



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลน การแสดงออก และสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Klebsiella oxytoca* CW2-3

Cloning, Expression and Characterization of Mannanase from *Klebsiella oxytoca* CW2-3

นามผู้วิจัย นางสาวนพวรรณ พงษ์พิพัฒน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลน การแสดงออก และสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Klebsiella oxytoca* CW2-3

Cloning, Expression and Characterization of Mannanase from *Klebsiella oxytoca* CW2-3

โดย

นางสาวนพวรรณ พงษ์พิพัฒน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. ๒๕๕๗

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นวพรรณ พงษ์พัฒน์ 2557: การโคลน การแสดงออก และสมบัติของเอนไซม์แมน
นาเนสจาก *Klebsiella oxytoca* CW2-3 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc. 148 หน้า

โคลนยีนแมนนาเนสจากธนาคารยีนของ *Klebsiella oxytoca* CW2-3 พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 3,314 คู่เบส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบ open reading frame (ORF) ของยีนแมนนาเนสขนาด 1,164 คู่เบส ซึ่งให้รหัสสำหรับกรดอะมิโนจำนวน 387 ตัว ให้ชื่อเป็น KMAN-2 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับแมนนาเนสจากแบคทีเรียอื่น 50-71 เปอร์เซ็นต์ และจัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolase แฟมิลี 26 ภายหลังการสับโคลนยีนแมนนาเนส *kman-2* เข้าสู่เวกเตอร์ pFlag-CTS และมีการแสดงออกของยีนแบบ overexpression ใน *Escherichia coli* TOP10 ได้เซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 ที่สามารถผลิต เอนไซม์แมนนาเนส KMAN ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 43.2 กิโลดาลตัน มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส และ 4-6 ตามลำดับ มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำและพีเอชช่วงกว้าง 4-10 และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลากหลายคือ คอนยัคกลูโคแมนแนน (KGM) (100%) โลคัสบินกัม (LBG) (92.63%) CMC (30.56%) Ivory nut mannan (5.98%) Avicel (4.98%) และกากมะพร้าว ที่ที่ไม่สกัดไขมัน (5.28%) และสกัดไขมัน (DCM) (7.02%) เมื่อวิเคราะห์ hydrolysate ที่ได้จากการย่อย KGM, LBG และ DCM ด้วยเทคนิค TLC พบโพลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงการทำงานของเอนไซม์แบบตัดภายในสายหลักของสับสเตรท นอกจากนี้ hydrolysate จาก LBG และ DCM สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะอยู่ในช่วง 0.36-0.83 ต่อชั่วโมง ขณะที่ hydrolysate จาก KGM ไม่มีผลต่อการเจริญ เมื่อทำการศึกษาลดน้ำตาลต่อกลุ่มเชื้อก่อโรค พบว่าแบคทีเรียก่อโรคสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี hydrolysate ทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะอยู่ในช่วง 0.21-0.58 ต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าค่าการเจริญจำเพาะในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส

Nawapan Pongsapipatana 2014: Cloning, Expression and Characterization of Mannanase from *Klebsiella oxytoca* CW2-3. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sunee Nitisinprasert, D.Sc. 148 pages.

A gene encoding a mannanase was cloned from the genomic library of *Klebsiella oxytoca* CW2-3. A 3,314 bp DNA fragment containing a mannanase gene was sequenced. An open reading frame (ORF) of 1,164 bp encoded a protein of 387 amino acids named KMAN-2 which exhibited 50-71% identity to β -mannanase produced by other microbial sources. It belonged to glycosyl hydrolase family 26. The mannanase gene *kman-2* was subcloned into pFlag-CTS and overexpressed in *Escherichia coli* TOP10 resulting in an active recombinant clone *E. coli* KMAN-2. Its molecular weight was approximately 43.2 kDa on SDS-PAGE. The optimum temperature and pH of KMAN were 30-50 °C and 4-6, respectively. It was stable at low temperature and wide pH range of 4-10. The enzyme also has wide range of substrate specificities of konjac glucomannan (KGM) (100%), locust bean gum (LBG) (92.63%), CMC (30.56%), Ivory nut mannan (5.98%) Avicel (4.98%) and copra meal in both non-defatted (5.28%) and defatted (DCM) (7.02%). The hydrolysate of KGM, LBG and DCM analyzed by TLC were difference in molecular weight indicating an endo action of mannanase. Moreover, the hydrolysates of LBG and DCM enhanced the growth of lactic acid bacteria with specific growth rate of 0.36-0.83 h⁻¹ while the one of KGM did not. Considering to their effects to pathogenic bacteria, it was found that all pathogenic bacteria could grow in the medium containing each three hydrolysates at the specific growth rate of 0.21-0.58 h⁻¹ which were lower than specific growth rate of bacteria in glucose condition.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและ
ผศ. ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. วิลาวัลย์ สินธุประภา
ประธานการสอบ และ ผศ. ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำปรึกษาในการ
เรียน การทำวิจัย ตลอดจนการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ
การอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. มณฑารพ ยมาภัย สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชา
เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้อเฟื้อพลาสมิดเวกเตอร์ pFlag-CTS และ
บริษัท Alltech Inc. (USA) ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างฟรีไบโอติกส์ ACTIGEN™ รวมถึง ดร. ศิริลักษณ์
เลี้ยงประยูรและพี่ๆ ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรที่
เอื้ออุปกรณ์ สถานที่ ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำ Thin layer chromatography ซึ่งทำ
ให้ผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยให้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ได้มอบวิชาความรู้
และคำแนะนำต่างๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ
ขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนๆ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ โดยเฉพาะ
น.ส. วรินทร์ เอกสุรีย์ น.ส. อรพรรณ ละอองคำ ดร. มัสติน นาคไพจิตร น.ส. สุภัจรี เรืองสมวงศ์
และนางอัจฉรา ไชยองค์การ สำหรับความช่วยเหลือมากมาย รวมถึงคำแนะนำทั้งในการใช้ชีวิตและ
การทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อศิษย์ คุณแม่อรสา พงษ์พิพัฒน์ และทุกคนในครอบครัวที่
เข้าใจ คอยให้คำปรึกษาแนะนำ ปลุกดันและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

นพวรรณ พงษ์พิพัฒน์

มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	33
ผลและวิจารณ์	49
สรุป	93
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	95
ภาคผนวก	117
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	118
ภาคผนวก ข สารเคมีและการวิเคราะห์	121
ภาคผนวก ค ผลการทดลอง	139
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	148

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แหล่งของเอนไซม์แมนนาเนส	10
2 เซลล์เจ้าบ้านและเวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนแมนนาเนส	19
3 เซลล์เจ้าบ้านและเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนแมนนาเนส	20
4 เชื้อจุลินทรีย์ และสภาวะการเจริญ	28
5 โปรเมอ์สำหรับการ subclone ยีนแมนนาเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pFlag-CTS	38
6 ปริมาณเซลล์ลูกผสมที่ได้จากการถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยใช้ จิโนมิกดีเอ็นเอขนาด 3-7 กิโลเบส	54
7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>kman-1</i> ด้วยโปรแกรม Blast X	63
8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสแต่ละช่วงเวลาของการเหนี่ยวนำในส่วนต่างๆ ของเซลล์	73
9 กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเมื่อแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่เวลาผลิต 8 ชั่วโมง	74
10 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	76
11 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์	81
12 ระบบตัวทำละลายสำหรับการแยกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค TLC	82
13 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการย่อยสับสเตรทคอนยัคกูโคแมนแนนโลคัสบีนกัม และกากมะพร้าวที่สกัดไขมันแล้ว	85
14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์ ที่ 24 ชั่วโมง	86
15 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชม. ⁻¹) ของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรีย ก่อโรคเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ผสมโอลิโกแซคคาไรด์	92

ตารางผนวกที่

ข1 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา ligation ในการทำธนาคารยีน	126
ข2 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา ligation ระหว่างยีนแมนนาเนสกับ pFlag-CTS	127
ข3 ส่วนประกอบของ sample buffer	135

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข4 ส่วนประกอบของ separation และ stacking gel	136
ข5 การเตรียมซีเทรทบัฟเฟอร์	137
ข6 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	138
ข7 การเตรียมไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์	138
ค1 ค่ากิจกรรมไอโซมิกซ์เจอร์ของแมนนอสในแต่ละส่วนของเซลล์ที่เวลาต่างๆ	140
ค2 ค่า Rของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์มาตรฐาน M1-M6 บนตัวทำละลาย A, B, C, D, E และ F	140
ค3 ค่า Rของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์มาตรฐาน M1-M6 บนตัวทำละลาย 1-butanol : acetic acid : น้ำ โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนที่ใช้	141
ค4 ค่า Rของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับเสตรทโลคัส ปีนกัมบนแผ่นซีลิกาเจล	142
ค5 ค่า Rของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับเสตรทคอนยัคกลูโคแมนแนนบนแผ่นซีลิกาเจล	143
ค6 ค่า Rของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับเสตรทกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้วบนแผ่นซีลิกาเจล	145

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทั่วไปของ mannan และ heteromannan	6
2	การทำงานของเอนไซม์ β -mannanase and α -galactosidase บนโมเลกุลของกาแลคโตแมนแนน	8
3	อนุกรมวิธานของ <i>Klebsiella oxytoca</i>	13
4	แผนที่เวกเตอร์ pUC19	29
5	แผนที่เวกเตอร์ pFlag-CTS	30
6	ลักษณะจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ <i>K. oxytoca</i> CW2-3	49
7	ลักษณะพลาสมิด pUC19 สกัดจากเชื้อ <i>E. coli</i> DH5 α	50
8	จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>K. oxytoca</i> CW2-3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sau</i> 3AI 0.5 หน่วย/ไมโครลิตร	51
9	ลักษณะพลาสมิด pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI	52
10	ดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของจีโนมิกดีเอ็นเอและพลาสมิดในอัตราส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอต่อพลาสมิด 1:1, 1:3 และ 3:1	53
11	ลักษณะของโคลนที่แสดงกิจกรรมแมนแนนส	55
12	กิจกรรมเอนไซม์แมนแนนสจากเซลล์ลูกผสม <i>E. coli</i> KMAN-1	56
13	การตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสม pKMAN-1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI	57
14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนในพลาสมิดลูกผสม	59
15	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนแมนแนนส	60
16	ตำแหน่ง -35 และ -10 promoter วิเคราะห์จากโปรแกรม BPROM (Softberry)	62
17	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนแนนสแฟมิลี 26	64
18	วิเคราะห์ตำแหน่งของ signal sequence ด้วยโปรแกรม SignalP	65
19	โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แมนแนนส KMAN จากโปรแกรม SWISS-MODEL (A) และ โปรแกรม RaptorX (B)	66
20	Expression vector pFlag-CTS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI และ <i>Kpn</i> I	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ No.298-ExF และ No.298-ExR	68
22	รูปแบบดีเอ็นเอลูกผสมวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส	69
23	ผลการตรวจสอบเซลล์ลูกผสมด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ No.298-ExF และ No.298-ExR	70
24	กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสของเซลล์ลูกผสมเมื่อทดสอบด้วยวิธี gel diffusion assay	71
25	กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะจากส่วน extracellular, periplasm และ cytoplasm	73
26	ลักษณะแถบโปรตีนในแต่ละขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA purification system	75
27	น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แมนนาเนสจาก <i>E. coli</i> KMAN-2	77
28	พีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ	78
29	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ	79
30	โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์ ภายใต้สภาวะต่างๆ	83
31	ใช้ตัวทำละลาย 1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนที่ใช้	84
32	โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์วิเคราะห์โดยวิธี TLC	87

ภาพผนวกที่

ข1	กราฟมาตรฐานดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส	128
ข2	กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส	131
ข3	กราฟมาตรฐาน BSA	132
ข4	กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน SeeBlue® Plus2 prestained standard	137
ค1	โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยสับสเตรทโกลด์สปีนกับวิเคราะห์โดยวิธี TLC	141

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค2 โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยสับเสตรทคอนยัคกลูโคแมน แน่ววิเคราะห์โดยวิธี TLC	143
ค3 โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยสับเสตรทากมะพร้าวที่สกัด ไขมันแล้ววิเคราะห์โดยวิธี TLC	144
ค4 กราฟการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก	146
ค5 กราฟการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค	147

การโคลน การแสดงออก และสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Klebsiella oxytoca*

CW2-3

Cloning, Expression and Characterization of Mannanase from *Klebsiella oxytoca*

CW2-3

คำนำ

มะพร้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย นอกจากนำมาเป็นอาหารได้โดยตรงแล้ว ยังสามารถนำไปแปรรูปในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมผลิตมะพร้าวแห้ง อุตสาหกรรมน้ำมันมะพร้าว อุตสาหกรรมกะทิเข้มข้น อุตสาหกรรมมะพร้าวชุดแห้ง และมะพร้าวอ่อน ซึ่งผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเหล่านี้ คือ กากมะพร้าว โดยประมาณ 84% พบอยู่ในรูปกากมะพร้าวปราศจากไขมันที่เป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมน้ำมันมะพร้าว (Khanongnuch *et al.*, 2006) กากมะพร้าวสามารถใช้เป็นแหล่งของพลังงานและโปรตีนในอาหารสัตว์ได้ เช่น สุกร (O'Doherty and McKeon, 2000; Dung *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามสัตว์สามารถนำไปใช้ได้น้อยเนื่องจาก 26% ของกากมะพร้าวเป็นสารประกอบจำพวกแมนแนน มีกาแลคโตแมนแนน 61% และเซลลูโลส 13% (Aspinall, 1970; Sandu and Dingle, 2003) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์พืชที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน (Capoe *et al.*, 2000) การมีสารประกอบแมนแนนและกาแลคโตแมนแนนสูงจะทำให้การย่อยสลายและการนำสารอาหารไปใช้ได้ลดลง (Mendoza *et al.*, 1994) ซึ่งถือว่าสารประกอบเหล่านี้เป็น anti-nutritional substance การใช้เอนไซม์แมนนาเนสทำให้เกิดการย่อยสารประกอบเหล่านี้ได้น้ำตาลแมนโนสเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (Manno-oligosaccharide) เพื่อใช้เป็นพรีไบโอติกส์ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอีกด้วย

มีการนำเอนไซม์แมนนาเนสไปใช้ในหลากหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร สัตว์ อุตสาหกรรมฟอกกระดาษ อุตสาหกรรมทำกาแฟสำเร็จรูป และอุตสาหกรรมทำน้ำยาซักฟอก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งมีมากมายหลายชนิดรวมถึง แบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella oxytoca* CW2-3 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้าแมนแนนเนสได้ และสามารถย่อยแมนแนนจากกากมะพร้าวได้ สารประกอบแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ได้ ที่ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* ซึ่งเป็น

สายพันธุ์โพรบิโอดิกส์และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Enteritidis ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคได้ (Titapoka *et al.*, 2008) แต่เนื่องจาก *K. oxytoca* CW2-3 สามารถผลิตเอนไซม์แมนแนนเอสได้ต่ำและเป็นแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้นจึงมีการศึกษาการโคลนยีนที่กำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์เบต้าแมนแนนเนส จาก *K. oxytoca* CW2-3 เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้



วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการโคลนยีนแมนนาเนสจากแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* CW2-3
2. ศึกษาสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสมที่ได้



การตรวจเอกสาร

1. แมนแนน

แมนแนน (mannan) และเฮเทอโรแมนแนน (heteromannan) เป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ในผนังเซลล์พืชซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในไม้เนื้อแข็ง (hard woods) และไม้เนื้ออ่อน (soft woods) (Capoe *et al.*, 2000) ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น ไซโลส (xylose), แมนโนส (mannose), กาแลคโตส (galactose) และ อะราบินโนส (arabinose) ซึ่งประกอบกันเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นทั้งเส้นตรงและเส้นกิ่ง (Filho, 1998)

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายในสารละลายที่เป็นด่าง (Selvendran and O'Neill, 1985) มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดเช่น กลูโคส (glucose) กาแลคโตส (galactose) แมนโนส (mannose) ไซโลส (xylose) และอะราบินโนส (arabinose)

โครงสร้างของแมนแนน

แมนแนนมีลักษณะโมเลกุลคล้ายรีบิ้นซึ่งมีความยืดหยุ่นมากกว่าเซลลูโลส แต่มีความหนาแน่นน้อยกว่าเซลลูโลส (Warren, 1996) แมนแนนมี 2 ชนิดคือ Mannan I หรือ A และ Mannan II หรือ B ซึ่ง mannan I จะมีลักษณะที่เป็น crystalline สูงและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ในขณะที่ mannan II มีน้ำหนักโมเลกุลสูงแต่มีลักษณะ crystalline น้อย (Aspinall, 1959)

แมนแนนสามารถจำแนกได้เป็น 4 subfamily ตามโครงสร้าง คือ (1) แมนแนนที่เป็นเส้นตรงหรือแมนแนนบริสุทธิ์ (linear mannan or pure mannan) เช่น ivory nut mannan และเมล็ดกาแฟ (2) กาแลคโตแมนแนน (galactomannan) เช่น โลคัสบีนกัม (locust bean gum) และกัวกัม (guar gum) (3) กลูโคแมนแนน (glucomannan) เช่น คอนยัค และ (4) กาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucoman) พบมากในไม้เนื้ออ่อน (Petkowicz *et al.*, 2001)

แมนแนนที่เป็นเส้นตรงหรือแมนแนนบริสุทธิ์ (Linear mannan or pure mannan) เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลแมนโนส ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสมากกว่า 95% เชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,4 จัดเป็นโฮโมโพลิแซคคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ไม่ละลายน้ำเนื่องจากมีโมเลกุลของ น้ำตาล

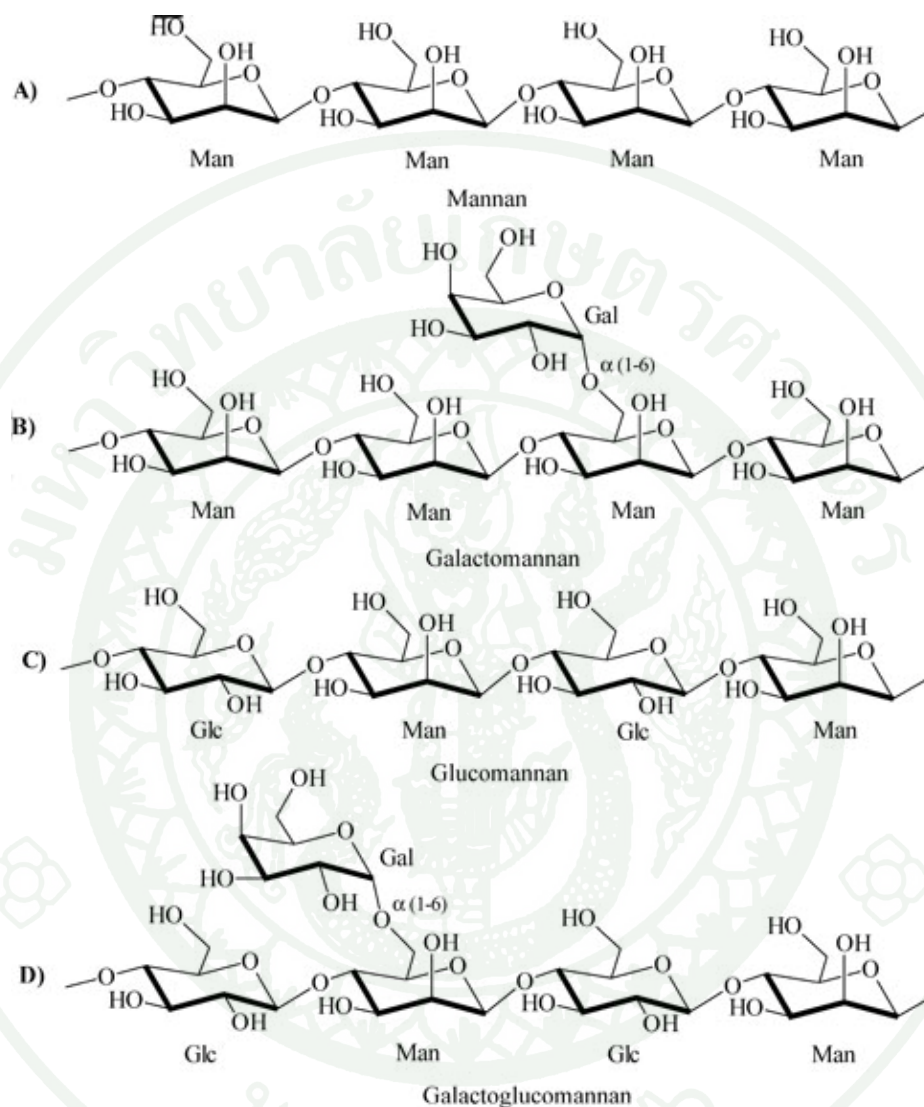
กาแลกโตสในสายของโพลิแซคคาไรด์น้อยกว่า 5% ในขณะที่กาแลกโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และกาแลกโตกลูโคแมนแนน จะมีส่วนประกอบของกาแลกโตสหรือกลูโคสหรือทั้งกาแลกโตสและกลูโคสรวมอยู่ด้วย (Aspinal, 1959)

กาแลกโตแมนแนน (Galactomannan) เป็นโพลิแซคคาไรด์ในพืช สายหลัก (backbone) ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส (D-mannose) เชื่อมด้วยพันธะ β -1,4 สามารถละลายน้ำได้ เนื่องจากมีส่วนประกอบของน้ำตาลกาแลกโตส และกิ่ง (side chain) ที่เป็นน้ำตาลกาแลกโตส (D-galactose) เชื่อมด้วยพันธะ α -1,6 (McCleary and Matheson 1986; Shobha *et al.* 2005; Parvathy *et al.* 2005) สามารถพบได้ใน fenugreek gum (มีอัตราส่วนระหว่างแมนโนสต่อกาแลกโตส 1:1), guar gum (มีอัตราส่วนระหว่างแมนโนสต่อกาแลกโตสประมาณ 2:1), tara gum (มีอัตราส่วนระหว่างแมนโนสต่อกาแลกโตสประมาณ 3:1) และ locust bean gum หรือ carob gum (มีอัตราส่วนระหว่างแมนโนสต่อกาแลกโตสประมาณ 4:1) กาแลกโตแมนแนนมักใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในอาหาร (stabilizer) อีกด้วย guar gum และ locust bean gum (LBG) มักใช้ในการทำไอศกรีมเพื่อเพิ่มเนื้อสัมผัสและลดการละลายของไอศกรีม LBG ยังใช้ในการทำ cream cheese, น้ำผลไม้ และน้ำสลัดอีกด้วย

กลูโคแมนแนน (Glucomannan) เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ เป็นส่วนประกอบของเฮมิเซลลูโลสที่มีมากที่สุดในไม้เนื้ออ่อน มีลักษณะเป็นเส้นตรงและมีกิ่งก้านน้อย สายหลักประกอบด้วยสายของน้ำตาลแมนโนส (D-mannose) กับน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) เชื่อมด้วยพันธะ β -1,4 ในอัตราส่วน 1.6:1 (Katsuraya *et al.*, 2003) มีกิ่งก้านประมาณ 8% เชื่อมด้วยพันธะ β -1,6 และ/หรือ 1,3 (Aspinall *et al.* 1962) กลูโคแมนแนนมักใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) และสารเพิ่มความเข้มข้น (thickener) ในไม้เนื้อแข็งจะประกอบด้วยกลูโคแมนแนนที่มีอัตราส่วนของกลูโคสต่อแมนโนส 1:1.5-2 (Timell 1967; Hongshu *et al.* 2002)

กาแลกโตกลูโคแมนแนน (Galactoglucomannan) เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่สายหลักประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) และแมนโนส (D-mannose) เชื่อมด้วยพันธะ β -1,4 โดยมีน้ำตาลกาแลกโตส (D-galactose) เป็นเส้นกิ่งเชื่อมด้วยพันธะ α -1,6 (Aspinall *et al.* 1962, Popa and Spiridon 1998)

โครงสร้างทั่วไปของ mannan และ heteromannan แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของ mannan และ heteromannan

- A) โครงสร้างแมนแนนประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเชื่อมด้วยพันธะ β -1,4
- B) โครงสร้างกาแลคโตแมนแนน ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส เชื่อมด้วยพันธะ β -1,4 ซึ่งเป็นสายหลัก และมีเส้นกิ่งคือน้ำตาลกาแลคโตสเชื่อมด้วยพันธะ α -1,6 ยึดติดอยู่กับแมนโนส
- C) โครงสร้างกลูโคแมนแนน สายหลักประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลกลูโคสเชื่อมด้วยพันธะ β -1,4

- D) โครงสร้างของกาแลคโตกลูโคแมนแนน สายหลักประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลกลูโคส เชื่อมด้วยพันธะ β -1,4 โดยมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นเส้นกิ่งเชื่อมด้วยพันธะ α -1,6 ยึดติดกับโมเลกุลแมนโนส

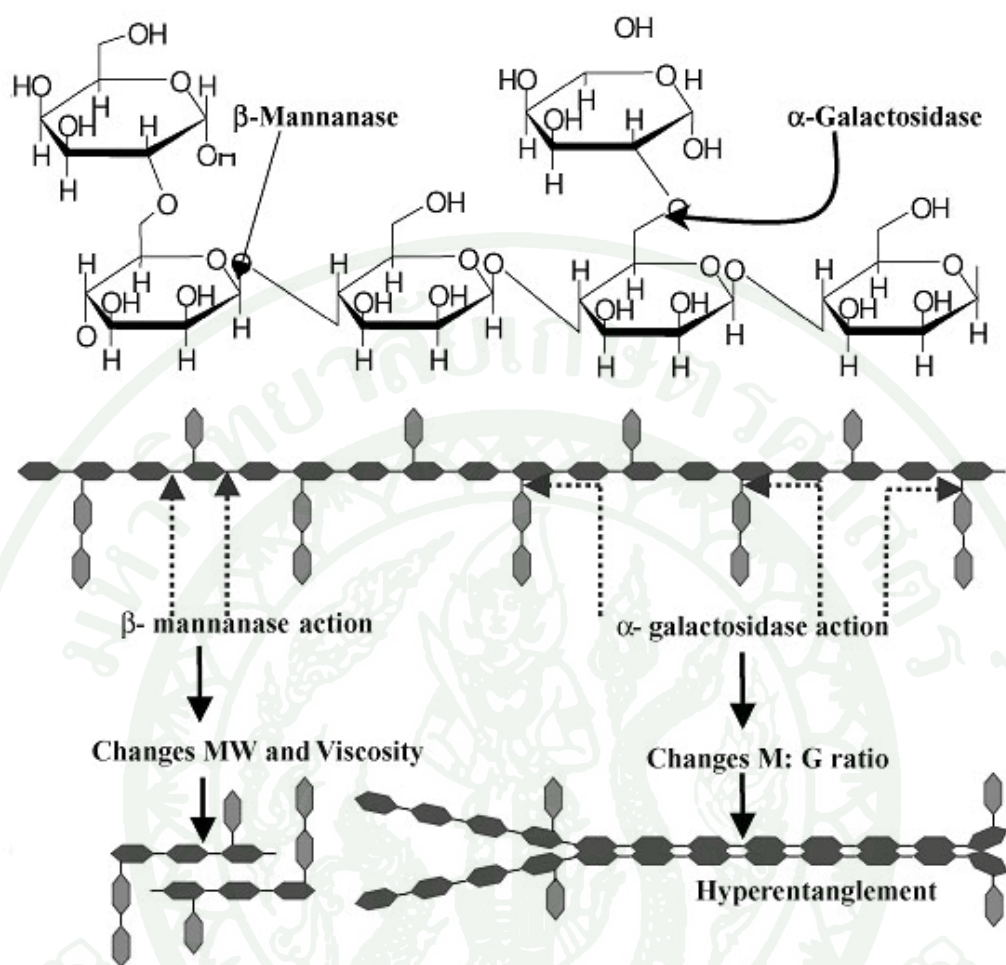
ที่มา: Dhawan and Kaur (2007)

2. เอนไซม์ย่อยแมนแนน (Mannan-degrading enzyme)

2.1 ชนิดของเอนไซม์ย่อยสลายแมนแนน

เอนไซม์ที่ย่อยสลายแมนแนนประกอบด้วยเอนไซม์ β -mannanase (1,4- β -D-mannan mannohydrolase, EC 3.2.1.78), β -mannosidase (1,4- β -D-mannopyranoside hydrolase, EC 3.2.1.25) และ β -glucosidase (1,4- β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) พบว่าเฉพาะเอนไซม์ β -mannanase เพียงชนิดเดียวที่สามารถตัดพันธะภายในสายหลักของแมนแนนและกาแลคโตแมนแนน ได้ผลผลิตเป็นแมนโนไตรโอส (mannotriose), แมนโนไบโอส (mannobiose) และแมนโนส (mannose) (Sabini *et al*, 2000)

นอกจากนี้ ยังพบว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย side chain ของแมนแนนคือ β -glucosidases (EC 3.2.1.21), α -galactosidases (EC 3.2.1.22) และ acetyl mannan esterases โครงสร้างที่ซับซ้อนของแมนโนสหรือสารประกอบในรูปโครงสร้างแมนแนนที่มีในพืชสามารถย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (Tenkanen, 1998; Filho, 1998) การทำงานของเอนไซม์ β -mannanase and α -galactosidase ในการย่อยสารประกอบกาแลคโตแมนแนน แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ β -mannanase and α -galactosidase บนโมเลกุลของกาแลคโตแมนแนน

ที่มา: Dhawan and Kaur (2007)

2.1.1 β -mannanase (1,4- β -D-mannan mannohydrolase, EC 3.2.1.78)

β -mannanase ผลิตโดยพืช รา และแบคทีเรีย เป็นเอนไซม์ย่อยสลายแมนแนนที่ตัดภายในสายโพลีแซคคาไรด์ (endo type) เช่นการตัดพันธะภายในสายหลักของแมนแนน กาแลคโตแมนแนนและกลูโคแมนแนนที่ตำแหน่ง β -1,4 แบบส้อม เอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม family 5 และ 26 ของกลุ่ม glycosyl hydrolase (Henrissat, 1990; Henrissat and Bairoch, 1993; Henrissat and Bairoch, 1996)

2.1.2 β -mannosidase (1,4- β -D-mannopyranoside hydrolase, E.C

3.2.1.25)

β -mannosidase เป็นเอนไซม์ย่อยสลายแมนแนนที่ตัดบริเวณปลายของสายโพลีแซคคาไรด์ (exo type) ด้วยการตัดน้ำตาลแมนโนส 1 โมเลกุลหรือมากกว่า 1 โมเลกุลออกจากปลายของสายโพลีแซคคาไรด์ ที่ตำแหน่ง β -1,4 จากปลายสายของแมนแนนและแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannooligosaccharide) ที่เป็น nonreducing end

2.1.3 β -glucosidase (1,4- β -D-glucoside glucohydrolase, E.C 3.2.1.21)

β -glucosidase เป็นเอนไซม์ย่อยสลายแมนแนนที่ตัดบริเวณปลายของสายโพลีแซคคาไรด์ (exo type) ย่อยสลายปลาย nonreducing end ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์ β -mannanase ที่ตำแหน่ง 1,4- β -D-glucopyranose นอกจากนี้ยังสามารถย่อย side chain ของกาแลคโตแมนแนนและกาแลคโตกลูโคแมนแนนที่ตำแหน่ง α -1,6-linked D-galactopyranosyl ด้วย

2.2 แหล่งของเอนไซม์ β -mannanase

β -mannanase ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย (Tamaru *et al.*, 1995), เชื้อรา (Kurakake *et al.*, 2006), พืชและสัตว์ (McCleary, 1988) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แหล่งของเอนไซม์แมนนาเนส

สิ่งมีชีวิต	อ้างอิง
1.1 แบคทีเรีย	
<i>Acinetobacter</i> sp. ST1-1	(Titapoka <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bacillus agaradhaerens</i>	(Bettiol and Showell, 2002)
<i>Bacillus</i> sp. AM001	(Akino <i>et al.</i> , 1989)
<i>Bacillus brevis</i>	(Araujo and Ward, 1990)
<i>Bacillus circulans</i> K-1	(Yosida <i>et al.</i> , 1998)
<i>Bacillus polymyxa</i>	(Araujo and Ward, 1990)
<i>Bacillus</i> sp. JAMB-750	(Hatada <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bacillus</i> sp. 1633	(Kauppinen <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bacillus</i> sp. M50	(Chen <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bacillus</i> sp. N16-5	(Ma <i>et al.</i> , 2004)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	(Talbot and Sygusch, 1990)
<i>Bacillus subtilis</i>	(Mendoza <i>et al.</i> , 1994)
<i>Bacillus subtilis</i> B36	(Li <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bacillus subtilis</i> BM9602	(Li <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bacillus subtilis</i> SA-22	(Sun <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	(Helow and Khattab, 1996)
<i>Bacteroides ovatus</i>	(Gherardini and Salyers, 1987)
<i>Bacteroides rumenicola</i>	(Matsushita <i>et al.</i> , 1991)
<i>Caldibacillus cellulosivorans</i>	(Sunna <i>et al.</i> , 2000)
<i>Caldocellulosiruptor saccharolyticus</i>	(Morris <i>et al.</i> , 1995)
<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	(Bicho <i>et al.</i> , 1991)
<i>Cellulomonas fimi</i>	(Stoll <i>et al.</i> , 1999, 2000)
<i>Clostridium butyricum/beijerinckii</i>	(Nakajima and Matsuura, 1997)
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	(Perret <i>et al.</i> , 2004)
<i>Clostridium tertium</i>	(Kataoka and Tokiwa, 1998)
<i>Clostridium thermocellum</i>	(Halstead <i>et al.</i> , 1999)
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	(Gibbs <i>et al.</i> , 1999)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	อ้างอิง
<i>Flavobacterium</i> sp.	(Zakaria <i>et al.</i> , 1998)
<i>Klebsiella oxytoca</i> CW2-3	(Titapoka <i>et al.</i> , 2008)
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	(Pason and Ratanakhanokchai, 2006)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> GS01	(Cho <i>et al.</i> , 2006)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> subsp. <i>Cellulosa</i>	(Braithwaite <i>et al.</i> , 1995)
<i>Rhodothermus marinus</i>	(Politz <i>et al.</i> , 2000)
<i>Streptomyces galbus</i>	(Kansoh and Nagieb, 2004)
<i>Streptomyces lividans</i>	(Arcand <i>et al.</i> , 1993)
<i>Thermoanaerobacterium Polysaccharolyticum</i>	(Cann <i>et al.</i> , 1999)
<i>Thermomonospora fusca</i>	(Hilge <i>et al.</i> , 1998)
<i>Thermotoga maritima</i>	(Parker <i>et al.</i> , 2001)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	(Duffaud <i>et al.</i> , 1997)
<i>Vibrio</i> sp.	(Tamaru <i>et al.</i> , 1997)
1.2 เชื้อรา	
<i>Agaricus bisporus</i>	(Tang <i>et al.</i> , 2001)
<i>Aspergillus tamarii</i>	(Civas <i>et al.</i> , 1984)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	(Christgau <i>et al.</i> , 1994)
<i>Aspergillus awamori</i>	(Setati <i>et al.</i> , 2001)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(Puchart <i>et al.</i> , 2004)
<i>Aspergillus niger</i>	(Ademark <i>et al.</i> , 1998)
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL	(Regaldo <i>et al.</i> , 2000)
<i>Aspergillus sulphureus</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2007)
<i>Aspergillus terreus</i>	(Huang <i>et al.</i> , 2007)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(Wymelenberg <i>et al.</i> , 2005)
<i>Piromyces</i> sp.	(Fanutti <i>et al.</i> , 1995)
<i>Trichoderma reesei</i>	(Stalbrand <i>et al.</i> , 1993, 1995)
<i>Trichoderma harzanium</i> strain T4	(Franco <i>et al.</i> , 2004)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	อ้างอิง
<i>Sclerotium rolfsii</i>	(Sachslehner <i>et al.</i> , 2000)
1.3 พืช	
Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) seed	(Filichkin <i>et al.</i> , 2004)
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> L.) endosperm cell wall	(Dutta <i>et al.</i> , 1997)
Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	(Hrmova <i>et al.</i> , 2006)
1.4 สัตว์	
Blue mussel (<i>Mytilus edulis</i>)	(Xu <i>et al.</i> , 2002)
Brown garden snail/slug (<i>Gastropoda pulmonata</i>)	(Charrier and Rouland, 2001)
Snail (<i>Littorina brevicula</i>)	(Yamamura <i>et al.</i> , 1996)
Mud snail (<i>Pomacea insularis</i>)	(Yamamura <i>et al.</i> , 1993)

ที่มา: คัดแปลงจาก Dhawan and Kaur (2007)

Titapoka *et al.* (2008) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสและขับออกมานอกเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการผลิต manno-oligosaccharide ซึ่งจัดเป็นสาร prebiotic พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella oxytoca* CW2-3 และ *Acinetobacter* sp. ST1-1 มีกิจกรรมเอนไซม์สูง โดยสายพันธุ์ ST1-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 0.290 U/ml นอกจากนี้เอนไซม์แมนนาเนสจากทั้ง 2 สายพันธุ์ยังมีการเพิ่มการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 โดยสายพันธุ์ *Klebsiella oxytoca* CW2-3 มีกิจกรรมการเพิ่มการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 สูงสุดคือ 2.15 logCFU/ml และมีกิจกรรมการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella Enteritidis* ในขณะที่สายพันธุ์ ST1-1 มีกิจกรรมการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Salmonella Enteritidis* ต่ำคือ 0.46-1.78 logCFU/ml นอกจากนี้ *K. oxytoca* CW2-3 ยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงกว้างตั้งแต่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส ซึ่งยังคงพบกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 82% ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *Acinetobacter* sp. ST1-1 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิต่ำ โดยค่า relative activity ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 42 และ 20% ที่อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ

3. แบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* CW2-3

อนุกรมวิธานและลักษณะพื้นฐานวิทยาของ *Klebsiella oxytoca*

Klebsiella เป็นสายพันธุ์ที่เก่าแก่ที่สุดในบรรดาสายพันธุ์อื่นในตระกูล *Enterobacteriaceae* ค้นพบในปีค.ศ.1885 (Grimont *et al.*, 1991; Ørskov, 1984) ซึ่งมีอนุกรมวิธานดังแสดงในภาพที่ 3

Kingdom: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Class: *Gamma Proteobacteria*

Order: *Enterobacteriales*

Family: *Enterobacteriaceae*

Genus: *Klebsiella*

Species: *Klebsiella oxytoca*

ภาพที่ 3 อนุกรมวิธานของ *Klebsiella oxytoca*

ที่มา: Grimont and Grimont (2005)

Klebsiella oxytoca เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ และมีรูปแท่ง (rod-shaped) มีขนาดประมาณ 2 ไมครอน สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *Klebsiella pneumoniae* ความแตกต่างระหว่าง *Klebsiella* กับสายพันธุ์อื่นที่ใกล้เคียงกันเช่น *E. coli* และ *Salmonella* คือ เซลล์ของ *Klebsiella* จะมีเมือกหนาห่อหุ้มหรือผลิตสารในลักษณะ extracellular polysaccharide ที่เรียกว่า “แคปซูล” ซึ่งจะปกป้องเซลล์จากการสูญเสียความชื้น (dessication) หรืออาจปกป้องเซลล์จากการกินโดยวิธี phagocytosis (cell eating) บางสายพันธุ์ของ จินส์สามารถผลิต extracellular toxic complex ซึ่งประกอบด้วย capsular polysaccharide 63%,

lipopolysaccharide 30% และ protein 7% เมื่อทดสอบในหนูทดลองพบว่า สารพิษนี้เป็นอันตรายร้ายแรงต่อปอดของหนู (Straus, 1987)

