รหัสโครงการ SUT-102-50-24-56

รายงานการวิจัย

การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* โดยเทคนิค Site-Directed Mutagenesis: เพื่อประโยชน์ในการสลายไคตินโดยวิธีชีวภาพ

(A Study of Substrate Specificity of Chitinase A from *Vibrio carchariae* using Site-Directed Mutagenesis Technique: An Application on Chitin Bioconversion)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT-102-50-24-56

รายงานการวิจัย

การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* โดยเทคนิค Site-Directed Mutagenesis: เพื่อประโยชน์ในการสลายไคตินโดยวิธีชีวภาพ

(A Study of Substrate Specificity of Chitinase A from *Vibrio carchariae* using Site-Directed Mutagenesis Technique: An Application on Chitin Bioconversion)

คณะผู้วิจัย
หัวหน้าโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์
สาขาวิชาชีวเคมี
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย
นางสาว สุพรรษา ปานทุม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2552

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์. ดร. วิภา สุจินต์
อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi* เป็นเอนไซม์ที่สลายไคตินให้เป็นน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และไคโตไบโอสเป็นผลิตผลหลัก งานวิจัยก่อนหน้าได้ทำการโคลนยีนไคติเนส เอ และได้ศึกษาคุณสมบัติทางเอนไซม์ไคติเนส เอ งานวิจัยนี้อธิบายบทบาทของกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณจับกับสับสเตรทและกรดอะมิโนที่ผิวของเอนไซม์ในการสลายสับสเตรทไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp70 Trp168 Tyr171 Trp231 Tyr245 Trp275 Trp397 และ Trp570 การทดสอบหาค่า specific hydrolyzing activity ของไคติเนสกลายพันธุ์ พบว่ามีเอนไซม์กลายพันธุ์ตัวเดียวคือ W397F ที่ให้ค่าแอคติวิตี้สูงกว่าเอนไซม์ดั้งเดิมส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์อื่นมีค่าแอคติวิตี้ลดลงอย่างมาก การวิเคราะห์หาน้ำตาลผลิตผลที่สร้างขึ้นโดยวิธี TLC พบว่าเมื่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่งรีดิวซ์ Trp275 ถูกเปลี่ยนเป็น Gly และ Trp397 เปลี่ยนเป็น Phe ทำให้รูปแบบการสลายน้ำตาลสายสั้นเปลี่ยนไปอย่างสิ้นเชิงแสดงว่ากรดอะมิโนทั้งสองน่าจะมีความสำคัญต่อการเลือกจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ การศึกษาการจับกับไคตินและการทดลองทางจลนพลศาสตร์แสดงให้เห็นว่า Trp70 ซึ่งพบอยู่ที่ผิวที่ปลายด้านเอ็นของโดเมนจับไคตินมีความสำคัญมากต่อการจับกับไคตินสายยาว การตรวจหารูปแบบการจับของสับสเตรทโดยเทคนิค HPLC MS พบว่า NAG_6 ชอบบริเวณจับ -2 ถึง + 2 มากกว่าบริเวณจับ -3 ถึง +2 ส่วน NAG_5 จะจับกับบริเวณจับ -2 ถึง +2 อย่างเดียวในขณะที่ crystalline α chitin จะเริ่มจับที่บริเวณจับได้หลายตำแหน่งทำให้สลายตัวกลางไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ได้หลายชนิดซึ่งตัวกลางเหล่านี้จะจับกับตำแหน่ง -2 ถึง +2 เป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าไคติเนสกลายพันธุ์ W275G และ W397F มีความชอบต่อสับสเตรทชนิด β มากกว่าสับสเตรทชนิด α

ABSTRACT

Chitinase A from a marine bacterium *Vibrio harveyi* is an enzyme that degrades chitin to chitooligosaccharides, yielding chitobioase as the major product. The gene encodes chitinase A was previously cloned and its enzymatic properties characterized. This study describes the functional roles of the aromatic residues located at the substrate binding cleft and the surface-exposed residues in chitin and chitooligosaccharide hydrolyses. Point mutations of Trp70, Trp168, Tyr171, Trp231, Tyr245, Trp275, Trp397, and Trp570, were generated. Investigation of specific hydrolyzing activity indicated that only mutant W397F had enhanced activity, while other mutants showed a significant loss of the activity. TLC analysis of product formation showed a complete change in the hydrolytic patterns of short-chain substrates when the reducing end residues Trp275 was mutated Gly and Trp397 to Phe, suggesting that both residues were crucial for the binding selectivity of chitinoligosaccharides. Chitin binding assay and kinetic experiments suggested that Trp70, which is located on the surface at the *N*-terminal end of the chitin binding domain, was the essential binding residue for a long-chain chitin. Assessment of substrate binding modes by HPLC MS revealed that NAG_6 preferred subsites -2 to + 2 over subsites -3 to +2 and NAG_5 only bound to subsites -2 to +2. Crystalline α chitin initially occupied various subsites, generating variuos chitioligosaccharide intermediates which later interacted mainly to subsites -2 to +2. In addition, mutants W275G and W397F preferred β substrates over α substrates.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ ……	ก
บทคัดย่อภาษาไทย ……	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ……	ค
สารบัญ ……	ง
สารบัญภาพ ……	จ
สารบัญตาราง ……	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย ……	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย ……	3
ขอบเขตของการวิจัย ……	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย ……	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย……	5
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์……	9
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย ……	24
ข้อเสนอแนะ ……	24
บรรณานุกรม ……	25
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก ……	27
ภาคผนวก ข ……	31
ประวัติผู้วิจัย ……	32

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์ 1

รูปที่ 3.1 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *V. carchariae*..... 9

รูปที่ 3.2 การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณเร่งของไคติเนส เอ ที่เป็นเป้าหมาย ของการกลายพันธุ์..... 10

รูปที่ 3.3 การวิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนส เอ หลังทำการกลายพันธุ์..... 11

รูปที่ 3.4 การวิเคราะห์ทาง TLC แสดงการสลาย colloidal chitin..... 13

รูปที่ 3.5 การวิเคราะห์ทาง TLC ที่แสดงรูปแบบการสลาย hexaNAG..... 15

รูปที่ 3.6 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *V. carchariae* ที่ แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโน Ser33 Trp70 Trp231 และ Tyr245 ที่บริเวณ ด้านนอกโมเลกุลของเอนไซม์..... 15

รูปที่ 3.7 การจับของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ผิวโปรตีนกับไคติเนสใ..... 15

รูปที่ 3.8 Adsorption binding isotherms ของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ผิวโปรตีนกับ colloidal chitin..... 18

รูปที่ 3.9 กลไกการจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และไคตินที่บริเวณเร่งของ เอนไซม์ไคติเนส..... 19

รูปที่ 3.10 ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อย chitin โดยวิธี quantitative HPLC MS..... 21

รูปที่ 3.11 ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อย chitin โดยวิธี quantitative HPLC MS..... 22

สารบัญตาราง

หน้า

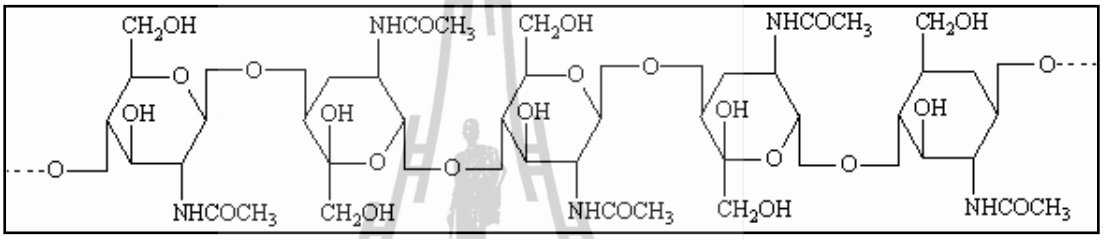
ตารางที่ 3.1 ค่า specific hydrolyzing activity ของโปรตีน wild-type และ
โปรตีนกลายพันธุ์…….. 12
ตารางที่ 3.2 ผลของการกลายพันธุ์ต่อค่า hydrolytic activity ของเอนไซม์ไคติเนส เอ…..... 16
ตารางที่ 3.3 ผลของการกลายพันธุ์ต่อค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนส เอ…… 17
ตารางที่ 3.4 การประมาณผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์โดย
วิธี quantitative HPLC MS analysis……. 20
ตารางที่ 3.5 ค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายสับสเตรทไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และ
ไคตินของเอนไซม์ไคติเนสดั้งเดิมและเอนไซม์ไคติเนสกลายพันธุ์…….. 23

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลีเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ของ *N*-acetyl glucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคลซิดิกแบบ β1→4 ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคตินโพลีเมอร์

ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลีเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 10^{10} ถึง 10^{11} ตันต่อปี (Gooday, 1994) ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเภสัชกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ

เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร เช่นโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง โรงงานอาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมข้างเคียงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะนี้การย่อยสลายไคตินโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมี ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิกิริยาการย่อยสลาย

ในธรรมชาติการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์สองชนิดด้วยกัน กล่าวคือขั้นตอนแรกไคตินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนส (EC3.2.1.14) ได้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์และให้ผลิตผลสุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ขั้นตอนต่อมาคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุล

คู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์บีต้าเอนอะซิทิลกลูโคซะมินิเดส หรือไคโตไบเอส (β-N-acetyl glucosaminidase/chitobiase) (EC 3.2.1.29) (Davis & Eveleigh, 1984)

เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไปเช่น ที่ส่วนต่าง ๆ ของพืช ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล สัตว์เคี้ยวเอื้อง และมนุษย์ หน้าที่ของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีแตกต่างกันไป เช่น เกี่ยวข้องในขบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา (Papavizas, 1985; Cabib, 1987; Kuranda & Robbins, 1991) มีส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่ (Sivan & Chet, 1989; Srivastava, et al., 1985) มีส่วนช่วยในการย่อยสารอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลง ปลาชนิดต่าง ๆ เช่น ปลาทอง ปลาเทร้า ปลาซีบาส เป็นต้น (Okutani, 1977; Okutani, et al., 1967) นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) เก่าที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา Spindler-Barth, 1993) ในพืชเอนไซม์ไคติเนสมีส่วนร่วมในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช (Boller et al., 1983; Pleban et al., 1997) และขบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช (de Jong et al., 1992) ส่วนในคนพบว่า acidic chitinase มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิดโรคภูมิแพ้ได้ (Wills-Karp & Karp, 2004)

ตามหลักเกณฑ์ที่เสนอโดย Henrissat (Henrissat & Bairoch, 1993) โดยอาศัยความใกล้เคียงของลำดับของกรดอะมิโนเป็นหลักจำแนกเอนไซม์ไคติเนสออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ (1) ไคติเนสแฟมิลี 18 พบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่แบคทีเรีย ไปจนถึงพืชและสัตว์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีลักษณะเชิงโครงสร้างที่สำคัญคือมีบริเวณเร่งประกอบด้วย 2 motifs มาประกอบเป็นโครงสร้าง $(\alpha/\beta)_8$-TIM barrel และมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ substrated-assisted mechanism (Papanikolau et al., 2001; Bortone, et al., 2002; Sasaki et al., 2002) และ (2) ไคติเนสแฟมิลี 19 พบเฉพาะในพืชและแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Streptomyces* (Cohen-Kupiec & Chet 1998; Ohno et al., 1996) ลักษณะของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือมีบริเวณเร่งเป็นแบบ bilobal $\alpha+\beta$ folding motif และมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ inversion hydrolytic mechanism (Robertus & Monzingo, 1999)

เชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) ในแฟมิลี *Vibrionaceae* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอ ซึ่งเป็นสมาชิกของไคติเนสแฟมีลี 18 ในปริมาณมาก แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ออกนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในทะเลเช่น สาหร่ายสีเขียว ไดอะตอม เป็นต้น ให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (Yu et al. 1991; Montgomery & Kirchman, 1993; Bassler et al., 1991) ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้ถือว่าเป็นแหล่งเอนไซม์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในขบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของกากไคติน มีการวิจัยหลายชิ้นรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและชีววิทยาเชิงโมเลกุลและองค์ประกอบของยีนไคติเนสในแบคทีเรีย (Watanabe et al., 1990; Svityl et al., 1997) แต่การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนส เอ นี้มีเพียงในเชื้อแบคทีเรียที่สกัดจากดิน *Serratia*

marcescens (Perraki et al., 1994) และส่วน catalytic domain ของไคติเนส เอ จาก *Bacillus circulans* (Watanabe et al., 2001) เป้าหมายหลักของงานวิจัยทางด้านโครงสร้างเพื่อเข้าใจกลไกการทำงานการของเอนไซม์โดยละเอียดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เช่นการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา ทางการเกษตร (Wang et al., 1997; Lorito et al., 1998; Carroad & Tom, 1978; Cosio et al., 1982) การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่าง ๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ถั่ว อ้อย ให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านโรคราต่าง ๆ และทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การกำจัดกากของเสียไคตินและนำผลิตผลจากการย่อยไคตินไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และการเกษตร (Carroad & Tom, 1978; Cosio et al., 1982)

การศึกษาก่อนหน้านี้ผู้วิจัยพบว่าเชื้อแบคทีเรียในทะเล *V. carchariae* ผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอ เป็นหลักเพื่อการสลายไคติน (Suginta et al., 2000; Suginta, 2007) โดยเอนไซม์นี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยเดียวมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63 kDa ที่คุณสมบัติเป็นเอนโดไคติเนสที่สามารถสลายพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งต่าง ๆ ภายในสายไคตินโพลีเมอร์ได้ผลิตผลที่เป็นไคโตโอลิโกเมอร์มีความยาวตั้งแต่ 2-6 หน่วย แต่ผลิตผลของการย่อยสุดท้ายคือไคโตไบโอส จากการศึกษาคุณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีความชอบ (affinity) ต่อไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์มากขึ้นเมื่อสายของไคโตโอลิโกเมอร์ยาวขึ้นซึ่งแสดงถึงโครงสร้างของบริเวณเร่งที่มีลักษณะเป็น multiple binding subsites (Suginta et al., 2005) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องจากเอนไซม์ไคติเนส เอ ของ *Serratia marcescens* (SmChiA)พบว่ากรดอะมิโนหลายตัว ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะ conservedและมีคุณสมบัติไม่มีขั้วหรือเป็นวงแหวนอะโรมาติกได้แก่ Typ167, Tyr170, Typ275, Phe396, Tyr418 และ Typ539 จากโครงสร้างสามมิติของ (SmChiA) พบว่ากรดอะมิโนเหล่านี้มีบทบาทในการสร้างสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีขั้วที่บริเวณเร่งทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้ดี (Aronson et al., 2003) จากข้อมูลนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนในบทบาทของกรดอะมิโนเหล่านี้ในต่อความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ไคติเนส เอ ของเชื้อ *V. carchariae* โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาโมเลกุลของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมและในการสลายไคตินและมีความจำเพาะสูงต่อการสร้างไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่ต้องการ

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก 4 ประการคือ

1. เพื่อเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้วที่บริเวณเร่งและบริเวณ Chitin Binding Domain ของเอนไซม์ไคติเนสเอ จากเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae* โดยเทคนิค site-directed mutagenesis
2. เพื่อศึกษาการสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 และการทำบริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี
3. เพื่อศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของไคติเนส เอ กลายพันธุ์เทียบกับ wild-type โดย

เทคนิค quantitative HPLC

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขอบเขตเริ่มที่การสร้างไคติเนส เอ ที่กลายพันธุ์ จากเชื้อ *V. carchariae* โดยจะทำการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วที่บริเวณเร่งและบริเวณ Chitin Binding Domain โดยเทคนิค site-directed mutagenesis หลังจากนั้นจะทำการศึกษาการแสดงออกของไคติเนส และทำการสกัดโปรตีนเพื่อนำมาศึกษาสมบัติทางจลศาสตร์เพื่อเปรียบเทียบความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์กลายพันธุ์และเลือกคัดเอนไซม์ที่ให้ความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงสุดในการสลายไคติน

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้มี 4 ประการหลักคือ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัย เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินงานมาก่อน จึงคาดว่าผลสัมฤทธิ์จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor มากกว่า 1.5 ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง
2. องค์ความรู้ที่ได้รับในระหว่างการทำงานวิจัยสามารถถ่ายทอดให้นักวิจัยรุ่นเยาว์ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. เป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์เนื่องจากงานวิจัยนี้มีเป้าหมายหลักคือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนสที่มีความสามารถในการย่อยไคตินโดยขบวนการทางชีวภาพดีขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตสารไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเชิงการค้าและเภสัชกรรมต่อไป
4. เป็นการส่งเสริมการท่องเที่ยวและการรักษาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากกากไคตินเป็นของเสียทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล การใช้ประโยชน์จากไคตินจะช่วยบรรเทาปัญหาสิ่งแวดล้อมชายฝั่งทะเล

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
3. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
4. กรมส่งเสริมการการส่งออก กระทรวงพาณิชย์
5. กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
6. หน่วยงานเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากไคติน-ไคโตซาน

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การกลายพันธุ์ การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์

ทำการกลายพันธุ์โดยเทคนิค PCR site-directed mutagenesis โดยใช้ QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (QIAGEN) และใช้ wild-type *chitinase A* DNA ที่โคลนอยู่ใน pQE60 expression vector เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนเพื่อสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด singlemutant ดังนี้ S33A/W, W70A, W168G, Y171G, W231A, Y245A/W, W275G, E315M/Q, D392K/N, W397F และ W570G ส่วน double mutant ได้แก่ W397F/W570G triple mutant ได้แก่ W397F/W570G/ W275G) และ quadruple mutant ได้แก่ W397F/W570G/W275G/Y171G ดังอธิบายโดย Suginta et al. (2007)

หลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนด้วยการทำ automated DNA sequencing (BSU, ประเทศไทย) และวิเคราะห์ข้อมูลของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมใน DNASTAR package (DNASTAR, Inc., Madison, USA) ทำการ express รีคอมบิแนนท์ไคติเนส เอ ดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ด้วยการเลี้ยงเซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB/100 μg/ml ampicillin ที่ 25 °C จนได้ OD_{600} ประมาณ 0.6 ทำการ induce เซลล์ด้วย 0.5 mM isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) ที่ 25 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 4,500 *g* เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 °C ทำการละลายเซลล์ด้วย 40 ml ของ lysis buffer ที่ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) และ 1.0 mg/ml lysozyme ต่อจากนั้นทำการสลายเซลล์ด้วยเทคนิค ultrasonication แล้วปั่นแยกเอาเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 *g* เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ได้หลังการปั่นตกตะกอนด้วยวิธีโครมาโตรกราฟฟีแบบจับจำเพาะโดยใช้ Ni-NTA agarose เป็นตัวจับ หลังจากล้างคอลัมน์ด้วย 5 mM imidazole ตามด้วย 10 mM imidazole ทำการชะเอาโปรตีนที่จับอยู่กับ Ni^{2+} ด้วย 250 mM imidazole นำ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli, 1970) ทำการรวม fraction ที่มีแถบโปรตีนไคติเนสที่ตำแหน่ง 63 kDa เข้าด้วยกันแล้วนำมาผ่าน membrane filtration (M_r 10 000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) เพื่อกำจัด imidazole และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford's (Bradford, 1974) แล้วนำโปรตีนมาศึกษาหน้าที่ โครงสร้าง หรือเก็บที่ -30°C ใน 15% กลีเซอรอล จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

2.2. การหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไคติเนส

หาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไคติเนสโดยใช้ pNP-$GlcNAc_2$ เป็นสับสเตรท โดยทำปฏิกิริยาใน 96-well microtiter plate ทำปฏิกิริยา 100-µl ที่ประกอบด้วย10 µl เอนไซม์ 500 µM *p*NP-$(GlcNAc)_2$ และ 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1.0 M Na_2CO_3 (50 µl) แล้ววัดหาปริมาณ *p*-nitrophenol (*p*NP) ที่ค่าดูดกลืนแสง A_{405} แล้วคำนวณความเข้มข้นของ *p*NP ด้วยกราฟมาตรฐานของ *p*NP ที่สร้างขึ้นที่ช่วง 0-30 nmol อีกวิธีหนึ่งคือการหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยวิธี reducing-sugar assay โดยทำปฏิกิริยา 500 µl ที่ประกอบด้วย 1% (w/v) colloidal chitin ใน 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 และ 100 µg เอนไซม์ที่ 37°C ในเครื่องเขย่า Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเอาส่วนของไคตินออกด้วยความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส 200 µl มาทำปฏิกิริยาตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DMAB assay ตามวิธีของ Bruce *et al*. (1995) แล้ววัดหาปริมาณน้ำตาลที่ทำปฏิกิริยาที่ค่าดูดกลืนแสง A_{585} โดยใช้กราฟมาตรฐานของ $GlcNAc_2$ ที่ช่วง 0-1.75 µmol เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วน crystalline α-chitin ทำวิธีเดียวกันกับ colloidal chitin แต่ใช้ปริมาณเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาปริมาณ 400 µg (Pantoom et al., 2008)

2.3. การวิเคราะห์หาน้ำตาลโดยเทคนิค TLC

ทำการศึกษาปฏิกิริยาการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (NAG_2-NAG_6) ของเอนไซม์ไคติเนสดั้งเดิมและไคติเนสกลายพันธุ์ ในปริมาตร 20 µl โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ที่มี 2.5 mM สับสเตรท และ 200 ng เอนไซม์บริสุทธิ์ ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 0, 2.5, 5, 10, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 5 µl นำไปวิเคราะห์หาผลิตผลที่เกิดขึ้นด้วยวิธี thin layer chromatography โดยใช้แผ่น silica TLC plate ขนาด 5.0 ซม × 6.0 ซม เป็น stationary phase และมี mobile phase ที่ประกอบด้วย *n*-butanol:methanol: 30% ammonia solution:H_2O (10:8:4:2) (v/v) หลังจากนั้นสเปรย์แผ่น TLC ด้วยสารละลาย aniline–diphenylamine reagent แล้วอบที่ 120 °C เป็นเวลา 5–10 นาที (Suginta et al., 2007)

2.4. การแยกและวิเคราะห์น้ำตาลโดยเทคนิค HPLC MS

ทำปฏิกิริยาการสลายน้ำตาล NAG_5 และ NAG_6 ในปริมาตร 50 µl ที่ประกอบด้วย 500 µM สับสเตรท 100 ng เอนไซม์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 0, 3, 7, 20, 30, 60 และ 180 นาที ณ เวลาต่าง ๆ ทำการ aliquot สารละลาย 10 µl ลงใน

200- µl vial แล้วนำไปแยกด้วยHPLC ที่ต่อกับเครื่อง ESI/MS โดยคอลัมน์ที่ใช้คือ Hypercarb®column (ThermoQuest, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA) ขนาด 150 × 2.1 mm 5 µm ทำการ run คอลัมน์ที่อุณหภูมิ 10 °C ที่ flow rate เท่ากับ 0.4 ml/min ทำการชะน้ำตาลออกจากคอลัมน์ด้วย 5-70% gradient ของ acetonitrile ที่มี 0.1% formic acid คำนวณหา β/α ratios จากพื้นที่ใต้ peak ของน้ำตาลต่าง ๆ ส่วนการวิเคราะห์หามวลในเครื่อง electrospray MS ใช้โหมด positive full scan โดยเลือกช่วงของ mass-to-charge ratio (*m/z*) ระหว่าง 200-1,400 หลังจากนั้นทำการเพิ่ม signal-to-noise ratios ด้วยการเปลี่ยนโหมดในการวิเคราะห์เป็น single ion monitoring mode โดยเลือก *m/z* 424.5 สำหรับ NAG_2, *m/z* 627.5 สำหรับ NAG_3, *m/z* 830.3 สำหรับ NAG_3, *m/z* 1034.16 สำหรับ NAG_5 สำหรับ *m/z* 1236.3 สำหรับ NAG_6(Suginta et al., 2009)

2.5. การทำ Chitin Binding Assay

ทำการศึกษาการจับกับสับสเตรทด้วยวิธี chitin binding assay ทำปฏิกิริยา (500 µl) ประกอบด้วย 1.0 µmol เอนไซม์ และ 1.0 mg ไคติน ใน 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ที่เวลาต่าง ๆ กันคือ 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 นาที ที่ 0 °C เพื่อลดอัตราการสลายของสับสเตรทโดยเอนไซม์ ณ เวลาที่ต้องการทำการปั่นแยกเอนไซม์อิสระออกจากเอนไซม์ที่จับกับไคติน ด้วยความเร็ว 12000 g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ทำการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด (E_t) และเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (E_f) ในส่วนใสด้วยวิธี Bradford's แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับไคติน (E_b) จากสมการ $E_t = E_f + E_b$ ส่วนการหาค่า equilibrium adsorption isotherm ทำโดยบ่มเอนไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 7.0 µM ที่อุณหภูมิ 0 °C กับ 1.0 mg ของไคตินชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นแยกส่วนใสที่มีเอนไซม์อิสระออกจากเอนไซม์ที่จับกับไคตินด้วยความเร็ว 12,000 xg แล้วนำมาวัดค่า โปรตีนด้วยวิธี Bradford แล้วสร้างกราฟระหว่าง [E_b] vs [E_f] เพื่อหาค่า dissociation binding constants (K_d) ของเอนไซม์ wild-type เทียบกับเอนไซม์กลายพันธุ์โดยฟังก์ชัน non-linear regression ใน GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) (Pantoom et al., 2008)

2.6. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์

ทำการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนส โดยวิธี colorimetric assay โดยในปฏิกิริยา 100 µl ประกอบด้วย 0–500 µM *p*NP-$GlcNAc_2$ ในสารละลาย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 และ dH_2O โดยทำการ pre-incubate ของเหลวใน microtiterplate ที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณ 400 ng และบ่มปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 50 µl 1 M Na_2CO_3 ทำการวัดหาปริมาณ *p*NP ที่เกิดขึ้นโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ A_{405} และสร้างกราฟมาตรฐานของ *p*NP ในช่วง 0–30 nmol ต่อจากนั้นทำการคำนวณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ เช่นค่า K_m ค่า V_{max} ค่า k_{cat} จากการทดลองซ้ำสามครั้ง โดยใช้ฟังก์ชัน nonlinear

regression จากโปรแกรม GraphPad Prism ส่วนการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ด้วยน้ำตาล chitohexaose และ colloidal chitin ใช้วิธี DMAB assay โดยทำปฏิกิริยา 200 µl ที่มี 0-500 µM NAG_6 กับ 50 µg เอนไซม์ ใน 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำปริมาตรทั้งหมดในปฏิกิริยามาวัดหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DMAB assay ส่วน colloidal chitin ใช้วิธีเดียวกันกับน้ำตาล chitohexaose แต่ใช้ความเข้มข้น 0 to 5.0 % (w/v) ทำการวัดผลิตผลน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาล $GlcNAc_2$ ที่ช่วง 0-1.75 µmol และหาค่าทางจลนพลศาสตร์ต่าง ๆ จาก ฟังก์ชัน nonlinear regression (Pantoom et al., 2008)

2.7. การทำ homology modeling

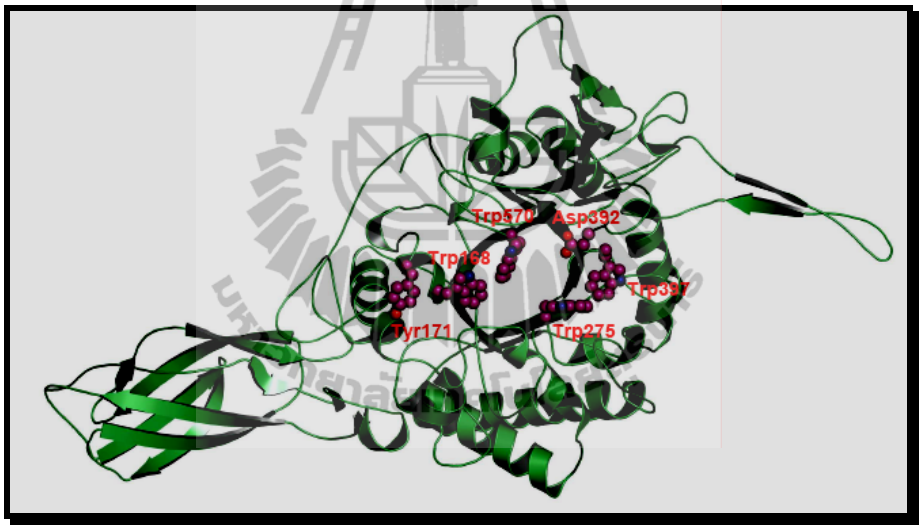
นำลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อ *V. carchariae* (UniProtKB/TrEMBL accession number Q9AMP1) submit เข้าไปใน Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/) เพื่อทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โดยใช้โครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์ E315L จากเชื้อ *S. marcescens* กับ hexaNAG (PDB code: 1NH6) เป็นโครงสร้างต้นแบบ และแสดงโครงสร้างที่ทำนายได้ด้วยโปรแกรม Pymol (www.pymol.org) ทำการหาตำแหน่งของกรดอะมิที่บริเวณเร่งโดย superimpose กรดอะมิโน 459 ตัวของโครงสร้างที่ทำนายได้ของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อ *Vibrio* กับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันกับเอนไซม์ของ *Serratia* แล้ว dock น้ำตาล hexaNAG เข้ากับบริเวณเร่งของเอนไซม์จาก *Vibrio* ด้วยโปรแกรม Superpose ใน CCP4 suit package (Collaborative Computational Project, 1994)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

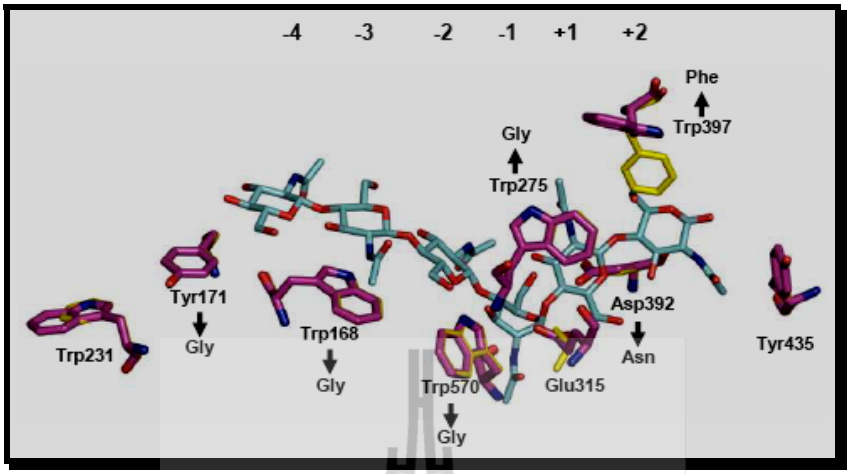
3.1. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง

งานวิจัยเริ่มต้นที่ทำการออกแบบสังเคราะห์ mutagenic primer เพื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ไคติเนส เอ ทั้งหมด Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้กับไคติเนสจากแบคทีเรียอื่น ๆ และจากแบบจำลองโครงสร้างสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้โครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากเชื้อ *Serratia marcescens* เป็นต้นแบบพบว่ากรดอะมิโนทั้งหมดนี้มีลักษณะ conserved และมีการจัดเรียงตัวอยู่ที่ส่วนบนของ TIM barrel domain ดังแสดงในรูปที่ 3.1



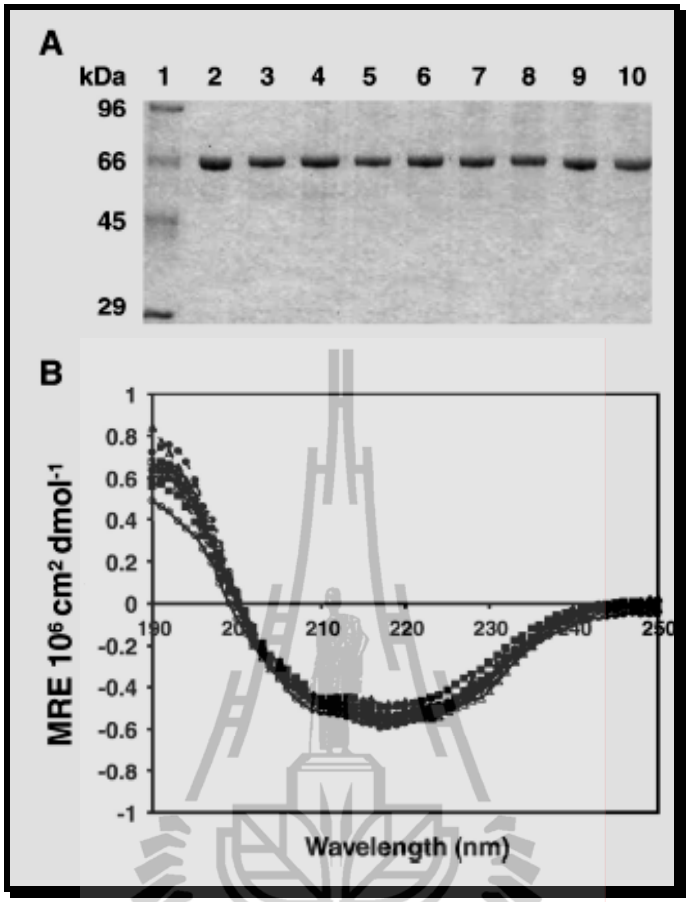
รูปที่ 3.1 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *V. carchariae* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนวงแหวน Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 ที่บริเวณด้านบนของ TIM barrel domain (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

การทดลองเปลี่ยน Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 โดยเทคนิค site-directed mutagenesis ทำให้ได้ single mutant 5 ตัวคือ W168G Y171G W275G W397Fและ W570G มี double mutant 1 ตัว คือ W397F/W570G) มี triple mutant 1 ตัวคือ W397F/W570G/ W275G และมี quadruple mutant 1 ตัวคือ W397F/W570G/W275G/Y171G กรดอะมิโนเหล่านี้จัดเรียงอยู่ในบริเวณจับกับสับสเตรท 6 บริเวณคือ (-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2) ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณเร่งของไคติเนส เอ ที่เป็นเป้าหมายของการกลายพันธุ์ (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

หลังจากการตรวจสอบความถูกต้องของการเปลี่ยนชนิดของนิวคลิโอไทด์ด้วยการทำ DNA sequencing ได้ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ M15 พบว่าเซลล์สามารถผลิตโปรตีนออกปริมาณมาก เมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงทำบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA affinity chromatography และชะโปรตีนออกด้วย 250 mM imidazole พบว่าได้โปรตีนไคติเนส เอ มีความบริสุทธิ์สูง (รูปที่ 3.3.A) และปริมาณของโปรตีนที่ผลิตได้คือ 10-15 mg โปรตีนบริสุทธิ์ต่อเซลล์ 1 ลิตร การวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิด้วย CD spectroscopy พบว่าลักษณะของ CD spectra ของโปรตีนกลายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับของโปรตีน wild-type (รูปที่ 3.3B) แสดงว่ากรดอะมิโนที่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงไม่ส่งผลกระทบกับโครงสร้างโดยรวมของโปรตีน



รูปที่ 3.3 การวิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนส เอ หลังทำการกลายพันธุ์
(A) SDS-PAGE ของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Ni-NTA agarose affinity chromatography (B) CD spectra ของโปรตีนกลายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

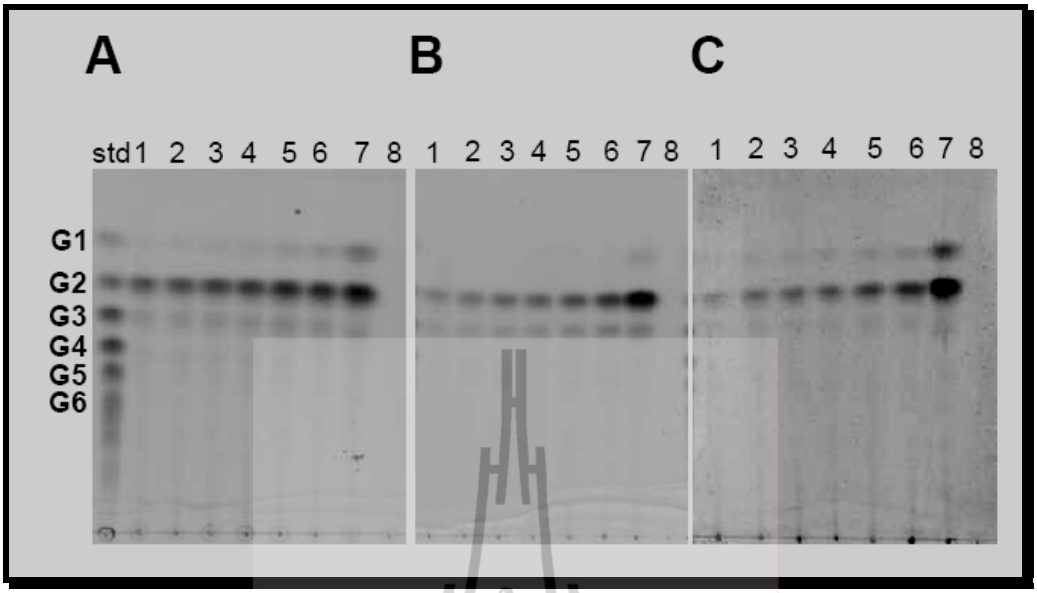
การตรวจหาค่า specific hydrolyzing activity ของเอนไซม์กลายพันธุ์เทียบกับเอนไซม์ wild-type โดยดูการสลายของ pNP-$[GlcNAc]_2$ และ colloidal chitin พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดยกเว้น W397F ให้ค่า specific activity ต่ำกว่าค่าของโปรตีน wild-type ส่วน W397F ให้ค่า specific activity ของการสลาย pNP-$[GlcNAc]_2$ สูงเป็น 142 เท่าและให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันในสลาย colloidal chitin ของค่าที่ได้จาก wild-type (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ค่า specific hydrolyzing activity ของโปรตีน wild-type และโปรตีนกลายพันธุ์ (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

Chitinase A variant	Specific hydrolyzing activity	
	(x 10^{-3} µmol *p*NP/min/µg) [a]	(µmol reducing sugars/min/µg) [b]
Wild-type	1.84 ± 0.05 (100)[c]	1.99 ± 0.018 (100)
D392N	0.61 ± 0.09 (33.4)	n.d.[d]
W168G	0.24 ± 0.03 (13.0)	n.d
Y171G	0.36 ± 0.00 (19.5)	n.d.
W275G	0.20 ± 0.00 (11.1)	0.10 ± 0.001 (5.0)
W397F	2.61 ± 0.08 (141.8)	2.04 ± 0.061 (102.5)
W570G	0.11 ± 0.00 (5.6)	n.d.
Double mutant (W570G/W397F)	0.10 ± 0.002 (5.5)	n.d.
Triple mutant (W570G/W397F/W275G)	0.01 ± 0.001 (0.6)	n.d.
Quadruple mutant (W570G/W397F/W275G/Y171G)	0.01 ± 0.001 (0.6)	n.d.

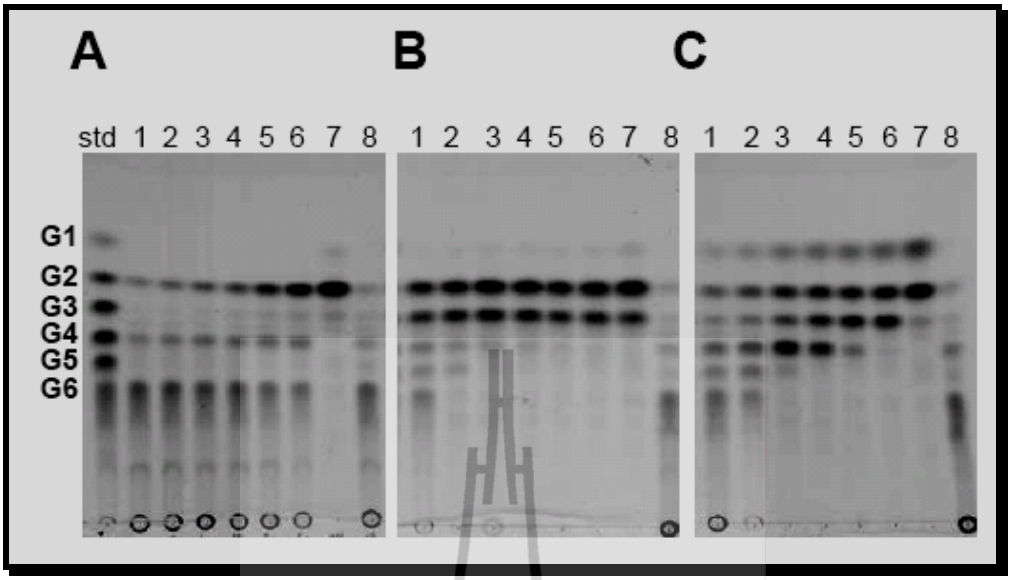
[a] Chitinase activity was measured using *p*NP-$[GlcNAc]_2$, and release of *p*NP was detected by the colorimetric method.
[b] Chitinase activity was measured using colloidal chitin, and release of reducing sugars was detected by the DMAB method.
[c] Values in brackets represent relative activity compared to that of wild-type (set as 100).
[d] n.d. represents no detectable activity.

ผลการทดลองที่ได้จากตารางที่ 3.2 ให้ข้อสรุปว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวนยกเว้น W397 มีผลต่อการสลายของสับเสตรทโมเลกุลเล็ก ๆ และไคตินโพลิเมอร์ จากการวิเคราะห์ชนิดของผลิตผลน้ำตาลที่ได้จากการสลาย colloidal chitin และไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ขนาด 2-6 หน่วย (NAG_2-NAG_6) พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ W168G, Y171G, W570G ไม่สามารถสลายไคตินได้ที่เวลา 18 ชั่วโมง ส่วนโปรตีน W275G และ W397F สามารถสลาย colloidal chitin ได้ที่เวลาของการบ่มตั้งแต่ 2.5 นาที ถึง 18 ชั่วโมง ได้น้อยลง แต่ไม่เปลี่ยนแปลงรูปแบบการสลายไคตินมากนักเมื่อเทียบกับ wild-type โดยผลิตผลหลักที่ได้คือ NAG_2 และผลิตผลรองคือ NAG_1 ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 การวิเคราะห์ทาง TLC แสดงการสลาย colloidal chitin ด้วย A) wild-type B) W275G และ C) W397F ช่อง std คือ G1-G6 standard mix; 1-7 คือเวลาในการบ่ม 2, 5, 10, 15, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง และ 8 คือ substrate blank (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

ส่วนผล TLC แสดงถึงโปรตีนทุกตัวไม่สามารถสลาย NAG_2 ได้เลยและ W275G เป็นโปรตีนตัวเดียวที่สลาย NAG_3 ได้เป็น NAG_2+NAG_1 และโปรตีนที่สลายน้ำตาล NAG_4- NAG_6 ได้ดีกว่า wild-type คือ W275G และ W397F การศึกษาผลของเวลาในการบ่มต่อการสลายน้ำตาล G6 ของโปรตีนกลายพันธุ์สองตัวนี้เทียบกับ wild-type พบว่า W275G สลาย NAG_6 ได้เป็นน้ำตาล NAG_2+NAG_3 เป็นหลัก ส่วนโปรตีน W397F สลายน้ำตาล NAG_6 ให้เป็นตัวกลางขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ NAG_1-NAG_5 และที่เวลาของการบ่มเป็น 18 ชั่วโมงจะได้ผลิตผลที่เป็น NAG_2+NAG_1 ซึ่งลักษณะการย่อยน้ำตาล NAG_6 ของโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองต่างไปจากโปรตีน wild-type อย่างสิ้นเชิง (รูปที่ 3.5) โดยที่ผลิตผลหลักของการสลาย NAG_6 ของ wild-type คือน้ำตาล NAG_2+NAG_4

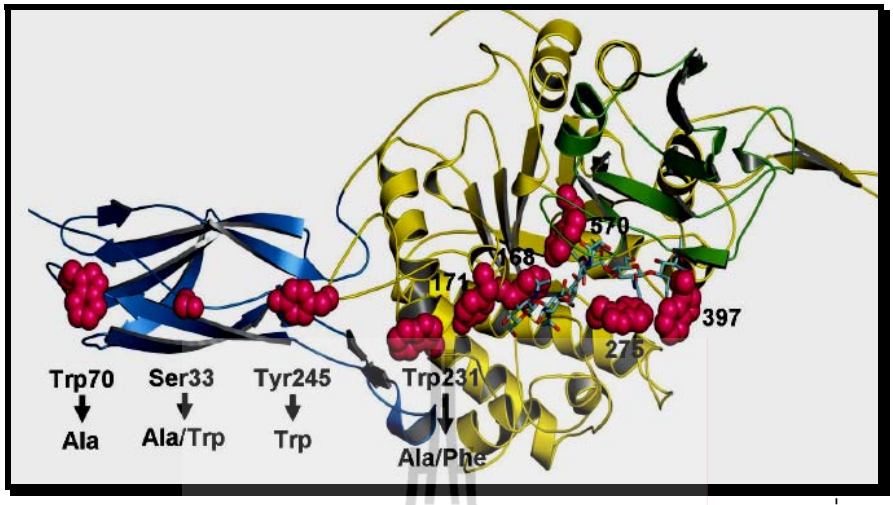


รูปที่ 3.5 การวิเคราะห์ทาง TLC ที่แสดงรูปแบบการสลาย hexaNAG ด้วย A) wild-type B) W275G และ C) W397F ช่องที่ std คือ G1-G6 standard mix; 1-7 เวลาที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง; 8 คือ substrate blank (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

จากรูปที่ 2 พบว่ากรดอะมิโน W275 จัดเรียงตัวอยู่ในตำแหน่ง จับที่ -1 ส่วนกรดอะมิโน W397 จะอยู่ในบริเวณจับสุดท้ายคือ +2 กรดอะมิโนทั้งสองน่าจะเป็นตัวกำหนดการจับของน้ำตาล NAG_6 ให้เข้ามาอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการย่อยที่พันธะที่สองจากด้านรีดิวซ์เพื่อให้ได้ผลิตผลเป็น NAG_2+NAG_4 การเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนทำให้กรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 สูญเสียความสามารถในการเลือกจับแบบจำเพาะทำให้ผลิตผลที่แตกต่างไปจากเดิมมาก

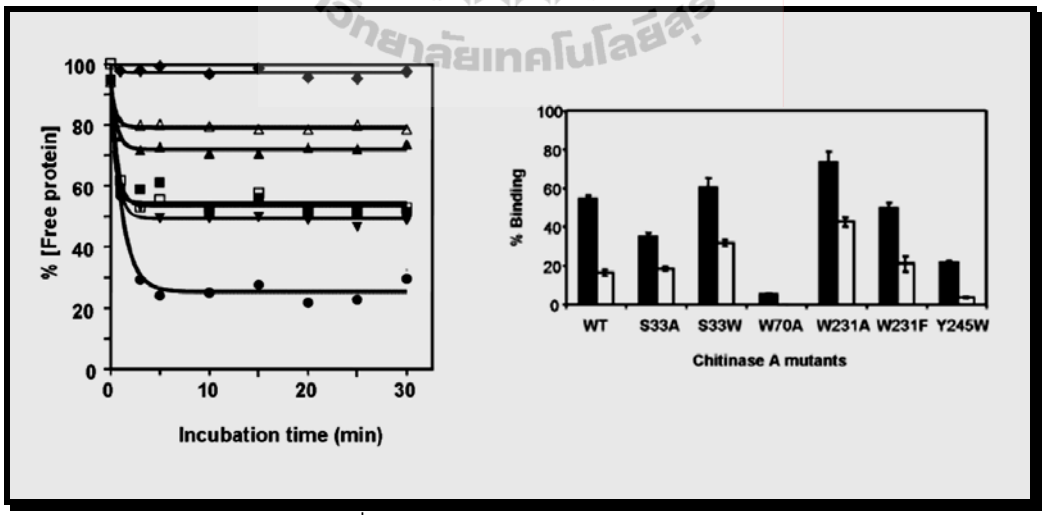
3.2. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ที่บริเวณจับกับไคติน

งานวิจัยต่อมาคือทำการออกแบบสังเคราะห์ mutagenic primer เพื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ conserved ที่บริเวณจับกับไคติน (chitin binding domain, ChBD) ของเอนไซม์ไคติเนส เอ สองตัวคือ Ser33 และ Trp70 บริเวณด้านนอกบริเวณเร่งที่ติดกับ ChBD อีกสองตัวคือ Trp231 และ Tyr245 จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้กับไคติเนสจากแบคทีเรียอื่น ๆ และจากแบบจำลองโครงสร้างสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้โครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากเชื้อ *S. marcescens* เป็นต้นแบบพบว่ากรดอะมิโนทั้งหมดนี้มีลักษณะ conserved และมีการจัดเรียงตัวอยู่ที่ผิว (surface exposed) ของเอนไซม์ โดยที่กรดอะมิโน Trp70 จะอยู่นอกสุดและ Trp231 จะอยู่ด้านในสุดติดกับปลายด้านรีดิวซ์ (รูปที่ 3.6)



รูปที่ 3.6 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *V. carchariae* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโน Ser33 Trp70 Trp231 และ Tyr245 ที่บริเวณด้านนอกโมเลกุลของไคติเนส (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

การทดลองศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อการจับกับสับสเตรทโดยการทำ chitin binding assay พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ W70A จะจับกับ colloidal chitin ได้น้อยที่สุด ส่วนเอนไซม์ W231A จับไคตินได้มากที่สุดโดยเอนไซม์ที่ศึกษาทั้งหมดมีลำดับของการจับไคตินเมื่อเทียบกับไคติเนสดั้งเดิมดังนี้คือ W231A> S33W >WT ≅ W231F>S33A>Y245W>W70A โดยผลของการจับแสดงไว้ในรูปที่ 3.7A และ 3.7B



รูปที่ 3.7 การจับของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ผิวโปรตีนกับไคติน A) ผลของเวลาต่อการจับ B) การจับของโปรตีนกลายพันธุ์กับไคตินสองชนิดคือ colloidal chitin (closed bar) และ crystalline chitin (open bar) สัญลักษณ์คือ wild-type (■); S33A (▲); S33W (▼); W70A (◆); W231A (●); W231F (□); และ Y245W (△) (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

เมื่อศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อค่า hydrolytic activity ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทสามชนิดคือ pNP-$[GlcNAc]_2$ crystalline chitin และ colloidal chitin ดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าการกลายพันธุ์มีผล

ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า hydrolytic activity ของ pNP สับสเตรทเพียงเล็กน้อย แต่พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ S33A W70A W231A และ W231F ให้ค่าแอคติวิตี้ต่อสับสเตรทสายยาวคือ colloidal chitin และ crystalline chitin ลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับโปรตีนดั้งเดิม ส่วนโปรตีนกลายพันธุ์ S33W และ Y245W จะให้ค่าแอคติวิตี้สูงขึ้น

ตารางที่ 3.2 ผลของการกลายพันธุ์ต่อค่า hydrolytic activity ของเอนไซม์ไคติเนส เอ (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

Protein	Specific hydrolyzing activity (U/μmol protein)[a]		
	Crystalline chitin	Colloidal chitin	pNP-$[GlcNAc]_2$
Wild-type	0.59 ± 0.02(100)[b]	12.9 ± 0.22 (100)	50.5 ± 1.13 (100)
S33A	n.d.[c]	8.5 ± 0.50 (66)	58.0 ± 1.08 (115)
S33W	1.00 ± 0.08 (166)	15.3 ± 0.32 (119)	54.0 ± 2.55 (107)
W70A	n.d.	4.3 ± 0.17 (33)	52.8 ± 2.14 (105)
W231A	n.d.	6.6 ± 0.26 (51)	45.2 ± 2.00 (90)
W231F	n.d.	9.2 ± 0.49 (71)	54.3 ± 2.85 (108)
Y245W	1.49 ± 0.09 (250)	19.6 ± 0.53 (152)	53.6 ± 1.61 (106)

[a] One unit of chitinase is defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of $[GlcNAc]_2$ or 1 nmol of pNP per min at 37°C.
[b] Values in parentheses represent relative specific hydrolyzing activities (%).
[c] Non-detectable activity.

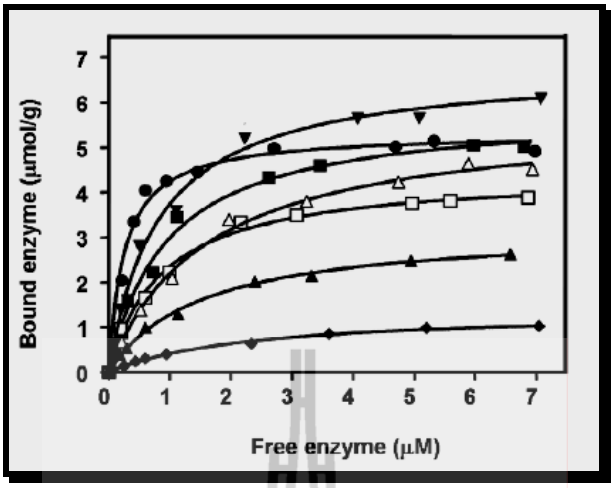
การศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์กับ chitohexamer กับ colloidal chitin พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทุกตัวให้ ค่า K_m ต่อสับสเตรทไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ลดลงเล็กน้อย และไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญกับค่า k_{cat} และค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์ ในทางตรงข้ามกันโปรตีนกลายพันธุ์ S33A W70A W231A และ W231F ให้ค่า k_{cat} และค่า k_{cat}/K_m ต่อสับสเตรทสายยาว (colloidal chitin) น้อยลงมาก โปรตีนกลายพันธุ์ที่ให้ค่า k_{cat}/K_m น้อยที่สุดคือ W70A ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ผลของการกลายพันธุ์ต่อค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนส เอ (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

Chitinase A variant	Chitohexaose			Colloidal chitin		
	K_m(μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m($s^{-1}M^{-1}$)	K_m(10^1 mg ml^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m(10^{-1} s^{-1}/ mg ml^{-1})
Wild-type	218 ± 22.0	2.9	1.3×10^3 (100)[a]	1.74 ± 0.1	1.2	0.7 (100)
S33A	171 ± 20.5	2.6	1.5×10^3 (115)	2.07 ± 0.2	0.9	0.4 (57)
S33W	210 ± 15.4	2.8	1.3×10^3 (100)	1.58 ± 0.2	1.4	0.9 (129)
W70A	185 ± 22.0	2.5	1.3×10^3 (100)	2.26 ± 0.4	0.4	0.2 (29)
W231A	189 ± 13.2	2.6	1.4×10^3 (108)	1.01 ± 0.2	0.6	0.6 (86)
W231F	163 ± 10.3	2.4	1.5×10^3 (115)	1.70 ± 0.2	0.9	0.5 (71)
Y245W	201 ± 13.1	2.6	1.3×10^3 (100)	1.82 ± 0.2	1.7	0.9 (129)

[a] Relative catalytic efficiencies (%) are shown in parentheses.

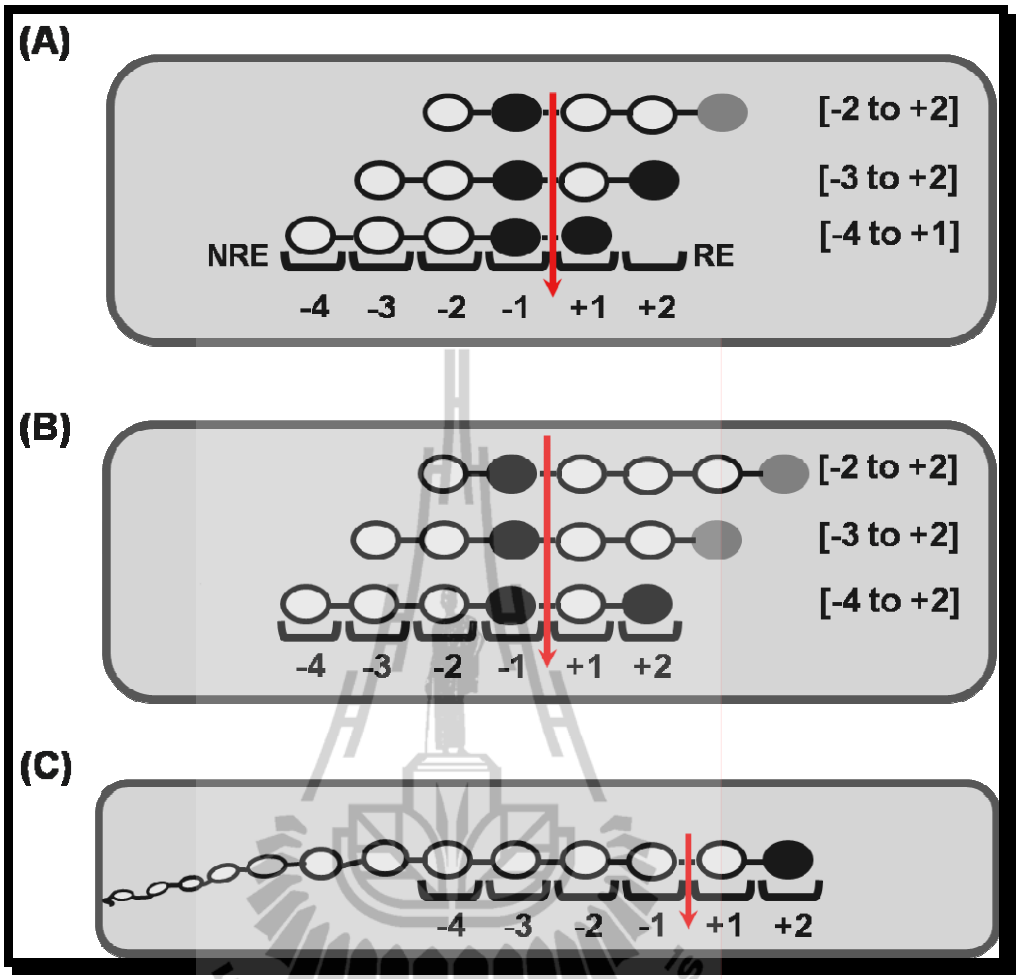
การศึกษาค่า adsorption isotherms พบว่า S33W และ W231A ให้ค่าการจับกับ colloidal chitin สูงกว่าโปรตีน wild-type ส่วน ไคติเนสกลายพันธุ์ W70A, S33A, W231F และ Y245W ให้ค่าการจับกับไคตินน้อยกว่า เมื่อคำนวณหาค่า dissociation binding constants (K_d) จากกราฟในรูปที่ 3.8 ให้ค่า K_d ของ wild-type เป็น 0.95 ± 0.11 μM ซึ่งสูงกว่าค่า K_d ของ S33W (0.84 ± 0.09 μM) และของ W231F (0.88 ± 0.09 μM) เล็กน้อย แต่สูงกว่าค่าของ W231A (0.26 ± 0.03 μM) อย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงข้ามค่า K_d ของ S33A (1.50 ± 0.11 μM) ของ W70A (2.30 ± 0.25 μM) และของ Y245W (1.60 ± 0.16 μM) มีค่ามากกว่าค่าของ wild-type จากค่า K_d ที่ได้สามารถสรุปความสามารถในการจับกับสับสเตรทได้เป็นลำดับดังนี้คือ W231A > S33W > W231F > wild-type > S33A > Y245W > W70A ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลของ chitin binding assay และค่าทางจลนพลศาสตร์ดังแสดงในรูปที่ 3.7 และตารางที่ 3.3 ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 Adsorption binding isotherms ของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ผิวโปรตีนกับ colloidal chitin (closed bar) สัญลักษณ์คือ wild-type (■); S33A (▲); S33W (▼); W70A (◆); W231A (●); W231F (□); และ Y245W (△) (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

3.3. การศึกษากลไกการเลือกจับของสับสเตรทบนบริเวณเร่งและการเลือกใช้อะโนเมอร์ของเอนไซม์ไคติเนส

งานวิจัยขั้นต่อมาได้ทำการศึกษาความเลือกจับของสับสเตรทชนิดต่าง ๆ บนบริเวณ substrate binding subsites ของเอนไซม์ โดยใช้เทคนิค quantitative HPLC MS จากข้อเสนอของ Watanabe และ ผู้ร่วมวิจัย (Imai et al., 2002) ที่ว่าน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้นจะเข้าจับกับบริเวณจับแบบสุ่ม ส่วนน้ำตาลไคตินสายยาวเข้าสู่บริเวณเร่งโดยการ feed เข้าจากทางด้านโดเมนจับไคติน (ChBD) ด้านเดียวเท่านั้น ในการทดลองนี้จึงได้เสนอกลไกการเข้าจับของน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG ซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำตาลสายสั้น และไคตินสายยาว ดังแสดงในรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 กลไกการจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และไคตินที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ไคติเนส (A) pentaNAG hydrolysis; (B) hexaNAG hydrolysis; และ (C) chitin hydrolysis (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

จากรูปจะเห็นว่าน้ำตาล pentaNAG จะสามารถจับบนบริเวณจับได้สามแบบคือ 1) จับที่ subsites -4 ถึง +1; 2) จับที่ subsites -3 ถึง +2; และ 3) จับที่ subsites -2 ถึง +2 (รูปที่ 3.9A) ขณะที่น้ำตาล hexaNAG ก็สามารถจับที่บริเวณจับได้สามแบบเช่นกันคือ คือ 1) จับที่ subsites -4 ถึง +2; 2) จับที่ subsites -3 ถึง +2; และ 3) จับที่ subsites -2 ถึง +2 (รูปที่ 3.9B) ส่วนไคตินสายยาวจะจับได้แบบเดียวคือ ปลายด้านรีดิวซ์จะเริ่มที่บริเวณ +2 ส่วนปลายด้านนอนรีดิวซ์ขยายมาทางด้านบริเวณ -4 และด้านโดเมนจับไคตินดังรูปที่ 3.9C

การศึกษาการย่อยที่เวลาเริ่มต้นที่ 0°C แล้วตรวจหาปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค quantitative HPLC ESI/MS พบว่าไคติเนสดั้งเดิมย่อยสับสเตรท pentaNAG จะถูกย่อยเป็นผลิตผลสองชนิดคือ NAG_2 และ NAG_3 และย่อย hexaNAG ให้เป็น NAG_2 NAG_3 และ NAG_4 ซึ่งแสดงว่าการตัดพันธะ

ไกลโคซิดิกเกิดขึ้นสองตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่สองจากปลายสายและตำแหน่งกลางสายน้ำตาล ส่วนการประมาณเปอร์เซ็นต์ของบีต้าอะโนเมอร์ของผลิตผลน้ำตาลที่ได้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 การประมาณผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์โดยวิธี quantitative HPLC MS analysis (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

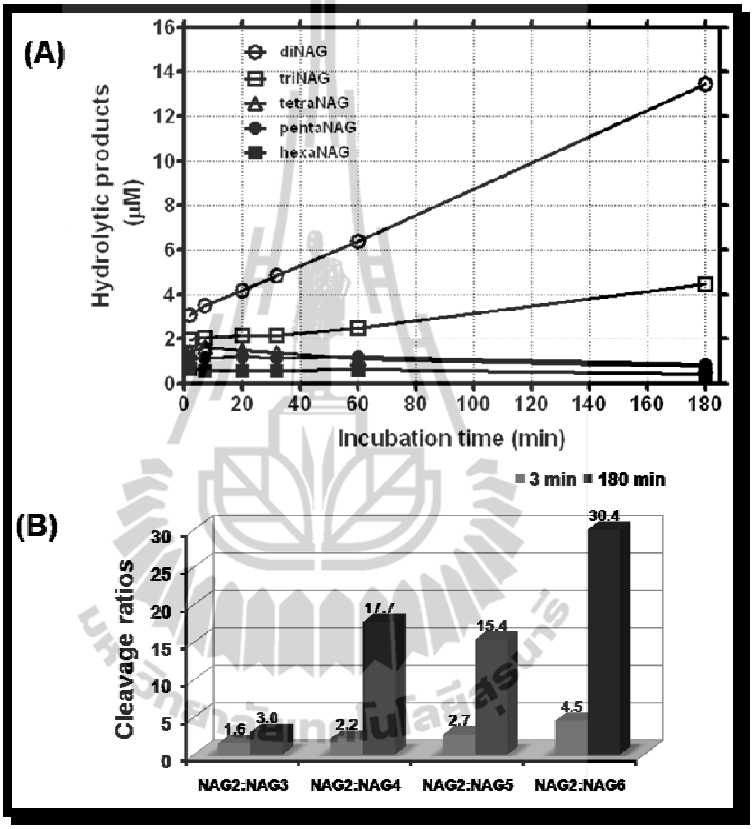
Substrate	Enzyme	The β content of initial products				
		NAG1	NAG2	NAG3	NAG4	NAG5
pentaNAG (NAG5)	Wild-type	-	92 (100)[a]	41(42)	-	-
	W275G	-	92	68	-	-
	W397F	85	69	100	100	-
hexaNAG (NAG6)	Wild-type	-	90(100)[b]	67(71)	45(48)	-
	W275G	-	90	64	82	-
	W397F	40	66	100	100	100

[a]The values in brackets are the expected values from the -2 to -2 binding mode for NAG5 hydrolysis.
[b]The values in brackets are the expected values from a combination of the -3 to +2 and -2 to +2 modes for NAG6 hydrolysis.

ผลการทดลองในตารางที่ 3.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การย่อย pentaNAG ด้วย wild-type chitinase ได้เป็น 92% βNAG_2 และ 41% βNAG_3 ซึ่งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์คำนวณของผลิตผล (100% βNAG_2 และ 42% βNAG_3) ที่ได้จากการย่อยที่เกิดจากการจับของสับสเตรทโดยใช้ -2 to + 2 binding mode ส่วนเปอร์เซ็นต์การย่อย hexaNAG ได้เป็น 90% βNAG_2, 67% βNAG_3, และ 45% βNAG_4 สอดคล้องกับค่าคำนวณของผลิตผลที่ได้จากการจับของสับสเตรทโดยใช้กลไกแบบผสมระหว่าง -3 to +2 binding mode กับ -2 to +2 binding mode คือ 100% βNAG_2, 71% βNAG_3, และ 48% βNAG_4 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4 ค่าในวงเล็บ)

ส่วนผลของการสลายไคตินพบว่าเอนไซม์ไคติเนสย่อยไคตินเป็นน้ำตาลไคโตโอลิโกแซ็คคาร์ไรด์สายสั้น ๆ มีขนาดตั้งแต่ NAG-NAG_6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนแล้วแต่ NAG_2 จัดเป็นผลิตผลหลักของการย่อย โดยที่เวลาเริ่มต้นของการย่อย (3 นาที) เอนไซม์ผลิต NAG_2 ได้ประมาณ 3 μM และที่สิ้นสุดของปฏิกิริยาจะได้ NAG_2 ปริมาณ 13 μM ส่วนผลิตผลรองลงมาคือ NAG_3 ที่ผลิตได้ในช่วงต้นคือ 2 μM และสิ้นสุดที่ 4 μM ส่วนผลิตผลอื่นจัดเป็น intermediate ที่สร้างในปริมาณน้อย (น้อยกว่า 2 μM) ผลการทดลองที่ได้ยืนยันว่าเอนไซม์ไคติเนสตัดสายไคตินในลักษณะผสมคือสายน้ำตาลสั้น ๆ ตั้งแต่ 3 หน่วยขึ้นไปเกิดจากการจับแบบ random binding และโดยการตัดด้วย endo activity ส่วนน้ำตาล NAG_2 เกือบทั้งหมดถูกสร้างโดยกลไกแบบ feeding โดยการตัดด้วย exo activity (รูปที่ 3.10A) เมื่อคำนวณค่า

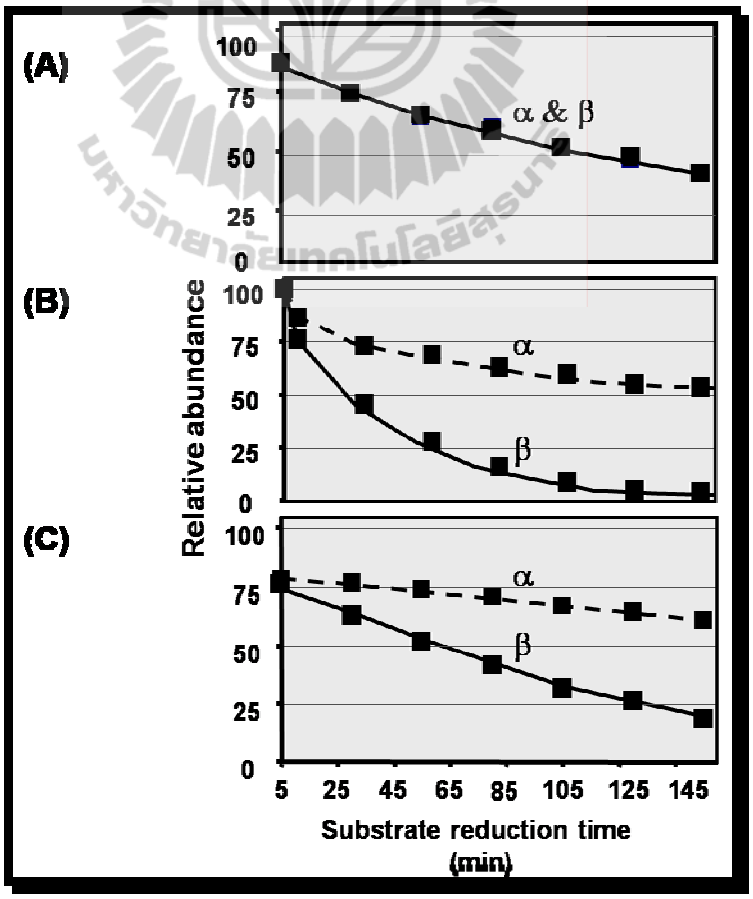
cleavage ratio ของน้ำตาล NAG_2 กับน้ำตาลผลิตผลอื่น ๆ เทียบกันระหว่างเวลาย่อยเริ่มต้นที่ 3 นาที กับเวลาสิ้นสุดในการทำปฏิกิริยาที่ 3 ชั่วโมงพบว่าสัดส่วนนี้ของ NAG_2 ต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ มีค่าสูงขึ้น ทั้งหมดกล่าวคือ NAG_2:NAG_3 สูงขึ้น 1.9 เท่า NAG_2:NAG_4 สูงขึ้น 9 เท่า NAG_2:NAG_5 สูงขึ้น 5 เท่า และ NAG_2:NAG_6 สูงขึ้น 6 เท่า (รูปที่ 3.10B) ซึ่งอัตราส่วนของ NAG ต่อน้ำตาล ๆ อื่น ๆ ที่สูงขึ้นที่เวลาในการทำสลายนานขึ้นแสดงว่าการตัดพันธะน่าจะเกิดขึ้นโดยขบวนการ feeding และแสดงถึงการย่อยสายไคตินแบบ progressive hydrolysis



รูปที่ 3.10 ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อย chitin โดยวิธี quantitative HPLC MS (A) Time course of chitin hydrolysis (B) Cleavage ratios (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

การทดลองต่อมาคือการศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อการเลือกใช้อะโนเมอร์ของสับเสตรท ดังแสดงในรูปที่ 3.11A พบว่าในช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 0-150 นาที พบว่าอัตราการสลาย β-anomer ของสับสเตรทไม่แตกต่างจากอัตราการสลาย α-anomer ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสับสเตรท น่าจะจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์โดยที่ปลายด้านรีดิวซ์ที่ยื่นออกมานอก substrate binding subsites และอยู่ในสารละลายในโครงรูป - หรือ -anomer อยู่ในปริมาณสมดุล (48% β และ 52% α) ผลการทดลองสอดคล้องกับการจับของสับสเตรท hexaNAG แบบ -3 to +2 และ +2 to +2 binding modes (รูปที่ 3.9B) เมื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ปลายด้านรีดิวซ์สองตัวคือ Trp275 เป็น Gly และ Trp397 เป็น Phe พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองคือ W275G และ W397F มีความสามารถในการใช้อะโนเมอร์ของสับสเตรท

เปลี่ยนไปกล่าวคือให้อัตราการสลาย β-anomer ได้ดีกว่า α-anomer มากเมื่อเทียบกับอัตราการสลายของโปรตีนดั้งเดิม (รูปที่ 3.11B,C) กรดอะมิโน Trp275 มีความสำคัญกับการจับกับน้ำตาล GlcNAc ที่ตำแหน่งย่อย (cleavage site, -1 to +1) ส่วนกรดอะมิโน Trp397 มีความสำคัญต่อการเลือกจับของเอนไซม์กับน้ำตาลด้านปลายรีดิวซ์คือ +2NAG จากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์กับน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG (Songsiriritthigul et al., 2008) พบว่าการจับกับน้ำตาลที่บริเวณเร่งเกิดขึ้นด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรไฮโดรโฟบิกเป็นหลัก การเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน Trp275 เป็นกรดอะมิโน Gly ทำให้มีผลกระทบต่อแรงไฮโดรโฟบิกที่กระทำต่อน้ำตาลที่ตำแหน่ง -1 และ +1 ส่งผลให้มีการเปลี่ยนการเลือกจับของเอนไซม์โดยมีการเลื่อนตำแหน่งของสายสับเสตรทไปทางด้านนอนรีดิวซ์ได้เล็กน้อย จากตารางที่ 3.4 จะเห็นว่าการสลายน้ำตาล hexaNAG จะให้ผลิตผลที่เป็น NAG_2 NAG_3 และ NAG_4 เหมือนเดิมแต่เปอเซ็นต์ของ β content ที่ได้เปลี่ยนไปจากเดิมแสดงว่าสายน้ำตาลมีการเข้าจับที่บริเวณเร่งเปลี่ยนไป นอกจากนี้โปรตีนกลายพันธุ์ W275G ยังให้ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) ทั้งสามตัวคือ pentaNAG hexaNAG และ colloidal chitin ลดลงประมาณ 5 เท่า โดยมีการเปลี่ยนค่าความชอบในการจับ (affinity of binding, K_m) ต่อสับสเตรท เล็กน้อย แต่ค่าคงที่ในการสลาย (catalytic rate, k_{cat}) ลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากโปรตีนดั้งเดิม (ตารางที่ 3.5)



รูปที่ 3.11 ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อย chitin โดยวิธี quantitative HPLC MS (A) Time course of chitin hydrolysis (B) Cleavage ratios (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

ส่วนการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp397 เป็น Phe อาจทำให้เกิดผลกระทบต่อแรงไฮโดรโฟบิกที่ทำกับน้ำตาลด้านปลายรีดิวซ์ทำให้ความสามารถในการเลือกจับลดลดเช่นกันแต่กรดอะมิโนนี้ไม่ได้อยู่ในตำแหน่งย่อยเหมือนกับ Trp275 ดังนั้นการเปลี่ยนกรดอะมิโนจึงไม่มีผลกระทบกับอัตราการย่อย ผลรวมของการกลายพันธุ์ก็คือทำให้สายน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ขยับมาทางด้านปลายนอนรีดิวซ์ได้และอาจจับกับตำแหน่งจับแบบยืดหยุ่นมากขึ้นทำให้โอกาสที่พันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลที่ตำแหน่งต่างๆ จะพบกับตำแหน่งย่อยได้มากขึ้นผลคือทำให้ผลิตผลในการย่อยหลากหลายสปีชีส์ตั้งแต่ NAG-NAG_5 ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และทำให้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์เปลี่ยนไปด้วยโดยไปเพิ่มค่า k_{cat} ของการสลายน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG เป็น 8 และ 60 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 ค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายสับสเตรทไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และไคตินของเอนไซม์ไคติเนสดั้งเดิมและเอนไซม์ไคติเนสกลายพันธุ์ (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

Chitinase A	pentaNAG			hexaNAG			colloidal chitin		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)	K_m ($mg \cdot ml^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mg \cdot ml^{-1}$)
Wild-type	380 ± 49 (1)	0.21 (1)	5.6×10^{-4} (1)	174 ± 23 (1)	0.19 (1)	1.1×10^{-4} (1)	12 ± 1.4 (1)	0.10 (1)	88×10^{-4} (1)
W275G	315 ± 110 (0.8)	0.04 (0.2)	1.3×10^{-4} (0.2)	238 ± 17 (1.4)	0.06 (0.3)	2.3×10^{-4} (2.1)	25 ± 3.7 (2.1)	0.02 (0.2)	6.7×10^{-4} (0.1)
W397F	476 ± 11 (1.3)	2.11 (10)	44×10^{-4} (8)	460 ± 53 (2.6)	3.0 (16)	65×10^{-4} (59)	19 ± 0.1 (1.6)	0.03 (0.3)	14×10^{-4} (0.2)

จากตารางที่ 3.11 จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 ให้ผลต่อค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายไคตินต่างจากค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ เนื่องจากกลไกการจับของสับสเตรททั้งสองไม่เหมือนกัน ส่วนของไคตินจะเข้าจับโดยปลายด้านรีดิวซ์จะเคลื่อนเข้าทางด้านปลายของโดเมนจับไคตินโดยการจับระหว่างสายของไคตินโพลีเมอร์กับ surface-exposed residues เช่น Tyr31, Trp70, Trp231 และ Tyr245 และ ดังนั้นกรดอะมิโนด้านปลายรีดิวซ์ เช่น Trp397 และ Trp275 จะทำหน้าที่ในการช่วยดึงสายของน้ำตาลให้เข้าสู่ substrate binding subsites จากด้านนอนรีดิวซ์ (-4) มายังด้านรีดิวซ์ (+2) ดังนั้นการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง -1, +1, +2 ทำให้ลดความสามารถในการจับกับน้ำตาลด้านปลายรีดิวซ์และทำให้เอนไซม์มี processivity ต่อสับสเตรทน้อยลง ข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับผลการจลนพลศาสตร์ของการสลายไคตินด้วยโปรตีนกลายพันธุ์ W275G และ W397F ให้ค่า K_m เพิ่ม ส่วนค่า k_{cat} ลดลงอย่างมาก

บทที่ 4
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างไคติเนสกลายพันธุ์โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณจับกับสับสเตรทและกรดอะมิโนที่ผิวของเอนไซม์โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp70 Trp168 Tyr171 Trp231 Tyr245 Trp275 Trp397 และ Trp570 โดยเทคนิค site-directed mutagenesis การทดสอบหาค่า specific hydrolyzing activity ของการสลาย *p*NP-$[GlcNAc]_2$ และ colloidal chitin เปรียบเทียบกับโปรตีน wild-type พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนวงแหวนมีความสามารถย่อย *p*NP-glycoside และ colloidal chitin ได้น้อยกว่าโปรตีน wild-type เอนไซม์กลายพันธุ์ W397F เป็นตัวเดียวที่ให้ค่า specific activity ของการย่อยสับสเตรททั้งสองตัวมากกว่า wild-type การตรวจสอบผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการสลายไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ตั้งแต่ 2-6 หน่วย (NAG_2-NAG_6) พบว่าไคติเนสกลายพันธุ์ W275G และ W397F ได้เปลี่ยนแปลงรูปแบบการสลายน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ไปจากรูปแบบของเอนไซม์ wild-type อย่างสิ้นเชิง ผลการทดลองสรุปได้ว่ากรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 น่าจะมีความสำคัญต่อการเลือกจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ส่วนผลของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่อยู่ที่บริเวณผิวโปรตีน พบว่า Trp70 ซึ่งอยู่ที่ปลายด้านเอ็นของโดเมนจับไคตินมีบทบาทสำคัญต่อการจับและการสลายไคตินสายยาว ส่วนกรดอะมิโน Trp231 และ Tyr245 ซึ่งอยู่ใกล้กับปลายมีผลต่อการสลายไคตินแต่ไม่มีผลต่อการจับกับไคตินสายยาว และกรดอะมิโนทั้งหมดไม่มีบทบาทสำคัญต่อการจับและการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ การศึกษาลักษณะการจับของเอนไซม์กับไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์เทียบกับไคตินโดยเทคนิค quantitative HPLC MS พบว่าสับเสตรท NAG_5 และ NAG_6 ชอบที่จะจับกับบริเวณแร่งที่ตำแหน่งจับ -2 ถึง +2 ส่วนไคตินสายยาวเริ่มต้นจับทั้งแบบสุ่มและแบบ progressive แต่ผลิตผลน้ำตาล NAG_2 ที่พบมากกว่าน้ำตาลสายสั้นอื่น ๆ แสดงว่าเอนไซม์สลายไคตินสายยาวแบบ progressive จากการวิเคราะห์โดย HPLC MS ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ wild-type ไม่มีการเลือกใช้สับสเตรทส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์ W397F และ W275G เลือกสลาย β สับสเตรทมากกว่า α สับสเตรท

4.2. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

บรรณานุกรม

Aronson, N.A., Halloran, B.A., Alexyev, M.F., Amable, L., Madura, J.D., Pasupulati, L., Worth, C., and van Roey., P (2003) *Biochem. J*. 376, 86-95.

Bassler, B.L., Yu, C., Lee, Y.C., and Roseman, S. (1991) *J. Biol. Chem*. 266, 2476-2486.

Bradford MM (1976) Anal Biochem 72:248-254.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., and Vogeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157, 22-31.

Bortone, K., Monzingo, A.F., Ernst, S., and Robertus, J.D. (2002) *J. Mol. Biol.* 320, 293-302.

Cabib, E. (1987) *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol*. 59-101.

Carroad, P.A., and Tom, R.A. (1978) *J. Food. Sci*. 43, 1158-1161.

Cohen-Kupiec, R., and Chet, I. (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 270-277.

Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) 760-763.

Cosio, I.G., Fisher, R.A., and Carroad, P.A. (1982) *J. Food Sci*. 47, 901-905.

Davis, B., and Eveleigh, D.E. (1984) In Chitin, Chitosan, and Related enzymes (Zakikas, J.P., ed.) Academic Press, New York. 160-179.

Gooday, G.W. (1994) In C. Ratledge (ed.) In Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 279-312.

Henrissat, B., and Bairoch, A. (1993) *Biochem. J.* 316, 695-696.

de Jong, A.J., Cordewener, J., lo Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerchhove, J., van Kammen, A., and de Vries, S.C. (1992) *Plant Cell* 4, 425-433.

Kuranda, M., and Robbins, P.W. (1991) *J. Biol. Chem*. 266, 19758-19767.

Imai T, Watanabe T, Yui T, Sugiyama J (2002) FEBS Lett 510, 201-205.

Laemmli UK (1970) Nature 227,680-685.

Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci, G., and Harman, G.E. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 7860-7865.

Montgomery, M.T., and Kirchman, D.L. (1993) *Appl. Environ. Micriobiol*. 59, 373-379.

Nonaka, T. (2001) FEBS Lett. 494, 74-78.

Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., and Wanatabe, T. (1996) *J. Bacteriol.* 178, 5065-5070.

Okutani, K. (1977) Int. Confer. Chitin/Chitosan, Boston MA (*USA*), April11th-13th, 1977, 554-562.

Okutani, K., Sawada, T., and Kimata, M. (1967) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*. 33, 952-955.

Pantoom S, Songsiriritthigul C, Suginta W (2008) BMC Biochem 21, 9:2

Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C.E., Oppenheim, A.B., and Petratos, K. (2001) *Biochemistry*, 40, 11338-11343.

Papavizas, C.G. (1985) *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54.

Pleban, S., Chernin, L., and Chet, I. (1997) *Lett Appl. Microbiol.* 25, 284-288.

Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., and Vorgias, C.E. (1994) *Structure* 2, 1169-1180.

Robertus, J.D. & Monzingo, A.F. (1999). *EXS.* 87, 125-135.

Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto, M., Watanabe, T., and Fukamizo, T. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)* 131, 557-564.

Sivan, A., and Chet, I. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135, 675-682.

Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC & Suginta W (2008) J Struct Biol 162,491-499.

Srivastava, A.K., Defago, G., and Boller, T. (1985) *Experientia*. 41, 1612-1613.

Spindler-Barth, M. (1993) In Chitin Enzymology (Muzzarelli, R.A.A., ed.), European Chitin Society, *Italy*, 75-82.

Suginta W (2007) Enzyme Microb Tech. 41,212-220.

Suginta, W., Robertson, P. A. W., Austin, B., Fry, S. C., and Fothergill-Gilmore, L. A. (2000) *J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84.

Suginta W, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R, Svasti J (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 177, 1151-1160.

Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Svasti, J., and Prinz, H. (2005) *FEBS J.* 272, 3376-3386.

Suginta W, Pantoom S & Prinz H (2009) J Chem Biol, online available May 28th, 2009.

Svityl, A.L., Chadhain, S.M.N., Moore, J.A., and Kirchman, D.L. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 408-413.

Yu, C., Lee, A.M., Bassler, B.L., and Roseman, S. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 24260-24267.

Wang, S.H., Zheng, H.J., Dissanayake, S., Cheng, W.F., Tao, Z.H., Lin, S.Z., Piessens, W.F. (1997) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 474-481.

Watanabe, T., Ishibashi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Sugiyama, J., Matsumoto, T., Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzyki K., and Tanaka, H. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 4107-4022.

Wills-Karp, M., and Karp, C.L. (2004) *N. Engl. J. Med.* 351, 1455-1457.

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลาย และสับสเตรท

1.1. LB Medium (Luria-Bacterial Medium)

Per litre:

To 950 ml of deionised H_2O add:

bacto-tryptone	10 g
bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g

Shake until the solutes have dissolved. Adjust the pH to 7.0 with 5 N NaOH (0.2 ml). Adjust the volume of the solution to 1 litre with deionised H_2O. Sterilise by autoclaving for 20 min at 15lb/sq. in. on liquid cycle.

1.2. Preparation of colloidal chitin

Chitin powder from crab shells (5 g) was added slowly into 60 ml of concentrated HCl and left at 4 °C overnight with vigorous stirring. The mixture was added to 2 litres of ice-cold 95% ethanol with rapid stirring and kept overnight at 25 °C. The precipitant was collected by centrifugation at 5000 ***g*** for 20 min at 4 °C and was washed with sterile distilled water until the colloidal chitin became neutral (pH 7.0). Colloidal chitin was stored at 4 °C until further applications.

1.3. Preparation of Bradford's solution

The dye reagent is prepared by dissolving 0.01% Coommassie blue G-250 in a mixture of 85% (v/v) phosphoric acid, 95% (v/v) ethanol, and water in a ratio of 10:5:85 by vol.

The protein concentration was determined by Micro-assay method

1. Pipet 20 µl samples containing between 1 and 10 µg into 1.5-mL polyethylene microfuge tubes. For the calibration curve, pipet triplicate volumes of 0-20 µg/mL BSA standard solution into microfuge tubes.

2. Add 1 mL of protein reagent to each tube and mix gently, but thoroughly.

3. Measure the absorbance of each sample between 2 and 60 min after addition of the protein reagent.

1.4. SDS-PAGE

- **Solutions for preparing 12% resolving SDS-polyacrylamide gel**

Solution component	Component volume (ml)		
	5 ml	10 ml	20 ml
H_2O	1.6	3.3	6.6
30% (w/v) acrylamide mix	2.0	4.0	8.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	5.0
10% SDS	0.05	0.1	0.2
10% ammonium persulfate (freshly prepared)	0.05	0.1	0.2
TEMED	2 µl	4 µl	6 µl

- **Solutions for preparing 5% stacking SDS-polyacrylamide gel**

Solution component	Component volume (ml)	
	2 ml	5 ml
H_2O	1.4	3.4
30% (w/v) acrylamide mix	0.33	0.83
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.25	0.63
10% SDS	0.02	0.05
10% ammonium persulfate (freshly prepared)	0.02	0.05
TEMED	2 µl	5 µl

- **Buffers for SDS-PAGE**

  SDS-gel loading buffer (3 x stock)

  150 mM Tris.Cl (pH6.8)

  300 mM dithiothreitol

  6% SDS (electrophoresis grade)

  0.3 % bromophenol blue

  30% glycerol

- **Tris-Glycine electrophoresis buffer (5 x stock)**

  250 mM Tris.Cl (pH 8.3)

  1.25 M glycine (electrophoresis grade) (pH 8.3)

  0.5 % SDS

- **Staining solution with Coomassie Brilliant Blue for Protein**

  Dissolve 0.25 g of Coomassie Brilliant Blue R250 in 90 ml of methnol:H_2O (1:1v/v) and 10 ml of glacial acetic acid. Filter the solution through a Whatman No. 1 filter to remove any particulate matter.

- **Destaining Solution for Coommassie Stain**

  30% methanol

  10% acetic acid

  dH_2O is added to bring volume to 100 ml.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5. Preparation of competent cells

1. Streak *E. coli* host cells on an LB plate+100 µg/ml Amp)
2. Allow cells to grow at 37°C overnight
3. Place one colony in 10 mL LB media (+antibiotic selection if necessary), grow overnight at 37°C
4. Transfer 5 mL overnight DH5a culture into 500 mL LB media in 2-L flask
5. Allow cell to grow at 37°C (250 rpm), until OD_{600}= 0.6 (~2-3 hours)
6. Transfer cells to 2 centrifuge bottles (250 mL), and place cells on ice for 20 mins
7. Centrifuge cells in Sorval GSA rotor at 4°C for 10 mins at 3,000 g (2500 rpm). **Cells must remain cold for the rest of the procedure**
8. Pour off media and resuspend cells in 30 mL of **cold** 0.1 M $CaCl_2$. Transfer the suspended cells into 50 mL polypropylene falcon tubes, and incubate on ice for 30 mins
9. Centrifuge cells using rotor at 4 °C for 10 mins at 3,000 g
10. Pour supernatant and re-suspend cells (by pipetting) in 8 mL cold 0.1M $CaCl_2$ containing 15% glycerol. Transfer 100 µL into (1.5 mL) Eppendorff tubes placed on ice. Freeze the cells in liquid nitrogen. Cells stored at -80°C can be used for transformation for up to ~6 months.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

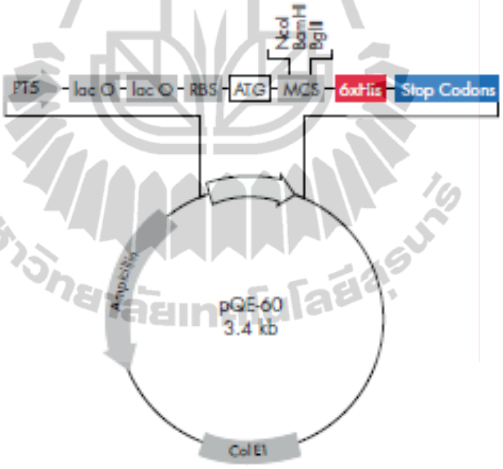
ภาคผนวก ข

แผนที่พลาสมิด pQE60 expression vector

pQE-60 Vector

Positions of elements in bases

Vector size (bp)	3431
Start of numbering at XhoI (CTCGAG)	1–6
T5 promoter/lac operator element	7–87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	133–150
Multiple cloning site	113–132
Lambda t_0 transcriptional termination region	173–267
rrnB T1 transcriptional termination region	1033–1131
ColE1 origin of replication	1608
β-lactamase coding sequence	3226–2366



pQE-60

CURRICULUM VITAE

Name Wipa Suginta

Affiliation School of Biochemistry, Institute of Science,
Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand
Tel: +66 44 22 4313; E-mail wipa@sut.ac.th

Degree Ph.D. (Biochemistry), University of Edinburgh, UK
M.Sc. (Biochemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand
B.Sc. (Biochemistry), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Marital status married with one child

Current Position Associate Professor in Biochemistry

Fellowships/Awards (2000 - present)

2008-2010 Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers from Alexander von Humboldt Foundation, Germany

2006 Suranaree University of Technology Award for "Outstanding Academic Performance in Science"

2005 For Women in Science Fellowship from L'OREAL (Thailand)/UNESCO.

2004 Biochemical Society General Travel Grant for a study visit to the Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany.

2003 DAAD Fellowship for a Study Visit to the Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany.

1999-2000 Wellcome Trust fellowship for Postdoctoral research study in Membrane Biology Group, The University of Edinburgh, United Kingdom.

Research Interest

1. Structure and function of bacterial porins
2. Structure and function of chitinases and chitobiases from marine bacteria to humans

Publications

Research Articles

1. Pantoom S, Vetter I, Prinz H & **Suginta W*** (2009) Structural analysis of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with novel chitinase inhibitors: Implications for drug development against allergic asthma. In preparation for *Nat. Struct. Mol. Biol.*

2. **Suginta W***, Chuenark D, Masuhara M & Fukamizo T (2009) Cloning, expression, and functional characterization of non-homologous *N*-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi*. In preparation for *FEBS J*.
3. Sritho N & **Suginta W*** (2009) The effects of the active site residues Asp313 and Tyr435 on the binding and catalytic activities of *Vibrio harveyi* chitinase A. Submitted to *J. Biochem. (Tokyo).*
4. Schulte A, Ruamchan S, Khunkaewla P & **Suginta W*** (2009) The outer membrane protein VhOmp from *Vibrio harveyi*: The pore-forming properties in black lipid membranes. *J. Membr. Biol.* (Accepted) (JIF2008 = 2.844).
5. **Suginta W*,** Pantoom S & Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi. J. Chem. Biol.* (online available May 28th, 2009).
6. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC & **Suginta W*** (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. *J. Struct. Biol.* 162, 491-499. (JIF2008 = 4.059)
7. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W*** (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC-Biochemistry*, 9:2. (unofficial JIF2007 = 2.34)
8. **Suginta W***, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R & Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BBA - General Subjects* 1770, 1151-1160. (JIF2008 = 2.713)
9. **Suginta W*** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme Microb.Tech*. 41, 212-220. (JIF2008 =2.375)
10. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H & **Suginta W*** (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. *Acta Cryst. Section F*. 61, 895-898. (JIF2007 = 0.645)
11. **Suginta W*,** Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J & Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J.* 272, 3376-3386. (JIF2008 = 3.139)

12. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C & **Suginta W*** (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem. J.* 384, 609–617. (JIF2008 = 4.317)

13. **Suginta W***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J & Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. *Arch. Biochem. Biophys*. 424, 171-180. (JIF2008 = 2.626)

14. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH & **Suginta W*** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Biochem. J.* 377, 579-587. (JIF2008 = 4.317)

15. **Suginta W**, Karoulias N, Aitkin A & Ashley RH (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. *Biochem. J.* 359, 55-64. . (JIF2007 = 4.317)

16. **Suginta W,** Robertson PAW, Austin B, Fry SC & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol*. 89, 76-84. (JIF2008 = 2.028)

17. Svasti J, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S & Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. *In Protein Structure-Function Relationship* (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.

18. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.

19. **Suginta W** & Svasti MRJ (1995) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *ScienceAsia* 21, 183-186.

20. **Suginta W** & Svasti J (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.

21. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in

Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. *ScienceAsia* 21, 293-303.

Presentations at Scientific Meetings (2000-present)

1. Sritho N & **Suginta W.** Mutational analysis of the active-site residues Aspartate313 and Tyr435 of Chitinase A from a marine bacterium *Vibrio harveyi*. 2nd SUT Graduate Conference 2009, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, January 21st-22nd, 2009. AG-P-13, *Poster presentation.*
2. Ruamchan S, Schulte A & **Suginta W**. Ion channel activity of *Burkholderia pseudomallei* and *thailandensis* porins in black lipid membranes. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P53, *Poster presentation.*
3. Chuenark D, Prinz & **Suginta W**. Cloning, expression, and characterization of two zincin-like fold containing chitobiases from *Vibrio harveyi.* 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P73, *Poster presentation.*
4. Sritho N, Songsiriritthigul C & **Suginta W.** Mutational analysis of the reducing-end binding residues of chitinase A from *Vibrio harveyi.* 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P50, *Poster presentation.*
5. Pantoom S, Prinz H & **Suginta W**. Identification of novel inhibitors of chitinase A from *Vibrio harveyi* using a hig-throughput screening approach. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P48, *Poster presentation.*
6. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W.** Crystallization of wild-type chitnase A and mutants (W275G and W397F) from Vibrio harveyi in complex with potential inhibitors. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P46, *Poster presentation.*
7. **Suginta W** & Prinz H. Substrate binding preference and anomer selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A as revealed by HPLC-MS. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P14, *Invited oral presentation.*
8. **Suginta W.** Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of

Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P47. *Poster presentation.*

9. Songsiriritthigul C, Kobdaj A & **Suginta W**. The active site residues Trp275 and Trp397 are important for the binding selectivity of chitinase A to soluble substrates. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P53. *Poster presentation.*
10. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The influence of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P27. *Poster presentation.*
11. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The effect of the *N*-terminal residues on the enzymatic properties of *Vibrio carchariae* chitinase A. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Challenges in Protein Research in Thailand", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P61. *Poster presentation.*
12. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W.** Structural analysis of *Vibrio carchariae* chitinase A reveals conformational changes during substrate hydrolysis. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Challenges in Protein Research in Thailand", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P19. *Oral presentation.*
13. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W.** Structure of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd Protein Crystallization Workshop. Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, 20 – 23 July 2006. *Invited oral presentation by SC.*
14. **Suginta W.** On the structure and function of bacterial porins and chitinases. A Departmental Special Seminar, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Agriculture, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago, May 15th, 2006. *Invited oral presentation.*
15. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** A study of substrate specificity of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P327. *Oral presentation.*
16. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A & **Suginta W** Expression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis of

chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P335. *Poster presentation*.

17. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** Active-site mutation alters substrate specificity of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd Protein Symposium Network, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, September 23th-24th, 2005. *Invited oral presentation.*
18. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Ashley RH & **Suginta W** Porin from *Burkholderia pseudomallei* and B. *thailandensis*. In 30th FEBS Congress & 9th IUBMB Meeting, Budapest, Hungary, July2nd-7th, 2005. *FEBS J. Vol.* 272, *Supp.* 1, P389. *Poster presentation.*
19. Songsiriritthigul C, Robinson RC, Yuvaniyama J & **Suginta W** Expression, purification, and preliminarily structural analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P164. *Poster presentation.*
20. Siritapetawee J & **Suginta W** Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis,* and their function as a non-specific channel. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P5. *Poster presentation*.
21. **Suginta W**, Svasti J & Prinzs H Enzymatic properties of a family 18 chitinase a from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC/ESI mass spectrometry, Joint Senior Research Scholar Meeting: Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22th-23th, 2003, *Invited oral presentation.*
22. Siritapetawee J, Ashley RH, Prinz H, Samosornsuk W & **Suginta W** Identification of *Burkholderia* porins using MALDI-TOF and nanoelctrospray MS. 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Invited oral Presentation.*
23. **Suginta W** *C*-terminal protein processing study of *Vibrio carchariae* chitinase, using MALDI-TOF and nanoelectrospray MS, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Oral presentation*.
24. Sun Q, McDonald A, **Suginta W** & Ashley RH (2001) Localisation of a CLIC (Chloride Intracellular Channel) protein fused to green fluorescent protein. *Biochem. Soc. Trans*. A112. *Poster Presentation*.
25. **Suginta W** & Ashley RH (2000) The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins. *Molecular Biophysics of Cell Membranes (FASEB conference),* P57. *Poster presentation*.

26. **Suginta W,** Estibeiro P, Rigden DJ & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*, Gene isolation, Nucleotide sequence, and homology modelling of 3D-structure. *Biophy. J.* P417A. *Poster presentation.*

Presentations at Scientific Meetings (Years 2000-present)

27. Sritho N & **Suginta W.** Mutational analysis of the active-site residues Aspartate313 and Tyr435 of Chitinase A from a marine bacterium *Vibrio harveyi*. 2nd SUT Graduate Conference 2009, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, January 21st-22nd, 2009. AG-P-13, *Poster presentation*.
28. Ruamchan S, Schulte A & **Suginta W.** Ion channel activity of *Burkholderia pseudomallei* and *thailandensis* porins in black lipid membranes. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P53, *Poster presentation*.
29. Chuenark D, Prinz & **Suginta W.** Cloning, expression, and characterization of two zincin-like fold containing chitobiases from *Vibrio harveyi*. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P73, *Poster presentation*.
30. Sritho N, Songsiriritthigul C & **Suginta W.** Mutational analysis of the reducing-end binding residues of chitinase A from *Vibrio harveyi*. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P50, *Poster presentation*.
31. Pantoom S, Prinz H & **Suginta W.** Identification of novel inhibitors of chitinase A from *Vibrio harveyi* using a hig-throughput screening approach. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P48, *Poster presentation*.
32. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W.** Crystallization of wild-type chitnase A and mutants (W275G and W397F) from Vibrio harveyi in complex with potential inhibitors. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 2008. P46, *Poster presentation*.
33. **Suginta W** & Prinz H. Substrate binding preference and anomer selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A as revealed by HPLC-MS. 2nd Annual Symposium of the Protein

Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P14, *Invited oral presentation*.

34. **Suginta W.** Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P47. *Poster presentation*.
35. Songsiriritthigul C, Kobdaj A & **Suginta W**. The active site residues Trp275 and Trp397 are important for the binding selectivity of chitinase A to soluble substrates. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P53. *Poster presentation*.
36. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The influence of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Odysseys in Protein Research", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 2007. P27. *Poster presentation*.
37. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The effect of the *N*-terminal residues on the enzymatic properties of *Vibrio carchariae* chitinase A. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Challenges in Protein Research in Thailand", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P61. *Poster presentation*.
38. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W.** Structural analysis of *Vibrio carchariae* chitinase A reveals conformational changes during substrate hydrolysis. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Challenges in Protein Research in Thailand", Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P19. *Oral presentation*.
39. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W.** Structure of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd Protein Crystallization Workshop. Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, 20 – 23 July 2006. *Invited oral presentation by SC*.
40. **Suginta W.** On the structure and function of bacterial porins and chitinases. A Departmental Special Seminar, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Agriculture, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago, May 15th, 2006. *Invited oral presentation*.

41. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** A study of substrate specificity of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P327. *Oral presentation*.
42. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A & **Suginta W** Expression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P335. *Poster presentation*.
43. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** Active-site mutation alters substrate specificity of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd Protein Symposium Network, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, September 23th-24th, 2005. *Invited oral presentation.*
44. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Ashley RH & **Suginta W** Porin from *Burkholderia pseudomallei* and B*. thailandensis*. In 30th FEBS Congress & 9th IUBMB Meeting, Budapest, Hungary, July2nd-7th, 2005. *FEBS J. Vol.* 272, *Supp.* 1, P389. *Poster presentation*.
45. Songsiriritthigul C, Robinson RC, Yuvaniyama J & **Suginta W** Expression, purification, and preliminarily structural analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P164. *Poster presentation*.
46. Siritapetawee J & **Suginta W** Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and their function as a non-specific channel. The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. February, 3rd-6th, 2004. P5. *Poster presentation*.
47. **Suginta W**, Svasti J & Prinzs H Enzymatic properties of a family 18 chitinase a from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC/ESI mass spectrometry, Joint Senior Research Scholar Meeting: Protein Structure and Thalassemia Research Fund, Royal River Hotel, Bangkok, August 22th-23th, 2003, *Invited oral presentation.*
48. Siritapetawee J, Ashley RH, Prinz H, Samosornsuk W & **Suginta W** Identification of *Burkholderia* porins using MALDI-TOF and nanoelctrospray MS. 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Invited oral Presentation.*

49. **Suginta W** *C*-terminal protein processing study of *Vibrio carchariae* chitinase, using MALDI-TOF and nanoelectrospray MS, 1st Protein Symposium Network, Mahidol, Thailand, August 29th-30th, 2002. *Oral presentation*.

50. Sun Q, McDonald A, **Suginta W** & Ashley RH (2001) Localisation of a CLIC (Chloride Intracellular Channel) protein fused to green fluorescent protein. *Biochem. Soc. Trans*. A112. *Poster Presentation*.

51. **Suginta W** & Ashley RH (2000) The chloride intracellular channel protein p64H1 (CLIC4) associates *in vitro* with brain dynamin, actin and 14-3-3 proteins. *Molecular Biophysics of Cell Membranes (FASEB conference)*, P57. *Poster presentation*.

52. **Suginta W,** Estibeiro P, Rigden DJ & Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae*, Gene isolation, Nucleotide sequence, and homology modelling of 3D-structure. *Biophy. J*. P417A. *Poster presentation*.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี