มหลักที่ถูกนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม คือเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolase เช่น carbohydrases, proteases, และ lipases ซึ่งมีส่วนแบ่งทางการตลาดในราว ร้อยละ ๗๕ ของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมทั้งหมด โดยเอนไซม์ที่มีส่วนแบ่งในการตลาดมากที่สุดคือเอนไซม์ในกลุ่ม proteases ที่มีส่วนแบ่งถึงร้อยละ ๖๐ ส่วนใหญ่อยู่ในอุตสาหกรรม ผงซักฟอก และสารชะล้างทำความสะอาด (detergent) สำหรับเอนไซม์ที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น ก็มีส่วนแบ่งอยู่มาก เช่นเดียวกัน ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases ซึ่งในการประยุกต์ใช้ในอาหารนั้น มีทั้งการใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร (food processing) และเติมลงไปเป็นส่วนหนึ่งของอาหาร เช่น ในกระบวนการผลิต เครื่องดื่ม ขนมอบ ผลิตภัณฑ์นมต่างๆ ใช้เสริมรสชาติ และผิวสัมผัส รวมทั้งใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากเอนไซม์ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น มีความเกี่ยวข้องกับสุขภาพของผู้บริโภคโดยตรง การจะนำเอนไซม์มาใช้ จึงต้องได้รับการรับรองโดยสถาบันที่เกี่ยวข้องก่อน องค์กรที่ทำหน้าที่ตรวจสอบ และรับรองการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ อาทิเช่น FDA (Food and Drug Administration) ในประเทศ สหรัฐอเมริกา หรือ EFSA (European Food Safety Authority) ในกลุ่มประเทศประชาคมยุโรป ในประเทศไทยองค์กรที่ควบคุมคือ ออย. (องค์การอาหารและยา) (Magnuson et al., 2013)

เอนไซม์ทั้งในอาหารสด และ อาหารสำเร็จรูปต่างๆ ส่วนใหญ่จะไม่สามารถทำงานได้แล้ว (in active) หรือมักจะถูกทำลายในทางเดินอาหาร เอนไซม์ในอาหารมีความปลอดภัย เพราะไม่เคยมีรายงานว่าทำให้เกิดพิษ ต่อคนและสัตว์แต่อย่างใด เอนไซม์ส่วนมากที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases ได้แก่ carbohydrase, protease, และ lipase ซึ่งถูกนำมาใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร แทนที่วิธีการทางเคมี และกายภาพที่รุนแรง อาทิเช่นการใช้ ความร้อน แร่งดัน หรือ สารเคมี ดังนั้นการใช้ เอนไซม์ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารจึงเป็นวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ยั่งยืน และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอนไซม์จากธรรมชาติ สำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร นั้น อาจเตรียมได้ จากสัตว์ พืช และจุลชีพ ในกรณีของเอนไซม์จากสัตว์ เนื้อสัตว์จะต้องได้รับการตรวจสอบว่าปลอดภัย และต้องได้รับการเตรียม ถูกต้องตามมาตรฐานสุขอนามัยที่ดี ส่วนเอนไซม์จากพืชและจุลชีพนั้น จะต้องผ่านการตรวจสอบให้แน่ใจว่า ไม่มีสารตกค้างปนเปื้อนในสารสกัดเอนไซม์ที่เตรียมได้ อย่างไรก็ตามการเตรียมให้ได้เอนไซม์ปริมาณมาก และบริสุทธิ์ ให้เพียงพอเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น ทำได้ยากโดยการสกัดจากพืชและสัตว์ ส่วนใหญ่แล้วจึงเตรียมได้จากจุลชีพที่โตได้ง่าย และสามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ในปริมาณมาก โดย หากเป็นเชื้อราส่วนใหญ่จะทำโดยการเลี้ยงเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว (submerged culture) หรือการผลิต

ในรูปแบบ solid-state fermentation (การหมักบนอาหารแข็ง) ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่นิยมมากขึ้น เพราะได้ผลผลิตมากกว่า และเป็นการพยายามใช้ประโยชน์จากของเหลือจากการเกษตรให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้จุลชีพจากธรรมชาติเป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์นั้น มีข้อจำกัดคือ อาจมีสารพิษเช่น mycotoxinปนเปื้อน และการกระตุ้นให้ผลิตในปริมาณมากทำได้ไม่ย่นยาก หรืออาจทำไม่ได้เลยในบางกรณี

แหล่งของเอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มี ๒ แหล่งคือ ๑) จากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ (wild type) ที่น่าเชื่อถือว่าปลอดภัย เช่นในกระเพาะลูกวัว ในอาหารหมักต่างๆ ที่มีการใช้มาเป็นระยะเวลายาวนานโดยภูมิปัญญาชาวบ้าน และ ๒) เอนไซม์ที่ผลิตด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม (recombinant enzyme) เอนไซม์แรกที่ได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคือ rennin หรือ chymosin จากกระเพาะลูกวัวโดย Christian Hansen ในปี ค.ศ. ๑๘๗๔ สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตชีส ในปัจจุบันเอนไซม์ chymosin ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนั้น เป็นเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้นด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม โดยการผลิตจากเชื้อ *E coli* K12 ถือเป็นเอนไซม์ดัดแปลงพันธุกรรมตัวแรกที่ได้รับการรับรองโดย FDA ของประเทศสหรัฐอเมริกา (Olempska-Bier et al., 2006) ในปี ค.ศ. ๒๐๐๑ AMFEP (Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products) ได้ประกาศรายชื่อเอนไซม์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทั้งหมดราว ๑๖๐ รายการ ซึ่งในจำนวนนั้นมีเอนไซม์ ๓๖ รายการที่ผลิตขึ้นจากสิ่งมีชีวิตที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม หรือ GMO (genetically modified organism)

ข้อได้เปรียบประการสำคัญของการประยุกต์ใช้เอนไซม์ดัดแปลงพันธุกรรม (recombinant enzyme) ในอุตสาหกรรมอาหารคือ สามารถผลิตได้ในปริมาณสูงกว่าเอนไซม์จากแหล่งธรรมชาติมาก ทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า จึงมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า รวมทั้งมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนจากสารอื่นๆ เช่น mycotoxin ได้น้อยกว่า อีกทั้งยังสามารถใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรมขั้นสูงในการพัฒนาเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติจำเพาะที่เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยเทคนิค directed evolution (Arnold and Moore, 1997) ส่วนข้อจำกัดประการสำคัญ คือไม่สามารถใช้วิธีการผลิต recombinant protein ทั่วๆ ไป ที่ใช้ antibiotic เป็น selection marker ได้ จึงต้องทำการพัฒนาระบบการผลิต จำเพาะเพื่อใช้สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Food-grade expression system) คือไม่ต้องใช้ antibiotic เป็น selection marker และควรสร้างขึ้นด้วยวิธีการ self-cloning จึงจะทำได้รับการยอมรับในกลุ่มผู้บริโภค นอกจากนั้นแล้วเซลล์เจ้าบ้าน หรือ host ที่จะใช้ในกระบวนการผลิต recombinant enzyme นั้น ควรเป็นจุลชีพที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย หรือมีสถานะ GRAS (generally recognized as safe) อาทิเช่น *Bacilli* หรือ Lactic acid bacteria ประเภทต่างๆ (Peterbauer et al., 2011) ที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ มาเป็นเวลายาวนาน ในปัจจุบัน ประเทศในกลุ่มที่พัฒนาแล้ว ได้มีการวิจัยและพัฒนาระบบการผลิต recombinant enzyme ด้วย food grade expression system มากพอควร ส่วนในประเทศไทย ไม่พบมีรายงานการผลิตและการประยุกต์ใช้ food-grade expression system ในการผลิต เอนไซม์ สำหรับอุตสาหกรรมอาหารมาก่อน

ระบบการแสดงออกของยีนสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Food-grade Expression System). ใน Lactic acid bacteria (Peterbauer et al., 2011)

แบคทีเรียประเภทแลคติกอะซิด (Lactic acid bacteria, LAB) เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ชนิด Gram บวก มีระบบ metabolism คล้ายคลึงกัน คือสามารถผลิตกรด lactic ได้ แบคทีเรีย LAB เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีสถานะปลอดภัยต่อมนุษย์ โดยใน สหรัฐอเมริกา เรียกสถานะนี้ว่า generally recognized as safe (GRAS) ส่วนในสหภาพยุโรปเรียกว่า qualified presumption of safety (QPS) เพราะเป็นแบคทีเรียซึ่งใช้เป็นปกติในกระบวนการหมักอาหารประเภทต่างๆ สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารของคน และสัตว์ ในระยะเวลา ๒ ทศวรรษที่ผ่านมา มีการค้นคว้าวิจัยเชิงลึกในระดับ โมเลกุล ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เพื่อการพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเป็นอันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรีย *Lactobacillus lactis* ซึ่งเป็นชนิดที่ได้รับการศึกษาค้นคว้ามากที่สุด และ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* และ *Streptococci* ทำให้ในปัจจุบันสามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ สำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในระดับอุตสาหกรรม หรือนำไปใช้เป็นแบคทีเรีย probiotic เพื่อสุขภาพ อีกทั้งยังมีการพัฒนาระบบการผลิต โปรตีน เอนไซม์ และ metabolite ต่างๆ ด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม เพื่อให้สามารถผลิตได้ในปริมาณสูง ทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้แบคทีเรียในกลุ่ม LAB จะมีสถานะ GRAS แต่ LAB ที่มีคุณสมบัติเป็น GMO คือได้รับการปรับแต่งพันธุกรรม จะต้องได้รับการตรวจสอบ และยืนยันก่อน ปลอดภัยต่อการใช้เป็นอาหารโดยองค์การที่นำเชื่อถือ เช่น FDA ก่อน ซึ่งการนำ LAB ที่ได้รับการปรับแต่งพันธุกรรมไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น จะถูกควบคุมอย่างเคร่งครัด อาทิเช่น เซลล์เจ้าบ้าน หรือ host strain ที่จะใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ จะต้องมีสถานะ GRAS ต้องได้รับการวิเคราะห์ลักษณะอนุกรมวิธานอย่างถูกต้อง ชัดเจน มีความเสถียร ต้องไม่ใช่ selection maker ที่เป็น antibiotic resistance, หรือ แบบอื่นที่ต้องมีการใส่ โลหะหนัก ในการคัดเลือกและรักษาสภาพ นอกจากนั้นแล้วต้องไม่ผลิตสารพิษ (toxin) และสารที่ก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ (allergens) รวมทั้งวิธีการตัดต่อยีน ต้องเป็นไปตามหลักการ self-cloning และ ระบบการผลิตต้องเป็นระบบที่เสถียร

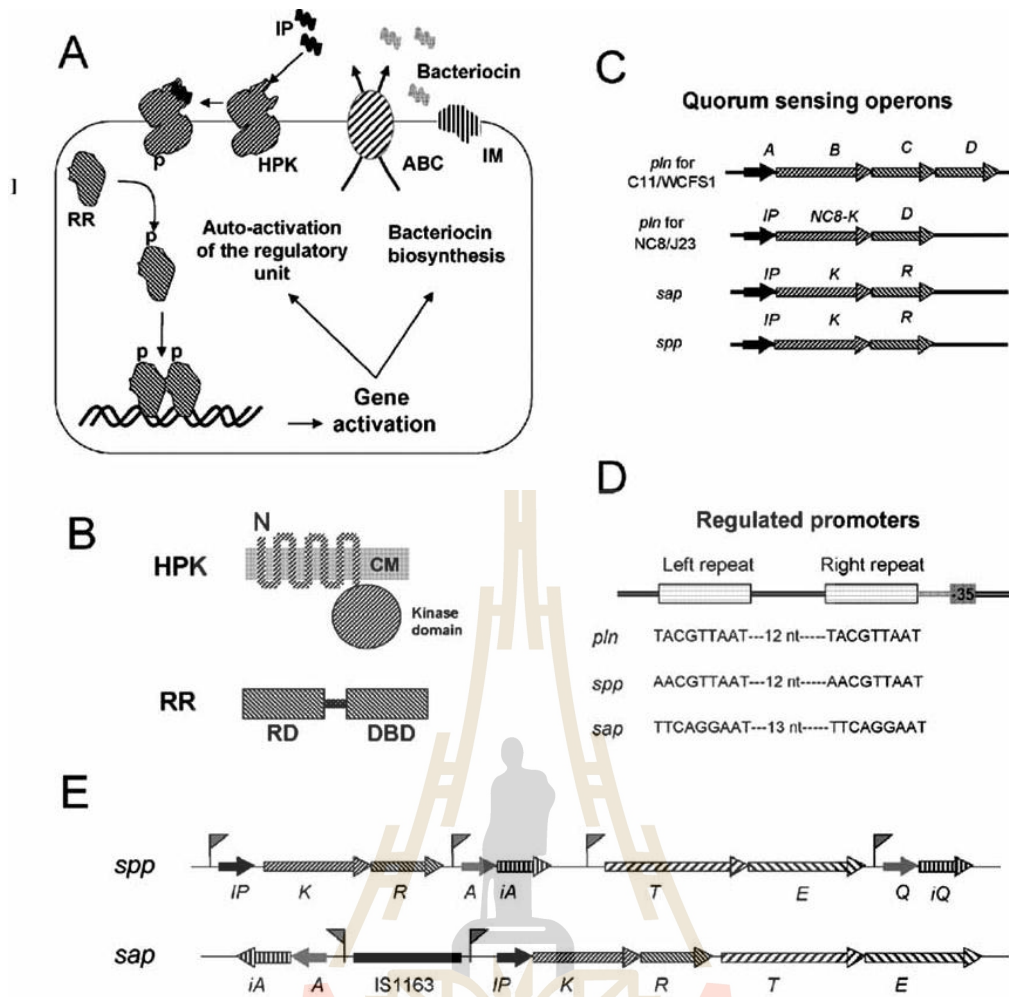
ความหมายของหลักการ self-cloning มีหลายระดับ คืออาจหมายถึงยีนที่นำไปตัดต่อให้แสดงออกต้องมาจากสิ่งมีชีวิตใน genus เดียวกัน หรือหากไม่ใช่ ก็ต้องเป็นยีนจากสิ่งมีชีวิตที่มีสถานะ GRAS ด้วยกัน ทั้งนี้สิ่งมีชีวิตที่ได้รับการปรับแต่งพันธุกรรมด้วยวิธีการ self-cloning ไม่ถือว่าเป็น GMO หากใช้ในวงที่จำกัด แต่จะถูกจัดว่าเป็น GMO ก็ต่อเมื่อมีการปลดปล่อยออกไปสู่ สิ่งแวดล้อม อาทิเช่นการใส่ลงไปผลิตในผลิตภัณฑ์อาหารโดยตรง จนถึงปัจจุบัน มีแบคทีเรียในกลุ่ม LAB ที่ถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการแสดงออกของยีนเพื่อผลิต โปรตีนปรับแต่งพันธุกรรมอยู่มากพอสมควร แต่ส่วนใหญ่เป็นของห้องปฏิบัติการที่คิดค้น ไม่ได้มีขายในท้องตลาด

ระบบการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย LAB ที่สามารถชักนำให้แสดงออกได้ตามความต้องการ (Inducible gene expression system) และมีความปลอดภัยสำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมีหลายชนิด ขึ้นกับ ชนิดของ promoter ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน อาทิเช่น promoter ที่ควบคุมการใช้ น้ำตาล, ควบคุมการผลิต heat shock protein, หรือควบคุมการสังเคราะห์ bacteriocin โดยระบบการแสดงออกประเภทแรกที่ถูกนำมาใช้ในการแสดงออกของยีนเพื่อผลิตโปรตีนปรับแต่งพันธุกรรมสำหรับ

อุตสาหกรรมอาหาร ที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และมีจำหน่ายในท้องตลาด มีอยู่เพียงประเภทเดียวคือ ระบบ NICE (Nisin-Controlled Expression) ซึ่งใช้ Nisin ซึ่งเป็น class I bacteriocins หรือ antibacterial peptide ความยาว ๓๔ กรดอะมิโน เป็นตัวชักนำให้ยีนแสดงออก ซึ่งการชักนำนั้นมีลักษณะเป็นสัดส่วนโดยตรง (linear dose-response) คือหากมีปริมาณสารชักนำมาก จะมีการผลิตโปรตีนออกมา มาก ซึ่งเป็นข้อดีของระบบผลิตโปรตีนประเภทนี้ เพราะสามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีนได้ตาม ต้องการ โดยเฉพาะโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อแบคทีเรีย เรียกระบบการชักนำในลักษณะนี้ว่า **quorum sensing** เพราะเป็นระบบที่แบคทีเรียใช้ควบคุมประชากรในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ จนถึงปัจจุบัน ห้องปฏิบัติการต่างๆ ทั่วโลก ได้พัฒนาระบบการแสดงออกของยีนโดยการชักนำด้วยระบบ quorum sensing ในแบคทีเรียในกลุ่ม LAB อื่นๆ อีก อาทิเช่น ใน *Lactobacillus sakei* และ *Lb. plantarum* โดย ระบบการแสดงออกของยีนใน *Lb. plantarum* ซึ่งเป็นระบบที่จะใช้ในโครงการวิจัยนี้ แสดงดังในรูปที่ ๒

ระบบการผลิตโปรตีนด้วย pheromone-based quorum sensing ใน *Lactobacillus plantarum* (Diep et al., 2009)

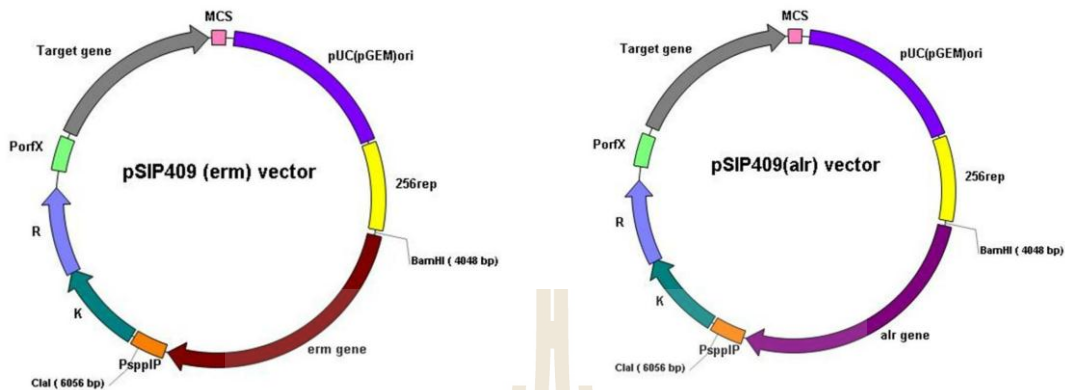
ระบบการแสดงโปรตีน ใน *L. plantarum* เป็นระบบที่ใช้ promoter ที่ควบคุมการทำงานแบบ quorum sensing สำหรับการสังเคราะห์สารต่อต้านแบคทีเรีย bacteriocin ชนิด sakasin A และ P ซึ่ง สามารถใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนได้ทั้งใน *Lactobacillus sakei* และ *Lactobacillus plantarum* โดยพลาสมิด ที่ใช้ในการควบคุมการแสดงออกด้วยระบบ quorum sensing ของ sakasin นี้ คือ pSIP vectors (รูปที่ ๓) ซึ่งถูกออกแบบมาเป็นสัดส่วนต่างๆ ได้แก่ ส่วน promoter, ยีนที่ต้องการ แสดงออก, replicon, และ selection marker เพื่อให้ง่ายต่อการตัดต่อให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการ ใช้งานต่างๆ ในขั้นแรก selectable marker ของ pSIP vector เป็น antibiotic resistance ต่อ erythromycin ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเป็น selection marker ชนิดอื่นที่เหมาะสมกับการใช้ในอุตสาหกรรม อาหาร ซึ่งมีให้เลือกใช้ได้หลายรูปแบบ อาทิเช่น alanine racemase ซึ่งจะใช้ในโครงการนี้



รูปที่ ๒ แผนภาพแสดงการควบคุมการทำงานของยีนแบบ quorum sensing สำหรับการสร้าง bacteriocin ใน *Lactobacilli* (Diep et al., 2009) รูป A ABC คือโปรตีน transporter ทำหน้าที่ส่ง inducing peptide (IP) และ bacteriocin ออกนอกเซลล์; IM คือ immunity protein ช่วยคุ้มกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายโดย bacteriocin; HPK คือ histidine protein kinase, CM คือ cell membrane หรือผนังเซลล์ เมื่อ HPK จับกับ IP ส่วนที่โผล่ออกมาทางด้านในเซลล์ (cytoplasmic domain) จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation); RR คือ response regulator ประกอบด้วย receiver domain (RD)1 ซึ่งจะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต ด้วย HPK และ DNA-binding domain (DBD) รูป B แสดงโครงสร้างของ HPK และ RR รูป C แสดงแผนผังของ operon ที่ควบคุมการผลิต plantaricins (pln), sakacin A (sap) และ sakacin P (spp) รูป D แสดงรายละเอียดของลำดับ DNA ของ promoter ที่เกี่ยวข้องต่างๆ รูป E แสดงแผนผังของ spp regulon และ sap regulon ยีน IP, K, และ R เป็นยีนของ IP, HPK, และ RR; A และ Q เป็นยีนของ bacteriocin precursors; iA และ iQ เป็นยีนของ immunity; T และ E เป็นยีนของ ABC-transporter และโปรตีนประกอบร่วม (accessory protein); IS1163 คือ IS-element; รูปนี้เป็นเครื่องหมายแสดงว่าเป็น promoter ที่สามารถควบคุมการทำงานได้ (regulated promoters)

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะใช้พลาสมิด หรือ vector pSIP409 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ใช้ sakacin P (spp) regulon เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน โดยจะใช้ vector ๒ แบบ คือแบบที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะ

erythromycin เป็น selection marker และ แบบที่ใช้ยีน alanine racemase (*alr*) เป็น selection marker ส่วนประกอบของ vector แสดงดังรูปที่ ๓



รูปที่ ๓ แผนผังของเวกเตอร์ pSIP409 ที่ใช้ในการวิจัยนี้

ยีนเป้าหมาย (target) ที่อยู่ในเวกเตอร์นี้สามารถถูกชักนำให้แสดงออกด้วย inducing peptide SpplP ซึ่งมีความยาว ๑๙ กรดอะมิโน และมีลำดับเป็น Met-Ala-Gly-Asn-Ser-Ser-Asn-Phe-Ile-His-Lys-Ile-Lys-Gln-Ile-Phe-Thr-His-Arg ซึ่งสามารถชักนำการแสดงออกของยีนโดยจะจับกับ promoter PssIP ซึ่งเป็น promoter ที่ควบคุมได้ดีมาก ไม่มีการรั่ว (leak) หากไม่มีตัวกระตุ้น ยีนที่ถูกคุมจะไม่สามารถแสดงออกได้เลย โดยปริมาณของ inducing peptide ที่ต้องใช้เพื่อให้สามารถชักนำการแสดงออกของยีนนั้น อยู่ในระดับต่ำ คือในช่วง 10-25 ng/ml จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย อีกทั้งความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนยังแปรผันแบบตรงกับปริมาณ peptide ที่ใช้เมื่อความเข้มข้นของเปปไทด์อยู่ในระดับต่างๆ อีกด้วย เวกเตอร์นี้สามารถใช้แสดงออกได้ทั้งใน เชื้อ *Lactobacillus sakei* และ *Lactobacillus plantarum*

ในโครงการวิจัยนี้ จะใช้ *Lactobacillus plantarum* เนื่องจาก เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการศึกษาวิจัยมาอย่างดี แบคทีเรียใน species นี้ถูกคัดแยกมาได้จากหลายแหล่ง เช่น อาหารหมัก, เศษพืช, อุจจาระ, และของเหลวในช่องคลอด และลำไส้ ส่วนใหญ่แล้วมีสถานะ GRAS (Diep et al., 2009) และมีคุณสมบัติเป็น probiotic และมีความทนทานสูงในระบบทางเดินอาหาร จึงมีความเหมาะสมในการพัฒนาเป็น functional food, โภชนเภสัชภัณฑ์ (nutraceutical) รวมทั้งเป็นพาหนะส่งผ่านโมเลกุล (delivery vehicle ไปยังช่องว่างต่างๆ ในร่างกาย (body cavities) เพื่อการรักษา หรือป้องกันโรคแนวใหม่

เนื่องจากเป้าหมายของโครงการนี้ ต้องการประยุกต์ใช้ระบบการแสดงออกของยีน เพื่อผลิต recombinant protein สำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแท้จริง vector ที่ใช้ในการแสดงออกของยีน จึงต้องใช้ selection marker ที่เหมาะสม โดยในโครงการวิจัยนี้จะใช้ alanine racemase เนื่องจากมีข้อดีคือ เป็น selection marker แบบเติมเต็ม (complement) จึงไม่ต้องใส่สารใดๆ เพิ่มเติมลงในน้ำเลี้ยงเชื้อ ทำให้ช่วยลดต้นทุนได้ alanine racemase เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย เพราะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน L-alanine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบได้ทั่วไปธรรมชาติ และอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้เป็น D-alanine ซึ่งจำเป็นในกระบวนการสร้าง cell wall ของแบคทีเรีย โดยในแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococci*

และ *Lactobacilli* นั้น มียีน *alr* เพียงยีนเดียว (Bron et al., 2002) ดังนั้นจึงสามารถกำจัดออกได้ง่าย เพื่อสร้าง mutant ของ host ที่ไม่มียีนของเอนไซม์นี้อยู่ โดย host strain ที่จะใช้ซึ่งยีน *alr* ถูกกำจัดออกไปคือ *Lactobacillus plantarum* WCFS1 ดังนั้น cells นี้จะโตได้เฉพาะเมื่อมี vector pSIP409 (*alr*) อยู่เท่านั้น โดยการผลิต recombinant protein นั้น อาจกำหนดให้อยู่ภายในเซลล์ หรือให้หลั่งออกมาภายนอกโดยการเชื่อมต่อกับ signal peptide ที่เหมาะสมด้วยก็ได้ อย่างไรก็ตามความสามารถของ vector นี้ในการผลิต recombinant protein ที่ต้องการนั้น ทั้งแบบที่อยู่ภายในเซลล์ หรือให้หลั่งออกมาภายนอกนั้น อาจคาดเดาได้ยาก เพราะขึ้นกับชนิดของ โปรตีน จึงต้องลองทำการค้นคว้าวิจัยดูว่าโครงสร้างของยีนของ recombinant enzyme แบบใดจึงจะเหมาะสมที่สุด อีกทั้งยังต้องทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต recombinant protein ให้มากที่สุด โดยการปรับเปลี่ยน ปัจจัยภายนอกต่างๆ อาทิเช่น อุณหภูมิ, ปริมาณของ inducing peptide, pH, ความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น และระยะเวลาในการชักนำเป็นต้น (Diep et al., 2009)



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย ผลการวิจัย และการวิเคราะห์วิจารณ์ผลที่ได้

3.1 การพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ beta-mannanase และ chitosanase ด้วย *Lactobacillus plantarum* food grade expression system โดยให้เอนไซม์หลั่งออกมาภายนอก

ผู้วิจัยได้ทำการวิจัย โดยมีนักศึกษาปริญญาโท คือ นางสาวปวีณา นามวิจิตร เป็นผู้ทำวิจัยส่วนเอนไซม์ Chitosanases (CsnA) และ นักศึกษาปริญญาเอก นายสุทธิพงษ์ ศักดิ์อุบล เป็นผู้ทำวิจัยส่วน beta-Mannanase (ManB) จากนั้นได้นำผลการวิจัยไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มีการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิ (peer review) ซึ่งมีค่า ดัชนีผลกระทบ 4.4 อยู่ใน Q1 โดยเป็นการร่วมมือกับมหาวิทยาลัย BOKU กรุงเวียนนา ประเทศ ออสเตรีย และ UNMB ประเทศ นอร์เวย์ ด้วย

Sak-Ubol, S., Namvijitr, P., Pechsrichuang, P., Haltrich, D., Nguyen, T.H., Mathiesen, G., Eijsink, V.G., and Yamabhai, M. (2016). Secretory production of a beta-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system. *Microb Cell Fact* 15, 81.


รายละเอียด วิธีการทดลอง ผลการวิจัย การวิเคราะห์ และวิจารณ์ผล แสดงในหน้าถัดไปทั้งหมด ๑๒ หน้า

RESEARCH

Open Access



Secretory production of a beta-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system

Suttipong Sak-Ubol^{1,2†}, Peenida Namvijitr^{1†}, Phornsiri Pechsrichuang¹, Dietmar Haltrich², Thu-Ha Nguyen², Geir Mathiesen³, Vincent G. H. Eijsink³ and Montarop Yamabhai^{1*} 

Abstract

Background: Heterologous production of hydrolytic enzymes is important for green and white biotechnology since these enzymes serve as efficient biocatalysts for the conversion of a wide variety of raw materials into value-added products. Lactic acid bacteria are interesting cell factories for the expression of hydrolytic enzymes as many of them are generally recognized as safe and require only a simple cultivation process. We are studying a potentially food-grade expression system for secretion of hydrolytic enzymes into the culture medium, since this enables easy harvesting and purification, while allowing direct use of the enzymes in food applications.

Results: We studied overexpression of a chitosanase (CsnA) and a β -mannanase (ManB), from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, respectively, in *Lactobacillus plantarum*, using the pSIP system for inducible expression. The enzymes were over-expressed in three forms: without a signal peptide, with their natural signal peptide and with the well-known OmpA signal peptide from *Escherichia coli*. The total production levels and secretion efficiencies of CsnA and ManB were highest when using the native signal peptides, and both were reduced considerably when using the OmpA signal. At 20 h after induction with 12.5 ng/mL of inducing peptide in MRS media containing 20 g/L glucose, the yields and secretion efficiencies of the proteins with their native signal peptides were 50 kU/L and 84 % for ManB, and 79 kU/L and 56 % for CsnA, respectively. In addition, to avoid using antibiotics, the erythromycin resistance gene was replaced on the expression plasmid with the alanine racemase (*alr*) gene, which led to comparable levels of protein production and secretion efficiency in a suitable, *alr*-deficient *L. plantarum* host.

Conclusions: ManB and CsnA were efficiently produced and secreted in *L. plantarum* using pSIP-based expression vectors containing either an erythromycin resistance or the *alr* gene as selection marker.

Keywords: β -Mannanase, Chitosanase, *L. plantarum*, pSIP, Alanine racemase, Secretion, Food-grade, *Bacillus*, Signal peptide, OmpA

Background

Heterologous production of hydrolytic enzymes is important for green and white biotechnology since such enzymes serve as green industrial biocatalysts for the

conversion of biomass into value-added products [1]. Lactic acid bacteria (LAB) are interesting hosts for the production of such enzymes because many of these bacteria are generally recognized as safe (GRAS), carry the qualified presumption of safety (QPS) status, and are easy to cultivate [2]. While LAB may not be the most efficient cell factories, their safety and food-grade status make them particularly attractive for producing enzymes that are to be used in e.g. food processing. One attractive host is *Lactobacillus plantarum*, as it had been widely used for foods, and hence is food-grade and even considered

*Correspondence: Montarop@sut.ac.th; montarop@g.sut.ac.th

[†]Suttipong Sak-Ubol and Peenida Namvijitr contributed equally to this work

¹ Molecular Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

Full list of author information is available at the end of the article



a probiotic [3] with potential benefits to human health [4]. To facilitate downstream processing in large-scale biotechnological applications, secretion of the over-expressed enzymes into the culture medium is desirable [5]. Therefore, lactobacillal expression systems based on the so-called pSIP vectors [6, 7] have been developed recently for the efficient secretion of heterologous proteins in *L. plantarum* [8].

In the present study we selected two extracellular, hydrolytic enzymes from *Bacillus*, a β -mannanase from *Bacillus licheniformis* (BManB) and a chitosanase from *Bacillus subtilis* (BsCsnA), to study secretory production in *L. plantarum*. Both enzymes are of interest for biotechnological applications, namely the conversion of hemicelluloses (mannans) and chitosan into manno-oligosaccharides (MOS) [9] and chito-oligosaccharides (CHOS) [10], respectively. For comparative purposes, these enzymes were overproduced in three forms: with no signal peptide, with their native (*Bacillus*) signal peptide, and with a signal peptide derived from the *Escherichia coli* OmpA protein. In addition, we compared two different selection markers, one based on antibiotic (erythromycin) resistance, and the other based on complementation selection using alanine racemase (*alr*). The engineered production strains were evaluated in terms of enzyme yields and secretion efficiencies.

Results

Construction of expression vectors

Genes encoding a mannan endo-1,4- β -mannosidase or 1,4- β -D-mannanase (EC 3.2.1.78), commonly named β -mannanase (ManB), from *B. licheniformis* strain DSM13 [11] and a chitosan *N*-acetylglucosaminohydrolase or chitosanase (EC 3.2.1.132) (CsnA, previously termed Csn) from *B. subtilis* strain 168 [12] were initially cloned into pSIP409 [7]. Subsequently, the erythromycin resistance gene (*erm^R*) in the pSIP409-based constructs was replaced with the alanine racemase gene (*alr*) [13, 14] to generate food-grade pSIP609 expression vectors, as shown in Fig. 1. Each gene was cloned in three forms: with no signal peptide (BManB_noSP and BsCsnA_noSP), with their native signal peptides (BManB_nt and BsCsnA_nt) or with the *E. coli* OmpA signal peptide (BManB_OmpA and BsCsnA_OmpA). The ability of the signal peptides to direct the secretion of these enzymes in *E. coli* has previously been reported [12, 15].

Expression and secretion of BManB and BsCsnA in *L. plantarum*

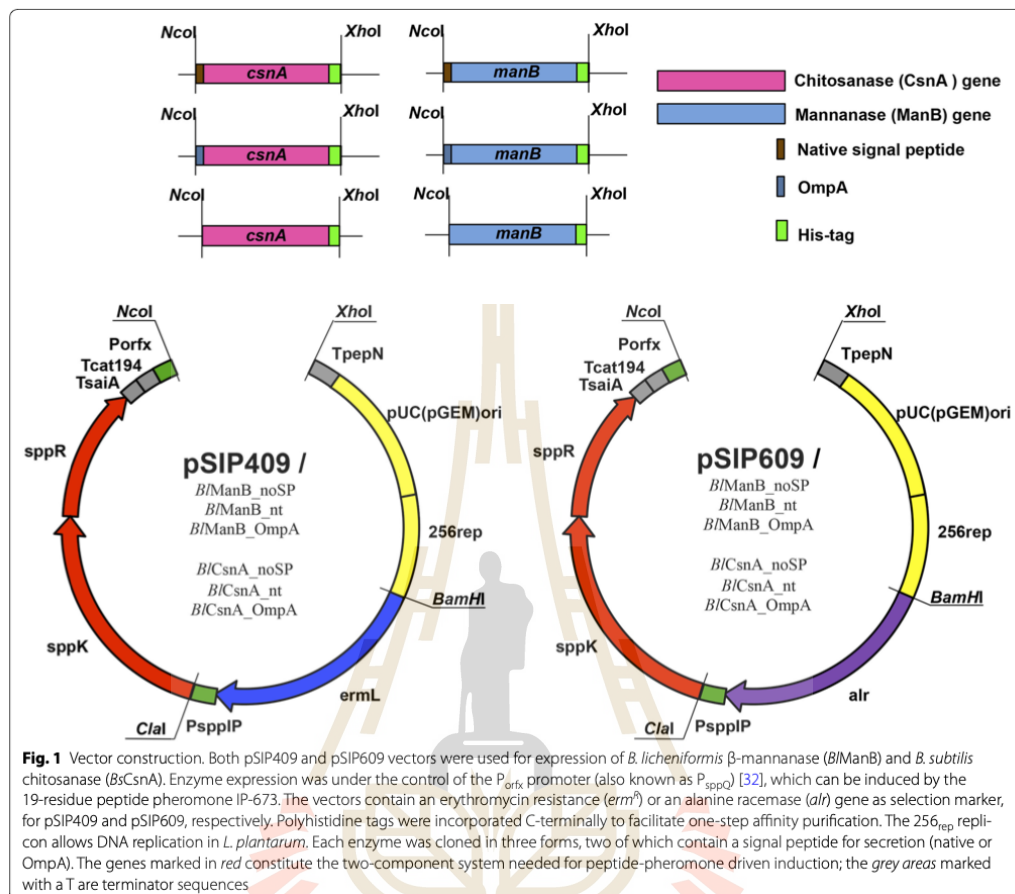
Recombinant strains of *L. plantarum* were grown in 3-L fermenters using MRS medium as described in the "Methods" section. The pH of the culture was controlled

at 6.5 using a 3 N NaOH solution. Enzyme activities were determined in both culture supernatants and cell lysates to calculate volumetric activities at different time points during the cultivations (Fig. 2; Table 1). Both *Bacillus* enzymes were secreted when using either of the two signal peptides, yet using the native signal peptides resulted in both the highest total production levels and the highest secretion efficiencies. While these data show that the OmpA signal peptide from Gram-negative *E. coli* does function in *Lactobacillus*, they also indicate that signal peptides from Gram-positive bacilli work better.

The genome of *L. plantarum* WCFS1 does not encode any known β -mannanase or chitosanase (www.cazy.org; [16]). Since mannanase activity in certain *L. plantarum* strains has however been reported [17], we checked the intrinsic β -mannanase and chitosanase activities in *L. plantarum* WCFS1 and its *alr* derivative TGL02, which were used as host strains in this study. Using the same fermentation and analytical procedures as above, we could not detect any chitosanase activity in the cell lysate or the culture supernatant of either strain. As for β -mannanase activity, we did not detect any activity in the lysates, while a trace amount of β -mannanase activity was detected in culture supernatants (about 150 units/L; i.e. less than 1 % of typical values shown in Fig. 2). Thus, the enzyme activities reported and discussed in this study are essentially devoid of background activity from the host bacterium.

Purification and analysis of secreted BManB and BsCsnA

ManB and CsnA produced using the native or the *E. coli* signal peptide were purified from culture broths and cell lysates by single-step immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and analyzed by SDS-PAGE. Figure 3 shows that all recombinant enzymes could be purified to a high degree of homogeneity. Routinely, 12 or 9 mg of purified ManB, and 25 or 12 mg of purified Csn, for constructs containing the native or the *E. coli* signal peptide, respectively, could be obtained from 1 L of culture medium. These rather low purification yields in the range of 20–30 % result from strict pooling of only the purest and most active fractions from the IMAC step. The specific activities of purified ManB and CsnA were approximately 1800 and 800 U/mg, respectively, for all samples of purified protein. Determination of the N-terminal sequences of the purified proteins by Edman degradation (Fig. 4) showed that the native *Bacillus* signal peptides of both ManB and CsnA were correctly processed by the *L. plantarum* secretion machinery. For technical reasons the two OmpA signal peptides contained minor variations (Fig. 4), which led to slight variations in processing. For ManB, the protein secreted with OmpA had the same



N-terminal sequence as the protein secreted with its native signal peptide, while CsnA secreted with OmpA contained an additional serine residue at its N-terminus.

Expression of *B/ManB* and *BsCsnA* using a food-grade vector system

To demonstrate the applicability of the secretory production of recombinant ManB and CsnA in the food biotechnology industry, the antibiotic selection marker in the pSIP409/*B/ManB* and pSIP409/*BsCsnA* expression vectors was replaced with the alanine racemase (*alr*) gene [13, 18]. Based on the results of the experiments described above, only constructs with native signal peptides were used. The resulting expression plasmids,

pSIP609/*B/ManB* and pSIP609/*BsCsnA* (Fig. 1) were transformed into *L. plantarum* strain TLG02, which is an D-alanine auxotroph [14]. The cultivation conditions were similar to those used for strains harboring pSIP409-derived vectors, except that no antibiotic was added in the culture media. Figure 5 shows a comparison of the volumetric activities of *B/ManB* and *BsCsnA* using either *erm^R* or *alr* as selection marker, at various time points after induction. For both enzymes, production levels were higher for the constructs with the *erm^R* selection marker, and this was almost exclusively due to higher levels of secreted enzymes. The level of intracellular enzyme activities was hardly affected by the change in the resistance marker, and, consequently, the calculated secretion

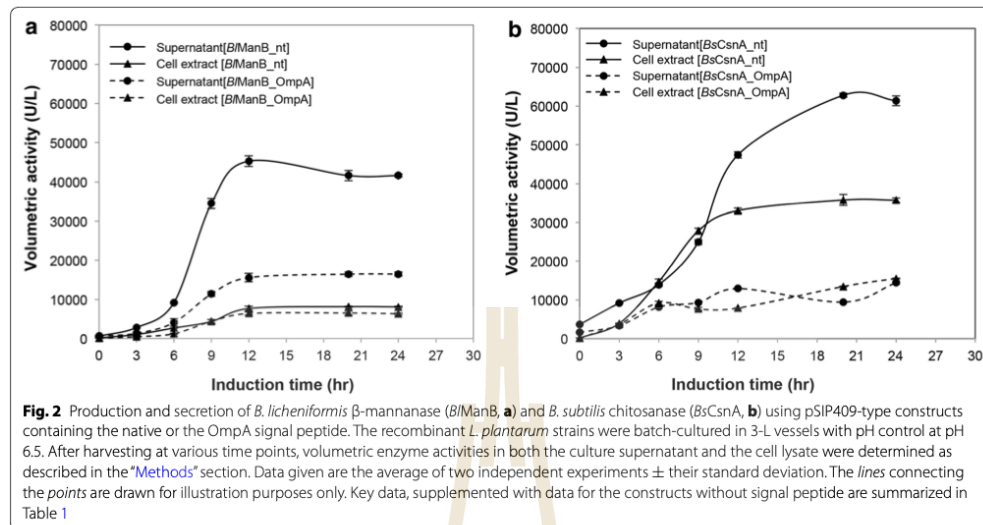


Table 1 Yields and secretion efficiency for production of *BManB* and *BsCsnA* in *L. plantarum* WCFS1 harboring various expression constructs based on the pSIP409 vector

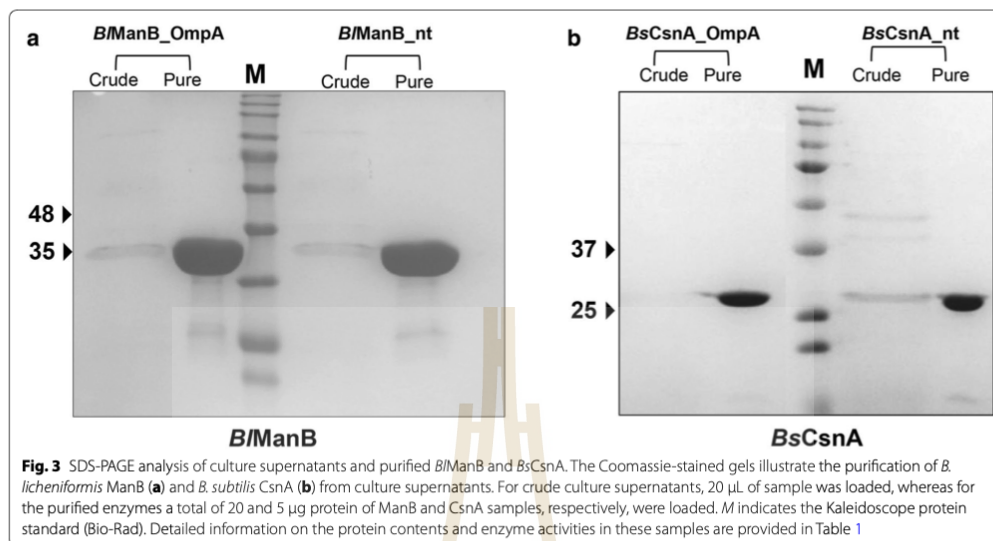
Enzyme	Type of SP	Volumetric activity (per liter)			% Secretion efficiency	Specific activity (U/mg)	
		Broth	Cell extract	Total		Broth	Cell extract
ManB	Native SP	42 \pm 1.3 kU	8 \pm 0.2 kU	50 \pm 1.5 kU	83.7	139	47
	OmpA SP	16 \pm 0.6 kU	7 \pm 0.3 kU	23 \pm 0.9 kU	71.6	84	39
	No SP	5 \pm 0.2 kU	20 \pm 0.9 kU	25 \pm 1.1 kU	19.0	–	92
CsnA	Native SP	63 \pm 0.5 kU	36 \pm 1.4 kU	99 \pm 1.9 kU	63.7	195	168
	OmpA SP	9 \pm 0.03 kU	13 \pm 0.1 kU	22 \pm 0.13 kU	41.2	90	97
	No SP	1 \pm 0.05 kU	15 \pm 0.7 kU	16 \pm 0.8 kU	6.7	–	65

The data were obtained from the culture harvested at 24 h after induction as described in "Methods" section. Data given are the average of two independent experiments \pm their standard deviation. Percentage secretion efficiency was calculated by dividing the enzyme activity in the culture broth by the total enzyme activity (broth + cell extract) \times 100

efficiencies were lower when using the *alr*-based vectors. A summary of total volumetric activity and secretion efficiency obtained using *alr* selection is provided in Table 2. The expression and secretion of recombinant *BManB* and *BsCsnA* with the food-grade *L. plantarum* expression system could also be detected by SDS-PAGE analysis of culture supernatants (Fig. 6a–c), showing strong enzyme bands. For the CsnA-producing strain, we assessed the effect of increased glucose supply; as expected, higher cell densities were obtained (Fig. 6), but total enzyme production was only marginally increased and the secretion efficiency went slightly down (Table 2).

Discussion

In this study we show that a β -mannanase (*BManB*) from *B. licheniformis* as well as a chitosanase (*BsCsnA*) from *B. subtilis* can be expressed and secreted efficiently in *L. plantarum* using the pSIP expression system. Both enzymes were produced and secreted at high levels compared to the levels previously obtained using *E. coli* expression systems [11, 12], also when using a potentially food-grade vector system that does not depend on the use of an antibiotic resistance selection marker. When estimated from the specific activities of the purified enzymes (1800 U/mg for ManB and 800 U/mg for CsnA),



total yields of recombinant proteins were \sim 28 mg/L medium for ManB produced with its native signal and a pSIP409-based vector, and \sim 127 mg/L of recombinant CsnA, again when using the native signal and a pSIP409-derived vector, 24 h after induction (Table 1). The amount of secreted, extracellular recombinant protein for these constructs was \sim 23 mg/L medium for ManB and \sim 79 mg/L for CsnA, showing again the efficient secretion of these recombinant enzymes. Replacement of the selection marker from *erm^R* to *alr* led to slightly lower expression levels (\sim 22 mg of total ManB and \sim 17 mg of secreted ManB per L medium; \sim 86 mg of total CsnA and \sim 39 mg of secreted CsnA per L medium; calculated from data given in Table 2 and the specific activities of the purified enzymes). The lower overall expression levels with the *alr* marker could reflect different plasmid copy numbers due to different selective pressures. Indeed, a previous comparative study on intracellular expression of β -galactosidases showed that *alr* selection led to lower plasmid copy numbers and slightly lower protein production levels [14]. Since the difference in expression level primarily concerned the secreted fraction of the produced protein, one could also speculate about connections between cell wall metabolism (which is effected by the *alr* mutation) and protein secretion.

It should be noted that further optimization can be done to obtain higher production levels with the various expression set-ups developed here. Possible variables

include the glucose concentration and the glucose-feeding regime, the amount of inducing peptide added as well as the time point of induction, the cultivation temperature, and the harvesting time [19].

The potential of using pSIP vectors for both intracellular protein production and protein secretion has been previously reported for model enzymes such as nuclease (NucA) and amylase (AmyA) [20] as well as other enzymes including β -glycosidases [21], oxalate decarboxylase [22, 23], cellulases and xylanases [24], and L-arabinose and D-xylose isomerases [25]. Most of these studies used pSIP vectors with the *erm* antibiotic selection marker, with the exception of studies on the expression of intracellular β -galactosidase [14], and L-arabinose and D-xylose isomerase [25], in which the food-grade *alr* selection marker was used. The present results underpin the usefulness of the *alr* selection marker for food-grade applications.

Notably, since the pSIP vector is a modular plasmid, existing constructs could easily be modified to suit desired purposes [7]. For example, the p256 replicon, which only functions in a limited range of lactobacilli [26] could be exchanged to allow broader host range. This could be useful because lactobacilli have different properties when it comes to e.g. probiotic activity, acid production, production of antimicrobial compounds such as bacteriocins, and the ability to interact with the human mucosa [5]. Notably, if the *alr* selection marker is to be used, application of pSIP vectors in other lactobacilli

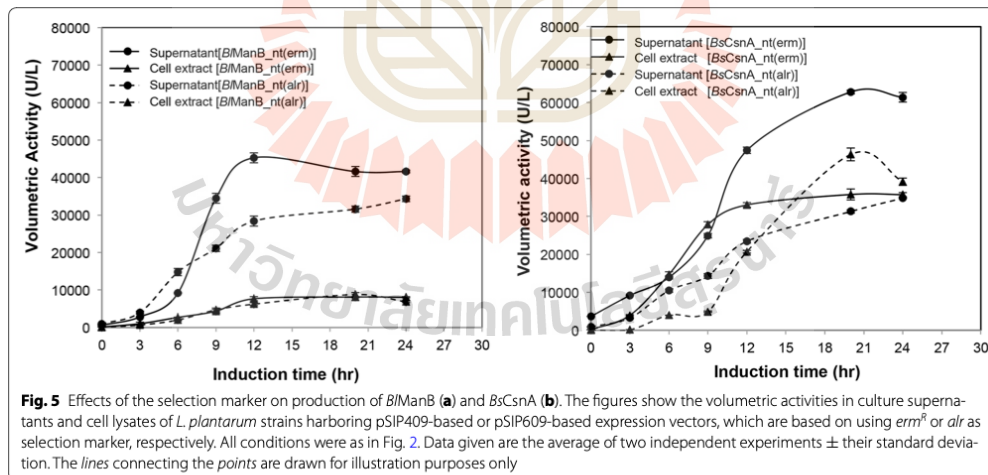
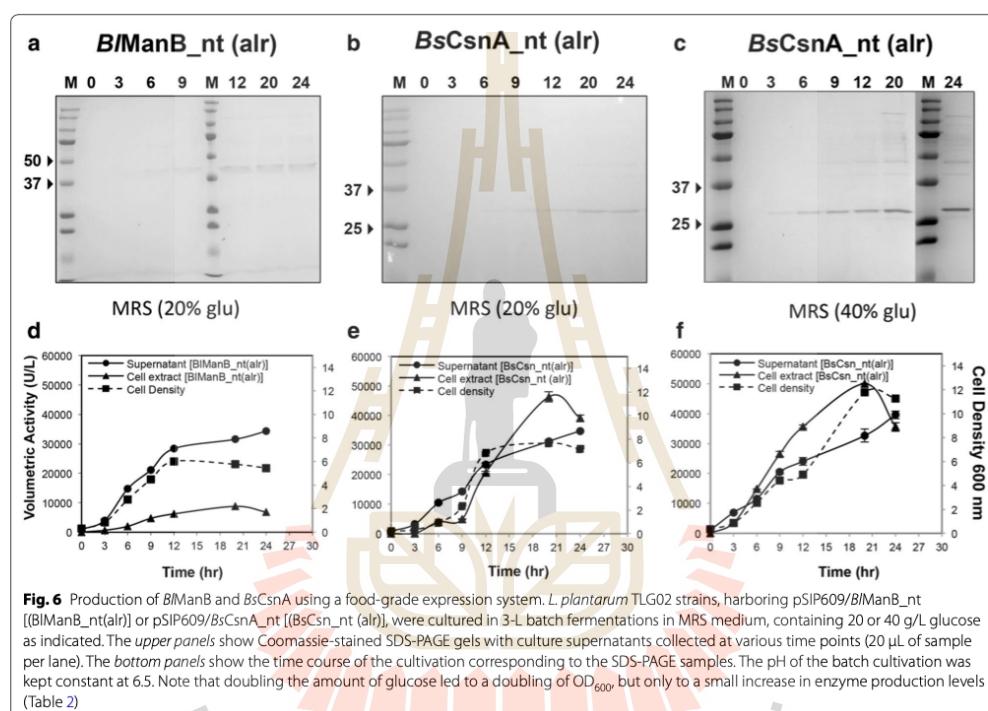


Table 2 Yields and secretion efficiency for production of *B/ManB_nt* and *BsCsnA_nt* by *L. plantarum* TLG02 (D-alanine auxotroph), measured 20 h after induction

Enzyme	Glucose (g/L)	Volumetric activity (per liter)			% Secretion efficiency
		Broth (kU)	Cell extract (kU)	Total (kU)	
ManB	20	31 ± 0.8	9 ± 0.2	40 ± 1	78.2
CsnA	20	31 ± 0.5	38 ± 0.7	69 ± 1.2	45.1
CsnA	40	33 ± 0.1	50 ± 2.2	83 ± 2.3	39.5

Data given are the average of two independent experiments ± their standard deviation



would require the engineering of D-alanine auxotrophs for each host strain [14].

The native signal peptides of the two *Bacillus* hydrolytic enzymes functioned well in that they gave good secretion efficiencies, comparable to those obtained with the better performing signal peptides of *L. plantarum* itself, as assessed in previous genome-wide signal peptide-screening studies [20]. Since *Bacillus* also is a Gram-positive bacterium, it is not surprising that the native *Bacillus*

signal peptides were efficient in directing secretion of heterologous proteins in Gram-positive *L. plantarum*. The *Bacillus* ManB signal peptide seemed particularly efficient reaching secretion efficiencies in the order of 80 %, and should perhaps be considered for use in secretion of other heterologous proteins in *L. plantarum*.

The data presented above show that the choice of the signal peptide not only affects the secretion efficiency but also the total expression level. This has been observed

before [8, 20] and is likely due to effects of the 5' part of the gene sequence and/or the amino acid sequence of the N-terminal part of the translated protein on overall translation efficiency [27]. The level of protein production apparently determines the secretion efficiency as well. It is likely that when the protein is expressed above a certain critical amount, saturation of the secretion machinery will occur [28, 29]. The latter could be the case for *BsCsnA*, which is expressed at more than three-fold higher levels and even secreted in higher amounts, but with a lower overall secretion efficiency compared to *B/ManB* (Table 1). Possibly, enzyme size also plays a role; the better produced *BsCsnA* (~30 kDa) is smaller than *B/ManB* (~41 kDa).

Conclusions

An efficient expression and secretion system for food-grade production of a β -mannanase (ManB) and a chitosanase (CsnA) in *L. plantarum* has been established. Our results indicate that native *Bacillus* signal peptides can be used for efficient expression and secretion of heterologous proteins in *L. plantarum*, providing an alternative for homologous, and, in a sense, more "food-grade" lactobacillar signal peptides. The modular pSIP vectors and the *alr* selection marker provide useful tools for the expression of heterologous proteins in *L. plantarum*.

Methods

Materials

Plasmids *CsnNative*-pMY202 and *CsnOmpA*-pMY202 containing the chitosanase (*csnA*) gene from *B. subtilis* with its native or the OmpA signal peptide, respectively, and a C-terminal His-tag [12] were used as templates for amplification of chitosanase constructs in this study. The plasmid *manBOmpA*-pMY202 [11] was used as template for amplification of the *B. licheniformis manB* gene containing the OmpA signal peptide. *B. licheniformis* DSM13 (NCBI accession number NC006322.1) genomic DNA was used as a template for amplifying a *manB* variant containing the native signal peptide. *E. coli* Top10 and MB1259 cells were used for molecular cloning with the pSIP409 and pSIP609 vectors, respectively. *L. plantarum* strains WCFS1 [30] and TGL02 [14] were used for expression studies with pSIP409 and pSIP609, respectively.

Constructs based on pSIP409 (antibiotic selection)

Because of the internal *NcoI* restriction site in the *manB* and *csn* genes, preventing straightforward restriction cloning, a sticky PCR-based method [31] was used to insert the two genes in between the *NcoI* and *XhoI* sites of the pSIP409 expression vector. All oligonucleotide primers used in this study are listed in Table 3 and were

Table 3 Oligonucleotide primers used in this study

Construct	Name	Sequence (5'-3')
<i>BsCsnA</i> _nt	<i>B.subCsnfwNcollong</i>	CATGAAAATCAGTATGCAAAAAGCAGATTTTTGG
	<i>B.subCsnfwNcolshort</i>	AAAATCAGTATGCAAAAAGCAGATTTTTGG
<i>BsCsn</i> _OmpA & <i>B/ManB</i> _OmpA	6HisXholrvlong	TCCGAGTCAATGGTGATGGTGATGGTG
	6HisXholrvshort	GTCAATGGTGATGGTGATGGTG
	FlagNcolfwlong	CATGAAAAAGACAGCTATCCGGATTG
	FlagNcolfwshort	AAAAAGACAGCTATCCGGATTG
<i>B/ManB</i> _nt	6HisXholrvlong	TCCGAGTCAATGGTGATGGTGATGGTG
	6HisXholrvshort	GTCAATGGTGATGGTGATGGTG
	<i>B.IIManBfwNcollong</i>	CTAGAAAAAACAATCGTTTTGTTCAATCT
<i>BsCsnA</i> _noSP	<i>B.IIManB6HisXholshort</i>	AAAAAAAACATCGTTTTGTTCAATCTTCG
	<i>B.IIManB6HisXholshort</i>	TCCGAGTCAATGGTGATGGTGTTCCACGACAGGCGTCA
	<i>B.SubMatCsnNcolFwlong</i>	GTCAATGGTGATGGTGTTCCACGACAGGCGTCA
	<i>B.SubMatCsnNcolFwshort</i>	CATGGCGGGACTGAATAAAGATC
<i>B/ManB</i> _noSP	6HisXholrvlong	GCGGGACTGAATAAAGATCAAAAAGC
	6HisXholrvshort	TCCGAGTCAATGGTGATGGTGATGGTG
	<i>B.LimanBMatfwNcollong</i>	GTCAATGGTGATGGTGATGGTG
	<i>B.LimanBMatfwNcolshort</i>	CATGGCACACACCGTTTTCTCCGGTG
<i>B/ManB</i> _noSP	6HisXholrvlong	GCACACACCGTTTTCTCCGGTG
	6HisXholrvshort	TCCGAGTCAATGGTGATGGTGATGGTG
	6HisXholrvshort	GTCAATGGTGATGGTGATGGTG

The primers used for the construction of each construct by sticky-PCR based method are listed. Note that primers 6HisXholrvlong and 6HisXholrvshort were used for every construct except for *B/ManB*_nt. The long and short primer pairs were used to generate sticky 5' or 3' ends as previously described [28]

designed to allow cloning into the *NcoI* and *XhoI* restriction sites of the pSIP plasmids. Generation of sticky PCR products was performed as previously described with some modification [31]. The PCR reaction mixture (total volume of 50 μ L) contained 10 μ M of each primer, 10 mM dNTPs, 1.25 units of *Pfu* DNA Polymerase and 10 \times *Pfu* Buffer with MgSO₄, provided by the manufacturer (Promega, Madison, USA). The amplification conditions for the *csn* gene were as follows: initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 45 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 2 min, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. The amplification conditions for the *manB* gene were as follows: initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 45 s, annealing at 50 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 2.5 min, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. All PCR products and vectors were separated using 1 % agarose gels in 1 \times TAE containing 0.2 μ g/mL of ethidium bromide and visualized under a UV transilluminator. The PCR products and vectors were purified using the Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up system (Promega, Madison, USA). For constructing complete gene inserts, approximately equal amounts of PCR products were mixed together in a PCR tube and heated at 95 °C for 5 min, and then the denatured products were briefly mixed in a vortex mixer. The re-annealing was done in a thermal cycler machine by reducing the temperature slowly from 95 to 25 °C. The total time for re-annealing was in the order of 2–3 h.

Plasmid pSIP409 [32] was digested with *NcoI* and *XhoI*, and gel-purified before being used in ligation reactions. In these reactions the molar ratio of linearized vector to re-annealed insert was approximately 1:15. The amount of linearized vector used for each ligation reaction was 50–100 ng. Ligations were performed for 16 h at 16 °C in

the presence of T4 DNA ligase in a final volume of 25 μ L. T4 DNA ligase was heat-inactivated (65 °C for 15 min) before transformation of the ligation mixtures into competent *E. coli* TOP10 cell. Transformants were selected on LB agar containing 800 μ g/mL erythromycin; plates were incubated at 37 °C for 16 h.

Construction of food-grade expression vectors (pSIP609 series)

Food-grade expression vectors for the production of recombinant *BtManB* and *BsCsnA* were constructed by replacing the *erm^R* gene with the *alr* obtained from pSIP609 [14]. The *erm^R* genes in pSIP409/*BsCsnA_nt*, pSIP409/*BsCsnA_OmpA*, pSIP409/*BtManB_nt* and pSIP409/*BtManB_OmpA* were exchanged with the *alr* gene using the restriction sites *BamHI* and *ClaI*, resulting in pSIP609/*BsCsnA_nt*, pSIP609/*BsCsnA_OmpA*, pSIP609/*BtManB_nt* and pSIP609/*BtManB_OmpA*, respectively. A list of all plasmids used in this study is shown in Table 4.

Transformation of *L. plantarum*

Lactobacillus plantarum competent cells were prepared and transformed by electroporation as previously described [33]. To transform the competent cells, 2–5 μ g of plasmid DNA was added to 40 μ L of electro-competent cells. The mixture was then transferred to chilled cuvettes. After drying and cleaning the outside of the cuvette it was placed into the electroporator, after which the cells were electroporated at 1.5 kV, followed by incubation on ice for 2 min. After adding 500 μ L of MRS medium containing 0.5 M glucose and 0.1 M MgCl₂ the cells were transferred to a clean 1.5 mL tube and incubated at 30 °C without agitation for 1–2 h. Finally, the cells were plated out on MRS agar plates containing

Table 4 Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Reference
pSIP409gusA	<i>erm</i> , pSIP401 derivative, <i>gusA</i> controlled by <i>PspqQ</i>	[7]
pSIP609gusA	pSIP409 derivative, <i>erm</i> replaced by <i>alr</i>	[34]
CsnNative-pMY202	pFLAG-CTS derivative, <i>csn_nt</i> controlled by <i>tac</i>	[12]
CsnOmpA-pMY202	pFLAG-CTS derivative, <i>csn_OmpA</i> controlled by <i>tac</i>	[12]
manBOmpA-pMY202	pFLAG-CTS derivative, <i>manB_ompA</i> controlled by <i>tac</i>	[11]
pSIP409/ <i>BsCsnA_nt</i>	<i>erm</i> , pSIP409 derivative, <i>csn_nt</i> controlled by <i>PspqQ</i>	This work
pSIP409/ <i>BsCsnA_OmpA</i>	<i>erm</i> , pSIP409 derivative, <i>csn_OmpA</i> controlled by <i>PspqQ</i>	This work
pSIP409/ <i>BsCsnA_noSP</i>	<i>erm</i> , pSIP409 derivative, <i>csn</i> controlled by <i>PspqQ</i>	This work
pSIP609/ <i>BsCsnA_nt</i>	<i>alr</i> , pSIP409 derivative, <i>csn_nt</i> controlled by <i>PspqQ</i> , <i>erm</i> replaced by <i>alr</i>	This work
pSIP409/ <i>BtManB_nt</i>	<i>erm</i> , pSIP409 derivative, <i>manB_nt</i> controlled by <i>PspqQ</i>	This work
pSIP409/ <i>BtManB_OmpA</i>	<i>erm</i> , pSIP409 derivative, <i>manB_OmpA</i> controlled by <i>PspqQ</i>	This work
pSIP409/ <i>BtManB_noSP</i>	<i>erm</i> , pSIP409 derivative, <i>manB</i> controlled by <i>PspqQ</i>	This work
pSIP609/ <i>BtManB_nt</i>	<i>alr</i> , pSIP409 derivative, <i>manB_nt</i> controlled by <i>PspqQ</i> , <i>erm</i> replaced by <i>alr</i>	This work

200 µg/mL of erythromycin (for pSIP409-type vectors transformed to *L. plantarum* WCFS1) or containing no antibiotics (for pSIP609-type vectors transformed to *L. plantarum* TGL02). Colonies appeared after incubation at 37 °C for 16 h.