Klebsiella หลายสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เช่น เปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้เป็นแอมโมเนียและกรดอะมิโน ในสายพันธุ์ M5a1 ซึ่งคัดเลือกเมื่อต้นปี 1950 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีแคปซูลห่อหุ้ม จึงเป็นสายพันธุ์ที่เลือกเพื่อใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ dinitrogen fixation และกระบวนการเมตาบอลิซึมอื่นๆ สายพันธุ์นี้เรียกว่า *Aerobacter* และเปลี่ยนชื่อในภายหลังเป็น *Klebsiella pneumoniae* แต่เมื่อมีการจัดประเภทใหม่ (re-classification) จึงเปลี่ยนชื่อเป็น *Klebsiella oxytoca* เนื่องจากมีกระบวนการทางชีวเคมีที่ต่างจาก *K. pneumoniae*

Klebsiella เป็นแบคทีเรียก่อโรคนวโอกาสที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดินและในน้ำ สถานที่ที่พบเชื้อกลุ่มนี้อาจแบ่งได้เป็น 2 แหล่งคือ *Klebsiella* ที่พบในธรรมชาติ (non-clinical habitat) เช่น บริเวณผิวน้ำ ดิน สิ่งปฏิกูล ในลำไส้คนและสัตว์ น้ำคั้นและต้นไม้ เป็นต้น และ *Klebsiella* ที่พบในโรงพยาบาล (clinical habitat) ซึ่งเป็นแหล่งของการติดเชื้อ *Klebsiella* ที่สำคัญ โดยเฉพาะผู้ป่วยหนักในแผนก ICU (Lin et al., 1997) บริเวณที่พบการติดเชื้อ *Klebsiella* คือ ทางเดินปัสสาวะ, บริเวณส่วนล่างของระบบทางเดินหายใจ, ระบบน้ำดี, และบริเวณแผลผ่าตัด โรคที่เกิดจากการติดเชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ การอักเสบของเนื้อเยื่อโพรงหัวใจ (endocarditis), โรคนิวโมเนีย (pneumonia) ทำให้เนื้อเยื่อปอดเปื่อย เกิดการอักเสบ และมีเลือดออก, เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ, เกิดสภาวะที่ติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacteremia), เกิดการอักเสบของหลอดเลือดดำ (thrombophlebitis), โรคถุงน้ำดี (cholecystitis), ท้องร่วง (diarrhea), เกิดการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจส่วนบน (upper respiratory tract infection), หูส่วนกลางอักเสบ (otitis media), และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) (Bagley, 1985) นอกจากนี้การติดเชื้อ *Klebsiella* ยังเพิ่มสูงขึ้นในโรงพยาบาลเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สามารถดื้อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด เนื่องจากการวิวัฒนาการของ *K. pneumoniae* และ *K. oxytoca* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ β -lactamase มาทำลายยาปฏิชีวนะได้ ทำให้สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะกลุ่ม extended-spectrum β -lactam ซึ่งได้แก่ penicillin, cephalosporins, monobactams และ carbapenems ได้ ทำให้การเลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นไปได้ยากขึ้น (Lin et al., 1997)

Dien et al. (2003) รายงานว่ามีการใช้ *K. oxytoca* ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลที่ใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง (ethanol fuel) ได้

4. การโคลนและการแสดงออกของยีนแมนนาเนส

การโคลนยีน หมายถึง การแยกยีนใดยีนหนึ่งที่สนใจ นำมาเพิ่มปริมาณให้ได้มากเท่าที่ ต้องการเพื่อใช้ในการศึกษา เช่น ศึกษาการควบคุมการแสดงออก หน้าที่ และความสำคัญของยีนนั้น ในเซลล์ โดยอาจจะถ่ายฝากยีนดังกล่าวลงในสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อผลิตสารหรือให้แสดงออกลักษณะ บางประการ

การโคลนยีนเป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาและก้าวหน้าอย่างมาก ที่จะช่วยเพิ่มความเข้าใจ เกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของยีนที่สนใจ และเป็นเทคนิคที่ช่วยในการควบคุมยีน ในปัจจุบัน พบว่ามากกว่า 50% ของเอนไซม์สำคัญ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมาจากจุลินทรีย์ที่ผ่านการทำพันธุ วิศวกรรมทั้งสิ้น (Dhawan and Kaur, 2007) โดยการใช้เทคนิค recombinant DNA ทำให้สามารถ สร้างจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ในปริมาณมากและมีค่าใช้จ่ายต่ำได้

การศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนแมนนาเนสจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการ สร้างจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส สิ่งที่ต้องพิจารณาก่อนการ ทำการโคลนยีนและการศึกษาการแสดงออกของยีนคือ ระบบของเซลล์เจ้าบ้านและเวกเตอร์ที่ เหมาะสม

4.1 เซลล์เจ้าบ้าน (host strain)

ระบบของเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนมีหลาย ระบบ พบว่าระบบที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์แมนนาเนส ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Pichia pastoris*

4.1.1 *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการโคลนยีน และการผลิตโปรตีน เนื่องจาก *E. coli* มีการเจริญเร็ว มีระบบไม่ซับซ้อน และมีการศึกษาและเข้าใจ เกี่ยวกับสมบัติของยีนจากเชื้อ *E. coli* ทำให้ง่ายต่อการควบคุมระบบการแสดงออก และมีเวกเตอร์ ให้เลือกใช้หลากหลาย แต่ข้อเสียของ *E. coli* คือ เกิด inclusion body ของโปรตีนภายในเซลล์เมื่อมี การเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนในปริมาณมาก ทำให้โปรตีนที่ผลิตได้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

และไม่มี post-translational modification นอกจากนี้ยังมี lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งถือว่าเป็น endotoxins ที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ จำเป็นต้องกำจัดออกก่อนนำโปรตีนมาใช้โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมผลิตยา (Terpe, 2006; Dale, 1995)

4.1.2 *Pichia pastoris*

ยีสต์เป็นยูคาริโอตที่มีการนำมาใช้มากในการผลิตโปรตีน เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นเซลล์สูง (high cell density) มีการขับโปรตีนออกนอกเซลล์ เวกเตอร์มี promoter ที่ได้จากยีน alcohol oxidase I (*AOXI*) ที่สามารถควบคุมการผลิตโปรตีนได้เป็นอย่างดี มีระบบ post-translational modification เช่น glycosylation คล้ายในเซลล์ยูคาริโอตชั้นสูง พลาสมิดมีความเสถียรสูงเนื่องจาก integrate เข้าสู่จีโนมของยีสต์ และโปรตีนที่เป็น inclusion body เมื่อใช้ระบบการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย สามารถผลิตและทำงานได้ดีในระบบการแสดงออกของ *Pichia pastoris* นอกจากนี้ยังเป็นระบบที่ง่ายต่อการจัดการ รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูงเมื่อเทียบกับระบบการแสดงออกของยูคาริโอตอื่น เช่น insect cell/baculovirus และ mammalian tissue culture systems แต่มีข้อเสียคือ เมทานอล ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนในยีสต์ภายใต้การควบคุมของ *AOXI* promoter เป็นสารไวไฟที่มีอันตราย อาจไม่เหมาะที่จะนำระบบนี้มาใช้กับอุตสาหกรรมอาหาร (Cereghino and Cregg, 1999; Macauley-Patrick *et al.*, 2005)

4.1.3 *Bacillus subtilis*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถนำมาใช้ในการโคลนยีนได้ มีข้อดีคือ ไม่มี LPS ที่เป็น endotoxins มีการดัดแปลงพันธุกรรมให้ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสน้อยลง (Terpe, 2006) สามารถผลิตโปรตีนและส่งออกนอกเซลล์ได้ แต่ได้ผลผลิตต่ำและพลาสมิดไม่เสถียร (Li *et al.*, 2004)

4.2 เวกเตอร์ (Vector)

4.2.1 พลาสมิด (plasmid)

เป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มีขนาดตั้งแต่ 1 กิโลเบสจนถึงมากกว่า 200 กิโลเบส ในการโคลนยีนนิยมใช้พลาสมิดที่มีขนาดเล็กเพื่อให้

การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความเสถียร พลาสมิดต้องมี marker gene ที่ใช้ในการตรวจสอบเซลล์ลูกผสมเช่น ยีนที่ควบคุมการสร้างสารที่ต้านทานยาปฏิชีวนะจำพวก ampicillin หรือ kanamycins หรือ tetracyclines เป็นต้น และมีตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งเพียง 1 ตำแหน่ง (unique site) พลาสมิดเวกเตอร์สามารถเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่มีขนาดมากถึง 15 กิโลเบสได้ เช่น pUC เป็นพลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนที่มีขนาดประมาณ 10-15 กิโลเบสได้ (Robertson *et al.*, 1997) การเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มาก จะทำให้ส่งถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี transformation เป็นไปได้ยาก และความเสถียรของพลาสมิดลดลง (สุรินทร์, 2548; Sambrook and Russell, 2001)

4.2.2 คอสมิด (cosmid)

คอสมิดเป็นเวกเตอร์ลูกผสมระหว่างฟาจและพลาสมิดของแบคทีเรีย คือมีส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวในแบคทีเรีย มี marker ที่ใช้ในการคัดเลือกโคลนและมี cohesive end site (cos site) ของแลมบ์ดาฟาจเพื่อช่วยให้สามารถบรรจุดีเอ็นเอลงในโปรตีนห่อหุ้มของแลมบ์ดาฟาจได้ เช่น คอสมิดเวกเตอร์ pJB8 ที่สามารถโคลนยีนที่มีขนาด 32-46 กิโลเบสได้ ขนาดของเวกเตอร์เมื่อรวมกับชิ้นดีเอ็นเอแล้วควรอยู่ในช่วง 28-48 กิโลเบส (Preston, 2003) คอสมิดเวกเตอร์มักใช้ในการทำธนาคารยีน โดยใช้วิธี transduction ในการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เมื่อดีเอ็นเอของคอสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้ว จะไม่สามารถสร้างอนุภาคฟาจได้ แต่จะจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอและคัดเลือกโคลนโดยใช้ marker แบบเดียวกับพลาสมิด (สุรินทร์, 2548)

4.2.3 แลมบ์ดาฟาจ (λ phage)

ฟาจ (phage) เป็นไวรัสที่สามารถบุกรุกแบคทีเรียได้ มีโครงสร้าง 2 แบบคือแบบที่มีโครงสร้างหัวและหาง (head-and-tail phage) เช่น λ phage และแบบที่มีโครงสร้างเส้น (filamentous phage) เช่น ฟาจ M13 การใช้ λ phage เป็นเวกเตอร์ในการโคลนยีน ที่ส่วนหัวของฟาจเป็นตำแหน่งที่บรรจุดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน และฟาจจะมีวงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) คือโครโมโซมของฟาจหรือดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนจะถูกฉีดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ยีนต่างๆ จะเกิดการแสดงออกภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการจำลองดีเอ็นเอของฟาจและการสร้างโปรตีนห่อหุ้ม ประกอบเป็นอนุภาคฟาจใหม่และถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อเซลล์แบคทีเรียแตก การใช้ λ phage เป็นเวกเตอร์แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ 1) insertion λ vector เช่น λ ZAP II ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอจะ

ถูกโคลนในทำนองเดียวกันกับพลาสมิด โดยปกติจะใช้กับดีเอ็นเอที่มีขนาด 5-11 กิโลเบส 2) replacement λ vector เช่น λ EMBL4 มีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดตำแหน่ง non-essential DNA ออกแล้วแทนที่ด้วยดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน เวกเตอร์กลุ่มนี้สามารถโคลนยีนที่มีขนาด 8-24 กิโลเบส λ phage เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี transduction ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่า transformation ประมาณ 100 เท่า และตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจาก plaque (กิตติพัฒน์, 2552; Casali and Preston, 2003 และ สุรินทร์, 2548)

4.2.4 เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีน (expression vector)

เวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนเป็นเวกเตอร์ที่ประกอบด้วยจุดเริ่มต้นของการจำลองตัว (origin of replication) ยีน marker ที่ควบคุมการต้านทานยาปฏิชีวนะสำหรับการคัดเลือกโคลนและ multiple cloning site คล้ายกับเวกเตอร์ทั่วไป และยังมีส่วนประกอบของ strong promoter ที่ใช้ในการควบคุมการแปลรหัส (ทรานสคริปชัน) เช่น *T7* promoter, *tac* promoter (promoter ที่ผสมระหว่างตำแหน่ง -35 ของ *trp* promoter กับตำแหน่ง -10 ของ *lacUV5* promoter) หรือ *trp* promoter เป็นต้น มีตำแหน่งของ ribosome binding site และ start codon ที่มีระยะห่างที่เหมาะสม รวมถึง transcription termination signal ที่อยู่ทางด้านปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ (Rodriguez and Denhardt, 1988) นอกจากนี้ยังมีส่วนของ protein tag เช่น ฮิสทีดิน ที่จะเชื่อมต่อกับโปรตีนที่สนใจ เพื่อช่วยในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์อีกด้วย

เซลล์เจ้าบ้านและเวกเตอร์ที่ใช้การโคลนและการแสดงออกของยีนเมื่อนานเนส แสดงดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 เชลล์เจ้าบ้านและเวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนแมนนเนส

เชลล์เจ้าบ้าน	เวกเตอร์	แหล่งของยีน	ขนาด	อ้างอิง
<i>E. coli</i> HB101	pUC18	Alkaliphilic <i>Bacillus</i> sp. JAMB-602	50 kDa	Takeda <i>et al.</i> (2004)
<i>E. coli</i> HB101	pUC18	Alkaliphilic <i>Bacillus</i> sp. JAMB-750	997 aa	Hatada <i>et al.</i> (2005)
<i>E. coli</i> DH5 α	pUC18	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	76 kDa	Ethier <i>et al.</i> (1998)
<i>E. coli</i> DH5 α	pGEM-T easy	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	45 kDa	Perret <i>et al.</i> (2004)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	pBR322	<i>Clostridium thermocellum</i>	67.04 kDa	Kurokawa <i>et al.</i> (2001)
<i>E. coli</i> Trans1-T1	pMD18-T	<i>Sphingomonas</i> sp.	43.7 kDa	Zhou <i>et al.</i> (2012)
<i>E. coli</i> DH10B	pUC19	<i>Pantoea agglomerans</i> A021	38.5 kDa	Wang <i>et al.</i> (2010)
<i>E. coli</i> DH5 α	pUC18	<i>Erwinia carotovora</i> CXJZ95-198	42 kDa	Zhang <i>et al.</i> (2007)
<i>E. coli</i> JM101	pJLA602	<i>Caldibacillus cellulovorans</i>	4567 bp	Sunna <i>et al.</i> (2000)
<i>E. coli</i> DH5 α	Cosmid pLARF-5	<i>Bacillus subtilis</i> Z-2	38 kDa	Zhang <i>et al.</i> (2006)
<i>E. coli</i> DH5 α	Cosmid pCC1FOS	<i>Paenibacillus polymyxa</i> GS01	1352 aa	Cho <i>et al.</i> (2006)
<i>E. coli</i> DH5 α	λ EMBL3	<i>Rhodothermus marinus</i>	113 kDa	Politz <i>et al.</i> (2000)
<i>E. coli</i> XL0LR	λ ZAPII	<i>Cellulomonas fimi</i>	951 aa	Stoll <i>et al.</i> (1999)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	λ ZAPII	<i>Clostridium cellulovorans</i>	47.15 kDa	Tamaru and Doi (2000)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	λ ZAPII	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subspecies cellulosa	46.9 kDa	Braithwaite <i>et al.</i> (1995)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	λ ZAP Express	<i>Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum</i>	119.6 kDa	Cann <i>et al.</i> (1999)

ตารางที่ 3 เซลล์เจ้าบ้านและเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนแมนนาเนส

เซลล์เจ้าบ้าน	เวกเตอร์	แหล่งของยีน	ขนาด	โปรตีน	ผลผลิตที่ได้	อ้างอิง
1. <i>Escherichia coli</i>						
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pH6EX3	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	76 kDa	ManF	25mg /L	Ethier <i>et al.</i> (1998)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-27b	<i>Cellulomonas fimi</i>	100 kDa	Man26A	70 mg /L	Stoll <i>et al.</i> (1999)
	pET-28a		95 kDa	Man2A	300 mg/L	
<i>E. coli</i> M15 (pREP4)	pQE-30T	<i>Clostridium thermocellum</i>	67.04kDa	Man26B	-	Kurokawa <i>et al.</i> (2001)
<i>E. coli</i> TOP10	pFlag-CTS	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13	41 kDa	ManB	50,000 U/L	Songsiririthigul <i>et al.</i> (2010)
<i>E. coli</i> Rosetta-gami (DE3)	pET32a	<i>Bacillus subtilis</i> Bs5	55 kDa	BsMan	1,231.41 U/ml	Huang <i>et al.</i> (2012)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pGEX-6P-1	<i>Paenibacillus</i> sp. BME-14	53 kDa	Man26B	145.90 U/mg	Fu <i>et al.</i> (2010)
<i>E. coli</i> BL21	pET-22b(+)	<i>B. circulans</i> CGMCC 1416	31 kDa	manB48	481.55 U/mg	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET21b(+)	<i>Erwinia carotovora</i> CXJZ95-198	42 kDa	ManA	เพิ่มขึ้น 9 เท่า	Zhang <i>et al.</i> (2007)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET24b(+)	Thermophilic <i>Bacillus subtilis</i>	38 kDa	ManA	3,169 U/mg	Summpunn <i>et al.</i> (2011)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pGEX-6P-1	<i>Pantoea agglomerans</i> A021	38.5 kDa	Man26P	514 U/mg	Wang <i>et al.</i> (2010)
2. <i>Bacillus subtilis</i>						
<i>B. subtilis</i> ISW1214	pHSP64	<i>Bacillus</i> sp. JAMB-602	50 kDa	Amn5A	287 U/mg	Takeda <i>et al.</i> (2004)
<i>B. subtilis</i> ISW1214	pHY300PLK	<i>Bacillus</i> sp. JAMB-750	997 aa	Man26A	36.3 U/mg	Hatada <i>et al.</i> (2005)
<i>B. megaterium</i> UNcat	pXb	Thermophilic <i>Bacillus subtilis</i>	38 kDa	ManA	359 U/ml	Summpunn <i>et al.</i> (2011)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

เซลล์เจ้าบ้าน	เวกเตอร์	แหล่งของยีน	ขนาด	โปรตีน	ผลผลิตที่ได้	อ้างอิง
3. <i>Pichia pastoris</i>						
<i>P. pastoris</i> GS115	pPICZαA	<i>Bacillus</i> sp. N16-5	50 kDa	ManA	23.7 U/ml	He <i>et al.</i> (2008)
	pGAPZαA				5.6 U/ml	
	pPIC9				32.2 IU/ml	
<i>P. pastoris</i> GS115	pPIC9K	<i>Bacillus subtilis</i>	40 kDa	Man	263.0 IU/ml, yielding 1.8 g/L	Yu <i>et al.</i> (2008)
<i>P. pastoris</i> GS115	pPICZαA	<i>Bacillus subtilis</i> G1	41 kDa	ManA	2,718 U/mg	Vu <i>et al.</i> (2012)
<i>P. pastoris</i> X-33	pPICZαA	<i>B. subtilis</i> MAFIC-S11	37.8 kDa	mannS	3,706 U/mg	Lv <i>et al.</i> (2013)
<i>P. pastoris</i> X-33	pGAPZαA	<i>Bacillus subtilis</i> MA139	38 kDa	Man	230 U/ml	Qiao <i>et al.</i> (2010)

4.3 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นกับชนิดของเวกเตอร์

4.3.1 Transformation

เป็นการนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยตรง ทำโดยเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ให้อยู่ในสภาพ ที่พร้อมรับดีเอ็นเอภายนอก (competent cell) โดยการใช้สารบางชนิดเช่น CaCl_2 หรือ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นต้น นำเซลล์ที่อยู่ในสภาพพร้อมรับไปรวมกับพลาสมิดดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พลาสมิดดีเอ็นเอจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อเอนไซม์ DNase ที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* เมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว โดยแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอจะแทรกเข้าสู่เซลล์ได้ เรียกวิธีการนี้ว่า “heat shock” อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยตรงคือ Electroporation เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์เพื่อให้ดีเอ็นเอมีโอกาสเข้าสู่เซลล์ได้ ต้องใช้กระแสไฟฟ้าและเวลาที่พอเหมาะ ถ้าใช้กระแสไฟฟ้าสูงหรือใช้เวลานานเกินไป เซลล์ *E. coli* จะตาย (สุรินทร์, 2548)

4.3.2 Conjugation

เป็นการถ่ายโอนยีนระหว่างเซลล์หนึ่งสู่อีกเซลล์หนึ่งโดยตรง วิธีนี้มักเกิดขึ้นง่ายกับแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli*, *Vibrio* และ *Pseudomonas* เป็นต้น และแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ทำโดยผสมแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่ต้องการให้มีการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน หลังจากบ่มเป็นเวลาหนึ่งเพื่อให้เกิดกระบวนการ conjugation นำแบคทีเรียมา spread อาหารคัดเลือกที่มียีน marker ในการคัดเลือกเซลล์ลูกผสม (Dale, 1995)

4.3.3 Transduction

เป็นวิธีการถ่ายเวกเตอร์ที่มีส่วนของฝาจ คือ λ phage และคอสมิด เนื่องจากเป็นเวกเตอร์ที่มีขนาดใหญ่จึงใช้วิธีถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยตรงไม่ได้ จึงใช้วิธีบรรจุดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนลงในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจก่อนเพื่อสร้างอนุภาคฝาจ แล้วนำเข้าเซลล์เจ้าบ้านโดยการบุกรุกเข้าเซลล์ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า transformation (สุรินทร์, 2548)

Ethier *et al.* (1998) ศึกษาเอนไซม์ β -mannanase (ยีน *ManF*) ที่เสถียรที่อุณหภูมิสูงจาก *Bacillus stearothermophilus* โดยการทำนาการยีน ใช้จิโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดแบบไม่สมบูรณ์ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ขนาด 2-10 กิโลเบส เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pUC18 และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α MCR ด้วยวิธี transformation ได้เซลล์ลูกผสมทั้งหมดประมาณ 10,000 โคโลนี พบเซลล์ลูกผสมที่มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 8 โคลน ซึ่งพบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสที่ส่วน periplasm ประมาณ 75% ของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด ยีนแมนนาเนสที่ได้มีขนาด 2,085 คู่เบส (ประมาณ 76 กิโลดาลตัน) พบ signal peptide 32 กรดอะมิโน แมนนาเนส จาก *Bacillus stearothermophilus* จัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolase แฟมิลี 5 ซึ่งพบกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserved amino acid residues) 7 กรดอะมิโนคือ Arg-96, His-182, Asn-227, Glu-228, His-306, Tyr-308, และ Glu-345 โปรตีน *ManF* ที่แสดงออกในพลาสมิด pH6EX3 และเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 มีค่า kinetic parameter V_{max} และ K_m เป็น 384 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และ 2.4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ

Stoll *et al.* (1999) ศึกษาเอนไซม์ β -mannanase (*Man26A*) ขนาดประมาณ 100 กิโลดาลตัน และ β -mannosidase (*Man2A*) ขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตัน จาก *Cellulomonas fimi* โดยใช้พาจ λ ZAPII ในการทำนาการยีนทั้ง *Man26A* และ *Man2A* ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี transduction ใน *E. coli* XL0LR ในการผลิตเอนไซม์ β -mannanase (*Man26A*) ใช้เวกเตอร์ pET27b ซึ่งมีส่วนของ fusion protein H6 tag ที่ตำแหน่งปลาย C และแสดงออกใน *E. coli* BL21(DE3) พบว่าหลังการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วย His-Bind metal chelating affinity column ได้ผลผลิตเอนไซม์ประมาณ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เอนไซม์จากในน้ำเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิกรัมและ cell extract 60 มิลลิกรัม ในการผลิตเอนไซม์ β -mannosidase (*Man2A*) ใช้เวกเตอร์ pET28a(+) ซึ่งมีส่วนของ fusion protein H6 tag ที่ตำแหน่งปลาย C เช่นเดียวกับเวกเตอร์ pET27b และแสดงออกใน *E. coli* BL21(DE3) พบว่า cell extract จาก *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pET28Man ให้ผลผลิตเอนไซม์มากถึง 300 มิลลิกรัมต่อ cell culture 1 ลิตร โปรตีนมีความบริสุทธิ์มากกว่า 95% หลังการทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

Ma *et al.* (2004) ศึกษาการแสดงออกของยีน alkaline β -mannanase จาก alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 โดยใช้ *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้านและเวกเตอร์ pUC19 สำหรับการโคลน ยีน ซึ่งหลังจากการผลิตและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate และผ่าน column chromatography 3 ขั้นตอนพบว่าได้ผลผลิตของเอนไซม์แมนนาเนส เพียง 8.8% He *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน alkaline β -mannanase จาก

alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 แบบ heterologous expression ใน *Pichia pastoris* GS115 โดยใช้โปรโมเตอร์ *AOXI* promoter ร่วมกับ *GAP* promoter เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในเวกเตอร์ pPICZαA (มีเฉพาะ *AOXI* promoter), pGAPZαA (มีเฉพาะ *GAP* promoter) และ pPIC9 (มีทั้ง *AOXI* และ *GAP* promoter) พบว่า alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 สามารถแสดงออกใน *P. pastoris* ได้และการใช้โปรโมเตอร์ *AOXI* และ *GAP* ร่วมกันสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้ โดยเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ 32.21 IU ต่อมิลลิกรัมที่ความเข้มข้นของโปรตีน 82 มิลลิกรัมต่อลิตร

Takeda *et al.* (2004) ศึกษาเอนไซม์อัลคาไลด์แมนนาเนส (amn5A) จาก alkaliphilic *Bacillus* sp. JAMB-602 ที่คัดแยกได้จากดิน โดยการโคลนยีนในพลาสมิด pUC18 ถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้วิธี short gun เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 จากการโคลนยีนแมนนาเนสในเวกเตอร์ pHSP64 ซึ่งเป็น *E. coli* - *B. subtilis* shuttle vector และถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Bacillus subtilis* ISW1214 สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนแมนนาเนส หลังการผลิตและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์พบว่า *B. subtilis* ISW1214 ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม สามารถผลิตและขับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ได้ เอนไซม์แมนนาเนสมีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตันจัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolase แฟมิลี 5 และได้ผลผลิตสุดท้ายของเอนไซม์หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl ประมาณ 33% ของน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมด ที่มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงถึง 287 หน่วยต่อมิลลิกรัม

Hatada *et al.* (2005) ศึกษาเอนไซม์แมนนาเนส (high-alkaline mannanase) จาก alkaliphilic *Bacillus* sp. JAMB-750 โดยการโคลนยีนแมนนาเนสในพลาสมิด pUC18 และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. JAMB-750 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolase แฟมิลี 26 มีขนาด 2,994 คู่เบส (997 กรดอะมิโน) โคลนยีนแมนนาเนสในเวกเตอร์ pHY300PLK เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Bacillus subtilis* IS1214 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนน้อยลง พบยีนแมนนาเนสขับออกมานอกเซลล์ หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่าได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น 14.2% หลังการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และมีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 36.3 หน่วยต่อมิลลิกรัม

Zhang *et al.* (2006) ศึกษาเอนไซม์ β-mannanase จาก *Bacillus subtilis* Z-2 โดยการทำธนาการยีน เชื่อมต่อจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ขนาด 15-30 กิโลเบสเข้ากับคอสมิดเวกเตอร์ pLARF-5 และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5α ด้วยวิธี

transduction ได้เซลล์ลูกผสมทั้งหมด 2,500 โคโลนี พบเซลล์ลูกผสมที่มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนานเนส 2 โคโลนี เอนไซม์แมนนานเนสจาก *Bacillus subtilis* Z-2 มีขนาด 38 กิโลดาลตัน ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolase แฟมิลี 26 ในการศึกษาการแสดงออกของยีน มีการแบ่งการทดลองออกเป็น 2 แบบคือ (1) เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์แมนนานเนสในสถานะมีและไม่มี signal peptide โดยโคลนในเวกเตอร์ pET22b(+) และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21(DE3) พบว่าเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับ mature mannanase gene มีการผลิตเอนไซม์ที่ดีกว่าโดยพบกิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้น 1.8 เท่าในลักษณะ extracellular และ 1.5 เท่าในลักษณะ intracellular หลังการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ด้วย IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (2) เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง SD sequence และ codon เริ่มต้น โดยโคลนยีนแมนนานเนสในเวกเตอร์ pRK415 และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ได้เป็น พลาสมิด pMAN-TTG (มี SD และ codon เริ่มต้นของ wild type คือ GGGGAG และ TTG), pMAN-NA (เปลี่ยน SD และ codon เริ่มต้นเป็น คือ AAGGAG และ ATG) และ pMAN-BE (เปลี่ยน SD และ codon เริ่มต้นเป็น คือ AAGGAG และ ATG เพิ่ม *pelB* signal peptide จากพลาสมิด pET22b(+)) พบว่า เซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pMAN-TTG มีการผลิตเอนไซม์แมนนานเนสน้อยที่สุด และเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pMAN-NA และ pMAN-BE มีการผลิตเอนไซม์แมนนานเนสเพิ่มขึ้น 5 เท่าและ 6.2 เท่า ตามลำดับ

Yu *et al.* (2008) ศึกษาการแสดงออกของยีนแบบ heterologous expression ของยีนแมนนานเนสจาก *Bacillus subtilis* ใน *Pichia pastoris* GS115 โดยใช้ *E. coli* DH5 α ในการเพิ่มจำนวนเวกเตอร์และศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้ *Pichia* expression vector pPIC9K พบว่าเซลล์ลูกผสมสามารถจับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ได้ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ถึง 263.0 IU ต่อ มิลลิลิตร ในการเลี้ยงในฟลาस्क หลังการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลพบเอนไซม์แมนนานเนสที่ถูกจับออกมานอกเซลล์ประมาณ 90% ของโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งหมดและได้ผลผลิตของเอนไซม์ถึงประมาณ 1.8 กรัมต่อลิตร

Yamabhai *et al.* (2008) ได้ศึกษาการจับโปรตีนออกนอกเซลล์ โดยทำการศึกษาเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ไคตินเนส และแมนนานเนส จาก *Bacillus* ด้วยระบบการแสดงออกของยีนใน *E. coli* โดยเปรียบเทียบการใช้ native signal peptide จาก *Bacillus* และ *E. coli* signal peptide (*OmpA*) ในการจับโปรตีนออกนอกเซลล์ด้วย native signal peptide จาก *Bacillus* จะใช้ expression vector pET21d(+) แสดงออกใน *E. coli* BL21(DE3) ภายใต้การควบคุมของ *T7* promoter และในการจับโปรตีนออกนอกเซลล์ด้วย *E. coli* signal peptide (*OmpA*) จะใช้เวกเตอร์ pFLAG-CTS แสดงออกใน *E. coli* TOP10 ภายใต้การควบคุมของ *tac* promoter พบว่าเอนไซม์ทั้งที่มี native

signal peptide และ *OmpA* สามารถจับออกนอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อสังเกตจากวงใสบนเพลท แต่ *E. coli OmpA* signal peptide สามารถจับเอนไซม์ออกนอกเซลล์ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ native signal peptide จาก *Bacillus* spp. โดยเอนไซม์อะไมเลสพบ 68.2% ของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ native signal peptide จาก *Bacillus* spp. และ 90.4% ของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ *E. coli OmpA* signal peptide เอนไซม์ไคตินเนสพบ 81.3% ของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ native signal peptide จาก *Bacillus* spp. และ 84.3% กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ *E. coli OmpA* signal peptide แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างการใช้นative signal peptide (94.4% ของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ) และ *OmpA* (93.9% กิจกรรมเอนไซม์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในเซลล์ลูกผสมที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

Cho *et al.* (2006) ศึกษาเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* GS01 ซึ่งคัดเลือกมาจากรากโสม โดยทำธนาคารยีน (cosmid library) ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดไม่สมบูรณ์ขนาด 23-40 กิโลเบสโคลนในคอสมิดเวกเตอร์ pCC1FOS ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* EPI300™ ด้วยวิธี transduction และคัดเลือกโคลนที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและแมนนาเนส โดยพบ 1 โคลนคือ Cel44C-Man26A ที่มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด หลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีนที่โคลนได้มีลักษณะเป็น multifunctional ซึ่งแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,4-endoglucanase, β -xylanase, 1,3-1,4- β -D-glucanase (lichenase) และ β -mannanase และมี multiple domain ประกอบด้วย catalytic domain ของ glycosyl hydrolase แฟมิลี 44 (571 กรดอะมิโน), glycosyl hydrolase แฟมิลี 26 (393 กรดอะมิโน), fibronectin domain type 3 (Fn3) (81 กรดอะมิโน) และ cellulose binding module type 3 (CBM3) (82 กรดอะมิโน)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้เป็นแหล่งของยีนแมนนาเนส

Klebsiella oxytoca CW2-3 เป็นแหล่งของเอนไซม์แมนนาเนส ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่มีกากมะพร้าว (Titapoka *et al.*, 2008)

2. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

2.1 *Escherichia coli* DH5 α มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็น (genotype) F⁻ Φ 80d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1* *endA1* *hsdR17* (*r_k*⁻, *m_k*⁺) *phoA* *supE44*⁻ *thi*⁻1 *gyrA96* *relA1* เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในสร้างธนาครยีน

2.2 *Escherichia coli* TOP10 มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็น F⁻ *mcrA* Δ (*mrr*⁻ *hsdRMS*⁻ *mcrBC*) ϕ 80 *lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *nupG* *recA1* *araD139* Δ (*ara*⁻ *leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL*(Str^R) *endA1* λ ⁻ เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการแสดงออกของยีน

3. แบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง

กลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก และก่อโรค ที่ใช้ในการทดสอบสมบัตินของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ รวมทั้งสถานะในการเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 4

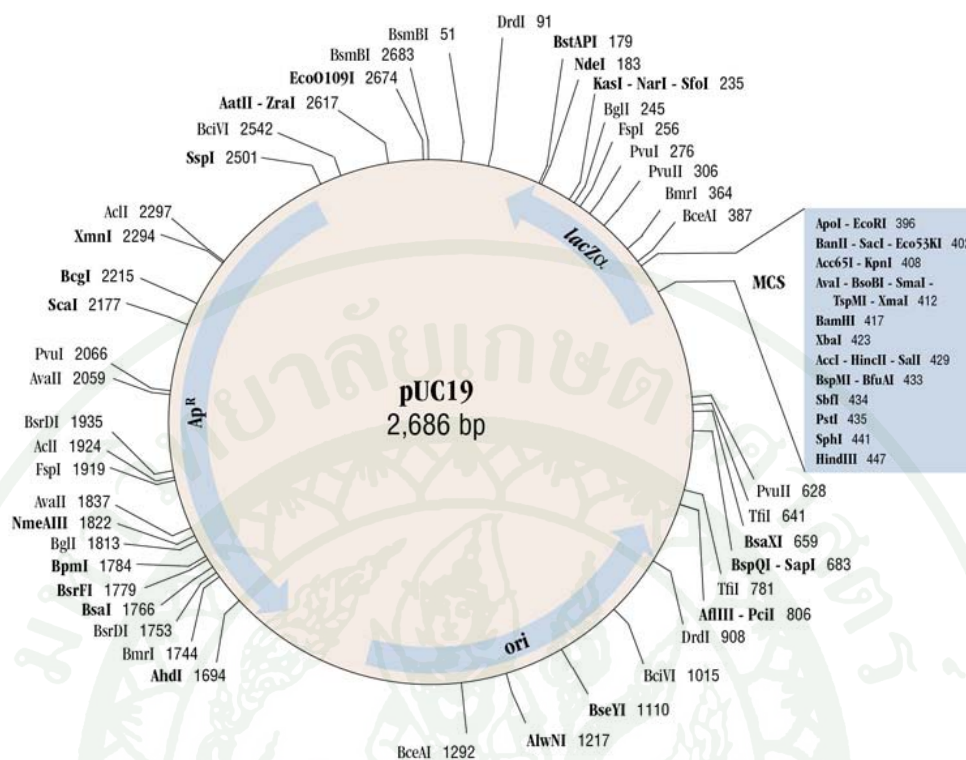
ตารางที่ 4 เชื้อจุลินทรีย์และสภาวะการเจริญ

เชื้อจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะการเจริญ
แบคทีเรียกรดแลกติก		
<i>Lactobacillus johnsonii</i> KUNN19-2	MRS	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง
<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	MRS	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง
<i>Lactobacillus salivarius</i> KUB-AC21	MRS	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง
<i>Lactobacillus salivarius</i> KL-D4	MRS	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 5805	MRS	บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง
<i>Leuconostoc citreum</i> JCM 9698	MRS	บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง
<i>Weissella confusa</i> JCM 1093	MRS	บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง
แบคทีเรียก่อโรค		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	NB	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง พร้อม เขย่า 200 รอบต่อนาที
<i>Escherichia coli</i> KUB-E010	NB	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง พร้อม เขย่า 200 รอบต่อนาที
<i>Salmonella</i> Enteritidis DMST 17368	NB	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง พร้อม เขย่า 200 รอบต่อนาที
<i>Salmonella</i> Typhimurium KUB-S003	NB	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง พร้อม เขย่า 200 รอบต่อนาที

4. พลาสมิดสำหรับการโคลนและการแสดงออกของยีน

4.1 พลาสมิด pUC19

ใช้เป็นพลาสมิดสำหรับการเตรียมธนาคารยีน เป็นพลาสมิดขนาดเล็กขนาด 2,686 คู่เบสและ high copy number ใช้ในการโคลนยีนทั่วไป มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Multiple cloning sites) บน *lacZ* (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนที่เวกเตอร์ pUC19

ที่มา: New England BioLabs

4.2 พลาสมิด pFlag-CTS

ใช้เป็นพลาสมิดสำหรับการแสดงออกของยีน การแสดงออกของยีน ควบคุมด้วย *tac* promoter และมี *ompA* signal peptide ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ และขับออกมายังส่วน periplasm ได้ มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน มีการดัดแปลงเพิ่มกรดอะมิโนฮิสทีดีน 10 กรดอะมิโนทางด้านปลาย C (หลัง multiple cloning site) สำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้เทคนิคคอลัมน์ มีการดัดแปลงเพิ่มตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *FspI*, *BamHI* และ *Acc65* และตัดตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *SmaI* และ *XmaI* ออก ดังแสดงในภาพที่ 5 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. มณฑารพ ยมาภัย สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. เอนไซม์และสารเคมี

- 6.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* (Promega, USA)
- 6.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (Fermentas, USA)
- 6.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Fermentas, USA)
- 6.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* (Fermentas, USA)
- 6.5 *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, USA)
- 6.6 T4 DNA ligase (Promega, USA)
- 6.7 RNaseA (Fermentas, USA)
- 6.8 Lysozyme (Fluka, USA)
- 6.9 QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN, USA)
- 6.10 Nucleospin extract II® (Machere-Nagel, USA)
- 6.11 FastAP™ Thermosensitive alkaline phosphatase (Fermentas, USA)
- 6.12 1 kb marker (Fermentas, USA)
- 6.13 λ /*EcoRI*+*HindIII* marker (Fermentas, USA)
- 6.14 X-gal (Fermentas, USA)
- 6.15 IPTG (Fermentas, USA)
- 6.16 SeeBlue® Plus2 prestained standard (Invitrogen, USA)
- 6.17 PMSF (Sigama, USA)
- 6.18 Congo red (Sigma, USA)
- 6.19 Pierce® Silver stain kit (Thermoscientific, USA)
- 6.20 Ni-NTA purification system (Invitrogen, USA)

