วิทยานิพนธ์

การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์

แมนนาเนส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ

***Bacillus circulans* NT 6.7**

Cloning and Expression of Mannanase Gene from

***Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 and**

***Bacillus circulans* NT 6.7**

นางสาวปาณิสรา เหมินทร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แมนนาเนส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *Bacillus circulans* NT 6.7

Cloning and Expression of Mannanase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 and *Bacillus circulan*s NT 6.7

นามผู้วิจัย นางสาวปาณิสรา เหมินทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ ....

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

กรรมการ ....

(อาจารย์อัจฉรา พยัพพานนท์, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.............. **เดือน**.................... **พ.ศ.**...............

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แมนนาเนส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *Bacillus circulans* NT 6.7

Cloning and Expression of Mannanase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 and *Bacillus circulans* NT 6.7

โดย

นางสาวปาณิสรา เหมินทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2551

ปาณิสรา เหมินทร์ 2551: การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แมนนาเนส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *Bacillus circulans* NT 6.7. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 92 หน้า

เอนไซม์แมนนาเนสสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์เพื่อใช้เป็นสารพรีไบโอติกที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ (Probiotic) เอนไซม์แมนนาเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายแหล่งโดยเฉพาะแบคทีเรีย ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณมาก ควบคุมการผลิตได้ง่าย การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *Bacillus circulans* NT 6.7 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และลักษณะของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเซลล์ลูกผสม (Recombinant cells) โดยใช้ *Escherichia coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบเซลล์ลูกผสมจำนวน 3 โคลนที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส ได้แก่เซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเป็น 0.080, 0.132 และ 0.304 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รวมทั้งแสดงกิจกรรมการย่อยบนสับสเตรตชนิดแข็งทำให้เกิดวงใส (Clear zone) ขนาด 1.3, 1.4 และ 1.7 ซม. ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้มีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรตประเภทกลูโคแมนแนน และกาแลคโตแมนแนนเช่นเดียวกับจุลินทรีย์ต้นแบบ เมื่อศึกษา Zymogram ของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวปรากฏแถบของโปรตีนที่แสดงกิจกรรมต่อสับสเตรต Locust bean gum (LBG) ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ต้นแบบ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสมซ้ำอีกครั้งเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้า-แมนนาเนส โดยการสกัดดีเอ็นเอและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xba*I และทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะนั้นไม่ปรากฏชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสทั้งบนพลาสมิดลูกผสม และโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากความไม่เสถียรของพลาสมิด pHT43 ที่นำมาใช้ในการทดลอง

__________________ __________________ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Panisara Haemin 2008: Cloning and Expression of Mannanase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 and *Bacillus circulans* NT 6.7. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology.
Thesis Advisor: Assistant Professor Suttipun Keawsompong, Ph.D. 92 pages.

Mannanase can be applied in the production of Manno-oligosaccharides, which are prebiotics utilized selectivity by probiotics. Mannanase has been produced from various organisms, especially bacterial sources which are preferred when large amounts of enzyme are required. In this research, mannanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 and *Bacillus circulans* NT 6.7 were cloned and expression by using *Escherichia coli* DH5α as a host cell. The result revealed that three recombinant cells had mannanase activity were found, named 6.3-379, 6.7-33 and 6.7-780, These recombinants had specific activity against locust bean gum 0.080, 0.132 and 0.304 unit/mg protein, respectively. Diameter of clear zone from recombinant cells 6.3-379, 6.7-33 and 6.7-780 were 1.3, 1.4 and 1.7 cm. All recombinant enzyme exerted high specific for glucomannan and galactomannan substrate. Zymogram of the recombinant enzyme and native enzyme showed active-band against locust bean gum in the same position. However, when recombinant cells were grown in the next generation to detect nucleotide sequences of mannanase gene by restriction analysis and polymerase chain reaction. The result indicated that DNA fragment of recombinant plasmid and chromosomal DNA of all recombinant cells were not detected. This might be caused by the unstability of plasmid pHT43.

____________________________ ____________________________ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางวิจัยของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการอบรมสั่งสอนในทุก ๆ เรื่องตลอดระยะเวลาที่ศึกษา และการตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก อาจารย์อัจฉรา พยัพพานนท์ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ ดร. เกียรติทวี ชูวงศ์โกมล อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุก ๆ ท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอนและให้ความรู้ในทุก ๆ ด้านตลอดจนการแก้ปัญหาต่าง ๆ ในการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับปริญญาโท และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกๆท่านที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเพื่อน ๆ ร่วมรุ่นปริญญาโท รหัส 47 ตลอดจนพี่ ๆ ในภาควิชาฯ ทุกคนสำหรับมิตรภาพ และความเอื้อเฟื้อในทุก ๆ ด้านตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและทำกิจกรรมต่าง ๆ ร่วมกัน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย และครอบครัวเหมินทร์ สำหรับความรัก กำลังใจ ความห่วงใยเอื้ออาทร ที่เป็นพลังให้ข้าพเจ้าต่อสู้กับปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ ได้

ปาณิสรา เหมินทร์

เมษายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	68
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	69
ภาคผนวก	85
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	92

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส	8
2	เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส	9
3	ตารางสรุปลักษณะของเอนไซม์เบต้า- แมนนาเนสจากแหล่งต่างๆ	16
4	แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดส	18
5	แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดส	21
6	เชื้อราและยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดส	22
7	ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนเบต้า-แมนนาเนส บนโครโมโซม และพลาสมิดลูกผสม	30
8	สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Separation gel (7.5%) และ Stacking gel (4%)	39
9	ค่าพารามิเตอร์ทางจลน์พลศาสตร์ของเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3	41
10	ค่าพารามิเตอร์ทางจลน์พลศาสตร์ของเอนไซม์จาก *B. circulans* NT 6.7	41
11	ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่างๆของเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3	43
12	ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆของเอนไซม์จาก *B. circulans* NT 6.7	43
13	ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7	44
14	ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของพลาสมิด pHT43	48
15	ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มของ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 โดยใช้ *E.coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน	50
16	ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะจากเซลล์ลูกผสมที่มีกิจกรรมต่อสับสเตรต LBG	51

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
17	ขนาดวงใสบน LBG plate ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3, *B. circulans* NT 6.7 เซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33, 6.7-780 และ *E.coli* DH5α	54
18	ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสมเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ต้นแบบ	56

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนใน Locust bean gum และ Guar gum	6
2	โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนในกากมะพร้าว	7
3	กลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า- แมนนาเนส	11
4	กลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า- แมนโนสิเดส	19
5	แผนที่ของพลาสมิด pHT43	29
6	โครโมโซมของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7	45
7	ลักษณะโครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I แบบไม่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 และ 30 นาที	46
8	ลักษณะโครโมโซมจาก *B. circulans* NT 6.7 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I แบบไม่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 และ 30 นาที	47
9	พลาสมิด pHT43 ก่อนและหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน	49
10	ลักษณะวงใส (Clear zone) ที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส บน LBG plate	53
11	Zymogram ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 เปรียบเทียบกับเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมภายหลังการย้อมด้วยสี Congo red	57
12	ลักษณะพลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780	58
13	พลาสมิดลูกผสมจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 ก่อนและหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน	59
14	พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 ก่อนและหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่		หน้า
15	ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Fsq และ Rsq ของเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780	62
16	ลักษณะโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33, 6.7-780 และ *E.coli* DH5α	63
17	ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ BMR ของเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 ,6.7-780 และ *E.coli* DH5α	64

การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แมนนาเนสจาก
Bacillus amyloliquefaciens NT 6.3 และ *Bacillus circulans* NT 6.7

Cloning and Expression of Mannanase Gene from
Bacillus amyloliquefaciens NT 6.3 and *Bacillus circulans* NT 6.7

คำนำ

มะพร้าวเป็นพืชที่มีปริมาณการเพาะปลูกสูงมากในประเทศแถบเอเชีย ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย (Hossain *et al.,*1996) และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าวต่าง ๆ นั้นมีสูงถึง 1.4 ล้านตันต่อปี (Choct, 2001) โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการทำน้ำกะทิ ซึ่งจะมีกากมะพร้าวที่เหลือจากการคั้นกะทิปริมาณมาก โดยปรกตินิยมนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่สัตว์จะย่อยและใช้ประโยชน์จากกากมะพร้าวได้ต่ำเนื่องจากกากมะพร้าวมีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตในรูปกาแลคโตแมนแนน สูงถึง 60-90 เปอร์เซ็นต์ (Luis *et al.,* 2000) กาแลคโตแมนแนนประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเป็นโครงสร้างหลักในทิศทางเบต้า-1,4 และน้ำตาลกาแลคโตสเป็นสายกิ่งที่ตำแหน่ง แอลฟ่า-1,6 โดยโครงสร้างเหล่านี้สามารถย่อยสลายให้กลายเป็นแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์ (manno-oligosaccharide) ได้โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

เอนไซม์ Beta-D-mannanase (endo-1,4 -beta-D-mannanase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4 ที่เชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลแมนโนสในโครงสร้างหลักของแมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนนและ กาแลคโตกลูโคแมนแนน ในลักษณะแบบสุ่ม (random) ทำให้ได้ผลผลิตเป็นแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์ (Cann *et al.,*1999) ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์เป็นสารพรีไบโอติก ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ เช่น *Bifidobacterium* sp. และ *Lactobacillus* sp. (Zakaria *et al.,*1998) รวมทั้งยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella* sp. ได้โดยแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์นี้จะทำหน้าที่เป็น analogue receptor ของเชื้อก่อโรคทำให้พื้นที่บนผนังลำไส้สำหรับเชื้อโปรไบโอติกมีมากขึ้น (Hardy, 2003) นอกจากนี้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสยังถูกนำมาใช้ลดความหนืดในระหว่างกระบวนการผลิตกาแฟ โกโก้ และ ช็อคโกแลต ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้เพิ่มสูงขึ้น (Zakaria *et al.,*1998) ด้วยเหตุผลดังกล่าวเอนไซม์แมนนาเนสจึงเป็นเอนไซม์ที่ถูกศึกษา และนำมาใช้มากในระดับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้นั้นมีหลายชนิดโดยเฉพาะจุลินทรีย์ในจีนัส *Bacillus*

สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้หลายชนิด รวมทั้งมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะโคลน และศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *Bacillus circulans* NT 6.7 เพื่อปรับปรุงลักษณะต่าง ๆ ทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่การพัฒนาเอนไซม์ชนิดนี้ในการประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการผลิตสารพรีไบโอติกให้มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสมบัติทางจลน์พลศาสตร์และความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7

2. ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7

3. ศึกษาลักษณะของเอนไซม์แมนนาเนสที่ผลิตได้จากเซลล์ลูกผสม (Recombinant cells)

การตรวจเอกสาร

1. แมนแนน (mannan)

1.1 แหล่งและโครงสร้างทางเคมี

แมนแนนเป็นสารประกอบประเภทเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ซึ่งพบในส่วนของผนังเซลล์พืช เช่นพืชไม้เนื้ออ่อน (soft wood) โดยพบอยู่ระหว่างชั้นของเซลลูโลส และลิกนิน (Ethier *et al.,* 1998) แมนแนนจากพืชนั้นสามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1.1 Heterogeneous backbone

เป็นกลุ่มของแมนแนนที่โครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิดคือกลูโคส และแมนโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 เรียกว่า กลูโคแมนแนน (glucomannan) เช่น แมนแนนในหัวบุก (konjac glucomannan) (Behr, 2003) โดยน้ำตาลกลูโคสในโครงสร้างหลักของกลูโคแมนแนนนั้นมีการเรียงตัวอย่างกระจัดกระจาย และอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส: กลูโคสในโครงสร้างหลักอยู่ในช่วง 4:1 จนถึง 1:1 (Meier *et al.*, 1982) ซึ่งแมนแนนจากหัวบุกนั้นจะมีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส: กลูโคส เป็น 16:1 และมีอันดับของการเกิดโพลิเมอร์ (Degree of polymerization: DP) มากกว่า 6,000

1.1.2 Homogeneous backbone

เป็นกลุ่มของแมนแนนที่โครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเพียงชนิดเดียวเชื่อมกันต่อด้วยพันธะเบต้า-1,4 และส่วนของกิ่งแขนงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6 ระหว่างน้ำตาลกาแลคโตสกับน้ำตาลแมนโนส เรียกแมนแนนกลุ่มนี้ว่ากาแลคโตแมนแนน (Ethier *et al.*,1998) ซึ่งพบมากในพืช เช่น เอนโดสเปิร์มของพืชตระกูลถั่ว กากเมล็ดกาแฟ เนื้อในของเมล็ดปาล์ม และกากมะพร้าวในส่วนของ Kernels เป็นต้น ตัวอย่างของกาแลคโตแมนแนนที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ กาแลคโตแมนแนนใน Locust bean gum (LBG) จากเมล็ดของ *Ceratonia siliqua* และ Guar gum จากเมล็ดของ *Cyanaposis tetragonolobus* ซึ่งกาแลคโตแมนแนนในพืชแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันที่ตำแหน่งการเชื่อมด้วยพันธะแอลฟา-1,6 ในสายกิ่งแขนงระหว่างน้ำตาล

กาแลคโตสกับน้ำตาลแมนโนส โดยกาแลคโตแมนแนนใน LBG มีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส: กาแลคโตส ประมาณ 5:1 มีน้ำหนักโมเลกุล 310,000 ดาลตัน และจะเกิดพันธะแอลฟ่า-1,6 ระหว่างน้ำตาลแมนโนสประมาณ 3-4 โมเลกุล ขณะที่กาแลคโตแมนแนนใน Guar gum มีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส: กาแลคโตส ประมาณ 2:1 มีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 ดาลตัน และจะเกิดพันธะแอลฟ่า-1,6 ระหว่างน้ำตาลแมนโนสประมาณ 1-2 โมเลกุล ดังภาพที่ 1

กากมะพร้าวนั้นประกอบด้วยแมนแนน กาแลคโตแมนแนน และเซลลูโลสในอัตราส่วน 26, 61 และ 13% ตามลำดับ (Balasubramaniam, 1976) ซึ่งคิดเป็น 25-30% โดยน้ำหนักสำหรับส่วนของแมนแนน และกาแลคโตแมนแนน (Sundu and Dingle, 2006) การที่โครงสร้างของกากมะพร้าวนั้นประกอบด้วยส่วนของโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง จึงทำให้กาแลคโตแมนแนนในกากมะพร้าวนั้นมีความแข็ง เรียงตัวกันเป็นผลึก (crystalline) และมีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกาแลคโตสเท่ากับ 14:1 ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนจากแหล่งอื่นๆ เช่น Guar gum ซึ่งมีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกาแลคโตสเป็น 2:1 ทำให้กากมะพร้าวละลายน้ำได้น้อยและย่อยสลายยาก (Sundu and Dingle, 2006) โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนที่เป็นองค์ประกอบในกากมะพร้าวแสดงดังภาพที่ 2

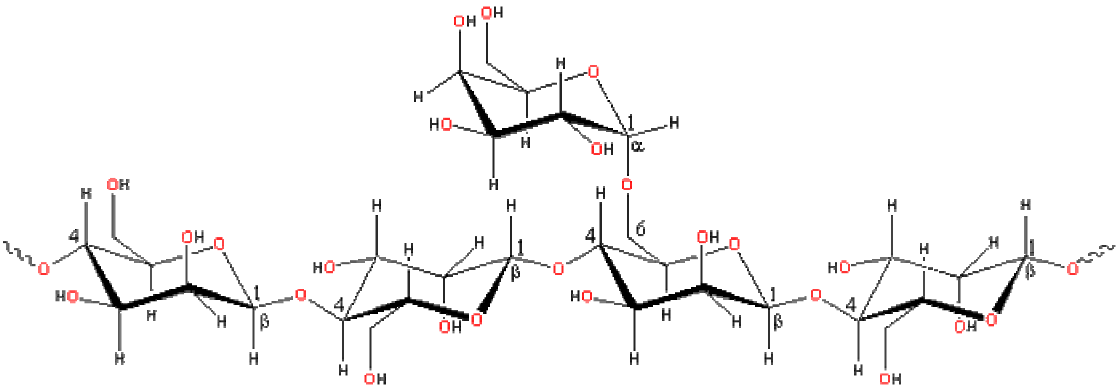
2. เอนไซม์ย่อยสลายแมนแนน (Mannan degrading enzyme)

การย่อยสลายสารประกอบแมนแนนในลักษณะสมบูรณ์ (Complete hydrolysis) จะต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายชนิดต่าง ๆ ดังนี้

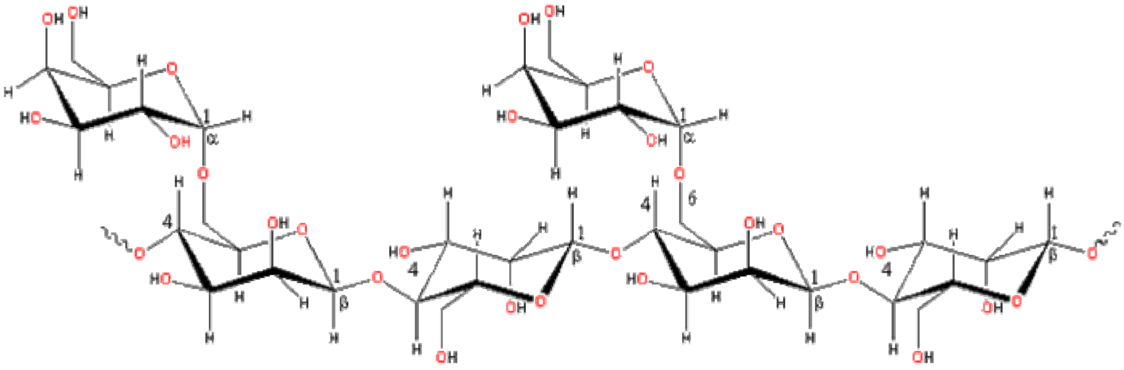
2.1 เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส (Endo-1,4-beta-D-mannanase; EC 3.2.1.78)

2.1.1 แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสสามารถผลิตได้จากหลายกลุ่มสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรียทั้งชนิดที่ต้องการ และไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic and anaerobic bacteria) เชื้อรา (Fungi) ยูคาริโอตชั้นสูง (Higher eukaryote) เช่นโปรโตซัว แมลง หอยทาก รวมทั้งเมล็ดพืชขณะที่เกิดกระบวนการงอก (Germinating plant seeds) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2



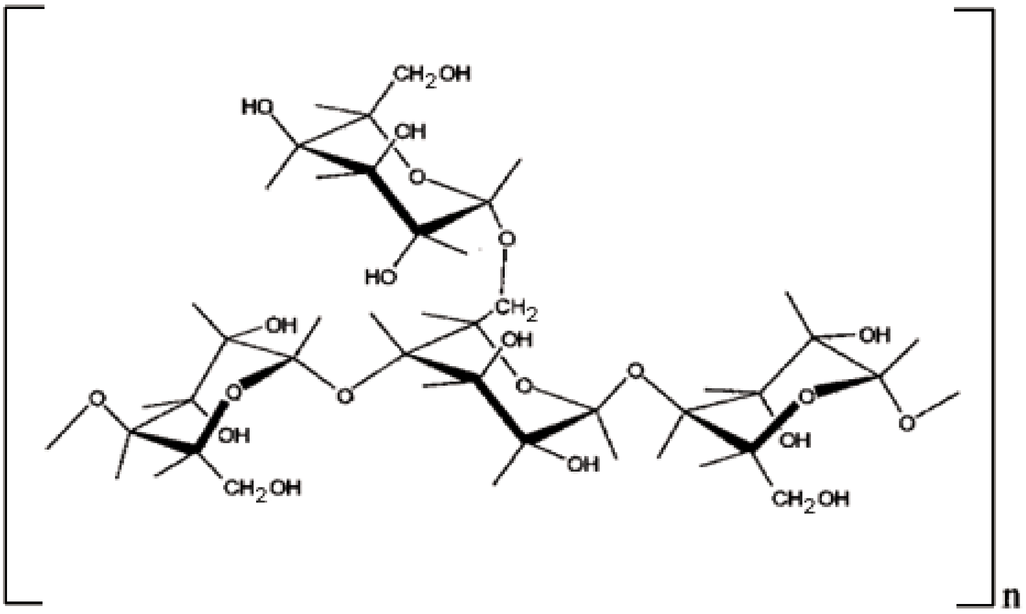
Locust bean gum



Guar gum

ภาพที่ 1 โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนใน Locust bean gum และ Guar gum

