สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของ phytic acid โดยเลข 1-6 แทนตำแหน่งอะตอมของคาร์บอนในวงแหวน inositol ที่สร้างพันธะกับกลุ่มฟอสเฟต	3
2.2	โครงสร้างจำลองโมเลกุล phytic acid เมื่ออยู่ในสภาวะ pH ที่ 0.5-10.5.....	4
2.3	แสดงการจับกันระหว่างระหว่าง phytic acid แร่ธาตุชนิดต่างๆ และโมเลกุลทางชีวเคมีอื่นๆ	8
2.4	การทำงานของเอนไซม์ phytase ในปฏิกิริยา hydrolysis ทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่าง phytates 2 โมเลกุลและแร่ธาตุต่างๆถูกทำลายทำให้ได้ phytate โมเลกุลเดี่ยวและฟอสฟอรัสแคลเซียม เหล็ก และสังกะสี.....	11
2.5	โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytases โดยบริเวณในวงกลมเป็นส่วน active site ของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ catalytic center (R81 H82 R85 R156 H361 และ D362) และส่วน substrate specificity site (K91 K94 E228 D262 K300 และ K301)	13
2.6	การทำงานเอนไซม์ 3-phytase จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับโมเลกุล phytic acid.....	16
2.7	การทำงานเอนไซม์ 5-phytase จากละอองเกสรของดอกลิลลี่ โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับโมเลกุล phytic acid.....	17
2.8	ปฏิกิริยา hydrolysis ของเอนไซม์ในกลุ่ม histidine acid phytases	19
2.9	ปฏิกิริยา hydrolysis สับสเทรตของเอนไซม์ในกลุ่ม alkaline phytases	20
2.10	การทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของเอนไซม์ phytases ที่แบ่งออกเป็นกลุ่มของ histidine acid phytases	21
2.11	แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytaseจากเชื้อรา *A. niger* TR170 หรือ PhyA170 ซึ่งสร้างโดยใช้โปรแกรม Swiss-Model.....	36
3.1	ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA -rPhyA170 ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ...	38
4.1	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytases ระหว่างเชื้อรา 4 สายพันธ์.....	58

4.2 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 โดยใช้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 เป็นโครงสร้างต้นแบบ 59
4.3 ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA -rPhyA170 ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ... 61
4.4 ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -mPhyA170 ที่มีการกลายในตำแหน่งจำเพาะที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis โดยวิธีพีซีอาร์ 62
4.5 ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -mPhyA170 ที่มีการกลายในตำแหน่งจำเพาะซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Dpn*I ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis โดยวิธีพีซีอาร์ 63
4.6 ผลภาพเจลจำลองของจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอหลังจากการย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pPICZαA -mPhyA170 กลาย Q50L และ Q50T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I ด้วยโปรแกรม NEBcuter v2.0 (Biolab) 65
4.7 ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -mPhyA170 กลาย Q50L และ Q50T และ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -rPhyA170 ต้นแบบ ที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ *Rsa*I 66
4.8 ผลโครมาโทแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน phyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด เปรียบเทียบกับยีน phyA170 ดั้งเดิม แสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนด้วยแถบสีดำ 67
4.9 ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -mPhyA170 ทั้ง 9 ชนิด และ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -rPhyA170 ต้นแบบ 69
4.10 ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -mPhyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด และ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -rPhyA170 ต้นแบบ ที่ถูก linearized ด้วยเอนไซม์ *Pme*I 70

4.11 ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -mPhyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด และ พลาสมิดดีเอ็นเอ pPICZαA -rPhyA170 ต้นแบบ ที่ถูก linearized และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Wizard DNA Clean-Up System (Promega) 72
4.12 ผลการวิเคราะห์ 0.8% agarose gel electrophoresis ของการแทรกตัวของพลาสมิด pPICZαA -mPhyA170 กลายทั้ง 9 ชนิด และพลาสมิด pPICZαA -rPhyA170 ต้นแบบ เข้าสู่โครโมโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1 73
4.13 ผลโครมาโทแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phyA*170 กลายทั้ง 9 ชนิด เปรียบเทียบกับยีน phyA170 75
4.14 ผลการวิเคราะห์ 10% SDS-PAGE ของการแสดงออกของโปรตีน phyA170 ดั้งเดิมและโปรตีนกลายจากรีคอมบิแนนท์เซลล์ *P. pastoris* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 4 ของการเพาะเลี้ยง..... 76
4.15 ผลการวิเคราะห์ 10% SDS-PAGE ของการแสดงออกของโปรตีน PhyA170 ดั้งเดิมและโปรตีน PhyA170 กลายจากรีคอมบิแนนท์เซลล์ *P. pastoris* 83
4.16 ผลกราฟแสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ phytase ที่ค่า pH 4.5 และ 5.5 85
4.17 ผลกราฟแสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ phytase ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 90 องศาเซลเซียส..... 86
4.18 ผลกราฟแสดงค่า relative activity ของการทนทานต่อความร้อนของเอนไซม์ phytase ดั้งเดิม (WT) 88
4.19 ผลกราฟแสดงค่า relative activity ของการทนทานต่อความร้อนของเอนไซม์ phytase กลาย Q50I 88
4.20 ผลกราฟแสดงค่า relative activity ของการทนทานต่อความร้อนของเอนไซม์ phytase กลาย Q50L 89
4.21 ผลกราฟแสดงค่า relative activity ของการทนทานต่อความร้อนของเอนไซม์ phytase กลาย Q50P 89
4.22 ผลกราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ K_m และ V_{max} ของโปรตีนดั้งเดิม (WT) 90

4.23 ผลกราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ K_m และ V_{max} ของ
โปรตีนกลาย Q50L 91
4.24 ผลกราฟแสดงค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ K_m และ V_{max} ของ
โปรตีนกลาย Q50P 92
5.1 การเปรียบเทียบโครงสร้างจำลองของเอนไซม์ phytases ระหว่าง
โปรตีนกลาย Q50P กับ โปรตีนดั้งเดิม 96
5.2 การจำลองการจับกันระหว่างโปรตีนดั้งเดิม (WT) กับ สับสเทรต phytic acid 100
5.3 การจำลองการจับกันระหว่างโปรตีนกลาย Q50L กับสับสเทรต phytic acid . 100
5.4 การจำลองการจับกันระหว่างโปรตีนกลาย Q50P กับสับสเทรต phytic acid 101
5.5 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase ต่อสับสเทรต phytic acid 103