7. เครื่องมือ

- 7.1 เครื่องชั่ง (Mettler Toledo, ML 3002/01)
- 7.2 ตู้เป็ยเชื้อ (Nuair, NU-440-400E)
- 7.3 ตู้บ่มเชื้อ (WTB Binder, BD with R3-controller)
- 7.4 Sonicator (HEAT SYSTEMS-Ultrasonics W-380)
- 7.5 Vortex mixer (LMS mixer uzusio, VTX-3000L)
- 7.6 Incubator shaker (Vision, VS-8480SRN)

- 7.7 pH meter (Mettler Toledo, five easy FE20)
- 7.8 water bath (Lauda, A 100)
- 7.9 Centrifuge (Tomy, MX-301)
- 7.10 Agarose gel electrophoresis (Takara)
- 7.11 Acrylamide gel electrophoresis (MiniPROTEAN[®] tetra cell, Bio-Rad, USA)
- 7.12 Gel document (Vilber Lourmat)
- 7.13 ไมโครปีเปต (Gilson and Biohit)
- 7.14 Autoclave (TOMY, ES-315)
- 7.15 Spectrophotometer (Cecil, CE 7250)
- 7.16 Microplate reader (Model 680, Bio-Rad, USA)
- 7.17 เครื่อง PCR (Thermal cycle (T-gradient, Biometra))

วิธีการ

1. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *Klebsiella oxytoca* CW2-3

วิธีสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอดัดแปลงจากวิธีของ Surzycki (2000) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Klebsiella oxytoca* CW2-3 ในอาหาร nutrient broth (NB) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร เหยียงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายใส่ทิ้ง ล้างเซลล์ที่ได้ด้วย SET buffer 500 ไมโครลิตรโดยใช้ vortex ที่ความเร็วต่ำ ใส่สารละลายเอนไซม์ lysozyme เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำ-หงายหลอดไปมา ประมาณ 5 นาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกำจัด RNA โดยเติมเอนไซม์ RNase A ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย SDS 25% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา (คว่ำ-หงาย) 5 นาที และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลอิมิตัว 700 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำ-หงาย หลอดไปมาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยก ที่ $15300 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส ส่วนบน (upper phase) ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ที่มาเชื้อแล้วโดยให้ตะกอนส่วนล่าง (bottom phase) ติดมาน้อยที่สุด เติม phenol : chloroform (1:1) โดยการกลับหลอดไปมา (คว่ำ- หงาย) 1 ชั่วโมงเหวี่ยงแยกที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที สารละลายใสส่วนบน (upper phase) ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ที่มาเชื้อแล้ว เติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา (คว่ำ-หงาย) 1 ชั่วโมง เหยี่ยงแยกที่ 13000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 15 นาที ถ่ายสารละลายใสส่วนบน (upper phase) ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ที่มาเชื้อ แล้ว เติม isopropanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ ผสมให้ เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา (คว่ำ-หงาย) เป็นเวลา 30 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้น เหยี่ยงแยกที่ $15300 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้ง ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล 70% ปริมาณ 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ทำการเหวี่ยงแยกที่ $15300 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เท สารละลายทิ้ง ทำให้ดีเอ็นเอแห้ง ด้วยเครื่อง speedvac (UNIVAPO 100H, Germany) และละลายดี เอ็นเอใหม่ด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเอาไอออนออก ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *Escherichia coli* DH5 α โดยวิธี Alkaline extraction

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Surzycki (2000) โดยเลี้ยง *E. coli* ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเชื้อที่เตรียมไว้ไปเหวี่ยงแยกที่ 2300 $\times$ g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง กำจัดสารละลายส่วนบน เติมสารละลาย TEG 200 ไมโครลิตรและผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ใส่สารละลายไลซิส (lysis solution: 0.2N NaOH + 1% SDS) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ใส่ Potassium acetate 3 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำไปเหวี่ยงแยกโครโมโซมดีเอ็นเอ และเศษเซลล์ออกที่ 15300 $\times$ g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายใสส่วนบน 750 ไมโครลิตรมายังหลอดขนาด 1.5 มิลลิตรหลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเหวี่ยงแยกที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที กำจัดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และทำให้ดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายดีเอ็นเอ ในบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A 5 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ใส่สารละลายฟีนอลอิมิดัวหนึ่งปริมาตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการคว่ำ-หงายเป็นเวลา 5 นาที นำไปเหวี่ยงแยกที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายดีเอ็นเอ ส่วนบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นใส่สารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) หนึ่งปริมาตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการคว่ำ-หงายเป็นเวลา 5 นาที นำไปเหวี่ยงแยกที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายดีเอ็นเอส่วนบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ isopropanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ ผสมให้เข้ากันและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน เหวี่ยงแยกที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กำจัดสารละลายใสและล้างดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล 70% และทำให้ดีเอ็นเอแห้ง ด้วยเครื่อง speedvac (UNIVAPO 100H, Germany) ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเอาไอออนออกแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมธนาคารยีน

3.1 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Partial digestion)

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลงของ Surzycki (2000) ทำการตัดดีเอ็นเอแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำการตัด 4 ตำแหน่ง ให้ได้ชิ้นดีเอ็นเออยู่ในช่วง 3-7 กิโลเบส โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ 10x buffer 2 ไมโครลิตร BSA 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ไซจีโนมิกดีเอ็นเอเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Sau3AI* 1 ไมโครลิตร โดยการผันแปรความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาเพื่อให้ได้สภาวะการตัดที่เหมาะสม เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเอาไอออนออกแล้วให้มีปฏิกิริยารวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 30 และ 40 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ อะกาโรสเจลเข้มข้น 1%

3.2 การสกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจล

ทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการหลังจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วตามวิธีดัดแปลงของ Sambrook and Russell (2001) จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสกัด NucleoSpin® Extract II (Machery-Nagel)

3.3 การตัดพลาสมิดและการกำจัดหมู่ฟอสเฟสออกจากปลาย 5' ของพลาสมิด (Dephosphorylation)

การตัดและการกำจัดหมู่ฟอสเฟสออกจากพลาสมิดทำตามคู่มือของบริษัท Fermentas (USA) โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* แบบสมบูรณ์ทำโดยใช้พลาสมิดเริ่มต้น 2 ไมโครกรัมและใช้เอนไซม์ 10 ยูนิตต่อ 1 ไมโครกรัมของพลาสมิดดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (12-18 ชั่วโมง) หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

การกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากปลาย 5' ของพลาสมิดดีเอ็นเอทำโดยใช้เอนไซม์ FastAP™ Thermosensitive Alkaline phosphatase (Fermentas, USA) ผสมพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครกรัม บัฟเฟอร์ 10X FastDigest™ 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ FastAP™ Thermosensitive Alkaline phosphatase 1 ไมโครลิตร (ใช้เอนไซม์ 1 ยูนิตต่อพลาสมิดขนาดประมาณ 3 กิโลเบส เข้มข้น 1 ไมโครกรัม) เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อและกำจัดไอออนแล้วให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ตัดแล้วด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตัดชิ้นพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้พลาสมิดบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด NucleoSpin® Extract II (Machery-Nagel, USA)

3.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation)

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของกลุ่มจากบริษัท promega โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *K. oxytoca* CW2-3 ขนาด 3 -7 กิโลเบสผสมกับเวกเตอร์ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ออกแล้วโดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอต่อเวกเตอร์ 1:1, 1:3 และ 3:1 โดยให้มีปฏิกิริยาดังนี้ 10X ligation buffer 1 ไมโครลิตร น้ำที่ฆ่าเชื้อและกำจัดไอออนแล้ว และเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อไมโครลิตร 0.5 ไมโครลิตร ใช้ น้ำปรับให้มีปฏิกิริยารวม 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้หลังการเชื่อมต่อด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (ดัดแปลงจากวิธีของ Surzycki (2000))

3.5.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนส์โดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂)

เตรียมเซลล์คอมพีเทนส์ตามวิธีดัดแปลงของ Maniatis *et al.* (1982) โดยเชื้อ *E. coli* DH5α 1 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืนในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที จากนั้นถ่ายเชื้อลงอาหาร LB ที่เตรียมใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยให้ความเข้มข้นของเชื้อ 5% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรให้มีค่า 0.4-0.6 จากนั้นแขวนเชื้อในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเชื้อลงในหลอดเหวี่ยง 50 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อ

แล้วเหวี่ยงที่ 2000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรครึ่งหนึ่งของน้ำเชื้อเริ่มต้น ทำการผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 2000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์อีกครั้ง ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของการเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ครั้งแรก ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืนเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์คอมพิเทนท์ จากนั้นแบ่งเซลล์คอมพิเทนท์ที่ได้ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 210 ไมโครลิตร เติมกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 15% โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.5.2 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* DH5 α โดยวิธี Heat-shock (ดัดแปลงจาก Maniatis *et al.*, 1982)

นำหลอดที่ใส่เซลล์คอมพิเทนท์และพลาสติกที่ต้องการนำเข้าสู่เซลล์เข้าบ้านใส่ในกล่องน้ำแข็ง จากนั้นนำไปไว้บนน้ำแข็ง (4 องศาเซลเซียส) พร้อมกับ tip และ micropipette ที่ไว้ประมาณ 5 นาที ใส่พลาสติกลูกผสมประมาณ 100, 10 และ 5 นาโนกรัมต่อเซลล์คอมพิเทนท์ 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย tip จากนั้นวางในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที Heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ใส่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหาร SOC 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าที่ 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที นำไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, x-gal 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์หรือนำไปเหวี่ยงแยกที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร SOC 100 ไมโครลิตร และ spread ลงเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งลักษณะโคโลนีสีขาวและสีฟ้า

3.6 การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม (Recombinant cells)

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Dhawan and Kaur (2007) โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใสล้อมรอบเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้โลคัสบีบักม 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นสับเซกตร

4. การศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) โดยบริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) และ ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

5. การโคลนยีนแมนนาเนสโดยเวกเตอร์ pFlag-CTS

5.1 ไพรมเมอร์

ไพรมเมอร์ใช้ในการ subclone ยีนแมนนาเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pFlag-CTS ดังแสดงในตารางที่ 5 ไพรมเมอร์สาย forward คือ No298-ExF ประกอบด้วยตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (บริเวณที่ขีดเส้นใต้) และ ยีนแสดงแมนนาเนสเริ่มจากตำแหน่ง ATG ส่วนไพรมเมอร์สาย reverse คือ No298-ExR ประกอบด้วยตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* (บริเวณที่ขีดเส้นใต้) และ ยีนที่สนใจซึ่งเป็นสายที่ คู่สมกับลำดับเบสบนสาย 5' ไปยัง 3' ของยีนแสดงแมนนาเนส ซึ่งไม่รวม stop codon เพื่อให้ยีนสามารถเชื่อมต่อกับฮิสทีดินที่เป็น affinity tag บนเวกเตอร์ pFlag-CTS ได้

ตารางที่ 5 ไพรมเมอร์สำหรับการ subclone ยีนแมนนาเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pFlag-CTS

ชื่อไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	T _m (°C)
No298-ExF	5' TACAG <u>AATTC</u> ATGTGCATTTATACAGTAGTTTGC 3'	51.8
No298-ExR	5' TATAGGTAC <u>CCC</u> AGCTGATGCTGATGTCGC 3'	58.9

5.2 การเตรียมยีนแมนนาเนสสำหรับ subclone

เตรียมยีนแมนนาเนสโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) ด้วยไพรมเมอร์จากข้อ 5.1 เพื่อเพิ่มจำนวนยีน โดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีนแมนนาเนสเป็นแม่แบบ และเตรียม master mix ดังนี้

10x บัฟเฟอร์ที่มี $MgSO_4$	5	ไมโครลิตร
dNTP mix (2.5 มิลลิโมลาร์ต่อเบส)	5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ No298-ExF (0.2 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ No298-ExR (0.2 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>Pfu</i> DNA polymerase (1.25 ยูนิต)	0.5	ไมโครลิตร
น้ำที่ไม่มีนิวคลีโอเอส	36.5	ไมโครลิตร
ทั้งหมด	49	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันและแบ่งใส่หลอดพีซีอาร์ จากนั้นเติมดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์ (Thermal cycle) โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

ขั้นที่ 1	Initial denaturation	95	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นที่ 2	Denaturation	95	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 3	Annealing	58	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 4	Extension	72	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นที่ 5	Final extension	72	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที

วนรอบตั้งแต่ขั้นที่ 2-4 เป็นจำนวน 30 รอบ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส หลังจากนั้น ตัดยีนแมนนาเนสที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *KpnI* โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10x FastDigest™ บัฟเฟอร์ 3 ไมโครลิตร ยีนแมนนาเนส 1 ไมโครกรัม เอนไซม์ *EcoRI* และ *KpnI* อย่างละ 1 ยูนิต (เอนไซม์ 1 ยูนิตสามารถตัดดีเอ็นเอได้ 1 ไมโครกรัม) และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที ตรวจสอบยีนแมนนาเนสด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการตัดดีเอ็นเอออกจากเจลตามวิธีดัดแปลงของ Sambrook and Russell, 2001 และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Nucleospin Extract II®

5.3 การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์ pFlag-CTS

ทำการตัดเวกเตอร์ pFlag-CTS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *KpnI* ตามคู่มือของบริษัท Fermentas โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 10x FastDigest™ บัฟเฟอร์ 3 ไมโครลิตร เวกเตอร์

pFlag-CTS 1 ไมโครกรัม เอนไซม์ *EcoRI* และ *KpnI* อย่างละ 1 ยูนิต (เอนไซม์ 1 ยูนิตสามารถตัดดีเอ็นเอได้ 1 ไมโครกรัม) และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที ตรวจสอบขนาดเวกเตอร์ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจล และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ด้วย Nucleospin Extract II[®]

5.4 การเชื่อมต่อยีนแมนนาเนสเข้ากับเวกเตอร์ pFlag-CTS

นำเวกเตอร์ pFlag-CTS และยีนแมนนาเนสที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *KpnI* และทำให้บริสุทธิ์แล้วมาผสมกันตามคู่มือของบริษัท Promega โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ 10x บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร ผสมยีนแมนนาเนสและเวกเตอร์ pFlag-CTS ในอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อเวกเตอร์ 3:1 เอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำปรับให้ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

5.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสม

ดำเนินการตามวิธีการในข้อ 3.5

5.6 การคัดเลือกเซลล์ลูกผสม

คัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใสล้อมรอบเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโลคัสบีบักม 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

6. การผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสมด้วยวิธีดัดแปลงของ Yamabhai *et al.* (2008) โดยใส่เซลล์ลูกผสม 1 โคโลนีลงในอาหาร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เติมเซลล์ลูกผสมที่เลี้ยงข้ามคืน 1% ลงในอาหาร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าที่

200 รอบต่อนาทีจนได้ค่าดูดกลืนแสง 0.6 ที่ 600 นาโนเมตร เติม IPTG โดยแปรผันความเข้มข้นของ IPTG เป็น 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 และ 1.25 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส พร้อมกับแปรผันเวลาในการเหนี่ยวนำ (induction time) เป็น 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 20 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร แช่หลอดเก็บตัวอย่างในน้ำแข็ง 5 นาที เหยียงแยกเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 8000 g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนของ extracellular เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสและวัดปริมาณโปรตีน จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย spheroplast buffer (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาทีและเหยียงแยกเซลล์และส่วนใสที่ 8000 ×g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนและฆ่าเชื้อแล้วและผสมด้วย $MgCl_2$ 1 มิลลิโมลาร์ที่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาทีพร้อมเขย่าเป็นระยะ และเหยียงแยกเซลล์และส่วนใสที่ 8000 ×g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของ periplasm เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสและวัดปริมาณโปรตีน จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ที่เหลือด้วย lysis buffer 1 มิลลิลิตรที่ 8000 ×g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer อีกครั้งโดยอัตราส่วน lysis buffer ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักเซลล์เปียก 1 กรัม ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator โดยทำบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที (พัก 30 วินาที) เหยียงแยกเซลล์และส่วนใสที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของ cytoplasm เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสและวัดปริมาณโปรตีน

7. การสกัดโปรตีนจากอะครีลาไมด์เจล

7.1 การทำอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Laemmli (1970) โดยเตรียมเจลอะครีลาไมด์ separating gel 12% และ stacking gel 4% (ภาคผนวก ข12.2) ผสม sample dye (ภาคผนวก ข12.1.6) กับตัวอย่างในอัตราส่วนระหว่าง sample dye : ตัวอย่าง เท่ากับ 1:4 โหลดโปรตีนตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานลงในเจลและต่อเครื่อง Mini PROTEAN® tetra cell, Bio-Rad (USA) เข้ากับ power supply เริ่มจากใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ในสภาวะ stacking gel 4% เมื่อโปรตีนเริ่มเข้าสู่ separating gel 12% เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ SeeBlue® Plus2 Pre-stained standard (Invitrogen, USA) ประกอบด้วย Myosin (250 kDa), Phosphorylase (148 kDa), BSA (98 kDa), Glutamic dehydrogenase (64 kDa), Alcohol dehydrogenase (50 kDa), Carbonic anhydrase (36 kDa), Myoglobin red (22 kDa), Lysozyme (16 kDa), Aprotinin (6 kDa) and Insulin, B chain (4 kDa)

7.2 การตัดเจล

ทำอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสภายใต้สภาวะ non-denaturing PAGE (Bañuelos *et al.*, 2005) โดยเติม SDS ทั้งในส่วน separating gel 12%, stacking gel 4% และ sample dye เตรียม sample dye โดยไม่เติม β -mercaptoethanol ตัวอย่างที่ผสมกับ sample dye ซึ่งเตรียมแบบ non-denaturing PAGE จะไม่ผ่านการให้ความร้อน หลังทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว ตัดเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเพื่อตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีน โดยนำไปย้อมด้วยสารละลาย silver ด้วยชุด Pierce® silver stain kit ตามวิธีของบริษัท Thermoscientific (USA) และอีกส่วนหนึ่งสำหรับสกัดเอนไซม์ออกจากเจลอะครีลาไมด์เพื่อใช้ในขั้นตอนทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป ทำการสกัดโปรตีนออกจากเจลอะครีลาไมด์ตามวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากเจลอะครีลาไมด์ (TECH TIP #51) ของบริษัท Thermoscientific (USA) โดยตัดชิ้นโปรตีนที่สนใจใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer (ภาคผนวก ข8) ให้ท่วมเจล หรือประมาณ 400 ไมโครลิตร บดเจลเป็นชิ้นเล็กๆ และบ่มในบัฟเฟอร์พร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นแยกเศษเจลออกจากส่วนใส โดยใช้เครื่องเหวี่ยงแยกที่ ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสเพื่อใช้วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

8. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส

กิจกรรมของเอนไซม์ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Titapoka *et al.* (2008) โดยเตรียมปฏิกิริยาประกอบด้วย เอนไซม์แมนนาเนส 100 ไมโครลิตร และสับสเตรทโลคัสปีนัม 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่เตรียมในซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์พีเอช 4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) 200 ไมโครลิตร คัมในน้ำเดือด 5 นาที และทำให้เย็นในน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller 1959) โดย 1 ยูนิตของกิจกรรมเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยได้น้ำตาลแมนโนส 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะในการทดลอง

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสด้วยวิธี gel diffusion assay ดัดแปลงจากวิธีของ Downie *et al.* (1993) โดยเทสารละลายประกอบด้วยสับسترทโลคัสปีนัม 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ละลายใน citrate buffer pH 4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และวุ้น (agar) 1.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในเพลทปริมาตร 25 มิลลิลิตร รอให้วุ้นแข็งประมาณ 1 ชั่วโมง เจาะวุ้นให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.6 เซนติเมตร ใส่สารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ลงในวุ้นที่เจาะ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (ประมาณ 18 ชั่วโมง) เทสารละลายคองโกเรด (congo red) 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แซ่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เทสารละลาย congo red ที่ล้างเพลทด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์จนกว่าจะเห็นวงใสชัดเจน เทกรดอะซิติก 0.5% โดยปริมาตร เพื่อให้เห็นวงใสชัดเจนขึ้น วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ปรากฏบนวุ้น

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์ (zymogram) ตามวิธีดัดแปลงของ Gersten (1996) โดยผสมเจลอะคริลาไมด์ 7.5% กับสับسترทโลคัสปีนัม 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่เตรียมในซีเตรทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 4 หลังจากทำอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิสภายใต้สภาวะ non-denaturing (เตรียม sample dye โดยไม่เติม β -mercaptoethanol และไม่ผ่านการให้ความร้อน) ล้างเจลอะคริลาไมด์ด้วยน้ำที่เอาไอออนออกแล้ว (deionized water) หลายๆ ครั้ง จากนั้นตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยประกบเจลอะคริลาไมด์เข้ากับเจลสับسترท บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นแซ่เจลสับسترทในสารละลาย congo red 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ประมาณ 30 นาที ล้างเจลด้วย NaCl เข้มข้น 1 โมลาร์จนกว่าจะเห็นแถบใสบนเจล และแซ่เจลในสารละลายกรดอะซิติก 0.1% โดยปริมาตรเพื่อให้เห็นแถบใสชัดเจนขึ้น

9. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ดำเนินการโดยวิธี Bradford โดยใช้ชุดทดสอบ dye reagent concentrate (Bio-Rad, USA) ตามคู่มือในชุดทดสอบ โดยทำให้ dye reagent เจือจาง 5 เท่าก่อนใช้ และใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานคือ BSA (Bovine serum albumin) วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ปริมาณตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปริมาณ dye reagent 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร

10. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity Chromatography โดยใช้ชุด Ni-NTA Purification System (Invitrogen, USA) ดำเนินการตามคู่มือของบริษัท Invitrogen โดยใช้เรซินนิกเกิลอะกาโรส ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อโปรตีนเข้มข้น 5-10 มิลลิกรัม เตรียมเรซินสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ภายใต้สภาวะ native โดยดูดเรซินใส่หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 15 หรือ 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ให้เรซินตกตะกอนด้วยแรงโน้มถ่วง คูด่วนใสทิ้ง ล้างเรซินด้วยน้ำปราศจากไอออนและฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ปริมาตร 6 มิลลิลิตรโดยการกลับไปมาเบาๆ ประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ให้เรซินตกตะกอนด้วยแรงโน้มถ่วง เติม native binding buffer พีเอช 8 ที่ไม่มี imidazole ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมโดยกลับไปมาเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ให้เรซินตกตะกอนด้วยแรงโน้มถ่วง เติม native binding buffer พีเอช 8 ที่ไม่มี imidazole ปริมาตร 6 มิลลิลิตรซ้ำอีก 1 ครั้ง หลังจากคูด่วนใสออกหมดแล้ว เติมตัวอย่างลงในหลอดผสมกับเรซินโดยการคว่ำ-หงายเบาๆ ภายใต้สภาวะที่เย็นเป็นเวลา 30-60 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ให้เรซินตกตะกอนด้วยแรงโน้มถ่วง ล้างเรซินด้วย native wash buffer พีเอช 8 ที่มี imidazole เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง สะโปรตีนที่ต้องการออกจากเรซินโดยเติม native elution buffer พีเอช 8 ที่มี imidazole เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 8-12 มิลลิลิตรลงในหลอดเก็บตัวอย่างที่มีเรซิน คว่ำ-หงายเบาๆ ถ่ายเรซินที่ผสมอยู่กับ native elution buffer ลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที ให้เรซินตกตะกอนด้วยแรงโน้มถ่วง เปิดจุกด้านล่างของคอลัมน์ เก็บตัวอย่างทั้งหมด 8-12 fraction หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างจากทุกขั้นตอนเพื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

11. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

11.1 การทำอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ดำเนินการตามวิธีการในข้อ 7.1

11.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ (Hames, 1998)

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ โดยทำอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสภายใต้สภาวะ denaturing SDS-PAGE ใช้ separating gel 12% เตรียม sample dye ที่มีทั้ง SDS และ β -mercaptoethanol ต้มตัวอย่างที่ผสมกับ sample dye แล้วในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที หลังทำ

อิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมเจลด้วย silver stain kit (Pierce) วัดระยะทางจากเวลถึง dye front และวัดระยะทางจากเวลถึงแถบโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่าง คำนวณค่า relative mobility ($R_f = \text{ระยะทางของโปรตีนมาตรฐานหรือโปรตีนตัวอย่าง} / \text{ระยะทางของ dye front}$) สร้างกราฟมาตรฐานของ $\log M.W$ ของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f และเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน

12. การวิเคราะห์พีเอชที่เหมาะสมและความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ

การวิเคราะห์ค่าพีเอชที่เหมาะสม (optimal pH) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์วัดที่พีเอช 3.0-10.0 โดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ดังนี้ ซิตเรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer) pH 3-6., ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 6-8 และ glycine-NaOH buffer พีเอช 8-10 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยมีไลคัสบินกัม 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ละลายในบัฟเฟอร์แต่ละชนิด

การวิเคราะห์ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์วัดโดยใช้บัฟเฟอร์ที่พีเอชเดียวกันกับการวิเคราะห์หาพีเอชที่เหมาะสม บ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ โดยเจือจางเอนไซม์ในแต่ละบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที วัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือโดยปรับพีเอชในปฏิกิริยาให้เป็นพีเอชที่เหมาะสมด้วย NaOH หรือ HCl เข้มข้น 1 นอร์มัลและวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum pH และ optimum temperature) เป็นเวลา 30 นาที

13. การวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมและความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

การวิเคราะห์อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์วัดในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียสในบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสม เป็นเวลา 30 นาที

การวิเคราะห์ความเสถียรของอุณหภูมิโดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 10-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum pH และ optimum temperature)

14. การวิเคราะห์ความจำเพาะต่อสับสเตรท (Substrate specificity)

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสับสเตรทต่างๆ ได้แก่ โลกัสปินกัม, α -mannan, ivory nut mannan, คอนยัคกลูโคแมนแนน, xylan (จาก oat spelts), CMC, avicel และกากมะพร้าว (copra meal) ที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (optimum condition)

15. การวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทโดย Thin layer chromatography (TLC) (Degradation pattern)

15.1 การเตรียมโอลิโกแซคคาไรด์

แปรผันเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสับสเตรท 3 ระดับคือ 1, 4 และ 8 ยูนิต ย่อย 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสับสเตรททั้งหมด 3 ชนิดคือ โลกัสปินกัม คอนยัคกลูโคแมนแนนและกากมะพร้าวที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted copra meal) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที เหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกกากและส่วนใส เก็บส่วนใสสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำการทดลอง วัดน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใสที่ได้จากการย่อยด้วยวิธี DNS และวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธี TLC

15.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรท

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Zahura *et al.* (2012) วิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นแก้วที่เคลือบด้วยซิลิกา (TLC silica gel 60) ขนาด 10x20 เซนติเมตร (Merck) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรท เทียบกับสารมาตรฐานคือ น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลคโตส และแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannobiose (M2), mannotriose (M3), mannotetraose (M4), mannopentaose (M5) และ mannohexaose (M6)) โดยหยดตัวอย่างลงบนแผ่นซิลิกา 5 ไมโครลิตร จากนั้นวางแผ่นซิลิกาในโถแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นทำให้แผ่นซิลิกาแห้งและพ่นด้วยกรดซัลฟิวริก 10% ในเอทานอลให้ทั่วแผ่น อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

16. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อในสถานะที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ

การศึกษาผลของโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคทำโดยใช้โอลิโกแซคคาไรด์ในส่วนใสที่ได้จากการย่อยสับเสตรทโลคัสปีนัม คอนยัคกลูโคแมนแนนและกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว เป็นแหล่งคาร์บอน เทียบกับน้ำตาลกลูโคสและสารฟรีไบโอติกส์ทางการค้า (ACTIGENTM) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากน้ำตาล (basal medium) ในการทดลองคือ อาหาร MRS ที่ไม่มีน้ำตาลสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกและอาหาร nutrient broth สำหรับแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้ *Leuconostoc citreum* JCM 9698, *Weissella confusa* JCM 1093, *Lactobacillus salivarius* AC21, *Lactobacillus salivarius* KL-D4, *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805, *Lactobacillus johnsonii* KUNN19-2, *Escherichia coli* E010, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* S003 และ *Salmonella Enteritidis* DMST 17368

16.1 การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (target strains)

การเตรียมเซลล์ที่ใช้ในการทดลองตามวิธีดัดแปลงของ Titapoka *et al.* (2008) โดยใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ nutrient broth ตามลำดับ เหยี่ยแยกเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงข้ามคืนเพื่อกำจัดน้ำเลี้ยงเชื้อ ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85% (normal saline) เติมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 1% ที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 ลงใน basal medium เติมน้ำตาลรีดิคัลที่วัดได้ในส่วนใสที่ได้จากการย่อยสับเสตรทแต่ละชนิด รวมถึงน้ำตาลกลูโคสและสารฟรีไบโอติกส์ทางการค้า (ACTIGENTM) ลงในอาหารที่ใช้ในการทดลอง จากนั้นบ่มเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัสและแบคทีเรียก่อโรค และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc citreum* JCM 9698, *Weissella confusa* JCM 1093 และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 วัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง microplate reader (Model 680, Bio-Rad) ทุกๆ 3 ชั่วโมงและสร้างกราฟการเจริญและคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

16.2 การเตรียมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

ดำเนินการตามวิธีดัดแปลงของ Saminathan *et al.* (2011) การเตรียมสารละลายจากการย่อยด้วยเอนไซม์ (hydrolysate) โดยย่อย 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสับเสตรทโลคัสปีนกับคอนยัคกลูโคแมนแนนและกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว ด้วยเอนไซม์แมนนาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้ม 10 นาที และกรองส่วนใสด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน สำหรับชุดควบคุมเตรียมจากน้ำตาลกลูโคสและสารฟรีไบโอติกส์ทางการค้า (ACTIGEN™) ที่ความเข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นกรองสารละลายด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อใช้ในการทดสอบผลของ hydrolysate ต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคต่อไป

16.3 การวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย

ดำเนินการตามวิธีของ Saminathan *et al.* (2011) ทำการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียด้วยการหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) จากสมการ

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$$

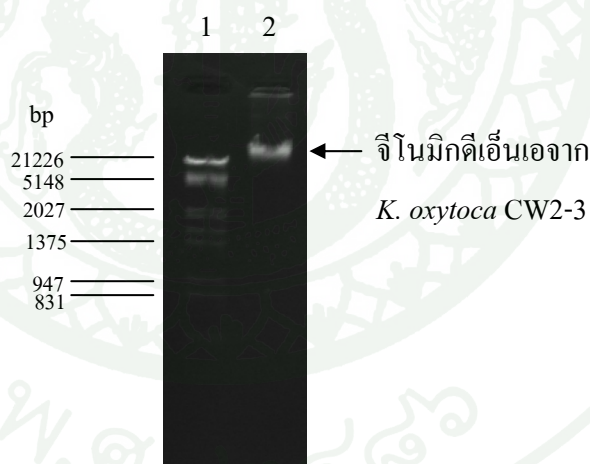
เมื่อ x_1 และ x_2 คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรที่วัดได้ในช่วง log phase ของแบคทีเรียที่เวลา t_1 และ t_2 โดยการสร้างกราฟระหว่างค่า $\ln x$ กับเวลา (ชั่วโมง) ซึ่งจะได้ค่า slope เป็นค่าการเจริญจำเพาะ (μ) ในช่วง log phase ของแบคทีเรียแต่ละชนิด (El-mansi *et al.*, 2012)

ผลและวิจารณ์

1. การโคลนยีนเมนนานาจาก *Klebsiella oxytoca* CW2-3

1.1 คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอจาก *K. oxytoca* CW2-3

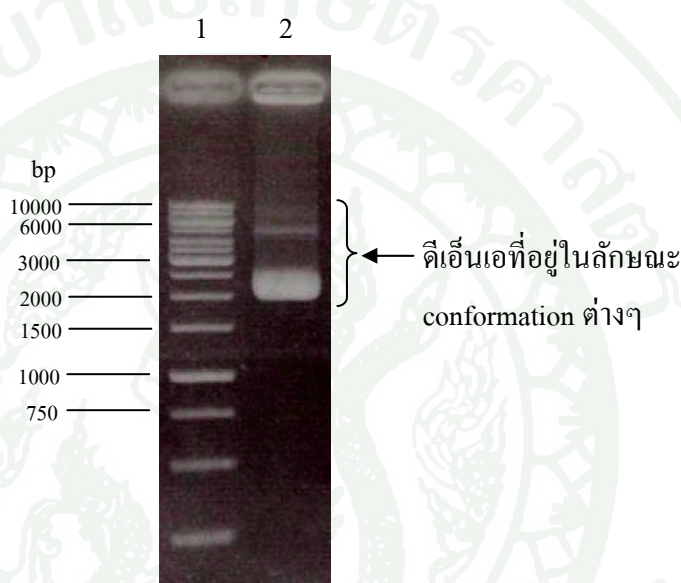
ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเซลล์ *K. oxytoca* CW2-3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสพบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะสมบูรณ์ (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอไม่ถูกทำลายในระหว่างขั้นตอนการสกัด เมื่อวิเคราะห์ค่าอัตราส่วนของ A260/A280 และ A260/A230 พบว่า ดีเอ็นเอมีค่า A260/A280 เท่ากับ 1.907 และค่า A260/A230 เท่ากับ 2.236 ซึ่งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีควรมีอัตราส่วน A260/A280 มากกว่า 1.8 และค่าอัตราส่วน A260/A230 มากกว่า 1.5 (Darbre, 1999; Surzycki, 2000) ดังนั้นเห็นได้ว่าดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์สูงและสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีความเข้มข้น 1.75 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร



ภาพที่ 6 ลักษณะจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *K. oxytoca* CW2-3 เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ตัดด้วย *Hind*III และ *Eco*RI เลนที่ 2 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *K. oxytoca* CW2-3

1.2 คุณภาพและปริมาณของพลาสมิด pUC19

ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พบดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งอยู่ในรูป circular และ supercoil (ภาพที่ 7) ดีเอ็นเอมีค่า A260/A280 เท่ากับ 1.931 และค่า A260/A230 เท่ากับ 2.501 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูงและสามารถนำไปใช้ต่อในขั้นตอนต่อไป เมื่อวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีความเข้มข้น 7.82 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

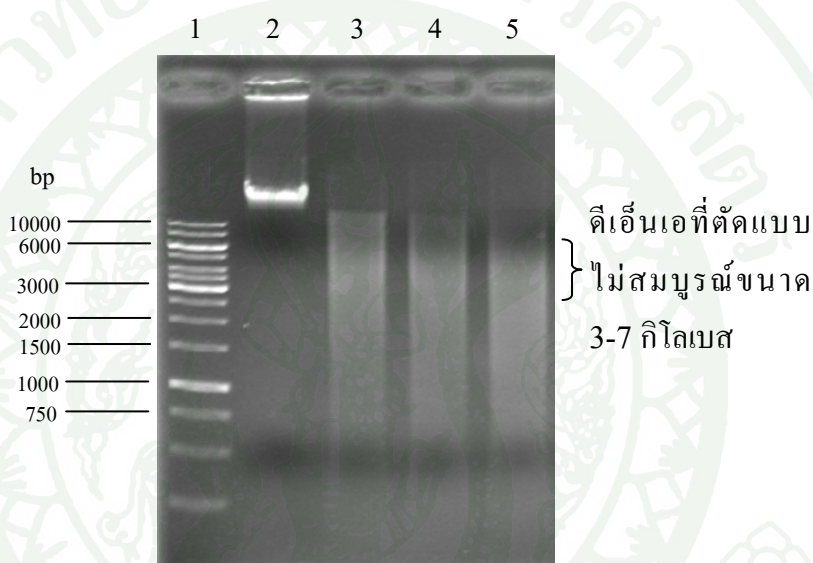


ภาพที่ 7 ลักษณะพลาสมิด pUC19 สกัดจากเชื้อ *E.coli* DH5 α เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส เลนที่ 2 พลาสมิดที่สกัดจากเชื้อ *E.coli* DH5 α

1.3 การเตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอขนาด 3-7 กิโลเบสแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI*

จากการศึกษาเอนไซม์เมนนานเนสของ Titapoka *et al.* (2008) พบเมนนานเนสขนาด 165 กิโลดาลตัน เมื่อคำนวณกลับเป็นกรดนิวคลีอิกพบว่ามีความยาว 4.5 กิโลเบส จึงทำการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *K. oxytoca* CW2-3 ให้อยู่ในช่วง 5-10 กิโลเบสด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* ให้ปลายสายมีลำดับเบสคู่สมกับเวกเตอร์ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI เมื่อโคลนยีนขนาด 5-10 กิโลเบสที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pUC19 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α และตรวจสอบเซลล์ลูกผสม ไม่พบเซลล์ลูกผสมที่มียีนเมนนานเนส

เมื่อพิจารณาจากขนาดดีเอ็นเอของแมนนาเนสจากแบคทีเรียชนิดอื่นพบว่ามีความอยู่ในช่วง 1-2 กิโลเบส จึงได้ลดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดเหลือ 3-7 กิโลเบส โดยทดลองตัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ 0.5 หน่วย/ไมโครลิตร และแปรผันเวลา 20, 30 และ 40 นาที ผลการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* โดยใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 0.5 หน่วย/ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 1% พบลักษณะของดีเอ็นเอในช่วงขนาด 3-7 กิโลเบสมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 8

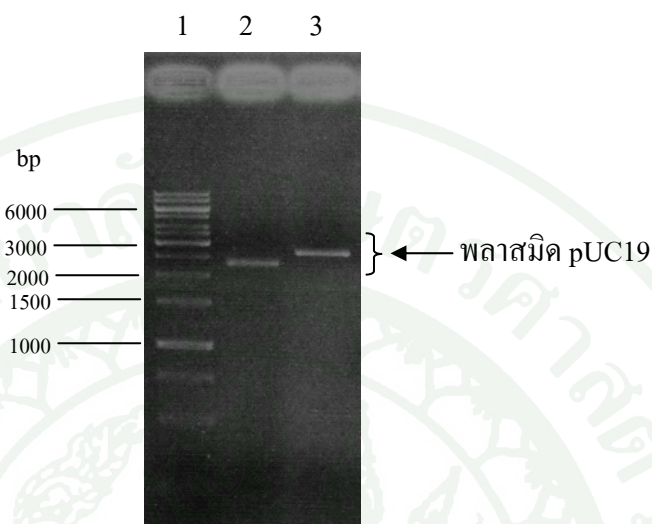


ภาพที่ 8 จีโนมดีเอ็นเอของ *K. oxytoca* CW2-3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* 0.5 หน่วย/ไมโครลิตร เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส เลนที่ 2: จีโนมดีเอ็นเอของ *K. oxytoca* CW2-3 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* 0.5 หน่วย/ไมโครลิตร เลนที่ 3: จีโนมดีเอ็นเอของ *K. oxytoca* CW2-3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* 0.5 หน่วย/ไมโครลิตร, 20 นาที เลนที่ 4: จีโนมดีเอ็นเอของ *K. oxytoca* CW2-3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* 0.5 หน่วย/ไมโครลิตร, 30 นาที เลนที่ 5: จีโนมดีเอ็นเอของ *K. oxytoca* CW2-3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* 0.5 หน่วย/ไมโครลิตร, 40 นาที

1.4 การเตรียมพลาสมิด pUC19 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

ทำการตัดพลาสมิด pUC19 ให้อยู่ในรูปเส้นตรง (linear form) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ที่มีปลายที่คู่สมกับจีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ผลการตรวจสอบด้วย

เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบขนาดของพลาสมิดที่อยู่ในรูปเส้นตรงมีขนาด 2.69 กิโลเบส (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ลักษณะพลาสมิด pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