ที่มา: Chaplin (2005)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนในกากมะพร้าว
ที่มา: Merce *et al.,* (2001)

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
Acinetobacter sp. ST1-1	Titapoka, 2007
Bacillus subtilis	Ratto and Poutanen, 1988
Bacillus sp. AM-001	Akino *et al*., 1989
Bacillus sp.	Ooi and Kikuchi, 1995
Bacillus subtilis NM-39	Mendoza *et al*., 1995
Bacillus sp. KK01	Hossain *et al.,* 1996
Bacillus subtilis KU-1	Zakaria *et al*., 1998
Bacillus stearothermophilus	Talbot *et al.,* 1990
Bacillus licheniformis	Feng *et al*., 2003
Bacillus amyloliqefaciens NT 6.3	Phothichito, 2006
Bacillus circulans NT 6.7	Phothichito, 2006
Vibrio sp. MA-128	Araki *et al.,* 1992
Cellulomonas fimi	Stoll *et al.,* 1999
Caldocellum saccharolyticum	Bicho *et al.,* 1991
	Gibbs *et al.,* 1992
Enterococcus casseliflavus	Oda *et al.,* 1993
Krebsiella oxytoca CW2-3	Titapoka, 2007
Pseudomonas cellulosa	Hogg *et al.,* 2001
Pseudomonas sp.	Yamaura *et al.,* 1990
Streptomyces sp.	Takahashi *et al.,* 1984
Streptomyces ipomoea	Monitel *et al.,* 1999
Streptomyces lividans 66	Arcand *et al.,* 1993
Thermomonospora fusca	Hilge *et al.,* 1998
Thermotoga neapolitana 5068	McCutchen *et al.,* 1996
	Duffaud *et al.,* 1997
Thermotoga maritima	Brown *et al.,* 1993
Polyporus versicolor	Johnson and Ross, 1990

ตารางที่ 2 เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า- แมนนาเนส

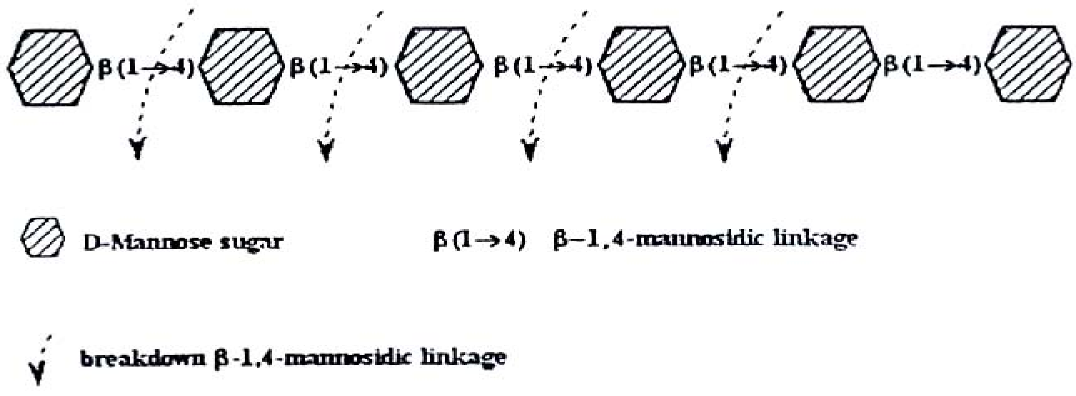
จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
Aspergillus niger	Ademark *et al.,* 1998
	Lin and Chen, 2003
Aspergillus oryzae	Regalado *et al.,* 2002
Aspergillus aculeatus	Setati *et al.,* 2001
Penicillium hirsutum	Bradner *et al.,* 1999
Penicillium purpurogenum	Park *et al.,* 1987
Penicillium brasilianum IPT 20888	Jorgensen *et al.,* 2003
Rhodothermusmarianus	Politiz *et al.,* 2000
Sclerotium rolfsii	Gubitz *et al.,* 1996
	Sachslehner *et al.,* 1998
	Puchart *et al.,* 1999
	Sachslehner and Haltrich, 1999
	Sachslehner *et al.,* 2000
	Singh *et al.,* 2000
	Ferreira and Filho, 2004
Trichoderma harzianum T4	Stalbrand *et al.,* 1993
Trichoderma reesei	Stalbrand *et al.,* 1995
	Harjunpaa *et al.,* 1997
	Tenkenso *et al.,* 1997
	Buchart *et al.,* 1993
	Juhasz *et al.,* 2005
Thermomyces lanuginosus	Hagglund *et al.,* 2003

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้นั้นสามารถแยกได้จากหลายแหล่งด้วยกัน จากการทดลองของ Hossain *et al.,* (1996) และ Abe *et al.,* (1994) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากดินโดยใช้กากมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสที่ขับออกสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ได้นั้นส่วนใหญ่จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* ในปี 1998 Kataowa และ Tokiwa ได้คัดแยกแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (anaerobic bacteria) จากดิน และตะกอน (sludges) พบเชื้อ *Clostridium tertianum* KT-5A ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่สุด โดยปริมาณของเอนไซม์แมนนาเนสจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการเหนี่ยวนำโดยใช้ กาแลคโตแมนแนน Guar gum, beef extract และ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ

Montiel *et al.,* (2002) ได้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้จำนวน 50 สายพันธุ์ จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ระหว่างการเจริญทั้งในอาหารเหลว และอาหารวุ้นแข็งที่มี LBG เป็นส่วนประกอบ พบว่าเชื้อ *Steptomyces scabies* CECT 3340 และ *Steptomyces ipomoea* CECT 3341 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 294.3 และ 242.9 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการฟอกสีกระดาษคราฟได้

2.1.2 กลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4 ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนสในโครงสร้างหลักของแมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และ กาแลคโตกลูโคแมนแนน (Stoll *et al.,* 1999) ในลักษณะแบบสุ่มโดยจะย่อยสลายจากบริเวณด้านในโมเลกุล (Cann *et al.,* 1999) ดังภาพที่ 3 และผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย คือ น้ำตาลแมนโนไตรโอส (mannotriose) และ แมนโนไบโอส (mannobiose) (Xu *et al.,* 2002)



ภาพที่ 3 กลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส
ที่มา: McCleary (1988)

2.1.3 ลักษณะของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

มีการศึกษาเอนไซม์ในกลุ่มนี้กันอย่างกว้างขวางจากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งในกลุ่ม เชื้อรา และแบคทีเรีย ซึ่งในการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสนั้น พบสารหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นสารเหนี่ยวนำให้มีปริมาณการผลิตเอนไซม์ที่ดีขึ้นได้ เช่น Gubitz *et al*., (1996) พบว่า amorphophallus Konjac glucomannan สามารถเหนี่ยวนำให้ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (Plant pathogen) ผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส ชนิดขับออกสู่นอกเซลล์ได้ ขณะที่ Lin และ Chen (2003) พบว่า กากมะพร้าวที่ปราศจากไขมัน (defatted copra meal) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสของเชื้อ *Aspergillus niger* NCH-189 ได้

ลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสนั้นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ โดยค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 2.9-7.5 (Hossain *et al.,*1996; Kremnicky *et al.,*1996; Oda *et al.,*1993 และ Araujo and Ward, 1990) ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จะอยู่ในช่วง 40 -74 องศาเซลเซียส (Zhang *et al.,* 2000; Zakaria *et al.,* 1998; Tamamura *et al.,* 1995 และ Mendoza *et al.,* 1994)

เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสบริสุทธิ์จากหลาย ๆ แหล่งนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลและค่า isoelectric point (pI) ที่แตกต่างกัน ซึ่งอยู่ในช่วง 40-59 กิโลดาลตัน และ 3.5-5.9 ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Gubitz *et al.,* (1996) พบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสบริสุทธิ์จาก *Sclerotium rolfsii* มีน้ำหนักโมเลกุล 61.2 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 3.5 และค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 2.9 และ 74 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Akino *et al.,* (1989) ได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส 3 ชนิดจาก alkalophilic *Bacillus* sp. AM-001 พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ M-I, M-II และ M-III ที่บริสุทธิ์มีค่าเป็น 58, 59 และ 42 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 5.9, 5.7 และ 5.1 ตามลำดับ ค่าคงที่ของมิเคลิส (Michaelis constant; K_m) ของเอนไซม์ M-I โดยใช้ กากมะพร้าว LBG และ Konjac glucomannan เป็นสับสเตรต มีค่าเป็น 2.0, 3.8 และ 7.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเร็วสูงสุดในการทำปฏิกิริยา (V_{max}) เป็น 730, 1470 และ 1880 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Mendoza *et al.,* (1995) ได้ศึกษาลักษณะของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Bacillus subtilis* NM-39 ที่คัดแยกจากดิน พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 4.8 และ ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 5.0 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Tamamura *et al.,* (1995) ได้รายงานผลการศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อ *Vibrio* sp. MA-138 ว่าเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุล 49 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 3.8 และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่ค่า pH 6.5 และ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Hossain *et al.,* (1996) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. KK01 ที่แยกได้จากดิน โดยใช้กากมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง หลังการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่ศึกษามี 4 ไอโซเมอร์ดังนี้ F1, F2, F3 และ F4 โดยทุก ๆ ไอโซเมอร์มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่ pH 7.1 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลซียส นอกจากนี้เมื่อศึกษาถึงปฏิกิริยาการย่อยสลายแมนแนน พบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ไอโซเมอร์นั้นเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแมนแนนจากกากมะพร้าวคิดเป็นสัดส่วน 23-31% ขณะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย LBG คิดเป็นสัดส่วน 19-22 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็น mannobiose, mannotriose และ mannotetraose

Zakaria *et al.,* (1998) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus subtilis* KU-1 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 39 กิโลดาลตัน มีค่า pI เป็น 4.5 ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 7 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่ค่า pH 4.5-9.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และโลหะในกลุ่ม Hg^{2+}, Ag^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} และ Cr^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้

Ma *et al.,* (2004) ศึกษาลักษณะของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. N16-5 ที่แยกได้จากตะกอนทะเลสาปในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 55 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 4.3 มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 9.5 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์สามารถย่อยสลายกาแลคโตแมนแนนและกลูโคแมนแนนได้ผลิตภัณฑ์เป็นโมโนแซคคาไรด์ และสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์

Jiang *et al.,* (2006) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus subtilis* WY 34 ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสสูง 1105 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ konjac glucomannan เป็นแหล่งคาร์บอน หลังการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 39.6 กิโลดาลตัน มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 6.0 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวที่ pH 5.5-10.1 และค่า K_m เป็น 7.6, 10.5 และ 27.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ LBG, Guar gum และ Konjac glucomannan เป็นสับสเตรต ตามลำดับ

Phothichito (2006) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากดินในจังหวัดนครปฐม พบแบคทีเรีย 19 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสได้ โดยแบคทีเรีย *Bacillus circulans* NT 6.7 มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.306 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ LBG เป็นสับสเตรต ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 6.0 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และสารแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายแมนแนนด้วยเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสยังมีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคบางชนิด เช่น *Salmonella serovar Eteritidis* S003 และ *E. coli* E010 ได้

นฤมล (2549) ศึกษาลักษณะของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 พบว่าค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 6.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่ pH 6-8 แต่มีความคงตัวสูงสุดที่ค่า pH เท่ากับ 8 โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือคิดเป็น 59.51%

Titapoka (2007) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากดิน และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ประกอบด้วยกากมะพร้าว จากหลาย ๆ พื้นที่ในประเทศไทย ซึ่งพบแบคทีเรียจำนวน 48 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสได้ แต่สายพันธุ์ *Krebsialla oxytoca* CW2-3 และ *Acinetobacter* sp. ST1-1 เป็นเพียง 2 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสสูงสุด มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 7.0 และ 6.0 เอนไซม์มีความคงตัวที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อค่า pH อยู่ในช่วง 3-6 และ 3-10 สำหรับเอนไซม์จาก *K. oxytoca* CW2-3 และ *Acinetobacter* sp. ST1-1 ตามลำดับ

นอกจากแบคทีเรียแล้ว เชื้อราจัดเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสกันอย่างกว้างขวาง โดย Arisan-Atac *et al*., (1993) ได้ศึกษาเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Trichoderma reesei* C-30 เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วพบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 46 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 5.2 มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 5.0 เอนไซม์มีความคงตัวในช่วง pH ที่กว้าง ตั้งแต่ 2.5 – 7.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 75 องศาเซลเซียส

Stalbrand (1993) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส 2 ชนิดจากรา *Trichoderma reesei* ที่ทำให้บริสุทธ์โดยวิธี ion-exchange chromatography, affinity chromatography และ chromatofocusing พบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสทั้ง 2 ชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 51 และ 53 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 4.6 และ 5.4 ตามลำดับ

Ademark *et al.,* (1998) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากรา *Aspergillus niger* ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต anion-exchange และ gel filtration chromatography พบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสบริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 40 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 3.7

Puchart *et al.,* (1999) ได้ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส เบต้า-แมนนาเนส อะราบิเนส และเพคติเนส จากรา *Thermomyces lanuginosus* จำนวน 17 สายพันธุ์ ซึ่งพบจุลินทรีย์จำนวน 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสได้ คือ *T. lanuginosus* IMI 158749, *T. lanuginosus* CBS 218.34 และ *T. lanuginosus* IMI 131010 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เป็น 21.6, 14.8 และ 3.8 ยูนิตต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

Puchart *et al.,* (2004) ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากเชื้อราทนร้อน *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (*Thermomyces lanuginosus* IMI 158749) พบเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จำนวน 2 ชนิด คือ MAN I (major form) และ MAN II (minor form) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 60 และ 63 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ค่า pI อยู่ในช่วง 4.9 – 5.2 สำหรับ MAN I และ 4.75-4.9 สำหรับ MAN II โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดแสดงกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ค่า pH เท่ากับ 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีความคงตัวเมื่อ pH อยู่ในช่วง 4.5 – 8.5 รวมทั้งมีรูปแบบการย่อยสลาย (hydrolysis pattern) สับสเตรตชนิดต่าง ๆ ที่คล้ายคลึงกัน

นอกจากแบคทีเรีย และเชื้อรา ยังมีรายงานการศึกษาเอนไซม์เบต้าแมนนาเนส จากยูคาริโอตชั้นสูงบางชนิด เช่นจากงานวิจัยของ Xu *et al*., (2002) ซึ่งได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากระบบย่อยอาหารของหอยแมลงภู่ชนิดหนึ่ง (Blue mussel) พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์จากหอยแมลงภู่ มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 5.2 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่ pH 4-9 และ ค่า pI ประมาณ 7.8 โดยเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลาย LBG และแมนแนนจากเมล็ดปาล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 3 ตารางสรุปลักษณะของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากแหล่งต่างๆ

Organisms	Optimum Temperature (Celcious degree)	Optimum pH	Molecular weight (kDa)	Isoeletric point (pI)	K_m (mg/ml)			
					LBG	Guar gum	Konjac	Copra meal
Sclerotium rolfsii	74	2.9	61.2	3.5	-	-	-	-
Bacillus sp. AM-001								
M-I	-	-	58	5.9	3.8	-	7.7	2.0
M-II	-	-	59	5.7	-	-	-	-
M-III	-	-	42	5.1	-	-	-	-
Bacillus subtilis NM-39	55	5.0	38	4.8	-	-	-	-
Vibrio sp. MA-138	40	6.5	49	3.8	-	-	-	-
Bacillus sp.KK01	50-60	7.1	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis KU-1	50-55	7.0	39	4.5	-	-	-	-
Bacillus sp. N16-5	70	9.5	55	4.3	-	-	-	-
Bacillus subtilis WY 34	65	6.0	39.6	-	7.6	10.5	27.4	-
Bacillus circulans NT 6.7	45	6.0	-	-	-	-	-	-
Bacillus amyloliquefaciens NT 6.3	50	6.0	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Organisms	Optimum temperature (Celcious degree)	Optimum pH	Molecular weight (kDa)	Isoeletric point (pI)	K_m (mg/ml)			
					LBG	Guar gum	Konjac	Copra meal
Krebsialla oxytoca CW2-3	50	4.0	165	3.5	1.056	-	1.038	-
Acinetobacter sp. ST1-1	40	6.0	-	-	-	-	-	-
Trichoderma reesei C-30	75	5.0	46	5.2	-	-	-	-
Trichoderma reesei								
I	-	-	51	4.6	-	-	-	-
II	-	-	53	5.4	-	-	-	-
Aspergillus niger	-	-	40	3.7	-	-	-	-
Aspergillus fumigatus IMI 385708								
MANI	60	4.5	60	4.90-5.20	-	-	-	-
MANII	60	4.5	63	4.75-4.90	-	-	-	-
Blue mussel	50-55	5.2	-	7.8	-	-	-	-

2.2 เอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดส (Beta-mannosidase; EC 3.2.1.25)

2.2.1 แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดส

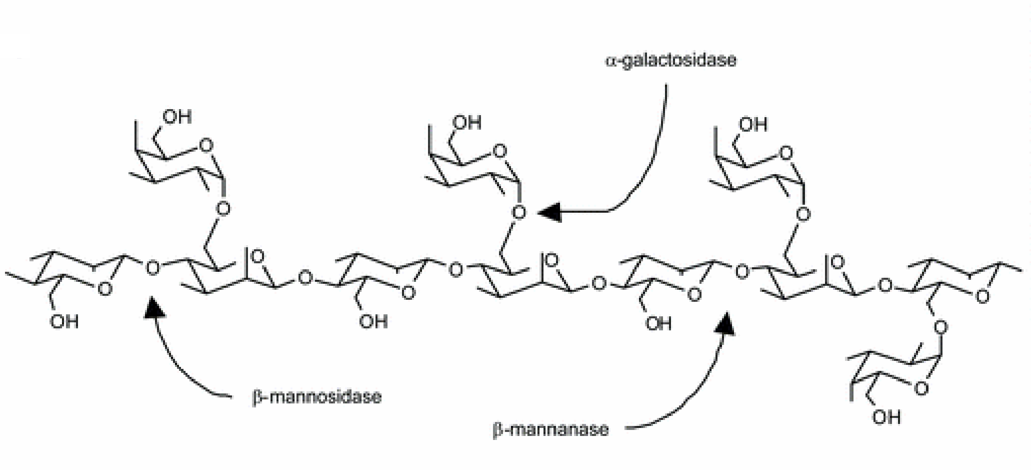
เอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษากันมากในกลุ่มของพืช เนื้อเยื่อสัตว์ และจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา (McCleary, 1983) แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดส

จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
<u>เชื้อแบคทีเรีย</u>	
Bacillus sp.	Akino *et al.*, 1998
Cellulomonas fimi	Stoll *et al.*, 1999
Enterococcus casseliflavus	Oda *et al.*, 1993
Thermotoga neapolitana 5068	Duffaud *et al.*, 1997
Thermotoga maritima	Brown *et al.*, 1993
Streptomyces sp. E2/22	Wongkattiya, 1998
Pyrococcus fluriosus	Bauer *et al.*, 1996
<u>เชื้อรา</u>	
Aspergillus sp.	Galkwad *et al.*, 1995
Aspergillus aculeatus	Takada *et al.*, 1999
Aspergillus awamori	Neustroev *et al.*, 1991
Aspergillus niger	Ademark *et al.,* 2001
Thermyces lanuginosus	Singh *et al.,* 2000
Sclerotium rolfsii	Gubitz *et al.,* 1996
<u>สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม</u>	
คน	Alkhayat *et al.,* 1998

2.2.2 กลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดส

เอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4 ที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลแมนโนส โดยจะตัดจากบริเวณปลายนอกสุดของโมเลกุลเข้าไป จากปลายด้านที่ไม่ใช่รีดิวซิ่ง (Non- reducing end) ของสับสเตรตจำพวกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ และไกลโคเปปไทด์ที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบ (manno-containing glycopeptides) ดังภาพที่ 4 โดยจะเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า เอกโซไกลโคสิเดส (exoglycosidase) และสับสเตรตส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์ เช่นแมนโนไตรโอส (mannotriose) และ แมนโนไบโอส (mannobiose) ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายคือน้ำตาลแมนโนสโมเลกุลเดี่ยว (Ademark *et al.,* 2001)



ภาพที่ 4 กลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดส

ที่มา: Duffaud *et al.,* (1997)