Expression of B₁ManB and BsCsnA in *L. plantarum*

Batch fermentations with pH control were carried out in 3-L MRS medium using a BIOSTAT B plus bioreactor (Sartorius, Germany). Recombinant *L. plantarum* strains were taken from a glycerol stock stored at -80 °C, re-streaked on appropriate MRS plates (with or without antibiotic, depending on the *L. plantarum* strain; see above) and grown overnight at 37 °C. Five to ten colonies were picked and grown in 5 mL MRS broth overnight, then sub-cultured into two flasks of 100 mL of MRS, and cultivated at 37 °C without shaking for 18–24 h. The two overnight cultures were pooled together, mixed well and after measuring the cell density at 600 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia biotech, UK) they were used to inoculate 3 L of MRS medium to an OD₆₀₀ of ~0.1. After incubation at 30 °C with 100 rpm agitation under anaerobic condition to an OD₆₀₀ of ~0.3, the cultures were induced with 12.5 ng/mL of IP-673 (amino acid sequence of IP-673 is Met-Ala-Gly-Asn-Ser-Ser-Asn-Phe-Ile-His-Lys-Ile-Lys-Gln-Ile-Phe-Thr-His-Arg; [34]). During further cultivation (30 °C with 100 rpm), the pH was controlled at pH 6.5 using 3.0 M sodium hydroxide. To monitor enzyme production, 40–50 mL of culture broth were harvested at 0, 3, 6, 9, 12, 18, 20, and 24 h after induction. The cells and culture supernatant were separated by centrifugation at 4000 rpm for 15 min at 4 °C (swing angle rotor, Centrifuge 5804, Eppendorf, Belgium), after which the cells were washed twice with lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0), and re-suspended in 3–4 mL of the same buffer. The cells were broken using a sonicator (Vibra-Cell Sonicator, Sonics & Materials, Inc, USA) at 25 % amplitude, pulse 5 s, 3 min for 2 rounds on ice. The cell lysate fraction was collected by centrifugation at 13,000 rpm, 4 °C for 45 min (Thermo Scientific, USA).

To measure the enzyme activity in culture supernatants, 3–5 mL of culture supernatant containing secreted enzymes were dialyzed with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 with stirring at 250 rpm, at 4 °C for 8–12 h, using the snake skin dialysis tubing, 10 kDa kit (Thermo scientific, USA). The dialyzed fraction of approx. 4–7 mL was collected and kept on ice for no longer than 6 h before the enzyme activity was determined.

Enzyme activity assay

ManB and CsnA activities in both lysates and supernatants were determined using the DNS method as previously described [11, 12]. For B₁ManB, an appropriately diluted enzyme solution (0.1 mL) was incubated with 0.9 mL

of pre-heated 0.5 % (w/v) locust bean gum (dissolved in 50 mM sodium citrate buffer, pH 6.0) at 50 °C for exactly 5 min, with mixing at 800 rpm. The amount of reducing sugars liberated in the enzyme reaction was assayed by mixing 100 µL of the reaction mixture with 100 µL DNS solution, followed by heating at 100 °C for 20 min, cooling on ice, and dilution with 300 µL of de-ionized water, before measuring the absorbance at 540 nm, using 1–5 µmol/mL of D-mannose as standards. The reactions were done in triplicate and we report mean values together with their standard deviation. The substrate solution was prepared by suspending 0.5 % (w/v) locust bean in 50 mM sodium citrate buffer, pH 6.0. The suspension was then dissolved at 80 °C, using hot plate stirrer at 200 rpm. (RCT CL, IKA Laboratory, Germany), followed by heating to the boiling point, cooled and stored overnight with continuous stirring. After that insoluble material was removed by centrifugation.

For BsCsnA, the reaction mixture consisted of 40 µL of appropriately diluted sample and 160 µL of 0.5 % chitosan (w/v) (in 200 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, and pre-incubated at 50 °C for 30 min). The reaction was incubated in a Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 50 °C for 5 min, with mixing at 900 rpm. The reaction was stopped by adding 200 µL of DNS solution, and the mixture was centrifuged at 12,000g for 5 min to remove the remaining chitosan that was precipitated. The colour in the supernatant was developed by heating at 100 °C for 20 min and cooling on ice. The reducing sugar in the supernatant was determined by measuring OD at 540 nm, using 1–5 µmol/mL of D-glucosamine as standards. The reactions were done in triplicate and we report mean values with standard deviations.

The final volume of culture supernatant after dialysis was taken into account when the volumetric enzyme activity was determined. Units of enzyme activity were defined as the amount of enzyme that liberates 1 µmol of reducing sugar (using D-mannose or D-glucosamine as a standard) per minute under the standard assay conditions.

Gel electrophoresis

Denaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using the method of Laemmli [35] with 12 % (w/v) polyacrylamide gels. The protein samples were briefly heated (3 min) in the loading buffer at 100 °C using a heat block (Eppendorf), and then cooled on ice before loading. Protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue R-250.

Protein determination

Protein concentrations were determined using the method of Bradford [36] with bovine serum albumin as standard.

N-terminal protein sequencing

Proteins in culture supernatants were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto a PVDF membrane (Bio-Rad) in 50 mM borate buffer containing 10 % (v/v) methanol, pH 9. After blotting, the membrane was stained with Coomassie blue for 3 min, followed by destaining with 40 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) acetic acid. Bands were cut out of the membrane and analyzed by a commercial provider using Edman degradation on an Applied Biosystems Procise 492 protein sequencer (Protein Micro-Analysis Facility, Medical University of Innsbruck, Austria).

Authors' contributions

SS and PN performed most of the ManB and CsnA experiments, respectively. SS and PN helped drafting the manuscript. PP helped with the CsnA assay and drafted the manuscript. DH and THN helped in designing the experiments, analyzed the data and edited the manuscript. GM and VGH participated in the generation of the pSIP vectors, analyzed data, and wrote parts of the manuscript. MY conceived of the study, supervised the cloning, expression and analysis of the enzymes, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Molecular Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. ² Food Biotechnology Laboratory, Department of Food Science and Technology, BOKU-University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria. ³ Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences (NMBU), Ås, Norway.

Acknowledgements

This work was supported by Suranaree University of Technology (SUT) and by the Office of the Higher Education Commission under NRU project of Thailand as well as the National Research Council (NRCT) of Thailand. It is the outcome of the MoU between SUT and BOKU. SS was supported by Royal Golden Jubilee (RGJ) scholarship from Thailand Research Fund (TRF), PN was supported by TRF-MAG scholarship, and PS was supported by SUT-Ph.D. scholarship.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

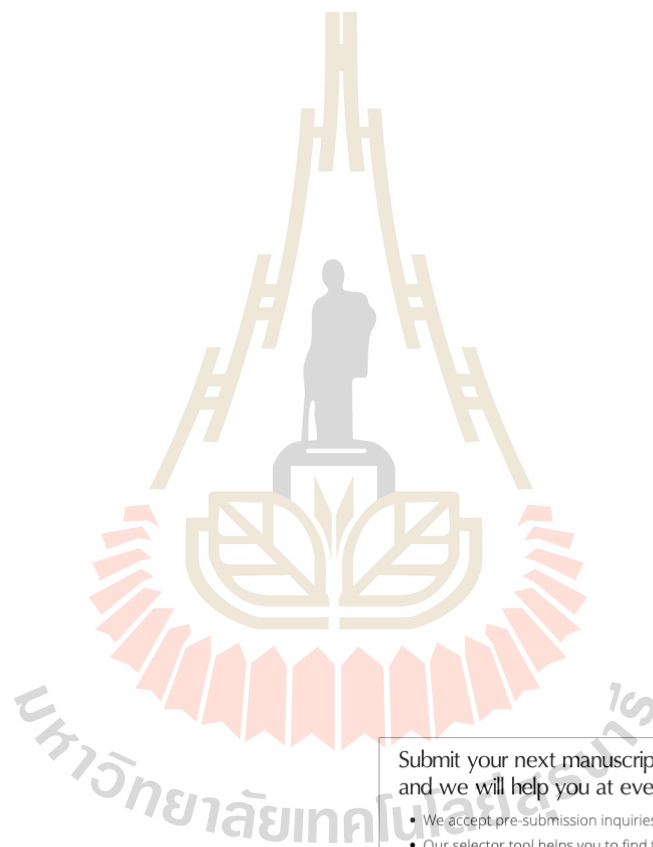
Received: 29 January 2016 Accepted: 3 May 2016

Published online: 12 May 2016

References

- Choi JM, Han SS, Kim HS. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnol Adv*. 2015;33:1443–54.
- Feord J. Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002;82:353–60.
- Diep DB, Mathiesen G, Eijsink VG, Nes IF. Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10:62–73.
- Vijaya Kumar SG, Singh SK, Goyal P, Dilbaghi N, Mishra DN. Beneficial effects of probiotics and prebiotics on human health. *Pharmazie*. 2005;60:163–71.
- Karliskas IL, Maudal K, Axelsson L, Rud I, Eijsink VG, Mathiesen G. Heterologous protein secretion in lactobacilli with modified pSIP vectors. *PLoS ONE*. 2014;9:e91125.
- Sorvig E, Gronqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijsink VG, Axelsson L. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;229:119–26.
- Sorvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VG, Axelsson L. High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology*. 2005;151:2439–49.
- Mathiesen G, Sveen A, Piard JC, Axelsson L, Eijsink VG. Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J Appl Microbiol*. 2008;105:215–26.
- Yamabhai M, Sak-Ubol S, Srila W, Haltrich D. Mannan biotechnology: from biofuels to health. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36:32–42.
- Khoushab F, Yamabhai M. Chitin research revisited. *Mar Drugs*. 2010;8:1988–2012.
- Songsiririttigul C, Buranabanyat B, Haltrich D, Yamabhai M. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2010;9:20.
- Pechsrichuang P, Yoohat K, Yamabhai M. Production of recombinant *Bacillus subtilis* chitosanase, suitable for biosynthesis of chitosan-oligosaccharides. *Bioresour Technol*. 2013;127:407–14.
- Bron PA, Benchimol MG, Lambert J, Palumbo E, Deghorain M, Delcour J, De Vos WM, Kleerebezem M, Hols P. Use of the air gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:5663–70.
- Nguyen TT, Mathiesen G, Fredriksen L, Kittl R, Nguyen TH, Eijsink VG, Haltrich D, Peterbauer CK. A food-grade system for inducible gene expression in *Lactobacillus plantarum* using an alanine racemase-encoding selection marker. *J Agric Food Chem*. 2011;59:5617–24.
- Yamabhai M, Buranabanyat B, Jaruseranee N, Songsiririttigul C. Efficient *E. coli* expression systems for the production of recombinant beta-mannanases and other bacterial extracellular enzymes. *Bioeng Bugs*. 2011;2:45–9.
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D490–5.
- Nadaroglu H, Adiguzel A, Adiguzel G. Purification and characterisation of β -mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its applications in some fruit juices. *Int J Food Sci Technol*. 2015;50:1158–65.
- Hols P, Defrenne C, Ferain T, Derzelle S, Delplace B, Delcour J. The alanine racemase gene is essential for growth of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol*. 1997;179:3804–7.
- Nguyen TT, Nguyen HM, Geiger B, Mathiesen G, Eijsink VG, Peterbauer CK, Haltrich D, Nguyen TH. Heterologous expression of a recombinant lactobacillal beta-galactosidase in *Lactobacillus plantarum*: effect of different parameters on the sakacin P-based expression system. *Microb Cell Fact*. 2015;14:30.
- Mathiesen G, Sveen A, Brurberg MB, Fredriksen L, Axelsson L, Eijsink VG. Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genom*. 2009;10:425.
- Bohmer N, Lutz-Wahl S, Fischer L. Recombinant production of hyperthermostable CelB from *Pyrococcus furiosus* in *Lactobacillus* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;96:903–12.
- Anbazhagan K, Sasikumar P, Gomathi S, Priya HP, Selvam GS. *In vitro* degradation of oxalate by recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing heterologous oxalate decarboxylase. *J Appl Microbiol*. 2013;115:880–7.
- Kolandaswamy A, George L, Sadasivam S. Heterologous expression of oxalate decarboxylase in *Lactobacillus plantarum* NC8. *Curr Microbiol*. 2009;58:117–21.
- Morais S, Shterzer N, Grinberg IR, Mathiesen G, Eijsink VG, Axelsson L, Lamed R, Bayer EA, Mizrahi I. Establishment of a simple *Lactobacillus plantarum* cell consortium for cellulase-xylanase synergistic interactions. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:5242–9.
- Staudigl P, Haltrich D, Peterbauer CK. L-Arabinose isomerase and D-xylose isomerase from *Lactobacillus reuteri*: characterization, coexpression in the food grade host *Lactobacillus plantarum*, and application in the conversion of D-galactose and D-glucose. *J Agric Food Chem*. 2014;62:1617–24.
- Sorvig E, Skaugen M, Naterstad K, Eijsink VG, Axelsson L. Plasmid p256 from *Lactobacillus plantarum* represents a new type of replicon in lactic acid bacteria, and contains a toxin-antitoxin-like plasmid maintenance system. *Microbiology*. 2005;151:421–31.
- Tuller T, Zur H. Multiple roles of the coding sequence 5' end in gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:13–28.

28. Driessen AJ, Manting EH, van der Does C. The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol.* 2001;8:492–8.
29. Muller M, Koch HG, Beck K, Schafer U. Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;66:107–57.
30. Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:1990–5.
31. Yamabhai M. Sticky PCR: a PCR-based protocol for targeted protein engineering. *Biotechnol J.* 2009;4:544–53.
32. Mathiesen G, Huehne K, Kroeckel L, Axelsson L, Eijsink VG. Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:3565–74.
33. Josson K, Scheirlinck T, Michiels F, Platteeuw C, Stanssens P, Joos H, Dhaese P, Zabeau M, Mahillon J. Characterization of a gram-positive broad-host-range plasmid isolated from *Lactobacillus hilgardii*. *Plasmid.* 1989;21:9–20.
34. Eijsink VG, Brurberg MB, Middelhoven PH, Nes IF. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sakei* by a secreted peptide. *J Bacteriol.* 1996;178:2232–7.
35. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5.
36. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.



Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

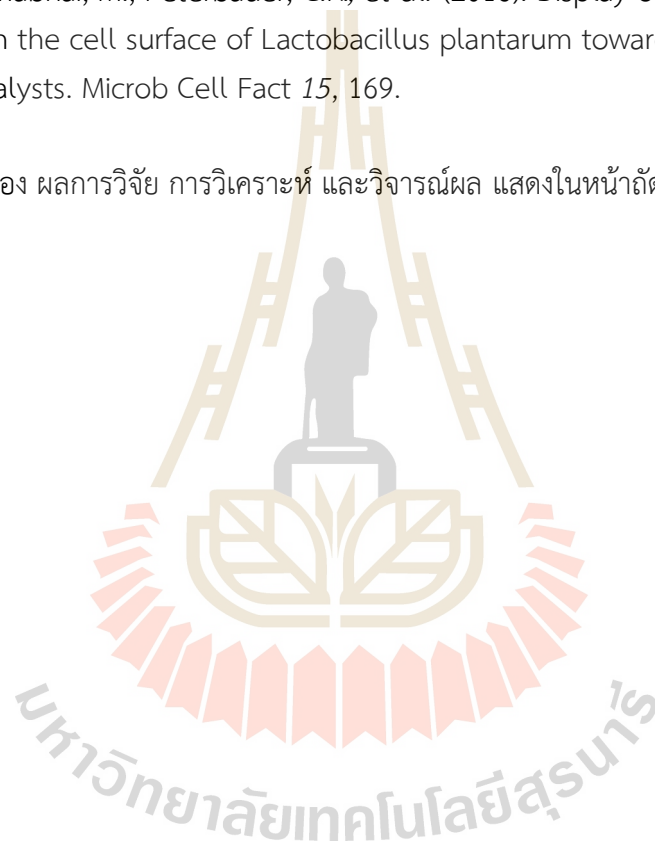


3.2 การพัฒนาระบบการผลิตเอนไซม์ beta-mannanase และ chitosanase ด้วย *Lactobacillus plantarum* food grade expression system โดยให้แสดงอยู่บนผิวของเซลล์ *Lactobacillus*

นอกจากนั้นแล้วผู้วิจัยยังได้ร่วมมือกับนักวิจัยที่ BOKU ประเทศออสเตรีย และ UNMB ประเทศนอร์เวย์ ในการผลิตเอนไซม์ทั้ง ๒ โดยให้ display ติดอยู่บนผนังเซลล์ โดยไม่หลุดออกมา อีกด้วย จากนั้นได้นำผลการวิจัยไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ เดียวกัน คือ

Nguyen, H.M., Mathiesen, G., Stelzer, E.M., Pham, M.L., Kuczkowska, K., Mackenzie, A., Agger, J.W., Eijnsink, V.G., Yamabhai, M., Peterbauer, C.K., *et al.* (2016). Display of a beta-mannanase and a chitosanase on the cell surface of *Lactobacillus plantarum* towards the development of whole-cell biocatalysts. *Microb Cell Fact* 15, 169.

รายละเอียด วิธีการทดลอง ผลการวิจัย การวิเคราะห์ และวิจารณ์ผล แสดงในหน้าถัดไปทั้งหมด ๑๔ หน้า



RESEARCH

Open Access



Display of a β -mannanase and a chitosanase on the cell surface of *Lactobacillus plantarum* towards the development of whole-cell biocatalysts

Hoang-Minh Nguyen^{1,2,3†}, Geir Mathiesen^{4†}, Elena Maria Stelzer¹, Mai Lan Pham¹, Katarzyna Kuczkowska⁴, Alasdair Mackenzie⁴, Jane W. Agger⁴, Vincent G. H. Eijsink⁴, Montarop Yamabhai⁵, Clemens K. Peterbauer^{1,2}, Dietmar Haltrich^{1,2} and Thu-Ha Nguyen^{1*}

Abstract

Background: *Lactobacillus plantarum* is considered as a potential cell factory because of its GRAS (generally recognized as safe) status and long history of use in food applications. Its possible applications include in situ delivery of proteins to a host, based on its ability to persist at mucosal surfaces of the human intestine, and the production of food-related enzymes. By displaying different enzymes on the surface of *L. plantarum* cells these could be used as whole-cell biocatalysts for the production of oligosaccharides. In this present study, we aimed to express and display a mannanase and a chitosanase on the cell surface of *L. plantarum*.

Results: ManB, a mannanase from *Bacillus licheniformis* DSM13, and CsnA, a chitosanase from *Bacillus subtilis* ATCC 23857 were fused to different anchoring motifs of *L. plantarum* for covalent attachment to the cell surface, either via an N-terminal lipoprotein anchor (Lp_1261) or a C-terminal cell wall anchor (Lp_2578), and the resulting fusion proteins were expressed in *L. plantarum* WCF51. The localization of the recombinant proteins on the bacterial cell surface was confirmed by flow cytometry and immunofluorescence microscopy. The highest mannanase and chitosanase activities obtained for displaying *L. plantarum* cells were 890 U and 1360 U g dry cell weight, respectively. In reactions with chitosan and galactomannans, *L. plantarum* CsnA- and ManB-displaying cells produced chito- and manno-oligosaccharides, respectively, as analyzed by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) and mass spectrometry (MS). Surface-displayed ManB is able to break down galactomannan (LBG) into smaller manno-oligosaccharides, which can support growth of *L. plantarum*.

Conclusion: This study shows that mannanolytic and chitinolytic enzymes can be anchored to the cell surface of *L. plantarum* in active forms. *L. plantarum* chitosanase- and mannanase-displaying cells should be of interest for the production of potentially 'prebiotic' oligosaccharides. This approach, with the enzyme of interest being displayed on the cell surface of a food-grade organism, may also be applied in production processes relevant for food industry.

Keywords: Cell-surface display, Whole-cell biocatalyst, *Lactobacillus plantarum*, Mannanase, Chitosanase, Lipoprotein anchor, Cell wall anchor

*Correspondence: thu-ha.nguyen@boku.ac.at

[†]Hoang-Minh Nguyen and Geir Mathiesen joint first authorship

¹ Food Biotechnology Laboratory, Department of Food Science and Technology, BOKU-University of Natural Resources and Life Sciences, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The display of enzymatically active heterologous proteins on the bacterial cell surface is an attractive strategy for many biotechnological applications, such as development of whole-cell biocatalysts and biosensors [1]. One of the most attractive features of cell-surface display is that enzyme molecules are simultaneously synthesized and self-immobilized on the bacterial cell surface, and the living whole-cell biocatalyst can then be easily obtained from the cultivation [2–4]. Anchoring of a secreted enzyme to the bacterial cell wall enables the direct use of microbial cells as immobilized biocatalyst, simultaneously with or immediately after the fermentation step. This offers the known advantages of immobilization, such as reuse of enzyme, stabilisation, etc., while avoiding tedious enzyme purification steps, simplifying enzyme applications, and providing cost benefits [3, 5].

In principle, there are two different ways of anchoring a secreted protein to the bacterial surface: via covalent attachment to the cell membrane or the cell wall, or non-covalently via a protein domain that interacts strongly with components of the cell wall or the membrane. Both systems have been used in lactic acid bacteria (LAB), primarily in *Lactococcus lactis* and different lactobacilli [6, 7]. Covalent attachment to the membrane can be attained by lipoprotein anchors, which typically consist of an N-terminal signal peptide containing the lipobox motif in its C-terminal part. Following secretion of the protein by the Sec pathway, a diacylglycerol transferase covalently links a conserved cysteine in the lipobox to a phospholipid in the membrane, while the signal peptide is removed by a lipobox-specific peptidase. Anchoring of a recombinant protein to the cell membrane can thus be achieved by fusing a heterologous protein downstream of a suitable lipoprotein anchor. The use of lipoanchors for heterologous protein display has received relatively little attention in LAB, compared to other methods of surface display. Covalent anchoring to the cell wall can be achieved by employing the sortase (SrtA) pathway. Here, the secreted protein carries a C-terminal anchor containing the so-called LP×TG motif (LPQT×E in *L. plantarum* [8]), followed by a hydrophobic domain and a positively charged tail [9]. The hydrophobic domain and the charged tail keep the protein from being released into the medium, thereby allowing recognition of the LP×TG motif by a membrane-associated transpeptidase called sortase [9–11]. The sortase cleaves the peptide bond, e.g. between threonine and glycine in the LP×TG motif, and links the now C-terminal threonine of the surface protein to the pentapeptide cross bridge of peptidoglycan [6, 7, 10–13]. Two major differences exist between these two methods of covalent attachment: (1) The protein is attached either to the membrane or the cell wall, and

therefore, sortase-mediated anchoring results in a more peripherally displayed protein. (2) The protein is attached to the cell surface via its N terminus with the lipobox approach, while the sortase-mediated cell wall anchor attaches the protein via its C terminus.