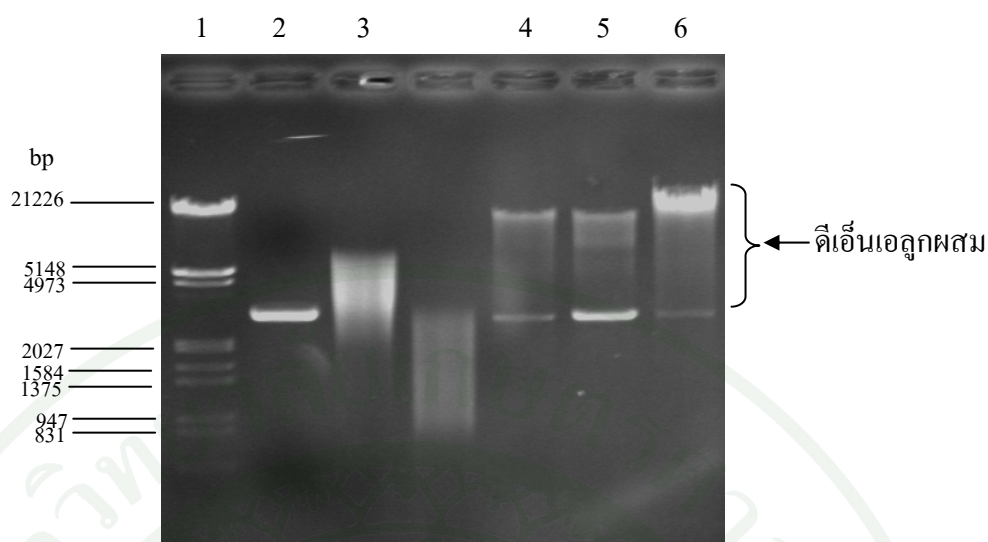
เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส

เลนที่ 2 พลาสมิด pUC19 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

เลนที่ 3 พลาสมิด pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

1.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตัดแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI กับเวกเตอร์ pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI โดย แปรผันอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอและพลาสมิด (insert : vector) เป็น 1:1, 1:3 และ 3:1 พบว่า เมื่อผสม insert : vector ในอัตราส่วน 3:1 พบพลาสมิดถูกผสมขนาดต่างๆ สูงที่สุด (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของจีโนมิกดีเอ็นเอและพลาสมิดในอัตราส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอต่อพลาสมิด 1:1, 1:3 และ 3:1

เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA ตัดด้วย *Hind*III และ *Eco*RI

เลนที่ 2 พลาสมิด pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ขนาด 2.69 กิโลเบส

เลนที่ 3 จีโนมิกดีเอ็นเอขนาด 3-7 กิโลเบส

เลนที่ 4 ดีเอ็นเอลูกผสมที่เชื่อมต่อกันด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ ขนาด 3-7 กิโลเบสและพลาสมิดในอัตราส่วน 1:1

เลนที่ 5 ดีเอ็นเอลูกผสมที่เชื่อมต่อกันด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ ขนาด 3-7 กิโลเบสและพลาสมิดในอัตราส่วน 1:3

เลนที่ 6 ดีเอ็นเอลูกผสมที่เชื่อมต่อกันด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ ขนาด 3-7 กิโลเบสและพลาสมิดในอัตราส่วน 3:1

1.6 คุณภาพคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cells)

นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 α โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง LA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า *E. coli* DH5 α สามารถเจริญได้ถึง 3.9×10^8 CFU/ml และเมื่อถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอ pUC19 เข้มข้น 10 นาโนกรัมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ 3.1×10^4 CFU/ml คิดเป็นค่า transformation efficiency เท่ากับ 3.1×10^6 โคโลนีต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่า คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 α มีประสิทธิภาพในการนำมาถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยวิธี heat shock

1.7 การถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

พบเซลล์ลูกผสมทั้งหมด 624 โคโลนี ได้จากการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อด้วยอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอและเวกเตอร์ 1:1, 1:3 และ 3:1 ด้วยปริมาณพลาสมิดลูกผสม 100, 10 และ 5 นาโนกรัม ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่า *E. coli* ลูกผสมทั้งในลักษณะโคลนสีขาวและสีฟ้าเป็น 1-230 และ 0-37 โคโลนี ตามลำดับ โดยพบว่าการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่อัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 100 นาโนกรัม เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α มีค่า transformation efficiency สูงสุด ขณะที่อัตราส่วน 3:1 ปริมาณ 5 นาโนกรัม ให้ค่าต่ำสุด

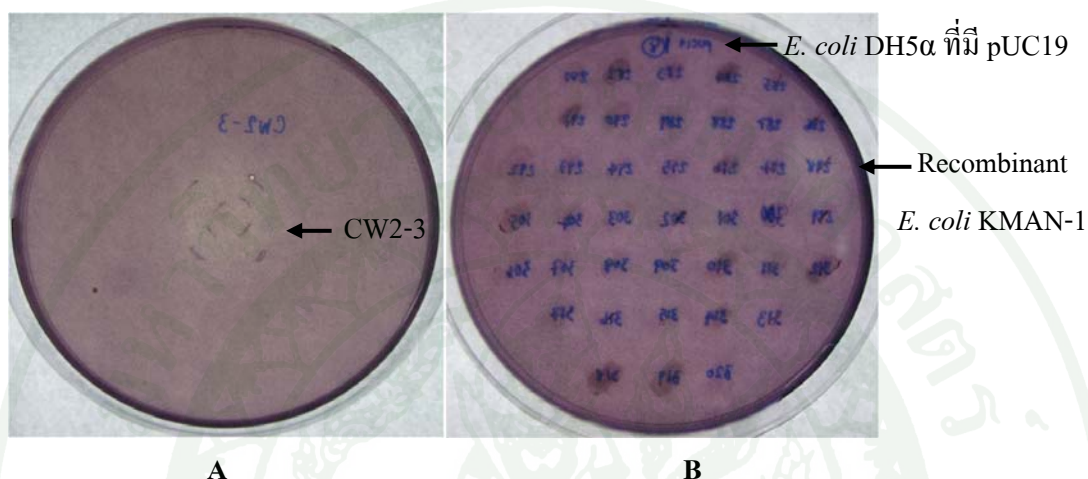
ตารางที่ 6 ปริมาณเซลล์ลูกผสมที่ได้จากการถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยใช้โณมิกดีเอ็นเอขนาด 3-7 กิโลเบส

อัตราส่วน ligation	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)	โคโลนีสีขาว	โคโลนีสีฟ้า	Transformation efficiency (CFU/ μ g DNA)
1:1	100	230	37	2.67×10^3
	10	18	3	2.1×10^3
	5	9	3	2.4×10^3
1:3	100	190	37	2.27×10^3
	10	25	1	2.6×10^3
	5	6	-	1.2×10^3
3:1	100	49	5	5.4×10^2
	10	7	3	1×10^3
	5	1	-	2×10^2

1.8 การตรวจสอบเซลล์ลูกผสมผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

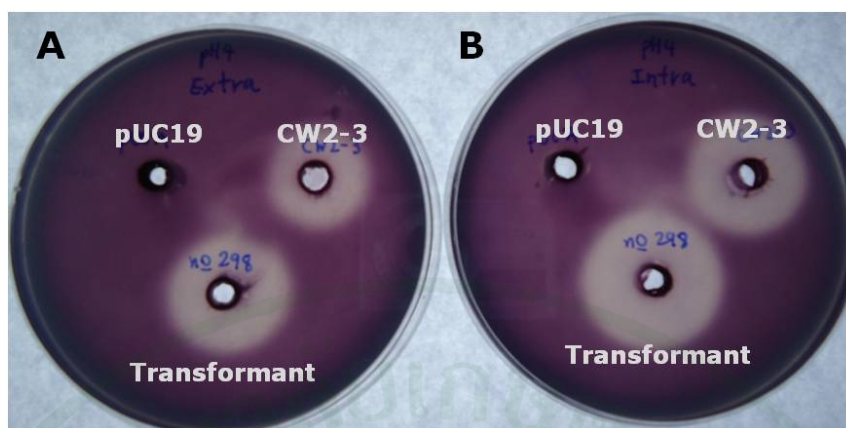
ตรวจสอบเซลล์ลูกผสมโดยเลี้ยงเซลล์ลูกผสมทั้งหมดที่ได้จากการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* DH5 α บนอาหารที่ใช้คัดเลือกซึ่งประกอบด้วยอาหารแข็ง LB ผสมกับโลคัสปีนัมที่ใช้เป็นสับสเตรทปริมาณ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบเซลล์ลูกผสมหมายเลข 298 เพียงโคโลนีเดียวเท่านั้นจากเซลล์ลูกผสมทั้งหมด 624 โคลน ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสรอบโคโลนีเทียบกับ *K. oxytoca* CW2-3 ที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมและ *E. coli*

DH5 α ที่มีพลาสมิด pUC19 เป็น negative control โดยให้ชื่อเซลล์ลูกผสมนี้ว่า *E. coli* KMAN-1 (ภาพที่ 11) เซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-1 นี้เป็นโคโลนีสีขาวที่ได้จากการถ่ายโอน พลาสมิด ลูกผสมที่เชื่อมต่ออัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อเวกเตอร์ เท่ากับ 1:3 และใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอลูกผสม 100 นาโนกรัม



ภาพที่ 11 ลักษณะของโคโลนีที่แสดงกิจกรรมแมนนานเอส (A) สายพันธุ์ดั้งเดิม *K. oxytoca* CW2-3 และ (B) เซลล์ลูกผสม *E. coli* และ *E. coli* DH5 α ที่มี pUC19 ซึ่งใช้เป็น negative control

ยืนยันการผลิตเอนไซม์แมนนานเอสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-1 โดยเลี้ยงเซลล์ลูกผสมในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพร้อมเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงและเหวี่ยงแยกเซลล์เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ (extracellular) เพื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี gel diffusion assay ส่วนตะกอนเซลล์นำมาแขวนลอยในไลซิสบัฟเฟอร์ และทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication เก็บส่วนใสหลังจากเหวี่ยงแยกกากเซลล์ เพื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ในส่วน intracellular ด้วยวิธี gel diffusion assay เช่นเดียวกันโดยเทียบกับชุดควบคุม positive control คือ ตัวอย่างที่ได้จาก *K. oxytoca* CW2-3 และ negative control คือตัวอย่างที่ได้จาก *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pUC19 (ภาพที่ 12) พบวงใส (clear zone) จากตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ในลักษณะ extracellular และ intracellular ของเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-1 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 2.2 และ 2.5 เซนติเมตร ตามลำดับ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสจากเอนไซม์ในส่วน extracellular และ intracellular ของ *K. oxytoca* CW2-3 ได้ 1.8 และ 2.1 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ส่วน extracellular และ intracellular ของ negative control ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนานเอส

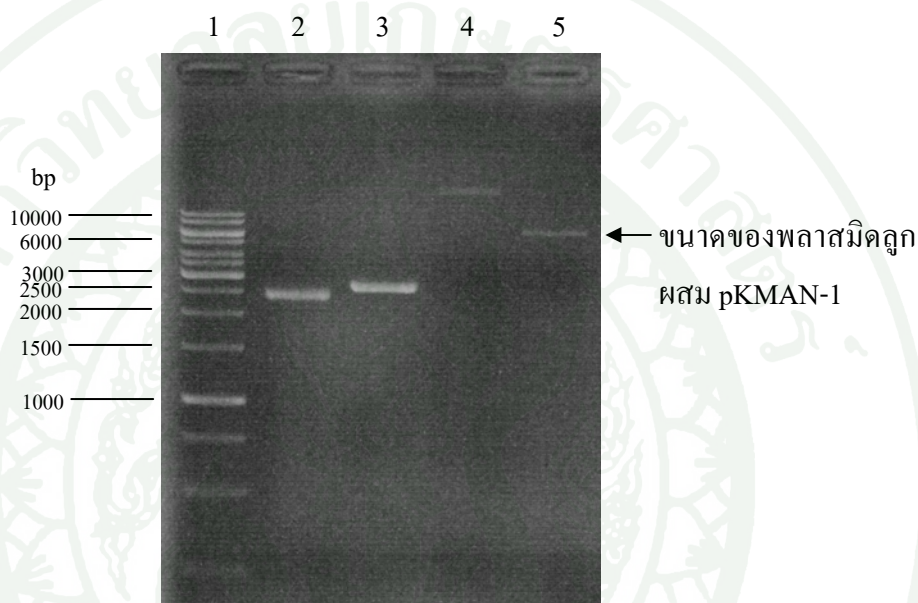


ภาพที่ 12 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-1 (A) extracellular enzyme; (B) intracellular enzyme

โดยปกติ *E. coli* จะไม่ส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ ยกเว้นโปรตีนบางกลุ่ม เช่น toxin และ hemolysin โปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสมที่ออกมานอกเซลล์ได้ อาจเกิดจากการรั่วซึมของโปรตีนจากส่วน periplasm ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ของเซลล์เมมเบรนของ *E. coli* ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ (Choi and Lee, 2004) นอกจากนี้ การใช้พลาสมิดที่มีการควบคุมการผลิตโปรตีนด้วย lac promoter เช่น พลาสมิดในตระกูล pUC, pTZ, pSK, pBluescript และ pGEM ซึ่งมีการควบคุมที่อ่อน อาจเกิดการผลิตโปรตีน และส่งออกมานอกเซลล์ได้ (leakiness) (Terpe, 2006 และ Baneyx, 1999) ซึ่งการตรวจสอบพบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-1 ด้วย ซึ่งอาจเกิดจากเหตุการณ์ดังที่กล่าวมา โดยมีงานวิจัยบางงานที่ใช้พลาสมิด pUC18 หรือ pUC19 ในการโคลนยีนแมนนาเนสเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* และสามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์ของเซลล์ลูกผสม โดยดูจากการย่อยสลายสเตรปโทนาอาหารแข็ง (clear zone) ได้ เช่น การโคลนยีนแมนนาเนสจาก *Erwinia carotovora* CXJZ95-198 (Zhang *et al.*, 2007) และ *Bacillus subtilis* NM-39 (Mendoza *et al.*, 1995) ด้วยการทำธนาคารยีน โดยใช้เวกเตอร์และเซลล์เจ้าบ้านคือ pUC18 และ *E. coli* DH5 α ตามลำดับ และการโคลนยีนแมนนาเนสจาก *Pantoea agglomerans* A021 ด้วยการทำธนาคารยีน โดยใช้เวกเตอร์และเซลล์เจ้าบ้านคือ pUC19 และ *E. coli* DH10B ตามลำดับ (Wang *et al.*, 2010)

1.9 ขนาดพลาสมิดลูกผสม pKMAN-1

ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pUC19 เมื่อคำนวณขนาดพลาสมิดลูกผสมพบว่า ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC19 มีขนาด 3,314 คู่เบส (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การตรวจสอบขนาดของพลาสมิดลูกผสม pKMAN-1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI
 เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส
 เลนที่ 2 พลาสมิด pUC19 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI
 เลนที่ 3 พลาสมิด pUC19 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI
 เลนที่ 4 พลาสมิดลูกผสมที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI
 เลนที่ 5 พลาสมิดลูกผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1 ตำแหน่ง open reading frame

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *kman-1* (GenBank accession number KM100456) ดังแสดงใน
 ภาพที่ 14 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ORF Finder ที่เว็บไซต์

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> พบ 1 open reading frame ที่มีลำดับเบสของยีนเมนนานเนส ประกอบด้วย จุดเริ่มต้น ATG และ stop codon คือ TAA มีขนาด 1,164 คู่เบส (387 กรดอะมิโน) (ภาพที่ 15)



>kman-1

GTGCAGCAGCTGAGCGCTGGTACCGTCAAAAACTCTCGATGCACTGAGGTTCCGTCGGCAGCGTGCGCCGAACGTAAAC
GAGCTAACCGCCTGGCCAGATATTCTCGTGAGCGCCAGATTACAGAAATGTCGCTTCATATCTGAAGACAATGCCGGCAG
ACGAGGCTTACTGGTGACACGGAGCGGCTGCAGCAGCTGGCCATTGAGAAGCTGATCAGCTGGAGCTGGCCCTGGCTC
CGCCGCTCTGACGGATATCATTTAGCTATTTTTCTATGCCCTGCCCGGGGCTTTGGCGTTTGTCCGGATTATGAAAG
TGCCCTGGTTTTATCCATCTGACGTTCCGGCCGTGGGACCATCGCTGGTTTGGAGCAGTATACCCTGTGACGTTCCGACCA
GGTTTTCACTTATCCAAAAACCGCAAATGAATAAACAGGGAATTTAGCAAAAGGGTAACAGCAAACTGCAAAATAGT
CTTACCCCACTTTTTTAATCCCTGCAATTGCAAGCAGCAGGGAGATCTTTTGTCTCTGCCGGCTCTGTGAATAACTCAATG
AGGCTTTCGCTTACAGCGGCCGACGCGTCCGCGTCTGCTCAGATAAAAGTAGTCCCATCGCTCCGCGACGGGCCCCGACC
GGAGAAGTAAATTAGTTACAGCATTGATAATGATGTTTCATCATAAACCAGCGCCGGTTTGGCGGCCAGGAGCCCTCCCC
ACCACTGAAAAGCGCCGCCGCCGCCGCCGGAAGGCCGGGAGTAGTGTGCTTTAATGATGGGTGTTGTAAGTACTCTTCT
TCATCGCTGTGGGTGGAGCTGCGGTGAGTTGCTGGTACACGCTCATAAGCGGCCCTGCGGCCCGCTAACGCGGAGATACG
CCCCGACTGCGGCTGTGCGCTTGTGCGGACCACTCCGACCGCGTACAGGGGCGTCTGAGATGTTTTGAGCGGGTATGGCTT
TGCAGGGAAGGGGTGCGTGAGGCAGAACCTGTCAAACTGCAGCCGGCTGCGCCGGGCGACGGCGCCATTTACCCGCGGTA
CTCCATTCAACTTCAGCTGGCGCCTCCATGCCGCTGACGCGGCATACAAAAGCTTATCGGTGTGCTTACTGATCCGGCGTC
CGGCTCACACAAGCCCACTATCTGGCGGCCGGCTCGTTACCGTTACAGGGCACTTTTATTGCAATTGAAATGCATCGCTATT
TTTTTGTGTTGCGGTGTTGACAGCCATCTTCTCTCAAACTACTATCAAACTACTGTATAAAAAACACATGTGCACTTTATA
CAGTAGTTTTGCAGGAGGCTTACCGCCAACGGAGCACGCTCCGGAAGCCTTCCCGCAACACACACAGGGGGCCTTCAGGCC
CGGACACAACAATTATCATAAGGAAAAACATAATGACTTCTTCAACTGCAGTACCAGCGAATCCGCTGCGGACAATAGTG
CGAAAAAGGTTTACCAGTGGTTAAACGGGCTGCGGACAGCAACGGTAAAAAGCTCATCTCCGGTATCTTCGGCGGCTACAG
GCAATATCGGCGGGGACAGCGGTTTCTCCCTGGCCAGGGCAACGCCATTAAAGACGCCACCGGGAATTTCCCGCAATTT
ACGGGGCAGATTATGCCCGCGGCTGGGATGTCAGCGCGCCGGGTGATGAGGCCAGCCTTATCGATCACAGTTGTAACAGCG
ATTTAATCAAGCCACTGGAAAAACGGAGGGCTGGTTGCCATCAGTCACTACCTGCCGAACCCGTTCTATGCGGGTAACAATC
CGGGCACCGGTGAAGGGGGCTGAAAAAGGCCATCAGCAACGACGAGTTTGGCAGCATTCTGCAGGACGGCACTGGTGCGC
GTCAGCGCTGGCTGTCCCTGCTCGATAAAGTGGCAGAGGGACTGCAGGAGCTGCGGGATAACGGCGTCCGGGTGTGTACC
GTCCGCTGCACGAGATGAACGGCGAATGTTCTGGTGGGGCGCGACAGGCTATAACACAACGACGCCACGCGGCGAGGATC
TGTACCGCCGCTGTACAGGACGTGTTGAGCTATTTCTTAAACGAAAGGGCTGACCAACCTGCTGTGGGTGTTCTCC
CGGACGCGAACCCTGACCATAAACCGCGTACTATCCGGCGCCGGTTATGTGGATATCGCGGCTGCTGTTGTTTCTGATG
ACAATCCGGCTCCCTGTCCGGCTATGACGAAATGCTGGGCTGAACAAACCGTTCCGGCTGGTGGAGGTGGGACCGTCAA
CAACGAATGGCCAGTACGACTACGCCGTTCTGGTGAACACCATTTCTGAGAATTTCCGAAAACCATCATGTTTGTACCTT
GGAATGACGGATGGAGTCCGGTGAAGAACGAGACGCTGCTGCGGCATTCAATAACGGCAGCGTCATTAACCTGGGCGACA
TCAGCATCAGTGGTAACCCCCCTGTGAGCCCCGGCGTTGCCGGGGCCGGGAGAATGAAAATGAACACTGTACCCCAT
TCCTGGCCGGAGATGCTGGAGCTGTTCCATCGGTGGTGGCAGGGAGACTCGCCGGCCGGGCTGTGTTGTTTCTGTAGTG
ATGGCCGCCCTGCGCATGGCTTACTTTGGCGGACGAGGGCTGGAGAAAAAACGCTGGAGATGCTGCTGTGCGGCC
CTGACACTGACCTTCTCCTCAGCGCTGGAATATCTGGGATTACCGAAAACCTGTCGGTGGCGCTTGGCGGAGCGACAGGG
CTGACTGGTGTGGACACCATCAGAGCGCTGGTAATGAATTATCTTGCAGAGCGGCTTGGTCCCGGTAAACGAAAGGAGAAG
GTGTAACAATGGTGTGTTTACGTGGTATCCGCAATAACACCCAGGCAATATTCGCCGGGTGAAGACTGGAAGGAGTGG
TCCGGGACGGGCGAGGATACGGATGAAGCCTTGTGCGGTTGTTGCGCCGGAATATGGTATCCGGGCAATGTTCTTATCC
TCCGGCGATACCGGCGAAGCATAACCTGAACACGATAAGTGAGATTATCCGGCGCTGGGCCCCCGGATGAAAACGACA
CCCGGGCCTATATCGACAGTGTGGTGCAGACGACCGGCGTGCCGGCAGATCAGCAGGTTGATACCGGCGACAGCGGCTTTA
TGACAACACTTCTGAAAGCCATCATCCGGCACGAGAATGGCGAACAGCCTTATGGTGACGACGTGTTTGCCCGCGCCCTGG
CACTGGCAGGTGACACGTGATCACTGACGACGCTTGGCGCTGCTGAAAAAGACCGCCCTGCCAGGGATGGTGTGCTTGT
CATGGTGGCCGTGCTGCTGGCCGCCGGGCTTACCGGGACAGGCGCGTCAAGGAGACACTCAGGGCCGACAGGGCGGAACA
TAATCTTCAGGTGGCAACATCACCATTACCGACATGACAGCCGGGCGCGCGCTGGCGGCTCTGGATACCCGGTACAC
AAAGGAGTTAACCGATGCGAAAAAGAGCTTGGCGATTTGAGTCTTGTGTGCGCACTGGCCAGTGTGGGTTGCGGGTCAA
CGCCACCTGCCCGGCGGCGGCGCGTCCGGCGCCAGCCGATGGGCAATGCAGCCAGCCCCGACTTACAGACGCCGCTGA
ACGGGATTATTACCCCTCAGGGAGCGGATCAGCAGCTTAGCGGGCAGGTGAGATACCTGCAGGCCATCATCAGCACACA
GTGTATGAGGTAATGTCTTCCCTCGTTACATGCGAGGCTGGTGGTTTTTGTGCTGAAAAATAACGAAATATTCTGTA
TTGACACCTGAAAACATCAGGCGTAATGTTAATAATACTGTACATACATACAGTATATTGGTTTTAATTTGTTGTTTTA
AATGTCAAAGAGGAAATGATATGAGTGGTGGAGATGGACGAGGTCCGGGTAATTCGGGGCTGGGACATAATGGCGGTCAG
GCCAGTGAAATGTGAATGGTACGTCTGGTAAAGGTGGCCCTTCATCAGGTGGTGGTAC

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนในพลาสมิดลูกผสม

บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ ยีนแมนนาเนสที่ 1 ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ORF Finder

บริเวณที่ขีดเส้นใต้หนา คือ start codon ATG และ stop codon TAA บริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2
เส้น คือ ตำแหน่งโปรโมเตอร์ -10 (AACTACTAT) และ -35 (TTGACA)

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 3 กรกฎาคม 2557

1309 atgtgcatttatacagtagtttgcagggaggcttaccgccaacgg
 M C I Y T V V C R E A Y R Q R
 1354 agcacgctccggaagccttccccgcaacacaccagggggcctca
 S T L R K P S P Q H T R G P S
 1399 ggccccggacacaacaattatcataaggaaaaacataatgacttct
 G P D T T I I I R K N I M T S
 1444 tcaactgcagtagcagcgaatccgtctgccgacaatagtgcgaaa
 S T A V P A N P S A D N S A K
 1489 aagggtttaccagtggttaaacgggctgccggacagcaacggtaaa
 K V Y Q W L N G L P D S N G K
 1534 aagctcatctccggtatcttcggcggctacagcaatatcggcggg
 K L I S G I F G G Y S N I G G
 1579 gacagcgggtttctccctggcccagggaacgccattaaagacgcc
 D S G F S L A Q G N A I K D A
 1624 accgggaaattccccggcaatttacggggcagattatgccgcggc
 T G K F P A I Y G A D Y A R G
 1669 tgggatgtcagcgcgcggggtgatgaggccagccttatcgatcac
 W D V S A P G D E A S L I D H
 1714 agttgtaacagcgatttaacagccactggaaaaacggagggtg
 S C N S D L I S H W K N G G L
 1759 gttgccatcagtcacacctgccgaacccgttctatgcgggtaac
 V A I S H H L P N P F Y A G N
 1804 aatccgggcaccgggtgaaggggcctgaaaaaggccatcagcaac
 N P G T G E G G L K K A I S N
 1849 gacgagtttgcgaccattctgcaggacggcactggtgcgcgtcag
 D E F A T I L Q D G T G A R Q
 1894 cgctggctgtccctgctcgataaagtggcagagggactgcaggag
 R W L S L L D K V A E G L Q E
 1939 ctgccccgataacggcgtgcccgtgttgtagcgtccgctgcacgag
 L R D N G V P V L Y R P L H E
 1984 atgaacggcgaatggttctggtggggcgcgacaggctataacaca
 M N G E W F W W G A T G Y N T
 2029 aacgacgccacgcggcaggatctgtaccgccgctgtaccaggac
 N D A T R Q D L Y R R L Y Q D
 2074 gtgttcagctatttctgtaaacgaaagggtgaccaacctgctg
 V F S Y F V N T K G L T N L L
 2119 tgggtgttctccccggacgcgaaccgtgaccataaaaccgcgtac
 W V F S P D A N R D H K T A Y
 2164 tatccggggcgcgggttatgtggatatcgccggctctggatttttac
 Y P G A G Y V D I A G L D F Y
 2209 acggacaatccggcctccctgtccggctatgacgaaatgctgggc
 T D N P A S L S G Y D E M L G
 2254 ctgaacaaaccgttcggcctggtggaggtgggaccgtcaacaacg
 L N K P F G L V E V G P S T T
 2299 aatggccagtagcactacgccgttctggtgaacaccatttctgcag
 N G Q Y D Y A V L V N T I L Q
 2344 aacttccccgaaaccatcatgtttgtaccctggaatgacggatgg
 N F P K T I M F V P W N D G W
 2389 agtccgggtgaagaaccagaacgctgctgcggcattcaataacggc
 S P V K N Q N A A A A F N N G
 2434 agcgtcattaacctgggacatcagcatcagctggtaa 2472
 S V I N L G D I S I S W *

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนแมนนานเนส

บริเวณขีดเส้นใต้ 2 เส้น คือ กรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ของ glycosyl hydrolase แฟมิลี 26

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 3 กรกฎาคม 2557

2.2 ตำแหน่งโปรโมเตอร์

โดยโปรแกรม BPROM (Softberry: <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของแบคทีเรียพบว่า มีตำแหน่งที่มีโอกาสเป็นโปรโมเตอร์ 8 ตำแหน่ง (ภาพที่ 16) แต่มีเพียง 2 ตำแหน่งที่อยู่หน้า ATG ของยีนแมนนาเนส (ภาพที่ 16) คือตำแหน่ง 1279 (-10), 1259 (-35) และ 708 (-10), 689 (-35) ซึ่งตำแหน่งที่ 1279 (-10 AACTACTAT), 1259 (-35 TTGACA) มีโอกาสเป็นตำแหน่งของโปรโมเตอร์มากที่สุด เนื่องจากตำแหน่ง 1259 (-35) ที่เป็นตำแหน่งของโปรโมเตอร์ -35 (TTGACA) ของยีนแมนนาเนสจาก *K. oxytoca* CW2-3 มีลำดับเบสที่คล้ายกันกับโปรโมเตอร์ -35 (TTGTCA) ของยีนอื่นจาก *K. oxytoca* (Arakawa *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1999) และจากการศึกษาโปรโมเตอร์จากหลายๆ ยีนของ *E. coli* พบว่ามีความเหมือนกันน้อยมาก แต่ภายในแต่ละโปรโมเตอร์จะมีลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) ซึ่งเป็นช่วงนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ยาว 6 นิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับคงเดิมตลอดคือ ที่ตำแหน่ง -10 (TATAAT) และ -35 (TTGACA) (สุรินทร์, 2548) ซึ่งบริเวณลำดับอนุรักษ์ของโปรโมเตอร์ -35 (TTGACA) นี้ก็ตรงกันกับตำแหน่ง -35 ของยีนแมนนาเนสจาก *K. oxytoca* CW2-3 และแมนนาเนสจากแบคทีเรียอื่น เช่น *Bacillus stearothermophilus* (-35 TTGACA) ด้วย (Ethier *et al.*, 1998) แต่ไม่พบตำแหน่งของ ribosome binding site ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีเบส adenine (A) และ guanine (G) สูงและมีการแปรผันมาก (diverse) มักอยู่บริเวณ 3-14 เบสก่อนถึง ATG และมี conserve sequence คือ AGGAG (Oliveira *et al.*, 2004)

```

>kman-1_MAN26_completed_sequence
Length of sequence- 4095
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters - 8
Promoter Pos: 1294 LDF- 7.61
-10 box at pos. 1279 AACTACTAT Score 39
-35 box at pos. 1259 TTGACA Score 66
Promoter Pos: 723 LDF- 4.51
-10 box at pos. 708 GTTCATCAT Score 39
-35 box at pos. 689 TTACAG Score 26
Promoter Pos: 3900 LDF- 3.93
-10 box at pos. 3885 CAGTATATT Score 56
-35 box at pos. 3861 TTAATA Score 35
Promoter Pos: 296 LDF- 2.99
-10 box at pos. 281 GGATATCAT Score 61
-35 box at pos. 257 TGGCCC Score 2
Promoter Pos: 2381 LDF- 1.48
-10 box at pos. 2366 TTGTACCCT Score 43
-35 box at pos. 2347 TTCCCG Score 35
Promoter Pos: 3195 LDF- 1.44
-10 box at pos. 3180 CTTTATGAC Score 28
-35 box at pos. 3161 TTGATA Score 58
Promoter Pos: 1740 LDF- 1.11
-10 box at pos. 1725 CGATTTAAT Score 40
-35 box at pos. 1703 TTATCG Score 24
Promoter Pos: 2877 LDF- 0.79
-10 box at pos. 2862 TGTAACAAT Score 41
-35 box at pos. 2844 GTAACG Score 4

```

ภาพที่ 16 ตำแหน่ง -35 และ -10 promoter วิเคราะห์จากโปรแกรม BPROM (Softberry)

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 3 กรกฎาคม 2557

2.3 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม

BLAST และ ClustalW

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนส *kman-1* กับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blast X ที่เว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> พบว่ายีนแมนนาเนสมีความเหมือนกับแมนนาเนสจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น 50-71% (ตารางที่ 7) ซึ่งจะมีบริเวณที่เหมือนกันคือบริเวณที่มีกรดอะมิโน WFWWG นอกจากนี้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ยังพบ catalytic residue ที่ตำแหน่ง Glu 225 และ Glu 324 อีกด้วย (ภาพที่ 17)

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *kman-1* ด้วยโปรแกรม Blast X

Organism	E value	Identity (%)	Accession
mannan endo-1,4-beta-mannosidase (<i>Enterobacter cloacae</i> EcWSU1)	0.0	71	YP_004951593
endo-beta-1,4-mannanase (<i>Pantoea agglomerans</i>)	0.0	71	ACN30272
beta-mannosidase (<i>Enterobacter cloacae</i>)	0.0	71	WP_025204433
endo-beta-1,4-mannanase (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)	9e-164	64	ABC95192
mannan endo-1,4-beta-mannosidase (<i>Dickeya dadantii</i> 3937)	9e-161	63	YP_003884802
beta-mannanase (<i>Bacillus</i> sp. 5H)	3e-116	50	BAA31711
beta-mannanase (<i>Bacillus subtilis</i>)	4e-116	50	ADZ54787

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 3 กรกฎาคม 2557

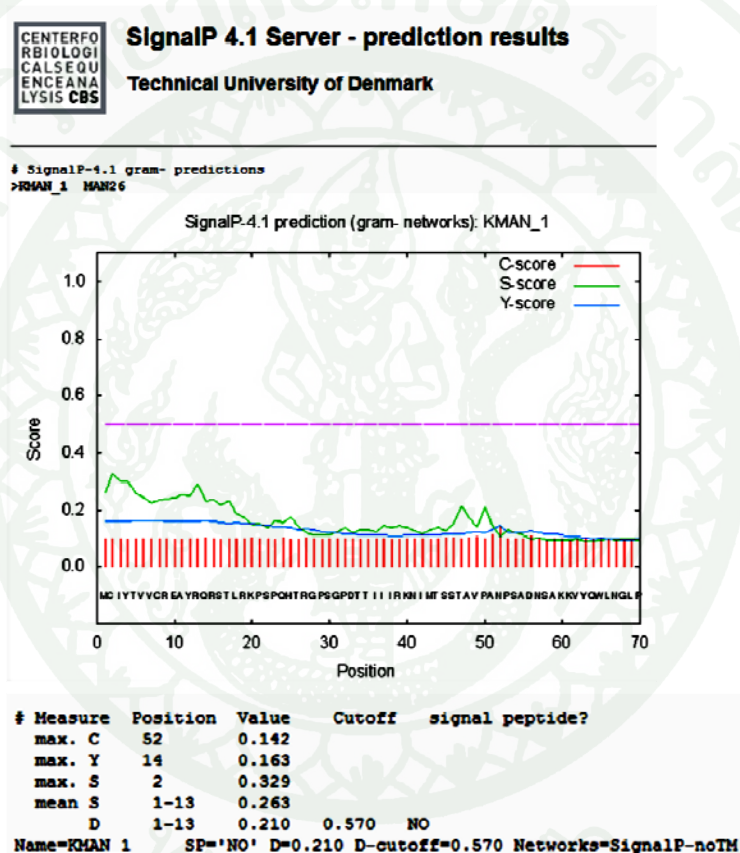
เมื่อพิจารณาความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence similarity) พบว่าเอ็นแมนแนนจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-1 จัดในกลุ่ม glycosyl hydrolase แฟมิลี 26 ซึ่งมีความเหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นอีก 7 สายพันธุ์ด้วยโปรแกรม ClustalW (ภาพที่ 17) กลุ่มของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แมนแนนในแฟมิลี 26 ส่วนใหญ่คือเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย (bacterial origin) ยกเว้นเชื้อราบางสายพันธุ์ซึ่งจะพบได้น้อย และมีกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (conserved sequence) คือ WFWWG เป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก (aromatic amino acid) ซึ่งต่างจากเอนไซม์แมนแนนในแฟมิลี 5 ที่มีกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แมนแนนที่หลากหลาย ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และแมนแนนจากยูคาริโอต ทำให้เอนไซม์แมนแนนในกลุ่มนี้มีกรดอะมิโนที่เหมือนกันน้อย และสามารถแบ่งออกเป็น 8 subfamily คือ A1-A8) ซึ่งใน subfamily A7 เป็นแมนแนนจากยูคาริโอต และ A8 เป็นแมนแนนจากแบคทีเรีย (Dhawan and Kaur, 2007) เอนไซม์แมนแนนในแฟมิลี 5 จะมีกรดอะมิโน 8 ตัว ที่เป็นกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง active site โดย Ma *et al.* (2004) รายงานกรดอะมิโนอนุรักษ์ 8 ตัวของแมนแนนจาก *Bacillus* sp. N16-5 คือ Arg-83, His-119, Asn-157, Glu-158, His-224, Tyr-226, Glu-254, และ Trp-283

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
kman-1 MAN26	MCIIYTVCREAYRQRSTLRKPSQHTRGPSGPDTTIIIRKNI	MTSSAVANPSADNSAKKVIYQMLNGLPDSNGKKLISGIFGGY	SNIGGDSGFSLAQGN							
ACN30272	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ABC95192	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YP_003884802	---MRPRHFPPTNRIYCMRRYQLFRISLAACIMTATISQV	GAHVSEVTPNAMATTRAIIYNMAHLPNRSDSRLLSGAFGGY	ANIGGDDAFSLAEAE							
BAA31711	---MVKKYTISSLILFLASAVLAKP-----	IEAHVSEVNPNAQOTTKRAMNLAHLPNRTENRVLSCAFGGYS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ADZ54787	---MFKKHTISLLIIFLLASAVLAQP-----	IEAHVSEVNPNAQOTTKRAMNLAHLPNRTENRVLSCAFGGYS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YP_004951593	---MPCIFQSRKDIQLQ-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
WP_025204433	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
kman-1 MAN26	AIKDATGKPPAIYGYADYARGMDVSPAGDEASLIDHSCNSD	LISHNRGGVVAISHHUPNEFFYAGNPGTGGGLKATISNDE	FATILQDGTGAROWLSL							
ACN30272	DLLALTGKPPAIYSADYARGMDACTPGEASLIDFGCNADL	IDHNRGGVVAISHHUPSPCFAGNPGDGKALHPVSNDEFS	SAILQSGTPSRGRWLM							
ABC95192	NIAARTGTPAIYACDYARGMDRTSAGNEADLVDSYCNST	LIDYNRGGVVAISHHUPNEVFAGNDPGTGGGLKAVSNEQ	LAAVLQSGTPERTWLAI							
YP_003884802	NIAARTGTPAIYACDYARGMDRTSAGNEADLVDSYCNST	LIDYNRGGVVAISHHUPNEVFAGNDPGTGGGLKAVSNEQ	LAAVLQSGTPERTWLAI							
BAA31711	RIRSAAGSPAIYGYADYARGMLETANIEDS--IDVSCNSD	LISHNRGGVVAISHHUPNEFFYAGNPGTGGGLKATISNDE	FATILQDGTGAROWLSL							
ADZ54787	RIRSAAGSPAIYGYADYARGMLETANIEDS--IDVSCNSD	LISHNRGGVVAISHHUPNEFFYAGNPGTGGGLKATISNDE	FATILQDGTGAROWLSL							
YP_004951593	DLOALTGKPPAIYSADYARGMDACTPGEASLIDFGCNADL	IDHNRGGVVAISHHUPNEFFYAGNPGTGGGLKATISNDE	FATILQDGTGAROWLSL							
WP_025204433	DLOALTGKPPAIYSADYARGMDACTPGEASLIDFGCNADL	IDHNRGGVVAISHHUPNEFFYAGNPGTGGGLKATISNDE	FATILQDGTGAROWLSL							
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
kman-1 MAN26	LDRVAAGLOELRDNGVVLVYRPLHEMNCWFWMWG	ITGYNTHDTTRMNLVIRLYRDITVYFVKTGLNLLWV	SPDANRDYKTSYYPGAYVDITGLDLY							
ACN30272	LDRVAAGLOELRDNGVVLVYRPLHEMNCWFWMWG	ITGYNTHDTTRMNLVIRLYRDITVYFVKTGLNLLWV	SPDANRDYKTSYYPGAYVDITGLDLY							
ABC95192	LDRVAAGLOELRDNGVVLVYRPLHEMNCWFWMWG	ITGYNTHDTTRMNLVIRLYRDITVYFVKTGLNLLWV	SPDANRDYKTSYYPGAYVDITGLDLY							
YP_003884802	LDRVAAGLOELRDNGVVLVYRPLHEMNCWFWMWG	ITGYNTHDTTRMNLVIRLYRDITVYFVKTGLNLLWV	SPDANRDYKTSYYPGAYVDITGLDLY							
BAA31711	LDRVAAGLOELRDNGVVLVYRPLHEMNCWFWMWG	ITGYNTHDTTRMNLVIRLYRDITVYFVKTGLNLLWV	SPDANRDYKTSYYPGAYVDITGLDLY							
ADZ54787	LDRVAAGLOELRDNGVVLVYRPLHEMNCWFWMWG	ITGYNTHDTTRMNLVIRLYRDITVYFVKTGLNLLWV	SPDANRDYKTSYYPGAYVDITGLDLY							
YP_004951593	LDRVAAGLOELRDNGVVLVYRPLHEMNCWFWMWG	ITGYNTHDTTRMNLVIRLYRDITVYFVKTGLNLLWV	SPDANRDYKTSYYPGAYVDITGLDLY							
WP_025204433	LDRVAAGLOELRDNGVVLVYRPLHEMNCWFWMWG	ITGYNTHDTTRMNLVIRLYRDITVYFVKTGLNLLWV	SPDANRDYKTSYYPGAYVDITGLDLY							
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
kman-1 MAN26	TDNPASLSGYDEMGLNKPFAFVGPSTINGQEDYANLVS	VILQKIPRATMFIWMNDASPLRLNLSAGAYNDRVINLGE	WMNGSVLS-----							
ACN30272	TDNPATVNGYDEMVALNKPFAFVGPSTINGQEDYANLVS	VILQKIPRATMFIWMNDASPLRLNLSAGAYNDRVINLGE	WMNGSVLS-----							
ABC95192	LDNPNANLSGYDEMLRLNKPFAFVGPSTINGQEDYANLVS	VILQKIPRATMFIWMNDASPLRLNLSAGAYNDRVINLGE	WMNGSVLS-----							
YP_003884802	LDNPNANLSGYDEMLRLNKPFAFVGPSTINGQEDYANLVS	VILQKIPRATMFIWMNDASPLRLNLSAGAYNDRVINLGE	WMNGSVLS-----							
BAA31711	PDAYSIGYDQLTALNKPFAFVGPSTINGQEDYANLVS	VILQKIPRATMFIWMNDASPLRLNLSAGAYNDRVINLGE	WMNGSVLS-----							
ADZ54787	PDAYSIGYDQLTALNKPFAFVGPSTINGQEDYANLVS	VILQKIPRATMFIWMNDASPLRLNLSAGAYNDRVINLGE	WMNGSVLS-----							
YP_004951593	TDNPATVNGYDEMVALNKPFAFVGPSTINGQEDYANLVS	VILQKIPRATMFIWMNDASPLRLNLSAGAYNDRVINLGE	WMNGSVLS-----							
WP_025204433	TDNPATVNGYDEMVALNKPFAFVGPSTINGQEDYANLVS	VILQKIPRATMFIWMNDASPLRLNLSAGAYNDRVINLGE	WMNGSVLS-----							

ภาพที่ 17 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนส แฟมิลี 26 แถบสีดำ คือกรดอะมิโนที่เหมือนกัน แถบสีเทา คือกรดอะมิโนที่คล้ายกัน กรอบสีแดง คือ บริเวณ conserve ของ glycosyl hydrolase แฟมิลี 26 และ (*) คือ catalytic residue YP_004951593, mannan endo-1,4-beta-mannosidase จาก *Enterobacter cloacae* EcWSU1; ACN30272, endo-beta-1,4-mannanase จาก *Pantoea agglomerans*; WP_025204433, beta-mannosidase จาก *Enterobacter cloacae*; ABC95192, endo-beta-1,4-mannanase จาก *Pectobacterium carotovorum*; YP_003884802, mannan endo-1,4-beta-mannosidase จาก *Dickeya dadantii* 3937; BAA31711, beta-mannanase จาก *Bacillus* sp. 5H; ADZ54787, beta-mannanase จาก *Bacillus subtilis*.