2.2.3 ลักษณะของเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดส

Akino *et al.,* (1998) ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสจาก *Bacillus* sp. AM-001 (alkalophilic strain) พบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสบริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 94 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 5.5 ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 6.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โลหะบางชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เช่น Ag^{2+} Cd^{2+} Cu^{2+} และ Zn^{2+} แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้โดยน้ำตาลแมนโนส และแมนนิตอล

Gubitz *et al.,* (1996) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสจาก *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในพืช พบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสบริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 57.5 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 4.5

Singh *et al.,* (2000) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* SSBP พบว่า LBG สามารถกระตุ้นให้เชื้อชนิดนี้ผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนโนสิเดสได้ และเอนไซม์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 80 องศาเซลเซียส

2.3 เอนไซม์แอลฟ่า- กาแลคโตสิเดส (Alpha-galactosidase; EC 3.2.1.22)

2.3.1 แหล่งของเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดส

เอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดส เป็นเอนไซม์ที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งพบทั้งชนิดที่ผลิตและเก็บอยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) และชนิดที่ผลิตแล้วขับออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme)

Pederson และ Goodman (1980) พบว่า *Bacillus stearothermophilus* AT-7 ผลิตเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสชนิดที่ผลิต และเก็บอยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) นอกจากจุลินทรีย์แล้ว เอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสยังสามารถพบใน สัตว์ และส่วนของเมล็ดพืชอีกด้วย แหล่งของเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสแสดงไว้ดังตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดส

จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
Bacillus stearothermophilus.	Talbot and Sygusch, 1990
Bacillus stearothermophilus NUB 3621	Fridjansson *et al.*, 1999
Bifidobacterium adolescentis	Van den Broek *et al.*, 1999
Pseudomonas fluorescen subsp.cellulosa	Halstad *et al.*, 2000
	Hazlewood *et al*,1998
	Braithwaite *et al.,*1995
	Rixon *et al.,*1992
Streptococcus mutans	Aduse-Opoku *et al.*, 1991
Thermotoga neapolitana 5068	Duffaud *et al.,* 1997
	McCutchen *et al.,* 1996
Thermotoga neapolitana	Vielle *et al.,*1995
	Dakhova *et al.,*1993
Thermus brockianus ITI360	Fridjansson *et al.*, 1999

ตารางที่ 6 เชื้อราและยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟ่า- กาแลคโตสิเดส

จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
<u>เชื้อรา</u>	
Aspergillus ficuum	Zapater *et al.*, 1990
Aspergillus Niger	Manzanres *et al.*, 1998
	Ademark *et al.*, 2001
Aspergillus Nidulans	Rios *et al.*, 1998
Aspergillus tamarii	Civas *et al.*, 1984
Penicillium purpurogenum	Shi buya *et al.*, 1998
Phanerocheate chrysosporium	Hart *et al.*, 2000
Trichoderma reesei	Golubev *et al.*, 1993
	Stalbrand *et al.*, 1993
	Margolles-Clark *et al.*, 1996
Trichoderma reesei RUT C-30	Zeilinger *et al.*, 1993
Sporoticum cellulophinum	Araujo and ward, 1991
<u>ยีสต์</u>	
Candida guilliermondii H404	Hashimoto *et al.*, 1993

2.3.2 กลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดส

เอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะแอลฟ่า-1, 6 ของน้ำตาลกาแลคโตส โดยจะย่อยสลายจากบริเวณปลายสุดของกาแลคโตแมนแนน หรือกาแลคโตกลูโคแมนแนน และโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ เช่น เมลิไบโอส (Melibiose) ราฟฟิโนส (Raffinose) และสตาชิโอส (stachyose) (McCleary, 1988) รวมทั้งสับสเตรตสังเคราะห์บางชนิด เช่น p-nitrophynyl-alpha-D-galactopyranoside (PNGP) และ methyl-alpha-D-galactopyranoside ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นน้ำตาลกาแลคโตส (Ademark *et al*., 2001) ดังภาพที่ 4

2.3.3 ลักษณะของเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดส

McCutchen *et al.,* (1996) พบว่าเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *Thermotoga neapolitana* 5068 (TN5068) มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 7.5 และ 100-105 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Luonteri *et al.,* (1998) ศึกษาเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสจาก *Pennicillium simplicissimum* พบว่า LBG และไม้เนื้ออ่อนบางชนิด เช่นรำข้าว เปลือกของเมล็ดข้าวโอ๊ตสามารถกระตุ้นให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสสูงขึ้นได้ เมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์มาศึกษาพบว่าเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสที่ผลิตโดยเชื้อราชนิดนี้มี 3 ไอโซเมอร์ได้แก่ AGLI AGLII และ AGIII ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 61, 84 และ 61 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 5.2, 4.4 และ 7.0 ตามลำดับ และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ AGLI และ AGLII เป็น 3.0 และ 4.5 และ AGIII เป็น 4.0-5.0 และ Halstead *et al*., (2000) พบว่าเอนไซม์แอลฟ่า-กาแลคโตสิเดสจาก *Pseudomonas fluorescens* subsp *cellulosa* มีน้ำหนักโมเลกุล 49.5 กิโลดาลตัน

3. การโคลนและการแสดงออกของยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp.

การศึกษาเกี่ยวกับการโคลนยีนแมนนาเนส จาก *Bacillus* sp. เพื่อพัฒนา และปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนยีนนั้นคือ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เจริญเติบโตเร็ว รวมทั้งมีการศึกษาข้อมูลต่างๆทางพันธุกรรมค่อนข้างแพร่หลาย โดยพลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนเข้าสู่ *E. coli* นั้นมีหลายชนิดด้วยกัน เช่นพลาสมิดในกลุ่มของ pBR322, pBluscript, pET, pUC18 และ pUC19 เป็นต้น

Akino *et al.,* (1989) ได้สร้างพลาสมิดลูกผสม (hybrid plasmid) ที่ประกอบด้วย DNA insert ขนาด 4 กิโลเบส จาก *Bacillus* AM-001 แทรกเข้าสู่ตำแหน่งจดจำของ *Hind* III ในบริเวณ lac Z ในพลาสมิด pUC 19 โดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน หลังจากทำบริสุทธิ์เอนไซม์แล้ว พบว่าประกอบด้วยเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส 2 ชนิด คือเบต้า-แมนนาเนส A และ B ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 58 และ 43 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดยยีนเบต้า-แมนนาเนส A มีขนาด 1,539 คู่เบส และมี COOH-terminal เป็น arginine residue ในขณะที่ยีนเบต้า-แมนนาเนส B มีขนาด 1,095 คู่เบส ซึ่งเป็น valine residue และเมื่อทดสอบผลการขาดหายไปของเบสบริเวณปลาย 3’ พบว่า เซลล์ลูกผสมที่มียีนขนาดเล็กกว่ายีนเบต้า-แมนนาเนส B จะไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส แสดงให้เห็นว่าบริเวณ COOH-terminal ของยีนเบต้า-แมนนาเนส B นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส

Luthi *et al.,* (1991) ได้โคลน และศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้า-แมนนาเนส จากแบคทีเรียทนร้อน *Caldocellum saccharolyticum* ใน *E. coli* โดยใช้พลาสมิด pUC 18 พบว่าเอนไซม์ที่ได้ทำงานได้ดีที่ pH 6 อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และยังคงมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส รวมทั้งมีแนวโน้มที่สูงขึ้นในสภาวะมีสับสตเตรต โดยกิจกรรมเอนไซม์จะยังคงสูงถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แม้ว่านำไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้สภาวะที่มีสับเสตรต แต่จะไม่ปรากฏกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 90 หรือ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในสภาวะไม่มีสับเสตรต และเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมดังกล่าวมีกิจกรรมสูงสุดต่อ LBG รองลงมาคือ Guar gum (*Pinus radiate*) glucomannan และ Konjac glucomannan ตามลำดับ

Mendoza (1995) ได้ศึกษาการโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เบต้า-แมนแนนเนสจาก *Bacillus subtilis* NM-39 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยใช้พลาสมิด pUC 18 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับของกรดอะมิโนสายสั้น ๆ ตั้งแต่ Methionine ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นจนถึง Alanine ในตำแหน่งที่ 24 นั้นเป็น Signal sequence สำหรับโปรตีนเป้าหมายซึ่งจะถูกแยกออกไปในระหว่างกระบวนการขนส่งเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส และเอนไซม์ที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุล 37.9 กิโลดาลตัน ซึ่งมีความใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ต้นแบบ

Ethier *et al.,* (1998) ได้โคลน และศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสทนร้อนจาก *B. stearothermophilus* ใน *E. coli* โดยใช้พลาสมิด Hexa-His-Tag (pH6EX3) ซึ่งมีการลงรหัสสำหรับกรดอะมิโนฮิสทิดีน (Histidine) บริเวณ N-terminal ทำให้ง่ายต่อกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ รวมทั้งการแสดงออกของยีนนั้นจะถูกควบคุมโดย strong *tac* promoter เอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมที่ผลิตได้สามารถทนร้อน และมีค่า kinetic parameter ต่าง ๆ เช่น K_m และ V_{max} ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ต้นแบบ แม้จะมีความแตกต่างของระบบการแสดงออก การแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จากเซลล์ลูกผสมนี้มีปริมาณการผลิตไม่ต่ำกว่า 10 % ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด จากระดับการแสดงออกที่สูง และทนต่อความร้อนทำให้สามารถนำเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการฟอกเยื่อกระดาษแทนการใช้สารเคมีได้

Yoshida *et al.,* (1998) ได้โคลน วิเคราะห์ลำดับเบส และศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย guar gum (G-gene) จาก *B.circulans* K-1 โดยสังเคราะห์ยีนขนาด 2,048 คู่เบส ด้วยเทคนิค PCR walking และทำให้เกิด over-expression ใน *E.coli* JM109 จากนั้นโคลน G-gene เข้าสู่พลาสมิด pUC19 แล้วศึกษาลักษณะของเอนไซม์ ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 62 กิโลดาลตัน ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 6.9 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสมบัติต่างๆของเอนไซม์ เช่นค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ และความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์ยังมีความใกล้เคียงกับ *B.circulans* K-1 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ต้นแบบ

Khanongnuch *et al.,* (1998) ได้โคลนยีนเบต้า-แมนนาเนส และยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 5H โดยใช้ *E.coli* JM109 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พลาสมิด pBlue script II ks$^-$ เป็นพลาสมิดสำหรับการโคลน และพลาสมิด pUC18, pUC19 เป็นพลาสมิดสำหรับการแสดงออก ซึ่งผลการทดลองพบว่าบริเวณ open reading frame (ORF) ของยีนเบต้า-แมนนาเนส และเซลลูเลส นั้นมีขนาด 1,086 และ1,503 คู่เบส ซึ่งลงรหัส (Coding) สำหรับโปรตีนที่มีขนาดของโมเลกุล 40.8 และ 55.4 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และจาก primary structure ของยีนเบต้า-แมนนาเนสนั้นทำให้ทราบว่ายีนที่

ลงรหัสสำหรับโปรตีนดังกล่าวประกอบด้วย 362 กรดอะมิโน ซึ่งเป็น Mature protein 336 กรดอะมิโน และ Signal peptide 26 กรดอะมิโน

Maruyama *et al.,* (2000) ศึกษาการแสดงออกของยีน *aman6* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ Endo-1,6-alpha-D-mannanase จาก *B.circulans* ใน *E. coli* DH5α โดยใช้พลาสมิด pBluescript II ks+ เมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปทำบริสุทธิ์แล้วศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเอนไซม์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 61 กิโลดาล และสมบัติอื่น ๆ ทั้งลำดับกรดอะมิโนบริเวณ N-terminal ความจำเพาะต่อสับสเตรต กลไกการเกิดปฏิกิริยา (Mode of action) ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *B.circulan*s TN-31 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ต้นแบบมาก

Ma *et al.,* (2004) ได้โคลนยีน และศึกษาลักษณะของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Bacillus* sp. N16-5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนความเป็นด่างได้ดี โดยใช้ *E. coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และ พลาสมิด pUC19 เป็นพลาสมิดสำหรับการโคลน เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 55 กิโลดาลตัน มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 9.5 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สามารถย่อยสลายกาแลคโตแมนแนน และกลูโคแมนแนนได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโดยการทำ Southern hybridization พบว่ายีนเบต้า-แมนนาเนส (*manA*) นี้ประกอบด้วยบริเวณ ORF จำนวน 1,479 คู่เบส และ Signal peptide จำนวน 32 กรดอะมิโน และบริเวณ ORF ของยีน manA ดังกล่าวมีความเหมือน (similarity) กับกลุ่มของ Glycosyl hydrolase family 5

Akita *et al.,* (2004) ได้โคลนยีน และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้า-แมนนาเนส จาก alkaliphilic *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JAMB-602 (*amn*5A) โดยใช้พลาสมิด pUC18 เป็นพลาสมิดสำหรับการโคลนเข้าสู่ *E.coli* HB101 จากนั้นเพิ่มปริมาณยีน *amn*5A ที่ได้โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส นำยีนดังกล่าวมาเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pHSP64 ซึ่งเป็นพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีนใน *Bacillus subtilis* ISW1214 แล้วศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ ซึ่งพบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสบริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน และนำเอนไซม์ดังกล่าวมาศึกษาโครงร่างสามมิติด้วยวิธี X-ray diffraction ต่อไป

Hatada *et al.,* (2005) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนเบต้า-แมนนาเนสจาก alkaliphilic *Bacillus* sp. สายพันธุ์ JAMB-750 ใน *Bacillus subtilis* และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ลูกผสมที่ผลิตได้ เนื่องจากเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ดังกล่าวมีคุณสมบัติในการทำงานได้ดีที่ค่า pH ที่สูงมาก ซึ่งสูงที่สุดที่เคยมีรายงานจากเอนไซม์กลุ่มนี้ โดยได้โคลนยีนเบต้า-แมนนาเนสเข้าสู่ *Bacillus subtilis* ISW1214 ด้วยพลาสมิด pHY300PLK พบว่าเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสมนั้นมีสมบัติต่างๆใกล้เคียงกับเอนไซม์ต้นแบบ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น131 กิโลดาลตัน pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 10 รวมทั้งสามารถทนต่อสาร surfactant เช่น SDS ได้ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 2 % (w/v)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

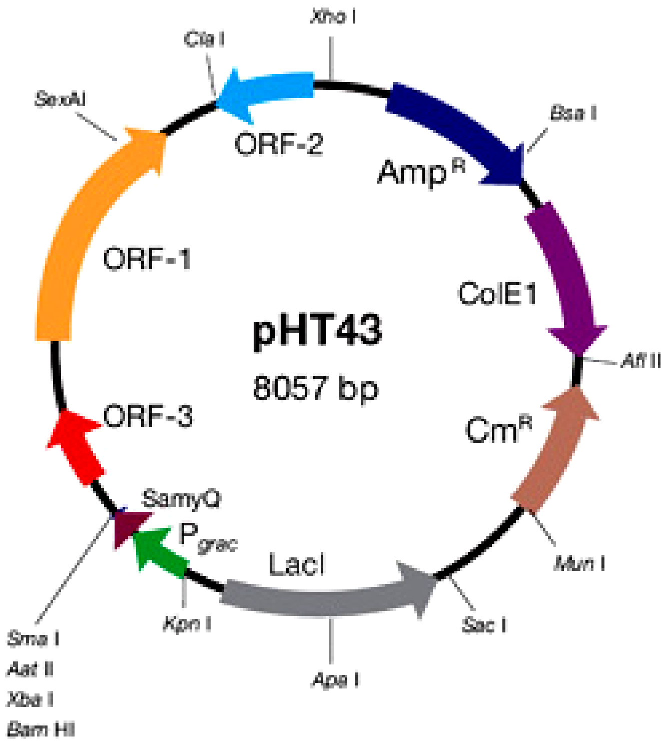
1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

1.1 แบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *Bacillus circulans* NT 6.7 สำหรับเป็นแหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส เก็บรักษาใน 50% กลีเซอรอลที่ปราศจากเชื้อ และเก็บในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.2 แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α สำหรับเป็นเซลล์เจ้าบ้านในการศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนเบต้า-แมนนาเนส

2. พลาสมิด

พลาสมิดที่นำมาใช้ในการโคลน และการแสดงออกของยีนเบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *Bacillus circulans* NT 6.7 เข้าสู่ *E. coli* DH5α คือพลามิด pHT43 (MoBiTec, ประเทศเยอรมัน) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ถูกพัฒนาขึ้นจาก *E. coli -B. subtilis* shuttle vector pMTLBS72 (Nguyen *et al.*, 2005) โดยพลาสมิด pHT43 นั้นมีขนาดประมาณ 8 กิโลเบส และประกอบด้วย strong promoter *gro*ESL operon ซึ่งเป็นยีนที่ลงรหัสสำหรับ heat shock protein *Gro*ES และ *Gro*EL จาก *B. subtilis* ที่เชื่อมต่อเข้ากับบริเวณ *lac* operator ทำให้สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกได้โดยใช้สาร IPTG, *gsi*BSD sequence ซึ่งเป็น strong ribosome binding site ที่ต่อเข้ากับบริเวณ coding region ของ signal peptide ของยีน *amy*Q ซึ่งเป็นยีนที่ลงรหัสสำหรับเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสจาก *B. amyloliquefaciens* จะทำให้มีระดับการหลั่งโปรตีนออกสู่นอกเซลล์สูงขึ้น (High-level secretion protein) นอกจากนี้ยังประกอบด้วย *Col*E1 ori (origin of replication จาก *Col*E1) ยีน Amp^R และ Cm^R ซึ่งเป็นยีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และ คลอแรมฟินิคอล สำหรับเป็นยีนเครื่องหมาย (Marker gene) ในการคัดเลือกเซลล์ลูกผสม แผนที่ของพลาสมิด pHT43 แสดงได้ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แผนที่ของพลาสมิด pHT43

ที่มา: Phan *et al*., (2005)

3. ไพรเมอร์ (primer)

ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนเบต้า-แมนนาเนสบนโครโมโซม และพลาสมิดลูกผสม แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนเบต้า-แมนนาเนสบนโครโมโซม และพลาสมิดลูกผสม

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนแมนนาเนสบนโครโมโซม (สุภา, 2550)	
BMF	5' CCN GTN AAY CCN AAY GCN CAR 3'
BMR	5' YTC NGC RAA NGC RAA NGG YTT 3'
ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนแมนนาเนสบนพลาสมิดลูกผสม (ขวัญคณิศร์, 2551)	
Fsq	5' TGT GAG CGG ATA ACA ATT CCC 3'
Rsq	5' AAG CCG ATA TTA GCC TCG TAT 3'

4. กากมะพร้าวที่ปราศจากไขมัน (Defatted copra meal)

เตรียมกากมะพร้าวที่ปราศจากไขมันโดยนำกากมะพร้าวไปตากแดด 1 วัน แล้วทำแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นำมาปั่นและบดด้วยเครื่อง Hammer mill (Janke & Kunkel IKA Labortechnik) ให้มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปสกัดไขมันออกโดยวิธี soxhlet จะได้กากมะพร้าวที่ปราศจากไขมัน สำหรับใช้เป็นสับสเตรตในการศึกษาสมบัติทางจลน์พลศาสตร์และความจำเพาะต่อสับสเตรต

วิธีการ

1. การผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

1.1 อาหารสำหรับผลิตเอนไซม์

อาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ ดัดแปลงมาจาก Abe *et al*., (1994) ประกอบด้วย 1% LBG, 3% poly peptone, 1.5% KH_2PO_4, 0.06% $MgSO_4.7H_2O$ และ 2.5% Corn steep liquor ปรับ pH ให้ได้ 6.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.2 การผลิตเอนไซม์

ถ่ายเชื้อ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 จำนวน 1 โคโลนีลงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนโดยใช้สาร IPTG นำไปบ่มภายใต้สภาวะให้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นถ่ายสารละลายเชื้อ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 เข้มข้น 1% ลงในอาหารผลิตเอนไซม์ แล้วนำไปบ่มที่ 50 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสจะพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยโดยใช้ LBG เป็นสับสเตรต โดยบ่มสารละลายเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใน 50 มิลลิโมลาร์ Potassium phosphate buffer pH 6.0 (0.5 มิลลิลิตร) ที่มี LBG เข้มข้น 1% ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้สาร DNS (Miller, 1959)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย LBG จนได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