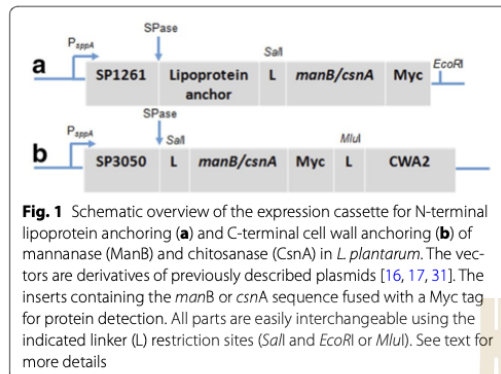
Lactobacillus plantarum WCFS1 is a well-studied member of the lactobacilli, which has been exploited as a host for cell-surface display of heterologous proteins, particularly for proteins with medical interest [1, 7, 14–17]. For example, cancer antigens have been expressed on the surface of *L. plantarum* using LP×TG anchoring, and it was shown that the recombinant bacteria induced specific immune responses in mice [17, 18]. In another study, an invasin protein, a virulence factor from the enteropathogenic bacterium *Yersinia pseudotuberculosis*, was covalently bound to the outer leaflet of the cell membrane using lipoprotein anchors and some of the resulting strains were powerful activators of NF-κB when interacting with monocytes [16]. These studies show the potential of anchoring functional proteins on the surface of *L. plantarum* using different anchoring methods.

In the present study, our aim was to display enzymes on the cell surface of *L. plantarum* and use the bacteria as whole-cell biocatalysts for the production of prebiotic oligosaccharides. For that purpose, we expressed and displayed a mannanase from *Bacillus licheniformis* DSM13 (ATCC 14580) and a chitosanase from *Bacillus subtilis* 168 (ATCC 23857) on the cell surface of *L. plantarum* WCFS1. Both enzymes are of interest for food and biotechnological applications. Mannanases (EC 3.2.1.78) release β-1,4-manno-oligosaccharides (MOS) from mannans, whereas chitosanases (EC 3.2.1.132) release chito-oligosaccharides (CHOS) from chitosans. The immobilization of active mannanase or chitosanase through cell-surface display could result in safe, stable food-grade biocatalysts that can be used in the production of MOS and CHOS in efficient and “food-grade” processes.

Results

Surface display of ManB and CnsA in *Lactobacillus plantarum*

To display mannanase (ManB) and chitosanase (CnsA) on the surface of *L. plantarum* two anchors were exploited. The enzymes were N-terminally anchored to the cell membrane using a 75 residue lipoprotein anchoring sequence derived from the Lp_1261 protein of *L. plantarum* [16] (Fig. 1). In addition, to achieve cell wall anchoring, the enzymes were fused to an LP×TG anchor derived from the Lp_2578 protein sequence, also known as “cwa2” [17]. For immunodetection of the proteins, a Myc-tag was fused to the enzyme sequences as shown in Fig. 1. To test the expression of



the target enzymes, the cells were harvested 2 h after induction and Western blot analysis of the crude, cell-free extracts was performed using anti-Myc antibodies for detection. Figure 2 shows that all four recombinant bacteria produced the expected proteins. Target proteins with cell wall anchor showed slightly higher size than expected, which is most likely a result of the presence of cell wall fragments associated with the target protein. The protein extracts from strains harbouring pSIP_1261ManB and pSIP_1261CsnA showed additional bands of smaller mass, which are most likely representing processed and unprocessed proteins. Mass differences such as those observed here are commonly reported in literature [19–21]. The discrepancy in size



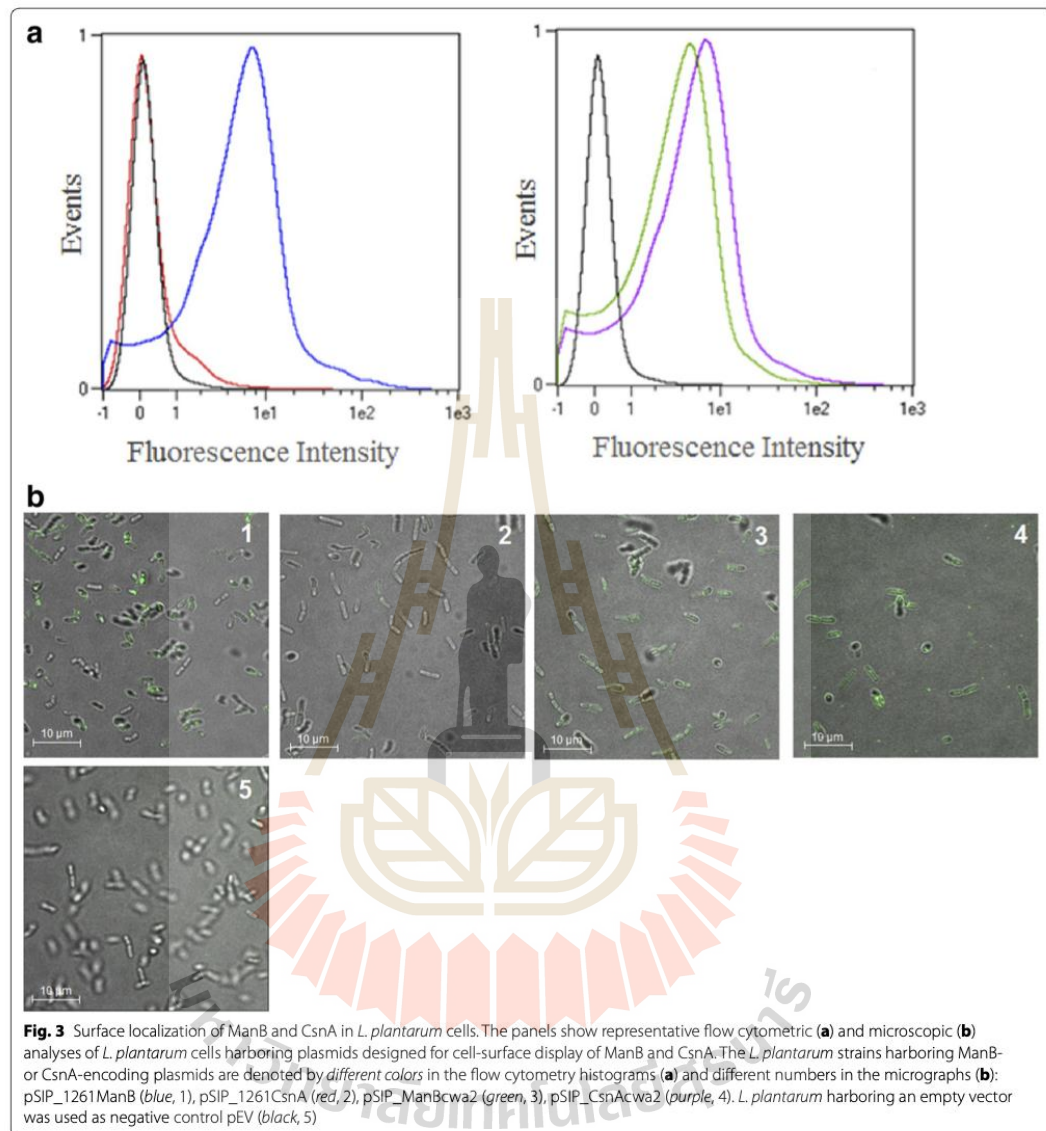
Fig. 2 Western blot analysis of cell-free extracts from transformed and induced *Lactobacillus* cells harboring various expression vectors. (1) pEV, negative control; (2) pSIP_1261ManB (lipoprotein anchor; predicted protein size of 51 kDa); (3) pSIP_1261CsnA (lipoprotein anchor; predicted protein size of 37 kDa); (4) pSIP_ManBcwa2 (cell wall anchor; predicted protein size of 62 kDa); (5) pSIP_CsnAcwa2 (cell wall anchor; predicted protein size of 51 kDa). Lane M indicates a molecular mass marker

may be due to binding to peptidoglycans for LP×TG anchors (larger size than expected, multiple bands) and incomplete processing (multiple bands) or proteolysis (multiple bands) for lipo-anchors. The anchored proteins are likely to contain peptidoglycan fragments of various sizes, which explain a certain degree of heterogeneity. Flow cytometry confirmed surface display of the target enzymes in three of the four recombinant bacteria (pSIP_1261ManB, pSIP_ManBcwa2, and pSIP_CsnAcwa2; Fig. 3a) Even though CsnA production was clearly shown by Western blotting for the strain carrying pSIP_1261CsnA (Fig. 2), we could not observe a shift in the fluorescence signal for this strain compared to the control strain (Fig. 3a). Immunofluorescence microscopy confirmed surface localization of the Myc-tag in strains carrying pSIP_1261ManB, pSIP_ManBcwa2, pSIP_CsnAcwa2, while again no signal was obtained with pSIP_1261CsnA (Fig. 3b). Hence, it was confirmed that the cell wall anchor mediates surface localization of both ManB and CsnA, whereas the lipo-anchor mediates surface expression of ManB.

Enzymatic activity and stability of ManB and CsnA-displaying cells

To test the functionality of the surface-displayed enzymes, we measured the enzyme activities of living recombinant bacteria. The highest enzymatic activities of ManB or CsnA-displaying cells were 890 and 1360 U per g of dry cell weight, respectively (Fig. 4a), which were obtained with the strains carrying plasmids for cell wall anchoring, pSIP_ManBcwa2 and pSIP_CsnAcwa2, respectively. The mannanase activity of the strain harboring the plasmid pSIP_1261ManB was determined to be ~460 U/g dry cell weight (Fig. 4a). Interestingly, significant chitosanase activity of ~740 U/g dry cell weight was found for the strain carrying pSIP_1261CsnA (lipo-anchored CsnA), even though surface localization of CsnA could not be confirmed by both flow cytometry or immunofluorescence microscopy.

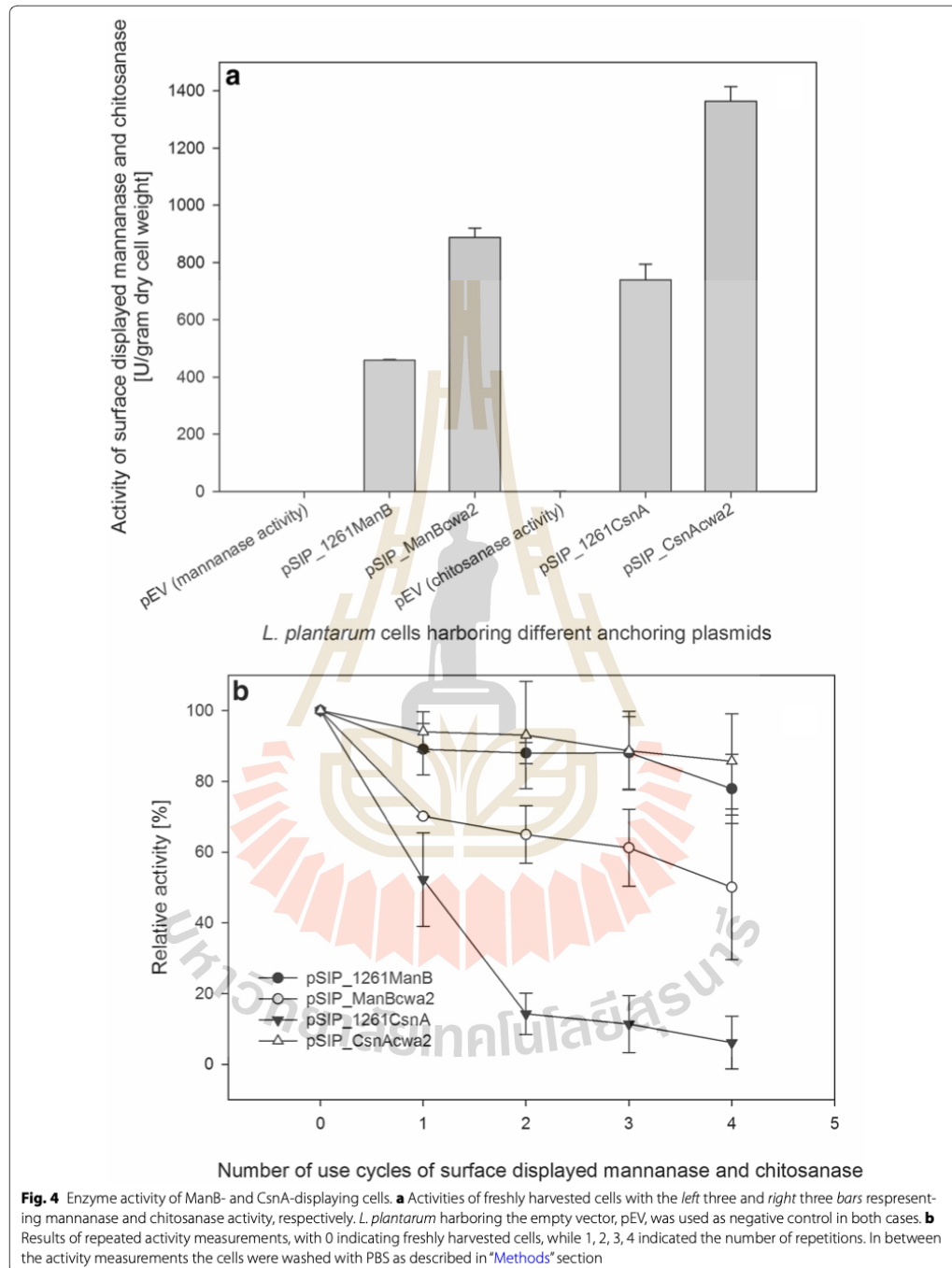
One advantage of immobilizing enzymes on the surface of bacteria is that they can easily be separated from the culture medium and reused. To test the stability of ManB and CsnA-displaying cells, we measured the enzyme activity during four repeated cycles with a washing step between the cycles to remove proteins released from lysed cells. The enzymatic activities of *Lactobacillus* cells harboring pSIP_CsnAcwa2 and pSIP_1261ManB decreased slightly as indicated by activity losses of ~14 and 22 %, respectively, after four assay/washing cycles, confirming that these enzyme-displaying cells can be reused for several rounds of biocatalysis at 37 °C (Fig. 4b). Significant losses in enzymatic activity were observed for



cells harboring pSIP_ManBcwa2 and pSIP_1261CsnA, with only 70 and 15 % of the initial mannanase and chitosanase activity being retained after the second cycle, respectively. After the fourth cycle, 90 % of chitosanase activity and 50 % of mannanase activity were lost from cells carrying pSIP_1261CsnA and pSIP_ManBcwa2, respectively (Fig. 4b).

Formation and analysis of oligosaccharides

The conversion of locus bean gum (LBG) to manno-oligosaccharides (MOS) by ManB-displaying cells was analyzed by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) of supernatants from the enzyme activity assay, which confirmed the presence of a range of different MOS in the reaction mixtures already after

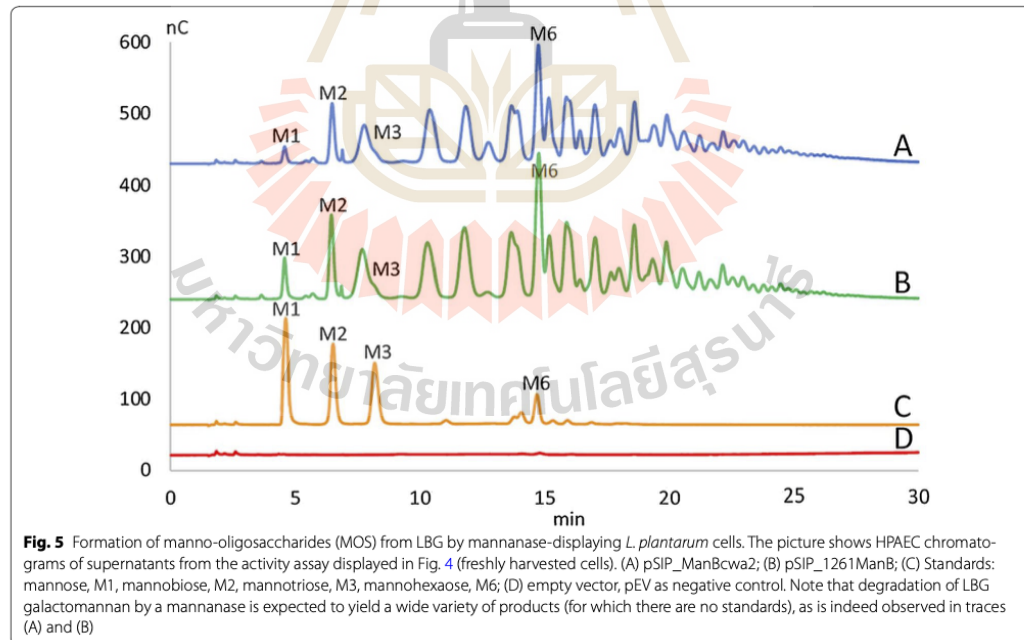


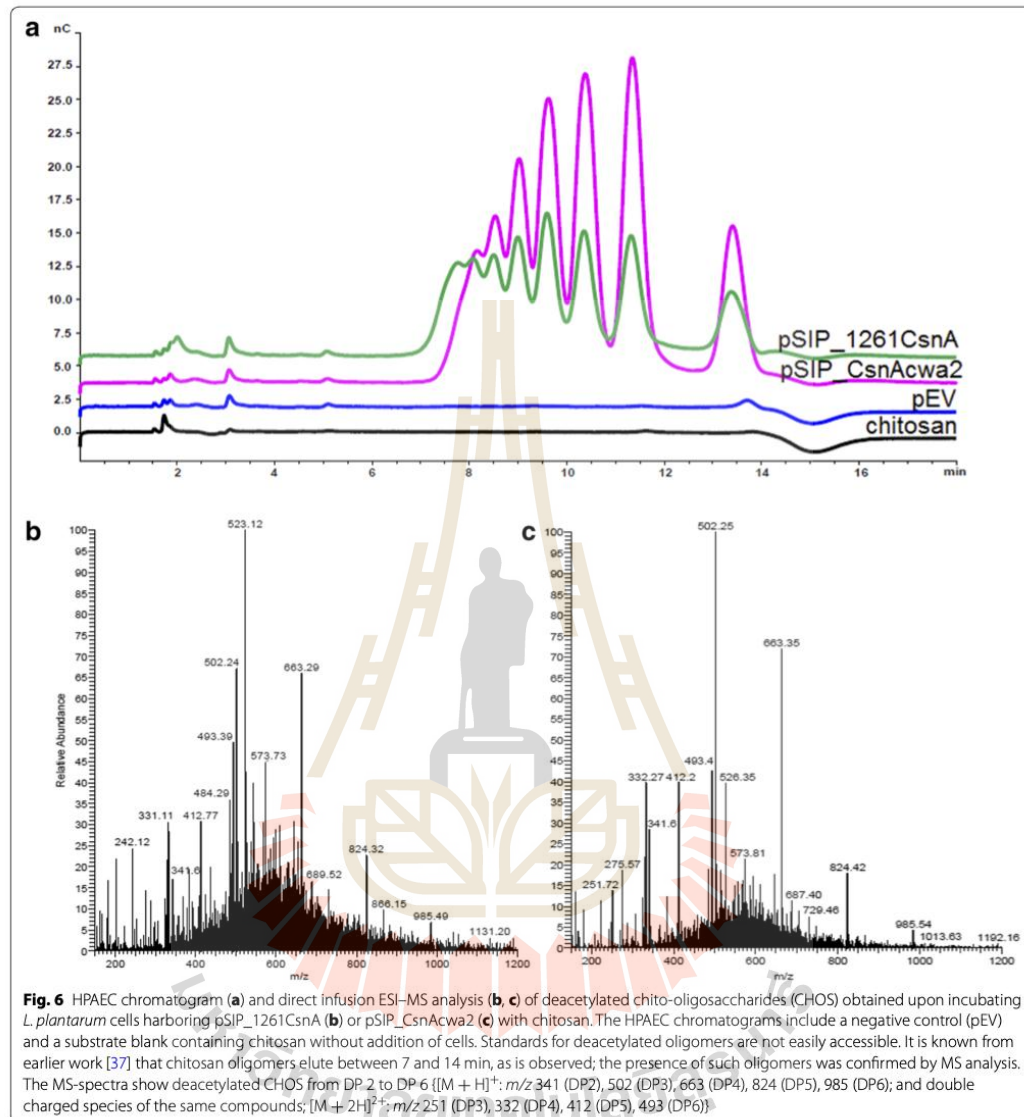
5 min of catalysis at 37 °C (Fig. 5). The conversion of chitosan to chito-oligosaccharides (CHOS) by CsnA-displaying cells was analyzed by HPAEC and direct infusion ESI-MS, and formation of deacetylated chito-oligosaccharides ranging from DP2 to DP6 was indeed observed (Fig. 6). Altogether, the results described so far indicate that ManB and CsnA displayed on *L. plantarum* cells are catalytically active and can convert their polymeric substrates into oligosaccharides.

Growth of ManB-displaying *Lactobacillus plantarum* cells on LBG

To test whether bacteria having the mannanase anchored on the surface may utilize LBG as a carbon source, the bacteria were cultivated in MRS broth containing different carbohydrates (glucose, mannose, LBG, or a mixture of glucose and LBG). After 12 h of incubation at 37 °C the number of colony forming units (cfu/ml) in the cell cultures was determined. Figure 7 shows fold increase in viable cells on different media in comparison with the growth in MRS medium without any added carbohydrate source. *L. plantarum* carrying the empty vector pEV, which contains neither the ManB-encoding gene nor the signal and anchoring sequences, grew as expected very well in MRS broth containing glucose or mannose. The growth of this strain in MRS broth containing LBG was

poor, which is similar to the growth in MRS medium with added carbohydrate, because this strain carries the empty vector without ManB-encoding gene, therefore LBG was not broken down into smaller manno-oligosaccharides to support its growth. When this strain is grown in MRS medium containing 1:1 mixture of glucose and LBG, the increase in the number of living cells is mainly due to the presence of glucose in the medium. The growth of both strains producing ManB was considerably lower compared to the control strain (pEV), which is a well-known characteristic of recombinant lactobacilli that overproduce heterologous proteins. This was most pronounced for the strain harboring the lipoprotein-anchor, which showed lower cell numbers on all carbohydrates tested compared to the strain with the cell wall anchor. Interestingly, in contrast to the control strain, both strains displaying ManB showed notable growth on MRS containing LBG as the sole carbohydrate. These observations show that surface-displayed ManB is able to break down galactomannan (LBG) into smaller MOS (including mannose, Fig. 5) and that these MOS can support growth of *L. plantarum*. However, the growth on MRS containing LBG as the sole carbohydrate was not comparable with the growth when glucose/mannose were included in the medium (Fig. 7) because the cells prefer monosaccharides such as mannose or glucose for their growth. When



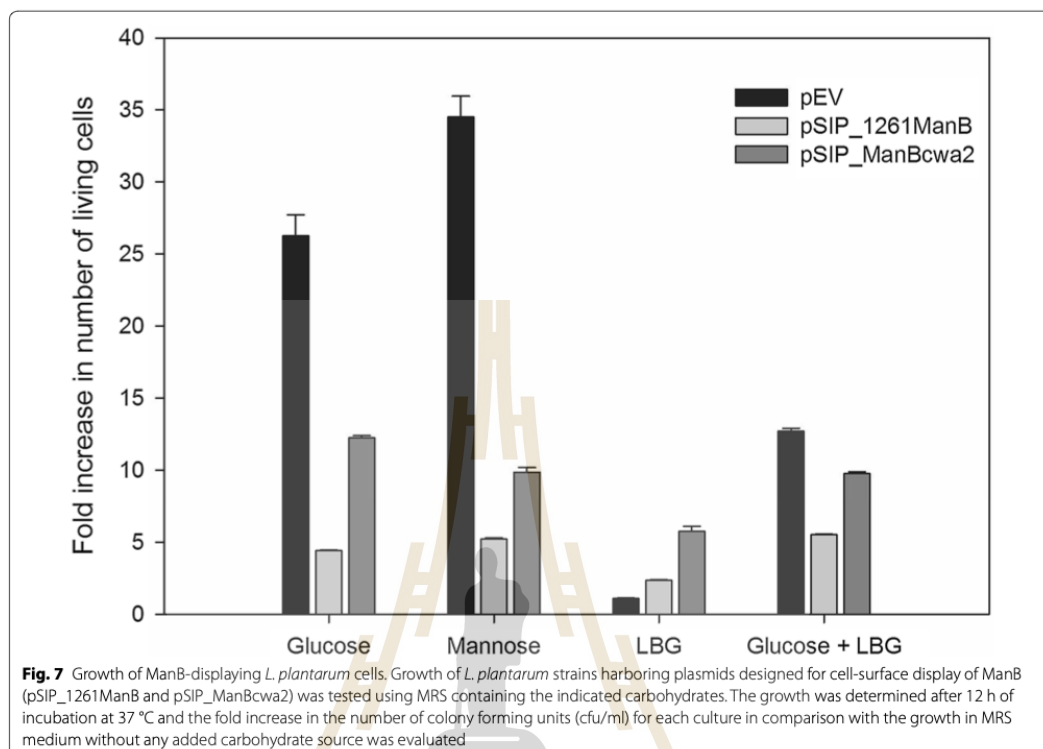


these sugars depleted in the medium, the cells will then consume other oligosaccharides for their growth.

Discussion

Lactic acid bacteria are important microorganisms in the food and beverages industry. Over the past decades, LAB have been used not only as starter cultures, but also

as producers of flavoring enzymes, antimicrobial peptides or metabolites that contribute to the flavor, texture and safety of food products [22–24]. LAB have for a long time been used in the production of a wide range of foods without adverse effects on humans [25]. Nowadays, LAB receive increasing attention because of their potential application in probiotic products [26]. Due to



their food-grade status and probiotic characteristics, several LAB are considered as safe and effective cell factories for food applications [23, 24]. *Lactobacillus plantarum*, one of the best-studied LAB for this purpose, is a versatile lactic acid bacterium, which is encountered in a range of environmental niches including dairy, meat and especially vegetable fermentations. Moreover, it is commonly found in the human gastrointestinal tract. Thus, the improvement of genetic tools for efficient protein expression, secretion and cell surface display in lactobacilli is an important aspect in further development of LAB as food-grade cell factories and carriers of recombinant enzymes for food/feed applications.

The use of enzymes in food technology has found wide application. Economical, sustainable and smart use of these biocatalysts could involve immobilization, where the enzyme after extraction from the fermentation process is bound onto a suitable food-grade carrier. The immobilization process adds to the costs of the biocatalyst preparation, and hence is restricted to more costly enzymes that are used in food technology, while cheaper enzymes are only used one time and then discarded. In

this study we investigated an approach that is based on the use of food-grade *L. plantarum* both as the cell factory and as carrier for enzyme immobilization. This will enable the direct use of the microbial cells straight after the fermentation step.

We explored this concept using a mannanase and a chitosanase, which are relevant for the production of health-promoting and potentially prebiotic oligosaccharides. The two anchors employed were also from *L. plantarum*, a lipoprotein-anchor derived from the Lp_1261 protein and a cell wall anchor (cwa2) derived from the Lp_2578 protein. Both anchors were successfully used to display the enzymes on the cell surface of *L. plantarum* WCFS1, but differences were observed. Flow cytometry and immunofluorescence microscopy confirmed surface localization of ManB with both anchors and of CsnA with cell wall anchor. Surface localization of CsnA with the lipoprotein anchor could not be confirmed by flow cytometry and immunofluorescence microscopy. We speculate this could be the smaller size of CsnA (~30 kDa; ManB has a mass of ~41 kDa) and the attachment of the N-terminus of the lipoprotein anchor

to the plasma membrane rather than the cell wall as with *cwa2*. The Myc-tag of CsnA might be buried in the cell wall and thus not sufficiently exposed for recognition by the antibody used for Myc detection. However, this type of discrepancies is not an unusual observation. For example, a similar observation was previously reported for a membrane anchor (Lipobox domain, Lip) when using it to display an anti-DEC-205 antibody (aDec) at the surface of *L. plantarum* [27]. The anchored aDec was not detected at the surface with flow cytometry, however the anchored protein was found to be functional. Activity measurements showed that lipoprotein anchored CsnA is produced, but that the activity is not stably bound to the cell surface (Fig. 4b). It is thus conceivable that the lipoprotein anchoring of CsnA did not work as anticipated.

Anchored ManB and CsnA were able to convert LBG and chitosan to oligosaccharides. Based on the known specific activities of the purified soluble enzymes (1800 U/mg for ManB and 800 U/mg for CsnA) [28], the amounts of active surface-anchored protein using cell wall anchor system are in the range of ~0.5 mg per g dry cell weight for ManB and ~1.7 mg per g dry cell weight for CsnA. The strains producing cell wall anchored enzymes gave highest activities. It is worth to mention that no enzymatic activities were detected in the culture medium and Western blotting of the supernatants of enzymatic reactions (after separating the cells) showed no bands (data not shown) indicating that there was no release (or cell lysis) from the cells. Thus, the activities reported here are indeed from surface-anchored enzymes. Notably, it is not possible to say whether this higher activity is caused by higher efficiency in enzyme production, secretion and anchoring, or by a more exposed localization of the enzyme and hence better accessibility of the active sites.

When anchoring a chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis* to the surface of *Saccharomyces cerevisiae* cells by fusion to the C-terminal half of α -agglutinin, 1.626 mM of free D-glucosamine were formed after 6 h of incubation with glycol chitosan [3]. Cell wall-anchored CsnA in our study produced 11.0 mM of free reducing end equivalents after 5 min of incubation with chitosan (data not shown) suggesting that chitosanase surface display in *L. plantarum* seems relatively effective. Displayed mannanase activities of 460 and 890 U/g dry cell weight, using the lipoprotein anchor and the cell wall anchor respectively, obtained are significantly higher than a reported activity of 62.3 U/g dry cell weight for a mannanase (*manI*) from *B. subtilis* HB002 that had been anchored to the cell-surface of *Yarrowia lipolytica* [29]. Although direct comparisons of the various systems is difficult, our present data do seem to indicate that display of enzymes on the *Lactobacillus* cell surface compares well to yeast-based systems.

The stability of the displayed enzyme is an important parameter for success. In this respect, our study revealed considerable differences between the various constructs. CsnA displayed using the cell wall anchor and ManB displayed using the lipoprotein anchor were relatively stable, retaining approximately 85 and 80 %, respectively, of their initial activities after four cycles of substrate hydrolysis. On the other hand, CsnA displayed using the lipoprotein anchor and ManB displayed using the cell wall anchor showed significantly lower stability. We have no proper explanation for these differences, which could be related to different protease susceptibilities of the various fusion proteins and/or to variations in protein shedding. As it stands, it is not possible to make general statements as to the applicability of an anchoring motif. Different combinations of enzymes and anchors may have to be tested to obtain optimal results, and this is relative simple with the modular pSIP system.

Conclusions

We have demonstrated successful anchoring of two different glycoside hydrolases onto the surface of *L. plantarum*. The displayed enzymes are active and some of the enzyme-producing cells showed good stability as whole cell biocatalysts. Surface anchoring of secreted enzymes in lactobacilli may yield safe, stable, food-grade whole-cell biocatalysts that can be used in different production processes relevant for the food industry. In addition, the use of lactobacilli rather than other bacterial species often used as microbial cell factories may help to overcome the reluctance of the food industry when it comes to introducing these novel biological production processes.

Methods

Chemicals, enzymes and plasmids

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise, and were of the highest quality available. All restriction enzymes and corresponding buffers were purchased from New England BioLabs (Frankfurt am Main, Germany). The plasmids pSIP409-ManB-native and pSIP409-CsnA-native containing the mannanase gene *manB* from *B. licheniformis* DSM13 (ATCC 14580) or the chitosanase gene *csnA* from *B. subtilis* 168 (ATCC 23857) [28] were used as templates for amplification of these two genes, respectively. All plasmids used in this study are listed in Table 1.

Bacterial strains, media and culture conditions

The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *Lactobacillus plantarum* WCFS1, isolated from human saliva as described by Kleerebezem et al. [8], was originally obtained from NIZO Food Research (Ede, The

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic (s)	Reference source
Strains		
<i>L. plantarum</i> WCFS1	Host strain	[8]
<i>E. coli</i> TOP10	Host strain	Invitrogen
Plasmids		
pEV	Erm ^r ; pLp_2578sAmyA derivative, no signal sequence, no <i>man</i> or <i>csn</i> (negative control)	[16]
pSIP409-ManB-native	Erm ^r ; <i>spp</i> -based expression vector pSIP409, for expression of <i>manB</i> its native signal peptide	[28]
pSIP409-CsnA-native	Erm ^r ; <i>spp</i> -based expression vector pSIP409 for expression of <i>csnA</i> with native signal peptide	[28]
pLp_1261InvS	Erm ^r ; pSIP401 derivative with the lipoanchor sequence from Lp_1261 fused to part of the <i>inv</i> gene.)	[16]
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa2	Erm ^r ; pSIP401 derivative encoding the Lp_3050 signal peptide ([32]) translationally fused to the hybrid antigen DC-Ag85B-ESAT6, followed by the cell wall anchor (cwa2) from Lp_2578 (cwa2 comprises 194 residues of Lp_2578; [17])	(Unpublished)
pSIP_1261ManB	Erm ^r ; pLp_1261InvS derivative with <i>manB-myc</i> instead of the <i>inv</i> gene	This study
pSIP_1261CsnA	Erm ^r ; pLp_1261InvS derivative with <i>csnA-myc</i> instead of the <i>inv</i> gene	This study
pSIP_ManBcwa2	Erm ^r ; pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa2 derivative with <i>manB-myc</i> instead of the gene fragment encoding DC_Ag85B-E6	This study
pSIP_CsnAcwa2	Erm ^r ; pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa2 derivative with <i>csnA-myc</i> instead of the gene fragment encoding DC_Ag85B-E6	This study

Netherlands) and maintained in the culture collection of the Norwegian University of Life Sciences (NMBU), Ås, Norway. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) was used in subcloning of DNA fragments and was grown in brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid Ltd.; Basingstoke, UK) at 37 °C. *L. plantarum* was grown in deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid) at 37 °C without agitation. When needed, erythromycin was supplemented to media to final concentrations of 200 µg/ml and 5 µg/ml for *E. coli* and *L. plantarum* cultivations, respectively.

DNA manipulation

Plasmids were isolated from *E. coli* cells using the Nucleospin Plasmid Miniprep Kit (Macherey–Nagel; Bethlehem, PA, USA). PCR amplification of DNA was performed using Phusion high-fidelity DNA polymerase F530-S (New England BioLabs) and the primers listed in Table 2, which were purchased from Operon Biotechnologies (Cologne, Germany). The sequences of PCR-generated inserts were verified by DNA sequencing performed by a commercial provider (Microsynth; Vienna, Austria). PCR products and DNA fragments obtained by digestion with restriction enzymes were purified using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey–Nagel), and the DNA concentration was estimated using the Qubit™ dsDNA BR assay (Invitrogen). Ligation of DNA fragments was performed using T4 DNA ligase (Fermentas; Vilnius, Lithuania) and In-Fusion Cloning Kit (Clontech; Mountain View, CA, USA) following the manufacturers' instructions. All plasmids were transformed into *E. coli* One

Shot TOP10 chemically competent cells (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. After obtaining the plasmids in sufficient amounts, they were transformed into electrocompetent cells of *L. plantarum* WCFS1 according to the protocol of Aukrust and Blom [30].

Plasmid construction

A schematic overview for the construction of the expression cassette for secretion and anchoring of both ManB and CsnA is presented in Fig. 1. The two anchoring sequences used in this study were taken from pLp_1261InvS and pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa2 (Table 1), which are derivatives of the pSIP401 vector that has been developed for inducible gene expression in lactobacilli [31]. The plasmids contain N-terminal signal peptides derived from the genes encoding Lp_1261 [16] and Lp_3050 [32], respectively. The total length of the Lp_1261 anchor is 75 residues, including 22 amino acids of the SP. The cell wall anchor sequence comprises 223 C-terminal residues from Lp_2578, of which 189 residues are the linker region followed by the LPQTSE motif, which is followed by a hydrophobic stretch and a positively charged C-terminal [16, 17, 33]. The C-termini of the target genes, *manB* and *csnA*, were fused to a 30-bp fragment encoding the *myc* tag (GAACAAAACATCTCAGAAGAGGATCTG), as shown in Fig. 1.

For construction of pSIP_ManBcwa2 a *manB-myc* fragment was generated by three PCR steps: PCR1 with primers Man3050F and ManR1, PCR2 with primers Man3050F and ManR2, and PCR3 with primers Man3050F and 3050R3 to introduce a C-terminal

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence ^a 5'→3'	Restriction site underlined
Man3050F	TGCTTCATCAGT <i>CGACCACACCGTTTCTCCGGT</i>	<i>Sall</i>
ManR1	TGAGATGAGTTTTGTCTTCCACGACAGCGTCAAAGAAT	
ManR2	TCAGATCTCTTCTGAGATGAGTTTTGTCTTCCACGAC	
3050R3	GTTTCAGTGACACGCGT <i>CAGATCTCTCTGAGATG</i>	<i>MluI</i>
Man1261F	GATTGCGGCGT <i>CGACCACACCGTTTCTCCGGT</i>	<i>Sall</i>
1261R3	CCGGGGTACCGAATTTCTTACAGATCTCTCTGAGATG	<i>EcoRI</i>
Csn3050F	TGCTTCATCAGT <i>CGACGCGGACTGAATAAAGATC</i>	<i>Sall</i>
CsnR1	TGAGATGAGTTTTGTCTGTCGACAGATCTTTGATTAC	
CsnR2	CAGATCTCTTCTGAGATGAGTTTTGTCTGTCGACAGA	
Csn1261F	GATTGCGGCGT <i>CGACGCGGACTGAATAAAGATC</i>	<i>Sall</i>

^a The nucleotides in italics are the positions that anneal to the DNA of the target gene (*manB* or *cnsA*)

MluI site. The resulting PCR fragment (~1047 bp) was ligated into the *Sall/MluI*-digested vector pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa2 using In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech) yielding the plasmid pSIP_ManCwa2.

For construction of pSIP_1261ManB, the *manB-myc* fragment generated from the PCR2 step described above was used as the template for a PCR reaction with primers Man1261F and 1261R3. The resulting PCR fragment was ligated into the *Sall/EcoRI*-digested vector pLp_1261InvS [16] using In-Fusion cloning kit (Clontech; Mountain View, CA, USA) yielding the plasmid pSIP_1261Man.

For construction of pSIP_CsnAcwa2 and pSIP_1261CsnA, a similar cloning strategy was used. The primer pairs Csn3050F/CsnR1, Csn3050F/CsnR2, and Csn3050F/3050R3 (Table 2) were used for the construction of pSIP_CsnAcwa2, whereas the primer pair Csn1261F/1261R3 (Table 2) was used to construct pSIP_1261CsnA. In-Fusion cloning kit (Clontech; Mountain View, CA, USA) was used for the ligation during the construction of pSIP_CsnAcwa2 and pSIP_1261CsnA.

Gene expression in *Lactobacillus plantarum*

To generate the four expression strains, pSIP_ManBcwa2, pSIP_1261ManB, pSIP_CsnAcwa2 and pSIP_1261CsnA were transformed into electro-competent *L. plantarum* WCFS1 and transformants were selected on MRS agar plates containing 5 µg/ml erythromycin. For gene expression, overnight cultures of *L. plantarum* WCFS1 harboring the plasmids were diluted in 50 ml of fresh pre-warmed MRS broth containing 5 µg/ml erythromycin to an OD₆₀₀ of ~0.1, and incubated at 37 °C without agitation to an OD₆₀₀ of 0.3. Gene expression was then induced by adding 25 ng/ml of the peptide pheromone IP-673 [34]. Cells were harvested 2 h after induction at an OD₆₀₀ of approximately 0.8–1.2 by centrifugation at 4000×g for 10 min at 4 °C, washed twice with phosphate

buffered saline (PBS) containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, and 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4), and then re-suspended in 1 ml of PBS containing 20 µl of 50 mM PMSF.

Western blotting

The cells obtained as described above were disrupted with glass-beads (≤106 µm; Sigma) using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals, Solon, OH) by shaking at speed 6.5 for 45 s. Proteins in the cell-free extracts were separated by running 10 % NuPAGE Novex Bis-Tris gels (ThermoFisher Scientific; St. Leon-Rot, Germany) following the protocol provided by the manufacturer. Subsequently, electroblotting was performed using the iBlot Dry Blotting system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Monoclonal murine anti-Myc antibody was obtained from Invitrogen and used as recommended by the manufacturer. The protein bands were visualized by using polyclonal rabbit anti-mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Dako, Denmark) and the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate from Pierce (Rockford, IL, USA).

Flow cytometry and indirect immunofluorescence microscopy

Cell staining for flow cytometry was carried out as previously described [16] with some modifications. One ml of cell culture (OD₆₀₀ of ~0.5) was harvested 2 h after induction, and cells were resuspended in 50 µl PBS containing 1 % of BSA (PBS-B) and 0.4 µl of the monoclonal anti-Myc antibody (Invitrogen; diluted 1:5000 in PBS-B). After incubation at RT for 30 min, the cells were centrifuged at 5000×g for 3 min at 4 °C and washed three times with 500 µl PBS-B. The cells were subsequently incubated with 50 µl PBS-B and 0.8 µl polyclonal rabbit anti-mouse antibody (FITC conjugated; ThermoFisher Scientific) diluted 1:2500 in PBS-B for 60 min in the dark,

at room temperature. After collecting the cells by centrifugation ($4000\times g$, 3 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) and washing five times with $500\text{ }\mu\text{l}$ PBS, the stained cells were analyzed by flow cytometry using a MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany), following the manufacturer's instructions.

For indirect immunofluorescence microscopy, the bacterial cells stained with monoclonal anti-c-Myc antibody and goat anti-mouse Alexa Fluor[®] 488 (IgG H&L) (Abcam; Cambridge, UK) were visualized under a Leica TCS SP5 II confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems; Mannheim, Germany) using a 488-nm argon laser (FITC photomultiplier tube [PMT]) and a bright field (BF) PMT for transmitted light. The fluorescence detection window was set between 505 and 550 nm and the images were acquired with a PL APO 63 \times /1.40 oil immersion objective.

Enzyme activity measurements

Enzymatic activities were determined following methods described previously [3, 29, 35, 36] with some modifications. The reaction mixtures consisted of $100\text{ }\mu\text{l}$ of a suspension of the enzyme-displaying cells in PBS and $900\text{ }\mu\text{l}$ of a 0.5 % (w/v) galactomannan solution (locust bean gum, LBG; Megazyme, Bray, Ireland) for mannanase activity, or $400\text{ }\mu\text{l}$ of a 0.5 % (w/v) chitosan solution (PT Biotech Surindo, Jawa Barat, Indonesia) for chitosanase activity. The galactomannan solution was prepared by dissolving LBG in 50 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. Chitosan was completely dissolved in 1 % acetic acid at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ after 30 min, and then the pH of the solution was adjusted to 5.5.

Enzyme-displaying cells were collected from the cultures 2 h after induction by centrifugation at $4000\times g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cell pellets obtained from 100 ml culture were washed twice with PBS and re-suspended in $100\text{ }\mu\text{l}$ of PBS. The mannanase or chitosanase-displaying cells were incubated with LBG or chitosan solutions, respectively, at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with mixing at 600 rpm for 5 min. The cells were removed by centrifugation ($5000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and 2 min) and the amount of reducing sugars released in the supernatant of the enzymatic reaction was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) assay. Briefly, $100\text{ }\mu\text{l}$ of the reaction supernatant were mixed with $100\text{ }\mu\text{l}$ of DNS solution, followed by heating at $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, cooling on ice for 5 min, and dilution with $800\text{ }\mu\text{l}$ de-ionized water, before measuring the absorbance at 540 nm using 1–5 $\mu\text{mol/ml}$ of D-mannose or D-glucosamine as standards for the mannanase and chitosanase assay, respectively. One unit of mannanase or chitosanase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of reducing sugars (or reducing end equivalents) per minute under the given conditions. The reactions were done in

triplicates and the standard deviations were always less than 5 %.

As an extra control, cells obtained after the incubation with substrate were washed with $500\text{ }\mu\text{l}$ with PBS and collected by centrifugation ($5000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min). The cells were then re-suspended in $100\text{ }\mu\text{l}$ of PBS and mannanase or chitosanase activities were re-measured. This procedure was repeated for four cycles of activity measurements with intermediate washing steps to evaluate the stability of ManB and CsnA-displaying cells.

High performance anion exchange chromatography (HPAEC)

Separation of the oligosaccharides released from locust bean gum during the activity assay described above was carried out by HPAEC analysis on an ICS-3000 system from Dionex (now Thermo Scientific; Sunnyvale, CA, USA) with pulsed amperometric detection. The system was equipped with a CarboPac PA-1[®] column ($2\text{ }\times\text{ }250\text{ mm}$) connected to a 50 mm CarboPac PA-1 guard column (Dionex). Separation of manno- or galactomanno-oligosaccharides was performed with a multi-step linear 1 M NaOAc gradient, going from 0.1 M NaOH to 0.1 M NaOH/0.1 M NaOAc over 35 min, then to 0.1 M NaOH/0.3 M NaOAc over 25 min, and finally 0.1 M NaOH/1 M NaOAc over 5 min, prior to reconditioning with 0.1 M NaOH for 9 min. Soluble manno-oligosaccharides (DP 1, 2, 3 and 6; Megazyme) were used as standards. Before analysis, the supernatants from the activity assay were centrifuged to remove any insoluble material.

Separation of the oligosaccharides released from chitosan during the activity assay described above was also carried out by HPAEC analysis. The analysis was performed with the same instrument and column as above, but the separation was achieved by isocratic elution with 25 mM NaOH for 18 min as described in [37].

Direct infusion mass spectrometry

Direct infusion mass spectrometry was performed on a Velos Pro LTQ linear ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific) with electrospray ionization (ESI) interface. A continuous flow of 0.2 ml/min of 1 mM formic acid/acetonitrile (30/70) and accurate 2 μl injections were supplied by an UltiMate 3000 RSLC UHPLC system (Dionex, now Thermo Scientific) directly linked to the ESI-interface without any chromatographic separation. The ESI was operated at 4 kV positive mode with sheath gas and auxiliary gas flow in the spray of 30 and 5 (arbitrary units), respectively. The ESI-probe was heated to $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ for better vaporization of the mobile phase. Data were collected with full scan acquisition in the mass range from

150–2000 m/z for 24 s and averages of 8–9 consecutive scans were used for illustrations.

Growth of recombinant ManB-displaying *Lactobacillus plantarum* cells on LBG

ManB-displaying *L. plantarum* cells (strains carrying either the plasmids pSIP_1261ManB or pSIP_ManB-cwa2) were harvested 2 h after induction and then grown in MRS broth containing 25 ng/ml of the peptide pheromone IP-673 and 20 g/l of different carbohydrates (glucose, mannose, LBG, or a 1:1 mixture of glucose and LBG), or no added carbohydrate substrate. After 12 h of incubation at 37 °C, the number of colony forming units (cfu/ml) for each culture was determined. The fold increase in the number of living cells in MRS medium with different carbohydrates in comparison with that in MRS medium without any added carbohydrate source was evaluated.

Abbreviations

ManB: mannanase from *Bacillus licheniformis* DSM13 (ATCC 14580); CsnA: chitosanase from *Bacillus subtilis* ATCC 23857.

Authors' contributions

THN and DH conceived of the study; HMN, GM and THN designed the experiments; HMN, EMS, MLP, KK, AM and JWA performed the experiments; HMN and GM drafted the manuscript; GM, VGHE, JWA, CKP, MY and DH contributed to the discussion and edited the manuscript; GM and VGHE supervised the research at NMBU; THN and DH supervised the research at BOKU; THN wrote the final version of the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Food Biotechnology Laboratory, Department of Food Science and Technology, BOKU-University of Natural Resources and Life Sciences, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria. ² BioToP the International Doctoral Programme on Biomolecular Technology of Proteins, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria. ³ Department of Biotechnology, DUT-Danang University of Technology, Nguyen Luong Bang, 54, Danang, Vietnam. ⁴ Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences (NMBU), P.O. Box 5003, 1432 Ås, Norway. ⁵ Molecular Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Acknowledgement

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Funding

HMN is thankful for VIED (Vietnam International Education Development), OeAD-Austrian Agency for International Co-operation in Education & Research, and the doctoral program BioToP-Biomolecular Technology of Proteins (grant FWF-W1224 of the Austrian Science Fund) for financial support. MLP thanks the European Commission for the Erasmus Mundus scholarship under the ALFABET project. GM and VGHE received support from the Norwegian Research Council, Grant 234502. MY acknowledges the support from Suranaree University of Technology (SUT), the Office of the Higher Education

Commission under NRU project of Thailand, and the National Research Council of Thailand (NRCT). THN acknowledges the support from the Austrian Science Fund (FWF Projects V457-B22 and P24868-B22).

Received: 8 July 2016 Accepted: 28 September 2016

Published online: 04 October 2016

References

- Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.* 2003;21:45–52.
- Tabuchi S, Ito J, Adachi T, Ishida H, Hata Y, Okazaki F, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. Display of both N- and C-terminal target fusion proteins on the *Aspergillus oryzae* cell surface using a chitin-binding module. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87:1783–9.
- Fukuda T, Isogawa D, Takagi M, Kato-Murai M, Kimoto H, Kusaoke H, Ueda M, Suye S-I. Yeast cell-surface expression of chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71:2845–7.
- Kuroda K, Ueda M. Arming technology in yeast-novel strategy for whole-cell biocatalyst and protein engineering. *Biomolecules.* 2013;3:632–50.
- Kuroiwa T, Noguchi Y, Nakajima M, Sato S, Mukataka S, Ichikawa S. Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylose-coated magnetic nanoparticles. *Process Biochem.* 2008;43:62–9.
- Diep DB, Mathiesen G, Eijsink VGH, Nes IF. Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009;10:62–73.
- Michon C, Langella P, Eijsink VGH, Mathiesen G, Chatel JM. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microb Cell Fact.* 2016;15:70.
- Kleerebezem M, Boekhorst J, Kranenburg RV, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MWEJ, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:1990–5.
- Schneewind O, Missiakas DM. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philos Trans Roy Soc B.* 2012;367:1123–39.
- Leenhouts K, Buist G, Kok J. Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol.* 1999;76:367–76.
- Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation. *Biotechnol Lett.* 2009;32:1–10.
- Boekhorst J, De Been MWHJ, Kleerebezem M, Siezen RJ. Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. *J Bacteriol.* 2005;187:4928–34.
- Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70:192–221.
- Morais S, Shterzer N, Lamed R, Bayer EA, Mizrahi I. A combined cell-consortium approach for lignocellulose degradation by specialized *Lactobacillus plantarum* cells. *Biotechnol Biofuels.* 2014;7:112–3.
- Liu X, Lagenaur LA, Lee PP, Xu Q. Engineering of a human vaginal *Lactobacillus* strain for surface expression of two-domain CD4 molecules. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:4626–35.
- Fredriksen L, Kleiveland CR, Hult LTO, Lea T, Nygaard CS, Eijsink VGH, Mathiesen G. Surface display of N-terminally anchored invasins by *Lactobacillus plantarum* activates NF- κ B in monocytes. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:5864–71.
- Fredriksen L, Mathiesen G, Sioud M, Eijsink VGH. Cell wall anchoring of the 37-kDa oncofetal antigen by *Lactobacillus plantarum* for mucosal cancer vaccine delivery. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:7359–62.
- Mobergslien A, Vasovic V, Mathiesen G, Fredriksen L, Westby P, Eijsink VGH, Peng Q, Sioud M. Recombinant *Lactobacillus plantarum* induces immune responses to cancer testis antigen NY-ESO-1 and maturation of dendritic cells. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11:2664–73.
- Piard JC, Hautefort I, Fischetti VA, Ehrlich SD, Fons M, Gruss A. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 1997;179:3068–72.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, Piard JC. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 2001;183:4157–66.

21. Turner MS, Hafner LM, Walsh T, Giffard PM. Peptide surface display and secretion using two LPXTG-containing surface proteins from *Lactobacillus fermentum* BR11. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:5855–63.
22. De Vos WM. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. *Int Dairy J*. 1999;9:3–10.
23. De Vos WM. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2:289–95.
24. Kuipers OP, De Ruyter PGGA, Kleerebezem M, De Vos WM. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol*. 1997;15:135–40.
25. Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J*. 1998;8:487–90.
26. Klaenhammer TR. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. *Int Dairy J*. 1998;8:497–505.
27. Christophe M, Kuczkowska K, Langella P, Eijsink VGH, Mathiesen G, Chatel JM. Surface display of an anti-DEC-205 single chain Fv fragment in *Lactobacillus plantarum* increases internalization and plasmid transfer to dendritic cells in vitro and in vivo. *Microb Cell Fact*. 2015;14(1):1.
28. Sak-Ubol S, Namvijitr P, Pechsrichuang P, Haltrich D, Nguyen T-H, Mathiesen G, Eijsink VGH, Yamabhai M. Secretory production of a beta-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system. *Microb Cell Fact*. 2016;15:81.
29. Yang X-S, Jiang Z-B, Song H-T, Jiang S-J, Madzak C, Ma L-X. Cell-surface display of the active mannanase in *Yarrowia lipolytica* with a novel surface-display system. *Biotechnol Appl Biochem*. 2009;54:171–6.
30. Aukrust T, Blom H. Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Res Int*. 1992;25:253–61.
31. Sørvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VGH, Axelsson L. High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology*. 2005;151:2439–49.
32. Mathiesen G, Sveen A, Brurberg MB, Fredriksen L, Axelsson L, Eijsink VGH. Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genom*. 2009;10:425.
33. Sørvig E, Grönqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijsink VG, Axelsson L. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;229:119–26.
34. Eijsink VGH, Brurberg MB, Middelhoven PH, Nes IF. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sakei* by a secreted peptide. *J Bacteriol*. 1996;178:2232–7.
35. Songsiriritthigul C, Buranabanyat B, Haltrich D, Yamabhai M. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2010;9:1–13.
36. Pechsrichuang P, Yoohat K, Yamabhai M. Production of recombinant *Bacillus subtilis* chitosanase, suitable for biosynthesis of chitosan-oligosaccharides. *Bioresour Technol*. 2013;127:407–14.
37. Mekasha S, Toupalová H, Eka Linggadjaja E, Tolani HA, Andèra L, Arntzen MØ, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH, Agger JW. A novel analytical method for D-glucosamine quantification and its application in the analysis of chitosan degradation by a minimal enzyme cocktail. *Carbohydr Res*. 2016;433:18–24.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3.3 การใช้เอนไซม์ chitosanase ที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* food grade expression system ไปใช้เพิ่มมูลค่าโคโตซาน โดยการเปลี่ยนไปเป็น โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ คอซ

การวิจัยเรื่องสุดท้ายของโครงการวิจัยที่เสนอขอนี้ คือการนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก food grade expression system ที่ได้พัฒนาขึ้นมา ไปใช้ย่อย โคโตซาน ให้เป็น คอซ ซึ่งให้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ แต่ยังมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้จริงคือ media ที่ใช้เลี้ยง มีกลิ่น และยังมีราคาสูง อีกทั้ง ยังต้องปรับระบบการผลิตให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้โดยไม่ต้องกระตุ้นด้วยสารชักนำ ซึ่งผู้วิจัยจะพิจารณาทำการพัฒนาต่อยอดต่อไปหลังจากประเมินด้วยหลักการ design thinking และ ใช้ business canvas ประกอบ ตามแนวทาง entrepreneurship

งานวิจัยหัวข้อสุดท้ายของโครงการวิจัยนี้ เป็นงานวิจัยเพื่อใช้ประกอบเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทของ นาย ชายน้อย เข็ม นักศึกษาจากประเทศกัมพูชา งานวิจัยนี้จะได้นำเสนอใน proceeding SUT International Virtual Conference on Science and Technology Nakhon-Ratchasima, Thailand 28th August 2020 มีรายละเอียด ดังแสดงใน ๗ หน้าถัดไป



AECXXX

(this number will be assigned after full manuscript is accepted)

Production of chitosan oligosaccharides using food-grade enzyme technology

Chai Noy Soem¹, and Montarop Yamabhai^{1,*}

Molecular Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand 30000

* Corresponding Author: montarop@g.sut.ac.th

Abstract. Chitosan oligosaccharides (CHOS), hydrolyzed oligomers of chitosan, have been shown to have several biological and physicochemical properties which are beneficial to human health and beauty. In this study, we have developed a food-grade enzyme technology for the production of soluble CHOS from chitosan, derived from chitin of shrimp and prawn shells, in a lactic acid solution. The bioconversion yields were 100%, and the products were kept in lyophilized form. Even though CHOS can be produced chemically, physically and enzymatically, production of CHOS using enzyme technology is preferable due to several advantages, most importantly, the process is environmental-friendly, and the final products can be precisely control by regulating the bioconversion reaction. In this research, well-characterized chitosan oligosaccharides were produced using well developed food-grade enzyme technology in our laboratory. The CHOS products could be further applied for food and feed industry. The result from this study is an example of innovation for bio-circular green economy (BCG), of which wastes are converted into profitable high-value product using green technology.

1. Introduction

Chitosan oligosaccharides (CHOS), which are expected to be utilized as functional foods, pharmaceuticals ingredient and bioactive compound, are hydrolyzed oligomers of chitosan. Chitosan oligosaccharides can be produced partially through enzymatic reaction or chemically hydrolyzed. At high temperature with strong acidic condition, chitosan is hydrolyzed, result in large amount of glucosamine (chitosan monomer) [1]. Disadvantage of chemical reaction method is needs of highly convenient system to control the progress of the reaction and generation toxic wastes. Chitosan oligosaccharides production using enzymatic hydrolysis has few advantages over high performance chemical reaction such as mild reaction condition and ability to generate low monosaccharide final products [2]. The hydrolysis of chitosan using enzymatic methods is better than chemical reagent-catalyzed methods and physical methods because of the predictability and controllability as well as less demand of energy [3]. Moreover, the enzymatic methods are highly specific with minimal chemical modification of the products. Enzyme concentrations, pH, temperature, and reaction duration are critical factors in controlling the CHOS production using enzyme-catalyzed reaction. Chitosan oligosaccharides are found to hold plenty of potential biological properties and physicochemical properties which are beneficial to human health and beauty. Of particular importance, CHOS and its derivatives have been demonstrated to possess several biological activities including anti-inflammation, immunostimulation, anti-tumor, anti-obesity, antihypertension, anti-Alzheimer's disease, tissue regeneration promotion,

drug and DNA delivery enhancement, anti-microbial, anti-oxidation and calcium-absorption enhancement [1, 4-8]. In this study, we aimed to produce CHOS using a well-developed food-grade enzyme technology from *Lactobacillus plantarum* expression system that has been previously established in our laboratory. The reaction conditions were performed in a lactic acid solution. The products were analysed by thin layer chromatography (TLC) and kept in a lyophilized form.

2. Materials and Methods

2.1. Bacteria and Plasmid

Lactobacillus plantarum TLG02: [9, 10]

pSIP609/BsCsnA_nt [9]

2.2. Chitosan

Food grade chitosan was supported by Marine Bioresource Co.ltd Thailand. Chitosan (Off-white yellow appearance) used in this study is highly purified chitosan with percentage of purity >90%, produced from chitin of dried shrimp shell from tropical ocean. The degree of deacetylation (DD) was higher than 90%, pH 6-8 with water insolubility and solubility in acid solutions (99%). Chitosan particle size was smaller than 1.5 mm with less than 1% ash content.

2.3. Expression of Chitosanase using Food-Grade Expression system

Production of Chitosanase was carried out as previously described [9]. In short, batch fermentation with pH control was carried out in 3-L MRS medium using a bioreactor. Recombinant *L. plantarum* strains was taken from a glycerol stock stored at -80 °C, re-streaked on appropriate MRS plates and grown overnight at 37 °C. Ten colonies were picked and grown in 5 mL MRS broth overnight, then sub-culture into two flasks of 100 mL of MRS and cultivate at 37 °C without shaking for 18–24 h. The two overnight cultures were pooled together, mixed well and after measuring the cell density at 600 nm, they were used to inoculate 3 L of MRS medium to an OD 600 of ~0.1. After incubation at 30 °C with 100 rpm agitation under anaerobic condition to an OD600 of ~0.3, the cultures were induced with 12.5 ng/mL of IP-673 (amino acid sequence of IP-673 is Met-Ala-Gly-Asn-Ser-Ser-Asn-Phe-Ile-His-Lys-Ile-Lys-Gln-Ile-Phe-Tr-His-Arg). During further cultivation (30 °C with 100 rpm), the pH was controlled at pH 6.5 using 3.0 M sodium hydroxide. Chitosanase enzyme was secreted into the fermentation broth.

2.4. Concentration and purification of BsCsn46A

Bio-separation process, which were mainly centrifugation and crossflow filtration, were employed for the downstream processing of BsCsn64A. The culture broth was concentrated using cross-flow concentrator (Viva Flow 200, Satorious) after filtered with 0.2 microns filter. One-step purification technique was used to purify secreted enzymes with HisPur Ni-NTA Resin (Thermofisher).

2.5. Enzyme activity assay

Chitosanase activity assay was carried out as previously described [9, 11]. In short, reaction mixture consisted of 40 µL of appropriately diluted sample and 160 µL of 0.5 % chitosan (w/v) (in 200 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, and preincubated at 50 °C for 30 min). The reaction was incubated in a

Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 50 °C for 5 min, with mixing at 900 rpm. The reaction was stopped by adding 200 µL of DNS solution, and the mixture was centrifuged at 12,000g for 5 min to remove the remaining chitosan that was precipitated. The color in the supernatant was developed by heating at 100 °C for 20 min and cooling on ice. The reducing sugar in the supernatant was determined by measuring OD at 540 nm, using 1–5 µmol/mL of d-glucosamine as standards. The reactions were done in triplicate and the mean values with standard deviations are reported.

2.6. Protein determination

Protein concentrations were determined using the BCA method with bovine serum albumin as standard. Analysis were operated according to the company instruction.

2.7. SDS-PAGE analysis

As described previously [9], denaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using the method of Laemmli using 12 % (w/v) polyacrylamide gels. The protein samples were briefly heated (10 min) in the loading buffer at 100 °C with a heat block (Eppendorf), and then cooled on ice before loading. Protein bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue R-250.

2.8. Production of Chitosan oligosaccharides in lactic acid

Chitosan oligosaccharides was produced using enzymatic hydrolysis method, of which enzyme usage conditions were 0.05 and 0.1 µg per 1 mg of chitosan, respectively. Chitosan at 1% w/v was dissolved using 2% lactic acid solution, and the pH was adjusted to 5.5 using sodium hydroxide (1 N). Chitosan substrate solution was pre-incubated for 30 min at 37 °C. The reaction mixture was proceeded for 48 hours. *BsCsn46A* was added 3 times, at the start of the reaction, 12 hours and at 24 hours of reaction. The reaction mixture was then heated to inactivate enzyme activity at 100 °C for 20 min, then cool down before being centrifuged and filtered to remove all the precipitate in the solution. Chitosan oligosaccharides was obtained as dried powder.

2.9. Lyophilization of CHOS

Lyophilization was carried out (GAMMA 2-16 LSC, CHRIST, Germany) using freeze-dryer where the product mixture was totally frozen before the operation. The condenser was set to -90°C and the shelves were set to -20°C. The samples were left in the freeze-dryer chamber for up to 72 hours with vacuum pressure at 0.001 Pa. After freeze-drying, samples were collected and kept at -20°C.

2.10. Thin Layer Chromatography

Dried CHOS powder was weighted and dissolved in distilled water and a solution of 100mg/mL was prepared. Two and 3 µl of the samples were spotted onto the TLC silica plate with the distance from each sample of 0.5 cm. Hot air blower was used to dry the sample after each 1 µl of spotting. The prepared plate was then left stand in a mobile-phase saturated beaker (14 mL isopropanol, 4 mL water and 2 mL ammonia) for about 2 hours until the visible mobile phase wet through to the top of the plate, then the plate was dried, and the same chromatography was repeated. After that, the plate was dried, and rapidly

soaked in 10% sulfuric acid in ethanol for about 1-2 mins before the visualization was done by heating the plate at 150°C with a plate heater until the spots on the plate became visible.

3. Results and Discussions

Expression and purification of BsCsn46A using food-grade expression system

Lactobacillus plantarum TGL02 was used as expression host for the production of food-grade chitosanase. According to previous report [9], the major proportion of the expressed enzyme is found in the bacterial culture supernatant which was reproducible in this experiment. After the expression for 20 hours, the culture supernatant was collected by centrifugation, filtered and then subjected to concentration process using a cross flow concentration system with a molecular weight cut off filter membrane of 10,000 Da. Then, the concentrated culture broth was subjected to the purification process using gravity-flow column chromatography technique. The enzyme could be well purified using resin affinity beads with high affinity specific binding to histidine tag and well-engineered histidine tag on the recombinant enzyme as demonstrated in Fig.1. The enzyme molecular weight of the expressed enzyme was approx.32 kDa as previously shown [9, 12]. The purified enzyme was then subjected to the concentration process in order to reduce the sample volume and increase enzyme concentration.

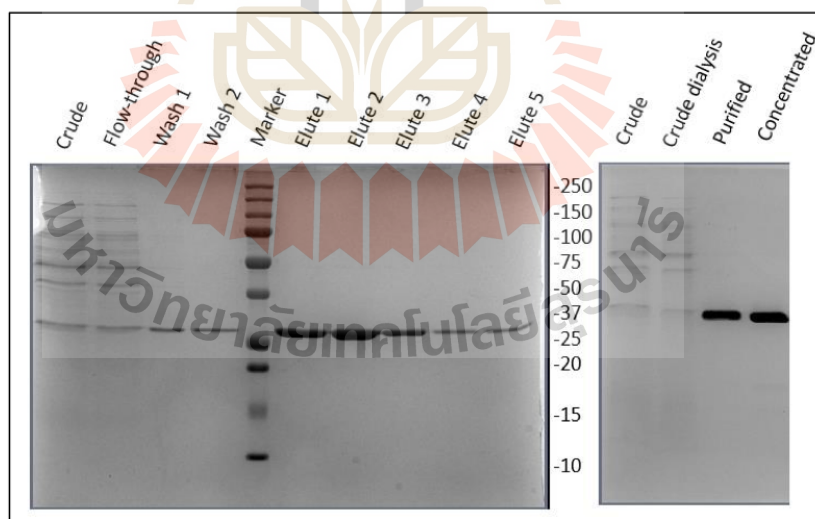


Figure 1. SDS-PAGE of chitosanase using food grade expression system. Purified protein was obtained from culture broth after 20 h of induction with 0.1 mM IPTG and were separated by SDS-PAGE on 15% gels.

Table 1. Enzymatic activity and protein concentration of *BsCsn46A*

	Induction time (h)	Enzymatic activity (Total units ^a)
Culture Broth	20	16.0±1
Purified enzyme	20	162.0±1
Concentrated purifies	20	413.0±1

	Induction time (h)	Protein conc (mg/L)
Culture Broth	20	4.0±1
Purified enzyme	20	680.0±1
Concentrated purifies	20	780.0±1

3.1.1. Production of Chitosan oligosaccharides using Food Grade *BsCsn46A*

At different time points of hydrolysis reaction, CHOS samples were collected and were subjected to TLC (Figure 2). Two different enzyme concentration were used, 0.05 and 0.1 µg per mg of chitosan, respectively. Hydrolyzed chitosan oligosaccharides samples were collected from the reaction at different time ranging from 5mins, 10 mins, 30 mins, 60 mins, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 12 hours 18 hours, 24 hours and 48. As shown in the TLC result, the final products were gradually shorter during the course of the reaction time. However, no monomer could be observed by TLC. This phenomena confirmed previous observation[13]. The reaction solution was then subjected to lyophilization using a freeze dryer. The dried CHOS powder was then dissolved in water at a concentration of 100 mg/mL for TLC analysis (Figure 3). The sample was fully water soluble, indicating that the water-insoluble chitosan was totally depolymerized by the enzyme during hydrolysis reaction. The sample of early stage of hydrolysis, specially at time points, 5 mins, 10 mins, 30 mins, 1 hours, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 30 hours and 36 hours, respectively, were not subjected to lyophilization and solubility testing. Judging from the TLC result, there were high molecular weight chitosan in the reaction inside the reaction solution until 24 hours of the reaction. To these time points, dimers and trimers CHOS molecules were merely visualized on the silica gel plate while only larger hydrolyzed molecules such as tetramers and pentamers could be observed. After second enzyme addition at 24-hour time point, shorter chain of hydrolyzed product was seen more while larger and longer molecules were fading out of the TLC plate. Still, no monomer sample was visualized even at 48 hours of the reaction. In this study, the purified food-grade enzyme was used, however, it should be possible to produce CHOS using crude enzyme directly from the culture broth, which would be cheaper. This future perspective for agriculture and animal applications of CHOS; however, is currently limited due to the complexity of the bacterial media (MRS). Further investigation on the development of host strain to be able to grow in cheaper media without addition of inducing peptide, will be more beneficial. Freeze-drying the final product is also an important step of the production process since it helps with product storage, transportation, as well as longer the final product shelf life. More investigation on the optimal storage condition of the CHOS products must be further explored.

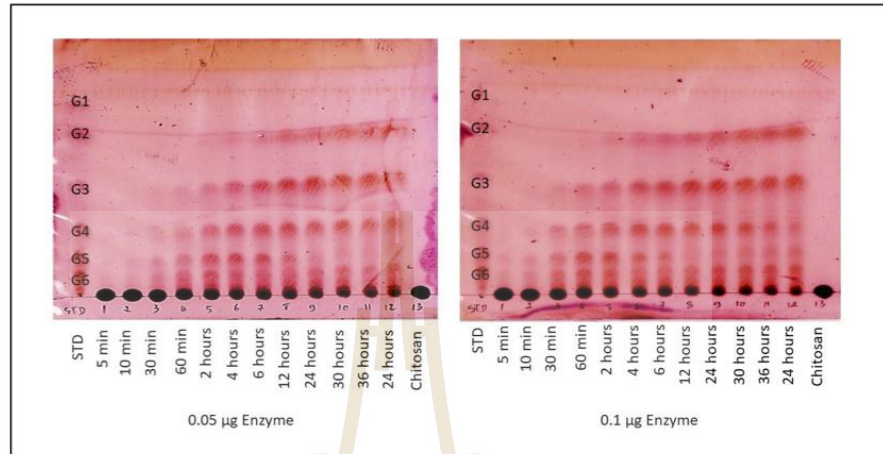


Figure 2. Thin layer chromatography of chitosan oligosaccharides produced by food grade enzyme. 2 different enzyme concentration were used, 0.05 and 0.1 μg , respectively. Hydrolyzed chitosan oligosaccharides samples were collected from the reaction at different time from 5mins, 10 mins, 30 mins, 60 mins, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours and, more enzyme was added again at 24 hours and samples were collected at 6 hours, 12 hours and 24 hours after second enzyme addition.

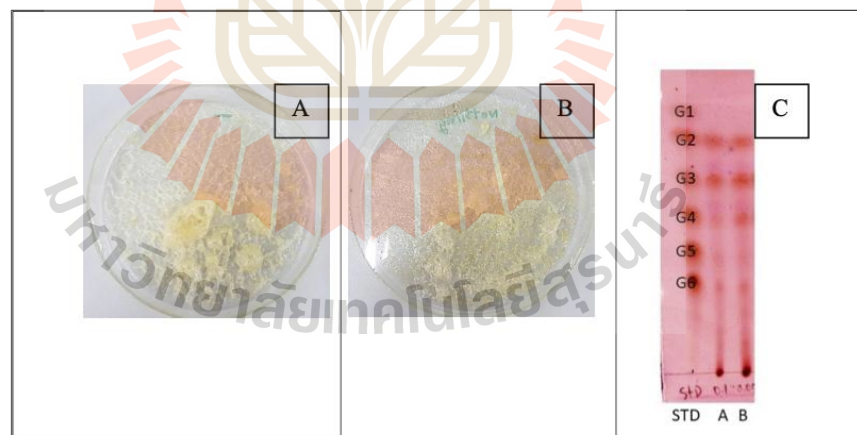


Figure 3. Final CHOS lyophilized product after lyophilization using freeze dryer. A: CHOS hydrolyzed for 48 hours using 0.05 μg of *BsCsn46A* per mg of chitosan, enzyme was added at time 0, 12, 24. B: CHOS hydrolyzed for 48 hours using 0.1 μg of *BsCsn46A* per mg of chitosan, enzyme was added at time 0, 12, 24. C: Thin layer chromatography analysis of final CHOS product dissolved in water after lyophilization (A: CHOS hydrolyzed by 0.1 μg enzyme per mg of chitosan, B: CHOS hydrolyzed by 0.05 μg of enzyme per mg chitosan for 48 hours)

Conclusion

According to our previous studies and this study, we demonstrated that *BsCsn46A* can be used to efficiently converse chitosan into a mixture of variety of soluble chitosan oligosaccharides with various degree of polymerization from shortest DP2 to longest DP6 as expected from the enzyme natural characteristics [13]. The results indicated the potential application of food-grade enzyme technology from *Lactobacillus plantarum* for the production of CHOS for agriculture and animal feed applications after further investigation.

Acknowledgments

Authors wishing to acknowledge Suranaree University of Technology, OROG scholarship, Molecular Biotechnology Laboratory (MY Lab) and Marine Bioresource Co.ltd Thailand for the support of this study.

References

- [1] Muanprasat C, Chatsudthipong V 2017 *Pharmacol Ther.* **170**80-97
- [2] Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sorlie M, Varum KM, Eijsink VG 2010 *Mar Drugs.* **8**(5)1482-517
- [3] Lodhi G, Kim YS, Hwang JW, Kim SK, Jeon YJ, Je JY, et al. 2014 *Biomed Res Int.* **2014**654913
- [4] Dai X, Chang P, Li X, Gao Z, Sun Y 2017 *Neurosci Lett.* **665**80-5
- [5] Jia P, Yu L, Tao C, Dai G, Zhang Z, Liu S 2017 *Biomed Pharmacother.* **93**807-15
- [6] Xu Q, Wang W, Qu C, Gu J, Yin H, Jia Z, et al. 2017 *Carbohydr Polym.* **170**241-6
- [7] Xu Q, Wang W, Yang W, Du Y, Song L 2017 *Int J Biol Macromol.* **98**502-5
- [8] Zou P, Yuan S, Yang X, Zhai X, Wang J 2017 *Chem Biol Interact.* **279**129-35
- [9] Sak-Ubol S, Namvijitr P, Pechsrichuang P, Haltrich D, Nguyen TH, Mathiesen G, et al. 2016 *Microb Cell Fact.* **15**81
- [10] Nguyen TT, Mathiesen G, Fredriksen L, Kittl R, Nguyen TH, Eijsink VG, et al. 2011 *J Agric Food Chem.* **59**(10)5617-24
- [11] Pechsrichuang P, Yoohat K, Yamabhai M 2013 *Bioresour Technol.* **127**407-14
- [12] Pechsrichuang P, Songsiriritthigul C, Haltrich D, Roytrakul S, Namvijitr P, Bonaparte N, et al. 2016 *Springerplus.* **5**(1)1200
- [13] Pechsrichuang P, Lorentzen SB, Aam BB, Tuveng TR, Hamre AG, Eijsink VGH, et al. Bioconversion of chitosan into chito-oligosaccharides (CHOS) using family 46 chitosanase from *Bacillus subtilis* (*BsCsn46A*) 2018. 420-8 p.

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก เป็นโรงงานระดับเซลล์ที่น่าสนใจ ในการใช้ผลิต โปรตีน และเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพราะ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้รับการรับรองว่ามีสถานะ ปลอดภัย และเพาะเลี้ยงได้ง่าย แบคทีเรียแลคโตบาซิลัส แพลนทาร์ม เป็นแบคทีเรียที่ ปลอดภัย และมีประวัติการใช้ในอาหารมายาวนาน

ในส่วนแรกของการวิจัย เป็นการผลิตเอนไซม์ โคโคซานเนส (CsnA) และ เบต้าแมนนาเนส (ManB) จากเชื้อ บาซิลัส ออกจากแลคโตบาซิลัส แพลนทาร์ม ผลการทดลองพบว่า ทั้ง ManB และ CsnA สามารถ ถูกผลิต และหลั่งออกมาจากเซลล์ได้เป็นอย่างดี โดยการใช้ระบบ pSIP ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน เมื่อใช้ทั้ง ยีนต้านยาปฏิชีวนะ อีริโทรมัยซิน และ ยีน *clr* เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก

ในส่วนที่ ๒ ของโครงการวิจัย เป็นการแสดงเอนไซม์ทั้ง ๒ บนผิวของ แลคโตบาซิลัส แพลนทาร์ม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สำหรับเป็นตัวเร่งทางชีวภาพแบบ ทั้งเซลล์ ผลการศึกษาพบว่า เอนไซม์ สามารถยึดอยู่กับผิวเซลล์ แลคโตบาซิลัส แพลนทาร์ม โดยยังมีฤทธิ์ย่อย แมนแนน และ โคโคซาน ได้ ดังนั้นจึงอาจใช้เซลล์ประเภทนี้ ในกระบวนการผลิตต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารได้

ในส่วนสุดท้ายของโครงการวิจัย เป็นการแสดงความสำเร็จในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ระบบการ แสดงออกของยีนเพื่อการผลิตโปรตีนปรับแต่งพันธุกรรม สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ของโครงการวิจัยนี้ โดยเป็นการใช้ เอนไซม์สำหรับอาหาร ที่ได้พัฒนาขึ้นในการผลิต คอช ที่ละลายน้ำได้ จาก โคโคซาน ที่สกัดได้จากเปลือก กุ้ง ในปฏิกิริยาที่มีกรดแลคติก ผลการศึกษาวิจัยพบว่า สามารถผลิต คอช ที่มีโครงสร้างสม่ำเสมอ ชัดเจน ด้วยระบบการผลิตเอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารที่ได้พัฒนาขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ ซึ่งคอช เหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดสำหรับอุตสาหกรรม อาหารคนและสัตว์ได้ต่อไป

ประเด็นที่สำคัญที่สุดที่จะต้องพัฒนาต่อไป จนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง นั้น คือจะต้องปรับ media สำหรับเลี้ยงเชื้อให้ ถูกลง เพราะระบบปัจจุบันใช้ MRS ซึ่งมีราคาสูง และสูตรซับซ้อน อีกทั้งยังต้อง ปรับระบบการแสดงออกของยีนให้ถาวรไม่ต้องใช้ peptide กระตุ้น และเมื่อจะนำไปพัฒนาต่อยอดให้เกิด มูลค่าจริง จะต้องทำการวิเคราะห์ business model ด้วย design thinking สร้าง business model canvas เพื่อพิจารณาแนวทางการต่อยอดให้เหมาะสม เพื่อให้มั่นใจได้ว่า จะก่อให้เกิดประโยชน์ และรายได้ อย่างแท้จริง แม้ระบบนี้จะมีศักยภาพสูงมากก็ตาม

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- Arnold, F.H., and Moore, J.C. (1997). Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv Biochem Eng Biotechnol* *58*, 1-14.
- Bron, P.A., Benchimol, M.G., Lambert, J., Palumbo, E., Deghorain, M., Delcour, J., De Vos, W.M., Kleerebezem, M., and Hols, P. (2002). Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* *68*, 5663-5670.
- Diep, D.B., Mathiesen, G., Eijsink, V.G., and Nes, I.F. (2009). Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol* *10*, 62-73.
- James, J., and Simpson, B.K. (1996). Application of enzymes in food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* *36*, 437-463.
- Juajun, O., Nguyen, T.H., Maischberger, T., Iqbal, S., Haltrich, D., and Yamabhai, M. (2011). Cloning, purification, and characterization of beta-galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Appl Microbiol Biotechnol* *89*, 645-654.
- Kay, B.K., Kasanov, J., and Yamabhai, M. (2001). Screening Phage-Displayed Combinatorial Peptide Libraries. *Methods* *24*, 240-246.
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P., and Poolman, B. (2000). Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr Opin Microbiol* *3*, 276-282.
- Magnuson, B., Munro, I., Abbot, P., Baldwin, N., Lopez-Garcia, R., Ly, K., McGirr, L., Roberts, A., and Socolovsky, S. (2013). Review of the regulation and safety assessment of food substances in various countries and jurisdictions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* *30*, 1147-1220.
- Maischberger, T., Leitner, E., Nitisinprasert, S., Juajun, O., Yamabhai, M., Nguyen, T.H., and Haltrich, D. (2010). beta-Galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: Purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides. *Biotechnol J*.
- Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., and DiNovi, M.J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review. *Regul Toxicol Pharmacol* *45*, 144-158.
- Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnol* *9*, 6.
- Pechsrichuang, P., Yoohat, K., and Yamabhai, M. (2013). Production of recombinant *Bacillus subtilis* chitosanase, suitable for biosynthesis of chitosan-oligosaccharides. *Bioresour Technol* *127*, 407-414.

- Peterbauer, C., Maischberger, T., and Haltrich, D. (2011). Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol J* 6, 1147-1161.
- Phrommao, E., Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Yamabhai, M. (2011). A novel subtilase with NaCl-activated and oxidant-stable activity from *Virgibacillus* sp. SK37. *BMC Biotechnol* 11, 65.
- Sinsuwan, S., Yongsawatdigul, J., Chumseng, S., and Yamabhai, M. (2012). Efficient expression and purification of recombinant glutaminase from *Bacillus licheniformis* (GlsA) in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 83, 52-58.
- Songsiriritthigul, C., Buranabanyat, B., Haltrich, D., and Yamabhai, M. (2010a). Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 9, 20.
- Songsiriritthigul, C., Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P., and Yamabhai, M. (2010b). Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. *Bioresour Technol* 101, 4096-4103.
- Songsiriritthigul, C., Pesatcha, P., Eijsink, V.G., and Yamabhai, M. (2009). Directed evolution of a *Bacillus* chitinase. *Biotechnol J* 4, 501-509.
- Tokuhara, D., Rholvarez, B., Mejima, M., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Kurokawa, S., Kuroda, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nochi, T., *et al.* (2013). Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J Clin Invest*.
- Yamabhai, M., Buranabanyat, B., Jaruseranee, N., and Songsiriritthigul, C. (2011). Efficient *E. coli* expression systems for the production of recombinant beta-mannanases and other bacterial extracellular enzymes. *Bioeng Bugs* 2, 45-49.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การผลิตบุคลากร

ส่วนหนึ่งของการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ ใช้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์นักศึกษาปริญญาเอก ๒ คน คือ นาย สุทธิพงษ์ ศักดิ์อุบล นางสาว ฮงมิน เหงียน และนักศึกษาปริญญาโท ๒ คน คือ นางสาวปณิตานามวิจิตร และ นาย ชายน้อย เข็ม



ประวัติหัวหน้าโครงการ

มณฑารพ ยมาภัย เกิดเมื่อวันที่ ๘ มกราคม ๒๕๑๐ เป็นบุตรของ รศ.ดร. สวนิต และ ผศ. อำไพ ยมาภัย จบการศึกษาทั้งในระดับประถม และ มัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ ๑๙ จากนั้นเข้าศึกษาต่อที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับปริญญาตรีเภสัชศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๓๒ แล้วได้เข้ารับราชการเป็นเภสัชกรประจำโรงพยาบาลหัวตะพานเป็นเวลา ๑ ปี ก่อนจะมาเป็นอาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปี ๒๕๓๖ ได้รับทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship ไปทำงานวิจัยที่ University of Minnesota เป็นเวลา ๙ เดือน แล้วจึงได้รับทุนรัฐบาลไทยไปเรียนต่อในระดับปริญญาเอกที่ University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมี Prof. Dr. Brian K. Kay เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา จบการศึกษา ระดับปริญญาเอกด้าน molecular biology ในปี พ.ศ. ๒๕๔๑ จากนั้นในปี พ.ศ. ๒๕๔๓-๒๕๔๕ ได้ทุนไปทำ postdoctoral 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 สหพันธรัฐเยอรมัน. สมรสกับ ศ.ดร. ดิฐธมา หาลทิช เมื่อวันที่ ๑๖ สิงหาคม ๒๕๔๗ และมีบุตร ๑ คน ชื่อ ด.ญ. ฐานิกา ยมาภัย หาลทิช ปัจจุบันเป็นศาสตราจารย์ และหัวหน้าห้องปฏิบัติการอณูเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยในปัจจุบันเป็นงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเชิงอณู (molecular biotechnology) มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยีเฟจ (phage display technology) และ เทคนิคอณูวิวัฒนาการ (molecular evolution) ในงานทางวิศวกรรมแอนติบอดี (antibody engineering) และวิศวกรรมเอนไซม์ (enzyme engineering) ผลงานวิจัยตามฐานข้อมูล ISI web of Sciences มีทั้งหมด ๔๐ เรื่อง มีจำนวน citation ๑๑๓๖ เรื่อง มี ค่า h-index ๑๗ ผลงานวิจัยตามฐานข้อมูล Scopus มีทั้งหมด ๖๑ เรื่อง มีจำนวน citation ๒๑๐๙ มี ค่า h-index ๒๒ ผลงานวิจัยตามฐานข้อมูล Google scholar มีทั้งหมด ๖๖ เรื่อง มีจำนวน citation ๒๙๘๕ มี ค่า h-index ๒๔ มี มีนักศึกษา ปริญญาโทที่ศึกษาจบไปแล้ว ๙ คน นักศึกษาปริญญาเอก ๗ คน

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทร 044 224152-4 224234 หรือ 244388 โทรสาร 044 224150

Email: montarop@g.sut.ac.th

ภาคผนวก ข การเผยแพร่ผลงาน

ผลงานจากโครงการนี้ ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ ดังนี้

ก. งานประชุมระดับนานาชาติ

- Soem, C.N., and Yamabhai, M. Production of chitosan oligosaccharides using food-grade enzyme technology. Proceeding SUT International Virtual Conference on Science and Technology, Nakhon-Ratchasima, Thailand 28th August 2020

ข. ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ (ดั่งแนบท้ายรายงานวิจัยนี้)

- Sak-Ubol, S., Namvijitr, P., Pechsrichuang, P., Haltrich, D., Nguyen, T.H., Mathiesen, G., Eijsink, V.G., and Yamabhai, M. (2016). Secretory production of a beta-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system. *Microb Cell Fact* 15, 81.
- Nguyen, H.M., Mathiesen, G., Stelzer, E.M., Pham, M.L., Kuczkowska, K., Mackenzie, A., Agger, J.W., Eijsink, V.G., Yamabhai, M., Peterbauer, C.K., *et al.* (2016). Display of a beta-mannanase and a chitosanase on the cell surface of *Lactobacillus plantarum* towards the development of whole-cell biocatalysts. *Microb Cell Fact* 15, 169.

ค. สิทธิบัตร ไม่มี