2.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ signal sequence

โดยโปรแกรม SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ตำแหน่งตัดของ signal sequence ในลำดับกรดอะมิโนจากจุลินทรีย์ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยูคาริโอต จากผลการวิเคราะห์ไม่พบตำแหน่งของ signal sequence ในลำดับกรดอะมิโนของแมนนานเนส *kman-1* (ภาพที่ 18)



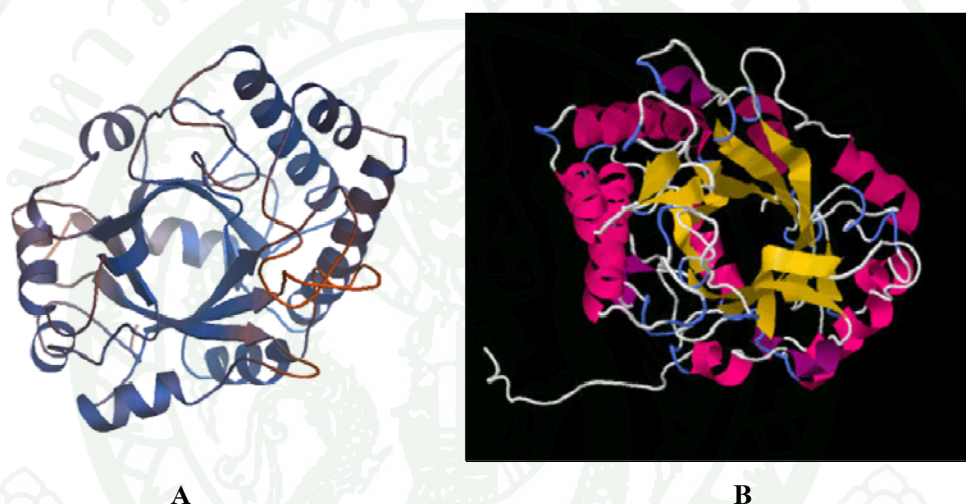
ภาพที่ 18 วิเคราะห์ตำแหน่งของ signal sequence ด้วยโปรแกรม SignalP

หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 29 มิถุนายน 2557

2.5 ลักษณะโครงสร้างสามมิติของแมนนานเนส KMAN

โดยโปรแกรม SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) และ RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่วิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของโปรตีนโดยเทียบ

กับฐานข้อมูล จากฐานข้อมูลแม่แบบที่ใช้ในเปรียบเทียบและวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนจากทั้ง 2 โปรแกรมคือ 2qbaA ซึ่งเป็นแม่แบบของเอนไซม์แมนนาเนส จากลักษณะ โครงสร้างสามมิติที่มีความคล้ายกัน (three dimensional structural similarities) โปรตีนในแฟมิลีที่แบ่งตามความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (sequence-based families) แบ่งออกเป็น “clan” ตามลักษณะโครงสร้างสามมิติ ซึ่งเอนไซม์แมนนาเนสจากทั้งแฟมิลี 5 และ 26 จัดอยู่ใน clan glycosyl hydrolase A (GH-A) ซึ่งเป็น clan ที่ใหญ่ที่สุด มีลักษณะการม้วนพับแบบ TIM (triose phosphate isomerase) (β/α)₈ Barrels ประกอบด้วยสาย α -helix 8 สายและสาย β -strand 8 สาย (Chauhan *et al.*, 2012; Dhawan and Kaur, 2007) ดังแสดงในภาพที่ 19 A และ B



ภาพที่ 19 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์แมนนาเนส KMAN จากโปรแกรม SWISS-MODEL (A) และ โปรแกรม RaptorX (B)

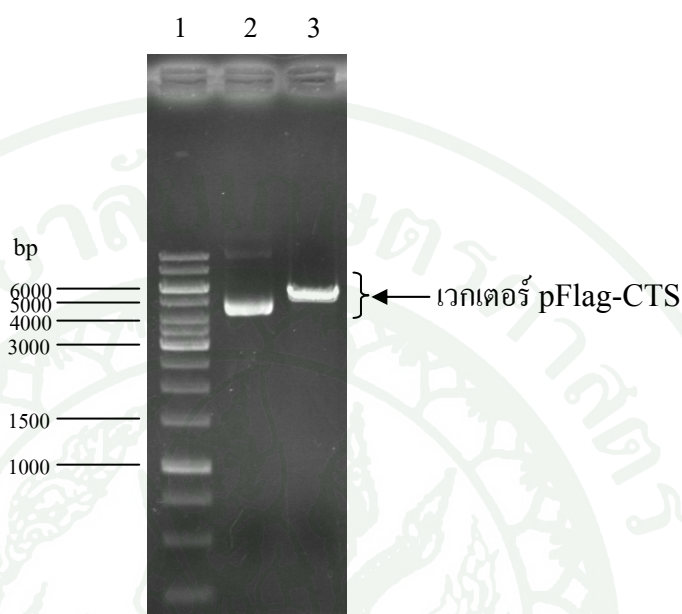
หมายเหตุ ทำการสืบค้นข้อมูลเมื่อวันที่ 22 มิถุนายน 2557

3. การแสดงออก ยีน *kman-2* โดย expression vector pFlag-CTS

3.1 พลาสมิด pFlag-CTS และการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *KpnI*

จากการสกัดพลาสมิด pFlag-CTS ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN) และตรวจสอบพลาสมิดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบแถบดีเอ็นเออยู่ในรูป supercoil 1 แถบ (ภาพที่ 20 เลนที่ 1) และเมื่อตัดพลาสมิด pFlag-CTS ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ

KpnI พบขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 5.4 กิโลเบส (ภาพที่ 20 เลนที่ 2) ซึ่งเท่ากับขนาดของพลาสมิด pFlag-CTS ตามแผนที่พลาสมิด เวกเตอร์ (Sigma, USA)



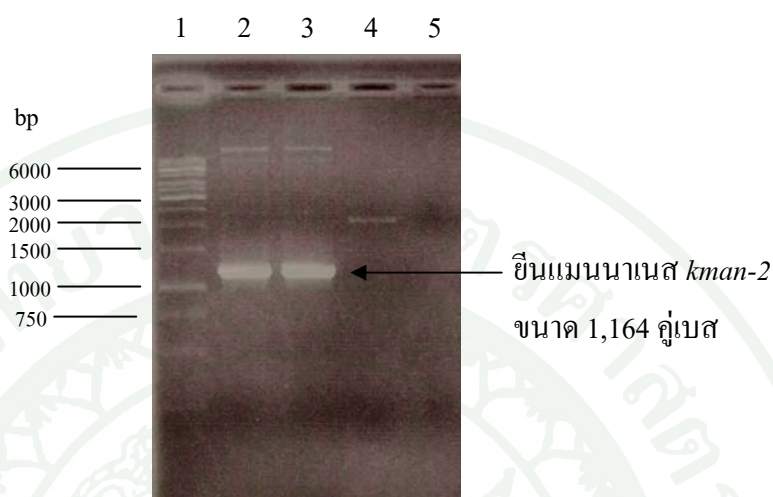
ภาพที่ 20 Expression vector pFlag-CTS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *KpnI*
 เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส
 เลนที่ 2 พลาสมิด pFlag-CTS ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *KpnI*
 เลนที่ 3 พลาสมิด pFlag-CTS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *KpnI*

3.2 การเตรียมยีนแมนนาเนส *kman-2* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ให้รหัส His tag

เพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนส *kman-2* ด้วยไพรเมอร์ No298-ExF (5' TACA GAATTCATGTGCATTTATACAGTAGTTTGC 3') และ No298-ExR (5' TATAGGTACC CCAGCTGATGCTGATGTCGC 3') โดยใช้พลาสมิดลูกผสม pKMAN-1 เป็นแม่แบบ (template) เทียบกับพลาสมิด pUC19 และน้ำ (negative control) เพื่อให้มั่นใจว่ายีนที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์คู่นี้คือยีนแมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-1 จริงไม่ได้มาจากการเพิ่มจำนวนของยีนอื่นบนเวกเตอร์หรือปนเปื้อนจากน้ำที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

ผลการเพิ่มปริมาณยีน *kman-2* ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบยีนขนาด 1,164 คู่เบส (ภาพที่ 21) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ทางด้านปลาย N และ *KpnI* ทางด้านปลาย C

ทำการตัดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสอง เพื่อให้เกิดปลายที่มีลักษณะคู่สมที่สามารถเชื่อมต่อได้กับเวกเตอร์ pFlag-CTS ที่ตัดด้วยเอนไซม์เดียวกันได้



ภาพที่ 21 ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ No.298-ExF และ No.298-ExR

เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส

เลนที่ 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

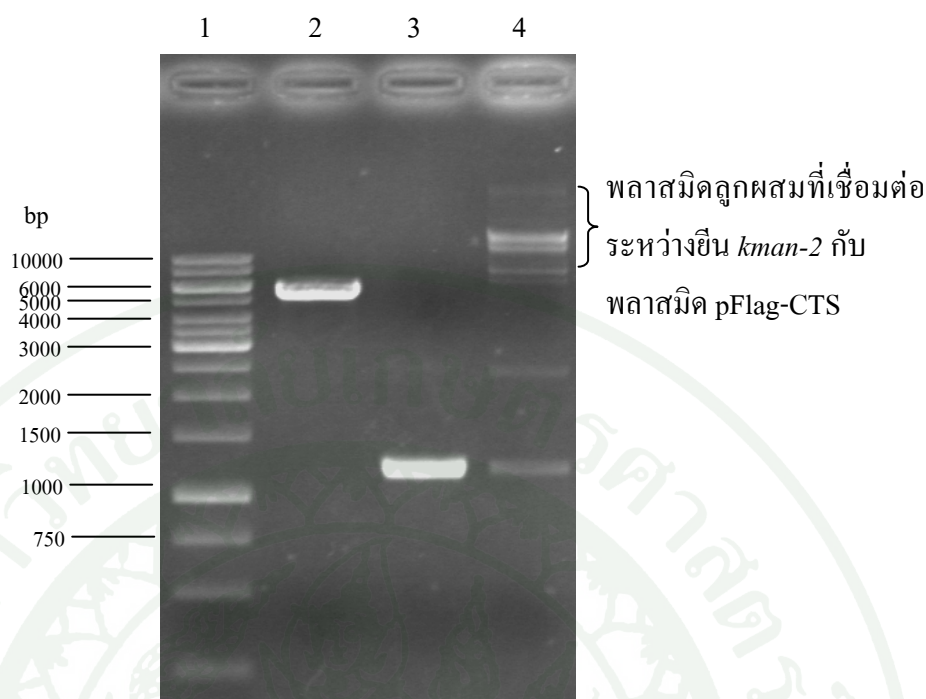
เลนที่ 3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

เลนที่ 4 negative control พลาสมิด pUC19

เลนที่ 5 negative control น้ำ

3.3 ผลการเชื่อมต่อยีนแมนนาเนส *kman-2* กับเวกเตอร์ pFlag-CTS

ตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีน *kman-2* กับเวกเตอร์ pFlag-CTS ที่เชื่อมต่อกันด้วยอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอต่อเวกเตอร์ เท่ากับ 3:1 ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบพลาสมิดลูกผสมและยังคงมียีนแมนนาเนสที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์เหลืออยู่บางส่วน (ภาพที่ 22) ให้ชื่อพลาสมิดลูกผสมที่เชื่อมต่อระหว่างยีนแมนนาเนส *kman-2* กับเวกเตอร์ pFlag-CTS ว่า pKMAN-2



ภาพที่ 22 รูปแบบดีเอ็นเอลูกผสมวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส

เลนที่ 2 expression vector pFlag-CTS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *KpnI*

เลนที่ 3 ยีนแมนนาเนสที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *KpnI*

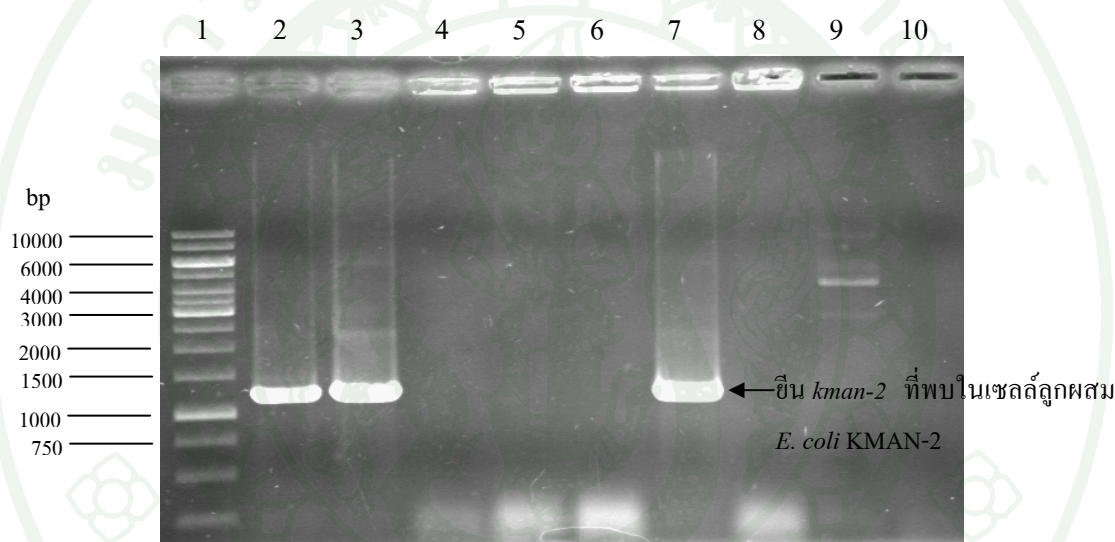
เลนที่ 4 ดีเอ็นเอลูกผสมที่เชื่อมต่อกันด้วยอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อพลาสมิด 3:1

3.4 คุณภาพคอมพิเทนส์เซลล์ *E. coli* TOP10

วิเคราะห์คอมพิเทนส์เซลล์ *E. coli* TOP10 โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง LA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า *E. coli* TOP10 สามารถเจริญได้ถึง 1.94×10^9 CFU/ml และเมื่อถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอ pFlag-CTS ที่อยู่ในรูป supercoil หรือ circular ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* TOP10 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ 1.16×10^5 CFU/ml คิดเป็นค่า transformation efficiency เท่ากับ 1.16×10^7 CFU ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ แสดงให้เห็นว่า คอมพิเทนส์เซลล์ *E. coli* TOP10 มีประสิทธิภาพในการนำมัลายโอนดีเอ็นเอด้วยวิธี heat shock

3.5 *E. coli* ลูกผสมแสดงกิจกรรมแมนนาเนส

กลุ่มเซลล์ลูกผสม 40 โคลนเพื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสเบื้องต้นโดยเลี้ยงเซลล์ลูกผสมบนอาหารที่ใช้คัดเลือก (selective media) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และตรวจสอบการย่อยสลายแป้งโดยดูจากวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี แต่ผลการทดสอบไม่สามารถระบุกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสได้ชัดเจน จึงกลุ่มเซลล์ลูกผสม 5 โคลนเพื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ พบเซลล์ลูกผสมเพียง 1 โคลนเท่านั้น (ภาพที่ 23 เชน 7) ที่มีอินแมนนาเนส *kman-2* โดยให้ชื่อเซลล์ลูกผสมนี้ว่า *E. coli* สายพันธุ์ KMAN-2



ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบเซลล์ลูกผสมด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ No.298-ExF และ No.298-ExR

เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส

เลนที่ 2 Positive control *K. oxytoca* CW2-3

เลนที่ 3 Positive control พลาสมิดลูกผสม pKMAN-1

เลนที่ 4 เซลล์ลูกผสม 1

เลนที่ 5 เซลล์ลูกผสม 2

เลนที่ 6 เซลล์ลูกผสม 3

เลนที่ 7 เซลล์ลูกผสม 4

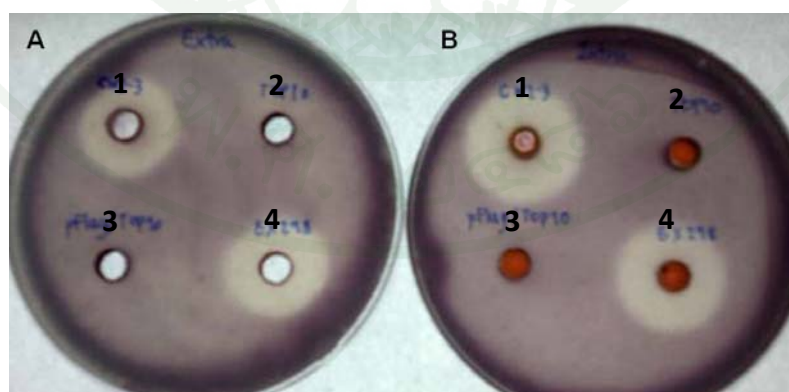
เลนที่ 8 เซลล์ลูกผสม 5

เลนที่ 9 Negative control พลาสมิด pFlag-CTS

ภาพที่ 23 (ต่อ)

เลนที่ 10 Negative control น้ำ

นำโคโลนี *E. coli* KMAN-2 ที่มีอินแมนนาเนสมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเซลล์ถูกผสมได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6 แล้วเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อกระตุ้นการผลิตเอนไซม์และเลี้ยงต่ออีก 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ (extracellular) เพื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี gel diffusion assay ส่วนตะกอนเซลล์นำมาแขวนลอยในไลซิสบัฟเฟอร์ และทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication เก็บส่วนใสหลังจากเหวี่ยงแยกเซลล์ เพื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ในส่วน intracellular ด้วยวิธี gel diffusion assay เช่นเดียวกันโดยเทียบกับชุดควบคุม positive control คือ *K. oxytoca* CW2-3 และ negative control คือ *E. coli* TOP10 และ *E. coli* TOP10 ที่มี พลาสมิด pFlag-CTS พบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเป็น 2.5 และ 2.7 เซนติเมตรจากเซลล์ถูกผสม *E. coli* KMAN-2 ในส่วน extracellular และ intracellular ตามลำดับ และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของส่วน extracellular และ intracellular จาก *K. oxytoca* CW2-3 ได้ 2.4 และ 2.8 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสจากทั้ง 2 ส่วนของ negative control (ภาพที่ 24) หลังการ subclone ได้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำอีกครั้ง พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของอินแมนนาเนสตรงกันกับอินแมนนาเนสใน *kman-1* ที่ได้จากการทำหาลำดับ



ภาพที่ 24 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสของเซลล์ถูกผสมเมื่อทดสอบด้วยวิธี gel diffusion assay

เพลท A คือเอนไซม์แมนนาเนสส่วน extracellular

เพลท B คือเอนไซม์แมนนาเนสส่วน intracellular

ภาพที่ 24 (ต่อ)

หมายเลข 1 คือ สายพันธุ์ *K. oxytoca* CW2-3

หมายเลข 2 คือ เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* TOP10

หมายเลข 3 คือ *E. coli* TOP10 ที่มีพลาสมิด pFlag-CTS

หมายเลข 4 คือ เซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2

4. การแสดงออกของยีนแมนนาเนส *kman-2* และการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

4.1 กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสจากส่วนต่างๆของเซลล์

สกัดเอนไซม์แมนนาเนสออกจากส่วน periplasm และ cytoplasm ของเซลล์ *E. coli* ซึ่งวิธีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์แมนนาเนส คือ osmotic shock และ sonication ตามลำดับ osmotic shock เป็นวิธีหนึ่งในการสกัดโปรตีนออกจากส่วน periplasm ใช้หลักการการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกของเซลล์ โดยบ่มเซลล์ในสารละลาย hypertonic ซึ่งมีส่วนประกอบของซูโครสที่ความเข้มข้นสูง ร่วมกับ EDTA และเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกโดยจับปล้นโดยการบ่มเซลล์ที่กำจัดสาร hypertonic ออกแล้วในสารละลาย hypotonic ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้น้ำที่เย็นจัด จากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกอย่างรวดเร็วทำให้โปรตีนในส่วนของ periplasm หลุดออกมาได้ เนื่องจากซูโครสที่มีค่าออสโมติกสูงจะทำให้เซลล์เหี่ยว ร่วมกับ EDTA ซึ่งทำหน้าที่ทำลาย lipopolysaccharide (LPS) ที่ผนังเซลล์ ทำให้ความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ของผนังเซลล์ด้านนอกมีมากขึ้น เมื่อละลายในน้ำที่เย็นจัด ซึ่งเป็นสารที่มีค่าออสโมติกต่ำทำให้เซลล์พองขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้โปรตีนในส่วน periplasm หลุดออกมาได้ (Chen *et al.*, 2004; Ewis and Lu, 2005) การใส่ $MgCl_2$ ในสารละลาย hypotonic สามารถช่วยให้สกัดโปรตีนออกจาก periplasm ได้ดีขึ้นและสามารถช่วยลดการเปื้อนของโปรตีนจากส่วน cytoplasm ได้ โดย EDTA จะจับแมกนีเซียมไอออนแทน ลดการทำลายที่ส่วน plasma membrane ทำให้โปรตีนส่วน cytoplasm ไม่หลุดออกมา (Jazii *et al.*, 2007; Ramanan *et al.*, 2010)

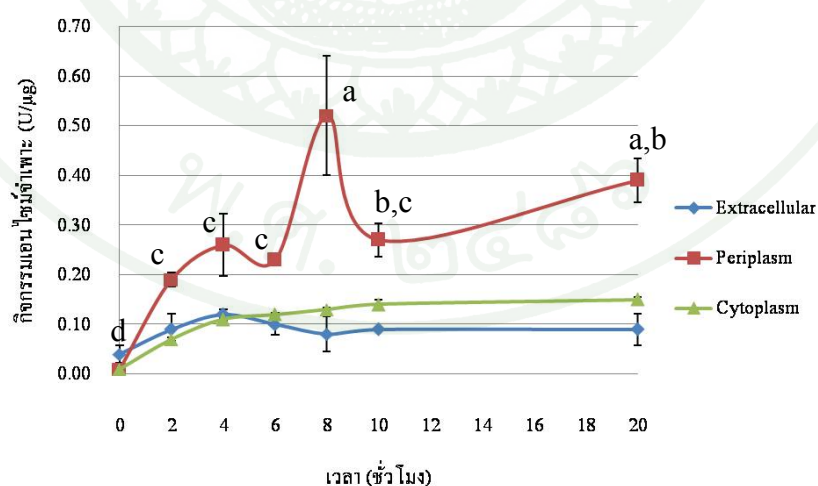
ภายหลังการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส โดยแปรผันเวลาที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 20 (ชั่วโมง) ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์รวม (total activity) ที่ extracellular, periplasm และ intracellular ในแต่ละชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 8 ซึ่งพบว่า ในส่วน intracellular มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงสุด แต่ผลการ

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) ในแต่ละส่วนของเซลล์ *E. coli* KMAN-2 พบว่าที่ส่วน periplasm ที่ชั่วโมงที่ 8 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุด (ภาพที่ 25) แสดงว่าเอนไซม์แมนนาเนสที่ผลิตในชั่วโมงที่ 8 ส่วน periplasm มีคุณภาพดีที่สุด เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนอื่นปนมาน้อย จึงเป็นส่วนที่เหมาะสมในการนำไปทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสแต่ละช่วงเวลาของการเหนี่ยวนำในส่วนต่างๆ ของเซลล์

เวลา (ชม.)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต)						
	0	2	4	6	8	10	20
E	4.86±0.01	14.49±1.37	20.21±2.66	19.6±1.60	20.38±0.23	21.2±1.13	29.05±11.58
P	0.74±0.03	18.3±3.11	28.73±10.44	23.91±2.50	57.62±27.46	27.69±6.92	44.3±7.26
I	4.11±0.12	43.19±3.29	66.16±4.77	75.79±2.95	80.25±2.27	81.05±7.67	74.22±1.45

หมายเหตุ E คือ ส่วน extracellular; P คือ ส่วน periplasm; I คือ ส่วน intracellular; ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดคำนวณจากการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรในแต่ละช่วงเวลา โดยมีปริมาตรทั้งหมดในส่วน extracellular 10 มิลลิลิตร ส่วน periplasm 1 มิลลิลิตร และส่วน intracellular 0.2 มิลลิลิตร



ภาพที่ 25 กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะจากส่วน extracellular, periplasm และ cytoplasm

^{a,b,c} ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ เปรียบเทียบเฉพาะส่วน periplasm

4.2 ความเข้มข้น IPTG ที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

จากข้อ 4.1 พบว่า เมื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสด้วย IPTG เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เอนไซม์แมนนาเนสในส่วน periplasm มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด จึงได้แปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่ 0.25, 0.5, 0.75, 1 และ 1.25 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมงเพื่อหาความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสม พบว่า ความเข้มข้นของ IPTG สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) ดังนั้นการใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์จึงเพียงพอต่อการเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2 โดยใช้เวลาผลิตหลังการเหนี่ยวนำแล้ว 8 ชั่วโมง

ตารางที่ 9 กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเมื่อแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่เวลาผลิต 8 ชั่วโมง

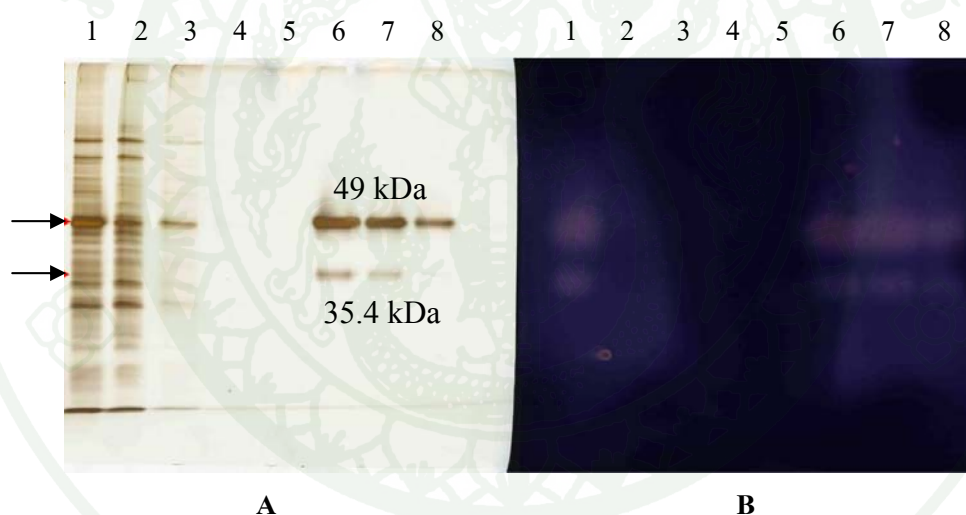
ความเข้มข้น IPTG (mM)	Specific activity (Unit/ μ g protein)
0	0.04 ± 0.00^b
0.25	0.18 ± 0.03^a
0.5	0.17 ± 0.01^a
0.75	0.18 ± 0.01^a
1	0.18 ± 0.00^a
1.25	0.19 ± 0.01^a

หมายเหตุ ^{a,b} ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$

4.3 สมบัติของเอนไซม์ KMAN ผลิตโดย *E. coli* KMAN-2

โปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ถูกผสมส่วนใหญ่จะมีการเชื่อมระหว่างโปรตีนที่สนใจและ affinity tag เพื่อให้ง่ายต่อการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ซึ่ง affinity tag ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือฮิสทีดีน (histidine) ที่มีความจำเพาะสูงกับนิเกิลไอออน (Ni^{2+}) ดังนั้นเมื่อผ่านโปรตีนที่ติดด้วยฮิสทีดีนลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเรซินที่มีนิเกิลไอออนอยู่บนเมทริกซ์ โปรตีนที่สนใจจะยึดติดกับเรซินและจะถูกชะออกมาภายหลังด้วยอิมิดาโซล (imidazole) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับฮิสทีดีนและสามารถจับกับนิเกิลไอออนได้เช่นกัน

จากการ subclone ยีนแมนนาเนส *kman-2* เข้าสู่เวกเตอร์ pFlag-CTS ที่มีตำแหน่งของฮิสทีดินที่เป็น affinity tag จำนวน 10 ตัวอยู่หลังตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะใน multiple cloning site ทำให้ยีนแมนนาเนสที่เชื่อมต่อกับฮิสทีดินทางด้านปลาย C และสามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้ด้วย Ni-NTA purification system (Invitrogen, USA) ภายใต้สภาวะ native จากการตรวจสอบแต่ละขั้นตอนของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) โดยใช้อะครีลาไมด์เจล 12% ภายใต้สภาวะ non-denaturing (เตรียม sample dye โดยไม่มีสาร β -mercaptoethanol และ ไม่ผ่านการให้ความร้อน) พบว่า ยังคงมีโปรตีนต้นที่คาดว่าจะเป็เอนไซม์แมนนาเนสบางส่วนที่ไม่จับกับเรซิน (ภาพที่ 26 เลน 3A) และพบโปรตีนบางส่วนหลุดจากเรซินเมื่อล้างคอลัมน์ด้วยอิมิดาโซล 20 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 26 เลน 4A) หลังจากชะคอลัมน์ด้วยอิมิดาโซล 250 มิลลิโมลาร์ พบโปรตีนที่แสดงกิจกรรมแมนนาเนสบน zymogram 2 แบบ (ภาพที่ 26 เลน 7-9A และ B) มีขนาดประมาณ 49 และ 35.4 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 26 ลักษณะแถบโปรตีนในแต่ละขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA purification system (A) อะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ภายใต้สภาวะ non-denaturing (B) วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสบนเจลอะครีลาไมด์ (zymogram)
 เลนที่ 1 โปรตีนส่วน periplasm (lysate) ก่อนผ่านลงคอลัมน์
 เลนที่ 2 โปรตีนหลังผ่านลงคอลัมน์ (unbound)
 เลนที่ 3 ล้างคอลัมน์ด้วยอิมิดาโซล ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 1
 เลนที่ 4 ล้างคอลัมน์ด้วยอิมิดาโซล ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 2
 เลนที่ 5 ล้างคอลัมน์ด้วยอิมิดาโซล ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 3
 เลนที่ 6 ชะคอลัมน์ (elution) ด้วยอิมิดาโซล ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 1

ภาพที่ 26 (ต่อ)

เลนที่ 7 ชะลอรัณ (elution) ด้วยอิมิดาโซล ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 2

เลนที่ 8 ชะลอรัณ (elution) ด้วยอิมิดาโซล ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ครั้งที่ 3

เมื่อพิจารณาเจลอะครีลาไมด์และกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสบนแผ่นเจลอะครีลาไมด์ (zymogram) พบว่า แบนโปรตีนขนาด 49 กิโลดาลตันมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าและมีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงกว่าแบนโปรตีนขนาด 35.4 กิโลดาลตัน จึงเลือกตัดแบนโปรตีนขนาด 49 กิโลดาลตันเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป ขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แสดงดังตารางที่ 10

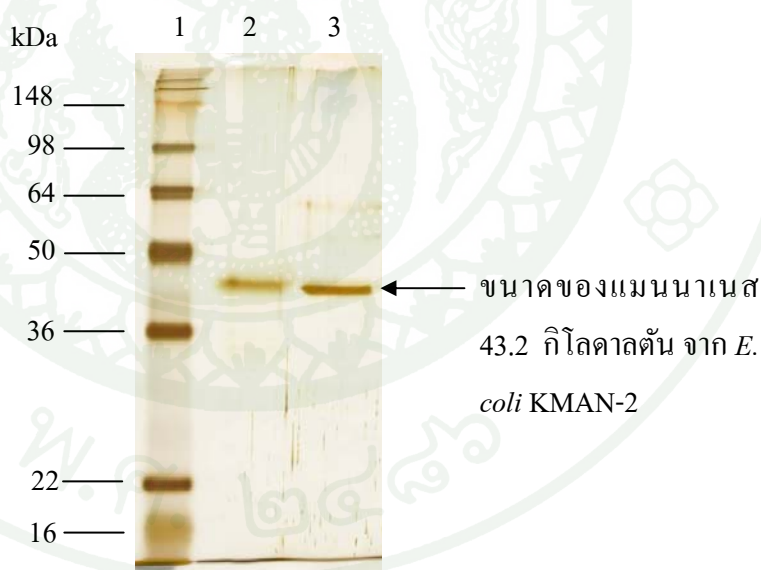
เมื่อเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ *E. coli* KMAN-2 ปริมาตร 1 ลิตรเพื่อผลิตเอนไซม์แมนนาเนสและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 2,348.29 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ได้โปรตีน 87.88% หลังผ่านโปรตีนลงคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเรซินที่มีนิกเกิลไอออนอยู่บนเมทริกซ์ แต่หลังจากตัดโปรตีนออกจากเจลอะครีลาไมด์ โปรตีนที่ได้มีปริมาณลดลงมากเหลือเพียง 9.62% เป็นไปได้ว่าขั้นตอนการชะโปรตีนออกจากเจลไม่สมบูรณ์ ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ได้น้อยลง

ตารางที่ 10 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

	Volume (ml)	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg)	Yield (%)	Purification factor
Crude (periplasmic fraction)	100	2,137.79	7.46	286.57	100	1
Ni-NTA column	12	1,878.63	0.8	2,348.29	87.88	8.19
Acrylamide gel extraction	20	205.69	0.35	587.69	9.62	2.05

เมื่อวิเคราะห์โปรตีน KMAN ภายใต้สภาวะ denaturing (เตรียม sample dye โดยมีสาร β -mercaptoethanol และผ่านการให้ความร้อน) พบโปรตีน 1 แบน มีขนาดประมาณ 43.2 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 27 เลน 3) ขนาดของโปรตีนที่คำนวณได้จากเทคนิคอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) มีขนาดใหญ่กว่าขนาดของโปรตีนที่คำนวณจากยีน (42.6 กิโลดาลตัน) เนื่องจากโปรตีนที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย affinity chromatography ด้วยการใช Ni-NTA

purification system จะยังคงมีส่วนของฮิสทีดิน 10 กรดอะมิโน (ประมาณ 1.1 กิโลดาลตัน) ติดอยู่ด้วย (Yamabhai *et al.*, 2008) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาจาก vector map ของ pFlag-CTS ยังพบส่วนของ FLAG 8 กรดอะมิโน (ประมาณ 0.88 กิโลดาลตัน) ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่งต่อจากฮิสทีดินด้วย (Sigma, USA) เมื่อคำนวณขนาดของโปรตีน 42.6 กิโลดาลตัน รวมกับส่วนของ FLAG และฮิสทีดิน พบว่า โปรตีนที่ได้ควรจะมีความรวมทั้งหมด 44.58 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นอะคริลาไมด์เจล อย่างไรก็ตาม การวัดขนาดของโปรตีนบนแผ่นอะคริลาไมด์เจลอาจเกิดการคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากข้อจำกัด เช่น การจับกันระหว่าง SDS กับแต่ละโปรตีน องค์ประกอบของกรดอะมิโนของแต่ละโปรตีน โดยเฉพาะโปรตีนที่มี acidic residue และ basic protein, โครงสร้างของโปรตีน รวมถึงการเกิด posttranslational modification อาจทำให้การเคลื่อนที่ของโปรตีนบนแผ่นอะคริลาไมด์เจลคลาดเคลื่อนได้ (Gersten, 1996; Hames, 1998) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ยีน *kman-2* ประกอบด้วย ATG 2 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ห่างกัน 126 เบสหรือ 42 กรดอะมิโน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อยืนยันขนาดของโปรตีน KMAN ต่อไป



