

53401204 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : แก่นตะวัน/ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ /ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสลูกผสม

จุฬามาศ ทรัพย์มาก : การโคลนยีนเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลูกผสม. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา, ผศ.ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และ ผศ.ดร.พิทยา หลิวเสรี. 93 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ได้โคลนสายดีเอ็นเอคู่สมที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของแก่นตะวันหรือเจรูชาเล็ม อาร์ทิโชค (*Helianthus tuberosus* L.) โดยยีน *I-sst* และ *I-fft* ที่กำหนดรหัสเป็นเอนไซม์ 1-sucrose: sucrose fructosyl transferase (1-SST, EC: 2.4.1.99) และ 1-fructan: fructan fructosyl transferase (1-FFT, EC: 2.4.1.100) ตามลำดับ ได้ถูกโคลนออกมาจากหัว สะสมอาหารของแก่นตะวันอายุ 105 วันด้วยวิธี RT-PCR และจากการวิเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่สมที่โคลน ได้พบว่า มีความเหมือนกับยีน *I-sst* (accession no. AJ009757.1) และ *I-fft* (accession no. AJ009756.1) ของ *Helianthus tuberosus* 99% และ 95- 99% ตามลำดับ จากนั้นได้มีการเชื่อมสายดีเอ็นเอคู่สมของยีน *I-sst* ที่โคลนได้และมีการเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเข้ากับพลาสมิด pPICZαA เพื่อให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* X-33 เมื่อนำยีสต์ลูกผสมจำนวน 2 โคโลนีที่เจริญบน อาหาร YPD ที่เติมซอร์บิทอลและยาปฏิชีวนะซีโอซินไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่โคลนได้พบว่า มีการแสดงออกของยีน *I-sst* ใน *Pichia pastoris* X-33 โดยพบการสังเคราะห์ FOS (1- kestose (GF2) and nystose (GF3)) อันเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ลูกผสมที่ได้และเอนไซม์ดังกล่าวยังสามารถ หลั่งออกภายนอกเซลล์ยีสต์ได้ด้วย ยีสต์ *Pichia pastoris* X-33 ที่มีพลาสมิด pPICZα_ *I-sst*_56 และ pPICZα_ *I-sst*_69 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลูกผสมที่หลั่งออกนอกเซลล์เท่ากับ 0.051 และ 0.048 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ การหายไปของแถบโปรตีนลูกผสมที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้ คอลัมน์ His tag บน SDS PAGE แสดงให้เห็นว่า polyhistidine (6xHis) tag ไม่ได้ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และจากการศึกษาการสังเคราะห์ FOS ด้วยเอนไซม์ลูกผสมที่หลั่งออกนอกเซลล์พบว่า สามารถสังเคราะห์ 1- kestose (GF2) ได้ภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากการบ่มเอนไซม์ลูกผสมกับน้ำตาลซูโครส 0.46 โมลาร์ที่ใช้ เป็นสับเตรท อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มเป็นเวลานานขึ้นจะพบการสังเคราะห์ nystose (GF3) ด้วย

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.

53401204 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : KAENTAWAN, FRUCTOOLIGOSACCHARIDES, RECOMBINANT FRUCTOSYLTRANSFERASE

JUTAMAT SAPMAK : CLONING OF FRUCTOSYLTRANSFERASE GENE FROM JERUSALEM ARTICHOKE (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) AND ACTIVITY ANALYSIS OF RECOMBINANT ENZYME. THESIS ADVISORS : ASST.PROF. BUDSARAPORN NGAMPANYA, Ph.D., ASST.PROF. PHIMCHANOK JATURAPIREE, Ph.D. AND ASST.PROF. PITTAYA LIEWSEREE, Ph.D. 93 pp.

Cloning of cDNAs corresponding to enzymes involved in fructo-oligosaccharides (FOS) synthesis of Kaentawan or Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) was investigated in this research. The *1-sst* and *1-fft* genes encoding for 1-sucrose: sucrose fructosyltransferase (1-SST, EC: 2.4.1.99) and 1-fructan: fructan fructosyltransferase (1-FFT, EC: 2.4.1.100) respectively were cloned from 105 days old tuber of Kaentawan by RT-PCR. The cloned cDNA sequences showed 99% and 95-99% identities to *Helianthus tuberosus 1-sst* (accession no. AJ009757.1) and *1-fft* gene (accession no. AJ009756.1), respectively. The *1-sst* gene was modified by adding the restriction sites for *EcoRI* and *SacII* in order to subclone into pPICZ α vector for further expressed in *Pichia pastoris* X-33. Two yeast transformants grown on YPD medium containing sorbitol and zeocin were selected and analyzed for gene expression. The cDNA showed the expression in *P. pastoris* X-33 by synthesis of FOS (1-kestose (GF2) and nystose (GF3)). Moreover, the 1-SST recombinant enzyme was also secreted into medium. The specific activities of 1-SST recombinant enzyme secreted from *P. pastoris* X-33 containing pPICZ α _1-sst_56 and *P. pastoris* X-33 containing pPICZ α _1-sst_69 were 0.051 and 0.048 U/mg protein, respectively. Disappearance of recombinant protein bands purified by His tag column on SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) indicated that polyhistidine (6xHis) tag was not translated into protein. The 1-kestose was synthesized within 12 h when the recombinant enzyme was incubated with 0.46M sucrose as substrate. However, nystose (GF3) was also synthesized in prolonged period of incubation.

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2013
Student's signature
Thesis Advisors' signature 1. 2. 3.