

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ .....	(2)
กิตติกรรมประกาศ.....	(6)
สารบัญตาราง.....	(13)
สารบัญภาพประกอบ.....	(14)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย .....	2
2. ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง .....	3
2.1 Phytic acid.....	3
2.1.1 คุณสมบัติทางเคมีของ phytic acid.....	3
2.1.2 แหล่งของ phytic acid.....	5
2.1.3 คุณสมบัติของ phytic acid ในด้านต่างๆ .....	6
2.2 Phytase .....	11
2.2.1 การจัดกลุ่มเอนไซม์ phytase .....	14
2.2.1.1 EC 3.1.3.8: the 3-phytases .....	14
2.2.1.2 EC 3.1.3.72: the 5-phytase .....	16
2.2.1.3 EC 3.1.3.26: the 4/6-phytases .....	17
2.2.2 การจัดกลุ่มของเอนไซม์ phytase ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี .....	18

2.2.3 แหล่งของเอนไซม์ phytase จากเชื้อจุลินทรีย์ .....	22
2.2.4 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ phytases ในทางอุตสาหกรรม .....	29
2.2.5 โครงสร้างแบบจำลองของเอนไซม์ phytase .....	35
3. วัสดุและวิธีการทดลอง .....	37
3.1 วัสดุ .....	37
3.1.1 แบคทีเรียที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) .....	37
3.1.2 ยีสต์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีน .....	37
3.1.3 พลาสมิด .....	37
3.2 วิธีการทดลอง .....	39
3.2.1 การเลือกตำแหน่งกรดอะมิโนที่ต้องการศึกษา .....	39
3.2.2 การเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งจำเพาะในยีน phyA170 ด้วยเทคนิค site directed mutagenesis ด้วยวิธีพีซีอาร์ .....	40
3.2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์ .....	40
3.2.2.2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ยีน phyA170 กลาย .....	42
3.2.2.3 การสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ-rPhy170 จากแบคทีเรีย <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ด้วย QIAprep spin miniprep kit .....	42
3.2.2.4 การทำปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งจำเพาะในยีน phyA170 .....	43
3.2.3 การถ่ายยีน phyA 170 กลายเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน <i>E. coli</i> JM109 .....	44
3.2.3.1 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ของ <i>E. coli</i> JM109 .....	44
3.2.3.2 การถ่ายยีน phyA 170 กลายเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน <i>E. coli</i> JM109 ด้วยวิธีทรานส์ฟอร์เมชัน(Transformation) .....	44
3.2.4 การตรวจหาโคลนี <i>E. coli</i> JM109 ที่ได้รับ พลาสมิดสายผสมที่มียีน phyA 170 กลาย .....	45
3.2.4.1 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phyA 170 กลาย .....	46
3.2.5 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 โดยยีสต์ <i>P. pastoris</i> .....	46

3.2.5.1 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายสำหรับการทรานสเฟอร์- เมชันเข้าสู่ยีสต์ <i>P. pastoris</i> .....	46
3.2.5.2 การทำพลาสมิดที่ทำการ linearized ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Wizard DNA Clean-Up System (Promega) .....	47
3.2.5.3 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของยีสต์ <i>P. pastoris</i> .....	48
3.2.5.4 การถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายพันธุ์เข้าสู่ยีสต์เจ้าบ้าน <i>P. pastoris</i> ด้วยการทำให้ electroporation .....	49
3.2.5.5 การตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายเข้าสู่ โครโมโซมยีสต์ <i>P. pastoris</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์.....	49
3.2.5.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ <i>P. pastoris</i> เพื่อใช้ ในการทำพีซีอาร์.....	49
3.2.5.5.2 การตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอสาย ผสมกลายเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์เจ้าบ้าน <i>P. pastoris</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์ .....	50
3.2.5.6 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในระดับ small-scale .....	51
3.2.5.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) .....	52
3.2.5.8 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ด้วยยีสต์ <i>P. pastoris</i> ....	53
3.2.6 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ phytase .....	54
3.2.6.1 การทดสอบหาค่า pH และ ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการ ทำงานของเอนไซม์ phytases.....	54
3.2.6.2 การทดสอบความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด-เบส และความ ร้อนของเอนไซม์ phytases .....	55
3.2.6.3 การศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ phytases	56
4. ผลการทดลอง .....	57
4.1 ผลการทดลองการวิเคราะห์หาตำแหน่งกรดอะมิโนของโปรตีน PhyA170 ที่จะศึกษา .....	57

4.2 การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสม pPICZαA –rPhyA170 จาก E. coli DH5α	60
4.3 การทำเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งจำเพาะของยีน phyA170	61
4.4 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายสำหรับการถ่ายเข้าสู่ยีสต์	
P. pastoris	68
4.5 การทำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ทำการ linearized ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Wizard DNA Clean-Up System (Promega)	71
4.6 การตรวจสอบการแทรกตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมกลายเข้าสู่โครโมโซมของยีสต์ P. pastoris ด้วยวิธีพีซีอาร์	73
4.7 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ของยีสต์ P. pastoris ในระดับ small-scale	76
4.8 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน PhyA170 ด้วยยีสต์ P. pastoris	82
4.9 การทดสอบหาค่า pH และ ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ phytases	84
4.10 การทดสอบความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรด-เบสและความร้อนของเอนไซม์ phytase	86
4.11 การศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ phytase	90
5.    วิจารณ์ผลการทดลอง	93
6.    สรุปผลการทดลอง	104
รายการอ้างอิง	108
ภาคผนวก	
ก. เครื่องมือ สารเคมี และการเตรียมสารเคมี	116
ข. ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytase TR170 จากเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> สายพันธุ์ TR170	126

ค. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phyA170 กลาย .....	128
ประวัติการศึกษา .....	133