ภาพที่ 27 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2

เลนที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน SeeBlue® Plus2 prestained standard (Invitrogen)

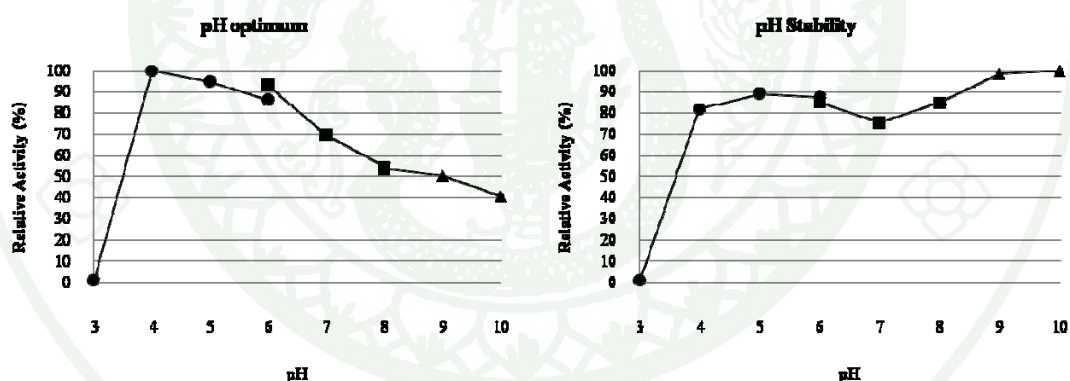
เลนที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แมนนาเนสภายใต้สภาวะ non-denaturing

เลนที่ 3 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แมนนาเนสภายใต้สภาวะ denaturing

5. คุณสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนส KMAN

5.1 พีเอชที่เหมาะสมและผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์

พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2 คือช่วงพีเอช 4-6 ที่พีเอช 5 และ 6 เอนไซม์ยังคงทำงานได้มากกว่า 80% (ภาพที่ 28) ซึ่งคล้ายกับช่วงพีเอชที่เหมาะสมของแมนนาเนสจากเชื้อราที่มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมส่วนใหญ่อยู่ในช่วงกรด และช่วงพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรียที่อยู่ในช่วงประมาณพีเอช 5-8 (Chauhan et al., 2012; Moreira and Filho, 2008; Dhawan and Kaur, 2007; Wang et al., 2012; Kurakake et al., 2006; Cai et al., 2011; Li et al., 2006; Kim et al., 2011; Kim et al., 2011; Li et al., 2008; Chandra et al., 2011; Lee et al., 2010; Jiang et al., 2006; Piwpankaew et al., 2014) เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงกว้างคือที่พีเอช 4-10 เมื่อบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

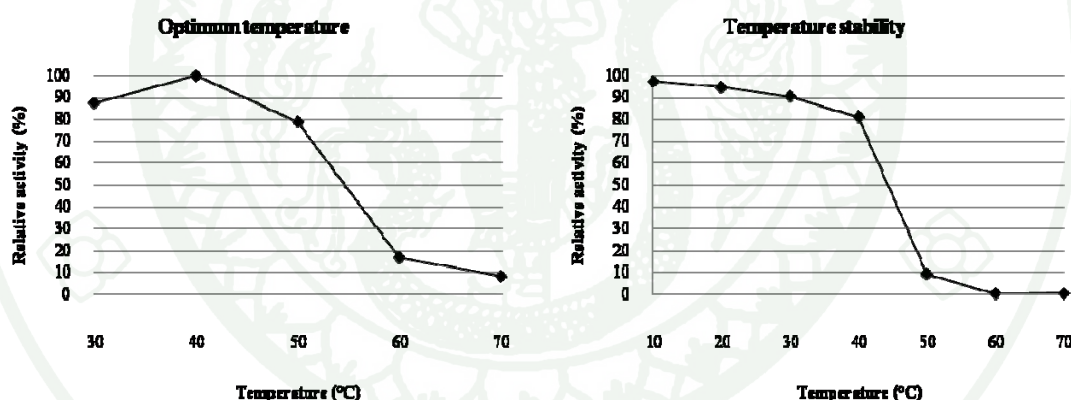


ภาพที่ 28 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ

(●) คือ ค่า relative activity ของเอนไซม์เมื่อทดสอบในซิเตรทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3-6; (■) คือ ค่า relative activity ของเอนไซม์เมื่อทดสอบในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6-8; (▲) คือ ค่า relative activity ของเอนไซม์เมื่อทดสอบในซิเตรทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8-10

5.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมและผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

เอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงกว้างคือ ช่วง 30-50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 29) โดยที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียสเอนไซม์ยังคงสามารถทำงานได้มากกว่า 80% ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับแมนนาเนสจากแบคทีเรียที่มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส (Chauhan et al., 2012; Moreira and Filho, 2008; Dhawan and Kaur, 2007; Li et al., 2006; Kim et al., 2011; Kim et al., 2011; Li et al., 2008; Chandra et al., 2011; Lee et al., 2010; Jiang et al., 2006; Piwpankaew et al., 2014) ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงทันทีเมื่อต้มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและไม่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เหลืออยู่เมื่อต้มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แสดงว่าเอนไซม์ไม่มีความเสถียรเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ในทางกลับกัน เมื่อต้มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำพบว่าเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้มากกว่า 80% ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 29 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการที่เอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2 มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำและสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำเช่นเดียวกัน จึงอาจเรียกได้ว่าเป็น low temperature active enzyme ซึ่งมีการวิจัยที่พบเอนไซม์แมนนาเนสที่มีคุณสมบัติที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ เช่น เอนไซม์แมนนาเนสจาก *Bacillus subtilis* Bs5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเหมาะสมที่ต่ำที่สุดในบรรดาแมนนาเนสจากแบคทีเรีย (Huang et al., 2012), เอนไซม์แมนนาเนสแฟมิลี 26 จาก *Sphingomonas* strain ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ทนต่อสภาพความเป็นเกลือสูงและทนต่อเอนไซม์โปรติเอส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40 องศาเซลเซียส ยังคงมีกิจกรรมเอนไซม์เหลืออยู่

ประมาณ 55% ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และประมาณ 20% ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส (Zhou *et al.*, 2012), เอนไซม์แมนนาเนสแฟมิลี 26 จาก *Aspergillus niger* CBS 513.88 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานได้มากกว่า 30% ในช่วงอุณหภูมิ 5-60 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45 องศาเซลเซียส (Zhao *et al.*, 2011) และเอนไซม์แมนนาเนสแฟมิลี 26 จาก *Bacillus licheniformis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 50-60 องศาเซลเซียสและเอนไซม์มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 4-55 องศาเซลเซียส (Songsiriritthigul *et al.*, 2010) เอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำนี้สามารถนำไปปรับใช้ได้ในพื้นที่ตอนของอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ความเย็นเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หรือป้องกันการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ หรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (aquaculture) เป็นต้น (Gerday *et al.*, 2000 และ Zhou *et al.*, 2012)

5.3 ความจำเพาะต่อสับเสตรท

เอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 มีความจำเพาะต่อสับเสตรทที่มีลักษณะเป็น heteromannan สูงสุด (ตารางที่ 11) โดยเฉพาะคอนยัคกลูโคแมนแนน (100%) ซึ่งคอนยัคกลูโคแมนแนนมีโครงสร้างเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งแขนง สายหลักประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกับน้ำตาลแมนโนสที่ตำแหน่ง β -1,4 แบบสลับ โดยมีอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกลูโคสคือ 1.6:1 สับเสตรทที่จำเพาะรองลงมาคือ โลคัสบินกัมหรือกาแลคโตแมนแนน (92.63%) ซึ่งมีโครงสร้างที่มีสายหลักคือน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง β -1,4 และมีกิ่งคือน้ำตาลกาแลคโตสเชื่อมกับน้ำตาลแมนโนสที่ตำแหน่ง α -1,6 โดยมีอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกาแลคโตสที่พบคือ 4:1 (Moreira and Filho, 2008) แสดงว่า เอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 ไม่เพียงจำเพาะต่อสับเสตรทที่เป็นกลูโคแมนแนน แต่ยังจำเพาะต่อสับเสตรทที่เป็นกาแลคโตแมนแนนอีกด้วย แต่มีความจำเพาะต่อสับเสตรทกลุ่ม homomannan น้อย โดยไม่สามารถย่อยสับเสตรท α -mannan ได้ ซึ่ง α -mannan เป็นแมนแนนที่มีน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 (Jones and Ballou, 1969) และสามารถย่อย ivory nut mannan (β -mannan) ได้น้อย ซึ่ง ivory nut mannan เป็นแมนแนนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงของน้ำตาลแมนโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 (Dhawan and Kaur, 2007) แสดงว่า เอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 มีความจำเพาะต่อโครงสร้างที่เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง β มากกว่า α นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสับเสตรท CMC ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส (สายหลักคือน้ำตาลกลูโคส) ได้ประมาณ 30.56% และ avicel 4.98% แต่ไม่สามารถย่อยสับเสตรท xylan ได้ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 นอกจากจะมีกิจกรรมเอนไซม์แมน

นานแล้ว ยังมีกิจกรรมของเซลล์ด้วย เอนไซม์แมนนานเนสสามารถย่อยกากมะพร้าวได้น้อย อาจเนื่องมาจาก พืชจำพวกปาล์มส่วนใหญ่มีโครงสร้างแมนแนนที่แข็งแรง มีลักษณะเป็น crystalline และไม่ละลายน้ำ การมีกิ่งที่เป็นกาแลคโตสมีส่วนช่วยให้ละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น ยังมีกาแลคโตสมาก ยังสามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งกากมะพร้าวมีอัตราส่วนระหว่างกาแลคโตสต่อแมนโนส คือ 1:14 ทำให้ละลายน้ำได้ไม่ดี (Sundu and Dingle, 2003) อาจเป็นผลให้เอนไซม์เข้าไปทำงานได้ยากขึ้น เช่นเดียวกับสับเสตรที่ที่ไม่ละลายน้ำอื่นคือ ivory nut mannan และ avicel ซึ่งเอนไซม์แมนนานเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 สามารถย่อยได้เพียง 5.98% และ 4.98% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์แมนนานเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 มีความจำเพาะต่อสับเสตรที่มี การละลายน้ำได้ดี (soluble substrate) มากกว่าสับเสตรที่ที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble substrate)

ตารางที่ 11 ความจำเพาะต่อสับเสตรของเอนไซม์

สับเสตร 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	Relative activity (%)
α -mannan	<1
Ivory nut mannan (β -mannan)	5.98
คอนซัคกลูโคแมนแนน	100
โลคัสปีนัม	92.63
CMC	30.56
Avicel	4.98
Xylan (จาก oat spelts)	<1
กากมะพร้าว	5.28
กากมะพร้าว (ที่สกัดไขมันแล้ว)	7.02

5.4 ผลผลิตจากการย่อยสับเสตรด้วยเอนไซม์แมนนานเนส

5.4.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยก

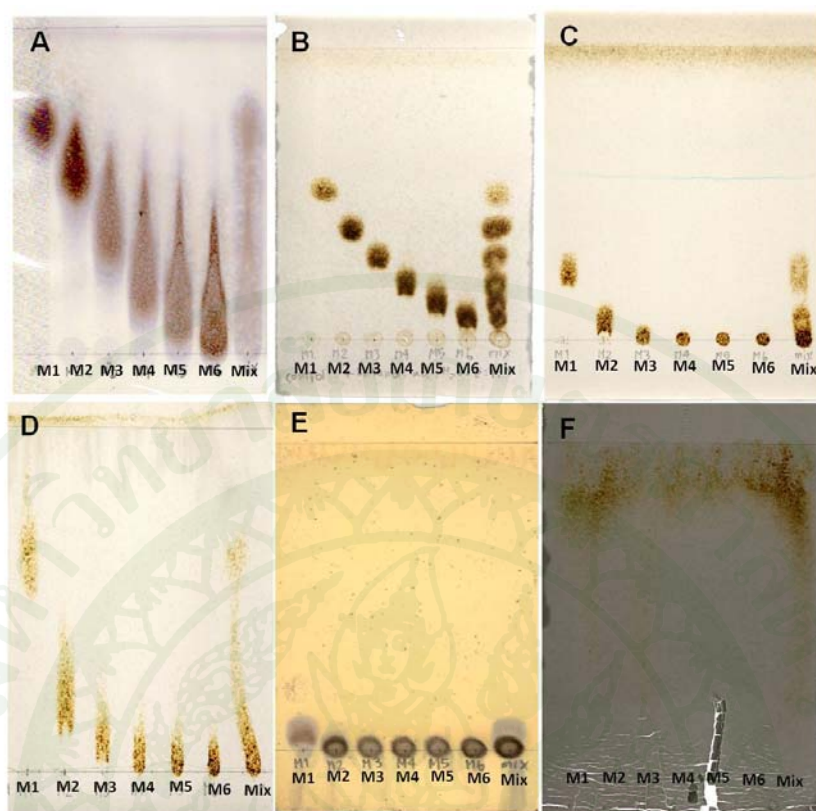
การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมนั้นเป็นขั้นตอนที่สำคัญเพื่อแยกสารที่มีองค์ประกอบหลากหลายออกจากกันได้ ซึ่งการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมนั้นจะทดลองจากการลองผิดลองถูก (trial and error) หรือจากงานวิจัยที่แยกองค์ประกอบของสารใกล้เคียงกัน และปรับ

อัตราส่วนของตัวทำละลายหรือเปลี่ยนตัวทำละลายให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการแยก โดยระบบตัวทำละลายที่เลือกใช้แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ระบบตัวทำละลายสำหรับการแยกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค TLC

ระบบตัวทำละลาย	อัตราส่วน (โดยปริมาตร)	อ้างอิง
บิวทานอล : isopropanol : ethanol : น้ำ	2:3:3:2	Chantorn <i>et al.</i> , 2013
1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ	2:1:1	Zahura <i>et al.</i> , 2012
1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ	2:1:1 (develop 2 ครั้ง)	ดัดแปลงจาก Zahura <i>et al.</i> , 2012
1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ	4:1:1	ดัดแปลงจาก Zahura <i>et al.</i> , 2012
1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ	1:1:1	ดัดแปลงจาก Zahura <i>et al.</i> , 2012
acetonitrile : น้ำ	85:15 (develop 2 ครั้ง)	Jiang <i>et al.</i> , 2004
acetonitrile : น้ำ	85:15	ดัดแปลงจาก Jiang <i>et al.</i> , 2004
chroloform : methanol : น้ำ	95:20:2.5	Liengprayoon, 2008
น้ำ	100	-

ทำการทดลองโดยใช้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์มาตรฐาน mannose (M1), mannobiose (M2), mannotriose (M3), mannotetraose (M4), mannopentaoase (M5) และ mannohexaoase (M6) (ภาพที่ 28) เรียงลำดับความมีขั้วจากมากไปน้อยของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์มาตรฐานคือ $M6 > M5 > M4 > M3 > M2 > M1$ ซึ่งสารที่มีขั้วมากจะเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ที่เป็นซิลิกาได้น้อยกว่าสารที่มีขั้วน้อย



ภาพที่ 30 โครมาโทแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์ ภายใต้สภาวะต่างๆ

A คือ ตัวทำละลาย บิวทานอล : isopropanol : ethanol : น้ำ ในอัตราส่วน 2:3:3:2 โดยปริมาตร

B คือ ตัวทำละลาย 1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 2:1:1 โดยปริมาตร

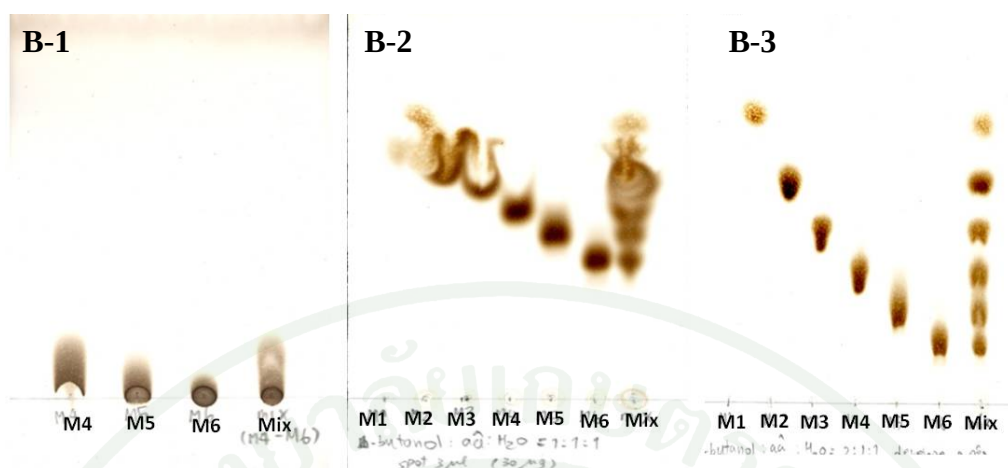
C คือ ตัวทำละลาย acetonitrile : น้ำ ในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตร

D คือ ตัวทำละลาย acetonitrile : น้ำ ในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตร (develop 2 ครั้ง)

E คือ ตัวทำละลาย chloroform : methanol : น้ำ ในอัตราส่วน 95:20:2.5

F คือ น้ำ 100 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดสอบตัวทำละลาย (ภาพที่ 30) พบว่าระบบ A, D, E และ F ไม่สามารถแยกสารผสมของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์มาตรฐานออกจากกันได้ ในขณะที่ระบบ C สามารถแยกได้เพียง M1 และ M2 ส่วนระบบ B สามารถแยก M1-M3 ออกจากกันอย่างชัดเจน แต่แยก M4-M6 ได้ไม่ชัดเจน จึงได้นำระบบ B มาทำการเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายต่อไป เพื่อหาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสม (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 ใช้ตัวทำละลาย 1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนที่ใช้

B-1 คือ ตัวทำละลาย 1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 4:1:1 โดยปริมาตร

B-2 คือ ตัวทำละลาย 1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร

B-3 คือ ตัวทำละลาย 1-บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 2:1:1 โดยปริมาตร
(develop 2 ครั้ง)

เมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลาย 1-บิวทานอล : กรดอะซิติก จาก 2:1:1 เป็น 4:1:1 พบว่า ยังคงไม่สามารถแยกแมนโนลิตอลโคแซคคาไรด์มาตรฐาน M4-M6 ออกจากกันได้ และเมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 1:1:1 สามารถแยก M5 และ M6 ได้แต่ไม่สามารถแยก M1-M4 ออกจากกันได้ เมื่อพิจารณาที่อัตราส่วนของตัวทำละลายเดิมคือ 2:1:1 แต่ develop ซ้ำอีกครั้งในระบบตัวทำละลายเดิมพบว่าสามารถแยกสารผสมของแมนโนลิตอลโคแซคคาไรด์มาตรฐานออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 31B-3 จึงใช้ระบบตัวทำละลายนี้และ develop 2 ครั้งในการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2

5.4.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยสลาย

ทดลองแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์ 1, 4 และ 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา ที่ใช้ในการย่อยสลายทคอนยัคกลูโคแมนแนน โลคัสปีนัม และกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว โดยมีปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาการย่อยสับสเตรทคอนยัคกลูโคแมนแนน โลคัสปีนัม และ
กากมะพร้าวที่สกัดไขมันแล้ว

ส่วนประกอบ	ปริมาณของแต่ละส่วนประกอบ (ไมโครลิตร)		
	เอนไซม์ 1 ยูนิต/ปฏิกิริยา	เอนไซม์ 4 ยูนิต/ปฏิกิริยา	เอนไซม์ 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา
2% (w/v) สับสเตรท*	100	100	100
28 U/ml แมนนาเนส	7.14	28.57	57.14
ซีเตรทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 4)	92.86	71.43	42.86
ปฏิกิริยารวม	200	200	200

หมายเหตุ * ซังกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว 2 มิลลิกรัม ผสมกับซีเตรทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณสับสเตรทสุดท้ายในปฏิกิริยา คือ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS พบว่า ใช้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียง 1 ยูนิต/ปฏิกิริยาสามารถย่อยคอนยัคกลูโคแมนแนน และโลคัสปีนัม ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้เอนไซม์ 4 และ 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ 8 ยูนิต/ปฏิกิริยาในการย่อยกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้วให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และต่างจากการใช้เอนไซม์ 1 และ 4 ยูนิต/ปฏิกิริยาอย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในการย่อยกากมะพร้าวพบว่าค่าน้ำตาลรีดิวซ์ยังคงเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์ ที่ 24 ชั่วโมง

1% (w/v) สับเสตรท	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (ยูนิต/ปฏิกิริยา)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
		0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
โลคัสปินกัม	1	0.07	3.74
	4	0.07	3.87
	8	0.07	3.93
คอนยัคกลูโคแมนแนน	1	0.41	5.51
	4	0.41	5.52
	8	0.38	5.92
กากมะพร้าว	1	0.01	0.53 ^b
	4	0.01	0.80 ^b
	8	0.01	1.17 ^a

หมายเหตุ ^{a,b} ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$

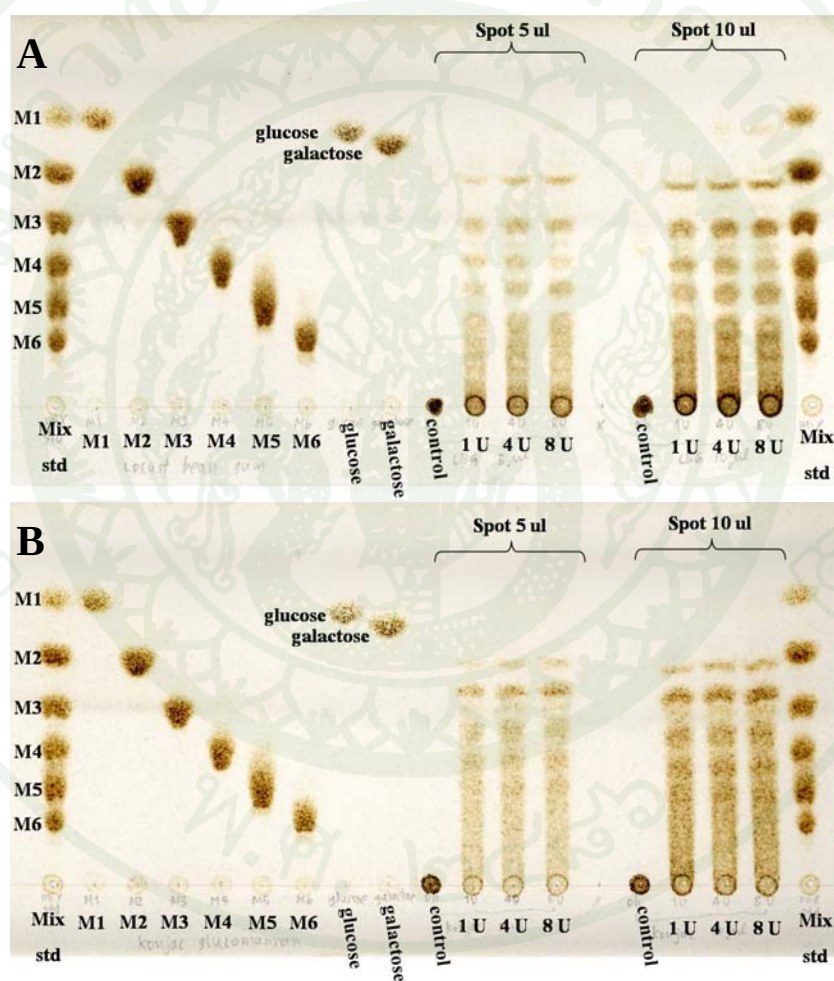
5.4.3 วิเคราะห์โพลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แมนนาเนสด้วยวิธี

Thin layer chromatography (TLC)

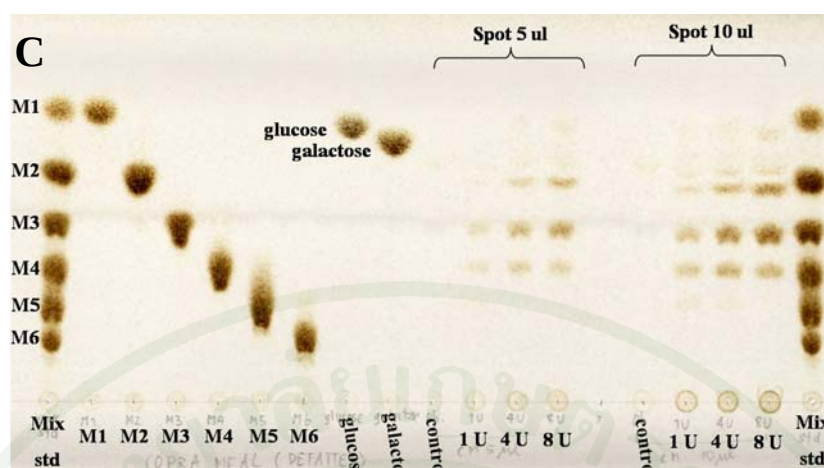
สับเสตรทที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือคอนยัคกลูโคแมนแนน โลคัสปินกัมและกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว คอนยัคกลูโคแมนแนนและโลคัสปินกัมเป็นสับเสตรทที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2 มากที่สุดคือ 100% และ 92.63% ตามลำดับ ส่วนกากมะพร้าวเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมทำน้ำมันมะพร้าวและอุตสาหกรรมทำน้ำกะทิ สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ แต่เนื่องจากกากมะพร้าวมีปริมาณแมนแนนและกาแลคโตแมนแนนสูง ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สัตว์ย่อยได้ไม่ดีหรืออาจเรียกได้ว่าเป็น anti-nutritional substance (Sundu and Dingel, 2003) การย่อยสารประกอบเหล่านี้ให้เป็นน้ำตาลแมนโนสหรือแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้ในสัตว์ และแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นพรีไบโอติกส์ยังอาจช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ได้ด้วย

ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับเสตรทคอนยัคกลูโคแมนแนน โลคัสปินกัมและกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli*

KMAN-2 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโลคัสปินกัม (H-LBG) คือ M2, M3, M4 และ โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า Rf อยู่ระหว่าง M4-M5, M5-M6 (ภาพที่ 32A) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยคอนซัคกลูโคแมนแนน (H-KGM) คือ M2, M5 และ โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า Rf อยู่ระหว่าง M2-M3, M3-M4 และ M4-M5 (ภาพที่ 32B) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว (H-DCM) คือ M2, M3 และ M4 (ภาพที่ 32C) โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นในการย่อยกากมะพร้าว จะพบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับตามปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 32 โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์วิเคราะห์โดยวิธี TLC



ภาพที่ 32 (ต่อ)

Mix std คือ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์มาตรฐานรวม M1-M6

M1 = Mannose

M2 = Mannobiose

M3 = Mannotriose

M4 = Mannotetraose

M5 = Mannopentaose

M6 = Mannoheptaose

A คือ สับเสตรทิลคัสปีนัมย่อยด้วยเอนไซม์แมนนาเนส 1 ยูนิต/ปฏิกิริยา

B คือ สับเสตรทิลคัสปีนัมย่อยด้วยเอนไซม์แมนนาเนส 1 ยูนิต/ปฏิกิริยา

C คือ สับเสตรทิลคัสปีนัมที่สกัดไขมันแล้วย่อยด้วยเอนไซม์แมนนาเนส 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา

จากการย่อยสับเสตรทิลคัสปีนัมทั้ง 3 ชนิดพบโอลิโกแซคคาไรด์ตั้งแต่ M2 ถึง M5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2 เป็นการตัดภายในสายหลักแบบสุ่ม ซึ่งทำให้ได้ทั้งแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสหรือกาแลคโตสเชื่อมต่ออยู่ด้วย นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ด้วย TLC ไม่พบน้ำตาลแมนโนสเกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แมนนาเนสนี้อาจไม่สามารถตัด M2 ได้ และไม่พบน้ำตาลกาแลคโตส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2 ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ α -galactosidase

5.5 ผลของ hydrolysate ต่อการเจริญของเชื้อ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบสมบัติหนึ่งของความเป็นโปรไบโอติกส์ของโพลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทคอนซัคกูโคแมนแนน โลคัสปีนกัมและกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยเอนไซม์แมนนาเนสจาก *E. coli* KMAN-2 ทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรค เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก (Saminathan *et al.*, 2011; Nakphaichit *et al.*, 2011; Nakphaichit, 2012; Ohimain and Ofongo, 2012; Tellez *et al.*, 2012; เกริกวุฒิและสุขาริณี, 2551) ยกเว้น *Lactobacillus johnsonii* KUNN19-2 ซึ่ง Prommadee *et al.* (2012) รายงานว่า เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่งานวิจัยยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นโปรไบโอติกส์

วิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคในสถานะที่เลี้ยงในอาหาร basal medium ที่ผสมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโพลีโกแซค (H-LBG) คอนซัคกูโคแมนแนน (H-KGM) และกากมะพร้าวที่สกัดไขมันแล้ว (H-DCM) เทียบกับอาหาร basal medium (negative control) กลูโคส (positive control) และ Actigen™ ที่เป็นโปรไบโอติกส์ทางการค้า ซึ่งประกอบด้วยแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (MOS) ที่ได้จากผนังเซลล์ (outer cell wall) ของยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (Sara *et al.*, 2012) ซึ่งผนังเซลล์ยีสต์ประกอบด้วย α -mannan และ β -glucan (Kogan and Kocher, 2007) โดยมีหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลองคือ ถ้าอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบมีค่าทางสถิติที่เทียบเท่าหรือน้อยกว่า basal medium หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทนั้นๆ ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และถ้าอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบมีค่าทางสถิติที่มากกว่าเทียบเท่าหรือน้อยกว่ากลูโคส แต่มากกว่า basal medium หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทนั้นๆ มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ

เมื่อเติม H-LBG, H-KGM และ H-DCM ลงใน basal medium และวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อเทียบกับ basal medium และสถานะที่มีน้ำตาลกลูโคสพบว่า ทั้งเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมีอัตราการเจริญจำเพาะดีที่สุดในการที่มีกลูโคส 0.05% (ตารางที่ 15) ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของ *Weissella confusa* JCM 1093 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ผสม H-LBG มีค่าใกล้เคียงกับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ผสม Actigen™ แสดงให้เห็นว่า H-LBG มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของ *W. confusa* JCM 1093 และอาจนำมาใช้แทน Actigen™ ได้ ในขณะที่

H-KGM และ H-DCM ส่งเสริมการเจริญของ *W. confusa* JCM 1093 ได้น้อย ซึ่งมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะไม่ต่างจาก basal medium (negative control)

การเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5, *Lactobacillus salivarius* KL-D4 และ *Lactobacillus johnsonii* KUNN19-2 ในอาหารที่มี H-DCM มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี Actigen™ อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะ *L. johnsonii* KUNN19-2 ที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี H-DCM สูงเทียบเท่ากับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส แสดงให้เห็นว่า H-DCM สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ได้และอาจใช้ H-DCM แทน Actigen™ ได้อีกด้วย นอกจากนี้ *L. salivarius* KL-D4 ยังสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี H-LBG และเจริญได้ดีกว่าในอาหารที่ Actigen™ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาที่โอลิโกแซคคาไรด์ใน H-DCM พบว่าประกอบด้วยส่วนผสมของ M2 M3 และ M4 ซึ่งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำนี้ แบคทีเรียโพรไบโอติกส์สามารถนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว (Rastall and Maitin, 2002 และ Saminathan *et al.*, 2011) Saminathan *et al.* (2011) ยังรายงานอีกว่า โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า DP (degree of polymerization) ต่ำ (ประกอบด้วย mono-, di-, tri- และ tetraoligosaccharide) เช่น galactooligosaccharides (GOS), fructooligosaccharides (FOS), isomaltooligosaccharides (IMO) และ gentiooligosaccharides (GTO) จะถูกใช้ได้อย่างรวดเร็วโดยแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม *Lactobacillus* นอกจากนี้ H-LBG และ H-KGM ที่ประกอบด้วยสารผสมของ M2 M3 M4 และ M5 และมีโอลิโกแซคคาไรด์ที่อาจมีกึ่งของน้ำตาลกาแลคโตสหรือกลูโคสรวมอยู่ด้วย อาจจำเป็นต้องใช้ระบบที่มีความจำเพาะจึงจะสามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ได้

Leuconostoc citreum JCM 9698, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 และ *Lactobacillus salivarius* AC21 ไม่สามารถใช้ H-LBG, H-KGM และ H-DCM ในการเจริญได้ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี hydrolysate ทั้ง 3 ชนิดแตกต่างจาก basal medium อย่างไม่มีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้น้ำตาลหรือโอลิโกแซคคาไรด์ได้แตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ระบบการย่อยที่จำเพาะต่อโอลิโกแซคคาไรด์นั้นๆ และยังขึ้นอยู่กับสถานะในการเลี้ยงอีกด้วย (Holt *et al.*, 2005 และ Saminathan *et al.*, 2011)

สาร hydrolysate ทั้ง 3 ชนิดนอกจากจะสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกได้แล้ว ยังพบว่ามีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วย โดย *Escherichia coli* ATCC 8739,

Escherichia coli E010, *Salmonella* Typhimurium S003 และ *Salmonella* Enteritidis DMST 17368 สามารถเจริญได้ในอาหารที่ผสม hydrolysate ทั้ง 3 ชนิดในอัตราการเจริญจำเพาะที่ต่ำกว่าในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส โดยเฉพาะอัตราการเจริญจำเพาะของ *Escherichia coli* E010 ในสภาวะที่มี H-LBG ซึ่งมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะไม่ต่างจากสภาวะที่เลี้ยงในอาหาร basal medium

จากการศึกษาพบว่า เซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 สามารถผลิตเอนไซม์แมนแนนสที่ย่อยกัมมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้วได้ hydrolysate ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกได้ 42.86 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งสาร hydrolysate นี้สามารถนำไปปรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้ในอนาคต

ตารางที่ 15 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชม.⁻¹) ของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ผสมโอลิโกแซคคาไรด์

เชื้อจุลินทรีย์	อัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ในอาหารที่ผสมน้ำตาลหรือ hydrolysate (ชม. ⁻¹)					
	Basal medium	Glucose	Actigen™	H-LBG	H-KGM	H-DCM
<i>Leuconostoc citreum</i> JCM 9698	0.48 ± 0.14 ^{b,c}	0.95 ± 0.03 ^a	0.63 ± 0.21 ^b	0.47 ± 0.09 ^{b,c}	0.52 ± 0.15 ^{b,c}	0.31 ± 0.06 ^c
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 5805	0.75 ± 0.10 ^b	1.03 ± 0.11 ^a	0.78 ± 0.10 ^b	0.42 ± 0.06 ^c	0.53 ± 0.04 ^c	0.40 ± 0.01 ^c
<i>Weissella confusa</i> JCM 1093	0.62 ± 0.11 ^d	1.09 ± 0.01 ^a	0.94 ± 0.10 ^b	0.83 ± 0.11 ^{b,c}	0.67 ± 0.06 ^{c,d}	0.76 ± 0.08 ^{c,d}
<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	0.24 ± 0.00 ^d	0.48 ± 0.02 ^a	0.26 ± 0.02 ^{c,d}	0.29 ± 0.02 ^c	0.30 ± 0.00 ^c	0.36 ± 0.03 ^b
<i>Lactobacillus salivarius</i> KL-D4	0.32 ± 0.06 ^c	0.76 ± 0.04 ^a	0.36 ± 0.04 ^c	0.49 ± 0.08 ^b	0.35 ± 0.08 ^c	0.42 ± 0.13 ^{b,c}
<i>Lactobacillus salivarius</i> AC21	0.57 ± 0.04 ^b	0.80 ± 0.03 ^a	0.58 ± 0.01 ^b	0.33 ± 0.03 ^c	0.57 ± 0.05 ^b	0.36 ± 0.10 ^c
<i>Lactobacillus johnsonii</i> KUNN19-2	0.36 ± 0.05 ^d	0.70 ± 0.08 ^a	0.49 ± 0.01 ^{b,c}	0.43 ± 0.03 ^{c,d}	0.54 ± 0.08 ^b	0.65 ± 0.04 ^a
<i>Escherichia coli</i> E010	0.12 ± 0.01 ^d	0.78 ± 0.15 ^a	0.63 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.00 ^d	0.49 ± 0.03 ^{b,c}	0.46 ± 0.03 ^c
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0 ^d	0.72 ± 0.12 ^a	0.59 ± 0.004 ^b	0.40 ± 0.03 ^c	0.58 ± 0.06 ^b	0.55 ± 0.03 ^b
<i>Salmonella</i> Typhimurium S003	0.27 ± 0.03 ^d	0.80 ± 0.01 ^a	0.64 ± 0.07 ^b	0.41 ± 0.02 ^c	0.48 ± 0.07 ^c	0.46 ± 0.03 ^c
<i>Salmonella</i> Enteritidis DMST 17368	0.27 ± 0.01 ^d	0.79 ± 0.01 ^a	0.62 ± 0.14 ^b	0.42 ± 0.07 ^c	0.51 ± 0.05 ^{b,c}	0.51 ± 0.03 ^{b,c}

หมายเหตุ ^{a,b,c,d} ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$; Basal medium คือ อาหารที่ไม่มีน้ำตาล (MRS ที่ไม่มีน้ำตาลสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก, NB สำหรับแบคทีเรียก่อโรค); Actigen™ คือ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า; H-LBG, H-KGM, H-DCM คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับเสตรทิลอสปีนัม, คอนยัคกลูโคแมนแนนและกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว ตามลำดับ

สรุป

โคลนยีนแมนนาเนสจากแบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* CW2-3 จากธนาคารยีน ซึ่งเตรียมโดยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Klebsiella oxytoca* CW2-3 แบบไม่สมบูรณ์ให้ได้ขนาด 3-7 กิโลเบส ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* 0.5 หน่วย/ปฏิกิริยา เป็นเวลา 20 นาที เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pUC19 และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ได้เซลล์ลูกผสมเพียง 1 โคลนที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสคือ *E. coli* KMAN-1 ซึ่งประกอบด้วยยีนแมนนาเนสขนาด 1,164 คู่เบส (387 กรดอะมิโน) ให้ชื่อเป็น KMAN-2 จัดอยู่ในกลุ่ม glycosyl hydrolase แฟมิลี 26 มีน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้จากยีน 42.6 กิโลดาลตัน มีตำแหน่งโปรโมเตอร์ -10 และ -35 ที่ตำแหน่ง 1279 (-10 AACTACTAT) และ 1259 (-35 TTGACA) เอนไซม์แมนนาเนสมีโครงสร้าง 3 มิติที่มีลักษณะ (α/β)₈ TIM Barrel

โคลนยีน *kman-2* ด้วยไพรเมอร์ No298-ExF (5' TACAGAATTCATGTGCATTTATA CAGTAGTTTGC 3') และ 298-ExR (5' TATAGGTACCCAGCTGATGCTGATGTCGC 3') เข้าสู่เวกเตอร์ pFlag-CTS และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* TOP10 พบเซลล์ลูกผสมเพียง 1 โคลน ให้ชื่อเป็นเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2

E. coli KMAN-2 สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสโดยเหนี่ยวนำด้วย IPTG เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมงหลัง พบว่าเอนไซม์ส่วน periplasm มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุด และการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA agarose ภายใต้อุณหภูมิ non-denaturing ได้เอนไซม์บริสุทธิ์ 87.88% เอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 2,348.29 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน พบแถบโปรตีนของเอนไซม์แมนนาเนสที่ปรากฏบน 12% เจลอะครีลาไมด์และตรวจสอบด้วยเทคนิคอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ภายใต้อุณหภูมิ non-denaturing จำนวน 2 แถบ มีขนาดที่คำนวณจากเจลอะครีลาไมด์ประมาณ 49 และ 35.4 กิโลดาลตัน ตัดเจลบริเวณแถบโปรตีนขนาด 49 กิโลดาลตันเพื่อนำไปศึกษาต่อ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ภายใต้อุณหภูมิ denaturing พบแถบโปรตีน 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 43.2 กิโลดาลตัน

เอนไซม์แมนนาเนสมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือพีเอช 4 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง 4-10 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำ 10-40 องศาเซลเซียส มีความจำเพาะต่อสับสเตรทคอนยัคกลูโคแมนแนนสูงที่สุด 100% รองลงมาคือ

โลคัสบีนกัม (92.63%) และสามารถย่อยสลาย CMC (30.56%), ivory nut mannan (5.98%), avicel (4.98%) และกากมะพร้าวทั้งที่ไม่ได้สกัด (5.28%) และสกัดไขมันออกแล้ว (7.02%)

เอนไซม์แมนนาเนสจากเซลล์ลูกผสม *E. coli* KMAN-2 มีการทำงานแบบตัดภายในสายหลักของสับสเตรทแบบลุ่ม (endo acting) ยืนยันจากการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคอนยัคกลูโคแมนแนน โลคัสบีนกัม และกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 1- บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 2:1:1 โดยปริมาตร และแยกสารประกอบในตัวทำละลายซ้ำ 2 ครั้ง พบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโลคัสบีนกัมด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ 1 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงคือ M2, M3, M4 และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า Rf อยู่ระหว่าง M4-M5, M5-M6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยคอนยัคกลูโคแมนแนนด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ 1 ยูนิต/ปฏิกิริยา บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงคือ M2, M5 และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า Rf อยู่ระหว่าง M2-M3, M3-M4 และ M4-M5 และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้วด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงคือ M2, M3 และ M4

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายสับสเตรทโลคัสบีนกัม (H-LBG) สามารถส่งเสริมการเจริญของ *W. confusa* JCM1093 และ *L. salivarius* KL-D4 ได้ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว (H-DCM) สามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. reuteri* KUB-AC5, *L. salivarius* KL-D4 และ *L. johnsonii* KUNN19-2 ได้ นอกจากส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายสับสเตรทโลคัสบีนกัม (H-LBG) คอนยัคกลูโคแมนแนน (H-KGM) และกากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้ว (H-DCM) ยังสามารถลดการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* E010, *E. coli* ATCC 8739, *S. Typhimurium* S003 และ *S. Enteritidis* DMST17368 ได้ เมื่อเทียบกับอัตราการเจริญของเชื้อก่อโรคในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2552. พันธุวิศวกรรม 1. แหล่งที่มา: http://203.131.222.72/ocw-wcl/pkg49314/Unit4/sl_9_4_2_2_1.swf, 20 พฤษภาคม 2557.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- 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 a β -mannanase. **J Biotechnol.** 63: 199–210.
- Akino, T., C. Kato and K. Horikoshi. 1989. The cloned β -mannanase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. AM-001 produces two β -mannanases in *Escherichia coli*. **Arch. Microbiol.** 152: 10–15.
- Arakawa, Y., M. Ohta, N. Kido, M. Mori, H. Ito, T. Komatsu, Y. Fujii and N. Kato. 1989. Chromosomal β -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum β -lactam antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.** 33(1): 63-70.
- Araujo, A., and O.P. Ward. 1990. Hemicellulases of *Bacillus* species: preliminary comparative studies on production and properties of mannanases and galactanases. **J. Appl. Bacteriol.** 68: 253–261.
- Arcand, N., D. Kluepfel, F. W. Paradis, R. Morosoli and F. Sharek. 1993. β -Mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequencing of the *manA* gene and characterization of the enzyme. **J. Biochem.** 290: 857–863.
- Aspinall, G.O. 1959. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Adv. Carbohydr. Chem.** 14: 429–468.

