สุภา สกุลศิริรัตน์ 2551: การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 และ *Bacillus circulans* NT6.7 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 134 หน้า

เอนไซม์แมนนาเนส สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ สำหรับใช้เป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ (probiotic) เอนไซม์แมนนาเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายแหล่ง ซึ่งแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมการผลิตได้ง่าย และมีต้นทุนการผลิตต่ำ ทำให้สามารถนำไปสู่การผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง งานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 และ *Bacillus circulans* NT6.7 เพื่อตรวจสอบชนิดและคุณสมบัติของยีนโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการวิเคราะห์ลำดับเบส และหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนโดยเทคนิค PCR walking เพื่อนำไปสู่การทำนายโครงร่างสามมิติ และบริเวณแร่งของเอนไซม์แมนนาเนส จากการวิจัย พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 786 และ 771 คู่เบส ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส (EC 3.2.1.78) ที่จัดอยู่ในกลุ่มของไกลโคไซด์ไฮโดรเลสสกุลที่ 26 (GH26) ตระกูล GH-A มีค่าร้อยละความเหมือนของลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนบางส่วน เท่ากับ 45.8 และ 67.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนทางด้านปลาย 5' และ 3' ด้วยเทคนิค PCR walking พบว่า ไม่สามารถหาลำดับเบสแบบครบทั้งยีนได้ จึงนำลำดับเบสบางส่วนที่ได้จาก *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไปทำนายโครงร่างสามมิติด้วยวิธี homology modeling เพื่อวิเคราะห์หาบริเวณแร่ง โดยใช้โครงร่างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 จาก *Cellvibrio japonicus* (1odz) เป็นต้นแบบ พบว่าโครงร่างสามมิติของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ มีลักษณะเป็น (β/α_8)-barrel โดยมีกรดอะมิโน Asp79, His101, Glu163 และ Tyr238 ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ Asp74, His96, Glu158 และ Tyr233 ใน *B. circulans* NT6.7 เป็นบริเวณแร่ง Asp79 และ Asp74 ทำหน้าที่เป็น nucleophile โดยสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Tyr238 และ Tyr233 ขณะที่ Glu163 และ Glu158 ทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst โดยมี His101 และ His96 มีบทบาทในการจับกับสารตั้งต้นที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ใน *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า Asp79 และ Asp74 มีความแตกต่างจากกรดอะมิโนที่เป็น nucleophile ของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสใน GH26 จากแหล่งอื่น ผลการวิจัยที่ได้ก่อให้เกิดองค์ความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *B. amyloliquefaciens* NT6.3 และ *B. circulans* NT6.7 ต่อไป

Supa Sakulsirirat 2008: Cloning and Structural Analysis of Genes Encoding Mannanase from *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 and *Bacillus circulans* NT6.7. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Suttipun Keawsompong, Ph.D. 134 pages.

Mannanase was an important enzyme for producing valuable manno-oligosaccharides known as prebiotic which were useful for the growth of intestinal probiotic. Mannanase has been isolated from a wide range of organisms. Bacterial source is preferred when large amounts of enzyme are required. Comparative studies of the bacterial mannanases showed that the hydrolyzing efficiency of the enzymes differed from species to species and even between the different strains of the same species. In this research, mannanases of *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 and *Bacillus circulans* NT6.7 were cloned and structurally analysed. The detection of mannanase genes was done by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were cloned, sequenced and subjected to BLAST search at NCBI. The result revealed that partial sequences were 786 and 771 base pairs long in *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and *B. circulans* NT6.7, respectively. These partial sequences were putative β-mannanase genes which classified into glycoside hydrolase family 26 (GH26) and belonged to clan GH-A. Comparison of nucleotide and amino acid sequences between *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and *B. circulans* NT6.7 showed 45.8 and 67.4 % sequence identities, respectively. Homology modeling was used in protein structure prediction from amino acid sequence by using Swiss-Model, DSViewerPro and SPDBV. Three-dimensional structure of β-mannanase from *Cellvibrio japonicus* was used as template model. Models of two *Bacillus* species were (β/α_8)-barrel shape. Corresponding amino acids contributing to the active site of β-mannanase were Asp79, His101, Glu163 and Tyr238 in *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and Asp74, His96, Glu158 and Tyr233 in *B. circulans* NT6.7. Asp79 and Asp74 were nucleophile which formed hydrogen bond with Tyr238 and Tyr233, Glu163 and Glu158 constituted acid/base catalyst and His101 and His96 played an important role in substrate binding as polysaccharide through hydrogen bonds between the imidazole ring and the sugar hydroxyl groups in *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and *B. circulans* NT6.7, respectively. In addition, Asp79 and Asp74 which were nucleophile, differed from β-mannanase in GH26 from another genus. The result presented here was preliminary study of partial β-mannanase sequences of *B. amyloliquefaciens* NT6.3 and *B. circulans* NT6.7. This could be basic for future study on β-mannanase to apply in prebiotic preparation.