

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