- Aspinall, G.O., R. Begbie, J.E. McKay. 1962. The hemicelluloses of European larch (*Larix decidua*). Part II. **J. Chem. Soc.** 214:219.
- Aspinall, G. O., 1970. **Polysaccharides**. Pergamon Press, New York.
- Bagley, S. 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. **Infection control: IC.** 6(2): 52-58.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 411-421.
- Bañuelos, O., C. Ronchel, J. Adrio and J. Velasco. 2005. Screening of microorganisms for enzymatic biosynthesis of nondigestible oligosaccharides. **Springer**, pp. 105-113. In J.L. Barredo, eds. **Microbial Enzymes and Biotransformations**. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Bettiol, J. P., and M.S. Showell. 2002. Detergent compositions comprising a mannanase and a protease. **US Patent** 6376445.
- Bicho, P. A., T. A. Clark, K. Mackie, H. W. Morgan and R. M. Daniel. 1991. The characterisation of a thermostable endo- β -mannanase cloned from *Caldocellum saccharolyticum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 337-343.
- Braithwaite, K. L., G. W. Black, G. P. Hazlewood, B. R. Ali and H. J. Gilbert. 1995. A non-modular endo-beta-1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*. **Biochem. J.** 305: 1005-1010.
- Cai, H., P. Shi, H. Luo, Y. Bai, H. Huang, P. Yang and B. Yao. 2011. Acidic β -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. **J. Biosci. Bioeng.** 112(6): 551-557.

- Cann, I. K., 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.
- Capoe, P., M. Kubackova and J. Alfoldi, 2000. Galactomannan from the secondary cell wall of *Picea abies*. L. Krast. **Carbohydr. Res.** 329: 635-645.
- Casali, N. and A. Preston. 2003. ***E. coli* plasmid vectors**. 1st ed. Totowa, N.J.: Humana Press.
- Cereghino, G. and J. Cregg. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10(5): 422-427.
- Chandra, M., Y.S. Lee, I.H. Park, Y. Zhou, K.K. Kim and Y.L. Choi. 2011. Isolation, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Paenibacillus* sp. DZ3. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.** 54(3): 325-331.
- Chantorn, S., N. Pongsapipatana, S. Keawsompong, A. Ingkakul, D. Haltrich and S. Nitisinprasert. 2013. Characterization of mannanase S1 from *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 and its application in copra mannan hydrolysis. **SCIENCEASIA**. 39(3): 236-245.
- Charrier, M., and C. Rouland. 2001. Mannan-degrading enzymes purified from the crop of the brown garden snail *Helix aspersa* Muller (*Gastropoda Pulmonata*). **J. Expt. Zool.** 290: 125–135.
- Chauhan, P., N. Puri, P. Sharma and N. Gupta. 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 93(5): 1817-1830.

- Christgau, S., S. Kauppinen, J. Vind, L.V. Kofod and H. Dalbøge. 1994. Expression, cloning, purification and characterization of a beta-1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 33: 917–925.
- Chen, Y., J. Long and L. Liao. 2000. Study on the production of betamannanase by *Bacillus* M50. **Wei Sheng Wu Xue Bao.** 40: 62–68.
- Chen, Y., L. Chen, S. Chen, M. Chang and T. Chen. 2004. A modified osmotic shock for periplasmic release of a recombinant creatinase from *Escherichia coli*. **Biochem. Eng. J.** 19(3): 211–215.
- Chen, X., Y. Cao, Y. Ding, W. Lu and D. Li. 2007. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* beta-mannanase in *Pichia pastoris*. **J. Biotechnol.** 128(3): 452–461.
- Cho, K., S. Hong, S. Lee, Y. Kim, G. Kahng, H. Kim and H. Yun. 2006. A cel44C man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 73(3): 618–630.
- Choi, J.H. and S.Y. Lee. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 64: 625–635.
- Civas, A., R. Eberhard, P. le Dizet and F. Petek. 1984. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii* secreted α -D-galactosidase and β -Dmannanase. **Biochem J.** 219: 857–863.
- Cui, F., J. Shi and Z. Lu. 1999. Production of neutral beta-mannanase by *Bacillus subtilis* and its properties. **Wei Sheng Wu Xue Bao.** 39(1): 60–63.
- Dale, J.W. 1995. **Molecular genetics of bacteria.** 2nd ed. John Wiley and Sons Ltd, England. pp. 163–185.

- Darbre, P. 1999. **Basic molecular biology**. 1st ed. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, UK.
- Dhawan, S. and J. Kaur. 2007. Microbial mannanases: An overview of production and applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** 27: 197-216.
- Dien, B., M. Cotta and T. Jeffries. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 63 (3): 258-66.
- Downie, B., H. Hilhorst and J. Bewley. 1993. A new assay for quantifying endo- β -D-mannanase activity using congo red dye. **Phytochemistry**. 36(4): 829-835.
- 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 neopolitana* 5068. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 169-177.
- Dung, N.N.X, L.H. Manh and P. Uden. 2002. Tropical fiber sources for pigs- digestibility, digesta retention and estimation of fibre digestibility in vitro. **Anim. Feed Sci. Tec.** 102: 109-124.
- Dutta, S., K.J. Bradford and D.J. Nevins. 1997. Endo- β -Mannanase activity present in cell wall extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. **Plant Physiol.** 11: 155-161.
- Ewis, H. and C. Lu. 2005. Osmotic shock: a mechanosensitive channel blocker can prevent release of cytoplasmic but not periplasmic proteins. **FEMS Microbiol. Lett.** 253(2): 295-301.
- El-Mansi, E.M.T., C.E.A. Bryce, B. Dahhou, S. Sanchez, A.I. Demain and A.R. Allman. 2012. **Fermentation microbiology and biotechnology**. 3rd ed. CRC Press.

- Ethier, N., G. Talbot and Sygusch, J. 1998. Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable β -mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4428-4432.
- Fanutti, C., T. Ponyi, G. W. Black, G. P. Hazlewood and H. J. Gilbert. 1995. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. **J. Biol. Chem.** 270(49): 29314–29322.
- Ørskov, I. 1984. The genus *Klebsiella* Trevisan 1885. In: Krieg N.R., J.G. Holt, eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Vol1. Baltimore: William and Wilkins. pp. 461-465.
- Filichkin, S. A., J. M. Leonard, P. P. Liu and H. Nonogaki. 2004. A novel endo- β -mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. **Plant Physiol.** 134:1080–1087.
- Filho, E. X. F. 1998. **Hemicellulases and biotechnology**. In: Pandalai SG (ed) Recent research developments in microbiology. Research Signpost, Trivandrum, pp 165–176
- Franco, P. F., H. M. Ferreira and E. X. Filho. 2004. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 40: 255–259.
- Fu, X., X. Huang, P. Liu, L. Lin, G. Wu, C. Li, C. Feng and Y. Hong. 2010. Cloning and characterization of a novel mannanase from *Paenibacillus* sp. BME-14. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20(3): 518-524.

- Gerday, C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, J. Dumont, G. Garsoux, D. Georlette, A. Hoyoux, T. Lonhienne, M. Meuwis and G. Feller. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Trends Biotechnol.** 18(3): 103-107.
- Gersten, D. 1996. **Gel electrophoresis-proteins.** 1st ed. Chichester: John Wiley, UK.
- Gherardini, F., M. Babcock and A. Salyers. 1987. Purification and characterization of a cell-associated, soluble mannanase from *Bacteroides ovatus*. **J. Bacteriol.** 169: 2038–2043.
- Gibbs, M. D., R. A. Reeves, A. Sunna and P. L. Bergquist. 1999. Sequencing and expression of a β -mannanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, and characteristics of the recombinant enzyme. **Curr. Microbiol.** 39(6): 351–357.
- Grimont, F., P.A.D. Grimont and C. Richard. 1991. The genus *Klebsiella*. In Starr M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel (ed.), **The prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.** 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag. pp. 2775-2796.
- Grimont, P.A.D. and F. Grimont. 2005. The *Proteobacteria* Part B: The *Gammaproteobacteria*. Brenner, D.J., N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity (ed.). In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed. vol. 2. The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Halstead, J. R., P. E. Vercoe, H. J. Gilbert, K. Davidson and G. P. Hazlewood. 1999. A family 26 mannanase produced by *Clostridium thermocellum* as a component of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannanases from anaerobic fungi. **Microbiol.** 145: 3101–3108.
- Hames, B.D. 1998. **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach.** 3rd ed., Oxford University Press, New York.

- Hatada, Y., N. Takeda, K. Hirasawa, Y. Ohta, R. Usami, Y. Yoshida, S. Ito and K. Horikoshi. 2005. Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750, its expression in *B. subtilis* and characterization of the recombinant enzyme. **Extremophiles**. 9: 497–500.
- He, X., N. Liu, W. Li, Z. Zhang, B. Zhang and Y. Ma. 2008. Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Enzym. Microb. Tech.** 43: 13-18.
- Henrissat, B. 1990. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 280: 304–316.
- Henrissat, B., and A. Bairoch. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 293: 781–788.
- Helow, E. R., and A. A. Khattab. 1996. The development of a *B. subtilis* 168 culture condition for enhanced and accelerated beta-mannanase production. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.** 43: 289–299.
- Henrissat, B., and A. Bairoch. 1996. Updating the sequence based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem. J.** 316: 695–696.
- Hilge, M., S. M. Gloor, W. Rypniewski, O. Sauer, T. D. Heightman and W. Zimmerman. 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.
- Hrmova, M., R.A. Burton, P. Biely, J. Lahnstein and G.B. Fincher. 2006. Hydrolysis of (1,4)- β -D-mannans in barley (*Hordeum vulgare* L.) is mediated by the concerted action of (1,4)- β -D-mannan endohydrolase and β -D-mannosidase. **Biochem. J.** 399: 77–90.

- Holt, S.M., C.M. Miller-Fosmore and G.L. Côté. 2005. Growth of various intestinal bacteria on alternansucrase-derived oligosaccharides. **Lett. Appl. Microbiol.** 40: 385-390.
- Hongshu, Z., Y. Jinggan and Z. Yan. 2002. The glucomannan from ramie. **Carbohydr. Polym.** 47:83–86
- Huang, S. P., C.L. Wang, G.M. Zhang and L.X. Ma. 2007. Construction of a double functional recombinant strain of *Pichia pastoris* coexpressing phytase and mannanase and the enzymatic analysis. **Wei Sheng Wu Xue Bao.** 47(2): 280–284.
- Huang, J., L. Bao, H. Zou, S. Che and G. Wang. 2012. High-level production of a cold-active B-mannanase from *Bacillus subtilis* Bs5 and its molecular cloning and expression. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology.** 27(4): 147-153.
- Jazii, F.R., A. Karkhane, B. Yakhchali, S. Fatemi and A. Deezagi. 2007. A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor from periplasmic space of *Escherichia coli*. **J. Chromatogr. B.** 856(1): 214-221.
- Jiang, Z., Y. Zhu, L. Li, X. Yu, I. Kusakabe, M. Kitaoka and K. Hayashi. 2004. Transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl β -d-xylobiosides and xylosides. **J. Biotechnol.** 114(1): 125-134.
- Jiang, Z., Y. Wei, D. Li, L. Li, P. Chai and I. Kusakabe. 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. **Carbohydr. Polym.** 66: 88-96.
- Jones, G.H. and C.E. Ballou. 1969. Studies on the structure of yeast mannan. **J. Biol. Chem.** 244(4): 1043-1051.

- Kansoh, A. L. and Z. A. Nagieb. 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. **Anton. van. Leeuwonhoek.** 85: 103–114.
- Kataoka, N., and Y. Tokiwa. 1998. Isolation and characterization of an active mannanase-producing anaerobic bacterium, *C. tertium* KT-5A from lotus soil. **J. Appl. Microbiol.** 84: 357–367.
- Katsuraya, K., K. Okuyama, K. Hatanaka, R. Oshima, T. Sato and K. Matsuzakic. 2003. Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ^{13}C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers.** 53 (2): 183–189.
- Kauppinen, M. S., M. Schulein, K. Schnorr, L.N. Andersen and M.E. Bjørnvad. 2003. Mannanases. **US Patent** 6,566,114.
- Khanongnuch, C., C. Sa-nguansookand and S. Lumyong. 2006. Nutritive Quality of β -Mannanase Treated Copra Meal in Broiler Diets and Effectiveness on Some Fecal Bacteria. **Int. J. Poultry Sci.** 5 (11): 1087-1091.
- Kim, D.Y., S.J. Ham, H.J. Lee, H.Y. Cho, J.H. Kim, Y.J. Kim, D.H. Shin, Y.H. Rhee, K.H. Son and H.Y. Park. 2011. Cloning and characterization of a modular GH5 β -1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Callulosimicrobium* sp. Strain HY-13. **Bioresour. Technol.** 102: 9185-9192.
- Kogan, G. and A. Kocher. 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science.** 109: 161–165.
- Kurakake, M., T. Sumida, D. Masuda, S. Oonishi and T. Komaki. 2006. Production of galacto-manno-oligosaccharides from guar gum by β -mannanase from *Penicillium oxalicum* SO. **J. Agric. Food. Chem.** 54 (20): 7885-7889.

- Kurokawa, J., E. Hemjinda, T. Arai, S. Karita, T. Kimura and K. Sakka. 2001. Sequence of the *Clostridium thermocellum* mannanase gene man26B and characterization of the translated product. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65: 548–554.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227(5259): 680-685..
- Li, W., Z. Dong and F. Cui. 2000. Purification and characterization of an endo-beta-1, 4-mannanase from *Bacillus subtilis* BM9602. **Acta microbiologica Sinica.** 40(4): 420-424.
- Li, W., X. Zhou and P. Lu. 2004. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. **Res. Microbiol.** 155(8): 605-610.
- Li, Y. N., K. Meng, Y.R. Wangm and B. Yao. 2006. A β -mannanase from *B. subtilis* B36: purification, properties sequencing, gene cloning and expression in *E. coli*. **Z. Naturforsch (C).** 61: 840–846.
- Li, Y., K. Meng, H. Luo and Y. Fan. 2008. Gene cloning, expression, and characterization of a novel β -mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18(1): 160-166.
- Liengprayoon, S. 2008. **Characterization of lipid composition of sheet rubber from Hevea brasiliensis and relations with its structure and properties.** Ph.D thesis, Kasetsart University.
- Lin, R., P. Hsueh, S. Chang, Y. Chen, W. Hsieh and K. Luh. 1997. Bacteremia due to *Klebsiella oxytoca*: clinical features of patients and antimicrobial susceptibilities of the isolates. **Clinical infectious diseases.** 24(6): 1217-1222.

- Lee, Y.S., Y. Zhou, I.H. Park, M. Chandra, S.C. Ahn and Y.L. Choi. 2010. Isolation and purification of thermostable β -mannanase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.** 53(1): 1-7.
- Lv, J., Y. Chen, H. Pei, W. Yang, Z. Li, B. Dong and Y. Cao. 2013. Cloning, expression, and characterization of β -mannanase from *Bacillus subtilis* MAFIC-S11 in *Pichia pastoris*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 169(8): 2326-2340.
- Ma, Y., Y. Xue, Y. Dou, Z. Xu, W. Tao and P. Zhou. 2004. Characterization and gene cloning of a novel beta-mannanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* N16-5. **Extremophiles** 8: 447–454.
- Macauley-Patrick, S., M. Fazenda, B. McNeil and L. Harvey. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast.** 22(4): 249-270.
- Matsushita, O., J.B. Russell and D.B. Wilson. 1991. A *Bacteroides ruminicola* β -1,4-endoglucanase is encoded in two reading frames. **J. Bacteriol.** 173: 6919–6926.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. **Molecular cloning, A laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 545p.
- McCleary, B.V. and N.K. Matheson. 1986. Polysaccharides having a β -D-xylan backbone. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 44:158–164.
- McCleary, B.V. 1988. Synthesis of β -D-mannopyranosides for the assay of β -D-mannosidase and exo- β -D-mannanase. **Meth. Enzymol.** 160: 515 - 518.
- Mendoza, N. S., M. Arai, T. Kawaguchi, T. Yoshida and L.M. Joson. 1994. Isolation of mannan utilizing bacteria and culture conditions for mannanase production. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 10: 51–54.

- Mendoza, N.S., M. Arai, K. Sugimoto, M. Ueda, T. Kawaguchi and L.M. Joson. 1995. Cloning and sequencing of β -mannanase gene from *Bacillus subtilis* NM-39. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1243: 552-554.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Moreira, L. and E. Filho. 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 79(2): 165-178.
- Morris, D. D., R. A. Reeves, M. D. Gibbs, D. J. Saul and P. Bergquist. 1995. Correction of the the β -mannanase domain of the *celC* pseudogene from *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* and activity of the gene product on kraft pulp. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 2262–2269.
- Nakajima, N., and Y. Matsuura. 1997. Purification and characterization of konjac glucomannan degrading enzyme from anaerobic human intestinal bacterium, *Clostridium butyricum*-*Clostridium beijerinckii* group. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 61: 1739–1742.
- Nakphaichit, M., S. Thanomwongwattana, C. Phraephaisarn, N. Sakamoto, S. Keawsomwong, J. Nakayama and S. Nitisinprasert. 2011. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. **Poult. Sci.** 90: 2753-2765.
- Nakphaichit, M. 2012. **Application of molecular technique to monitor microbial change in chicken gastrointestinal tract**. Ph.D. thesis, Kasetsart University.
- O'Doherty, J.V. and M.P. McKeon. 2000. **The use of expeller copra meal in grower and finisher pig diets**. *Livest Prod Sci.* 67: 55-65.

- Ohimain, E. and R. Ofongo. 2012. The effect of probiotic feed supplementation on chicken health and gut microflora: A review. **Int. J. Anim. Veter. Adv.** 4(2): 135-143.
- Oliveira, M., D. Mendes, L. Ferrari and A. Vasconcelos. 2004. Ribosome binding site recognition using neural networks. **Genetics and Molecular biology**, 27(4): 644-650.
- Pan, X., T. Wu, L. Zhang, L. Cai and Z. Song. 2009. Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to stimulated stress environment. **Lett. Appl. Microbiol.** 48: 362-367.
- Parker, K. N., S. R. Chhabra, D. Lam, W. Callen, G. D. Duffaud, M. A. Snead, J. M. Short, E. J. Mathur and R. M. Kelly. 2001. Galactomannanases Man2 and Man5 from *Thermotoga* species: growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes. **Biotechnol. Bioeng.** 75(3): 322–333.
- Parvathy, K.S., N.S. Susheelamma, R.N. Tharanathan and A.K. Gaonkar. 2005. A simple non-aqueous method for carboxymethylation of galactomannans. **Carbohydr. Polym.** 62:137–141.
- Pason, P., K. L. Kyu and K. Ratanakhanokchai. 2006. *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 2483–2490.
- Perret, S., A. Belaich, H. P. Fierobe, J. P. Belaich and C. Tardif. 2004. Towards designer cellulosomes in *Clostridia*: mannanase enrichment of the cellulosomes produced by *Clostridium cellulolyticum*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 40: 255–259.
- Petkowicz, C.L.O., F. Reicher, H. Chanzy, F.R. Taravel and R. Vuong. 2001. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydr. Polym.** 44:107–112

Piwpankaew, Y., S. Sakulsirirat, S. Nitisinprasert, T.H. Nguyen, D. Haltrich and S.

Keawsompong. 2014. **Expression and characterization of recombinant β -mannanase.** Asian Federation of Biotechnology, Regional symposium on Biotechnology for Sustainability. 9-11 February, 2014. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 65.

Prommadee, P., W. Garnjanagoonchorn, K. Lange and S. Nitisinprasert. 2012. Characterization of *Lactobacillus johnsonii* KUNN19-2 and *Pediococcus pentosaceus* KUNNE6-1 isolated from Thai-style fermented pork (Nham) for their probiotic properties in the gastrointestinal tract and immunomodulation. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 46: 440-450.

Politz, O., M. Krah, K. K. Thomsen and R. R. Borriss. 2000. A highly thermostable endo-1,4-beta-mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53(6): 715-721.

Popa, V.I. and Spiridon, J. 1998. Hemicelluloses: structure and properties. *In*: Dumitriu S (ed) **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. Marcel Dekker, New York, pp 297-311.

Puchart, V., M. Vrsanska, P. Svoboda, J. Pohl and P. Biely. 2004. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *T. lanuginosus* IMI 158749). **Biochimica et biophysica Acta**. 1674: 239-250.

Qiao, J., Z. Rao, B. Dong and Y. Cao. 2010. Expression of *Bacillus subtilis* MA139 β -mannanase in *Pichia pastoris* and the enzyme characterization. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 160(5): 1362-1370.

Ramanan, R., J. Tan, M. Mohamed, T. Ling, B. Tey and A. Ariff. 2010. Optimization of osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon- α 2b from *Escherichia coli* using response surface method. **Process Biochem.** 45(2): 196-202.

Rastall, R. and V. Maitin. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. **Curr. Opin. Biotechnol.** 13: 490-496.

Regalado, C., B.E. Garcia-Almendarez, L.M. Venegas-Barrera, A. Tellez-Jurado, G.

Rodriguez-Serrano, S. Huerta-Ochoa and J.R. Whitaker. 2000. Production, partial purification and properties of β -mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. **J. Sci. Food Agric.** 80: 1343–1350.

Rodriguez, R. and D. Denhardt. 1988. **Vectors**. 1st ed. Boston: Butterworths, USA. pp. 205-225.

Robertson, D., S. Shore and D. Miller. 1997. **Manipulation and expression of recombinant DNA**. 1st ed. San Diego: Academic Press, USA.

Sabini, E., H. Schubert, G. Murshudov, K.S. Wilson, M. Siika-Aho and M. Penttila. 2000. The three-dimensional structure of a *Trichoderma reesei* β -mannanase from glycoside hydrolase family 5. **Acta Crystallogr.** 56: 3–13.

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

Sambrook, J. and D. Russell. 2001. **Molecular cloning**. 1st ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saminathan, M., C.C. Sieo, R. Kalavathy, N. Abdullah and Y.W. Ho. 2011. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. **Afr. J. Microbiol. Res.** 5(1): 57-64.

Sandu, B. and J. Dingle. 2003. Use of enzymes to improve the nutritional value of palm kernel meal and copra meal. **Proc. Queensland Poult. Sci. Symp.** 11(14): 1-15.

- Şara, A., M. Benítez, E. Gabor and A. Ani. 2012. The effects of ACTIGEN™ in broiler chicken nutrition. **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**. 69(1-2): 339-340.
- Selvendran, R.R. and M.A. O'Neill. 1985. **Isolation and analysis of cell walls from plant material**. John Wiley & Sons, New York, pp. 25–123.
- Setati, M. E., P. Ademark, W.H. Vanzyl, B. Hahn-Hagerdal and H. Stalbrand. 2001. Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo- β -1,4-mannanase encoding gene (*man1*) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. **Protein Express Purif**. 21: 105–114.
- Shobha, M.S., A.B.V. Kumar, R.N. Tharanathan, R. Koka and A.K. Gaonkar. 2005. Modification of guar galactomannan with the aid of *Aspergillus niger* pectinase. **Carbohydr. Polym**. 62:267–273.
- Songsiriritthigul, C., B. Buranabanyat, D. Haltrich and M. Yamabhai. 2010. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1, 4- β -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. **Microb. Cell Fact**. 9(1): pp. 1-13.
- Straus, D.C. 1987. Production of an extracellular toxic complex by various strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun**. 55 (1): 44-48.
- Stalbrand, H., A. Saloheimo, J. Vehmaanpera, B. Henrissat and M. Penttilä. 1995. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* β -mannanase gene containing a cellulose binding domain. **Appl. Environ. Microbiol**. 61: 1090–1097.

- Stalbrand, H., M. Siika-Aho, M. Tenkanen and L. Viikari. 1993. Purification and characterisation of two β -mannanases from *Trichoderma reesei*. **J. Biotechnol.** 29: 229-242.
- Stoll, D., H. Stalbrand and R. A. J. Warren. 2000. Hydrolysis of mannans by *Cellulomonas fimi*, pp. 91–98. In M. E. Himmel, J. O. Baker, and J. N. Saddler (eds.), **Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion**, vol. 769, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Stoll, D., H. Stalbrand and R. A. Warren. 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(6): 2598–2605.
- Summpunn, P., S. Chaijan, D. Isarangkul, S. Wiyakrutta and V. Meevootisom. 2011. Characterization, gene cloning, and heterologous expression of β -mannanase from a thermophilic *Bacillus subtilis*. **J. Microbiol.** 49(1): 86-93.
- Sun Y. M., H.Y. Yu, W.J. Wang, Y.S. Yang and Y.H. Yang. 2003. Purification and properties of *Bacillus subtilis* SA–22 endo-1,4-beta-D-mannanase. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.** 19(3): 327–330.
- Sunna, A., M. Gibbs, C.W. Chin, J. Nelson and P.J. Bergquist. 2000. A gene encoding a novel multidomain β -1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 664–670.
- Surzycki, S. 2000. **Basic Techniques in Molecular Biology**. Springer, Berlin, pp. 1-32.
- Takeda N., K. Hirasawa, K. Uchimura, Y. Nogi, Y. Hatada, M. Akita, R. Usami, Y. Yoshida, W.D. Grant, S. Ito and K. Horikoshi. 2004. Alkaline mannanase from a novel species of alkaliphilic *Bacillus*. **J. Appl. Glycosci.** 51: 229-236.

- 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.
- Tamaru, Y., T. Araki, H. Amagoi, H. Mori and T. Morishita. 1995. Purification and characterization of an extracellular beta-1, 4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. **Appl. Environ. Microb.** 61(12): 4454-4458.
- Tamaru, Y., T. Araki, T. Morishita, T. Kimura, K. Sakka and K. Ohmiya. 1997. Cloning, DNA sequencing, and expression of the beta-1,4-mannanase gene from a marine, *Vibrio* sp. strain MA-138. **J. Ferment Bioeng.** 83: 201–205.
- Tamaru, Y. and R.H. Doi. 2000. The engL gene cluster of *Clostridium cellulovorans* contains a gene for cellulosomal ManA. **J. Bacteriol.** 182: 244–247.
- Tang, C.M., L.D. Waterman, M.H. Smith and C.F. Thurston. 2001. The cel4 gene of *Agaricus bisporus* encodes a β -mannanase. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 2298–2303.
- Tellez, G., C. Pixley, R.E. Wolfenden, S.L. Layton and B.M. Hargis. 2012. Probiotics/direct fed microbials for *Samonella* control in poultry. **Food Res. Int.** 45: 628-633.
- Tenkanen, M. 1998. Action of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus oryzae* esterases in the deacetylation of hemicelluloses. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 27: 19–24.
- Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 211-222.
- Timell, T.E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. **Wood Sci. Technol.** 1:45–70.

- Titapoka, S., S. Keawsompong, D. Haltrich and S. Nitisinprasert. 2008. Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 1425-1433.
- Vu, T.T.H., D.T. Quyen, T.T. Dao and S.L.T. Nguyen. 2012. Cloning, High-Level Expression, Purification, and Properties of a Novel Endo- β -1, 4-Mannanase from *Bacillus subtilis* G1 in *Pichia pastoris*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 22(3): 331-338.
- Wang, J., Z. Shao, Y. Hong, C. Li, X. Fu and Z. Liu. 2010. A novel β -mannanase from *Pantoea agglomerans* A021: gene cloning, expression, purification and characterization. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26(10): 1777-1784.
- Wang, Y., P. Shi, H. Luo, Y. Bai, H. Huang, P. Yang, H. Xiong and B. Yao. 2012. Cloning, over-expression and characterization of an alkali-tolerant endo- β -1,4-mannanase from *Penicillium freii* F63. **J. Biosci. Bioeng.** 113(6): 710-714.
- Warren, R.A.J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annu. Rev. Microbiol.** 50: 183-212.
- Wu, S.W., K. Dornbusch and G. Kronvall. 1999. Genetic characterization of resistance to extended-spectrum β -lactams in *Klebsiella oxytoca* isolates recovered from patients with septicemia at hospitals in the Stockholm area. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43(5): 1294-1297.
- Wymelenberg, A. V., G. Sabat, D. Martinez, Rajangam, A. S., T. T. Teeri, J. Gaskell, P. J. Kersten and D. Cullen. 2005. The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: Database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. **J. Biotechnol.** 118: 17-34.

- Xu, B., D. Sellos and J.C. Janson. 2002. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) β -mannanase gene. **Eur. J. Biochem.** 269: 1753-1760.
- Yamabhai, M., S. Emrat, S. Sukasem, P. Pesatcha, N. Jaruseranee and B. Buranabanyat. 2008. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. **J. Biotechnol.** 133: 50-57.
- Yamamura, I., Y. Nozaki, T. Matsumoto and T. Kato. 1996. Purification and some Properties of endo- β -1,4 mannanase from a marine mollusk *Littorina brevicula*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60: 674-676.
- Yamamura, I., and T. Matsumoto. 1993. Purification and some properties of endo- β -1,4 mannanase from a mud snail *Pomacea insularis*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 7: 1316–1319.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. **Gene.** 33(1): 103-119.
- 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(3): 514–520.
- Yu, Q., X. Chen, H. Ding and M. Yue. 2008. Heterologous expression and characterization of *man* gene from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris*. **Front Biol.** 3: 26-31.
- Zahura, U., M. Rahman, A. Inoue and T. Ojima. 2012. Characterization of a β -D-mannosidase from a marine gastropod, *Aplysia kurodai*. **Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.** 162(1): 24-33.

- Zakaria, M. M., M. Ashiuchi, S. Yamamoto and T. Yagi. 1998. Optimization for beta-mannanase production of a psychrophilic bacterium, *Flavobacterium sp.* **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62: 655–660.
- Zhang, Q., X. Yan, L. Zhang and W. Tang. 2006. Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of a β -mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2. **Mol. Biol.** 40: 368–374.
- Zhang, Y., Z. Liu and X. Chen. 2007. Cloning and expression of a mannanase gene from *Erwinia carotovora* CXJZ95-198. **Ann. Microbiol.** 57 (4): 623-628.
- Zhao, W., J. Zheng and H. Zhou. 2011. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1, 4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: Constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*. **Bioresour. Technol.** 102(16): 7538-7547.
- Zhou, J., R. Zhang, Y. Gao, J. Li, X. Tang, Y. Mu, F. Wang, C. Li, Y. Dong and Z. Huang. 2012. Novel low-temperature-active, salt-tolerant and proteases-resistant endo-1, 4- β -mannanase from a new *Sphingomonas* strain. **J. Biosci Bioeng.** 113(5): 568--574.





1. อาหาร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	10 กรัม

เติมน้ำ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร SOB

Bacto tryptone	20 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	0.5 กรัม

เติมน้ำ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร SOC

เติมน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB และผสมให้เข้ากัน

4. อาหาร Basal medium สำหรับการทดสอบความเป็นฟรีไบโอติกส์

4.1 อาหาร Nutrient broth (NB)

ละลายอาหาร NB (Merck, Germany) สำเร็จรูป 8 กรัมในน้ำ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.2 อาหาร MRS ที่ปราศจากน้ำตาล (ดัดแปลงจาก Pan *et al.*, 2008)

Beef extract	10 กรัม
Peptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
K_2HPO_4	2 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 กรัม
Sodium acetate	5 กรัม
di-ammonium citrate	1.7 กรัม
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.05 กรัม
Tween 80	1 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหาร MRS

ชั่งอาหาร MRS (Difco, USA) 55 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



1. บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดจีโนมกดีเอ็นเอ

1.1 SET บัฟเฟอร์

ประกอบด้วย ซูโครส 20%

สารละลาย Tris-HCl (pH 7.6) 50 มิลลิโมลาร์

สารละลาย EDTA (pH 8) 50 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายดังนี้

ซูโครส 25% 40 มิลลิลิตร

Tris-HCl (pH 7.6) 1 โมลาร์ 2.5 มิลลิลิตร

EDTA (pH 8) 0.5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร

ผสมสารแต่ละชนิดให้เข้ากันในขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

1.2 Tris-HCl (pH 7.6) 1 โมลาร์

ละลาย Tris base 12.1 กรัมในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นประมาณ 6 มิลลิลิตรละลายให้เข้ากัน ปรับพีเอชเป็น 7.6 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 EDTA (pH 8) 0.5 โมลาร์

ละลาย disodium ethylene tetraacetate (EDTA) 18.61 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 น้ำตาลซูโครส 25%

ละลายซูโครส 25 กรัมในน้ำ 80 มิลลิลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 สารละลาย SDS 25%

ละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) 25 กรัมในน้ำ 80 มิลลิลิตร ค่อยๆ ให้ความร้อนเพื่อช่วยในการละลาย จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.6 สารละลาย Lysozyme

ชั่ง lysozyme ผงและละลายในบัฟเฟอร์ TE ให้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkaline extraction

2.1 สารละลาย TEG

ประกอบด้วย	Tris-HCl (pH 8.0)	25 มิลลิโมลาร์
	EDTA	10 มิลลิโมลาร์
	กลูโคส	50 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายดังนี้

Tris-HCl (pH 8.0) 1 โมลาร์	25 มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์	2 มิลลิลิตร
กลูโคส 1 โมลาร์	5 มิลลิลิตร

ผสมสารแต่ละชนิดให้เข้ากันในขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.2 สารละลายไลซีส

ประกอบด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอมล
สารละลาย SDS 1%

เตรียมสารละลายดังนี้

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มัล	2 มิลลิลิตร
สารละลาย SDS 20%	5 มิลลิลิตร

ผสมสารแต่ละชนิดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนั่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3 TE บัฟเฟอร์

ประกอบด้วย Tris-HCl (pH 7.6)	10 มิลลิโมลาร์
EDTA (pH 8.0)	1 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายดังนี้

Tris-HCl (pH 7.6) 1 โมลาร์	1 มิลลิลิตร
EDTA (pH 8.0) 0.5 โมลาร์	0.2 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร และนำไปนั่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 230, 260 และ 280 นาโนเมตรของดีเอ็นเอที่สกัดได้เพื่อวิเคราะห์การปนเปื้อนของโปรตีนและสารละลายฟีนอล วิเคราะห์เป็นค่าอัตราส่วน A260/A280 ซึ่งควรมีค่ามากกว่า 1.8 และอัตราส่วน A260/A230 ควรมีค่ามากกว่า 1.5 และสามารถคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution}$$

(A260 1 หน่วย มีค่าเท่ากับเมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

4. การคำนวณ ligation

4.1 การคำนวณปริมาณพลาสมิดและจีโนมิกดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำนาการยีน

4.1.1 ปริมาณพลาสมิด pUC19

1 พิโคโมลของพลาสมิด pUC19 (2.69 กิโลเบส) = 1.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

10 พิโคโมลของพลาสมิด pUC19 (2.69 กิโลเบส) = 17.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปริมาตร 1000 ไมโครลิตร มีพลาสมิด pUC19 10 พิโคโมล = 17.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีพลาสมิด pUC19 10 พิโคโมล = 0.178 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องใช้พลาสมิด pUC19 ปริมาณ 178 นาโนกรัม (10 พิโคโมล) ในการเชื่อมต่อ

4.1.2 ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดแบบไม่สมบูรณ์ขนาด 3-7 กิโลเบส

ใช้ค่าเฉลี่ยของขนาดจีโนมิกดีเอ็นเอในการคำนวณ

1 พิโคโมลของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดไม่สมบูรณ์ (3-7 กิโลเบส) = 3.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

10 พิโคโมลของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดไม่สมบูรณ์ (3-7 กิโลเบส) = 33 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปริมาตร 1000 ไมโครลิตร มีดีเอ็นเอ (3-7 กิโลเบส) 10 พิโคโมล = 33 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีดีเอ็นเอ (3-7 กิโลเบส) 10 พิโคโมล = 0.33 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดไม่สมบูรณ์ (3-7 กิโลเบส) ปริมาณ 330 นาโนกรัม (10 พิโคโมล) ในการเชื่อมต่อ แปรผันอัตราส่วนระหว่างจีโนมิกดีเอ็นเอขนาด 3-7 กิโลเบส ต่อพลาสมิด pUC19 เป็น 1:3, 3:1 และ 1:1 โดยมีปฏิกิริยาแสดงดังตารางผนวกที่ ข1

ตารางผนวกที่ ข1 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา ligation ในการทำธนาคารยีน

อัตราส่วนระหว่างจีโนมิกดีเอ็นเอ (3-7 กิโลเบส) ต่อ พลาสมิด pUC19			
อัตราส่วน	1:3	3:1	1:1
ปริมาณดีเอ็นเอ (พิโคโมล)	10 : 30	30 : 10	10 : 10
ปริมาณดีเอ็นเอ (นาโนกรัม)	330 : 534	990 : 178	330 : 178
ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)			
น้ำ	1.7	-	4.5
10x ligation buffer	1	1	1
จีโนมิกดีเอ็นเอ (3-7 กิโลเบส)	2.5	7	2.5
พลาสมิด pUC19	4.3	1.5	1.5
เอนไซม์ T4 DNA ligase	0.5	0.5	0.5
รวม	10	10	10

4.2 การคำนวณปริมาณพลาสมิด pFlag-CTS และยีน *kman-2* สำหรับการสับโคลน

4.2.1 ปริมาณพลาสมิด pFlag-CTS

1 พิโคโมลของพลาสมิด pFlag-CTS (5.4 กิโลเบส) = 3.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3 พิโคโมลของพลาสมิด pFlag-CTS (5.4 กิโลเบส) = 10.68 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปริมาตร 1000 ไมโครลิตร มีพลาสมิด pFlag-CTS 3 พิโคโมล = 10.68 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีพลาสมิด pFlag-CTS 3 พิโคโมล = 0.1068 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องใช้พลาสมิด pFlag-CTS ปริมาณ 106.8 นาโนกรัม (3 พิโคโมล) ในการเชื่อมต่อ

4.2.2 ปริมาณยีน *kman-2*

1 พิโคโมลของยีน *kman-2* (1.164 กิโลเบส) = 0.77 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

9 พิโคโมลของพลาสมิด *kman-2* (1.164 กิโลเบส) = 6.93 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปริมาตร 1000 ไมโครลิตร มีชิ้น *kman-2* 9 พิโคโมล = 6.93 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีชิ้น *kman-2* 9 พิโคโมล = 0.0693 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ชิ้น *kman-2* ปริมาณ 69.3 นาโนกรัม (9 พิโคโมล) ในการเชื่อมต่อ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอต่อพลาสมิดเวกเตอร์ 3:1 มีปฏิกิริยาแสดงดังตารางผนวกที่ ข2

ตารางผนวกที่ ข2 ส่วนประกอบในปฏิกิริยา ligation ระหว่างชิ้นแมนนาเนสกับ pFlag-CTS

อัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอต่อพลาสมิดเวกเตอร์	
	3:1
ปริมาณดีเอ็นเอ (พิโคโมล)	9 : 3
ปริมาณดีเอ็นเอ (นาโนกรัม)	69.3 : 106.8
ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)	
น้ำ	4.3
10x ligation buffer	1
จีโนมิกดีเอ็นเอ (3-7 กิโลเบส)	1.2
พลาสมิด pFlag-CTS	3
เอนไซม์ T4 DNA ligase	0.5
รวม	10

5. การเปลี่ยนน้ำหนักโมเลกุลของแมนนาเนสเป็นกิโลเบส

สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{กิโลเบส} = \frac{\text{น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)}}{110} \times 3$$

เอนไซม์แมนนาเนสจาก *Klebsiella oxytoca* CW2-3 มีขนาด 165 กิโลดาลตัน (Titapoka *et al.*, 2008) ดังนั้น

$$\text{ขนาดของยีนแมนนาเนส (กิโลเบส)} = \frac{165 \times 3}{110}$$

$$\text{ดังนั้น ยีนแมนนาเนสมีขนาด} = 4.5 \text{ กิโลเบส}$$

6. การวัดขนาดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

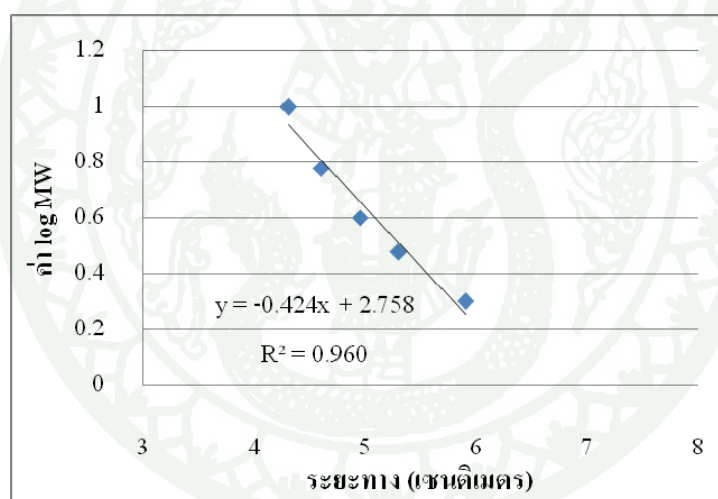
6.1 วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐานจากกึ่งกลางเวลถึงกึ่งกลางแถบดีเอ็นเอ

6.2 เปลี่ยนค่าขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานจากกิโลเบสเป็นค่า log กิโลเบส

6.3 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอมาตรฐานกับ log กิโลเบส

(ภาพผนวกที่ ข1)

6.4 วัดระยะทางของดีเอ็นเอตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส

7. บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์แมนนาเนสจากส่วน periplasm และ cytoplasm

7.1 Spheroplast buffer

ประกอบด้วย ซูโครส 0.5 มิลลิโมลาร์

Tris-HCl (pH 8) 100 มิลลิโมลาร์

EDTA (pH 8) 0.5 มิลลิโมลาร์

PMSF 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายดังนี้

ซูโครส 1 โมลาร์	0.1 มิลลิลิตร
Tris-HCl (pH 8) 1 โมลาร์	20 มิลลิลิตร
EDTA (pH 8) 0.5 โมลาร์	0.2 มิลลิลิตร
PMSF 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำที่กำจัดไออนและฆ่าเชื้อแล้วเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.2 Lysis buffer

ประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8)	50 มิลลิโมลาร์
EDTA (pH 8)	0.5 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายดังนี้

Tris-HCl (pH 8.0) 1 โมลาร์	5 มิลลิลิตร
EDTA (pH 8) 0.5 โมลาร์	0.1 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำที่กำจัดไออนออกแล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีนออกจากอะครีลาไมด์เจล (elution buffer)

ประกอบด้วย	Tris-HCl (pH 8)	50 มิลลิโมลาร์
	NaCl	150 มิลลิโมลาร์
	EDTA (pH 8)	0.1 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายดังนี้

Tris-HCl (pH 8.0) 1 โมลาร์	5 มิลลิลิตร
----------------------------	-------------

EDTA (pH 8) 0.5 โมลาร์	0.02 มิลลิลิตร
NaCl 1 โมลาร์	15 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับพีเอช 7.5 และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำที่กำจัดไอออนออกแล้ว นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

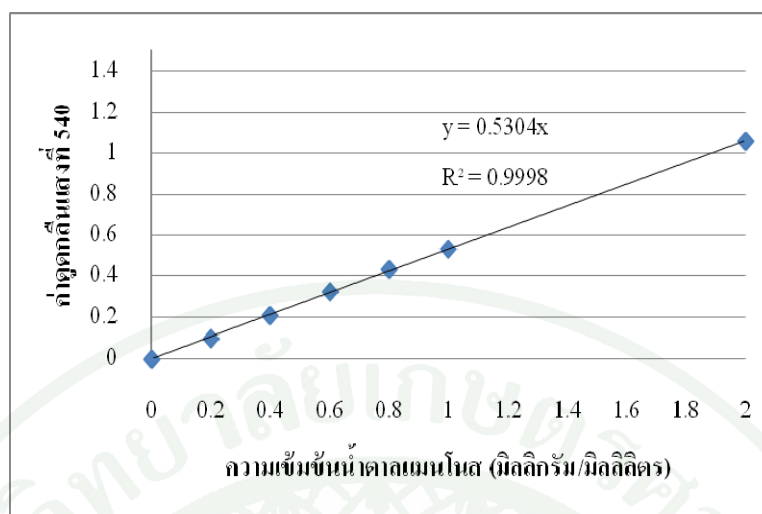
9. สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสและการวิเคราะห์

9.1 สารละลาย DNS

ชั่ง dinitrosalicylic acid 20 กรัมละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตรจนละลาย ค่อยๆ เติมสารละลาย NaOH (30 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร) จนให้เข้ากัน นำไปอังบนอ่างน้ำร้อน ค่อยๆ เติม potassium sodium tartate 600 กรัมลงไป จนกระทั่งสารละลายใส ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2000 มิลลิลิตร

9.2 สารละลายมาตรฐานน้ำตาลแมนโนสและกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำตาลแมนโนสที่ความเข้มข้น 0.2-2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS โดยให้มีปฏิกิริยาดังนี้ เติมน้ำตาลแมนโนสความเข้มข้น 0.2-2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรปริมาตร 200 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย DNS 200 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แช่เย็น 5 นาที เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรและน้ำตาลแมนโนสความเข้มข้นต่างๆ (ภาพผนวกที่ ข2)



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส

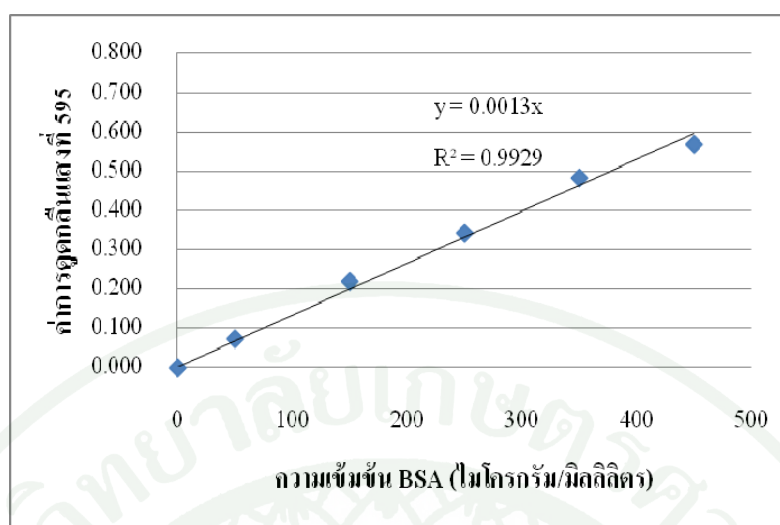
10. สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีน

10.1 สารละลาย Bradford

เจือจาง dye reagent concentrate (Bio-Rad) 5 เท่าด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว

10.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSAและกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 50-450 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรกับ dye reagent concentrate (Bio-Rad) ที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกันและตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรและสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาพผนวกที่ ข3)



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐาน BSA

11. บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำแอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA purification system (Invitrogen)

11.1 5x native purification buffer (pH 8)

ประกอบด้วย โซเดียมฟอสเฟต (monobasic)	250 มิลลิโมลาร์
NaCl	2.5 โมลาร์

ชั่งโซเดียมฟอสเฟต (monobasic) 7.8 กรัม และ NaCl 29.2 กรัม เติมน้ำที่กำจัดไอออนออกแล้วประมาณ 100 มิลลิลิตร ปรับเป็นพีเอช 8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

11.2 Binding buffer (pH 8)

เจือจาง 5x Native purification buffer (pH 8) ให้เป็น 1x Native purification buffer ปรับเป็นพีเอช 8 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือไฮโดรคลอริก

11.3 Wash buffer (pH 8) + Imidazole 20 มิลลิโมลาร์

1x Native purification buffer (pH 8)	50 มิลลิลิตร
Imidazole (pH 6) 3 โมลาร์	335 ไมโครลิตร

ปรับเป็นพีเอช 8 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือไฮโดรคลอริก

11.4 Elution buffer (pH 8) + Imidazole 250 มิลลิโมลาร์

1x Native purification buffer (pH 8)	13.75 มิลลิลิตร
Imidazole (pH 6) 3 โมลาร์	1.25 มิลลิลิตร

ปรับเป็นพีเอช 8 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือไฮโดรคลอริก

12. บัฟเฟอร์สำหรับอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและการเตรียมเจล

12.1 บัฟเฟอร์สำหรับการทำอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

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

Acrylamide	29.2 กรัม
N'N'-bis-methylene- acrylamid	0.8 กรัม

เติมน้ำที่กำจัดไอออนออกแล้ว 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด

12.1.2 Tris-HCl (pH 8.8) 1.5 โมลาร์

Tris-base	18.15 กรัม
น้ำที่กำจัดไอออนออกแล้ว	60 มิลลิลิตร

ปรับเป็นพีเอช 8.8 ด้วย HCl 6 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำที่
กำจัดไอออนออกแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12.1.3 Tris-HCl (pH 6.8) 0.5 โมลาร์

Tris-base	6 กรัม
น้ำที่กำจัดไอออนออกแล้ว	60 มิลลิลิตร

ปรับเป็นพีเอช 6.8 ด้วย HCl 6 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำที่
กำจัดไอออนออกแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12.1.4 SDS 10%

ละลาย SDS 10 กรัมในน้ำ 90 มิลลิลิตร กวนเบาๆ และปรับปริมาตรเป็น 100
มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

12.1.5 5x running buffer

Tris-base	9 กรัม
Glycine	43.2 กรัม
SDS	3 กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 600 มิลลิลิตรด้วยน้ำที่กำจัดไอออนออกแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4
องศาเซลเซียส (ถ้าตกตะกอนให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้) เจือจาง 5 เท่าก่อนใช้ ใช้ได้เพียง 10
ครั้ง

12.1.6 Sample buffer (5x loading dye)

ส่วนประกอบของ sample buffer แสดงดังตารางผนวกที่ ข3

ตารางผนวกที่ ข3 ส่วนประกอบของ sample buffer

ส่วนประกอบ	Denaturing (มิลลิลิตร)	Non-denaturing (มิลลิลิตร)
น้ำที่กำจัดไอออนออกแล้ว	1.9	2.1
Tris-HCl (pH 6.8) 0.5 โมลาร์	0.5	0.5
กลีเซอรอล	0.4	0.4
SDS 10%	0.8	0.8
β -mercaptoethanol	0.2	-
Bromophenol blue 1%	0.2	0.2
รวม	4	4

แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

12.2 การเตรียม separation และ stacking gel

ผสม separation gel และ stacking gel ตามส่วนประกอบแสดงดังตารางผนวกที่ ข4 โดยยังไม่เติม TEMED และ ammonium persulfate ค่อยๆ ผสมกันด้วย magnetic stirrer อย่าให้เกิดฟอง นำไปกำจัดฟองอากาศในสารละลาย (degas) ด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที ผสม TEMED และ ammonium persulfate ลงใน separating gel คนเบาๆ เติมเจลลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกที่ใช้ทำอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เท isopropanol ปิดหน้าเจล ทิ้งให้เจลแข็งประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจาก separating gel แข็ง เท isopropanol ออกจนหมดและซับให้แห้ง ผสม TEMED และ ammonium persulfate ลงใน stacking gel คนเบาๆ ให้เข้ากันและเทลงบน separation gel ใส่หัวสำหรับทำช่องเติมตัวอย่าง (well) ทิ้งให้เจลแข็งอีกประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นประกอบเข้ากับเครื่องทำอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางผนวกที่ ข4 ส่วนประกอบของ separation และ stacking gel

ส่วนประกอบ	Separation gel (12%) (มิลลิลิตร)	Stacking gel (4%) (มิลลิลิตร)	Substrate gel (7.5%) (มิลลิลิตร)
น้ำที่กำจัดไอออนออกแล้ว หรือสับเซตรท	3.35	3.05	2.475 ¹
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) หรือ 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5	1.25 ²	1.25
10% SDS	0.1	0.05	0.05
30% Acrylamide/Bis	4	0.665	1.25
TEMED ³	0.005	0.0025	0.0025
10% Ammonium persulfate ⁴	0.1	0.05	0.05
รวม	10	5	5

หมายเหตุ 1; ใช้สับเซตรทโลคัสป็นกัม1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแทนน้ำ

2; ใน stacking gel ใช้บัฟเฟอร์ 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

3,4; เติมน้ำที่ก่อนใช้

13. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

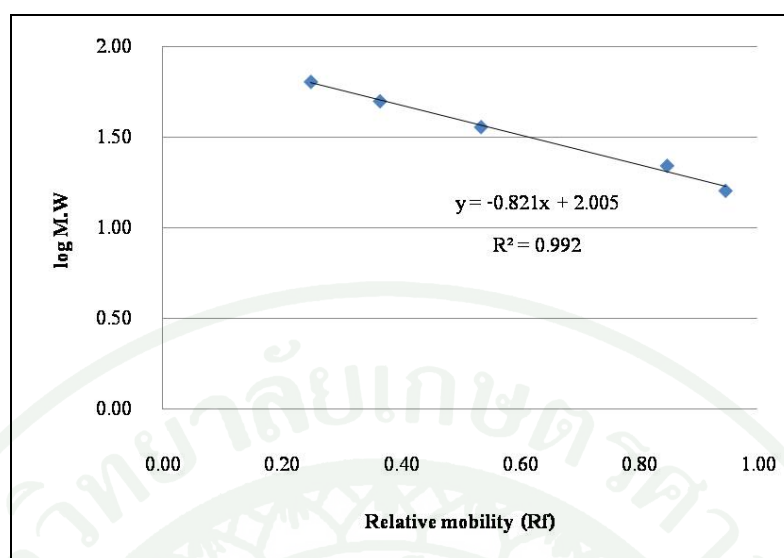
13.1 วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ dye front

13.2 วัดระยะทางการเคลื่อนที่จากขอบเวลจนถึงกึ่งกลางแบนของแต่ละโปรตีนมาตรฐาน

13.3 เปลี่ยนค่าน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแบนโปรตีนมาตรฐานจากกิโวลตตันเป็นค่า log
กิโวลตตัน

13.4 คำนวณค่า Relative mobility ($R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ dye front}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน}}$)

13.5 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log กิโวลตตันของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_f (ภาพ
ผนวกที่ ข4)



ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน SeeBlue® Plus2 prestained standard

14. บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดสอบฟิโอสที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์

14.1 ซิเตรทบัฟเฟอร์ (ฟิโอส 3-6)

เตรียมสารละลาย A: citric acid 0.1 โมลาร์

สารละลาย B: sodium citrate 0.1 โมลาร์

ผสมสารละลาย A และ B ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ตารางผนวกที่ ข5) เจือจางให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์

ตารางผนวกที่ ข5 การเตรียมซิเตรทบัฟเฟอร์

ฟิโอส	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
3	46.5	3.5
4	30	20
5	20.5	29.5
6	5.5	44.5

14.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-8)

เตรียมสารละลาย A: monobasic sodium phosphate	0.2 โมลาร์
สารละลาย B: dibasic sodium phosphate	0.2 โมลาร์

ผสมสารละลาย A และ B ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ตารางผนวกที่ ข6) เจือจางให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเจือจางอีก 2 เท่าให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์

ตารางผนวกที่ ข6 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
6	81	19
7	39	61
8	5.3	94.7

14.3 ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (พีเอช 8-10)

เตรียมสารละลาย A: ไกลซีน	0.2 โมลาร์
สารละลาย B: โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.2 โมลาร์

สารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยสารละลาย B (ตารางผนวกที่ ข7) เจือจางให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์

ตารางผนวกที่ ข7 การเตรียมไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
8	50	1.5
9	50	8.8
10	50	32



ตารางผนวกที่ ค1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเมมbranในแต่ละส่วนของเซลล์ที่เวลาต่างๆ

เวลา	Extracellular	Periplasm	Cytoplasm
0	0.04±0.017	0.01±0.003	0.01±0.001
2	0.09±0.032	0.19±0.014	0.07±0.004
4	0.12±0.011	0.26±0.063	0.11±0.003
6	0.10±0.022	0.23±0.008	0.12±0.003
8	0.08±0.035	0.52±0.120	0.13±0.003
10	0.09±0.002	0.27±0.034	0.14±0.010
20 (ข้ามคืน)	0.09±0.032	0.39±0.044	0.15±0.005

ตารางผนวกที่ ค2 ค่า Rf ของการเคลื่อนที่ของโพลิโกแซคคาไรด์มาตรฐาน M1-M6 บนตัวทำละลาย A, B, C, D, E และ F

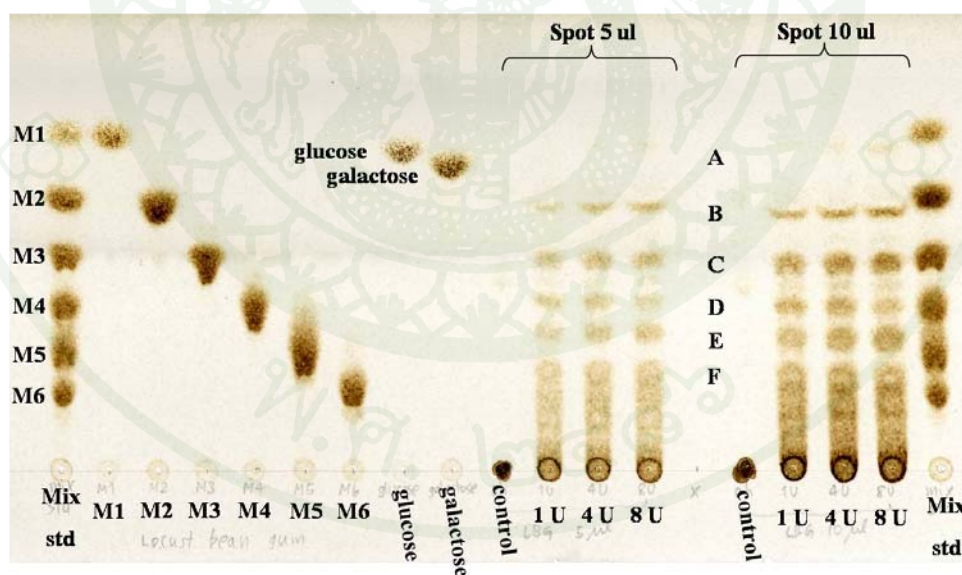
โพลิโกแซคคาไรด์มาตรฐาน	ระบบตัวทำละลาย											
	A		B		C		D		E		F	
	เดี่ยว	ผสม	เดี่ยว	ผสม	เดี่ยว	ผสม	เดี่ยว	ผสม	เดี่ยว	ผสม	เดี่ยว	ผสม
M1	0.71	-	0.53	0.52	0.25	0.23	0.61	0.58	0.07	0.05	-	-
M2	0.59	-	0.39	0.40	0.07	0.08	0.22	-	0.00	0.00	-	-
M3	0.31	-	0.29	0.29	0.00	0.00	0.09	-	0.00	0.00	-	-
M4	0.18	-	0.21	0.20	0.00	0.00	0.05	-	0.00	0.00	-	-
M5	0.11	-	0.14	0.12	0.00	0.00	0.03	-	0.00	0.00	-	-
M6	0.08	-	0.08	0.08	0.00	0.00	0.02	-	0.00	0.00	-	-

หมายเหตุ “-” คือไม่สามารถระบุได้

ตารางผนวกที่ ค3 ค่า Rf ของการเคลื่อนที่ของโพลิโกแซคคาไรด์มาตรฐาน M1-M6 บนตัวทำละลาย 1-butanol : acetic acid : น้ำ โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนที่ใช้

โพลิโกแซคคาไรด์มาตรฐาน	ระบบตัวทำละลาย					
	A		B		C	
	เดี่ยว	ผสม	เดี่ยว	ผสม	เดี่ยว	ผสม
M1	-	-	-	-	0.70 ± 0.01^f	0.71 ± 0.01^f
M2	-	-	-	-	0.54 ± 0.01^e	0.55 ± 0.01^e
M3	-	-	-	-	0.42 ± 0.01^d	0.43 ± 0.01^d
M4	0.09	-	0.48	-	0.32 ± 0.01^c	0.32 ± 0.00^c
M5	0.04	-	0.42	0.42	0.23 ± 0.00^b	0.23 ± 0.01^b
M6	0.00	-	0.36	0.36	0.16 ± 0.01^a	0.15 ± 0.00^a

หมายเหตุ ^{a-f} ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$); “-” คือไม่สามารถระบุได้



ภาพผนวกที่ ค1 โครมาโตแกรมของโพลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยสับสเตรทโลคัสปีนัม วิเคราะห์โดยวิธี TLC

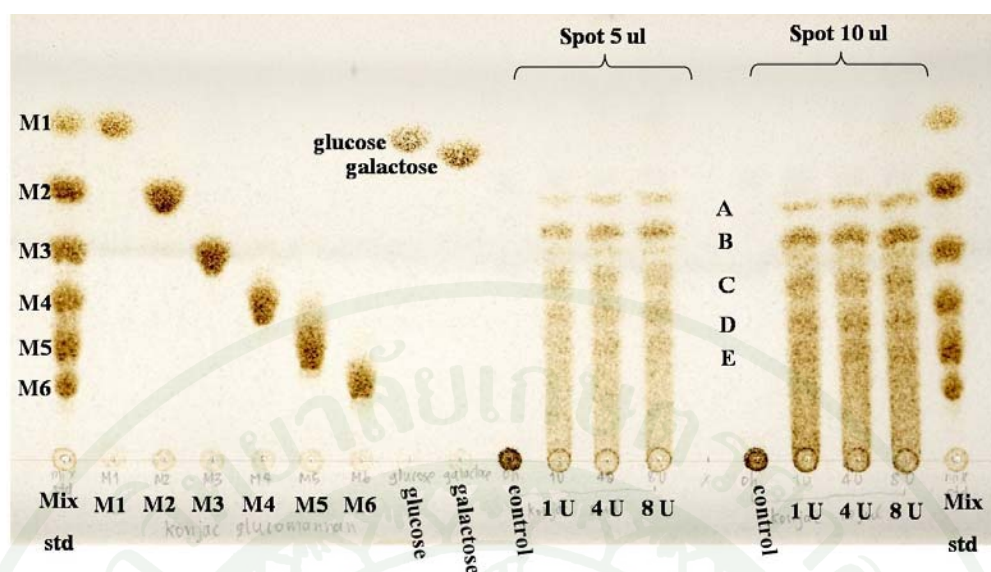
จากภาพผนวกที่ ค1 วัดค่า Rf ของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดังแสดงในตารางผนวกที่ ค4

ตารางผนวกที่ ค4 ค่า Rf ของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทโกลักส บีนกัมบนแผ่นซีลิกาเจล

Standard	ค่า Rf			Products	ค่า Rf (5 ไมโครลิตร)			ค่า Rf (10 ไมโครลิตร)		
	ผสม	เดี่ยว	Spots		1 ยูนิต	4 ยูนิต	8 ยูนิต	1 ยูนิต	4 ยูนิต	8 ยูนิต
M1	0.73	0.72	A		-	-	0.69	-	0.70	0.68
M2	0.59	0.57	B	M2	0.57	0.57	0.57	0.55	0.55	0.55
M3	0.47	0.47	C	M3	0.47	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
M4	0.36	0.36	D	M4	0.37	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
M5	0.27	0.27	E	M4-M5	0.31	0.29	0.29	0.29	0.29	0.28
M6	0.17	0.19	F	M5-M6	0.21	0.21	0.21	0.20	0.20	0.20
Glucose	-	0.69								
Galactose	-	0.66								

หาค่า Rf ของแต่ละจุดของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นเทียบกับโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลมาตรฐานโดยวัดระยะทางจากจุดที่หยดตัวอย่างจนถึงเส้นบนสุดของตัวทำละลาย (solvent travel) และวัดระยะทางจากจุดที่หยดตัวอย่างจนถึงแต่ละจุดของตัวอย่างบนแผ่นซีลิกา (spots travel)

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางของ spot จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางของตัวทำละลายจากจุดเริ่มต้น}}$$



ภาพผนวกที่ ค2 โครมาโตแกรมของโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยสับสเตรทคอนยัคกลูโคแมน
แน่ววิเคราะห์โดยวิธี TLC

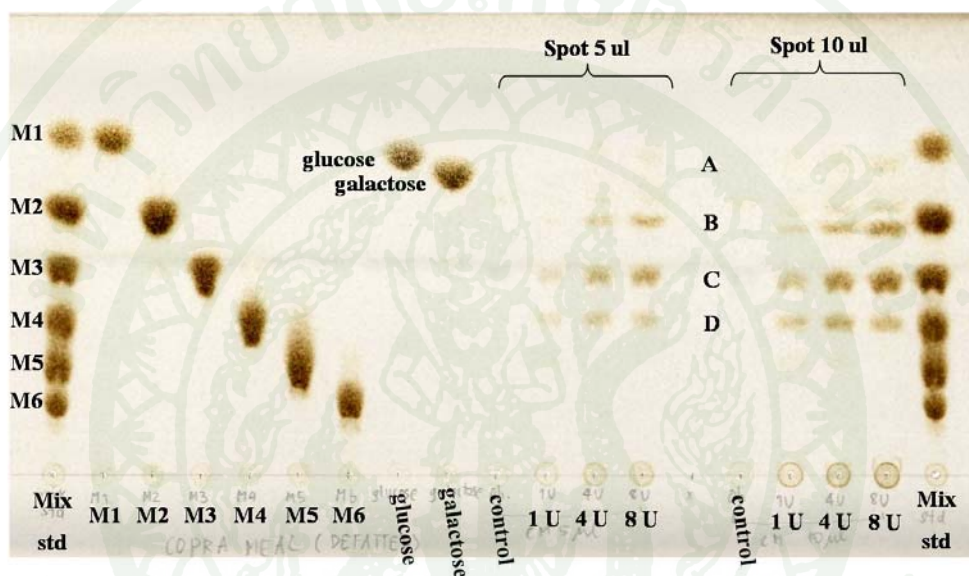
จากภาพผนวกที่ ค2 วัดค่า Rf ของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดังแสดงในตาราง
ผนวกที่ ค5

ตารางผนวกที่ ค5 ค่า Rf ของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรท
คอนยัคกลูโคแมนบนแผ่นซิลิกาเจล

Standard	ค่า Rf		Spots	Products	ค่า Rf (5 ไมโครลิตร)			ค่า Rf (10 ไมโครลิตร)		
	ผสม	เดี่ยว			1 ยูนิต	4 ยูนิต	8 ยูนิต	1 ยูนิต	4 ยูนิต	8 ยูนิต
M1	0.72	0.71	A	M2	0.57	0.56	0.57	0.55	0.56	0.56
M2	0.57	0.57	B	M2-M3	0.49	0.49	0.49	0.48	0.48	0.48
M3	0.44	0.44	C	M3-M4	0.40	0.40	0.40	0.38	0.38	0.39
M4	0.35	0.35	D	M4-M5	0.32	0.32	0.32	0.30	0.30	0.30
M5	0.24	0.25	E	M5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.24	0.24
M6	0.16	0.17								
Glucose	-	0.69								
Galactose	-	0.65								

หาค่า Rf ของแต่ละจุดของโกลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นเทียบกับโกลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลมาตรฐานโดยวัดระยะทางจากจุดที่หยดตัวอย่างจนถึงเส้นบนสุดของตัวทำละลาย (solvent travel) และวัดระยะทางจากจุดที่หยดตัวอย่างจนถึงแต่ละจุดของตัวอย่างบนแผ่นซิลิกา (spots travel)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางของ spot จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางของตัวทำละลายจากจุดเริ่มต้น}}$$



ภาพผนวกที่ ค3 โครมาโตแกรมของโกลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยสับเสตรทากมะพร้าวที่สกัดไขมันแล้ว วิเคราะห์โดยวิธี TLC

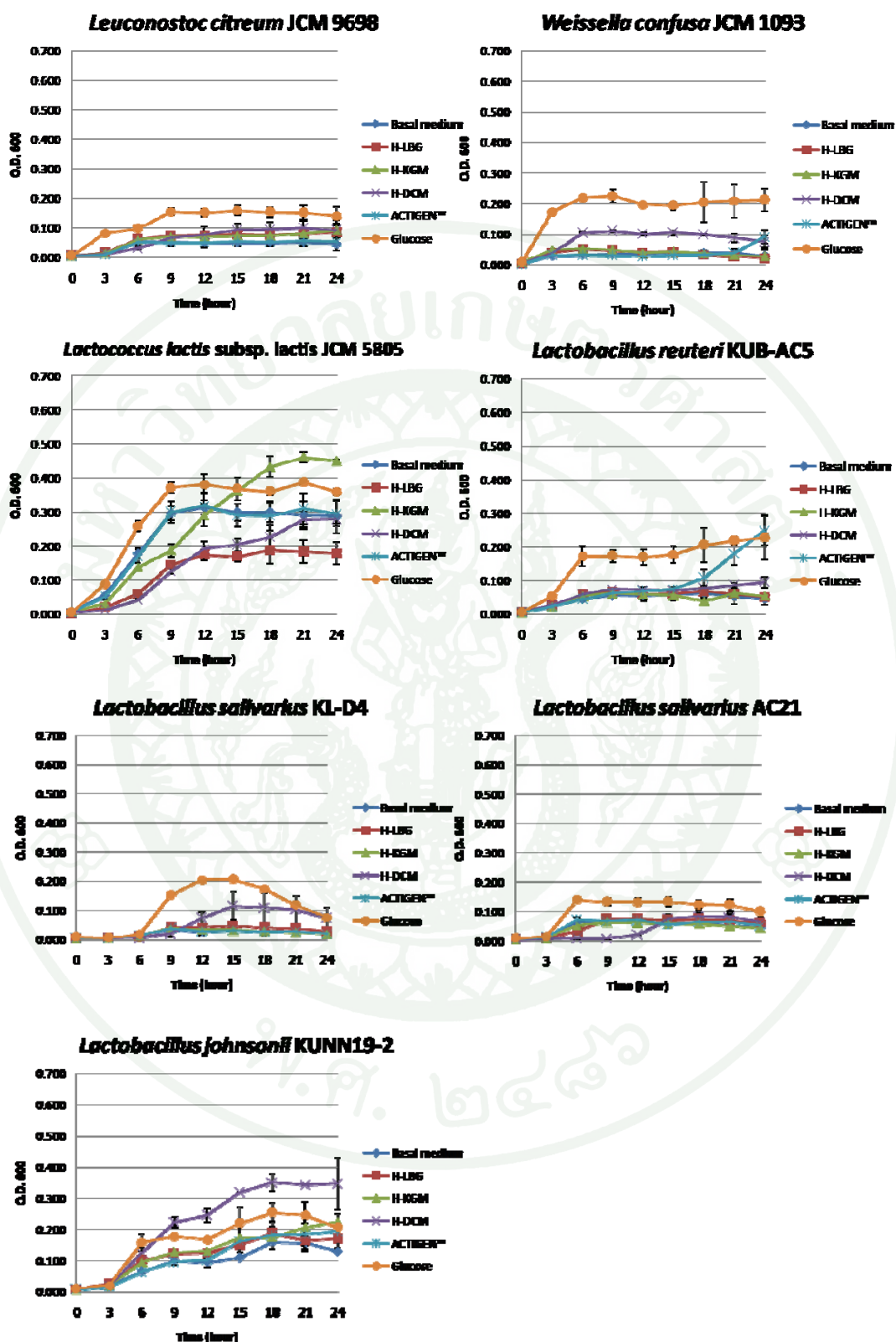
จากภาพผนวกที่ ค3 วัดค่า Rf ของการเคลื่อนที่ของโกลิโกแซคคาไรด์ได้ดังแสดงในตารางผนวกที่ ค6

ตารางผนวกที่ ๓6 ค่า Rf ของการเคลื่อนที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยสับเสตรทากมะพร้าวที่สกัดไขมันออกแล้วบนแผ่นซีลิกาเจล

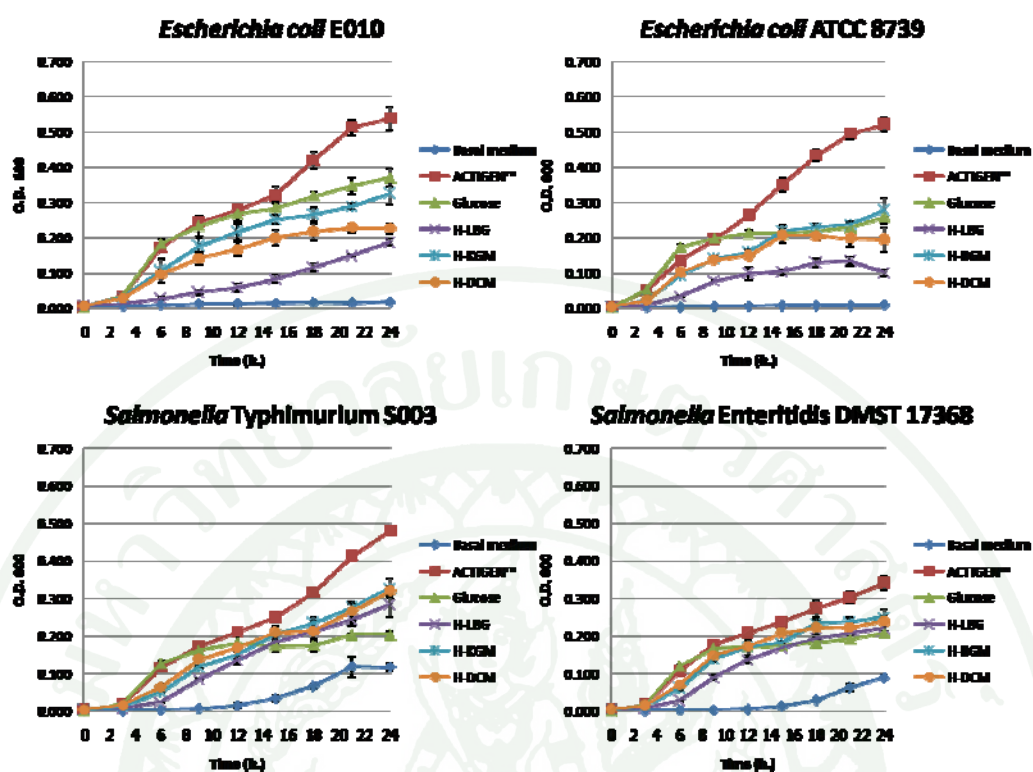
Standard	ค่า Rf		Spots	Products	ค่า Rf (5 ไมโครลิตร)			ค่า Rf (10 ไมโครลิตร)		
	ผสม	เดี่ยว			1 หน่วย	4 หน่วย	8 หน่วย	1 หน่วย	4 หน่วย	8 หน่วย
M1	0.71	0.71	A		-	-	0.59	-	0.68	0.68
M2	0.56	0.55	B	M2	0.55	0.55	0.55	0.53	0.54	0.53
M3	0.44	0.43	C	M3	0.43	0.43	0.43	0.42	0.42	0.42
M4	0.32	0.33	D	M4	0.33	0.33	0.33	0.34	0.33	0.33
M5	0.24	0.23								
M6	0.15	0.16								
Glucose	-	0.69								
Galactose	-	0.64								

หาค่า Rf ของแต่ละจุดของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นเทียบกับโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลมาตรฐานโดยวัดระยะทางจากจุดที่หยดตัวอย่างจนถึงเส้นบนสุดของตัวทำละลาย (solvent travel) และวัดระยะทางจากจุดที่หยดตัวอย่างจนถึงแต่ละจุดของตัวอย่างบนแผ่นซีลิกา (spots travel)

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางของ spot จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางของตัวทำละลายจากจุดเริ่มต้น}}$$



ภาพผนวกที่ ค4 กราฟการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก



ภาพผนวกที่ ค5 กราฟการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	น.ศ. นวพรรณ พงษ์พิพัฒน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	4 กุมภาพันธ์ 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	—
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	—
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	นำเสนอผลงานวิจัยเรื่อง Optimization of thin layer chromatography analysis of mannooligosaccharide derived from plant hydrolysate ที่งาน International Conference on Beneficial Microbes (ICOBM 2014) ที่ประเทศมาเลเซีย
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา