

เหริญน เคา เค็ง : การเปลี่ยนไซแลนให้เป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์เชิงหน้าที่ (ซอซ) โดยใช้
เอนไซม์ปรับแต่งพันธุกรรมเอนโด-เบต้า-1,4-ไซแลเนส (BIOCONVERSION OF XYLAN
INTO FUNCTIONAL XYLOOLIGOSACCHARIDES (XOS) BY RECOMBINANT ENDO- β -
1,4-XYLANASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ บุญทาวน, 106 หน้า

คำสำคัญ: บาซิลลัส สับซิลิส/ ไซแลเนส/โปรตีนจับมัดโตส/ฮิสติดีน/ติดป้าย/ไซแลน/ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์/ซอซ/พรีไบโอติก/ด้านการอักเสบ

ไซแลนเป็นทรัพยากรประเภทคาร์โบไฮเดรต ที่สามารถหมุนเวียนมาใช้ใหม่ ซึ่งมีปริมาณมากเป็นอันดับสองของโลก ไซแลนเป็นสารโพลีแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างหลากหลาย และมีศักยภาพในการนำไปใช้งานได้หลากหลายรูปแบบ ในงานวิจัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์นี้ ได้ทำการโคลนยีน *BsXynA11* จากเชื้อ บาซิลลัส สับซิลิส เข้าในพลาสมิด *pMAL-p5x* และ *pMY202* เพื่อผลิตเอนไซม์ปรับแต่งพันธุกรรมไซแลเนส ๒ ชนิด คือ *MBP-BsXynA11* และ *BsXynA11-His* จากนั้นได้ทำการประเมินความสามารถของเอนไซม์ทั้งสองในการเปลี่ยนไซแลนจากไม้บีช (Beechwood; BW) และชานอ้อย (Sugarcane Bagasse; BG) ให้เป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ซอซ) เชิงหน้าที่

ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต *MBP-BsXynA11* ในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* คือการใช้สาร IPTG ที่ความเข้มข้น ๐.๒ มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา ๒๐ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ ๓๒ องศาเซลเซียส ในขณะที่ *BsXynA11-His* นั้นจะให้ผลการผลิตที่ดีที่สุดเมื่อใช้ IPTG ที่ความเข้มข้น ๐.๑ มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๐ ชั่วโมง ภายใต้สภาวะดังกล่าว *MBP-BsXynA11* มีผลผลิตสูงกว่า โดยอยู่ที่ ๔๔.๖ มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับ *BsXynA11-His* ซึ่งมีผลผลิตที่ ๔๔.๖ มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่า *MBP-BsXynA11* มีน้ำหนักโมเลกุล ๖๖ กิโลดาลตัน ในขณะที่ *BsXynA11-His* มีน้ำหนักโมเลกุล ๒๓ กิโลดาลตัน ทั้งสองเอนไซม์แสดงประสิทธิภาพสูงสุดที่อุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียสและ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ ๖.๕ แต่ *MBP-BsXynA11* มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) สูงกว่า โดยอยู่ที่ ๗,๙๐๐ ยูนิตต่อนาโนโมล ในขณะที่ *BsXynA11-His* มีค่า ๔,๘๐๐ ยูนิตต่อนาโนโมล

MBP-BsXynA11 ยังมีความคงทนต่อความร้อนได้ดีกว่า โดยหลังการบ่มที่ ๔๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของ *MBP-BsXynA11* คงเหลืออยู่ที่ร้อยละ ๗๖.๕ และ ๘๑ ในสภาวะที่มีและไม่มีไซแลนจากไม้บีชตามลำดับ ในขณะที่ *BsXynA11-His* มีค่าคงเหลือเพียง ร้อยละ ๖๕.๕ และ ๒.๓ สำหรับอุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส กิจกรรมที่คงเหลือของ *MBP-BsXynA11* อยู่ที่ร้อยละ ๕๘.๕ และ ๒๒.๕ ในสภาวะที่มีและไม่มีไซแลนจากไม้บีชตามลำดับ ส่วน *BsXynA11-His* มีค่าคงเหลือเพียง ร้อยละ ๑๐.๗ และ ๑.๖

การวิเคราะห์จลนพลศาสตร์พบว่า *MBP-BsXynA11* มีค่า V_{max} และ k_{cat} สูงกว่าที่ ๔,๕๓๐ ไมโครโมล ต่อนาโนโมล และ ๕,๙๗๖ ต่อวินาทีตามลำดับ ในขณะที่ *BsXynA11-His* มีค่า ๓,๔๗๐ ไมโครโมล ต่อนาโนโมล และ ๔,๗๘๘ ต่อวินาทีตามลำดับ อย่างไรก็ตาม *BsXynA11-His* มีความสามารถในการจับกับสารตั้งต้นคือไซแลนจากไม้บีชได้ดีกว่า โดยมีค่า K_m ที่ ๑๒.๙ มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เมื่อเทียบกับ *MBP-BsXynA11* ซึ่งมีค่า K_m ที่ ๑๙.๓ มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

ในกระบวนการเปลี่ยนไซแลนให้เป็น ซอส ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ที่ ค่า pH 6.5 และ อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง ซอส ถูกผลิตได้ร้อยละ ๕๒ และ ๕๐ เมื่อใช้เอนไซม์ MBP-BsXynA11 และ BsXynA11-His ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์ ซอส มากกว่าร้อยละ ๙๐ ประกอบด้วยไซโลไบโอส ไซโลไดรโอส และไซโลเตตราโอส ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง

จากนั้นได้ทำการศึกษากิจกรรมทางชีวภาพของ MBPBW-XOS (ซอส ที่ได้จากไซแลนจากไม้ปืชโดยใช้เอนไซม์ MBP-BsXynA11) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติพรีไบโอติกที่เด่นชัดในอาหารสังเคราะห์ต่อเชื้อโปรไบโอติก ๗ สายพันธุ์ ได้แก่ *Bifidobacterium longum* (Omniflora, Austria), *Lactobacillus acidophilus* DSM20079 (DSMZ), *L. amylovorus* DSM20552 (DSMZ), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM20081 (DSMZ), *L. gasseri* (Omniflora, Austria), *Streptococcus salivarius* DSM2059 (DSMZ), *S. thermophilus* APC151 นอกจากนี้ ยังพบว่า MBPBW-XOS สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรไบโอติกสองสายพันธุ์ (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* และ *S. thermophilus*) ในโยเกิร์ตหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา ๓ สัปดาห์ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส

ที่สำคัญที่สุด การศึกษานี้พบว่า MBPBW-XOS และ MBPBG-XOS (ซอส ที่ได้จากไซแลนจากขานอ้อยโดย MBP-BsXynA11) และ XOSBW-HIS (ซอส ที่ได้จากไซแลนจากไม้ปืชโดยใช้ BsXynA11-His) รวมทั้ง XOSBG-HIS (ซอส ที่ได้จากไซแลนจากขานอ้อยโดย BsXynA11-His) มีฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์โมโนไซด์ของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยมีฤทธิ์ในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณที่ใช้ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ ๕๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิตร 50 $\mu\text{g/mL}$ แม้ว่าจะยังจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อประเมินความเป็นพิษของ ซอสในปริมาณที่สูง แต่อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้ได้เน้นย้ำถึงศักยภาพของ ซอส ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ในการเป็นส่วนผสมในอาหารเชิงหน้าที่ ที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพ ทั้งมนุษย์และสัตว์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

NGUYEN CAO CUONG : BIOCONVERSION OF XYLAN INTO FUNCTIONAL
XYLOOLIGOSACCHARIDES (XOS) BY RECOMBINANT ENDO- β -1,4-XYLANASE.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. APICHAT BOONTAWAN, Ph.D. 106 PP.

Keywords: *Bacillus subtilis*/xylanase/Maltose-binding protein/Histidine/Tag/
Xylan/Xylooligosaccharides/Prebiotic/Anti-inflammatory

Xylan, the second most abundant renewable carbohydrate resource globally, is a heterogeneous polysaccharide with diverse potential applications. In this study, the BsXynA11 gene from *Bacillus subtilis* was cloned into pMAL-p5x and pMY202 vectors to express two recombinant xylanases, namely MBP-BsXynA11 and BsXynA11-His. These recombinant xylanases were evaluated for their ability to convert xylan from beechwood (BW) and sugarcane bagasse (BG) xylan into functional xylooligosaccharides (XOS). The optimal conditions for the MBP-BsXynA11 expression in *Escherichia coli* were 0.2 mM IPTG for 20 h, at 32 °C, while BsXynA11-His expression was optimal using 0.1 mM IPTG at 27 °C for 20 h. Under these conditions, MBP-BsXynA11 exhibited a higher expression yield of 44.6 mg/L compared to 5.5 mg/L for BsXynA11-His. SDS-PAGE analysis showed molecular weights of 66 kDa for MBP-BsXynA11 and 23 kDa for BsXynA11-His. Both enzymes demonstrated optimal activity at 60 °C and pH 6.5; however, MBP-BsXynA11 displayed a higher specific activity of 7,900 U/nmol, compared to 4,800 U/nmol for BsXynA11-His. In comparison with BsXynA11-His, the thermostability of MBP-BsXynA11 was superior. In the presence and absence of the BW-xylan, the remaining activity of MBP-BsXynA11 after 72 h of incubation at 40 °C was 76.5% and 81%, and at 50 °C, 58.5% and 22.5%, respectively. For BsXynA11-His, 65.5% and 2.3% of the activity were retained at 40 °C, and 10.7% and 1.6% were retained at 50 °C, in the presence and absence of BW substrate, respectively. Kinetic analysis revealed that MBP-BsXynA11 also exhibited a higher V_{max} of 4,530 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{nmol}^{-1}$ and k_{cat} of 5,976 s^{-1} , compared to 3,470 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{nmol}^{-1}$ and 4,788 s^{-1} for BsXynA11-His, respectively. However, BsXynA11-His showed better substrate affinity for BW-xylan, i.e., at K_m of 12.9 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, compared to 19.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for MBP-BsXynA11. At the optimal bioconversion reaction of 2% (w/v) WB xylan, pH 6.5 at 40 °C for 48 h, 52% and 50% of XOS could be generated from BW-xylan using 500 U/mL MBP-BsXynA11 and BsXynA11-His, respectively. Remarkably, over 90% of the XOS products comprised xylobiose, xylotriose, and xyloetraose, which are highly bioactive components.

Next, the biological activities of MBPBW-XOS (XOS derived from beechwood xylan by MBP-*BsXynA11*) was investigated. The results showed a notable prebiotic effect in synthetic media on seven probiotic strains, i.e., *Bifidobacterium longum* (Omniflora, Austria), *Lactobacillus acidophilus* DSM20079 (DSMZ), *L. amylovorus* DSM20552 (DSMZ), *L. delbrueckii* sub. *bulgaricus* DSM20081 (DSMZ), *L. gasseri* (Omniflora, Austria), *Streptococcus salivarius* DSM2059 (DSMZ), and *S. thermophilus* APC151. Moreover, MBPBW-XOS's ability to support the growth of two probiotic strains (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*) in yogurt after three weeks of storage at 4 °C was also revealed. Most importantly, the anti-inflammatory activity of MBPBW-XOS, MBPBG-XOS (XOS from sugarcane bagasse xylan by MBP-*BsXynA11*), XOSBW-HIS (XOS from beechwood xylan by *BsXynA11*-His), and XOSBG-HIS (XOS from sugarcane bagasse xylan by *BsXynA11*-His) were also demonstrated on LPS-induced human mature monocytes, in a dose-dependent manner, with the optimal concentration at 50 µg/mL. While further studies are needed to assess XOS toxicity at high doses, these findings underscore the potential of enzymatically produced XOS as functional food ingredients with health-promoting effects for humans and animals.

School of Biotechnology
Academic Year 2024

Student's Signature:

Advisor's Signature:

Co-Advisor's Signature:

Co-Advisor's Signature: