CLONING AND EXPRESSION OF ENZYMES FROM GLYCOSYL HYDROLASE FAMILY (XYLANASE AND NEOPULLULANASE) FROM THE SEDIMENTS OF BOR KHLUENG HOT SPRING

VIRIYA NITTERANON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7010-6
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลนและการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ไซแลนเนสและนีโอพูลูแลนเนสจากสิ่งมีชีวิตในตัวอย่างดินน้ำพุร้อน อำเภอ บ่อคลึง (CLONING AND EXPRESSION OF ENZYMES FROM GLYCOSYL HYDROLASE FAMILY (XYLANASE AND NEOPULLULANASE) FROM THE SEDIMENTS OF BOR KHLUENG HOT SPRING))

วิริยา นิตย์ธีรานนท์ 4636864 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : กุศล ภูธนกิจ, Ph.D., สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์, Ph.D., วิฑูรย์ ถิระโสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

กลุ่มเอนไซม์ย่อยแป้ง (ไซแลนเนส, นีโอพูลูแลนเนส, อะไมเลส ฯลฯ) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนชิ้นส่วนของยีนไซแลนเนสและนีโอพูลูแลนเนสขึ้นมาจากสิ่งมีชีวิตในตัวอย่างดินของน้ำพุร้อน อ. บ่อคลึง จ. ราชบุรีโดยวิธีพีซีอาร์ ชิ้นส่วนของยีนขนาด 167 และ 560 คู่เบสที่ได้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าชิ้นส่วน 167 คู่เบสมีความคล้ายคลึง 65% ในลำดับกรดอะมิโนกับยีน *Thermobacillus xylanilyticus xynA* ส่วนชิ้น 560 คู่เบส โคลน BK44 มีความคล้ายคลึง 54% ในลำดับกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ glycosyl hydrolase family 13 ของ *Deinococcus radiodurans* และ 51% กับเอนไซม์ alpha-cyclodextrinase ของ *Geobacillus kaustophilus* โดยได้นำลำดับเบสจากชิ้นยีนที่เลือกมาทำการโคลนต่อไปโดยวิธีการ genome walking PCR จากผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถโคลนยีนไซแลนเนสทั้งชิ้นได้ ในทางตรงกันข้ามชิ้นส่วนของยีนนีโอพูลูแลนเนสถูกโคลนขึ้นโดยได้ open reading frame ที่มีความยาว 1,458 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งถอดรหัสให้โปรตีนที่มีความยาว 485 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบในฐานข้อมูลพบว่าโปรตีนมีความคล้ายคลึง 54% ในลำดับกรดอะมิโนกับเอนไซม์ maltogenic amylase ของ *Thermus* sp. และ alpha-cyclodextrinase ของ *Geobacillus kaustophilus* และมีความคล้ายคลึง 53% กับเอนไซม์ (neo)pullulanase ของ *Thermus thermophilus* ซึ่งทั้งหมดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มนีโอพูลูแลนเนส ผลการศึกษาการแสดงออกของ BK44 ใน *P. pastoris* และ *E. coli* พบว่าสามารถผลิตโปรตีนขนาดประมาณ 55 kDa ใน *E. coli* ได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าโปรตีนนี้ไม่สามารถแสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อซับสเตรทที่จำเพาะต่อยีนนีโอพูลูแลนเนส

116 หน้า. ISBN 974-04-7010-6

CLONING AND EXPRESSION OF ENZYMES FROM GLYCOSYL HYDROLASE FAMILY (XYLANASE AND NEOPULLULANASE) FROM THE SEDIMENTS OF BOR KHLUENG HOT SPRING

VIRIYA NITTERANON 4636864 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: KUSOL POOTANAKIT, Ph.D.,
SUTIPA TANAPONGPIPAT, Ph.D., WITOON TIRASOPHON, Ph.D.

ABSTRACT

Glycosyl hydrolases comprise a huge group of enzymes (xylanases, neopullulanases, amylases, etc.) and are valuable carbohydrate-degrading enzymes in biotechnological industries. In this study, to obtain genes encoding thermostable enzymes that are required for industrial processes, we have turned to directly obtaining the genes from environmental DNA, specifically, the Bor Khlueng hot spring. Consensus primers based on the conserved regions of family 10 xylanases and family 13 glycosyl hydrolases were used to obtain 167 bp and 560 bp PCR fragments of xylanase and neopullulanase genes, respectively. Sequence analysis of the partial xylanase gene exhibited 65% amino acid sequence identities to *Thermobacillus xylanilyticus xynA*. However, the full-length xylanase gene was not successfully obtained. For neopullulanase, the amino acid sequence analysis of one clone, BK44, showed 54% identity to glycosyl hydrolase family 13 of *Deinococcus radiodurans* and 51% identity to *Geobacillus kaustophilus* alpha-cyclodextrinase. This suggested that the obtained partial sequence from Bor Khlueng hot spring encoded a novel enzyme in this family. Using genome walking approaches, the 3' and 5'-end of the gene were obtained. The result showed that the full-length BK44 had an open reading frame of 1,458 bp encoding 485 amino acid residues and exhibited 54% identity to maltogenic amylase of *Thermus* sp., and alpha-cyclodextrinase of *Geobacillus kaustophilus*; and 53% identity to (neo)pullulanase of *Thermus thermophilus*. This suggested that BK44 belonged to the neopullulanase subfamily. Expression of the full-length BK44 in *P. pastoris* and *E. coli* was performed. The expressed protein of approximately 55 kDa was successfully obtained in *E. coli*. However, its enzymatic activities were not detected.

KEY WORDS: XYLANASE/ NEOPULLULANSE/ GLYCOSYL HYDROLASES/ GENOME WALKING/ *PICHIA PASTORIS*

116 P. ISBN 974-04-7010-6