3. การวิเคราะห์สมบัติทางจลน์พลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์

ศึกษาค่าคงที่ของ มิเคลิส (K_m) และ อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสต่อสับสเตรต 3 ชนิดคือ LBG, konjac glucomannan และ กากมะพร้าว โดยแปรค่าความเข้มข้นของสับสเตรตตั้งแต่ 0.2 – 1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทุก ๆ 5 นาทีตั้งแต่นาทีที่ 0 จนถึงนาทีที่ 30

คำนวณหาค่า K_m และอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา V_{max} จากกราฟของไลน์วีเวอร์-เบอร์ค (Line weaver-burk plot)

4. การวิเคราะห์ความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์

ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 1.2 ต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ดังนี้ LBG, Guar gum, Alpha-mannan (yeast), Ivory nut mannan, Konjac glucomannan, Xylan from oat spelt, Xylan from birch wood, Caboxymethylcellulose (CMC), Avicel และกากมะพร้าว โดยใช้สับสเตรตเข้มข้น 1 % (w/v) บ่มกับเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและวัดกิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการข้อ 2

5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Lowry *et al*., (1951) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารละลายมาตรฐาน

6. การโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แมนนาเนส จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7

6.1 สกัดโครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7

วิธีการสกัดโครโมโซมดัดแปลงจากวิธีของ Harwood และ Cutting (1990) เลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ในอาหาร LB (ภาคผนวก) 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บเซลล์ เทสารละลายส่วนบน (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีอีกครั้ง เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer 800 ไมโครลิตร เติม lysozyme 0.002 กรัม เพื่อทำให้เซลล์แตก นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เติม 20% sarkosyl ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสต่ออีก 5 นาที จากนั้นกำจัดโปรตีนโดยการเติมสารละลายฟีนอล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหงายหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนออกที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม (1:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากัน โดยการคว่ำหงายหลอดกลับไปมาอีก 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้ง ปิเปตสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อนออก กำจัดโปรตีนด้วยสารละลายฟีนอล และฟีนอลคลอโรฟอร์มดังขั้นตอนข้างต้นอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายใสส่วนบนที่ได้มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่า และ แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใสส่วนบนออก ล้างตะกอนโครโมโซมด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนโครโมโซมมาทำแห้งภายใต้สูญญากาศ จากนั้นละลายตะกอนโครโมโซมด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของโครโมโซมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ความบริสุทธิ์ของโครโมโซมนั้นจะพิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งควรมีค่ามากกว่า 1.8 โครโมโซมจึงจะมีความบริสุทธิ์สูง

ความเข้มข้นของโครโมโซมคำนวณได้จาก

ความเข้มข้นของโครโมโซม (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) = OD_{260} x 50 x ระดับการเจือจาง

6.2 การเตรียมพลาสมิด pHT 43

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pHT 43 ลงในอาหาร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บเซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาสกัดแยกพลาสมิด โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป QIAprep® spin Miniprep (QIAGEN)

6.3 การเตรียมธนาคารยีนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

6.3.1 การตัดโครโมโซมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตัดโครโมโซมแบบไม่สมบูรณ์ (Partial digestion) ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I ดัดแปลงตามวิธีการของ Brown (1991) โดยใช้โครโมโซมเริ่มต้น 1 ไมโครกรัม เอนไซม์ *Bsp*143I 1 ยูนิตปริมาตร 1 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์เฉพาะสำหรับทำปฏิกิริยา ปริมาตร 2 ไมโครลิตร โดยแปรผันเวลาในการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกสภาวะที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2– 6 กิโลเบสมากที่สุด ตรวจสอบผลการตัด โดยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

6.3.2 การสกัดแยกโครโมโซมออกจากเจล

แยกดีเอ็นเอจากข้อ 6.3.1 ออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Nuclospin® Extract II จากบริษัท Machercy-Nagal

6.3.3 การตัดพลาสมิด pHT 43 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ตัดพลาสมิดแบบสมบูรณ์ (Complete digestion) ตามวิธีการของ Sambrook *et al.,* (1989) โดยใช้พลาสมิดเริ่มต้น 1 ไมโครกรัม และเอนไซม์ 10 ยูนิต ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นตรวจสอบผลที่เกิดขึ้น

6.3.4 การเชื่อมโครโมโซมกับพลาสมิด

นำชิ้นส่วนโครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ที่มีขนาด 2-6 kb จากข้อ 6.3.1 มาผสมกับพลาสมิด pHT 43 ที่เตรียมได้จากข้อ 6.3.3 โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย พลาสมิด ปริมาตร 2 ไมโครลิตร โครโมโซม 5 ไมโครลิตร T_4 DNA ligase buffer 1.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ T_4 DNA ligase (Promega) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำ deionize ที่ปราศจากเชื้อ 4.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นตรวจสอบผลที่เกิดขึ้น

6.3.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5α โดยวิธี Heat shock (Sambrook *et al*., 1989)

6.3.5.1 การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์โดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์

เขี่ยเชื้อ *E. coli* DH5α 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าจนถึงระยะ log phase โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.3 -0.4 แช่ขวดเชื้อในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที เทเชื้อที่เตรียมไว้ลงในหลอดเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 30 มิลลิโมลาร์ที่เย็นปริมาตร 0.5 เท่า เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แยกคอมพีเทนท์เซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าอีกครั้งเขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งข้ามคืน แบ่งคอมพีเทนท์เซลล์ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 210 ไมโครลิตร เติมกลีเซอรอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 % ของปริมาตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส

6.3.5.2 การเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E.coli* DH5α

เคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านตามขั้นตอนของ Sambrook *et al.,* (1989) โดยนำพลาสมิดลูกผสม และคอมพีเทนท์เซลล์ 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวางบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาทีทันที นำไปวางบนน้ำแข็ง 2 นาที เติมสารละลาย SOC ลงไป 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที นำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.4 การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม (Recombinant cells)

นำโคโลนีของเซลล์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถ่ายลงบนอาหาร LB ที่มี LBG และปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ปรากฏวงใส (Clear zone) รอบ ๆ โคโลนี ภายหลังการย้อมสีด้วยสารละลาย Cango red เข้มข้น 0.1 % (w/v)

6.5 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ลูกผสม (recombinant cell)

6.5.1 การตรวจสอบขนาดของ DNA insert โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำตามวิธีของ Sambrook *et al*., (1989) นำเซลล์ลูกผสมที่สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสมาตรวจสอบหาขนาดของยีนแมนนาเนส โดยนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป QIAprep® spin Miniprep (QIAGEN) มาตรวจสอบความเข้มข้น แล้วนำพลาสมิดลูกผสม 1 ไมโครกรัมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Xba*I ซึ่งมีตำแหน่งการตัดอยู่บนพลาสมิด pHT 43 โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย deionized water ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บัฟเฟอร์เฉพาะสำหรับทำปฏิกิริยา พลาสมิดลูกผสม และเอนไซม์ 10 ยูนิตปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 20 นาที ตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟรีซีส

6.5.2 การตรวจสอบยีนแมนนาเนสโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ตรวจสอบชิ้นส่วนยีนแมนนาเนสบนพลาสมิดลูกผสม และ บนโครโมโซมโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Fsq /Rsq และ BMF/BMR ตามลำดับ เครื่อง Thermal cycle (T-gradient; Biometra) โดยในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ประกอบด้วย บัฟเฟอร์เฉพาะสำหรับปฏิกิริยา ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร $dNTP_5$ mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 มิลลิลิตรต่อลิตร ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตรปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร (ต่อ 1 ไพรเมอร์) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2 หน่วย (unit) ต่อไมโครลิตร และพลาสมิดลูกผสมหรือโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสมความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วย deionized water ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยปิเปตเบา ๆ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal cycle ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทำสำหรับการตรวจสอบยีนบนพลาสมิดลูกผสมด้วยไพรเมอร์ Fsq /Rsq เป็นดังนี้ ขั้นที่ 1 denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ในขณะที่สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบยีนบนโครโมโซม โดยใช้คู่ไพรเมอร์ BMF/BMR นั้นจะเป็น ขั้นที่ 1 denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 53.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ และขั้นที่ 3 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟรีซีส

6.6 การตรวจสอบลักษณะของเอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสม

6.6.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสมตามวิธีการในข้อ 1.2 จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ดังวิธีการในข้อ 2

6.6.2 การวิเคราะห์ลักษณะการย่อยบนสับสเตรตชนิดแข็ง

หยดสารละลายเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมลงบน LBG plate ซึ่งประกอบด้วย LBG เข้มข้น 1% และ Agar เข้มข้น 1.5% ในโปแตสเซียมฟอตเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 -6 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะวงใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น

6.6.3 การวิเคราะห์ความจำเพาะต่อสับสเตรต

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมต่อสับเสรตชนิดต่าง ๆ ดังนี้ LBG, Guar gum, Alpha-mannan (yeast), Ivory nut mannan, Konjac glucomannan, Xylan from oat spelt, Xylan from birch wood, Caboxymethylcellulose (CMC), Avicel และ กากมะพร้าว โดยใช้สับสเตรตเข้มข้น 1 % (w/v) บ่มกับเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและวัดกิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 2

6.6.4 ศึกษา Zymogram ของเอนไซม์

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลแสดงดังตารางที่ 8 ก่อนเตรียมเจลให้ตั้งสารละลายทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิห้อง การผสมสารให้เรียงลำดับจาก Deionized water, 1.5 M Tris-HCl, acrylamide/Bis (30% stock) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นไล่อากาศออกแล้วเติม TEMED และ 10% ammonium persulfate ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาผสมกับ Loading dye แล้วหยอดตัวอย่างลงในช่องบนแผ่นเจล ตั้งแรงดันไฟฟ้าที่ 100 volt จากนั้นนำเจลออกมาย้อมด้วย silver stain plus kit (Bio-Rad, USA)

นำแผ่นเจลที่ได้จากการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิสมาแปะทับกับแผ่นของสับสเตรต (LBG) ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นสับสเตรตออกมาเททับด้วยสี Congo red เข้มข้น 0.1% ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เทสี Congo red ออก แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย 1M NaCl จนปรากฏลักษณะวงใสบนแผ่นสับสเตรต จากนั้นล้าง NaCl ออกด้วยน้ำ deionized แล้วเททับด้วย 0.5% กรดอะซิติก ตรวจสอบผลที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 8 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Separation gel (7.5%) และ Stacking gel (4%)

สารเคมี	Seperation gel (7.5%)	Stacking gel (4%)
1. Deionized water	9.9 ml	6.2 ml
2. 1.5 M Tris-HCl	5 ml	2.5 ml
3. acrylamide/Bis (30% stock)	5 ml	1.33 ml
4. TEMED	10 ul	10 ul
5. 10% ammonium persulfate	200 ul	100 ul
Total	20 ml	10 ml

หมายเหตุ: Seperation gel (7.5%) ใช้ 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Stacking gel (4%) ใช้ 1.5 M Tris-HCl pH 6.8

10% ammonium persulfate จะต้องเตรียมก่อนใช้เท่านั้น

ผลและวิจารณ์

1. สมบัติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7

1.1 สมบัติทางจลน์พลศาสตร์

ค่าพารามิเตอร์ทางจลน์พลศาสตร์ของเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ได้แก่ ค่าคงที่ของมิเคลิส (Michealis-Menten constants; K_m) อัตราเร็วสูงสุดในการทำปฏิกิริยา (Maximum velosity; V_{max}) จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 สรุปได้ดังตารางที่ 9 และ 10 จากตารางพบว่าค่า K_m ของเอนไซม์จาก *Bacillus* ทั้ง 2 ชนิดเมื่อใช้ LBG เป็นสับสเตรตมีค่าแตกต่างกันมากประมาณ 7-8 เท่า คือ มีค่าเท่ากับ 1.739 และ 13.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาจากการใช้กากมะพร้าวที่ปราศจากไขมัน และ Konjac glucomannan เป็นสับสเตรต พบว่าเอนไซม์มีค่า K_m ใกล้เคียงกันคือ 1.11 และ 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร10.7 และ 9.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ตามลำดับ ค่า K_m เป็นค่าที่บอกถึงสัมพรรคภาพ (affinity) ของเอนไซม์ที่มีต่อโครงสร้างของสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ซึ่งหาก K_m มีค่าต่ำแสดงว่าเอนไซม์มี affinity สูงต่อสับสเตรตชนิดนั้น ๆ จากการทดลองแสดงให้ทราบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมี affinity สูงต่อสับสเตรต ประเภทกาแลคโตแมนแนน

เมื่อพิจารณาค่า V_{max} จากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันทั้งจากการใช้ LBG Konjac glucomannan และ กากมะพร้าว เป็นสับสเตรต ซึ่งค่า V_{max} จะแสดงให้ทราบถึงอัตราเร็วสูงสุดในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ การที่ค่า V_{max} มีค่าใกล้เคียงกันแสดงให้ทราบว่าสับสเตรตทั้ง 3 ชนิดนั้นไม่ส่งผลต่ออัตราเร็วในการทำปฏิกิริยา เอนไซม์ยังคงทำงานได้ดีเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 9 ค่าพารามิเตอร์ทางจลน์พลศาสตร์ของเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3

Characteristic constant	Value		
	Locust bean gum	Konjac glucomannan	Copra meal
Michealis-Menten conatant (K_m)(mg/ml)	1.739	10.70	1.110
Maximum velosity (V_{max})(mg/ml.min)	2.288	2.40	0.121

ตารางที่ 10 ค่าพารามิเตอร์ทางจลน์พลศาสตร์ของเอนไซม์จาก *B. circulans* NT 6.7

Characteristic constant	Value		
	Locust bean gum	Konjac glucomannan	Copra meal
Michealis-Menten conatant (K_m)(mg/ml)	13.30	9.40	1.40
Maximum velosity (V_{max})(mg/ml.min)	2.20	1.90	0.053

1.2 ความจำเพาะต่อสับสเตรต

ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (Relative activity) ของเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 แสดงได้ดังตารางที่ 11 และ12 ตามลำดับ จากตารางพบว่า เอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 สามารถย่อยสลาย Konjac glucomannan, LBG, Xylan from oat spelt, Xylan from birchwood, Guar gum, Ivory nut, Copra meal, Alpha-mannan และ CMC ด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100, 92.33, 44, 29.67, 18.67, 13, 9.33, 4.67 และ 3 % ตามลำดับ และผลการทดลองสอดคล้องกับเอนไซม์จาก *B. circulans* NT 6.7 นั่นคือเอนไซม์

สามารถย่อยสลายสับสเตรตดังกล่าวได้ด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100, 79.5, 12.73, 12.42, 10.56, 6.83, 6.83, 4.35 และ 1.24 % ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากทั้ง 2 ชนิดนั้นแสดงกิจกรรมต่อสับสเตรตแมนแนนที่เป็น beta-1,4 mannosidic linkage หลาย ๆ ชนิด เช่น แมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และ alpha mannan นอกจากนี้ยังแสดงกิจกรรมต่อสารประกอบไซแลน และสารประกอบเซลลูโลสบางชนิด แต่จะมีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรตที่เป็นกลูโคแมนแนน และ กาแลคโตแมนแนน การที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีกิจกรรมต่อสับสเตรตอื่น ๆ เช่นไซแลน และเซลลูโลสบางประเภทได้นั้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็น Crude enzyme ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลาย ๆ ชนิดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพื่อทำงานร่วมกันทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายสับสเตรตชนิดต่าง ๆ เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

จากผลการศึกษาสมบัติทางจลน์พลศาสตร์และความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีสมบัติทางจลน์พลศาสตร์ และความจำเพาะต่อสับสเตรตที่เหมือนกันนั่นคือมี affinity สูงต่อสับสเตรตประเภทกาแลคโตแมนแนน ตลอดจนมีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรตประเภทกลูโคแมนแนน และกาแลคโตแมนแนน จากงานวิจัยของ นฤมล (2549) และ Phothichito (2006) ซึ่งได้ศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *B. amylolique faciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดนั้นมีลักษณะบางประการที่แตกต่างกัน แต่ยังคงมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงพอ ๆ กัน นอกจากนี้ สุภา (2550) ได้ศึกษาถึงการโคลน และวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของลำดับเบสของยีนเบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อทั้ง 2 ซึ่งมีขนาด 786 และ 771 คู่เบส ตามลำดับ แต่เนื่องจากลำดับเบสของยีนเบต้า-แมนนาเนสที่ได้มานั้นเป็นเพียงลำดับเบสบางส่วนของยีน (Partial sequence) ไม่ใช่ลำดับเบสที่ครบทั้งยีน (Full sequence) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงได้ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนเบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าว เพื่อหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีน ตลอดจนการผลิตเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม เพื่อศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมเปรียบเทียบกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ต้นแบบต่อไป

ตารางที่ 11 ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3

Substrate	Relative activity (%)
Konjac glucomannan	100.00
LBG (galactomannan)	92.33
Xylan from oat spelt	44.00
Xylan from Birchwood	29.67
Guar gum (galactomannan)	18.67
Ivory nut (mannan)	13.00
Copra meal (galactomannan)	9.33
Alpha-mannan	4.67
Carboxymethyl cellulose (CMC)	3.00
Avicel	0

ตารางที่ 12 ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์จาก *B. circulans* NT 6.7

Substrate	Relative activity (%)
Konjac glucomannan	100.00
LBG (galactomannan)	79.50
Ivory nut mannan	12.73
Guar gum (galactomannan)	12.42
Xylan from oat spelt	10.56
Xylan from Birchwood	6.83
Copra meal (galactomannan)	6.83
Alpha-mannan	4.35
Carboxymethyl cellulose (CMC)	1.24
Avicel	0

2. การโคลนและการแสดงออกของยีนเบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 โดยใช้ *E.coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

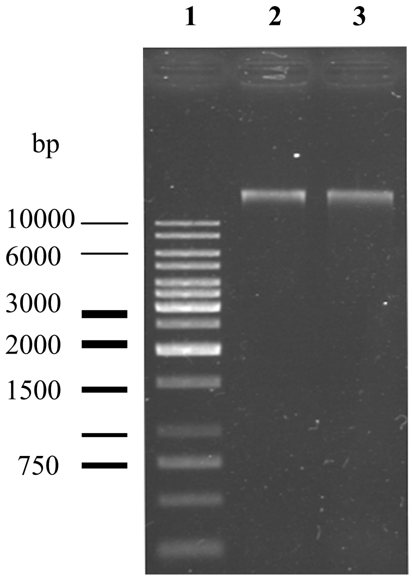
2.1 การเตรียมโครโมโซมสำหรับการโคลน

2.1.1 การสกัดโครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7

การสกัดโครโมโซมใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Harwood และ Cutting (1990) โดยโครโมโซมที่สกัดได้จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 มีความเข้มข้นเป็น 0.135 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ 0.165 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ดังตารางที่ 13 จากการตรวจสอบคุณภาพของโครโมโซมที่สกัดได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส พบแถบโครโม โซมเพียง 1 แถบที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่มีการฉีกขาดหรือถูกทำลาย ดังภาพที่ 6 และเมื่อคำนวณความบริสุทธิ์ของโครโมโซมจากอัตราส่วนระหว่าง A260/280 พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.80 และ 1.83 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ดังนั้นตัวอย่างโครโมโซมที่สกัดได้จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 มีความบริสุทธิ์สูงสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของโครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7

โครโมโซมจากเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสง		A260/280	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ
	260 nm	280 nm		(ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
B. amyloliquefaciens NT 6.3	0.009	0.005	1.80	0.135
B. circulans NT 6.7	0.011	0.006	1.83	0.165



ภาพที่ 6 โครโมโซมของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7

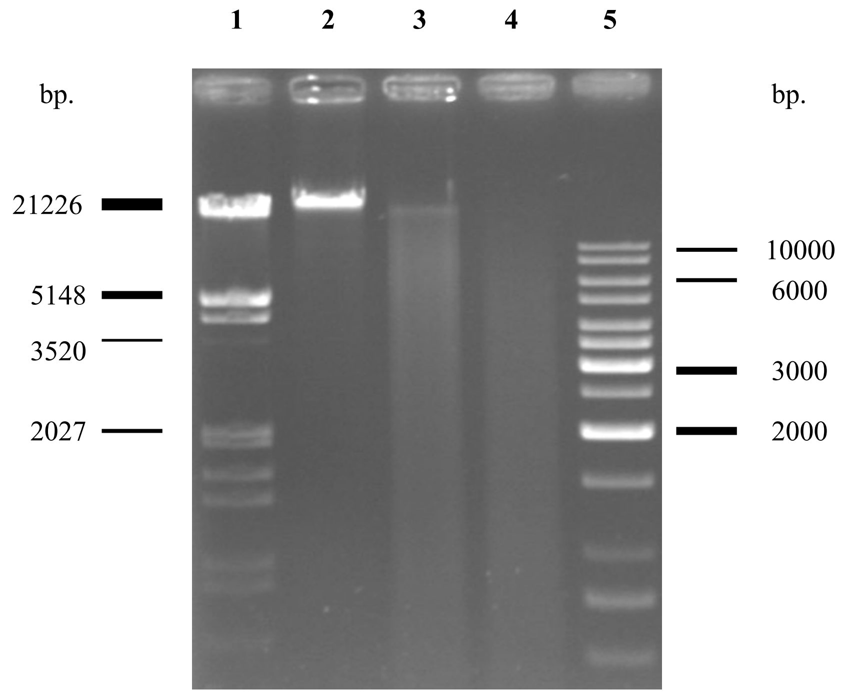
ช่องที่ 1 1 Kb marker

ช่องที่ 2 โครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3

ช่องที่ 3 โครโมโซมจาก *B. circulans* NT 6.7

2.1.2 การตัดโครโมโซมแบบไม่สมบูรณ์ (Partial digestion) ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I

ข้อดีของการตัดโครโมโซมแบบไม่สมบูรณ์ คือทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่แตกต่างกัน และมีโอกาสได้ชิ้นส่วนของยีนที่สมบูรณ์ (สุรินทร์, 2536) จากการศึกษาขนาดของยีนเบต้า-แมนนาเนสจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จากฐานข้อมูลพบว่ามีขนาดตั้งแต่ 1,100-1,500 คู่เบส ดังนั้นจึงเลือกตัดโครโมโซมให้อยู่ในช่วง 2-6 กิโลเบส โดยใช้เอนไซม์ *Bsp*143I ซึ่งจดจำลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5’GATC3’ ดัดแปลงตามวิธีการของ Brown (1991) โดยแปรผันเวลาที่ใช้ในการตัดเป็น 15 และ 30 นาที จากนั้นตัดโครโมโซมที่ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อตรวจสอบผลการตัดโครโมโซมของ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 พบว่าเวลาที่เหมาะ สมของการตัดโครโมโซมให้ได้ขนาด 2-6 กิโลเบสมากที่สุดเป็น 15 นาที ดังภาพที่ 7 และ 8 จากนั้นสกัดโครโมโซมขนาด 2-6 กิโลเบสออกจากเจล โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Nuclospin® Extract II เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมธนาคารยีนต่อไป



ภาพที่ 7 ลักษณะโครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I แบบไม่สมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาที

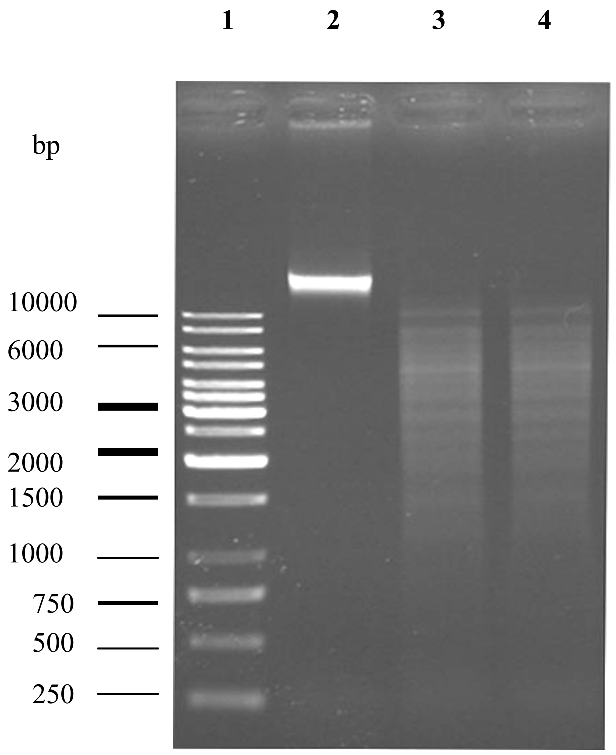
ช่องที่ 1 Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Eco*RI

ช่องที่ 2 โครโมโซมที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I

ช่องที่ 3 โครโมโซมที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I เป็นเวลา 15 นาที

ช่องที่ 4 โครโมโซมที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I เป็นเวลา 30 นาที

ช่องที่ 5 1 Kb marker



ภาพที่ 8 ลักษณะโครโมโซมจาก *B. circulans* NT 6.7 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I แบบไม่สมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาที

ช่องที่ 1 1 Kb marker

ช่องที่ 2 โครโมโซมที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I

ช่องที่ 3 โครโมโซมที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I เป็นเวลา 15 นาที

ช่องที่ 4 โครโมโซมที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I เป็นเวลา 30 นาที

2.2 การเตรียมพลาสมิด pHT43 สำหรับการโคลน

2.2.1 การสกัดพลาสมิด pHT43

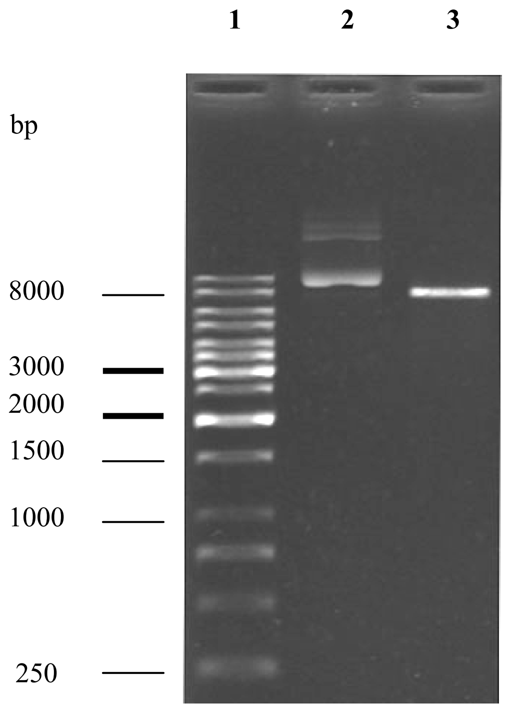
ความเข้มข้นและอัตราส่วน A260/280 ของพลาสมิด pHT43 แสดงดังตารางที่ 14 จากตารางพบว่าพลาสมิดที่สกัดได้มีความเข้มข้น 0.195 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และมีค่าอัตราส่วนของ A260/280 อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แสดงว่าพลาสมิด pHT43 ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของพลาสมิด pHT43

พลาสมิด	ค่าการดูดกลืนแสง		A260/280	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
	260 nm	280 nm		
pHT43	0.013	0.007	1.86	0.195

2.2.2 การตัดพลาสมิด pHT43 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ตัดพลาสมิด pHT43 ที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ซึ่งจะทำให้เกิดปลายที่มีเบสคู่สมกับโครโมโซมซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I โดยในการตัดพลาสมิด pHT43 จะทำการตัดอย่างสมบูรณ์ (Complete digestion) ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และเมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าพลาสมิด pHT43 ถูกตัดอย่างสมบูรณ์ได้เป็นพลาสมิดเส้นสาย (Linear plasmid) ที่มีขนาด 8 กิโลเบส ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 พลาสมิด pHT43 ก่อน และหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

ช่องที่ 1 1 Kb marker

ช่องที่ 2 พลาสมิด pHT43 ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ช่องที่ 3 พลาสมิด pHT43 หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

2.3 การเชื่อมโครโมโซมที่ผ่านการตัดแบบไม่สมบูรณ์เข้ากับพลาสมิด pHT43

การตัดโครโมโซมแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bsp*143I และการตัดพลาสมิด pHT43 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI จะทำให้เกิดปลายเหนียว (cohesive end) ของทั้งโครโมโซม และพลาสมิด ซึ่งจะอาศัยคุณสมบัติดังกล่าวในการเชื่อมต่อโครโมโซม และพลาสมิดเข้าด้วยกัน โดยนำพลาสมิด pHT43 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI มาเชื่อมต่อกับโครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ขนาด 2-6 กิโลเบส โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ T_4 DNA ligase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ขึ้น และในปฏิกิริยานอกจากประกอบด้วยพลาสมิด โครโมโซม และเอนไซม์ T_4 DNA ligase แล้ว ยังจำเป็นต้องอาศัย ATP และ Mg^{2+} ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ T_4 DNA ligase จะทำให้ได้พลาสมิดลูกผสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.4 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านจะเริ่มจากการทำให้เซลล์เจ้าบ้านอยู่ในสภาพพร้อมรับพลาสมิดจากภายนอก (Competent cells) ตามวิธีการของ Sambrook *et al.,* (1989) โดยเซลล์เจ้าบ้านที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือ *E.coli* DH5α ซึ่งได้ทดสอบแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสม เนื่องจากไม่มีการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสที่ต้องการศึกษา ผลการทรานสฟอร์มและประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มของ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 แสดงได้ดังตารางที่ 15 จากตารางพบโคโลนีจำนวน 964 และ 1,245 โคโลนีจากโครโมโซมของ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการคำนวณโอกาสที่จะพบชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสจากขนาดจีโนมของแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส นั้นพบว่าจะต้องทำการคัดเลือกโคลนจำนวน 1,500 โคลนจึงจะมีโอกาสเจอชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสจำนวน 1 ยีน ดังนั้นการที่ผลการทรานสฟอร์มเจอโคลนจำนวน 964 และ 1,245 โคลน แสดงว่าจำนวนดังกล่าวน้อยกว่าจำนวนโคลนที่จะมีโอการสเจอยีนเบต้า-แมนนาเนสจำนวน 1 ยีน ต่อมาได้นำโคลนทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย LBG ซึ่งเป็นตัวแทนของสารประกอบกาแลคโตแมนแนนต่อไป

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มของ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 โดยใช้ *E. coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

เชื้อ	จำนวนโคโลนี (cfu/ml)	Transformation efficiency (cfu/ug DNA)
B.amyloliquefaciens NT 6.3	964	$1.56x10^{4}$
B.circulans NT 6.7	1,245	$2.00x10^{4}$

2.5 การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม

นำโคโลนีของเซลล์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินมาถ่ายลงบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และ LBG เป็นองค์ประกอบ จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ปรากฏวงใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนีภายหลังการย้อมสีด้วย 0.1% (w/v) Congo red แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย 1M NaCl จากผลการทดลองพบว่าจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 พบโคลนจำนวน 98 โคลนที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสต่อสับสเตรต LBG ในขณะที่จาก *B.*

circulans NT 6.7 พบจำนวน 129 โคลนที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าว จึงได้นำโคลนทั้งหมดมาผลิตเอนไซม์แล้ววิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

2.5.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ของเซลล์ลูกผสม

นำโคลนทั้งหมดมาถ่ายลงในอาหาร PM (producing enzyme medium) pH 6.0 ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วนำไปบ่มที่ 50 และ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะให้อากาศ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 ตามลำดับ นำเอนไซม์ที่ได้จากทุก ๆ โคลนมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ด้วยวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สาร DNS (Miller, 1959) ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะจากโคลนที่มีกิจกรรมต่อสับสเตรต LBG แสดงได้ดังตารางที่ 16 จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์พบว่าเซลล์ลูกผสม 6.3-379 จากจุลินทรีย์ต้นแบบ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 เซลล์ลูกผสม 6.7-33 และ 6.7-780 จากจุลินทรีย์ต้นแบบ *B. circulans* NT 6.7 มีกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส รวมทั้งมีการย่อยสลาย LBG ในอาหารผลิตเอนไซม์ ซึ่งทำให้ได้เอนไซม์ที่มีลักษณะใสเช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต้นแบบ (wild type) ในขณะที่เซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* DH5α และเซลล์ลูกผสม *E. coli* DH5α ที่มีเฉพาะพลาสมิด pHT43 (*E. coli* DH5α/pHT43) ซึ่งไม่ได้รับชิ้นส่วนของโครโมโซมใด ๆ นั้นไม่แสดงกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส และเอนไซม์มีลักษณะหนืด เนื่องจาก LBG ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารผลิตเอนไซม์ไม่สามารถถูกย่อยสลายไปได้

ตารางที่ 16 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะจากเซลล์ลูกผสมที่มีกิจกรรมต่อสับสเตรต LBG

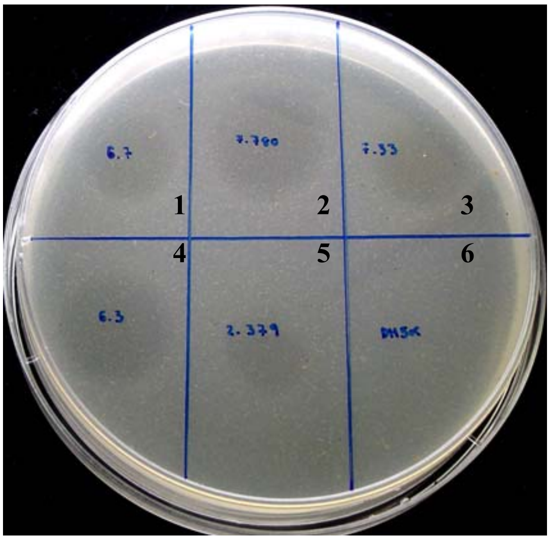
เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
B. amyloliquefaciens NT 6.3	0.214
เซลล์ลูกผสม 6.3-379	0.080
B.circulans NT 6.7	0.145
เซลล์ลูกผสม 6.7-33	0.132
เซลล์ลูกผสม 6.7-780	0.304
E. coli DH5α	0
E. coli DH5α/pHT43	0

จากการคำนวณโอกาสการพบชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนส ที่จะต้องทำการคัดเลือกโคลนจำนวน 1,500 โคลนจึงจะมีโอกาสเจอยีนเบต้า-แมนนาเนสจำนวน 1 ยีน แต่การที่คัดเลือกโคลนจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 จำนวน 964 โคลนแล้วเจอยีนเบต้า-แมนนาเนส จำนวน 1 ยีน จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 แสดงว่าโอกาสในการเจอชิ้นส่วนของยีนคิดเป็น 1/964 หรือคิดเป็น 1.04×10^{-3} ขณะที่จาก *B. circulans* NT 6.7 จำนวน 1,245 โคลน แล้วเจอยีนเบต้า-แมนนาเนส จำนวน 2 ยีน คือเซลล์ลูกผสม 6.7-33 และ 6.7-780 แสดงให้เห็นว่าโอกาสในการพบชิ้นส่วนของยีนคิดเป็น 2/1245 หรือ 1.61×10^{-3} ดังนั้นแสดงว่าค่าทางทฤษฎีที่ได้จากการคำนวณนั้นไม่ได้เท่ากันในทุกกรณี อาจมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ ด้านทั้งแหล่งของยีน ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตลอดจนเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการแสดงออก เป็นต้น

แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 ซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีความหนืดเนื่องจากสับสเตรต LBG ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารผลิตเอนไซม์นั้นไม่ถูกย่อยสลายไป รวมทั้งเมื่อวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ก็พบว่าไม่ปรากฏกิจกรรมเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 อีก ซึ่งแตกต่างจากผลการวัดกิจกรรมเอนไซม์ในครั้งแรกอย่างชัดเจน จึงได้ตรวจสอบเอนไซม์ที่ผลิตได้ในครั้งแรกจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 ทั้งลักษณะการย่อยของเอนไซม์บนสับสเตรตชนิดแข็ง ความจำเพาะต่อสับสเตรต และ Zymogram ของเอนไซม์ ตลอดจนการตรวจสอบเซลล์ลูกผสมเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสต่อไป

2.5.2 ลักษณะการย่อยของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมบนสับสเตรตชนิดแข็ง

ผลการหยดสารละลายเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 เปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์จาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3, *B. circulans* NT 6.7 และ *E.coli* DH5α แสดงดังภาพที่ 10 จากลักษณะวงใสที่เกิดขึ้นพบว่าเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 แสดงวงใสบน LBG plate ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสจากโคลน 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780, *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 แสดงดังตารางที่ 17 ในขณะที่เซลล์เจ้าบ้านคือ *E.coli* DH5α ไม่ปรากฏลักษณะวงใสบน LBG plate



ภาพที่ 10 ลักษณะวงใส (Clear zone) ที่เกิดจากการย่อยของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส บน LBG plate

ช่องที่ 1 *B. circulans* NT 6.7

ช่องที่ 2 เซลล์ลูกผสม 6.7-780

ช่องที่ 3 เซลล์ลูกผสม 6.7-33

ช่องที่ 4 *B. amyloliquefaciens* NT 6.3

ช่องที่ 5 จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379

ช่องที่ 6 *E.coli* DH5α

ตารางที่ 17 ขนาดวงใสบน LBG plate ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3, *B. circulans* NT 6.7 เซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33, 6.7-780 และ *E.coli* DH5α

เชื้อ	ขนาดวงใส (clear zone) (เซนติเมตร)
B. amyloliquefaciens NT 6.3	1.70
เซลล์ลูกผสม 6.3-379	1.30
B. circulans NT 6.7	1.60
เซลล์ลูกผสม 6.7-33	1.40
เซลล์ลูกผสม 6.7-780	1.70
E. coli DH5α	0

2.5.3 ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม

ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 แสดงได้ดังตารางที่ 18 เมื่อพิจารณาเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 พบว่าสามารถย่อยสลาย Konjac glucomannan, LBG, Ivory nut, Guar gum , Xylan from oat spelt, Xylan from birchwood และ กากมะพร้าว ด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100, 99.47, 25.94, 15.11, 14.25, 12.54 และ 5.99 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 นั้นแสดงกิจกรรมต่อสับสเตรตที่เป็น beta-1,4 mannosidic linkage ของสารประกอบแมนแนนหลาย ๆ ประเภทไม่ว่าจะเป็นแมนแนน กาแลคโตแมนแนน และกลูโคแมนแนน รวมทั้งแสดงกิจกรรมต่อสับสเตรตประเภทไซแลนคือ Xylan from oat spelt และ Xylan from birchwood ขณะที่ไม่แสดงกิจกรรมการย่อยต่อสับสเตรตที่เป็น Alpha-mannan, Avicel และ CMC เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ต้นแบบคือ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 พบว่ามีรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน แต่เอนไซม์จากจุลินทรีย์ต้นแบบสามารถย่อยสลายสับสเตรตที่เป็น Alpha-mannan และ CMC ได้เล็กน้อย ขณะที่เซลล์ลูกผสม 6.3-379 ไม่แสดงกิจกรรมดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลลลูกผสมนั้นได้รับชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเบต้า-แมนนาเนสและ ไซลาเนส แต่ไม่ได้รับชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส จึงส่งผลให้ไม่แสดงกิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส จากผลที่ได้สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 มีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่เป็น กลูโคแมนแนน กาแลคโต

แมนแนน และไซแลน แต่ไม่มีกิจกรรมต่อสับสเตรตประเภทเซลลูโลส นั่นคือไม่แสดงกิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส ขณะที่เอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม 6.7-780 นั้นสามารถย่อยสลาย Konjac glucomannan, LBG, Xylan from oat spelt, Xylan from birchwood, Guar gum, Ivory nut และกากมะพร้าว ด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100, 77.21, 30.23, 18.60, 17.21, 10.47 และ 4.65 ตามลำดับ ดังนั้นเอนไซม์สามารถแสดงกิจกรรมต่อสับสเตรตที่เป็นแมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และสารประกอบไซแลน โดยไม่แสดงกิจกรรมต่อ Alpha-mannan, Avicel และ CMC เช่นเดียวกับเซลล์ลูกผสม 6.3-379 ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากจุลินทรีย์ต้นแบบ คือ *B. circulans* NT 6.7 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ต้นแบบนั้นแสดงกิจกรรมต่อ Alpha-mannan ได้เล็กน้อย ขณะที่เซลล์ลูกผสม 6.7-780 ไม่แสดงกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าว

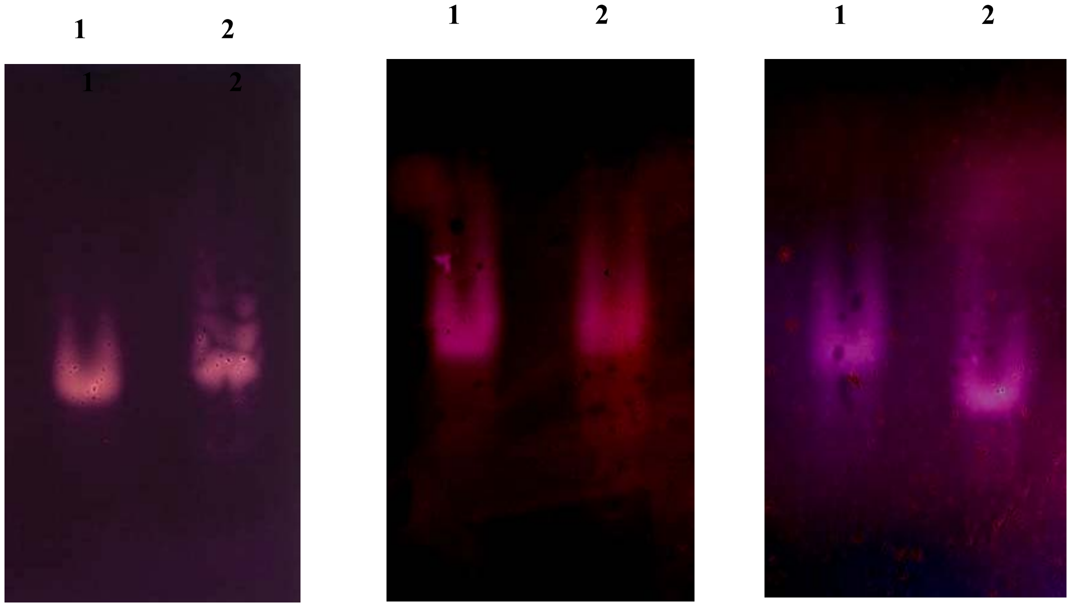
เมื่อพิจารณาที่เอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม 6.7-33 พบว่ามีความแตกต่างจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่ได้กล่าวมาเล็กน้อยเนื่องจากเอนไซม์จากจากเซลล์ลูกผสม 6.7-33 นั้นนอกจากจะย่อยสลายสับสเตรตที่เป็น แมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และสารประกอบไซแลนได้แล้ว ยังสามารถย่อยสลายสับสเตรตประเภท Alpha-mannan และ CMC ได้เล็กน้อย โดยเอนไซม์สามารถย่อยสลาย Konjac glucomannan, LBG, Ivory nut, Guar gum, Xylan from oat spelt, Xylan from birchwood, Alpha-mannan กากมะพร้าว และ CMC ด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100, 71.52 14.24, 12.02, 11.39, 7.28, 6.01, 4.75 และ 1.90 ตามลำดับ จากความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 แสดงให้ทราบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีรูปแบบเหมือนกับความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ต้นแบบ คือมีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรตประเภทกลูโคแมนแนน และกาแลคโตแมนแนน จากความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ต้นแบบ และเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 ในตารางที่ 18 นั้น พบว่านอกจากจะแสดงกิจกรรมต่อสับสเตรตที่เป็น แมนแนน กาแลคโตแมนแนน และ กลูโคแมนแนนแล้วยังแสดงกิจกรรมต่อสารประกอบไซแลนอีกด้วย ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจาก ไซแลนเป็นสารประกอบประเภทเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เช่นเดียวกับแมนแนน ซึ่งในโครงสร้างจะประกอบด้วยส่วนของกิ่งแขนงที่มีความใกล้เคียงกัน เอนไซม์เบต้า- แมนนาเนสที่ผลิตได้จึงสามารถแสดงกิจกรรมต่อสารประกอบดังกล่าวได้ นอกจากเหตุผลดังกล่าวแล้วการที่เอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมสามารถแสดงกิจกรรมต่อสารประกอบไซแลนได้นั้น อาจมีผลเนื่องจากการได้รับชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบไซแลนจากจุลินทรีย์ต้นแบบไปด้วยนั่นคือได้รับทั้งชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแมนแนน และไซแลน เนื่องจากการเตรียม DNA insert สำหรับการโคลนที่ใช้ในการทดลองนี้เลือกใช้วิธีการตัดโครโมโซมแบบไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเซลล์ลูกผสมที่ได้จึงมีโอกาสได้รับชิ้นส่วนของยีนที่แตกต่างกันและมีโอกาสที่จะได้รับชิ้นส่วนของยีนมากกว่า 1 ยีน

ตารางที่ 18 ความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ต้นแบบ

Substrate	Relative activity (%) / Organism				
	B. amyloliquefaciens NT 6.3	6.3-379	*B. circulans* NT 6.7	6.7-33	6.7-780
Konjac (glucomannan)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
LBG (galactomannan)	92.33	99.47	79.50	71.52	77.21
Ivory nut (mannan)	13.00	25.94	12.73	14.24	10.47
Guar gum (galactomannan)	18.67	15.11	12.42	12.02	17.21
Xylan from oat spelt	44.00	14.25	10.56	11.39	30.23
Xylan from Birchwood	29.67	12.54	6.83	7.28	18.60
Alpha-mannan	4.67	0	4.35	6.01	0
Copra meal (galactomannan)	9.33	5.99	6.83	4.75	4.65
CMC	3.00	0	1.24	1.90	0.70
Avicel	0	0	0	0	0

2.5.4 การศึกษา Zymogram ของเอนไซม์

การศึกษา Zymogram ของเอนไซม์นั้นเอนไซม์จะยังคงมีโครงสร้างและรูปร่างในสภาพธรรมชาติ ลักษณะการแยกของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับขนาดและความหนาแน่นของประจุ (อาภัสสรา, 2537) Zymogram ของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 แสดงได้ดังภาพที่ 11 จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า Zymogram ของเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 (ภาพที่ 11a), 6.7-33 (ภาพที่ 11b) และ 6.7-780 (ภาพที่ 11c) มีรูปแบบใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ต้นแบบ (wild type) คือ *B. amylolique faciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 และพบแถบโปรตีนที่แสดงกิจกรรมต่อสับสเตรต LBG ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน



(a) (b) (c)

ภาพที่ 11 Zymogram ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 เปรียบเทียบกับเอนไซม์จากเซลล์ลูกผสม ภายหลังการย้อมด้วยสี Congo red

(a) *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 (ช่องที่ 1) และ เซลล์ลูกผสม 6.3-379 (ช่องที่ 2)

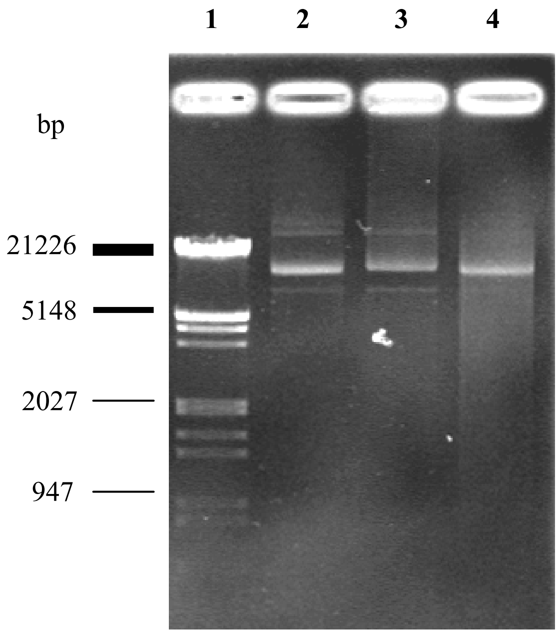
(b) *B. circulans* NT 6.7 (ช่องที่ 1) และ เซลล์ลูกผสม 6.7-33 (ช่องที่ 2)

(c) *B. circulans* NT 6.7 (ช่องที่ 1) และ เซลล์ลูกผสม 6.7-780 (ช่องที่ 2)

2.5.5 การตรวจสอบเซลล์ลูกผสมเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

2.5.5.1 การตรวจสอบขนาดของ DNA insert โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผลการสกัดพลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 แสดงดังภาพที่ 12 นำพลาสมิดจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 มาตรวจสอบขนาดของ DNA insert ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ซึ่งมีตำแหน่งตัดอยู่บนพลาสมิด pHT43 ซึ่งผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI แสดงได้ดังภาพที่ 13



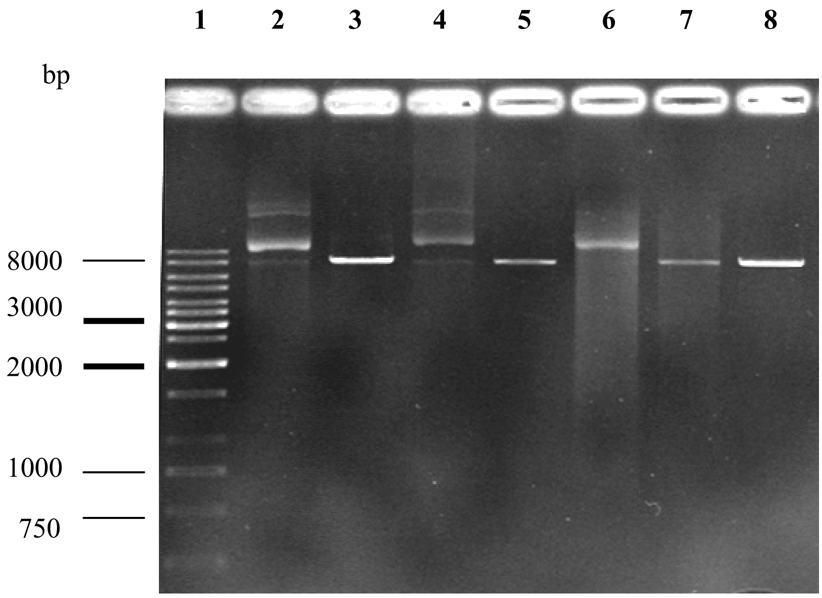
ภาพที่ 12 ลักษณะพลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780

ช่องที่ 1 Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Eco*RI

ช่องที่ 2 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-780

ช่องที่ 3 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-33

ช่องที่ 4 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379



ภาพที่ 13 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 ก่อนและหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน

ช่องที่ 1 1 Kb marker

ช่องที่ 2 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-780 ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ช่องที่ 3 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-780 หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ช่องที่ 4 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-33 ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

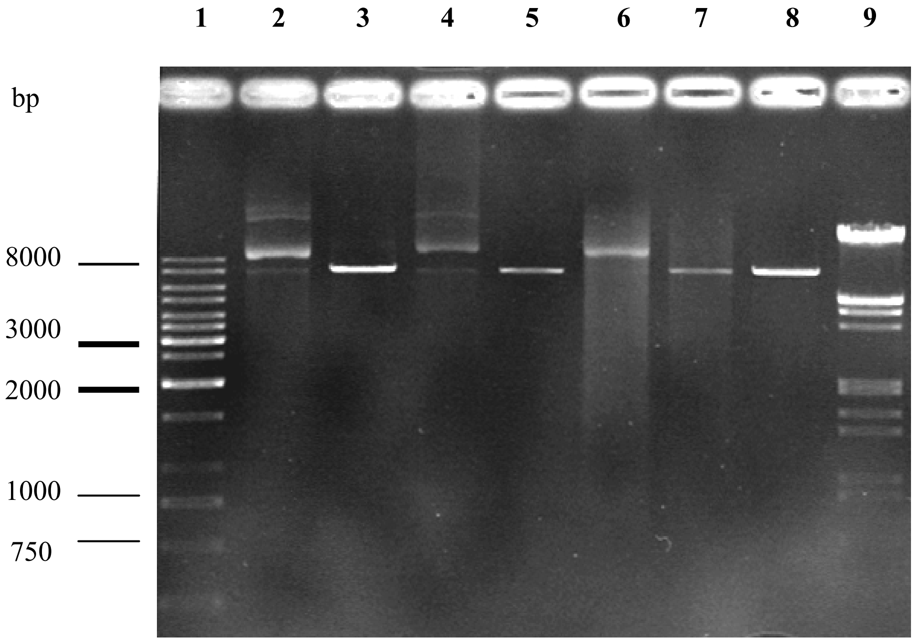
ช่องที่ 5 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-33 หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ช่องที่ 6 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ช่องที่ 7 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

ช่องที่ 8 พลาสมิด pHT43 ชนิดเส้นสาย (linear plasmid)

จากผลการตัดพบเพียงพลาสมิดขนาด 8 กิโลเบส ซึ่งเท่ากับขนาดของพลาสมิด pHT43 ชนิดเส้นสาย (Linear plasmid) จึงได้เปลี่ยนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตัดโดยเลือกใช้เอนไซม์ *Xba*I ซึ่งมีตำแหน่งตัดอยู่บนพลาสมิด pHT43 เช่นกันเพื่อดูรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ เปรียบเทียบกับการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 14 พบว่าให้ผลเช่นเดียวกันซึ่งพบเฉพาะแถบพลาสมิด pHT43 ขนาด 8 กิโลเบส ไม่พบชิ้นดีเอ็นเออื่นบนพลาสมิดลูกผสมจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 โคลน



ภาพที่ 14 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 ก่อนและหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน

ช่องที่ 1 1 Kb marker

ช่องที่ 2 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-780 ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I

ช่องที่ 3 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-780 หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I

ช่องที่ 4 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-33 ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I

ช่องที่ 5 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.7-33 หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I

ช่องที่ 6 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I

ช่องที่ 7 พลาสมิดจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379 หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I

ช่องที่ 8 พลาสมิด pHT43 ชนิดเส้นสาย (Linear plasmid)

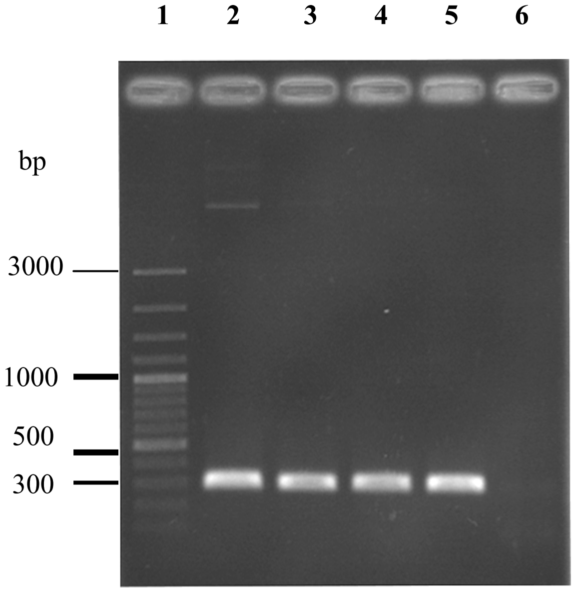
ช่องที่ 9 Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Eco*RI

2.5.5.2 การตรวจสอบยีนเบต้า-แมนนาเนสโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นำพลาสมิดจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 มาตรวจสอบชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสบนพลาสมิดลูกผสม ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Fsq และ Rsq ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบคร่อมตำแหน่งของการแทรกชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสบนพลาสมิด pHT43 (insert site) ซึ่งหากมีเฉพาะพลาสมิด pHT43 จะได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขนาด 300 คู่เบส แต่หากมีชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสอยู่บนพลาสมิด ขนาดของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสก็จะมีขนาดมากขึ้นตามขนาดของชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสที่แทรกอยู่ และจากผลดังภาพที่15 พบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 มีขนาด 300 คู่เบสซึ่งมีขนาดตรงกับชุดควบคุมที่ใช้พลาสมิด pHT43 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ซึ่งผลดังกล่าวแสดงว่าเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 มีเฉพาะพลาสมิด pHT43 ไม่มีชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสแทรกอยู่

เมื่อตรวจสอบไม่พบชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสบนพลาสมิดลูกผสมจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 ซึ่งอาจเกิดจากการแทรกชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวเข้าสู่โครโมโซมของเซลล์ลูกผสม จึงได้ตรวจสอบยีนเบต้า-แมนนาเนสบนโครโมโซมของเซลล์ลูกผสม โดยสกัดโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 ผลการสกัดโดยแสดงดังภาพที่ 16 จากนั้นนำมาตรวจสอบยีนเบต้า-แมนนาเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ BMR ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ consensus sequence ของยีนเบต้า-แมนนาเนสจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus*

จากผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 786 คู่เบส (ภาพที่ 17) ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ (expected size) เฉพาะชุดควบคุมคือใช้โครโมโซมจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเท่านั้น แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอใดๆเมื่อใช้โครโมโซมจากจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้ทราบว่าไม่ปรากฏชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสบนโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3



ภาพที่ 15 ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Fsq และ Rsq ของเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780

ช่องที่ 1 100 bp DNA plus marker

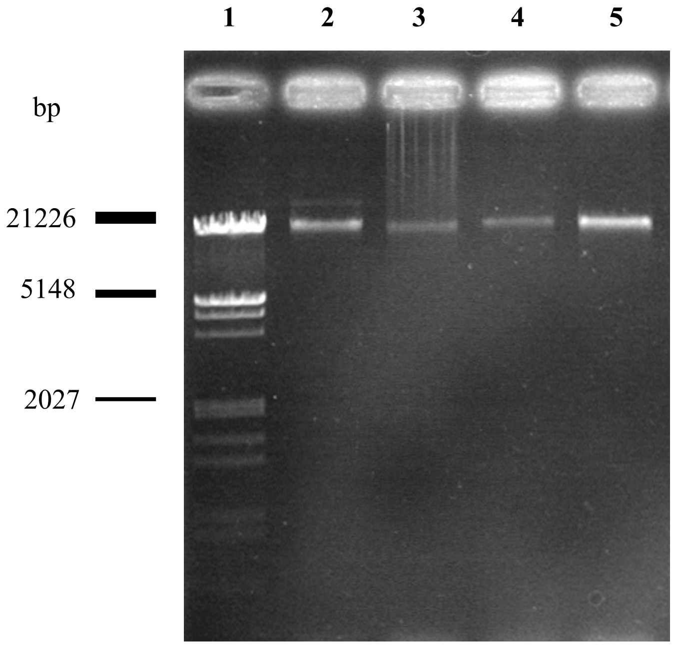
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้พลาสมิด pHT43 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้พลาสมิด 6.3-379 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้พลาสมิด 6.7-33 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้พลาสมิด 6.7-780 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 6 Negative control



ภาพที่ 16 ลักษณะโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33, 6.7-780 และ *E.coli* DH5α

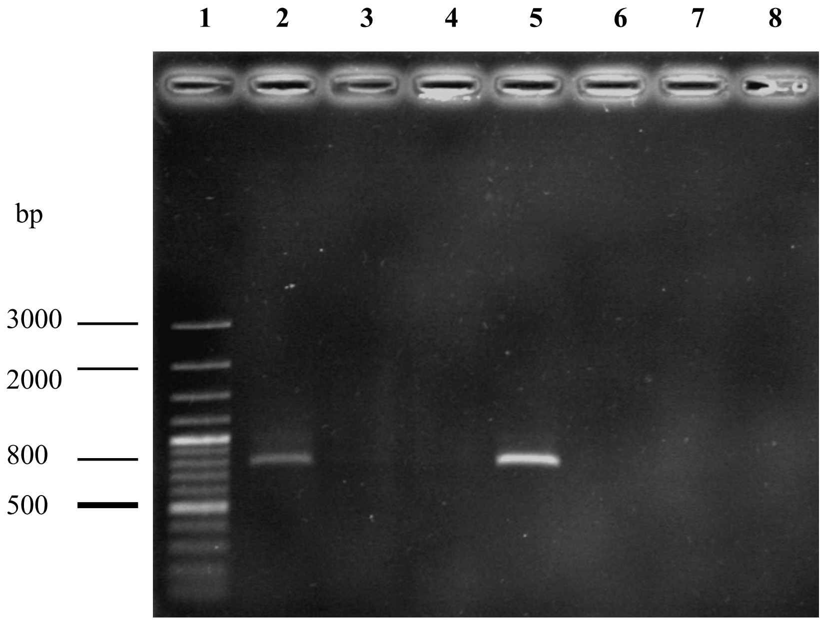
ช่องที่ 1 Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Eco*RI

ช่องที่ 2 โครโมโซมจากโคลน 6.7-780

ช่องที่ 3 โครโมโซมจากโคลน 6.7-33

ช่องที่ 4 โครโมโซมจากโคลน 6.3-379

ช่องที่ 5 โครโมโซมจาก *E.coli* DH5α



ภาพที่ 17 ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ BMF และ BMR ของเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33, 6.7-780 และ *E.coli* DH5α

ช่องที่ 1 100 bp DNA marker

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้ *B. circulans* NT 6.7 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้เซลล์ลูกผสม 6.7-780 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้เซลล์ลูกผสม 6.7-33 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้ *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้เซลล์ลูกผสม 6.3-379 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้ *E.coli* DH5α เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 8 Negative control

จากผลการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้า-แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 ทั้งวิธีการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดคือ *Bam*HI และ *Xba*I และเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ Consensus sequence ของยีนเบต้า-แมนนาเนสจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และไพรเมอร์ที่ออกแบบคร่อมตำแหน่งของการแทรกชิ้นส่วนโครโมโซม (insert site) บนพลาสมิด pHT43 พบว่าไม่ปรากฏชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสทั้งบนพลาสมิด และโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 ในขณะที่เซลล์ลูกผสมดัง กล่าวมีการแสดงกิจกรรมเอนไซม์ต่อทั้งอาหารเหลวโดยพิจารณาจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นภายหลังการย่อยสับสเตรต LBG และต่อสับสเตรต LBG ชนิดแข็ง ซึ่งเกิดลักษณะวงใสเมื่อหยดสารละลายเอนไซม์ รวมทั้งมีรูปแบบของเอนไซม์ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งลักษณะของความจำเพาะต่อสับสเตรต รวมไปถึงรูปแบบ Zymogram ของเอนไซม์ เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าวนั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากความไม่เสถียรของพลาสมิด pHT43 ที่นำมาใช้ในการทดลองจึงส่งผลให้มีการหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนพลาสมิดลูกผสม (DNA deletion) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Takesue *et al*., (2007) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ Levan fructotransferase (LFTase) โดยใช้พลาสมิด 2 ชนิด คือ pLFT-ENTR และ pHT43 เป็นพลาสมิดสำหรับการแสดงออก โดยผลการวิจัยแสดงให้เห็นถึงความไม่เสถียรของ พลาสมิด pHT43 ที่ส่งผลให้ไม่มีการแสดงออกของยีนนั่นคือไม่มีการตรวจพบเอนไซม์ LFTase ที่ต้องการศึกษา แต่ในทางตรงกันข้ามยีนดังกล่าวสามารถแสดงออกได้ดีเมื่อเลือกใช้พลาสมิดชนิดอื่นในการแสดงออกแทน โดยปกติความไม่เสถียรของพลาสมิดนั้นมักมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงภายในของพลาสมิดเองทั้งการเกิดมิวเตชั่นเฉพาะจุด (Point mutation) การขาดหายไปของชิ้นส่วนบนพลาสมิด (Deletion) การเพิ่มชิ้นส่วนของพลาสมิด (Insertion) รวมไปถึงการจัดเรียงตัวใหม่ (Rearangement) ของยีนต่าง ๆ บนพลาสมิด หรือเกิดความไม่เสถียรในการแบ่งชิ้นส่วนทางพันธุกรรมไปสู่เซลล์ลูกหลาน (Segregational instability) ซึ่งมีสาเหตุมาจากกการขาดหายไปของชิ้นส่วนบนพลาสมิดระหว่างเซลล์ลูกในขั้นตอนของกระบวนการแบ่งเซลล์ (Kumar *et al.,* 1991)

จำนวนของพลาสมิดต่อเซลล์ (Copy number) นับเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลต่อความเสถียรของพลาสมิด โดยพลาสมิดจะมีความเสถียรต่ำหากเลือกใช้พลาสมิดชนิด low copy number เป็นพลาสมิดในการแสดงออก (Balbas *et al.,* 1988) และจากการที่พลาสมิด pHT43 ที่นำ มาใช้ในการทดลองนั้นเป็นพลาสมิดชนิด low copy number จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลให้พลาสมิดชนิดนี้มีความไม่เสถียร โดยสาเหตุดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lamotte *et al.*, (1994) คือปริมาณผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ศึกษานั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวน Plasmid copy number โดยปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *E.coli* HB101ในการเพาะเลี้ยงระบบ batch จะลดลงอย่าง

รวดเร็วเมื่อปริมาณพลาสมิดต่อเซลล์ใน *E.coli* HB101 ลดลง และปริมาณพลาสมิดต่อเซลล์ที่จะส่งผลให้พลาสมิดมีความเสถียร และมีการแสดงออกของยีนได้นั้นควรมีจำนวนมากกว่า 60 พลาสมิดต่อเซลล์ (Seo และ Bailey, 1985; Dennis *et al.,* 1985) ดังนั้นพลาสมิดชนิด low copy number จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการแสดงออกของยีน ความไม่เสถียรของพลาสมิดที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นนอกจากอาจมีสาเหตุจากความบกพร่องของพลาสมิด pHT43 และจำนวน copy number ของพลาสมิดแล้ว ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการโคลน (DNA insert size) ก็ส่งผลต่อความเสถียรของพลาสมิดเช่นกัน จากการทดลองได้เลือกใช้ DNA insert ขนาด 2-6 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดค่อนข้างใหญ่ และเมื่อรวมกับพลาสมิด pHT43 ซึ่งมีขนาด 8 กิโลเบส ทำให้พลาสมิดลูกผสมมีขนาด 10-14 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่มาก โดยหากขนาดของ DNA insert ที่นำมาใช้ในการโคลนมีขนาดใหญ่มากขึ้นเท่าไหร่ การเกิด segregational instability ก็จะเพิ่มมากขึ้นเท่านั้น (Bron *et al.,* 1985; 1988) ด้วยเหตุผลต่าง ๆ ที่กล่าวมาอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการทดลองมีความไม่เสถียร และเมื่อเกิดการจำลองตัว (Replication) เพื่อแบ่งสารพันธุกรรมไปสู่เซลล์ลูกหลานนั้นมีการหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนพลาสมิดลูกผสม (DNA deletion) (Kumar *et al.,* 1991) ทำให้เซลล์ลูกไม่สามารถถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ ไปจากเซลล์แม่ได้ทั้งหมด

นอกจากสาเหตุที่เกิดจากการขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนพลาสมิด (DNA deletion) แล้วการเกิด Co-transformation (Zhao *et al.,* 2007) อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลให้เกิด Segregational instability ในขั้นตอนการเตรียมพลาสมิดให้อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอก (Competent cells) เซลล์จะเกิดช่องที่ผนังเซลล์มากมาย ดังนั้นเมื่อส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ดังกล่าวอาจมีบางเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดมากกว่า 1 พลาสมิด ซึ่งอาจได้รับทั้งพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนส และพลาสมิด pHT43 ที่เกิด Self-ligation และเมื่อเกิดการแบ่งตัวเพื่อถ่ายทอดสารพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูก พลาสมิดลูกผสมที่ได้รับชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนส ซึ่งมีขนาดใหญ่และมีความเสถียรน้อยกว่าอาจเกิดการหายไป (Plasmid loss) ทำให้เหลือเฉพาะพลาสมิด pHT43 เท่านั้นที่สามารถถ่ายทอดไปสู่ประชากรรุ่นถัดไปได้ จึงไม่มีการตรวจพบชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสจากประชากรรุ่นลูกได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ค่าคงที่ของมิเคลิส (K_m) และ อัตราเร็วสูงสุดในการทำปฏิกิริยา (V_{max}) ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 เมื่อใช้ LBG, Konjac glucomannan และกากมะพร้าวเป็นสับสเตรตมีค่าเป็น 1.739 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2.886 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.นาที 10.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิ ลิตร และ 2.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.นาที และ 1.110 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.121 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.นาที ตามลำดับ ขณะที่เอนไซม์จาก *B. circulans* NT 6.7 มีค่า K_m และ V_{max} ต่อสับสเตรตดังกล่าวเป็น 13.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.นาที 9.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.นาที และ 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.053 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.นาที และเมื่อทดสอบความจำเพาะต่อสับสเตรต พบว่า เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *B. amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *B. circulans* NT 6.7 มีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรตประเภทกลูโคแมนแนน และกาแลคโตแมนแนน

การโคลนและการแสดงออกของยีนเบต้า-แมนนาเนสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดโดยใช้พลาสมิด pHT43 เป็นพลาสมิดในการแสดงออก และ *E.coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบเซลล์ลูกผสมจำนวน 3 โคลนที่มีกิจกรรมต่อ LBG คือ เซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 0.080, 0.132 และ 0.304 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 แสดงกิจกรรมการย่อยบนสับสเตรตชนิดแข็งซึ่งทำให้เกิดวงใสขนาด 1.30, 1.40 และ 1.70 เซนติเมตรสำหรับเซลล์ลูกผสม 6.3-379, 6.7-33 และ 6.7-780 ตามลำดับ เอนไซม์จากเซลล์ลูกผสมมีสมบัติใกล้เคียงกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ต้นแบบทั้งความจำเพาะต่อสับสเตรตและ Zymogram ของเอนไซม์ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเบต้า-แมนนาเนสในเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าไม่ปรากฏชิ้นส่วนของยีนเบต้า-แมนนาเนสทั้งบนพลาสมิดและโครโมโซมจากเซลล์ลูกผสมทั้ง 3 ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเป็นผลเนื่องจากความไม่เสถียรของพลาสมิด pHT43 ที่ใช้ในการทดลองจึงส่งผลให้มีการหายไปของยีนเบต้า-แมนนาเนสในเซลล์ลูกผสม

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนชนิดต่าง ๆ ในเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งนั้นจำเป็นต้องเลือกระบบการแสดงออกของยีนให้เหมาะกับเซลล์ที่ต้องการศึกษา รวมทั้งระบบการแสดงออกของยีนจะต้องมีประสิทธิภาพจึงจะส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนที่ดี และมีระดับการแสดงออกที่สูง ซึ่งจากผลการทดลองที่ศึกษานั้นแม้ว่าจะพบเซลล์ลูกผสมจำนวน 3 โคลนที่มีการแสดงออกของยีนเบต้า-แมนนาเนสที่สนใจ และมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงตลอดจนมีลักษณะต่างๆ ทั้งความจำเพาะต่อสับสเตรต และ Zymogram ของเอนไซม์มีความใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ต้นแบบมาก แต่เนื่องจากความไม่เสถียรของพลาสมิดที่เลือกใช้ในการแสดงออก จึงส่งผลให้ลักษณะต่างๆนั้นไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่ประชากรในรุ่นต่อไปได้ ซึ่งหากต้องการพัฒนางานวิจัยนี้ต่อไปจำเป็นต้องเลือกพลาสมิดชนิดอื่นที่มีความเสถียรมากกว่า รวมไปถึงมีขนาดเล็กกว่าพลาสมิด pHT43 ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ซึ่งน่าจะทำให้มีการแสดงออกของยีนที่ดีและสามารถปรับปรุงลักษณะที่บกพร่องต่าง ๆ ทำให้ได้พลาสมิดลูกผสมที่มีความเสถียรมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ขวัญคณิศร์ อินทรตระกูล. 2551. **การโคลนและการแสดงออกของยีนเคราติเนสจาก *Bacillus lichenniformis* KUB-0006 ใน *Bacillus subtilis*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นฤมล ทรัพย์มณีนุกูล. 2549. **ลักษณะเฉพาะของเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ**. เทคนิควิจัยปริญญาตรี, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภา สกุลศิริรัตน์. 2550. **การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT 6.3 และ *Bacillus cir*culans NT 6.7** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. **เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส**. ครั้งที่ 1. คณะสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

Abe, J., Z.M.Hossain and S. Hizukari. 1994. Isolation of beta- mannanase producing microorganism. **J. Ferment. Bioeng.** 3: 259-261.

Ademark, P., A. Varga., J. Medve., V. Harjunpaa., T. Drakenberg., F. Tjerneld and H. Stalbrand. 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of beta-mannanase. **J. Biotechnol.** 63: 199-210.

Ademark, P., R.P. de Vries., P. Hagglund., H. Stalbrand and J. Visser. 2001. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding and β-mannosidase involved in galactomannan degradation. **Eur. J. Biochem.** 268: 2982-2990.

Aduse-Opoku, J., L. Tao., J. Ferretti and R.R.B. Russell. 1991. Biochemical and genetic analysis of *Streptococcus mutans* α-galactosidase. **J. Gen. Microbiol.** 137: 757-764.

Akino, T., C. Kato and K. Horikoshi. 1989. Two *Bacillus* β-mannanase having difference COOH termini are produced in *Escherichia coli* carrying pMAH5. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 3178-3183.

Akino, T., N. Nakamura and K. Horikoshi. 1998. Characterization of β-mannosidase of an alkalophillic *Bacillus* sp. **Agric. Biochem.** 52: 1459-1464.

Akita, M., N. Takeda., K. Hirasawa., H. Sakai., M. Kawamoto., M. Yamamoto., W.D. Grant., Y. Hatada., S. Ito and K. Horikoshi. 2004. Crystallization and preliminary X-ray study of alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. **Crystallization Papers.** 1490-1492.

Alkhayat, A.H., S.A Kraemer, J.R. Leipprandt, M. Macek, W.J. Kleijer and K.H. Friderici. 1998. Human β-mannosidase cDNA characterization and first identification of mutation associated with human β-mannosidase. **Hum. Mol. Cenet.** 7: 75-83.

Araujo, A and Ward. 1990. Hemicellulases of Bacillus spicies: Preliminary comparative studies on production and properties of Mannanases and Galactase. **J. Appl. Bacteriol.** 68: 253-261.

Araujo, A and O.P. Ward. 1991. Studies on the galactomannan-degrading enzymes produced by *Sporotrichum cellulophilum*. **J. Ind. Microbiol.** 8: 229-236.

Araki, T., Y. Tamaru and T. Morishita. 1992. Beta-1, 4-mannanase from marines bacteria *Vibrio* spp. MA-129 and MA-138. **Appl. Microbiol.** 38: 343-351.

Arcand, N., D. Kluepfel., F.W. Paradis., R. Morosoil and F. Shareck. 1993. Beta-mannanase of *Streptomyces lividan*s 66: Cloning and DNA sequence of the ManA gene and characterization of the enzyme. **J. Biochem.** 290: 857-863.

Arisan-Atac, I., R. Hodits., D. Kristufek and C.P. Kubicek. 1993. Purification and characterization of a beta-mannanase of *Trichoderma reesei* C-30. **Appl. Microbiol. Technol.** 39: 58-62.

Balasubramaniam, K. 1976. Polysaccharides of the kernel of maturing and mature coconuts. **J. Food Sci. Biotechnol.** 41: 1370-1373.

Balbas, P., X. Soberon., F. Bolivar and R.L. Rodrigez. 1988. **The plasmid pBR322, In vectors, A survey of molecular cloning vector and their Uses**. pp. 5-37. Massachusettes: Buterworth and Stoneham.

Bauer, M.W., E. J. Bylina., R.V. Swanson and R.M. Kelley. 1996. Comparison of a beta-galactosidase and a beta-mannosidase from the hyperthermophilic archacon *Pyrococcus fluriosus*. **J. Biochem.** 271: 23749-23755.

Behr Winfried. 2003. **Dietetic and pharmaceutical raw material: Konjac mannan.** Available source: http://www.behrobonn.com/literat/konjacmb.html, Dec 19, 2003.

Bicho, P.A., T.A. Clark., K. Meckie., H.W. Morgan and R.M. Daniel. 1991. Tha characterization of a thermostable endo-beta-mannanase cloned from *Caldocellum saccharolyticum*. **Appl. Microbiol. Technol.** 36: 337-343.

Bradner, J.R., R.K. Sidhu., M. Gillings and K.M.H. Nevalainen. 1999. Hemicellulase activity of Antarctic microfungi. **Appl. Microbiol.** 87: 366-370.

Braithwaite, K.L., G.W. Black., G.P. Hazlewood., B.R.S. Ali and H.J. Gilbert. 1995. A Non-modular endo beta-1,4-Mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*. **J. Biochem.** 305: 1005-1010.

Bron, S and E.Luxen. 1985. Segregational Instability of pUB110-derived recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. **Plasmid.** 14: 95-224.

Bron, S., E. Luxen and P. Swart. 1988. Instability of recombinant pUB110 plasmid in *Bacillus subtilis*: plasmid encoded stability function and effect of DNA insert. **Plasmid.** 19: 231-241.

Brown, S.H., C. Sjoholm and R.M. Kelly. 1993. Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extreamly thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. **Biotechnol. Bioeng.** 41: 878-886.

Brown, T.A. 1991. **Essential Molecular Biology: A practical Approach volume1.** Oxford university press, New York.

Buchart, J., J. Salminen., M. Siika-aho., M. Ranua and L. Viikari. 1993. The role of *Trichoderma reesei* xylanase and Mannanase in the treatment of softwood kraft pulp prior to bleaching. **Hozforschung.** 47: 473-478.

Cann, I.K.O., S. Kocherginskaya, M.R. King, B.A. White and R.I. Mackie. 1999. Molecular cloning, Sequencing and expression of a novel multidomain mannanase gene from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. **J. Bacteriol**. 181: 1643-1651.

Chaplin Matin. 2005. **Water structural and behavior: locust bean gum.** Available source: http://www.lsbu.ac.uk/water/hyloc.html,Feb 29, 2005.

Choct, M. 2001. Use of enzymes in non-cereal grain feed stuffs. **School of Rural Science and Natural Resources-Animal Science**. The University of New England, Armidale, NSW 2351, Australia.

Civas, A., R. Eberhard, P. Le Dizet and F. Petek. 1984. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii* secreated 2-D-galactosidase and β-D-mannanase. **J. Biochem.** 219: 857-863.

Dakhova, O.N., N.E. Kurepina and V.V. Zverlov. 1993. Cloning and expression of *Escherichia coli* of *Thermotoga neapolitana* gene encoding for enzymes of carbohydrate substrate degradation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 194: 1359-1364.

Duffaud, G.D., C.M. McCutchen., P. Leduc., K.N. Parker and R.M. Kelly. 1997. Purification and Characterization of extremely thermostable β-mannanase, β-mannosidase, and α-galactosidase from the hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 169-177.

Ethier, N., G. Talbot and J. Sygusch. 1998. Gene cloning, DNA sequencing and expression of Thermostable β-mannanase from *Bacillus sterothermophilus.* **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4428-4432.

Feng, Y., Z. He., S.L. Ong., J. Hu., Z. Zhang and W.J. Ng. 2003. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum beta-mannanase production. **Enz. Microb. Technol.** 32: 282-289.

Ferreira, H.M. and E.X.F Filho. 2004. Purification and characterization of a β-mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohyd. Polym.** 57: 23-29.

Fridjansson, O., H. Watlawick., A. Gehweiler., T. Rohrhirsh and R. Matter. 1999. Cloning of the gene encoding a novel thermostable α-galactosidase from *Thermus brockianus* ITI 360. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3955-3963.

Gibb, M.D., D.J. Saul., E. Luthi and P.L. Bergquist. 1992. The β-mannanase from "*Caldocellum Saccharolyticum*" is part of a multidomain enzyme**. Appl. Environ. Microbiol.** 58: 3864-3867.

Gubitz, G.M., M. Hayn., M. Sommerauer and W. Steiner. 1996. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*. Characterization and synergism of two endo β-mannanase and a β-mannosidase. **Biores. Technol.** 58: 127-138.

Gulubev, M.M. and K.N. Neustroeb. 1993. Crystallization of α-galactosidase from *Trichoderma reesei*. **J. Mol. Bio.** 231: 933-934.

Halstead, J.R., M.P. Fransen., R.Y. Eberhart., A.J. Park., H.J. Gibert and G.P. Hazlewood. 2000. α-galactosidase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa.* Cloning high level expression and its role in galactomannan hydrolysis. **FEMS. Microbiol. Lett.** 192: 197-203.

Hardy, B. 2003. **Meintenance of intestinal healty is key to performance and profit.** Available source : http://www.nutrivisioninc.com/intesthealth, Dec 3, 2003.

Harjunpaa, V., A. Teleman., M. Siikaaho and T. Drakenberg. 1995. Kinetic and stereochemical studies of manno-oligosaccharide hydrolysis catalyzed by beta mannanase from *Trichoderma reesei*. **Eur. J. Biochem.** 234: 278-283.

Hashimoto, H., C. Katayama., M. Goto and S. Kitahata. 1993. Purification and some properties of alpha-galactosidase from *candida guilliermondii* H404. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 57: 372-378.

Hart, D.O., S. He., C.J. Chany., S.G. Wither., P.F.G. Sims., M.L. Sinnott and H. Brumer. 2000. Identification of Asp-130 as the catalytic nucleophile in the main α-galactosidase from *Phanerocheate chrysosporium* a family 27 glycosyl hydrolase. **J. Biochem.** 39: 9826-9836.

Harwood, R.C. and S.M. Cutting. 1990. **Molecular biological methods for *Bacillus*.** John wiley and Sons, Chichester.

Hatada,Y., N. Takeda., K. Hirasawa., Y. Ohta., R. Usami., Y. Yoshida.,W.D. Grant., S. Ito and K. Horikoshi. 2005. Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750, its expression in *Bacillus subti*lis and characterizationof the recombinant enzyme. **Extreamophiles.** 9: 497-500.

Harzlewood, G.P. and H.J. Gilbert. 1998. Structure and function analysis of *Pseudomonas* plant cell wall hydrolases. **Prog. Nucleic acid. Res. Mol. Biol.** 61: 211-241.

Hilge, M., S.M. Gloor., W. Ryphiewski., O. Sauer., T.D.Heightman., W. Zimmerman., K. Winterhalter and K. Piontek . 1998. High-resolution native and complex structures of Thermostable β-mannanase from *Thermomonospora fusca* – substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. **Structure**. 6: 1433-1444.

Hogg, D.E., J. Woo., D. Nolam., V.A. McKie., H.J. Gibert and R.W. Pickersgill. 2001. Crystal structure of mannanase 26A from *Pseudomonas cellulosa* and analysis of residues involved in substrate binding. **J. Biol. Chem.** 276: 31186-31192.

Hossain, M., Z. J.I. Abe and S. Hizukuri. 1996. Multiple forms of β-mannanase from *Bacillus* sp. KK01. **Enz. Microb. Technol**. 18: 95-98.

Jiang, Z., Y. Wei., D. Li., L. Li., P. Chai and I. Kusakabe. 2006. High-level Production, Purification and Characterization of a thermostable beta-mannanases from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. **Carbohyd. Polym.** 57: 1-9.

Johnson, K.G and N.W. Ross. 1990. Enzymatic properties of beta-mannanase from *Polyporus versicolor*. **Enz. Microb. Technol.** 12: 960-964.

Jorgensen, H., T. Eriksson., J. Borjesson., F. Tjerneld and L.Olsson. 2003. Purification and Characterization of five cellulase and xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enz. Microb. Technol.** 32: 851-861.

Juhasz, T., Z. Szengyel., K. Roczey., M. Siika-aho and L. Viikari. 2005. Characterization of cellulase and hemicellulase producted by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Proc. Biochem.** 40: 3519-3525.

Kataowa, N. and Y. Tokiwa. 1998. Isolation and characterization of and active mannanase producing anaerobic bacterium, *Clostridium tertianum* KT-5A, from lotus soil. **Appl. Microbiol.** 84: 357-367.

Khanongnuch, C., K. Asada., H. Tsuruga., T. Ooi., S. Kinoshita and S. Lumyoung. 1998. Beta-mannanase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H active for bleaching of crude pulp. **J. Ferment. Bioeng.** 86: 461-466.

Kremnicky, L., E. Slavikova., D. Mislovicova and P. Biely. 1996. Production of extracellular beta-mannanases by yeasts and yeast-like microorganism. **Folia. Microbiol.** 41: 43-47.

Kumar P.K.R., H.K. Maschke., K. Friehs. 1991. Strategies for improving plasmid instability in genetically modified bacteria in bioreacters. **Trends. Biotechnol.** 9: 279-284.

Lamotte, D., A. Gschaedler and J. Boudrant. 1994. Transitory plasmid instability during the exponential phase of growth of a recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.** 16: 1113-1118.

Lin, T.C. and C. Chen. 2003. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger*. NCH-189 using defatted copra based media. **Proc. Biochem.** 32: 1103-1109.

Lowly, O. H., N. H. Rosebrough., A. L. Farr and R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. BioChem.** 193: 265-275.

Luis, E.S., F.G. Teves and M.R. Calapardo. 2000. Nutritional value of copra meal treated with bacterial mannanase in broiler diets. **Philipp. Agric. Sci**. 72: 7-14.

Luthi, E., N.B. Jasmat., R.A. Graying., D.R. Love and P.L. Bergquist. 1991. Cloning. Sequence Analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a β-mannanase from the extremely thermophilic Bacterium *"Caldocellum saccharolyticum"*. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 694-700.

Luonteri, E., E. Alatalo, M. Siika-aho, M. penttila and M. Tenkanen. 1998. α-galactosidase of *Penicilium simplicissimum* : Production, purification and characterization of the gene encoding AGL1. **Appl. Biotechnol. Biochem.** 28: 179-188.

Ma. Y., Y. Xuc., Y. Dou., Z. Xu., W. Tao. and P. Zhou. 2004. Characterization and gene cloning of a novel β-mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. **Extremophiles**. 8: 447-454.

Manzanres, P., L.H. de Graaff. and J. Visser. 1998. Characterization of galactosidase from *Aspergillus niger* : purification of a novel α-galactosidase activity. **Enz. Microb. Technol.** 22: 383-390.

Margolles-Clark, E., M. Tenkanen., E. Luonteri and M. Penttila. 1996. Three α-galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. **Eur. J. Biochem.** 240: 104- 111.

Maruyama. Y. and T. Nakajima. 2000. The *aman6* gene encoding a yeast Mannan backbone degrading 1,6-α-D-Mannanase in *Bacillus circulan* : cloning, Sequence Analysis and expression. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 64: 2018-2020.

McCleary, B.V. and N.K. Matheson. 1983. Action patterns and substrate binding requirements of beta-D- Mannanase with Mannosaccharide and mannan-type polysaccharides. **Carbohyd.** 119: 191-217.

McCleary, B.V. 1988. Soluble, dye-labeled polysaccharides for the assay of endo-hydrolase. **Methods. Enzymol.** 160: 74-86.

McCutchen, C.M., G.D. Duffaud., P. Leduc., A.R.H. Peterson., A.Tayal., S.A. Khan. and R.M. Kelly. 1996. Characterization of extreamly thermostable enzymatic breaker (α-1, 6-galactosidase and β-1,4-mannanase) from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for hydrolysis of guar gum. **Biotechnol. Bioeng.** 52: 332-339.

Meier, H. and J.S.G. Reid. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. **Encyclopedia of Plant Physiology New Ser.** 13A: 418-471.

Mendoza, N.S., N. Arai., K. Sugimoto., M. Ueda., T. Kawaguchi. and L.M. Josen. 1995. Cloning and sequencing of β-mannanase from *Bacillus subtilis* NM-39. **Biochem. Biophys. Acta.** 1243: 552-554.

Mendoza, N.S., M. Arai., T. Kawaguchi., T. Yoshida. and L.M. Joson. 1994. Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis*. **Microbiol. Biotechnol.** 10: 551-555.

Merce, A.L., E. Fernandes., A.S. Mangrich., M.R. Sierakowki. and B. Szpoganicz. 2001. **Fe (III) - Galactomannan Solid and Aqueous Complexes. Potentiometric, EPR Spectroscopy and Thermal Data**. Available sourc http://www.scielo.br/img/fbpe/jbchs/, November/December, 2001.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.

Monitel, M.D., J. Rodriguez., M.I. Perez-Leblic., M. Hernandez., M.E. Arias and J.L. Copa-Patino. 1999. Screening of mannanases in actinomyces and their potential application in the biobleaching of pine kraft pulps. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52: 240-245.

Montiel, M.D.., M. Hernandez., J. Rodriguez. and M.E. Arias. 2002. Evaluation of and endo-mannanase produced by Streptomyces ipomoea CECT 3341 for the biobleaching of pine kraft pulps. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52: 240-245.

Neustroev, K. N., A.S. Krylov., L.M.Firsov., O.N. Abroskina. and A.Y. Khorlin. 1991. Isolation and properties of beta-mannosidase from *Aspergillus awamori*. **Biokhimiya.** 56: 1406-1412.

Nguyen, D.H., Q.A. Nguyen., R.C. Ferreira., L.C.S. Ferreier., L.T. Tran and W. Schumann. 2005. Construction of plasmid-base expression vectors for *Bacillus subtilis*. **Plasmid: in press.**

Oda, Y., T. Komaki and K. Tonomura. 1993. Purification and properties of extracellula β-mannanase produced by *Enterococcus casseliflavus* FL2121 isolated from decayed konjak. **J. Ferment. Bioeng.** 76: 14-18.

Ooi, T. and D. Kikuchi. 1995. Purification and some properties of beta-mannanase from Bacillus sp. **Microbiol. Biotechnol.** 11: 310-314.

Parks, K.K., I. Kusakabe., Y. Komatsu., G. Kobayashi., T. Yasui and K. Murakami. 1987. Purification and some properties of beta-mannanase from *Penicillin purpurogenum.* **Agric. BioChem**. 51: 2709-2716.

Pederson, D.M. and R.E. and Goodman. 1980. Isozyme of alpha-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Can. J. Microbiol.** 26: 978-984.

Phan, T.T.P., H.D. Nguyen. and W. Schumann. 2005. Novel plasmid-based expression vectors for intra and extra cellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Prot. Expr. Purif: in press.**

Phothichito, K. 2006. **Isolation and characterization of mannanase producing microorganism.** Master thesis, Kasetsart University.

Politiz, O., M. Krash., K.K. Thomsen and R. Borriss. 2000. A highly thermostable endo-(1,4)-beta mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 715-721.

Puchart, V., P. Katapodis., P. Biely., L.Kremnicky., P. Christakopoulos., M. Versanska., D. Kekos., B.J. Macris. and M.K. Bhat. 1999. Production of xylanase, Mannanase and pectinase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enz. Microb. Technol.** 24: 355-361.

Puchart, V., V. Maria., S. Pavel., P. Jan., B. Zamrut. and O. Peter. 2004. Purification and characterization of two forms of endo-i-1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly Thermomyces lanuginosus IMI 158749). **Biochem. Biophys. Acta.** 3: 239-250.

Ratto, M. and K. Pourtanen. 1988. Production of mannan-degrading enzymes. **Biotechnol. Lett.** 10: 661-664.

Regalado, C., B.E. Garcia-Almendarez., L.M. Venegas-Barrera., A. Tellez-Juradu., G. Rodriguez-Serrano., S. Huerta-Ochoa and J.R. Whitaker. 2002. Production, partial purification and propertirs of beta-mannanase obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee waste and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nig*er. **J. Sci. Food. Agric.** 80: 1343-1350.

Rios, S., A.M. Pedrgosa., I.F. Monistrol and F. Laborda. 1998. Purification and molecular properties of and alpha-galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidu*lans. **FEMS Microbiol. Lett.** 112: 35-42.

Rixon, J.E., L.M. Ferreira., A.J. Durrant., J.I. Laurie., G.P. Hazlewood. and H.J. Gilbert. 1992. Characterization of the gene CelD and its encoded product 1,4-beta-D-glucan glucohydrolase D from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. **J. Biochem.** 285: 947-955.

Sachslehner, A., D. Haltrich., G. Gubitz., B. Nidetzky and K.D. Kulbe. 1998. Efficient production of Mannan-degrading enzymes by the basidiomycetes *Sclerotium rolf*sii. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 70-71: 939-953.

Sachslehner, A. and D. Haltrich. 1999. Purification and some properties of a thermosable acidic endo-beta-1,4-D-Mannanase from *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. **FEMS Microbiol. Lett** 177: 47-55.

Sachslehner, A., G. Foidl., G. Gubitz. and D. Haltrich. 2000. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. **J. Biotechnol.** 80: 127-134.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T.Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Seo, J.H and J.E. Bailey. 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng** 27: 28-33.

Setati, M.E., P. Ademark, W.H. Van-Zyl., B. H. Hagerdal and H. Stalbrand. 2001. Expression of *Aspergillus aculeatus* endo β-1,4-mannanase encoding gene (man.1) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. **Prot. Exp. Purif.** 21: 105-114.

Shi buya, H., H. Nagasaki., S. Kaneko., S. Yoshida., G.G. Park., I. Kusakabe and H. Kobayashi. 1998. Cloning and high-level expression of α-galactosidase cDNA from *Penicillium purpurogenum*. **Appl. Environ. Microbiol**. 64: 4489-4494.

Singh, S., B. Pillay., V. Dilsook and B.A. Prior. 2000. Production and properties of hemicellulases by a *thermomyces lanuginosus* strain. **J. Appl. Microbiol.** 88: 975-982.

Stalbrand, H., M. Siika-aho., M. Tenkanen and L. Viikari. 1993. Purification and characterization of two β-mannanases from *Trichoderma reesei.* **J. Biotechnol**. 29: 229-242.

Stalbrand, H., A. Saloheimo., J. Vehmaanpera., B. Henrissat and M. Penttila. 1995. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* beta-mannanase gene containing a cellulose binding domain. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1090-1097.

Stoll, D., H. Stalbrand and R.A. J. Warren. 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. **Appl. Environ. Microbiol**. 65: 2598-2605.

Sundu, B. and J. Dingle. 2006. Use of enzymes to improve the nutritional value of palm kernel meal and copra meal. **Proc. Quensland Poult. Sci. Symp. Australia.** 11: 1-15.

Tamamura, Y., T. Araki., H. Amagoi., H. Mori. and T. Morishita. 1995. Purification and characterization ofand extracellular beta-1,4-Mannanase from marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 4454-4458.

Takada, G., T. Kawaguchi., T. Kaga., J. Sumitani and M. Arai. 1999. Cloning and sequencing of gene from *Aspergillus aculeatus* No. F-50. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63: 206-209.

Takahashi, R., I. Kusabae., S. Kusama., Y. Sakurai., K. Murakami., A. Maekawa. and T.Suzyki. 1984. Structure of glucomanno-oligosaccharides from the hydrolytic productions of Konjac glucomannan produced by a β-mannanase from *Streptomyces* sp. **Agric. Biochem.** 48: 2943-2950.

Talbot, G. and J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable β-mannanase and α-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus.* **Appl. Environ. Microbiol**. 56: 3505-3510.

Takesue, N., S. Teruo., T. Michiko., T. Fusao., A. Kazo. 2007. Production of di-D-fructofranosyl-2,6':2',6-anhydride (DFA IV) by recombinant *Bacillus subtilis* carrying heterogenous levan fructotransferase from *Arthrobacter nicitinovorans* GS-9 **Enz. Microb. Technol.** 41: 673-676.

Tenkenso, M., M.M. Perttula., L. Viikari and A. Teleman. 1997. Action of *Trichoderma reesei* mannanase on galactoglucomannan in pine kraft pulp. **J. Biotechnol.** 57: 191-204.

Titapoka, S. 2007. **Characterization of mannanase from effective bacterial strains and their application for prebiotic production.** Doctoral thesis, Kasetsart University.

Titapoka, S. 2007. Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal. **World. J. Microb. Biot: in press.**

Van den Broek, L.A.M., J. Ton., J.C. Verdoes., K.M.J. Van Laere., A.G.J. Voragen and G. Beldman. 1999. Synthesis of α-galacto-oligosaccharides by a cloned α-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. **Biotechnol. Lett.** 21: 441-445.

Vielle, C., J.M. Hess., R.M. Kelly and J.G. Zeikus. 1995. *xly* A cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana* 5068. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1867-1875.

Wongkattiya, N. 1998. **Selection of actinomyces capable of producing mannanase.** Master thesis, Chiang Mai University.

Xu, B ., P. Hagglund., H. Stalbrand and J.C. Janson. 2002. Endo- β- 1,4-mannanase from blue mussel, *Mytilus edulis* : purification, characterization and mode of action. **J. Biotechnol.** 92: 267-277.

Yamaura, I., T. Matsumoto., M. Funatu and Y. Funatu. 1990. Purification and some properties of endo-1,4-β-D-mannanase from *Pseudomonas* sp.PT-5. **Agric. Biochem.** 54: 2425-2427.

Yoshida, S., Y. Sako and A. Uchida. 1998. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for an Enzyme from *Bacillus circulans* K-1 that degrades Guar gum. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62: 514-520.

Zakaria, M.M., S. yamamoto and T. yagi. 1998. Purification and characterization of and Endo-β-1,4-mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1. **FEM MIcrobiol. Lett.** 158: 25-31.

Zapater, I.G., A.H. Ulah and R.J. Wodzinski. 1990. Extracellular alpha-galactosidase (E.C.3.2.1.22) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135, purification and characterization. **Prop. Biochem.** 20: 263-296.

Zeilinger, S., D. Kristufek., I. Arisan-Atac., R. Kodits and C.P. Kubicek. 1993. Condition of formation, purification and characterization of an α-galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1347-1353.

Zhang, J., Z. M. He and K. Hu. 2000. Purification and characterization of beta-mannanase from Bacillus licheniformis for Industrial Use. **Biotechnol. Letts.** 22: 1375-1378.

Zhao, Y., Q. Qian., W. Hui-Zhong. and H. Da-Nian. 2007. Co-transformation of gene expression cassettes via particle bombardment to generate safe transgenic plant without any unwanted DNA. **In Vitro Cel l. Develop Biol.** 43: 328-334.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani medium)

Bacto – tryptone	10.0	กรัม
Bacto – yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.5 โดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 1 N นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที (ในกรณีที่เป็นวุ้นแข็งให้เติมวุ้น 1.5% ของปริมาตรอาหาร)

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ SOB

Bacto – tryptone	20.0	กรัม
Bacto – yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC คืออาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยวิธีปลอดเชื้อ

1.4 2M น้ำตาลกลูโคส

ละลายน้ำตาลกลูโคส 1.8 กรัม ในน้ำกลั่น 3.5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

1.5 อาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ (Producing emzyme medium)

Logust bean gum	10.0	กรัม
Poly peptone	30.0	กรัม
KH_2PO_4	15.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.6	กรัม
Corn steep liquor (V/V)	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. บัฟเฟอร์และสารเคมีต่างๆ

2.1 Lysis buffer

EDTA	50	มิลลิโมลาร์
NaCl	0.1	โมลาร์

2.2 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA)

EDTA	1	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 TBE buffer (Tris-borate buffer) 5X

Tris base	108	กรัม
EDTA	9.3	กรัม
Boric acid	55	กรัม
Deionize water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.0

2.4 Potassium phosphate buffer pH 6.0

นำสารละลาย KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1 โมล่าร์ และ K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ผสมกันจนได้ค่า pH เป็น 6.0

2.5 Phenol: Chloroform (1:1)

ผสมฟีนอลและคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แล้วเททับส่วนบนด้วย TE buffer เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.6 Chloroform : Isoamyl alcohol

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แล้วเททับส่วนบนด้วย TE buffer เก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.7 20% Sarkosyl (N-lauroylsarcosine)

ชั่ง Sarkosyl 10 กรัม ค่อย ๆ ละลายด้วย deionized water ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.8 1M NaCl pH 7.5

ชั่ง NaCl 5.844 กรัม เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

2.9 3M Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate.3H_2O จำนวน 20.4 กรัม ละลายในน้ำ deionized water 25 มิลลิลิตร เติม 6M HCl จนได้ค่า pH เท่ากับ 5.2 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.10 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายแอมพิซิลลิน (Sodium salt) จำนวน 100 มิลลิกรัมในน้ำ deionized ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 ไมครอนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.11 Dinitrosalicylic acid (DNS) สำหรับวัดกิจกรรมเอนไซม์

ชั่ง 3, 5- Dinitrosalicylic acid 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายเบส (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 กรัม ในน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร) ลงไปช้า ๆ คนให้เข้ากัน นำไปอังบนอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส จากนั้นเติมโพแทสเซียม-โซเดียมตาร์เตรต ลงไปทีละน้อยจนครบ 600 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 2 ลิตรด้วยน้ำกลั่นเก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

2.12 Acrylamide/bis (30%T, 2.67%C)

Acrylamide	14.6	กรัม
N'N'-bis-methylene-acrylamide	0.4	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ deionized กรองและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด (เก็บรักษาได้นานที่สุดเป็น 30 วัน)

2.1.3 1.5M Tris-HCl pH 8.8

Tris-base	18.15	กรัม
น้ำ deionized	60	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย 6M HCl ให้ได้ pH เป็น 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ deionized รักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.4 0.5M Tris-HCl pH 6.8

Tris-base	6	กรัม
น้ำ deionized	60	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย 6M HCl ให้ได้ pH เป็น 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ deionized รักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.15 eletrode (running buffer) pH 8.3 (1X)

Tris-base	3	กรัม
Glycine	14.4	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ deionized

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปาณิสรา เหมินทร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 12 มิถุนายน 2524
สถานที่เกิด	ยะลา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. ชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	Technical Support
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	Cybeles (Thailand) CO.,LTD
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-