

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบบหลั่งออกนอกเซลล์โดยยีสต์ลูกผสมสายพันธุ์

Kluyveromyces lactis

PRODUCTION OF AN EXTRACELLULAR CELLULASE BY
RECOMBINANT YEAST *Kluyveromyces lactis*

จันตรา คิมภก

JANTRA DIMAK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AG-M-101-192

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบบหลั่งออกนอกเซลล์โดยยีสต์ลูกผสมสายพันธุ์

Kluyveromyces lactis

PRODUCTION OF AN EXTRACELLULAR CELLULASE BY
RECOMBINANT YEAST *Kluyveromyces lactis*

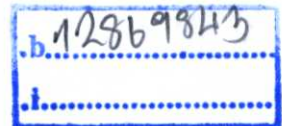


T148468

จันตรา ดิมาก

JANTRA DIMAK

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน **148468**
วันเดือนปี **30 ต.ค. 2560**



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AG-M-101-192

**PRODUCTION OF AN EXTRACELLULAR CELLULASE BY
RECOMBINANT YEAST *Kluyveromyces lactis***

JANTRA DIMAK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2015

KMITL-2015-AG-M-101-192

**COPYRIGHT 2015
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบบหลั่งออกนอกเซลล์โดยยีสต์ลูกผสมสายพันธุ์
Kluyveromyces lactis
Production of an Extracellular Cellulase by Recombinant Yeast
Kluyveromyces lactis

นักศึกษา นางสาวจันทร์ดา ดีมาก

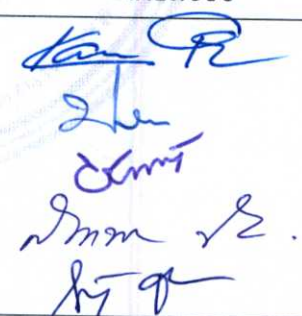
รหัสประจำตัว 54640802

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.กนกรัตน์	ศรีกิจเกษมวัฒน์	
ดร.ปรีดา	เลิศวัชรสารกุล	
รศ.ดร.กานต์	สุขสุแพทย์	
ผศ.ดร.ลำแพน	ขวัญพูล	
ผศ.ดร.กัญญา	จิระเจริญรัตน์	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRBANG

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 7 กรกฎาคม 2558

สถานที่สอบ ห้องประชุมภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง (ชั้น 3 ตึกบุญนาถ L)

คณบดีรับรองแล้ว

มณฑล เน้นมณี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล เน้นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 15 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2558

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบบหลั่งออกนอกเซลล์โดยยีสต์ลูกผสมสายพันธุ์ <i>Kluyveromyces lactis</i>
นักศึกษา	นางสาวจันทรา คีมาก
รหัสประจำตัว	54640802
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

บทคัดย่อ

Kluyveromyces lactis เป็นยีสต์เซลล์เข้าบ้านชนิดหนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยในการผลิตโปรตีนในระดับอุตสาหกรรม และสามารถผลิตโปรตีนหลั่งออกนอกเซลล์ได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลูกผสมโดยใช้ระบบยีสต์โดยทำการโคลนยีน *cel5_A24* แบบ mature gene ที่จำแนกได้จากแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะหมักของกระบือปลักไปยังเวกเตอร์ pKLAC2 ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ LAC4 และถ่ายเข้าสู่ยีสต์เซลล์เข้าบ้าน *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 ได้ยีสต์ลูกผสมให้ชื่อเป็น pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 และทำการคัดเลือกโคลนด้วยวิธีการทดสอบการย่อยกับสับสเตรท carboxyl methyl cellulose (CMC) บนอาหารแข็งนำยีสต์ที่ปรากฏวงใสรอบโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPGal เพื่อผลิตเอนไซม์ พบว่าโปรตีนรวมที่ผลิตได้โดยหลั่งออกนอกเซลล์มีปริมาณ $47 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ และสามารถย่อย CMC ได้ดีที่สุดเมื่อปรับในบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 5 นาที โดยมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ $92.81 \pm 0.02 \text{ U/mg protein}$ เอนไซม์มีความเสถียรในสภาวะกรด-ด่างในช่วง pH 4.0-10.0 และสามารถทนความร้อนได้ถึง 50°C เอนไซม์สามารถย่อยสับสเตรท CMC ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ Xylan, Avicel และ กระดาษกรอง เมื่อเติมสารละลาย 10 mM CaCl_2 และ 10 mM SrCl_2 เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น และสามารถย่อยสลายซังข้าวโพดได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ ชานอ้อย และฟางข้าว โดยได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 219.51 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุ

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เป็นอย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ เป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ รวมทั้ง ผศ.ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูงและรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับสนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณปรียนันท์ ศิระประภาภัสส์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ระหว่างการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ได้ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆด้าน ทั้งด้านทุนทรัพย์และเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาและการวิจัยจนทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

จันทร์รา ตีมาก

มิถุนายน 2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XII
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย.....	XV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัย.....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เอนไซม์.....	4
2.2 เอนไซม์กลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส.....	4
2.3 เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5.....	5
2.4 เซลลูโลส.....	7
2.5 เอนไซม์เซลลูเลส.....	8
2.6 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสายผสม.....	11
2.6.1 การผลิตโดยใช้ระบบแบคทีเรีย.....	11
2.6.2 การผลิตโดยใช้ระบบยีสต์.....	11
2.6.3 การผลิตโดยใช้ระบบเชื้อรา.....	11
2.6.4 การผลิตโดยใช้ระบบพืช.....	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7 เชลลูโลโซม.....	14
2.8 ประโยชน์ของเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรม.....	15
2.9 ยีสต์.....	17
2.10 ยีสต์ <i>Kluyveromyces lactis</i>	18
2.11 การใช้ยีสต์ <i>Kluyveromyces lactis</i> ในอุตสาหกรรม.....	20
2.12 ยีนเซลลูเลส <i>Cel5_A24</i>	21
2.13 การผลิตเอนไซม์ลูกผสมในยีสต์ <i>Kluyveromyces lactis</i>	21
2.14 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในยีสต์.....	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	27
3.1 ที่มาของยีน.....	27
3.1.1 ยีนที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่.....	27
3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่.....	27
3.1.3 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่.....	27
3.2 เวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่.....	27
3.3 การถ่ายยีนเซลลูเลสเข้าสู่แบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	27
3.3.1 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	28
3.3.2 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>Escherichia coli</i> DH5 α (transform).....	28
3.3.3 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี blue/white Screening.....	29
3.3.4 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening.....	29
3.3.5 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส...	29
3.3.6 การสกัดพลาสมิดโดยวิธี Alkaline lysis.....	29
3.3.7 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	30
3.3.8 การสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ FavoPrep TM Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Austria).....	30

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.3.9 การออกแบบไพรเมอร์.....	31
3.3.10 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลล์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	31
3.3.11 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์.....	32
3.4 การสร้างยีนเซลล์ลูกผสม.....	33
3.4.1 การนำเวกเตอร์ pKLAC2 และยีนเซลล์สมมาตรด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนนำมาเชื่อมต่อกัน.....	33
3.4.2 การเชื่อมต่อยีนเซลล์เข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 (Ligation).....	33
3.4.3 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี Colony PCR.....	34
3.4.4 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านยีสต์ <i>Klyveromyces lactis</i> สายพันธุ์ GG799 ให้เป็นคอมพิเทนต์เซลล์.....	34
3.4.5 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ยีสต์ <i>Klyveromyces lactis</i> ด้วยวิธี heat shock.....	35
3.4.6 การคัดเลือกโคโลนียีสต์ลูกผสม <i>K. lactis</i> ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลล์สบนอาหารแข็ง CMC.....	35
3.4.7 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอยีสต์ <i>K. lactis</i>	36
3.4.8 การตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	36
3.5 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE).....	37
3.6 การเตรียมโปรตีนเซลล์.....	37
3.6.1 การผลิตเอนไซม์สายผสม.....	37
3.6.2 การทำโปรตีนให้เข้มข้น (protein concentration).....	37
3.6.3 การตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีน.....	38
3.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลล์.....	38
3.7.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์โดยการหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS assay.....	38
3.7.2 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลล์จากยีสต์ลูกผสม.....	39

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.7.2.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal time).....	39
3.7.2.2 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์ (Optimal pH).....	39
3.7.2.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimal temperature).....	39
3.7.2.4 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด-ด่างของ เอนไซม์ (pH stability).....	39
3.7.2.5 การทดสอบความสามารถในการทนต่อความร้อนของ เอนไซม์ (Thermo stability).....	40
3.7.2.6 การทดสอบการย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (Substrate specificity).....	40
3.7.2.7 การวิเคราะห์สารยับยั้ง และสารที่กระตุ้นการทำงานของ เอนไซม์ (Inhibit-activator enzyme).....	40
3.7.2.8 การทดสอบการย่อยวัสดุเชื้อยีส.....	41
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	42
4.1. การคัดเลือกโคลน.....	42
4.1.1 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening.....	42
4.1.2 ผลการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยการคัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ...	43
4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนเซลลูเลสในยีสต์ <i>Kluyveromyces lactis</i>	44
4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลลูเลสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่ โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	44
4.2.2 การเชื่อมต่อยีนเซลลูเลสเข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 (Ligation).....	46
4.2.3 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี Colony PCR.....	48
4.2.4 ผลการเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน เซลลูเลส.....	50

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.2.5 ผลการเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโนของยีน เซลลูเลส.....	50
4.2.6 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเซลลูเลสเข้าสู่ยีสต์ <i>K. lactis</i> ด้วยวิธี heat Shock.....	58
4.2.7 การคัดเลือกโคโลนียีสต์ลูกผสม <i>K. lactis</i> ที่มีกิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี DNS assay.....	58
4.2.8 การคัดเลือกยีสต์ลูกผสม <i>K. lactis</i> ที่มีกิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์เซลลูเลส (Activity plate).....	60
4.2.9 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ลูกผสม.....	60
4.2.10 การตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.	61
4.2.11 ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel....	62
4.3 การเตรียมโปรตีนเซลลูเลส.....	63
4.3.1 การเพาะเลี้ยงและทำโปรตีนให้เข้มข้น (protein concentration).....	63
4.4 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส.....	64
4.4.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal time).....	64
4.4.2 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์ (optimal pH).....	65
4.4.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimal temperature).....	66
4.4.4 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ (pH stability).....	67
4.4.5 การทดสอบความสามารถในการทนต่อความร้อนของเอนไซม์ (Thermo stability).....	68
4.4.6 การทดสอบการย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (Substrate specificity).....	70

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.4.7 การเปรียบเทียบระบบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากระบบยีสต์ <i>K. lactis</i> และระบบ <i>E. coli</i>	71
4.4.8 การวิเคราะห์สารยับยั้ง และสารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (Inhibit-activator enzyme).....	72
4.4.9 การทดสอบการย่อยเชื้อ.....	74
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	76
เอกสารอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลาย อาหารเลี้ยงเชื้อ และแผ่นที่เวคเตอร์.....	89
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน.....	100
ประวัติผู้เขียน.....	106

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ไกลโคไซค์ไฮโดรเลส Clan.....	5
2.2	กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซค์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5.....	6
2.3	จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส.....	11
4.1	ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2- Cel5_A24/10C2.....	58
4.2	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2- Cel5_A24/10C2A3 ในการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ.....	71
4.3	การเปรียบเทียบระบบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากระบบยีสต์ <i>K. lactis</i> และระบบ <i>E. coli</i>	72
4.4	ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2- Cel5_A24/10C2A3 เมื่อเติมสารละลายแต่ละชนิด.....	74
4.5	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยจากวัสดุ 1 กรัม.....	75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่

ก1	การเตรียม polyacrylamide gel	96
ก2	การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate	97
ก3	การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate.....	97
ข1	แสดงค่ามาตรฐาน BSA ของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน.....	101
ข2	แสดงค่ามาตรฐานกลูโคสที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์.....	102
ข3	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 ช่วงระยะเวลาในการบ่มตั้งแต่ 5-60 นาที.....	103
ข4	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 ที่บ่มในช่วง pH 3.0-11.0.....	103
ข5	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 บ่มที่อุณหภูมิ 20-90°C.....	104
ข6	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 การทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0-11.0 ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์.....	104
ข7	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 การทนต่อความร้อนของเอนไซม์ เมื่อบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 20-90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์.....	105

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การจัดเรียงตัวของไฟบริล ไมโครไฟบริล และเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช.....	8
2.2 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส endo- β -glucanase, exo- β -glucanase และ β -glucosidase.....	10
2.3 รูปแบบอย่างง่ายขององค์ประกอบเซลลูโลโซมที่เกาะกับผิวเซลล์ และทำปฏิกิริยากับสับสเตรทจากองค์ความรู้พื้นฐานของเซลลูโลโซมจาก <i>Clostridium</i> sp.	15
4.1 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนเซลลูเลสด้วยวิธี size screening ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	42
4.2 ผลการตรวจสอบการสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยวิธี Alkaline lysis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	43
4.3 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มีการเชื่อมต่อระหว่างยีนเซลลูเลสกับเวกเตอร์ pTZ57R/T โดยตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xba</i> I และ <i>Bam</i> HI ตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	44
4.4 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลลูเลส ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	45
4.5 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	46
4.6 ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> I และ <i>Not</i> I ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	47
4.7 ผลการตรวจสอบการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	47
4.8 ผลการตรวจสอบการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	48
4.9 ผลการตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี Colony PCR ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	49

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4.10	ผลการตรวจสอบการสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep Kit ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	49
4.11	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลส pKLAC2-Cel5_A24/10C2, pKLAC2-Cel5_A24/10C5 และ pKLAC2Cel5_A24/10C6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Cel5_A24</i> mature gene.....	51
4.12	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลลูเลส pKLAC2-Cel5_A24/10C2, pKLAC2-Cel5_A24/10C5 และ pKLAC2Cel5_A24/10C6 กับลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>Cel5_A24</i> mature gene.....	56
4.13	ผลการย่อยสลายสับสเตรท CMC บนอาหารแข็ง.....	60
4.14	ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	61
4.15	ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%.....	62
4.16	ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีน วิเคราะห์บนเจล 10% SDS-PAGE.....	63
4.17	โปรตีนรวมก่อนและหลังทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยคอลัมน์ ultrafiltration วิเคราะห์บนเจล 10% SDS- PAGE.....	64
4.18	ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อบ่มที่ระยะเวลา 5-60 นาที.....	65
4.19	ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อบ่มที่ pH 3.0-11.0.....	66
4.20	ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อบ่มโดยใช้อุณหภูมิ 20-90 °C.....	67
4.21	ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์การทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2- Cel5_A24/10C2A3.....	68
4.22	ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์การทนต่อความร้อนของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2- Cel5_A24/10C2A3.....	69

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	98
ก2 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pKLAC2.....	99
ข1 แสดงกราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA standard) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm.....	101
ข2 แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคส (Glucose Standard) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm	102

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CMC	Carboxymethylcellulose
Da	Dalton
kDa	Kilo Dalton
DNS	3,5-Dinitrosalicylic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
g	Gram
IPTG	Isopropyl- β -D thiogalactoside
YP	Yeast extract, Peptone
LB	Lubia-Bertani
mg	Milligram
mg/ml	Milligram per milliliter
mM	MilliMolar
M	Molar
ng	Nanogram
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside
μ g	Microgram
μ g/ μ l	Microgram per microlite
μ g/ml	Microgram per milliliter
μ l	Microlite
μ M	MicroMolar
μ Mole	MicroMole
$^{\circ}$ C	Degree Celsius
%	Percentage
L	Liter
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
nm	Nanometer

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมและทางการค้าอย่างกว้างขวาง เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร อาหารสัตว์ การหมักแอลกอฮอล์ ยา การเกษตร สิ่งแวดล้อม สิ่งทอ เชื้อเพลิง อุตสาหกรรมเคมี กระดาษและอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ การจัดการของเสีย ทางการแพทย์ อุตสาหกรรมยา พันธุวิศวกรรม และบำบัดมลพิษ เป็นต้น (Dhillon *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2011)

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืชได้ จัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) สามารถย่อยสลายซั้บเสตรที่มีพันธะไกลโคซิดิก (Beguin and Aubert. 2000) เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส (Lynd *et al.* 2002) ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) และ β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) (Perez *et al.* 2002) จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzyme database (CAZy) แบ่งไกลโคไซด์ไฮโดรเลสออกเป็น 133 กลุ่ม ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสที่มีลักษณะการทำงานแบบ endoglucanases (EC 3.2.1.4) จัดอยู่ในกลุ่ม 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 74, 124 และ NC เอนไซม์เซลลูเลสที่มีลักษณะการทำงานแบบ exoglucanase (EC.3.2.1.91) จัดอยู่ในกลุ่ม 5, 6 และ 9 และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีลักษณะการทำงานแบบ β -glucosidases (EC 3.2.1.21) จัดอยู่ในกลุ่ม 1, 3, 5, 9, 30, 116 และ NC (Henrissat *et al.* 2015)

เอนไซม์เซลลูเลสถูกผลิตโดยสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดรวมทั้ง อาร์เคีย เชื้อรา แบคทีเรีย พืช แมลง และสัตว์บางกลุ่ม (Davison and Blaxter. 2005; Watanabe and Tokuda. 2001) โดยพบว่ามีการผลิตจากเชื้อรามากที่สุด (Ariffin *et al.* 2006)

การผลิตโปรตีนลูกผสมโดยทั่วไปนิยมใช้ระบบการผลิตโดยแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ ระบบยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* อย่างไรก็ตามปัญหาที่เกิดขึ้นมาคือการเก็บเกี่ยวโปรตีนไปใช้งาน เนื่องจากระบบการผลิตส่วนใหญ่เป็นแบบการหลั่งภายในเซลล์ (intracellular) ซึ่งต้องเพิ่มขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง การศึกษาครั้งนี้จึงทดลองนำระบบยีสต์ *K. lactis* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตโปรตีนเป้าหมายในปริมาณสูง และสามารถหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) มาใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสมเซลลูเลส นอกจากนี้ยังมีโปรตีนมากกว่า 40 ชนิดที่ได้มาจากแหล่งต่างๆทั้ง แบคทีเรีย เชื้อรา พืช

ไวรัส และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ซึ่งนำมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในระบบยีสต์ *K. lactis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ooyen *et al.* 2006) สามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตต่างๆ เช่น bovine prochymosin ที่พบในนม (Berg *et al.* 1990) นอกจากนี้ยังได้มีการผลิตเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* (Li *et al.* 2011) เป็นต้น

เนื่องจากยีนเซลล์ยีสต์ที่ศึกษาแยกได้จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ โดยไม่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิค metagenome amplification การศึกษาครั้งนี้จึงนำยีนดังกล่าวมาย้ายฝากเข้าไปในยีสต์ *K. lactis* เป็นยีสต์เจ้าบ้าน และทดสอบความสามารถในการผลิตโปรตีนลูกผสมแบบหลั่งออกภายนอกเซลล์ และทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในกิจกรรมที่เหมาะสมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนเซลล์ยีสต์จากแบคทีเรียในกระเพาะหมักของกระบือ
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของพลาสมิดลูกผสมใน *K. lactis*
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสมและคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

ห้องปฏิบัติการกลางโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4 ขั้นตอนการวิจัย

แบ่งได้ 5 ขั้นตอน คือ

1. เพิ่มปริมาณยีนเซลล์ยีสต์ที่ได้เชื่อมต่อไว้ในพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57 R/T ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส ทำการตัดต่อยีนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pKLAC2 และถ่ายยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH α

2. คัดเลือกโคลนที่มีการเชื่อมต่อยีนสำเร็จและวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์

3. สกัดพลาสมิดลูกผสมและถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์เจ้าบ้าน *Kluyveromyces lactis*

4. คัดเลือกโคโลนียีสต์ลูกผสม *K. lactis* ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลล์ยีสต์

5. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ยีสต์ลูกผสมสายพันธุ์ *K. lactis* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
2. ทราบสถานะที่เหมาะสมในการทำงานและความสามารถในการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์

เอนไซม์ คือ โปรตีนกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ซึ่งเหมาะสมกับสภาวะภายในเซลล์ และอวัยวะของสิ่งมีชีวิตทั่วไป เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่เรียกว่า สับสเตรท เนื่องจากเอนไซม์มีบริเวณที่เรียกว่าบริเวณเร่ง (active site) ซึ่งจะต้องสอดคล้องกับส่วนของซับสเตรทในด้านขนาด รูปร่าง และธรรมชาติทางเคมี จึงทำให้เกิดโครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรท นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น (พัชรา วีระกะลัส. 2541)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นมนุษย์ สัตว์ พืช จุลินทรีย์ มีกระบวนการของสิ่งมีชีวิตที่มีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบทั้งสิ้น เช่น กระบวนการสังเคราะห์สารอาหารย่อยสลายสารอาหาร กระบวนการสร้างพลังงาน เป็นต้น (ปราณี อานปรื่อง. 2547)

2.2 เอนไซม์กลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส

ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) หรือเรียกว่า ไกลโคซิเดส (glycosidase) เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ระหว่างคาร์โบไฮเดรต 2 โมเลกุล หรือมากกว่า (Kumar. 2011) ฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) ได้จำแนกเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสออกเป็นกลุ่ม (family) ทั้งหมด 133 กลุ่ม โดยเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสตามลักษณะโครงสร้าง 3D ของโปรตีน ที่เรียกว่า Clan ปัจจุบันมี 14 Clan คือ GH-A, GH-B, GH-C, GH-D, GH-E, GH-F, GH-G, GH-H, GH-I, GH-J, GH-K, GH-L, GH-M และ GH-N (ตารางที่ 2.1) และมีกลไกการทำงานหลัก 2 ประเภท คือ Retaining และ Inverting (Koshland. 1953) โดย GH-A มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด และมีโครงสร้างแบบ $(\beta/\alpha)_8$ ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสที่มีกลไกการทำงานแบบ Retaining ได้แก่ GH-A, GH-B, GH-C, GH-D, GH-E, GH-H, GH-J และ GH-K และมีกลไกการทำงานแบบ Inverting ได้แก่ GH-F, GH-G, GH-I, GH-L, GH-N และ GH-M (Henrissat *et al.* 2015)

ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส มีบทบาทสำคัญทั้งในธรรมชาติ และในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม ที่เกี่ยวกับทางชีวภาพเปลี่ยนสารชีวมวลไปเป็นเชื้อเพลิง ช่วยลดต้นทุนในการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิง ทางการแพทย์ ทางชีวเคมี (Yang *et al.* 2011) พบได้ในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ อาร์เคีย สัตว์ พืช (Opassivi *et al.* 2006)

ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ที่ย่อยสลายสับสเตรทที่มีพันธะไกลโคซิด ได้แก่ แป้ง เซลลูโลส และ เพคติน เป็นต้น เอนไซม์ที่จะย่อยสลายสับสเตรทนี้ได้ คือ อะมัยเลส เซลลูเลส และ เพคตินเนส ตามลำดับ (ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543)

ตารางที่ 2.1 ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส Clan

Clan	Families (GH)	Anomeric configuration	Three dimensional structure
	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30,		
GH-A	35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86, 113, 128	retaining	$(\beta/\alpha)_8$
GH-B	7, 16	retaining	β -jelly roll
GH-C	11, 12	retaining	β -jelly roll
GH-D	27, 31, 36	retaining	$(\beta/\alpha)_8$
GH-E	33, 34, 83, 93	retaining	6-fold β -propeller
GH-F	43, 62	invertig	5-fold β -propeller
GH-G	37, 63	invertig	$(\alpha/\alpha)_6$
GH-H	13, 70, 77	retaining	$(\beta/\alpha)_8$
GH-I	24, 46, 80	invertig	$\alpha+\beta$
GH-J	32, 68	retaining	5-fold β -propeller
GH-K	18, 20, 85	retaining	$(\beta/\alpha)_8$
GH-L	15, 65, 125	invertig	$(\alpha/\alpha)_6$
GH-M	8, 48	invertig	$(\alpha/\alpha)_6$
GH-N	28, 49	invertig	β -helix

ที่มา : Naumoff. 2011; Henrissat *et al.* 2015.

2.3 เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5

เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5 (GH 5) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ใหญ่ที่สุดในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (Cottrell *et al.* 2005) แต่ก่อนรู้จักคือ Cellulase Family A (Henrissat *et al.* 1989) มีรูปแบบของ clan แบบ GH-A และ โครงสร้าง 3 มิติของสายกรดอะมิโนมีรูปแบบ $(\beta/\alpha)_8$ (Dominguez *et al.* 1995) และมีกลไกการทำงานแบบ retaining (Barras *et al.* 1992)

กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ endoglucanase (cellulase), endomannanase, exoglucanase, exomannanase, β -glucosidase และ β -mannosidase รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์อื่นๆ เช่น 1,6-galactanase, 1,3-mannanase, 1,4-xylanase, endoglycoceramidase, xyloglucanases (ตารางที่ 2.2) เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5 พบอย่างกว้างขวางทั้งใน อาร์คีย์ แบคทีเรีย ยูคาริโอต โดยเฉพาะ ฟังไจ และพืช แต่ไม่พบเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5 ในมนุษย์ (St John *et al.* 2010)

เอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5 จะย่อยซับสเตรตต่างๆ รวมทั้ง ไคติน แมนแนน เซลลูโลส ไซแลน กลูแคน และไลเคนิน โดยเอนไซม์ที่มีมากสุดในกลุ่มนี้มาจากแบคทีเรีย 60% มีเพียงเล็กน้อยที่มาจากอาร์คีย์ ส่วนที่เหลือประมาณ 38% มาจากยูคาริโอต (Coutinho and Henrissat. 1999)

ตารางที่ 2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5

Enzyme Activity	EC number
endo- β -1,4-glucanase / cellulose	3.2.1.4
endo- β -1,4-xylanase	3.2.1.8
β -glucosidase	3.2.1.21
β -mannosidase	3.2.1.25
β -glucosylceramidase	3.2.1.45
glucan β -1,3-glucosidase	3.2.1.58
Licheninase	3.2.1.73
exo- β -1,4-glucanase / cellodextrinase	3.2.1.74
glucan endo-1,6- β -glucosidase	3.2.1.75
mannan endo- β -1,4-mannosidase	3.2.1.78
cellulose β -1,4-cellobiosidase	3.2.1.91
steryl β -glucosidase	3.2.1.104
Endoglycoceramidase	3.2.1.123
Chitosanase	3.2.1.132

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Enzyme Activity	EC number
β -primeverosidase	3.2.1.149
xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase	3.2.1.151
endo- β -1,6-galactanase	3.2.1.164
hesperidin 6-O- α -L-rhamnosyl- β -glucosidase	3.2.1.168
β -1,3-mannanase	3.2.1.-
arabinoxylan-specific endo- β -1,4-xylanase	3.2.1.-
mannan transglycosylase	2.4.1.-

ที่มา : Henrissat *et al.* (2015)

2.4 เซลลูโลส

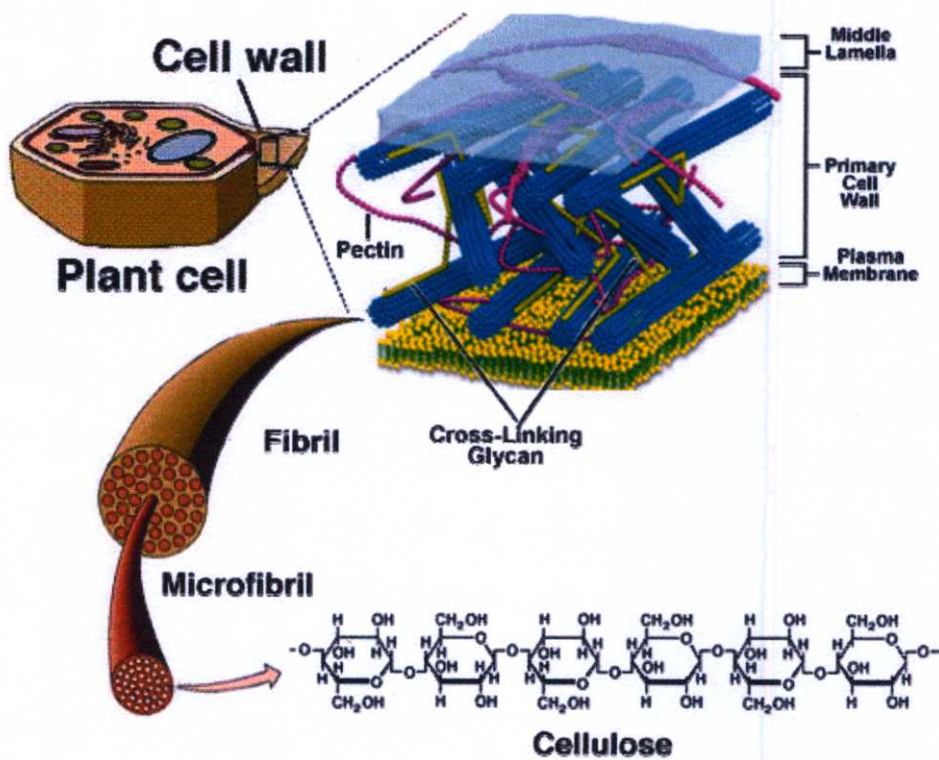
มวลชีวภาพจากพืช (plant biomass) ซึ่งประกอบด้วยพอลิเมอร์หลัก 3 ชนิด คือ เป็น เซลลูโลส (cellulose) 40% เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 33% และ ลิกนิน (lignin) 23% ในผนังเซลล์พืชประเภทที่มีเนื้อไม้ (wood plants) พอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะเป็น โครงสร้างที่เชื่อมโยงกัน และ ทำความแข็งแรงให้ผนังเซลล์ เรียกว่า วัสดุลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic material) นอกจากนี้อาจ พบพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเพกทิน (pectin) ในปริมาณเล็กน้อย (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551)

โพลิเมอร์หลักของผนังเซลล์ คือ เซลลูโลส (cellulose) และพอลิเมอร์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และเพกทิน (pectin) โดยผนังเซลล์พืชเป็นเสมือนด่าน ต้านทานต่อการเข้าทำลายโครงสร้างโพลิเมอร์ด้วยเอนไซม์ ซึ่งการเข้าทำลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ตามกลไกทางธรรมชาตินั้น พบในสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญและย่อยสลายเศษซากพืชได้เป็นจำนวนมาก (Cai *et al.* 2010; Kudo. 2009; Vanholme *et al.* 2004; Dashtban *et al.* 2009)

เซลลูโลสเป็นหนึ่งในโพลิเมอร์จากธรรมชาติ (biopolymers) ที่มีมากที่สุดในโลก ที่เกิดขึ้น ในเนื้อไม้ ฝ้าย ป่าน และพืชอื่นๆ ทำหน้าที่หลักในการเสริมโครงสร้างพืช เซลลูโลสถูกสังเคราะห์ได้ โดยสาหร่าย เปรียงหัวหอม และแบคทีเรียบางชนิด (Klemm *et al.* 2006; Henriksson and Berglund. 2007; Iwamoto *et al.* 2007) ในเนื้อไม้มีเซลลูโลส 60% และมีขนาด 600-1,000 หน่วยกลูโคส ขณะที่ ในฝ้ายมีเซลลูโลสถึง 90% และมีขนาด 8,000-12,000 หน่วย ในธรรมชาติ ประมาณ 40-60 สายของ เซลลูโลสจะพันกันเป็นมัด (bundles) หรือเส้นใยฝอย (fibrils) ในทิศทางเดียวกัน โดยมีพันธะ ไฮโดรเจน โดยมีพันธะไฮโดรเจนเป็นแรงยึดระหว่างสายและภายในสาย (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551)

เซลลูโลสเป็นโพลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์พืช (Watanabe *et al.* 2010) และเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic (Huang *et al.*

2008) เรียงต่อกันประมาณ 100-10,000 หน่วยย่อย (Reddy and Yang, 2009) เส้นใยเซลลูโลสจัดเรียงตัวกันเป็นไมโครไฟบริล และยึดโครงสร้างกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยมีทั้งบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ เรียกว่า คริสตัลไลน์ (crystalline) และจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบเรียกว่า อะมอร์ฟัส (amorphous) (Beguin and Aubert, 1994) เซลลูโลสเป็นเส้นใยที่เหนียวมีสมบัติไม่ละลายน้ำ ซึ่งมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ (Chandra *et al.* 2007) เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนพลังงานทดแทนที่มีมากที่สุด และสามารถถูกย่อยสลายไปเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยเอนไซม์เซลลูเลส (Xiaohong *et al.* 2004)



ภาพที่ 2.1 การจัดเรียงตัวของไฟบริล ไมโครไฟบริล และเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช

(Anomuous, 2013)

2.5 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืชได้ จัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) สามารถย่อยสลายซับซ้อนที่มีพันธะไกลโคซิดิก (Beguin and Aubert, 2000) เซลลูเลส

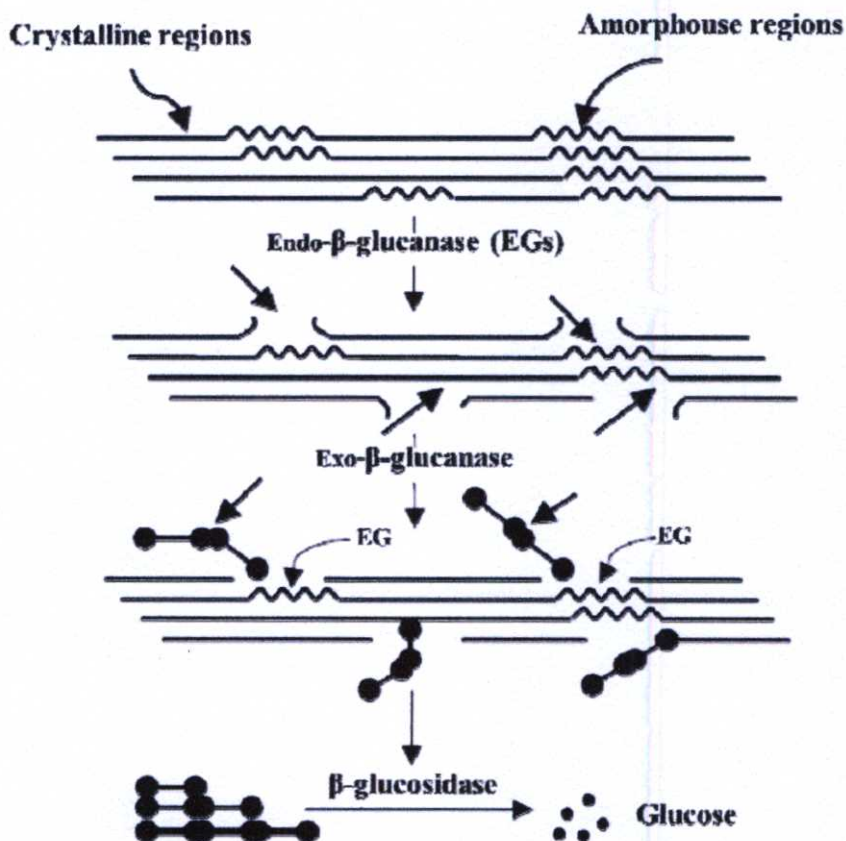
เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส (Lynd *et al.* 2002) ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) และ β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) (Perez *et al.* 2002)

กลไกการทำงานของเซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ

1. endoglucanases หรือ endo-1, 4- β -D-glucan glucanohydrolases (EC 3.2.1.4) เอนโดกลูคานเนสจะสับตัดพันธะ β -1,4-glucosidic บริเวณที่มีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ภายในสายเซลลูโลส ได้ผลผลิตเซลลูลิโกลิโกแซคคาไรด์ (cellooligosaccharides) (Wood. 1989) พบอยู่ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 51, 61 และ 74 (Sadhu and Maiti. 2013) เอนโดกลูคานเนสผลิตโดย อาร์คีย์ แบคทีเรีย เชื้อรา พืช และสัตว์ (Zhang and Zhang. 2013) สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยทดสอบการทำปฏิกิริยาต่อสับสเตรท carboxymethylcellulose (CMC) (Wike *et al.* 1983)

2. exoglucanase หรือ 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase (cellobiohydrolases) (EC. 3.2.1.91) เอกโซกลูคานเนสจะย่อยบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ (crystalline) ด้านปลายสายของเซลลูโลสได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอส (cellobiose) (Béguin and Aubert. 1994) พบอยู่ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 5, 6, 7, 9, 10 และ 48 (Sadhu and Maiti. 2013) เอกโซกลูคานเนสผลิตโดย แบคทีเรีย และเชื้อรา (Koivula *et al.* 2002 ; Vocadlo and Davies. 2008) สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยทดสอบการทำปฏิกิริยาต่อสับสเตรทที่เป็น crystalline เช่น Avicel และ filter paper (Ayers. 1959)

3. β -glucosidases หรือ β -D-glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21) บีต้า-กลูโคซิเดสย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นผลผลิตสุดท้ายคือ กลูโคส ที่บริสุทธิ์ (Béguin and Aubert. 2000) พบอยู่ในไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1, 3 และ 9 (Sadhu and Maiti. 2013) บีต้า-กลูโคซิเดสผลิตโดย อาร์คีย์ แบคทีเรีย เชื้อรา พืช และสัตว์ (Hong *et al.* 2007 ; Zhang *et al.* 2006) สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยทดสอบการทำปฏิกิริยาต่อ p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p-NPG) และ เซลโลไบโอส (cellobiose) (Wike *et al.* 1983)



ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส endo-β-glucanase, exo-β-glucanase และ β-glucosidase (Anonymous. 2013)

จากฐานข้อมูล Carbohydrate-Active Enzyme database (CAZy) แบ่งไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ออกเป็น 133 กลุ่ม ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสที่มีลักษณะการทำงานแบบ endoglucanases (EC 3.2.1.4) จัดอยู่ในกลุ่ม 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 74, 124 และ NC เอนไซม์เซลลูเลสที่มีลักษณะการทำงานแบบ exoglucanase (EC 3.2.1.91) จัดอยู่ในกลุ่ม 5, 6 และ 9 และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีลักษณะการทำงานแบบ β-glucosidases (EC 3.2.1.21) จัดอยู่ในกลุ่ม 1, 3, 5, 9, 30, 116 และ NC (Henrissat *et al.* 2015)

เอนไซม์เซลลูเลสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย พืช โปรทิสต์แมลง และสัตว์บางกลุ่ม (Davison and Blaxter. 2005; Watanabe and Tokuda. 2001) โดยพบว่ามีการผลิตจากเชื้อรามากที่สุด (Ariffin *et al.* 2006)

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

กลุ่ม	จุลินทรีย์
เชื้อรา	<i>Aspergillus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> <i>Fusarium</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Humicola</i> , <i>H. insolens</i> , <i>H. grisea</i> <i>Melanocarpus</i> , <i>M. albomyces</i> <i>Penicillium</i> , <i>P. brasilianum</i> , <i>P. occitanis</i> , <i>P. decumbans</i> <i>Trichoderma</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. harzianum</i>
แบคทีเรีย	<i>Acidothermus</i> , <i>A. cellulolyticus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bacillus sp</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium</i> , <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. thremocellum</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>P. cellulosa</i> <i>Rhodothermus</i> , <i>R. marinus</i>
แอกติโนไมซิส	<i>Cellulomonas</i> , <i>C. fimi</i> , <i>C. bioazotea</i> , <i>C. uda</i> <i>Streptomyces</i> , <i>S. drozdowiczii</i> , <i>S. lividans</i> <i>Thermonospora</i> , <i>T. fusca</i> , <i>T. curvata</i>

ที่มา: Sukumaran *et al.* (2005)

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลส และพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ คือ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Sarcinar* แต่เชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญมากคือ *Acetobacter sp.* เนื่องจากมีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสได้ในปริมาณสูง ดังนั้นจึงให้ *Acetobacter sp.* นี้ เป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างเซลลูโลสได้ (วราวุฒิ ครุสง และ กรวิกา สุขศรีวงษ์ .2539)

2.6 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสายผสม

2.6.1 การผลิตโดยใช้ระบบแบคทีเรีย (Expression in bacteria)

แบคทีเรียที่นิยมใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม ได้แก่ *E. coli* และ *Bacillus* (Juturu and Wu. 2012) นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์แล้ว ยังนิยมศึกษาการแสดงออกในโอสต์ *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas cellulosa* และ *Streptomyces lividans* ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการแสดงออกของเอนไซม์เซลลูเลส โดย *Z. mobilis* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน สามารถหมักน้ำตาลได้หลากหลายชนิด ได้ผลผลิตเป็นเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง สามารถทนต่อความเป็นพิษของเอทานอลได้ (Linger *et al.* 2010) เนื่องจากมีคุณสมบัติที่โดดเด่นจึง

ถือได้ว่าอีกเป็นทางเลือกในการผลิตแอลกอฮอล์ การเลือกใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนลูกผสมมีข้อดี ดังนี้ (1) ผลิตโปรตีนได้สูงกว่า ประมาณ 12-30 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* (Delgado *et al.* 2002) (2) แสดงออกของโปรตีนนอกเซลล์ และภายในเซลล์ (Linger *et al.* 2010; Lejeune *et al.* 1988) (3) ใช้เทคนิคการถ่ายโอนยีนค่อนข้างง่าย (4) พลาสมิดแสดงออกได้ทั้ง autonomous replicating DNA และ integrating DNA genome ของเซลล์เจ้าบ้าน (Delgado *et al.* 2002) และ (5) มีการทดสอบมาแล้วว่า มีการแสดงออกและหลังเอนไซม์เซลล์สูงระดับที่สูง (Linger *et al.* 2010) ข้อเสียในขณะนี้ยังขาดความพร้อมของชุด kit ทางการค้า (commercial kit)

Pseudomonas cellulose แบคทีเรียแกรมลบ ที่ใช้อาหาร โดยการดูดซึมสารอินทรีย์ เซลลูโลส (non-cellulosomic saprophytic bacteria) ภายในจีโนมมีดีเอ็นเอประกอบด้วยกลุ่มยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส ล้วนเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายพืช

Streptomyces lividans แบคทีเรียแกรมบวก พบในดิน เป็นที่รู้จักดีสำหรับการผลิต secondary metabolites โดยนิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนลูกผสม (Binnie *et al.* 1997) ข้อดีของการใช้ *Streptomyces* เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของโปรตีน ได้แก่ (1) มีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ใช้ในงานเภสัชกรรมมานานแล้ว รวมทั้งทราบวิธีการผลิตโปรตีนในระดับใหญ่ๆเป็นอย่างดี (2) สามารถหลังโปรตีนลูกผสมได้ (secrete recombinant proteins) (3) มีวิธีการในการถ่ายโอนยีนที่ค่อนข้างง่าย คล้ายกับในแบคทีเรียทั่วไป และ (4) มีความเป็นไปได้สำหรับปรับปรุงทางพันธุวิศวกรรมเพื่อการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (Herai *et al.* 2004; Anné *et al.* 2012)

2.6.2 การผลิตโดยใช้ระบบยีสต์ (Expression in yeast)

ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านอีกระบบที่น่าสนใจนอกเหนือจากการใช้แบคทีเรีย ระบบยีสต์กลายเป็นที่นิยมมากขึ้นในระดับอุตสาหกรรม ข้อดีของการใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม ได้แก่ (1) มีกระบวนการ post-translation modification (2) มีความสามารถหลังโปรตีนลูกผสม (3) มีความสามารถเจริญเติบโตมีความหนาแน่นของเซลล์สูงมาก (4) ยีสต์มีหลากหลายสายพันธุ์เพื่อต้องการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม และ (5) ปราศจากความเป็นพิษ โดยยีสต์สายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุดสำหรับการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*), *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* และ *Yarrowia lipolytica* (Juturu and Wu. 2012)

2.6.3 การผลิตโดยใช้ระบบเชื้อรา (Expression in filamentous fungi)

เชื้อราจำนวนมากมีการหลังเอนไซม์หลายๆชนิด (multiple enzymes) เช่น *Aspergillus niger* ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ได้ $25-30 \text{ g L}^{-1}$ และ *Trichoderma reesei* สามารถผลิตโปรตีนนอกเซลล์ได้ 100 g L^{-1} เนื่องจากเชื้อราสามารถหลังโปรตีนออกมาได้ปริมาณสูง มีความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์เซลลูเลสจากต่างสายพันธุ์ (heterologous expression)

โดยใช้เทคโนโลยี recombinant DNA ซึ่งสายพันธุ์ราที่นิยมใช้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมได้แก่ *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *T. reesei*, *Penicillium chrysogenum* และ *Rhizopus oryzae* โดยมีหลายวิธีที่ช่วยพัฒนาเพื่อการผลิตโปรตีนลูกผสม ได้แก่ (1) วิธีการ gene fusion: ด้วยการเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนที่สนใจกับปลายด้าน C-terminus ของ native gene หลังจากการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (2) การแสดงออกของแชพเพอโรน (chaperone) ในปริมาณที่สูง : ในระหว่างการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม โปรตีนอาจมีการม้วนพับเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเอนไซม์โปรตีเอส โดย chaperones จะช่วยให้โปรตีนมีการม้วนพับ และปรับปรุงระดับการหลั่งโปรตีนลูกผสม (3) ตรวจสอบการกระจายพันธุ์ multi-copy หลังจากการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้อราแล้ว ทำการคัดเลือกโคลน multi-copy (5-6) ของพลาสมิดลูกผสมจะช่วยปรับปรุงการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (4) ใช้สายพันธุ์เซลล์เจ้าบ้านที่ขาดเอนไซม์โปรตีเอส: โดยทั่วไปในเชื้อราแล้วการแสดงออกของเอนไซม์โปรตีเอสสัมพันธ์กับการแสดงออกของเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้โปรตีนลูกผสมอาจถูกทำลายโดยเอนไซม์โปรตีเอส เป็นการลดปริมาณโปรตีนลูกผสมลงได้ ดังนั้นเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้เพื่อการแสดงออกเอนไซม์เซลลูเลสจึงไม่ควรเอนไซม์โปรตีเอส เพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ต้องการ (Ward. 2012; Sharma *et al.* 2009)

2.6.4 การผลิตโดยใช้ระบบพืช (Expression in plants)

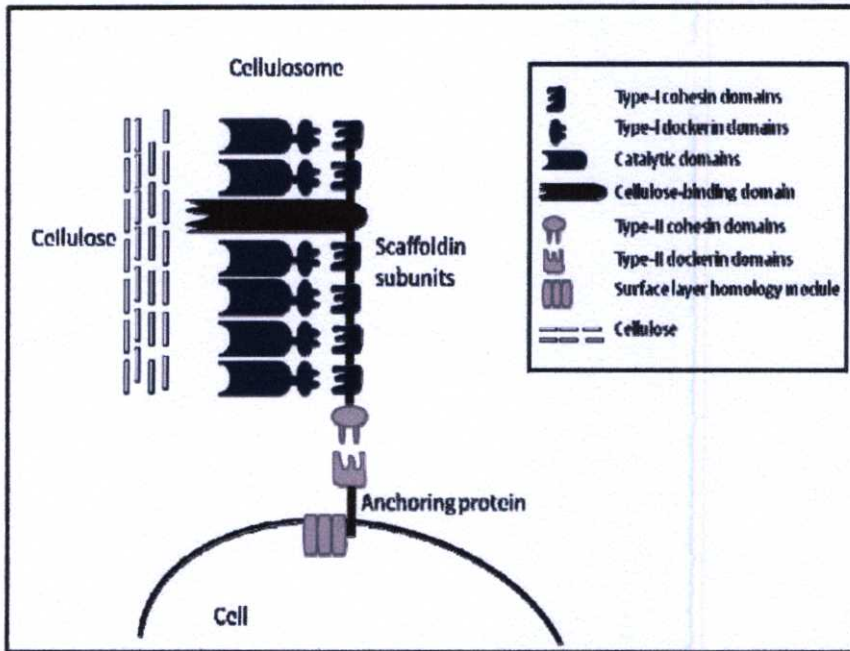
พืชเป็นอีกทางเลือกที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม นอกเหนือจากแบคทีเรียและเซลล์สัตว์ ในการเลือกใช้พืชเป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อใช้ในการแสดงออกโปรตีนลูกผสม (1) ใช้ศึกษาการแสดงออกของนิวเคลียสจีโนมพืช (nuclear genome) (2) ศึกษาการแสดงออกของพลาสต์จีโนม (plastid genome) (3) ศึกษาการแสดงออกของเนื้อเยื่อพืชจากลำดับเบสของไวรัส (viral sequence) ซึ่งการใช้วิธีการทั้งสามข้างต้นพบว่าการแสดงออกของโปรตีนในระดับที่ต่ำ เพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมที่สูงขึ้น จึงมีการปรับปรุงวิธีการการผลิตด้วย (1) มีการแสดงออกร่วมของ replicases และร่วมใช้ปัจจัยในการถอดรหัส (transcription) (2) การใช้ strong promoter (3) การเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่ต้องการศึกษา (copy numbers of the foreign genes) (4) ทำ codon optimization (5) กำหนดตำแหน่งการแสดงออกภายในเซลล์ (6) protein fusion เพื่อปรับปรุงความเสถียรภาพของโปรตีนลูกผสม ข้อดีของการใช้พืชเป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการแสดงออกโปรตีนลูกผสม ได้แก่ เป็นการลดต้นทุนการผลิตลงอย่างมีนัยสำคัญ โปรตีนมีกระบวนการ glycosylation เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* ซึ่งไม่พบว่ามีกระบวนการนี้ หรือยีสต์ (hyperglycosylated) การแสดงออกของยีนเซลลูเลสมีผลในเชิงบวกต่อการเติบโตของพืช (Streatfield. 2007)

2.7 เซลลูโลโซม (Cellulosome)

เซลลูโลโซมเป็นการทำงานร่วมกันแบบหลายเอนไซม์ (multienzyme) ผลิตจากแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic bacteria) เป็นหลัก ส่วนมากมักพบจากแบคทีเรียคลาส (class) Clostridia แต่มีรายงานการพบเซลลูโลโซมในแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (aerobic bacterium) และพบบ้างในราที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic fungi) จากสปีชีส์ (species) *Neocallimastix*, *Piromyces* และ *Orpinomyces* (Fanutti *et al.* 1995; Li *et al.* 1997) แสดงให้เห็นว่า เซลลูโลติกแบคทีเรีย (cellulolytic bacteria) อาจผลิตเซลลูโลโซมได้แต่พบเล็กน้อย ซึ่งเซลลูโลโซมส่วนมากมักสร้างจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic microorganisms) ซึ่งเป็นข้อดีที่ช่วยลดการใช้พลังงานในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นจุลินทรีย์กลุ่มนี้จึงมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์หลายๆชนิดได้ดีกว่ากิจกรรมทางเมตาบอลิซึม

เซลลูโลโซมพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 จาก *Clostridium thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแบบไม่ต้องการออกซิเจนที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic) และสร้างสปอร์ (spore-forming) (Lamed *et al.* 1983) โดยเซลลูเลสจาก *C. thermocellum* พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างสูงเมื่อใช้เซลลูโลสที่มีโครงสร้างแบบผลึก (crystalline cellulose) เป็นซับสเตรท ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้นี้ เรียกว่า กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่แท้จริง (true cellulose activity) หรือ อะวิเซลเลส (avicelase) ซึ่งมีความสามารถทำลายพันธะในเซลลูโลสที่มีโครงสร้างแบบผลึกที่ละลายน้ำได้ (solubilize crystalline form) เช่น เส้นใยฝ้าย หรือ avicel (Johnson *et al.* 1981)

ในการศึกษาทั่วไปนิยมนศึกษาเซลลูโลโซมจากแบคทีเรีย *C. thermocellum* ร่วมกับเซลลูโลโซมจากจุลินทรีย์แบบไม่ต้องการออกซิเจนที่ชอบอุณหภูมิสูง (anaerobic mesophile) เช่น *C. cellulolyticum* และ *C. cellulovorans* โดยเซลลูโลโซมส่วนมากมักมีสมบัติคล้ายๆกัน พบว่าเซลลูโลโซมประกอบด้วยโดเมนหลายโดเมน (multiple subunit) ที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน คือ catalytic domain ซึ่งส่วนที่ติดกับส่วนนี้คือ dockerin ซึ่งเป็นส่วนที่จับบน scaffoldin เอนไซม์ที่ไม่ใช่เซลลูโลโซมจะไม่มีส่วนของ dockerin และ scaffoldin subunit โดย scaffoldin subunit เป็นส่วนที่ประกอบด้วย cellulose-binding domain (CBD) หรือ cellulose-binding module (CBM) และ cohesion domain ซึ่ง scaffoldin subunit จะมีหน้าที่คือ บริเวณ cellulose-binding domain (CBD) เป็นตัวจับกับเซลลูโลส และรวมเอนไซม์ subunit ที่เหมือนกัน ซึ่งการจับกันระหว่าง dockerin domain กับ cohesion domain เรียกว่า interaction scaffoldin ส่วน anchoring protein จะเป็นตัวเชื่อมเซลล์แบคทีเรียกับ scaffoldin subunit (Bayer *et al.* 1998)



ภาพที่ 2.3 รูปแบบอย่างง่ายขององค์ประกอบเซลลูโลโซมที่เกาะกับผิวเซลล์ และทำปฏิกิริยากับ สับสเตรทจากองค์ความรู้พื้นฐานของเซลลูโลโซมจาก *Clostridium* sp. (ดัดแปลงจาก Shoham *et al.* 1999)

2.8 ประโยชน์ของเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรม

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม อาหาร อาหารสัตว์ กระดาษ สิ่งทอ การหมักแอลกอฮอล์ ยาการเกษตร และ สิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Dhillon *et al.* 2011)

การประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสในงานด้านอุตสาหกรรมหลักๆ นิยมใช้กำจัดขนบนเส้นใย ผ้า เช่น การผลิตยีนส์เดนิมด้วยการฟอกยีนส์ด้วยหิน และในผงซักฟอกตามบ้านเรือนทั่วไปที่ได้รับการปรับปรุงให้เส้นใยผ้ามีความอ่อนนุ่มและสีสดใส อย่างไรก็ตามเอนไซม์เซลลูเลสยังใช้ในการปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์และช่วยปรับปรุงให้มีความสามารถในการย่อยได้ดีขึ้นในระหว่างการผลิตน้ำผลไม้ และในการใช้ความร้อนสูง เช่น การล้างน้ำหมักให้หลุดออกม่ง่าย และในอุตสาหกรรมด้านอื่นๆ ได้มีการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น (Ponnambalam *et al.* 2011)

1. อุตสาหกรรมสิ่งทอ

ใช้ในการฟอกยีนส์เดนิมเพื่อให้ผ้ามีสีอ่อน ดูดี แทนการฟอกด้วยการใช้หินภูเขาไฟตามวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม (Belghith *et al.* 2001; Bhat. 2000; Olsom and Stanley. 1991) การผลิตผ้าเดนิม โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเข้าจับเส้นใยเซลลูโลสแล้วทำให้สึคราม

หลุดออกมา จึงทำให้เนื้อผ้ามีสีซีดตามลักษณะผ้าเคนิม สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Humicola insolens* เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการกำจัดเส้นใยผ้าที่มีขนาดเล็กที่ขึ้นออกมาจากเนื้อผ้า ซึ่งนอกจากจะเป็นการกำจัดขุยผ้าแล้ว ยังเป็นการทำให้ผ้ามีความอ่อนนุ่ม และได้ผ้าที่มีสีหลากหลายตามความเข้มสีของเนื้อผ้า (Olson, 1990; Galante and Formantici, 2003)

2. สารซักล้างและผงซักฟอก

เอนไซม์เซลลูเลส โดยเฉพาะเอนไซม์ EG III และ CBH I เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ผสมในผงซักฟอกเพื่อทำความสะอาดผ้า หลายงานวิจัยระบุว่าเอนไซม์ EG III พบได้หลากหลายแหล่ง แต่เอนไซม์ EG III จาก *Trichoderma reesei* มีความเหมาะสมเมื่อใช้ผสมในผงซักฟอก โดยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* และ *Trichoderma harzianum* ซึ่งเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์จากธรรมชาติ มีความนิยมใช้ในงานด้านอุตสาหกรรมใกล้เคียงกับเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* เอนไซม์เซลลูเลสจากราในสปีชีส์ *Humicola* (*Humicola insolens* และ *Humicola griseothermoidea*) สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ดี เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนและมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง จึงเหมาะสมต่อการเติมลงไปในการซักล้างหรือผงซักฟอก

3. อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและกระดาษ

ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและกระดาษนั้น ใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส (hemicellulases) ในการเปลี่ยนสภาพเยื่อกระดาษเชิงกลอย่างหยาบ ช่วยในการฟอกสีกระดาษ (de-inking) และช่วยในการแยกน้ำ (drainage) เพิ่มความสามารถในการบดกระดาษ ช่วยในการกำจัดหมึกที่ปะปนในกระดาษ โดยเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ยังประยุกต์ใช้กับเยื่อกระดาษในด้านอื่นๆ ด้วยการใส่เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษแข็งทางชีวภาพอย่างง่าย ใช้ในการผลิตกระดาษเช็ดมือและกระดาษชำระ อีกทั้งเอนไซม์เซลลูเลสเองยังเป็นตัวช่วยกำจัดสิ่งติดอยู่กับกระดาษได้ด้วย

4. อาหารและอาหารสัตว์

มีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมอาหาร ในกระบวนการการสกัดและทำให้น้ำผักและน้ำผลไม้ใส ใช้ผลิตเนกต์อาร์ (fruit nectars) และน้ำผลไม้เข้มข้น (fruit purees) และใช้ในการสกัดน้ำมันมะกอก สำหรับเอนไซม์กลูคาเนส (glucanases) เป็นอีกหนึ่งเอนไซม์ที่ใช้เติมลงไปในการผลิตเบียร์และผลิตไวน์ เพื่อปรับปรุงการออกของข้าวบาร์เลย์ เพิ่มความชุ่มชื้นแช่ (maceration) และสกัดสีด้วยการใช้เอนไซม์เอกโซจีนัส เฮมิเซลลูเลส (exogenous hemicellulases) และเอนไซม์กลูคาเนส (glucanases) เอนไซม์เซลลูเลสยังใช้ในการสกัดคาร์โรทีนอยด์ (carotenoid extraction) ในกระบวนการผลิตสารให้สี (food coloring agents) และยังพบการใช้เอนไซม์เฮมิเซลลูโลสผสมกับเอนไซม์เพคตินเนส (pectinase) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสในการปรับปรุงคุณภาพอาหารสัตว์ อีกทั้งยังพบรายงานการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma* ในการปรับปรุงให้อาหารสัตว์มีการย่อยได้ดีขึ้น ด้วยการผสมให้เป็นวัตถุเติมในอาหาร (feed additives) ช่วยปรับปรุงอัตราการ

เปลี่ยนอาหาร (feed conversion ratio) และเพิ่มความสามารถในการย่อยอาหารสัตว์จากเมล็ดธัญพืช (Saranraj *et al.* 2012)

2.9 ยีสต์

ยีสต์ เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยว มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดี่ยวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่า ยีสต์ต่างจากสาหร่ายเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และไม่เหมือนโพรโทซัวเพราะมีผนังเซลล์ที่แข็งแรง นอกจากนี้ยังแตกต่างไปจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ เพราะมีขนาดใหญ่กว่า และสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันด้วย

โดยทั่วไปขนาดของเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าแบคทีเรีย แต่ยีสต์ที่ขนาดเล็กที่สุดก็ยังไม่ใหญ่เท่าแบคทีเรียที่ใหญ่ที่สุด ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ ความกว้าง 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 5-30 ไมโครเมตร หรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์แต่ละชนิดจะมีรูปร่างโดยเฉพาะ แม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังคงมีความแตกต่างที่ขนาดและรูปร่างของแต่ละเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีแฟลกเจลลาหรืออวัยวะอื่นในการเคลื่อนที่ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552)

ยีสต์สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้าง และมีแอลกอฮอล์สูงถึงร้อยละ 18 ยีสต์หลายชนิดเจริญในที่ที่มีน้ำตาลซูโครสสูงถึงร้อยละ 55-60 โคโลนีของยีสต์มีสีต่างๆ จากสีครีมจนถึงสีชมพูและแดง (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549)

ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โคโลนีของยีสต์มีขนาด รูปร่าง โครงสร้าง และขอบแตกต่างกัน เช่นเดียวกับแบคทีเรีย บางชนิดอาจมีโคโลนีเรียบ บางชนิดขุ่น ขรุขระ บางชนิดแบนราบ หรือนูนสูงชัน บางชนิดขอบเรียบ บางชนิดขอบไม่แน่นอนหรือคล้ายเส้นขน โคโลนีอายุน้อยมีความหนืดคล้ายแป้งเปียก เมื่ออายุมากขึ้นจะยิ่งหนาและแห้งมากขึ้น และอาจสร้างรงควัตถุด้วย การเจริญในอาหารเหลวมีลักษณะสำคัญ บางชนิดเจริญที่ก้นหลอดและตกตะกอน บางชนิดเจริญอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งหลอด บางชนิดเจริญเฉพาะผิวหน้าอาหาร เป็นแผ่นหรือฟิล์มปกคลุม (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552) โคโลนีของยีสต์ จะมีสีต่างกันตามชนิด เช่น ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง, ผลิตแอลกอฮอล์ หรือทำเบียร์จะมีสีขาวนวล หรือครีม ได้แก่ *Saccharomyces cereviceae* ยีสต์บางชนิดมีสีส้มแดง เช่น *Sporoboromyces*, *Rhodotolura* บางชนิดมีสีดำเข้ม เช่น *Aureobasidium* เป็นต้น (วันเจริญ โภธาเจริญ. 2551) จีโนมของยีสต์มีขนาด 1.4×10^7 คู่เบส หรือประมาณ 3 เท่าของ *E. coli* ประกอบด้วยโครโมโซม 17 โครโมโซม และชิ้นส่วนดีเอ็นเออีก 3 ชิ้น ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้ทันทีโดยใช้เทคนิค pulse field gel electrophoresis จีโนมของยีสต์มีส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำอยู่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการศึกษาปัจจุบันพบว่ามีเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ของจีโนมเท่านั้นที่เป็นยีนที่

จำเป็น กระบวนการต่างๆ ภายในยีสต์ ตลอดจนสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆ ได้ศึกษาเป็นอย่างดี สำหรับยีสต์ยังไม่พบไวรัสที่จำเพาะกับยีสต์ (สุรินทร์ ปิยะ โขคณากุล. 2548)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มีมนุษย์นำมาใช้ เริ่มจากการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่มีเมื่อประมาณ 7,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช ต่อมามีการใช้ยีสต์ในการผลิตไวน์ และขนมปัง ปัจจุบันมีการใช้ยีสต์ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากการหมักในอุตสาหกรรมมาชนิดขึ้น อุตสาหกรรมที่มีการผลิตปริมาณมากคือ เบียร์ ไวน์ ยีสต์ขนมปัง โปรตีนเซลล์เดี่ยวและยีสต์อาหารสัตว์ (สาวิตรี ลิมทอง. 2556) การหมักน้ำผลไม้ การทำให้ขนมปังขึ้นฟู ทำให้อาหารบางชนิดมีคุณค่าทางอาหาร การสังเคราะห์สาร เช่น วิตามิน ไขมัน และ โปรตีน จากน้ำตาลอย่างง่ายและแอมโมเนียในโตเจน นอกจากนี้ยังใช้ยีสต์เพื่อการศึกษาทางด้านชีวเคมีพื้นฐาน และกระบวนการทางเมแทบอลิซึมของยูคาริโอติกเซลล์ (นงลักษณ์ และ ปรีชา. 2552)

การใช้ประโยชน์จากยีสต์ในปัจจุบัน

1. ทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก อุ สาโท และกระแช่

2. ทางด้านการประมง หรือ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงอาหารธรรมชาติ เพราะยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมาก คือมีขนาดประมาณ 3-4 ไมครอน และสามารถดำเนินการเพาะเลี้ยงได้ค่อนข้างง่ายมากคือ ใช้ภาชนะขนาดเล็ก ใช้เวลาเพาะขยายพันธุ์ค่อนข้างเร็วเพียง 2-3 วัน อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงจัดเตรียมได้ง่าย คือใช้เฉพาะแป้งและน้ำตาล (ประภาส โฉลกพันธุ์รัตน์. 2553)

3. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ และวีสกี

4. ผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ เช่น ยีสต์ขนมปัง ยีสต์อาหารคน และยีสต์อาหารสัตว์

5. ผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามินบี และวิตามินดี เอนไซม์ เช่น อินเวอร์เทส แลกเทส และไลเพส (สาวิตรี ลิมทอง. 2549)

2.10 ยีสต์ *Kluyveromyces lactis*

Kluyveromyces lactis จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ในแฟมิลี Saccharomycetaceae จินัส *Kluyveromyces* เป็นยีสต์ที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเริ่มแรกถูกเรียกว่า *Saccharomyces lactis* (Barnett et al. 2000) ในปี 1984 ได้มีการจำแนกหมวดหมู่ใหม่โดยให้ชื่อใหม่ว่า *K. lactis* โดยยีสต์ทั้งสองมีสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน เพียงแต่ *K. lactis* มีขนาดเซลล์เล็กกว่า *S. cerevisiae* แต่ยีสต์ทั้งสองมีความแตกต่างกันทางสรีรวิทยาในการใช้น้ำตาลในกระบวนการเมแทบอลิซึม โดย *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ในผลไม้ที่กำลังเน่าที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอทานอลโดยใช้ออกซิเจนเป็นผลพลอยได้จากการเผาผลาญเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงกระบวนการที่เรียกว่า "Crabtree effect" ในทางกลับกัน *K. lactis* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แลคเตส (lactase) ค่อนข้างสูง ซึ่งเอนไซม์แลคเตสสามารถย่อยน้ำตาลแลคโตส

ในน้ำนม ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และแลคโตส โดยจะไม่พบเอนไซม์แลคเตสในยีสต์ *S. cerevisiae* ดังนั้น *K. lactis* จึงมักพบได้ในการหมักผลิตภัณฑ์นม ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสปริมาณสูง อีกทั้งยีสต์ *K. lactis* โดยมากพบว่าแยกได้จากผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต (yogurt) ชีส (cheese) และบัตเตอร์มิลค์ (buttermilk) และยีสต์ *K. lactis* จะไม่สามารถผลิตเอทานอลในสภาวะมีอากาศได้

เซลล์ของยีสต์ *K. lactis* มีรูปร่างกลม (spherical) ถึงรี (oval) ขนาดค่อนข้างเล็กกว่า *S. cerevisiae* (Entian and Barnett, 1983) *K. lactis* เป็นยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding yeast) และสร้างสปอร์ที่มีรูปร่างกลม เป็นอีกหนึ่งในสองสปีชีส์ที่พบในอาหารประเภทผลิตภัณฑ์นม บางสปีชีส์สร้างเอนไซม์ β -galactosidase ที่หมักน้ำตาลนม (lactose) ทำให้เกิดฟอง พบในหางนม (whey) และในผลไม้หลายชนิด เป็นราที่มักจะทำให้เนยแข็งเสีย (สุ่มฉา วัฒนสินธุ์, 2549) ยีสต์ *K. lactis* สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40°C (D' Amore *et al.* 1989)

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีสต์ *K. lactis* นานกว่าทศวรรษ และเป็นที่ยอมรับกันดีว่ามีความปลอดภัย ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Bonekamp and Oosterom, 1994) ตั้งแต่ปี 1950 มีการนำยีสต์ *K. lactis* ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์แลคเตส (β -galactosidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในน้ำนม ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์นมที่ปราศจากน้ำตาลแลคโตส โดยในปี 1960 ได้นำ *K. lactis* มาใช้เป็นโปรตีนเสริมในอาหารในรูปแบบโปรตีนแห้ง และทำให้หมดฤทธิ์ ในปี 1980 ยีสต์ *K. lactis* เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาใช้ในการถ่ายโอนยีน (transformation) (Das and Hollenberg, 1982) นำไปสู่การพัฒนาประสิทธิภาพการเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของ heterologous protein ยีสต์ *K. lactis* ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการแสดงออก เป็นที่รู้จักกันดีสำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์โคโมซินทางการค้า ทำให้น้ำนมวัวตกตะกอน (Van den Berg *et al.* 1990) ยีสต์ *K. lactis* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในปี 1993 ปัจจุบันพบว่ามีโปรตีนมากกว่า 40 ชนิด ที่ถูกผลิตด้วยยีสต์ *K. lactis* และได้มาจาก แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการเป็นเซลล์เจ้าบ้านของ *K. lastis* ที่สามารถผลิตโปรตีนได้หลากหลาย มีข้อดีมากมาย (Dujon *et al.* 2004) อีกทั้งเอนไซม์ที่ได้จาก *K. lastis* ยังมีความปลอดภัยตาม GRAS สามารถใช้ในงานด้านอาหาร และได้มีการพัฒนาเป็นชุด kit ทางการค้าพร้อมใช้เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนใน *K. lastis* ด้วยความร่วมมือของ New England Biolabs กับ DSM (Ooyen *et al.* 2006)

ยีสต์ *K. lactis* สามารถผลิต r-protein ได้โดยการเหนี่ยวนำของโปรโมเตอร์ *LAC4* ซึ่งถูกควบคุมโดยน้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่ำ และมีความสามารถในการใช้สับสเตรทที่มีราคาถูกลงอย่างน้ำตาลแลคโตส และหางนมได้ โดยยีสต์ *K. lactis* เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยตาม GRAS (Generally Recognized As Safe) และสามารถในการหลังโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (Wésolowski-Louvel *et al.* 1996) ทราบลำดับเบสของจีโนมที่สมบูรณ์ (Dujon *et al.*

2004) และนำมาใช้ในทางการค้า ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากบริษัท NEB (Colussi and Taron. 2005) ถึงแม้ว่าจากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้จะนิยมศึกษา *K. lactis* สายพันธุ์ CBS 2359 ที่ตำแหน่ง MAT α mating แต่สายพันธุ์ wild-type haploid strain GG799 นำมาใช้เป็นชุด Kit ทางการค้า ในปัจจุบันได้รับการยอมรับในการใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Çalik and Çalik. 2011)

2.11 การใช้ยีสต์ *Kluyveromyces lactis* ในอุตสาหกรรม

โปรตีนส่วนมากที่ผลิตได้จากยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีการหลั่งออกนอกเซลล์ *Kluyveromyces lactis* เป็นยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โดยการหลั่งออกนอกเซลล์ (secreted enzyme) และผลิตภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ในระดับอุตสาหกรรมของ DSM เช่น เอนไซม์ brovine prochymosin ที่ทำให้น้ำนมตกตะกอน (van den Berg *et al.* 1990) อีกทั้งเอนไซม์แลคเตสที่ผลิตโดยยีสต์ *K. lactis* มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมและมีการจำหน่ายภายใต้ชื่อทางการค้า Maxilact™ (DSM Food Specialties, Delft, The Netherlands) เอนไซม์ที่ผลิตจากยีสต์ชนิดนี้จัดอยู่ในระดับความปลอดภัย GRAS (Generally Recognized as Safe) และยังเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นมส่วนใหญ่ โดยการย่อยน้ำตาลแลคโตสในน้ำนม จึงมีประโยชน์ต่อผู้ที่บริโภคผลิตภัณฑ์นมที่ปราศจากน้ำตาลแลคโตส การใช้ยีสต์ *K. lactis* เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการแสดงออกของโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารสามารถนำไปใช้ในการผลิตโปรตีนที่ใช้ในการรักษา (therapeutic) ในทางอุตสาหกรรมการผลิตยา และยังพบว่ายังมีโปรตีนอีกมากที่เกี่ยวข้องในการผลิตยาซึ่งถูกผลิตจากยีสต์ *K. lactis*

โปรตีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่ผลิตได้จาก *K. lactis* ในปริมาณสูง ได้แก่ interleukin 1- β , interferon α A, β -lactoglobulin, lysozyme, macrophage colony stimulating factor, serum albumin และ insulin precursor (Feng *et al.* 1997) โดยยีสต์ *K. lactis* ยังมีความสามารถในการผลิตสารแอนติบอดี single-chain Fv (Swennen *et al.* 2002; Robin *et al.* 2003; van Ooyen *et al.* unpublished) แต่มีข้อเสียอย่างหนึ่งในการใช้ยีสต์ *K. lactis* รวมทั้งยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ และเชื้อราเป็นระบบการแสดงออก สำหรับการผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการรักษา เนื่องจากโปรตีนที่ถูกหลั่งออกมาจะต้องผ่านกระบวนการ glycosylation ซึ่งมีรูปแบบไม่เหมือนในมนุษย์ อาจมีผลต่อครึ่งชีวิต (half-life) ของเนื้อเยื่อและความสามารถในการชักนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโปรตีนที่ใช้ในการรักษา อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ในกระบวนการ glycosylation จากมนุษย์ในยีสต์ (Gemgross. 2004) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่จะช่วยให้การผลิตโปรตีนที่ใช้ในการรักษาในยีสต์ และอาจนำไปใช้ประโยชน์ได้

ประสิทธิภาพของยีสต์ *K. lactis* ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีอย่างไม่จำกัด สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้มากมาย ในปี 1960 ยีสต์ *K. lactis* ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเด็ก ระหว่างสงครามไบอาฟรา (Biafra war) (Bonekamp and Oosterom. 1994) อีกทั้ง *K. lactis* ที่ใช้ทาง

การค้ายังสามารถผลิตเอนไซม์อินลูนิเนส (Laloux *et al.* 1991), เอนไซม์ฟอสโฟไลเปส บี (phospholipase B) (Oishi *et al.* 1999) และเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) (Colussi *et al.* 2005)

2.12 ยีนเซลล์ลูเลส Cel5_A24

วิทิตา สาริตโกวิทชัย (2554) ได้ทำการคัดแยกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลล์ลูเลสจากแบคทีเรีย ในกระเพาะหมักของกระบือปลัก โดยการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสแฟมิลีที่ 5 ในแบคทีเรีย เพื่อเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสกับฐานข้อมูลยีนพบว่าโคลนที่ได้ 10 โคลน มีบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์เซลล์ลูเลสในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส แฟมิลีที่ 5 จากนั้นทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของโคลน Cel5_A24 ด้วยเทคนิค genome walking ที่ใช้ปฏิกิริยาด้วย Ligation-mediated PCR ซึ่งสามารถหาชิ้นส่วนยีนเพิ่มเติมจากเดิมได้ทางด้าน upstream และพบจุดเริ่มต้นของยีนเซลล์ลูเลส Cel5_A24 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ยาว 2,253 คู่เบส แปลรหัสเป็นโปรตีนความยาว 751 กรดอะมิโน มีขนาดโปรตีนประมาณ 85 kDa ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ายีนมีความคล้ายคลึงกับเซลล์ลูเลสจากเชื้อ *Ruminococcus albus* 77% ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส แฟมิลีที่ 5 เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ Cel5A_24 พบว่ามี signal peptide ยาว 33 และพบว่ายีนนี้เป็นยีนที่มีโครงสร้างในแบบเซลล์ลูโลโซม (cellulosome) มีส่วนของ dockerin และ carbohydrate binding domain (CBM_4_9) ทำการแสดงออก Cel5_A24 แบบ mature gene ได้ โดยใช้เวกเตอร์ pET28a(+) เป็นเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก และ *E. coli* Rosetta (DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โปรตีนที่ได้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble protein) เมื่อทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อซับสเตรท CMC พบว่าทำงานได้ดีที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 30°C มีค่า $V_{max} = 209.83 \pm 13.40$ U/mg และ $K_m = 4.38 \pm 0.87$ mg/ml เอนไซม์สามารถย่อย CMC ได้ดี แต่ย่อย Avicel ได้น้อย จึงจัดอยู่ในกลุ่ม endoglucanase

2.13 การผลิตเอนไซม์ลูกลผสมในยีสต์ *Kluyveromyces lactis*

Wamalwa *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *xynIIA* ที่ได้มาจาก *Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-125 ที่ถูกแสดงออกในยีสต์ *K. lactis* สายพันธุ์ CBS 1065 และหลังที่ระดับ 156 $\mu\text{g/ml}$ ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในฟลาสที่เขย่า ยีน *xynIIA* มีระดับการผลิตในฟลาสที่เพาะเลี้ยงมีการเขย่าในยีสต์ *K. lactis* CBS 1065 สูงกว่าที่มีการรายงานสำหรับยีน xylanase อื่นๆ ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ LAC4 พลาสมิดประกอบด้วยลำดับเบสทั้งหมดของ pKD1 จาก *Kluyveromyces drosophilarius* ลูกผสม *XynIIA* มีการทำงานสูงมากในช่วง pH 3.0-10.0 ซึ่งกิจกรรม

การทำงานสูงที่สุดที่ pH 7.0 เอนไซม์มีการแสดง specific activity 628 U/mg-protein ต่อสับสเตรท birchwood xylan แต่ไม่มีกิจกรรมของเซลลูเลสหรือ β -xylosidase

Feng *et al.* (2010) กล่าวว่า ไคโมซิน (chymosin) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สำคัญ นิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตชีส ยีสต์ *K. lactis* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน ไคโมซิน เมื่อใช้ยีสต์ *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อศึกษาการแสดงออกของไคโมซิน พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ (80 U/mL เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า) คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจาก codon usage ของเซลล์เจ้าบ้านผิดพลาด จึงมีผลทำให้การแปลรหัสและการผลิตไคโมซินไม่ประสิทธิภาพได้ ดังนั้นเพื่อจะปรับปรุงประสิทธิภาพการแสดงออกของไคโมซินลูกผสมที่แสดงออกใน *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 คณะผู้วิจัยได้ออกแบบและสังเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดการสร้างไคโมซินด้วย optimized codon ที่มีค่า G+C content ค่อนข้างต่ำ และได้ปรับเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ 333 bp เพื่อให้โคดอนที่ต้องการ สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 315 ตัว เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์สภาวะเขย่า (shaking flask) พบค่ากิจกรรมไคโมซินอยู่ที่ 575 U/ml ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้มีการทำ optimized gene ถึง 7 เท่า เมื่อนำรีคอมบิแนนต์ไคโมซินที่ทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 35.6 kDa ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับไคโมซินของลูกวัวดั้งเดิม (native calf chymosin) ที่ไม่ได้ optimized codon เมื่อนำ α -casein, β -casein และ κ -casein บ่มร่วมกับไคโมซินลูกผสมที่แสดงออกใน *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 หรือ ไคโมซินจากกระเพาะลูกวัว และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าไคโมซินลูกผสม และ native calf chymosin สามารถย่อย κ -casein ได้ ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าการใช้ optimized codon ของยีนไคโมซินจากลูกวัว เป็นการปรับปรุงประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนในเซลล์เจ้าบ้าน *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 อีกทั้งการปรับปรุงทางพันธุวิศวกรรม (genetic manipulation) ด้วยการใช้ optimized codon เป็นการประยุกต์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตไคโมซินในระดับอุตสาหกรรม

Thomas *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ไซเลนเนสลูกผสม ยีน XynD และ XynA ที่ทนต่อค่าและทนต่อความร้อน ที่แยกได้จาก *Bacillus pumilus* MTCC5015 โดยใช้เวกเตอร์ pKLAC1 ถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ *K. lactis* และศึกษานำเอนไซม์เหล่านี้มาใช้ในการกำจัดหมึกจากกระดาษที่เป็นของเสียในเขตเทศบาล จากผลการทดลองพบว่ามีประสิทธิภาพสูงที่มีประสิทธิภาพซึ่งพบว่ามีค่ากิจกรรมสูงกว่าเดิมถึง 3 เท่า เอนไซม์มีการแสดงออกดีที่สุดเมื่อเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 2.5% และค่า pH 9.0 ซึ่งเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified enzyme) แสดงให้เห็นค่ากิจกรรมที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 50°C และ 60°C ที่ค่า pH 9.0 และ 10.0 ตามลำดับ โดยที่ pH 12.0 ยังคงมีค่ากิจกรรมเอนไซม์อยู่ที่ 74% และ 26% หลังจากบ่มไว้ 2 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50°C และ 60°C นาน 1 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ 100% และเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C พบค่ากิจกรรมเอนไซม์

คงเหลือ 23% เอนไซม์ลูกผสมที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถกำจัดหมึกที่อยู่ในกระดาษเลเซอร์ที่เป็นของเสียได้สูง (273%) มากกว่า crude xylanase จาก *Bacillus* และเอนไซม์ทางการค้าในสภาวะกรด โดยเอนไซม์ไซลานเนสที่ได้มีสมบัติความคงทนที่ค้ำเยี่ยม ซึ่งเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ

Ushasree *et al.* 2014 ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน phytase (phyA) เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตสที่ทนความร้อน (thermostable phytase) ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* NII 08121 โดยใช้เวกเตอร์ pKLAC1 ถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ *K. lactis* GG799 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการหลั่งของเอนไซม์ลูกผสมเท่ากับ 198 U ml^{-1} จากการวิเคราะห์ในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 22°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Purified enzyme) โดยจะมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 72 U mg^{-1} และเมื่อตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนมีขนาดโมเลกุล $\geq 140 \text{ kDa}$ โดยอุณหภูมิเหมาะสมที่ 55°C และพบว่ามีค่า pH ที่เหมาะสมสองช่วงที่ pH 2.5 และ pH 5.5 โดยเอนไซม์มีความคงทนต่อเปปซิน (pepsin) โดยพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ยังคงเหลือ 60% เมื่อบ่มร่วมกับเปปซินในสัดส่วน 1:1000 เอนไซม์มีความสามารถทนต่อความร้อนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ 69% และ 37% ที่อุณหภูมิ 90°C และ 100°C นาน 10 นาที ตามลำดับ และยังมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเดิมแม้ทิ้งไว้ในสภาวะเดิมจนถึง 1 ชั่วโมง การศึกษา deglycosylation แสดงให้เห็นผลกระทบเพียงเล็กน้อยของ N-linked glycans คุณสมบัติทางความร้อน ในการทำ multiple sequence alignment พบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนแอสพาราจिन (Asn) ที่ตำแหน่ง 345 ซึ่งอาจเป็นตัวแทนสมบัติคงทนต่ออุณหภูมิสูง สำหรับการมีสมบัติความคงทนของเอนไซม์ phytase ต่ออุณหภูมิสูง ทำให้เอนไซม์ในงานวิจัยนี้มีสมบัติที่ดีกว่าเอนไซม์ phytase ทางการค้าที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน

Zhan *et al.* 2014 กล่าวว่า เอนไซม์ไซแลนเนสสามารถใช้แทนสารเคมีเติมแต่งในการปรับปรุงปริมาณและคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของขนมปังในการอบ เอนไซม์ไซแลนเนสเหมาะสมในการปรับปรุงผลผลิตจะส่งเสริมการใช้เอนไซม์ไซแลนเนสในอุตสาหกรรมการอบ ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ xylanase XYNZG ที่ได้จาก *Plectosphaerella cucumerina* ให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* อย่างไรก็ตาม *P. pastoris* ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นโฮสต์ (host) สำหรับผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส ที่ใช้ในขั้นตอนการอบ เนื่องจาก *P. pastoris* เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีความปลอดภัยตาม GRAS (Generally Regarded As Safe) และยังคงมีการเมทานอลในระหว่างการหมักปริมาณมาก ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร สำหรับยีสต์ *Kluyveromyces lactis* เป็นโฮสต์ที่ใช้ในการแสดงออก เนื่องจากมีความปลอดภัยตาม GRAS จึงนิยมใช้ในงานทางด้านอาหารและอาหารสัตว์ ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาเอนไซม์ xylanase ยีน xynZG จาก *P. cucumerica* ให้มีการแสดงออกในยีสต์ *K. lactis* เมื่อถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ *K. lactis* แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD ที่มี 1% RBB xylan (Remazol Brilliant Blue-xylan) ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสล้อมรอบกว้างๆ และนำไปเลี้ยงในพลาสติกที่มีอาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

และตรวจสอบขนาดโปรตีนลูกผสมด้วยวิธี SDS-PAGE และ zymograms analysis ซึ่งโปรตีนมีขนาดประมาณ 19 kDa จากผลการทดลองพบค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 115 U/mL ที่ 72 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YLPU เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไซแลน โดย XYNZG ส่วนใหญ่คือ ไซโลไบโอส (xylobiose) และ ไซโลทรีโอส (xylotriose) ผลของการทดลองในการอบแห้งให้เห็นว่าเมื่อเติมเอนไซม์ xylanase XYNZG ช่วยลดระยะเวลาในการนวดแป้ง เพิ่มปริมาณขนมปัง ปรับปรุงเนื้อสัมผัส และมีผลในเชิงบวกต่อการทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมปัง

2.14 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในยีสต์

Hong *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษายีสต์ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ NBRC 1777 ระบุว่า เป็นยีสต์ที่ทนร้อนและมีการพัฒนาเป็น โฮสต์ เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนเซลลูเลสที่ทนร้อน มีการคัดแยกยีนที่ทนร้อน endo- β -1,4-glucanase, cellobiohydrolase และ β -glucosidase ถ่ายเข้าไปยังโครโมโซมของยีสต์ *K. marxianus* และประสบความสำเร็จในการแสดงออก ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกสูง ลูกผสม *K. marxianus* ที่มีการแสดงออกของยีน cellulase มีความสามารถที่เจริญเติบโตได้ในอาหาร synthetic medium ประกอบด้วย cellobiose หรือ carboxymethyl-cellulose ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สายพันธุ์ลูกผสม มีการผลิตเอทานอล 43.4 g/L จาก 10% cellobiose

Guo *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ endo- β -1,4-glucanases จำนวน 2 ยีนคือ *eg27I* และ *eg27II* ที่ได้จากหอย (*Ampullaria crosseana*) ที่มีการแสดงออกในยีสต์ *Pichia Pastoris* นำ recombinant protein ที่มี His₆-tagged ติดอยู่แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีขั้นต้นคนเดียว (single chromatography step) โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ลูกผสม EG27I และ EG27II เท่ากับ 15.31 U/mg และ 12.40 U/mg ตามลำดับ เมื่อใช้ carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC-Na) เป็นซับสเตรต เอนไซม์ลูกผสม EG27I และ EG27II มีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5 และ 5.5-6.0 ตามลำดับ และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50°C และ 50-55°C ตามลำดับ และเอนไซม์ EG27I และ EG27II ความสามารถทนภาวะความเป็นกรด-ด่างสูงที่สุดที่ pH 8.0 และความสามารถในการทนความร้อนได้สูงถึง 40°C

Song *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษา ยีน *cbhI* และ *cbhII* ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ cellobiohydrolase ได้จากเชื้อรา *Trichoderma viride* AS3.3711 และ *T. viride* CICC 13038 ตามลำดับ ด้วยเทคนิค RT-PCR สำหรับยีน *cbhI* แยกได้จาก *T. viride* AS3.3711 มีขนาด 1542 คู่เบส และแปลรหัสได้ 514 กรดอะมิโนตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 53.96 kDa และยีน *cbhII* แยกได้จาก *T. viride* CICC 13038 มีขนาด 1413 คู่เบส แปลรหัสได้ 417 กรดอะมิโน โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 49.55 kDa CBHI มีความเหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase family 7 และ CBHII

เหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 6 CBHI และ CBHII สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลกลูโคสด้วยการทำลายพันธะระหว่างไคแซคคาร์ไรด์เซลโลไบโอส (disaccharide cellobiose) ทางค้ำ non-reducing ของปลายสายเซลลูโลส งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ cellobiohydrolase ทั้ง CBHI และ CBHII ให้มีการแสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* H158 โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ Sc-cbhI และ Sc-cbhII มีค่าสูงที่สุดเมื่อเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.03 และ 0.089 unit ml⁻¹ ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ลูกผสม CBHI และ CBHII คือ 60°C และ 70°C ตามลำดับ และมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ CBHI และ CBHII คือ pH 5.8 และ 5.0 ตามลำดับ

Jin *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและสมบัติของเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanases ยีน *celE* ที่ได้จากเชื้อรา *Orpinomyces* PC-2 ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ alcohol oxidase (alcohol oxidase promoter; AOX1) โดยใช้พลาสมิด pPIC9K และถ่ายยีนไปเข้าสู่จีโนมของยีสต์ *P. pastoris* GS115 ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตโดยวิธี electroporation งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanase สูงสุด และกำหนดชื่อใหม่ว่า *P. pastoris* egE และเพาะเลี้ยงเชื้อในพลาสติกที่มีการเขย่า และนำเชื้อมาปั่นตกตะกอนเซลล์ เก็บส่วนใส (culture supernatant) มาตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาด 52 kDa นอกจากนี้ลูกผสม *P. pastoris* egE ยังสามารถใช้ sodium carboxymethyl cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เอนไซม์ลูกผสมที่ผลิตโดย *P. pastoris* แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่สภาวะ pH 6.0 และอุณหภูมิที่ 45°C แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanase เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในอุณหภูมิปานกลาง และ pH กลางๆ ที่เหมาะในการนำไปใช้ในขั้นตอนการล้างทำความสะอาดชิ้นเนื้อในขั้นตอนสุดท้าย จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ในพลาสติกสภาวะเขย่าด้วยความเข้มข้นเมทานอล 1% ซึ่งเป็นระดับที่นิยมเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบค่ากิจกรรมเอนไซม์ endo-β-1,4-glucanase มีค่าสูงสุดเท่ากับ 72.5 IU mL⁻¹ ที่ชั่วโมง 96 ซึ่งเอนไซม์ลูกผสม มีศักยภาพทั้งในงานด้านวิชาการและการประยุกต์ไปใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทออีกด้วย

Li *et al.* (2011) ได้ศึกษาการแสดงออกในระดับสูงของยีนแอลฟาอะไมเลสที่ได้จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายและใช้แป้งสำหรับการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี ถ่ายยีนแอลฟาอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ *Kluyveromyces lactis* ได้ผลผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดคือ 22.4 U/ml เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C ที่ pH 7.0 ในอาหารที่มีการแลกโตส นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่ายีสต์ลูกผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งให้ผลผลิตสุดท้าย เท่ากับ 12.25 g/l และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ที่ 11 U/ml อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีแป้งอยู่ 20 g/l ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

Quay *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน endoglucanase, *EgIA* ที่ได้มาจาก *Aspergillus niger* ATCC 105874 ได้มีการแสดงออกในยีสต์สายพันธุ์ *Pichia pastoris* และคุณสมบัติ

ของโปรตีนลูกผสมที่มีลักษณะพิเศษ full length cDNA ของยีน *eglA* ได้ทำการโคลนเข้าไปยัง pPICZαC เป็นเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออก และมีการหลั่งออกนอกเซลล์ในยีสต์ *Pichia pastoris* ได้โปรตีนลูกผสมประมาณ 30 kDa ยีน *EglA* มีการแสดงออกค่าที่เหมาะสมสำหรับการทำงานอยู่ที่ 50°C และเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิระหว่าง 30°C และ 55°C เอนไซม์ทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้ในช่วง pH 2.0-7.0 และค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ pH 4.0 ยีน *EglA* แสดงให้เห็นถึงการเข้าจับต่อ β-glucan ดีที่สุดตามด้วย CMC ซึ่งค่าจำเพาะการทำงานที่ 63.83 และ 9.47 ตามลำดับ ส่วน cellobiose, laminarin, filter paper และ avicel ได้ค่าที่ต่ำมากหรือไม่สามารถตรวจสอบการย่อยได้ ธาตุทั้งหลายที่แตกตัว (metal ions) เช่น Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} และ K^{+} ส่งเสริมการทำงาน endoglucanase อย่างเห็นได้ชัดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งธาตุแมงกานีสทำให้ปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นในการทำงานประมาณ 2.7 เท่า เมื่อเทียบกับตัวควบคุม ขณะที่ Pd^{2+} , Cu^{2+} , SDS และ EDTA แสดงให้เห็นว่ายับยั้งการทำงานของยีน *EglA*

Akbarzadeh *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน endoglucanase II (*eglII*) ที่ได้จาก *Trichoderma reesei* ถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* เอนไซม์ลูกผสมมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่สภาวะ pH 4.8 และอุณหภูมิ 75°C และยังคงแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีความสามารถทนต่อความร้อนเมื่ออุณหภูมิสูง กิจกรรมเอนไซม์มีค่า pH ในช่วงกว้าง คือ pH 3.5-6.5 การเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารที่หมักในฟลาสก์ที่เขย่า โปรตีนลูกผสมมีการแสดงออกที่สภาวะที่เหมาะสม (pH 7.0, อุณหภูมิ 25°C และเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 1%) นาน 72 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส 2,358.8 U/ml สรุปได้ว่า *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกในระดับสูงของยีน endoglucanase ซึ่งมีความสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีขึ้น

Fang *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษา ยีน xylanase จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 11 ที่ได้จาก *Aspergillus niger* IA-001 เรียกว่า *xynB* และให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* แปลรหัสได้ 225 กรดอะมิโน โดยใช้เวกเตอร์ pPICZαA ถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* X-33 ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ alcohol oxidase I (AOX1) ยีน *xynB* เชื่อมต่อกับ α-factor signal peptide (pPICZαmA) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซเลนเนสลูกผสม ซึ่งวัดได้ 1280 U ml⁻¹ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า 1.5 เท่า เมื่อถูกแทรกเข้าไปในเวกเตอร์ pPICZαA และมีค่าสูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์ native xylanase จากสายพันธุ์ดั้งเดิม 19.39 เท่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 10 L หลังจาก 114 ชั่วโมง ทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซเลนเนสลูกผสมได้ 10,035 U ml⁻¹ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โปรตีน *xynB* ที่บริสุทธิ์ พบว่ามีเพียงแถบเดียวซึ่งมีขนาด 24 kDa สามารถย่อยสับสเตรท beechwood xylan ได้ดีที่สุดในบัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50°C โดยมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1916 U mg⁻¹ ยิ่งไปกว่านั้น *xynB* ยังมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในช่วง pH กว้าง ตั้งแต่ 2.2-10.0 และเอนไซม์มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 4.429 mg mL⁻¹ และ 1429 U mg⁻¹ ตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

รายละเอียดการเตรียมสารละลาย อาหารเลี้ยงเชื้อ และแผนที่เวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง สำหรับทำการโคลนยีนที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ จะแสดงในภาคผนวก ก

3.1 ที่มาของยีน

3.1.1 ยีนที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

ยีนเซลล์ลีสที่ใช้ในการศึกษา คือ *cel5_A24* แบบ mature gene ซึ่งจำแนกได้จาก แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะหมักของกระบือปลัก มีขนาด 2,163 bp จาก วิชา สาริต โกวิตชัย (2554)

3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับการย้ายฝาก เวกเตอร์ pTZ57R/T (fermentas, Canada)

3.1.3 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

ยีสต์ *Kluyveromyces lactis* สายพันธุ์ GG799 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับศึกษาการ แสดงออกของยีน (*K. lactis* Protein Expression Kit, New England Biolab, USA)

3.2 เวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

pTZ57R/T vector (Fermentas, Canada) ที่ใช้สำหรับเป็น โคลนนิ่งเวกเตอร์

pKLAC2 vector (New England Biolab, USA) ใช้เป็น expression vector สำหรับการ แสดงออกของโปรตีนใน *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 (New England Biolab, USA) โดยมีโปรโม เตอร์ LAC4 เป็น โปรโมเตอร์ที่เหนี่ยวนำการแสดงออกด้วยน้ำตาลกาแลคโตส

3.3 การถ่ายยีนเซลล์ลีสเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

ยีนเซลล์ลีส *cel5_A24* ที่เชื่อมต่อไว้ในเวกเตอร์ pTZ57R/T ได้รับความอนุเคราะห์จาก วิชา สาริต โกวิตชัย (2554) ถ่ายเข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock

3.3.1 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

การเตรียมเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ให้เป็นคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) ตามวิธีของ Inoue *et al.* (1990) เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α บนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี ลงในอาหาร SOB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 200 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 18°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.6 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองขนาด 50 ml นำไปตั้งไว้ในน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB buffer (ภาคผนวก ก) ที่แช่เย็นปริมาตร 40 ml ตั้งหลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ต่อมาละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 10 ml เขย่าเบาๆ จนตะกอนละลาย แล้วเติมสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 7% นำหลอดตั้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่งคอมพีเทนต์เซลล์ที่ได้ ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจขนาด 1.5 ml หลอดละ 100 μ l แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C

3.3.2 การถ่ายโอนพลาสมิดถูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α (transform)

ถ่ายโอนพลาสมิดถูกผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ปริมาตร 100 μ l มาทำให้ละลายโดยตั้งไว้ในน้ำแข็งนาน 15 นาที จากนั้นดูดเชื้อเอ็นเอสายผสม จากข้อ 3.3 ปริมาตร 10 μ l ใส่ในคอมพีเทนต์เซลล์ แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42°C นาน 90 วินาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 μ l นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกประมาณ 800 μ l แล้วทำการละลายตะกอน นำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ย (spread plate) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 μ g/ml, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 0.2 μ g/ml และ Isopropyl-B-D-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.2 mM/ml แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง

3.3.3 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี blue/white screening

ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมโดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน, X-Gal และ IPTG ซึ่งเวกเตอร์ pTZ57R/T มี *lacZ* gene ที่บริเวณ *multiple cloning site* ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยจะไปย่อย X-Gal ทำให้ได้โคโลนีเป็นสีฟ้า เมื่อถูกแทรกด้วยชิ้นยีนที่บริเวณ *lacZ* gene ทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ได้จึงไม่เกิดการย่อย x-gal จึงได้โคโลนีสีขาวแทน ดังนั้นจึงเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เก็บเป็น master plate ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และสุ่มเลือกโคโลนีไปตรวจสอบด้วยวิธี size screening

3.3.4 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อเช็ดโคโลนีจาก master plate ใส่ลงใน lysis buffer (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 25-30°C เชื้อให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15-30 นาที จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูส่วนใสด้านบนไปตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ ในเจลอะกาโรส 0.8% จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนเพื่อสกัดพลาสมิดในขั้นตอนต่อไป

3.3.5 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส

สารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 5:1 วิเคราะห์ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8% ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ 0.5X TAE pH 8.0 (ภาคผนวก ก) โดยใช้ 1 kb ladder (Fermentas, Canada) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์เท่ากับ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ นาน 10 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำ 5 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง gel documentation (Syngene genius; Bio Imaging System, Germany)

3.3.6 การสกัดพลาสมิดโดยวิธี Alkaline lysis

หลังจากทำการคัดเลือกโคลนที่มีการสอดแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนเซลล์ลูเลสด้วยวิธี size screening นำโคลนดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 ml ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เท

อาหารทิ้ง เดิม Alkaline lysis I (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปวางในน้ำแข็งนาน 5 นาที เดิม Alkaline lysis II (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 μ l ผสมให้เข้ากัน กลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปวางในน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากันกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปวางในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ต่อมาคูดของเหลวด้านบนปริมาตร 600 μ l ใส่ในหลอดไมโครเซนติพีจิว์ หลอดใหม่ เดิม isopropanol ปริมาตร 600 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล กลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทของเหลวทิ้งรอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 μ l นำไปตรวจสอบความเข้มข้นของพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5

3.3.7 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการสกัดจากข้อ 3.3.6 นำมาทำการตรวจสอบขนาดการสอดแทรกของยีนเซลล์ลูเลส โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI (Fermentas, Canada) พร้อมกันทั้ง 2 เอนไซม์ในหลอดเดียวกัน โดยปฏิกิริยาปริมาตรรวม 10 μ l ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม (100 ng) ปริมาตร 1 μ l, 1X buffer TangoTM with BSA (33 mM Tris-acetate (pH 7.9 ที่อุณหภูมิ 37°C), 10mM magnesium acetate, 6.6mM potassium acetate, 0.01 mg/ml BSA) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI อย่างละ 3 ยูนิต, ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C นำปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5 จากนั้นเลือกพลาสมิดที่มีการสอดแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนเซลล์ลูเลสในขนาดที่ถูกต้อง มาทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ FlavoPrepTM Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Austria)

3.3.8 การสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ FlavoPrepTM Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Austria)

โดยนำโคลนที่เลือกได้แล้วจากข้อ 3.3.7 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 ml ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 μ g/ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์โดยเติม FAPD1 buffer ปริมาตร 250 μ l ผสมให้

เข้ากัน เติม FAPD2 buffer ปริมาตร 250 μ l กลับหลอดเบาๆ ไปมา 5 ครั้ง วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เติม FAPD3 buffer ปริมาตร 350 μ l กลับหลอดเบาๆ ไปมา 5 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทั้งหมดใส่ใน FAPD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ภายใน FAPD column ทิ้ง เติม W1 buffer ปริมาตร 400 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ภายใน FAPD column ทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 750 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ภายใน FAPD column ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ย้าย FAPD column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ ต่อมาเติม elution buffer 50 μ l วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำพลาสติกที่สกัดได้ไปตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5 แล้วทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรสต่อไป

3.3.9 การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเซลล์ลูเลส เพื่อจะเชื่อมต่อเข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะอยู่ด้วย ซึ่งออกแบบตามขั้นตอนในคู่มือของ *K. lactis* Protein Expression Kit (New England Biolab, USA.) การออกแบบไพรเมอร์นั้นจะต้องวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดที่ตำแหน่ง cloning site ของเวกเตอร์แต่ไม่ตัดชิ้นยีน โดยออกแบบให้มีตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* ตามด้วยตำแหน่ง Kex protease ที่บริเวณด้าน 5' ของยีน และตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NodI* ที่บริเวณด้าน 3' โดย forward primer คือ Cel5A24_pKLAC2F 5'-CCGCTCGAGAAAAGATGGCCGCTTCGAGAAAAC-3' บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI*, บริเวณตัวเอียง คือตำแหน่งของ Kex protease และ reverse primer คือ Cel5A24_pKLAC2R 5'-TTTATAGCGGCCGCTCAAGATATCTTTTTGATAACG-3' บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NodI*

3.3.10 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลล์ลูเลสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

เพิ่มปริมาณยีนเซลล์ลูเลสที่เชื่อมต่อไว้ในพลาสมิด pTZ57R/T ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยคิเอ็นเอต้นแบบซึ่งเป็นพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากข้อ 3.3.8 (100 ng), 1X Optimized DyNzyme EXT Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.0 ที่

อุณหภูมิ 25°C), 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM (NH₄)₂SO₄, และ 0.01% Triton[®]X-100, 0.2 mM dNTP, 0.5 μM Cel5A24_pKLAC2F (forward primer) และ 0.5 μM Cel5A24_pKLAC2R (reverse primer) 0.5% DMSO, เอนไซม์ DyNazyme[™] EXT DNA Polymerase (Finnzyme, Finland) 1 ยูนิต ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 μl นำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler[™] thermal cycler; Biometra, Germany) และกำหนดอุณหภูมิที่ต่างกันในช่วง primer annealing คือ 55.0, 55.7, 59.4, 61.8, 64.1 และ 65.0°C ซึ่งปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอน โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเป็นการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยจะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ทำให้เส้นดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (denaturation) แล้วลดอุณหภูมิลงเป็น 55°C เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน (primer annealing) จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของไพรเมอร์ (primer extension) โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 35 รอบ และสิ้นสุดปฏิกิริยาโดยคงอุณหภูมิไว้ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ ไปตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5 และทำให้บริสุทธิ์

3.3.11 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.3.10 ที่ตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% มาสกัดแยกดีเอ็นเอ ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย FavorPrep[™] GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Austria) โดยตัดบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เดิม FADF buffer 500 μl ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C นาน 15 นาที ทำการ vortex ทุก 3 นาที จนกว่าชิ้นเจลจะละลายหมด แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน FADF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เดิม wash buffer ปริมาตร 750 μl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จากนั้นย้าย column ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ต่อมาเติม elute buffer 40 μl ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำไปตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5

3.4 การสร้างยีนเซลล์ลูกผสม

3.4.1 การนำเวกเตอร์ pKLAC2 และยีนเซลล์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนนำมาเชื่อมต่อกัน

นำพลาสมิดเวกเตอร์ pKLAC2 (ภาคผนวก ก) และผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.3.11 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI* โดยแยกออกเป็น 2 หลอด หลอดที่หนึ่งในปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 30 μ l ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ (pKLAC2) 1 μ g, 2X buffer Tango™ with BSA (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA), เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI* (Fermentas, Canada) 10 ยูนิต ปรับปริมาณปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 30 μ l

หลอดที่สองในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 30 μ l ประกอบด้วยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก ข้อ 3.3.11) 1 μ g, 2X buffer Tango™ with BSA (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA), เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI* (Fermentas, Canada) 10 ยูนิต และปรับปริมาณปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 30 μ l นำทั้งสองหลอดมาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่ อุณหภูมิ 80°C นาน 20 นาที นำปฏิกิริยาที่ได้ไปตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5 และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 3.3.11

3.4.2 การเชื่อมต่อยีนเซลล์เข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 (Ligation)

ทำการเชื่อมต่อยีนเซลล์เข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 โดยนำเวกเตอร์และผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI* จากข้อ 3.4.1 มาเชื่อมต่อกันด้วย เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas, Canada) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของผลผลิตพีซีอาร์ต่อเวกเตอร์คือ 10:1 บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock เลี้ยงในอาหารเหลว LB โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2-3 ชั่วโมง นำไปเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง LB ใส่ยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 μ g/ml นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเลือก โคลนีสีขาวมาเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เก็บเป็น master plate บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง แล้วนำ master plate เก็บที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมโดยวิธี Colony PCR ในขั้นตอนต่อไป

3.4.3 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี Colony PCR

นำโคลนที่ได้จากข้อ 3.4.2 มาทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี Colony PCR ซึ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยสารละลาย 1X *Taq* Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (750 mM Tris-HCl (pH 8.8 ที่อุณหภูมิ 25°C), 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% Tween 20) 2 mM MgCl_2 , 400 μ M dNTP, 10 μ M Cel5A24_pKLAC2F และ 10 μ M Cel5A24_pKLAC2R ที่จำเพาะสำหรับยีน, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต (Fermentas, Canada) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 μ l ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อจาก master plate ลงในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler; Biometra, Germany) โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงเป็น 55°C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ และสิ้นสุดปฏิกิริยาโดยคงอุณหภูมิไว้ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5 ทำการคัดเลือกพลาสมิดที่มีการสอดแทรกด้วยยีนในขนาดที่ต้องการ มาทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen, South Korea) เพื่อเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ด้วยโปรแกรม BioEdit

3.4.4 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านยีสต์ *Kluyveromyces lactis* สายพันธุ์ GG799 ให้เป็นคอมพิเทนต์เซลล์ (Schiestl and Gietz, 1995)

ทำการเขี่ยโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อ *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 (New England Biolab, USA) ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 ml โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12-16 ชั่วโมง ใช้ปิเปตดูดเชื้อขึ้นมา 500 μ l ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ที่มี 3% กลีเซอรอล ปริมาตรรวม 100 ml เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C จนกระทั่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วงประมาณ 0.6-1.0 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการล้างตะกอน 2 ครั้งด้วย TE buffer (pH 7.5) ปริมาตร 10 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE-LiAc buffer โดยเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 50% กลีเซอรอล 500 μ l จากนั้นแบ่งคอมพิเทนต์เซลล์ที่เตรียมได้ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บที่อุณหภูมิ -80°C

3.4.5 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ยีสต์ *Kluyveromyces lactis* ด้วยวิธี heat shock

ตามคู่มือ *K. lactis* Protein Expression Kit (New England Biolab, USA) นำพลาสมิดลูกผสมที่มีลำดับเบสที่ถูกต้องที่ได้จากข้อ 3.4.3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacII* เพื่อให้พลาสมิดลูกผสมมีลักษณะเป็นเส้นตรง เพื่อสามารถสอดแทรกเข้าไปในจีโนมของยีสต์ *K. lactis* ที่ตำแหน่ง *LAC4* locus ได้โดยในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 30 μ l ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม 100 ng, 1X NEB buffer 4 (20 mM Tris-acetate, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 1 mM DTT (pH 7.9)) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacII* 10 ยูนิต (New England Biolab, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่ 65°C นาน 20 นาที แล้วนำปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% จากนั้นทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ *SacII* ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จะมีลักษณะเส้นตรง เข้าสู่ยีสต์ *K. lactis* ด้วยวิธีการ heat shock โดยนำคอมพลีเมนต์เซลล์ที่ได้จากข้อ 3.4.4 ปริมาตร 100 μ l ตั้งไว้ในน้ำแข็งนาน 15 นาที นำดีเอ็นเอสายผสม 1 μ g ใส่ลงในหลอดคอมพลีเมนต์เซลล์ นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30°C นาน 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ด้วยอุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที และเทส่วนใสด้านบนทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว yeast peptone medium containing glucose (YPGlu) 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YPGal ปริมาตร 1 ml จากนั้นย้ายใส่หลอดทดลองขนาด 50 ml เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 4-5 ชั่วโมง แล้วย้ายใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที และเทส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย phosphate-buffered saline (PBS) ที่มีความเข้มข้น 1X ปริมาตร 1 ml นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Carbon Base (YCB) ที่มีส่วนผสมของ acetamide ความเข้มข้น 5 mM โดย acetamide จะถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน แล้วทำการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน จากนั้นสุ่มเก็บโคโลนีไปเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง YCB ที่มี acetamide ความเข้มข้น 5 mM เก็บเป็น master plate บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

3.4.6 การคัดเลือกโคโลนียีสต์ลูกผสม *K. lactis* ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหารแข็ง CMC

โดยการสุ่มเลือกโคโลนีจาก master plate ที่ได้จากข้อ 3.4.5 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPGal เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน ใช้ cockborer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 cm ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กดลงไปบนอาหารแข็ง CMC (carboxyl methyl cellulose)

ใส่เชื้อที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว YPGal 100 μ l บ่มงานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน ราวทับด้วย congo red ความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วย 1 M NaCl เป็นเวลา 10 นาที โดยสังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็ง CMC จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.4.7 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอยีสต์ *K. lactis* (Cheunjit et al. 2004)

นำโคลนที่มีกิจกรรมการของเอนไซม์เซลลูเลสได้จากข้อ 3.4.6 มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ เชื้อยีสต์ *K. lactis* ลงในอาหารเหลว YPGlu ปริมาตร 10 ml ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12-16 ชั่วโมง คูลเชื้อใส่ในหลอดไมโครเซนติพีวจ์ 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ละลายตะกอนในสารสกัดดีเอ็นเอ Breaking buffer (2% Triton-X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris(pH8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 200 μ l และ glass bead ประมาณ 0.3 g หลังจากนั้นปั่นให้เข้ากัน ประมาณ 10-15 นาที จากนั้นเติม Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (50:48:2) ปริมาตร 200 μ l แล้วเติม TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6) ปริมาตร 200 μ l ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เก็บส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนติพีวจ์หลอดใหม่ เติมเอทานอลบริสุทธิ์ 2.5 เท่าของส่วนใสที่เก็บได้ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C วางทิ้งไว้รองจนกว่าตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 40 μ l นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5

3.4.8 การตรวจสอบดีเอ็นเอถูกผสมด้วยปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรส

ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมด้วยปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรส โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4.7 ปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยสารละลาย 1X ViBuffer A (500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1 ที่อุณหภูมิ 20°C) 0.1% Triton™X-100) 2 mM MgCl₂, 400 mM dNTP, 10 μ M pKLAC2_F (5'-GAAGAAGCCTTGATTGGA-3') และ 10 μ M pKLAC2_R (TCGGCACTAATAACCGTT-3'), เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต (Vivantis, Malaysia) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 μ l นำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler; Biometra, Germany) โดยกำหนด

อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วลดอุณหภูมิตั้งเป็น 55°C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 35 รอบ และสิ้นสุดปฏิกิริยาโดยคงอุณหภูมิไว้ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.3.5

3.5 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)

นำโปรตีนมาผสมกับ 5X dye loading buffer (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วน 1:4 นำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 94°C นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำมาวิเคราะห์บนเจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ซึ่งประกอบด้วยเจลชั้นล่าง (separating gel) ที่ความเข้มข้น 10% และเจลชั้นบน (stacking gel) ที่ความเข้มข้น 5% โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนแบบ vertical slab gel ขนาด 7x10x0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร และแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 30 mA ต่อเจล นาน 90 นาที โดยใส่ running buffer ใช้เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย coomassie blue นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วย destaining buffer นาน 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีน หลังจากนั้นเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้กับ pre-stain protein marker (Tiangen, China) ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบน้ำหนักของโปรตีน

3.6 การเตรียมโปรตีนเซลล์

3.6.1 การผลิตอนุไซม์สายผสม

นำโคโลนีของยีสต์ลูกผสม *K. lactis* มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPGal ปริมาตร 50 ml เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12-16 ชั่วโมง ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm ให้ได้เท่ากับ 0.4 แล้วคูณปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGal ปริมาตรรวม 200 ml เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 300 ml เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน ทำการแยก crude protein โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวแล้วนำไปเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนเซลล์

3.6.2 การทำโปรตีนให้เข้มข้น (protein concentration)

นำ crude protein ที่ผลิตได้จากข้อ 3.6.1 มาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยการกรองและปั่นเหวี่ยงผ่านคอลัมน์ Vivaspin 20 (GE Healthcare, Sweden) ตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay kit (Biorad, USA) วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย 10% SDS-PAGE

3.6.3 การตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีน

ทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน โดยนำ bovine serum albumin: BSA (Fluka, USA) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml และนำสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้นมาอย่างละ 20 μ l ผสมกับน้ำยาคูคกติน Biorad protein assay (Biorad, USA) ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณสมการถดถอย $y=ax+b$ โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA

บ่มโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.6.2 ปริมาตร 20 μ l ผสมกับน้ำยาคูคกติน 1 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปแทนในสมการ เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน โดยแทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสง เพื่อคำนวณหาค่า x (ความเข้มข้นของสารละลาย) เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA แล้วนำไปวิเคราะห์หน้าหนักโมเลกุลด้วย 10% SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 3.5

3.7 การประเมินกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

3.7.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์โดยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNA assay

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสับเสตรท carboxymethyl cellulose (CMC) ของเอนไซม์เซลลูเลสที่แยกได้จากยีสต์ลูกผสม ซึ่งจะได้ผลผลิตหลังการย่อยสลาย คือ น้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน 0, 5, 10, 15 และ 20 mM โดยจะใช้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ก) เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 1 ml โดยนำ crude protein ที่ได้จากข้อ 3.6.2 มา 40 μ l บ่มใน CMC ที่มีความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 M ที่ pH 7.0 ปริมาตร 300 μ l นำไปบ่มในเครื่องควบคุม (heat box) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 10 นาที จากนั้นเติม 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 660 μ l เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร (Miller, 1959) นำค่าที่วัดได้ไปเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) เพื่อนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) และค่าแอกติวิตีจำเพาะ (specific activity) และนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยให้ค่าสูงที่สุดคิดเป็น 100% แสดงผลเป็นค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ (relative activity) โดย 1 ยูนิตของเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่

ย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ (Li *et al.* 2009)

3.7.2 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ลูกผสม

3.7.2.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal time)

ทำโดยการบ่ม crude enzyme 40 μ l กับสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 M ที่ pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 5, 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบเอนไซม์ในข้อ 3.7.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

3.7.2.2 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

(Optimal pH)

ทำโดยการบ่ม crude enzyme 40 μ l กับสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 M pH ตั้งแต่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 ที่อุณหภูมิ 30°C ตามเวลาที่เหมาะสม โดย pH 3.0-6.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตรต (sodium acetate buffer) ที่ความเข้มข้น 0.1 M และ pH 7.0-11.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate buffer) ที่ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นทำการทดสอบเอนไซม์ในข้อ 3.7.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

3.7.2.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimal temperature)

โดยการบ่ม crude enzyme 40 μ l กับสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ตามเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จากข้อ 3.7.2.1 และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดจากข้อ 3.7.2.2 บ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C จากนั้นทำการทดสอบเอนไซม์ในข้อ 3.7.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

3.7.2.4 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ (pH stability)

ทำโดยนำ crude enzyme มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 M ตั้งแต่ pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง

นำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.7.2.2 และ 3.7.2.3 หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในปฏิกิริยาโดยทำการทดสอบเอนไซม์ในข้อ 3.7.1 โดยเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยคิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ (relative activity) ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่บ่มคิดเป็น 100%

3.7.2.5 การทดสอบความสามารถในการทนต่อความร้อนของเอนไซม์ (Thermo stability)

ทำโดยนำ crude enzyme มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 M ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์จากข้อ 3.7.2.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิในช่วง 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้น โดยทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.7.1 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยคิดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 100% แล้วนำมาเปรียบเทียบค่าฤทธิ์สัมพัทธ์กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่บ่มในอุณหภูมิ 20-90°C

3.7.2.6 การทดสอบการย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (Substrate specificity)

การทดสอบความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายสับสเตรท จะเลือกใช้สับสเตรททั่วไปที่งานวิจัยใช้ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส โดยสับสเตรทที่ใช้ในการทดสอบ คือ 1% CMC โดยเปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน, 1% xylan โดยเปรียบเทียบกับไซโลสมาตรฐาน, 1% Avicel โดยเปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน และ filter paper โดยเปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน แล้วนำมาทดสอบในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2.2 และค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2.3 หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในปฏิกิริยาโดยทำการทดสอบเอนไซม์ในข้อ 3.7.1

3.7.2.7 การวิเคราะห์สารยับยั้ง และสารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (Inhibit-activator enzyme)

บ่มสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์จากข้อ 3.7.2.2 เติมสารละลายได้แก่ 10 mM CaCl₂, 10 mM LiCl, 10 mM SrCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 50 mM EDTA, 50 mM HgCl₂, 1% SDS, 5% SDS, 10% SDS นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์

หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในปฏิกิริยาโดยทำการทดสอบเอนไซม์ในข้อ 3.7.1 ซึ่งเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่ได้เติมสารละลายต่างๆลงไป (non metal ions) โดยให้ค่าฤทธิ์สัมพันธ์เท่ากับ 100 %

3.7.2.8 การทดสอบการย่อยวัสดุเยื่อใย

ทดสอบการย่อยวัสดุเยื่อใย โดยใช้วัสดุเยื่อใย 1% ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย และ ช้างข้าวโพด บ่มกับเอนไซม์ 20 ยูนิต และวัสดุเยื่อใยที่ไม่ได้บ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แต่บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์แทน ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่ม (optimal temperature) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสมา 100 μ l ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (optimal pH) 300 μ l จากนั้นเติมสารละลาย DNS (dinitrosalicylic acid reagent) ปริมาตร 600 μ l เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 95 °C นาน 10 นาที คั่งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน (วิมลทิพย์ และ คณะ. 2550)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกโคลน

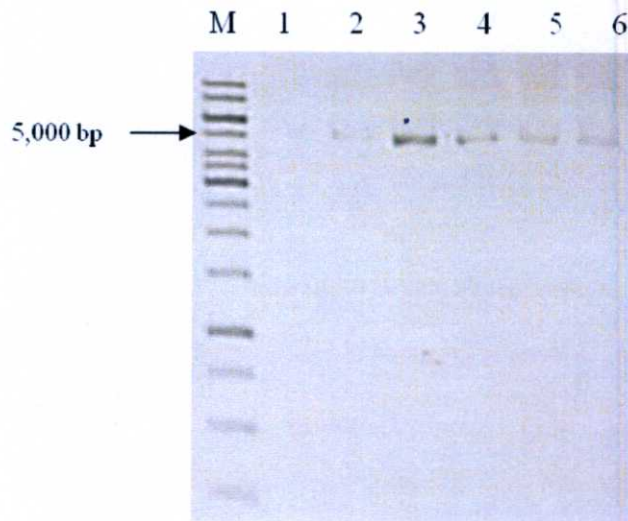
4.1.1 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening

ยีนเซลลูเลส *cel5_A24* แบบ mature gene ซึ่งจำแนกได้จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะหมักของกระบือปลัก มีขนาด 2,163 bp ที่เชื่อมต่อไปในพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T ได้รับความอนุเคราะห์จาก วิทิตา สาริตโกวิทช์ (2554) และถ่ายเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมีพลาสมิดลูกผสมที่ถูกแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนเซลลูเลส *cel5_A24* โดยวิธี blue/white screening ปรากฏว่าพบโคโลนีสีขาวจำนวนมาก จึงสุ่มเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินมาทำเป็น master plate แล้วตรวจสอบโคลนที่คาดว่าจะมีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนเซลลูเลสด้วยวิธี size screening จากผลการทดลองพบว่ามีเพียง 10 โคลนเท่านั้นที่คาดว่าจะมีพลาสมิดลูกผสมที่มีการสอดแทรกของยีนเซลลูเลส ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีขนาดใหญ่กว่าเวกเตอร์ pTZ57R/T ที่มีขนาดประมาณ 2,800 bp ซึ่งไม่มีการสอดแทรกด้วยชิ้นส่วนยีนเซลลูเลส (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนเซลลูเลสด้วยวิธี size screening ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane C คือเวกเตอร์ pTZ57R/T, Lane 1-32 คือหมายเลขของโคลนพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกมาตรวจสอบ และวงกลมแสดงโคลนที่คาดว่าจะมีการสอดแทรกด้วยยีนเซลลูเลส

จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนดังกล่าวที่คาดว่าจะมีการสอดแทรกด้วยยีนเซลลูเลส (ภาพที่ 4.1) มา 6 โคลน คือ โคลนที่ 3, 8, 10, 20, 22 และ 24 มาทำการสกัดพลาสมิดโดยวิธี Alkaline lysis ซึ่งพลาสมิดที่มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนยีนเซลลูเลส ควรจะมีขนาดของยีนรวมกับ พลาสมิดเวกเตอร์ประมาณ 4,900 bp โดยยีนเซลลูเลสมีขนาดประมาณ 2,100 bp และเวกเตอร์ pTZ57R/T ที่มีขนาดประมาณ 2,800 bp จากผลการทดลองพบว่าพลาสมิดลูกผสมที่ได้มีขนาด ประมาณ 4,900 bp ซึ่งเป็นไปตามความคาดหมาย (ภาพที่ 4.2)



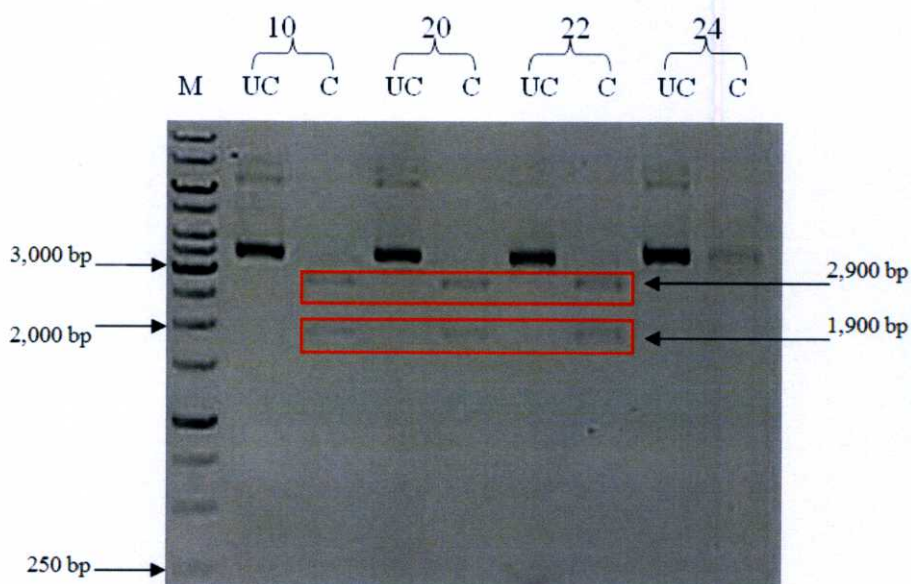
ภาพที่ 4.2 ผลการตรวจสอบการสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยวิธี Alkaline lysis ในเจลอะกาโรส

ความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane 1 คือ โคลน Cel5_A24/3, Lane 2 คือ Cel5_A24/8, Lane 3 คือ Cel5_A24/10, Lane 4 คือ Cel5_A24/20, Lane 5 คือ Cel5_A24/22 และ Lane 6 คือ Cel5_A24/24

4.1.2 ผลการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการสกัดโดยวิธี Alkaline lysis มาตรวจสอบการเชื่อมต่อกันระหว่างยีนเซลลูเลสกับเวกเตอร์ pTZ57R/T นำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*II และ *Bam*HI พร้อมกันทั้งสองเอนไซม์ในหลอดเดียวกัน ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*II จะตัดที่บริเวณเวกเตอร์ pTZ57R/T 1 ตำแหน่ง ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะตัดภายในยีนเซลลูเลส 1 ตำแหน่ง และตัดบริเวณเวกเตอร์ pTZ57R/T 1 ตำแหน่ง ซึ่งถ้ามีการเชื่อมต่อกันระหว่าง ยีนกับเวกเตอร์ ผลผลิตที่ได้ควรมีขนาดแถบดีเอ็นเอเป็น 3 ส่วน คือ ขนาดประมาณ 200, 1,900 และ 2,900 bp แล้วนำมาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ซึ่งผลที่ได้พบว่าโคลนที่ 10, 20 และ 22 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*II และ *Bam*HI ปรากฏขนาดแถบดีเอ็นเอเป็น 3 ส่วน

คือ ขนาดประมาณ 200, 1,900 และ 2,900 bp เป็นไปตามที่คาดหวัง (ภาพที่ 4.3) โดยทั้ง 3 โคลน ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีขนาดใกล้เคียงกันจึงเลือก Cel5_A24 โคลนที่ 10 (Cel5_A24/10) ไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปสกัดพลาสมิดลูกผสมโดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Austria)



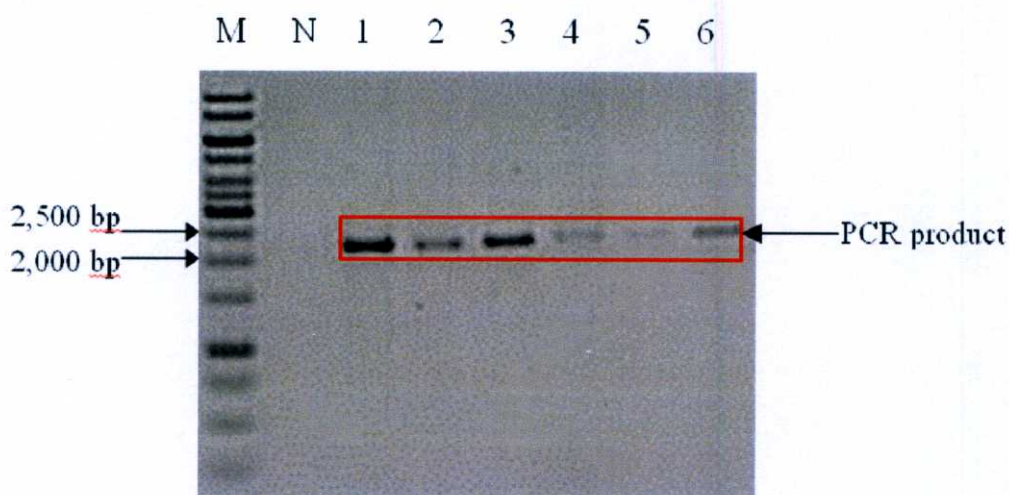
ภาพที่ 4.3 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่างยีนเซลล์กับเวกเตอร์ pTZ57R/T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI ตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%, Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane 10, 20, 22, 24 คือ หมายเลขโคลน Cel5_A24/10, 20, 22 และ 24 ตามลำดับ, UC คือ พลาสมิดลูกผสมที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ C คือ พลาสมิดลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI

4.2 การศึกษาการแสดงออกของพลาสมิดลูกผสมในยีสต์ *Kluyveromyces lactis*

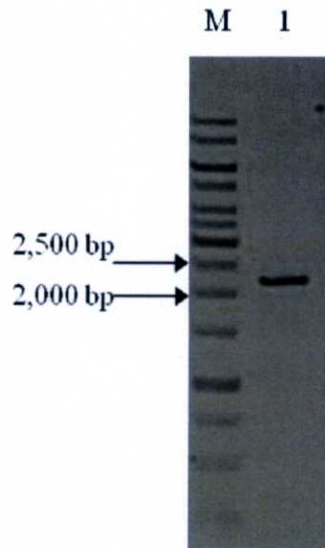
4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลล์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

นำพลาสมิดลูกผสม Cel5_A24/10 ที่สกัดได้โดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit จากข้อ 4.1.2 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลล์ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้เอนไซม์ DyNazyme™ EXT DNA Polymerase (Finnzyme, Finland) ซึ่งมีคุณสมบัติในการ proof reading และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์

Cel5A24_pKLAC2F (forward primer) และ Cel5A24_pKLAC2R (reverse primer) และกำหนดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing คือ 55.0, 55.7, 59.4, 61.8, 64.1 และ 65.0 °C ซึ่งคาดหวังผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 2,200 bp เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8% ผลการตรวจสอบพบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 55.0 °C มีขนาดแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกับขนาดที่ต้องการ และแถบดีเอ็นเอที่ได้เข้มที่สุด (ภาพที่ 4.4) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์เพื่อให้มีปริมาณมากขึ้น โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 55.0 °C แล้วนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการในข้อ 3.3.11 (ภาพที่ 4.5) ก่อนนำไปทำการเชื่อมต่อยีนเซลล์ูเลสเข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 ต่อไป



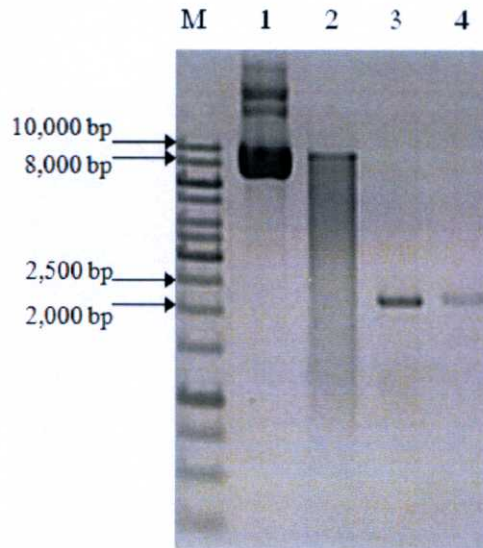
ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเซลล์ูเลส ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane N คือ negative control, Lane 1-6 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนเซลล์ูเลส Cel5_A24/10 เมื่อใช้อุณหภูมิ primer annealing ที่ 55.0, 55.7, 59.4, 61.8, 64.1 และ 65.0 °C ตามลำดับ



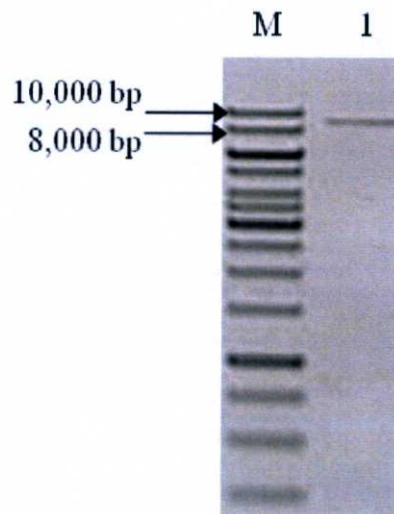
ภาพที่ 4.5 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane I คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนเซลลูเลส Cel5_A24/10 โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 55.0 °C

4.2.2 การเชื่อมต่อยีนเซลลูเลสเข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 (Ligation)

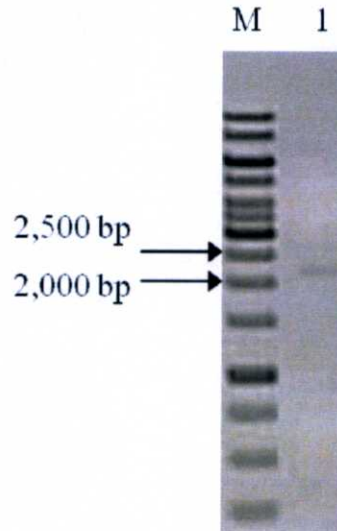
นำเวกเตอร์ pKLAC2 และผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4.2.1 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI* ตามวิธีการในข้อ 3.4.1 นำปฏิกิริยาที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มาตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ดังภาพที่ 4.6 และทำการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ แล้วตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ดังภาพที่ 4.7 และ 4.8 จากนั้นทำการเชื่อมต่อยีนเซลลูเลสเข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 ตามวิธีการในข้อ 3.4.2 และทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดถูกผสมโดยวิธีการทำ Colony PCR



ภาพที่ 4.6 ผลการตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI* ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane 1 คือ เวกเตอร์ pKLAC2 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, Lane 2 คือ เวกเตอร์ pKLAC2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI*, Lane 3 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนเซลลูเลส Cel5_A24/10 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, Lane 4 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนเซลลูเลส Cel5_A24/10 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI*



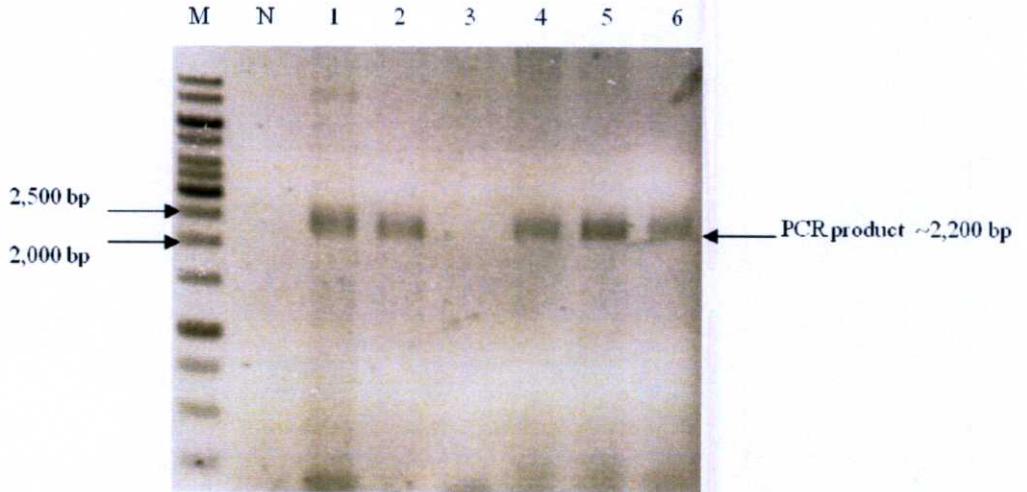
ภาพที่ 4.7 ผลการตรวจสอบการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane 1 คือ เวกเตอร์ pKLAC2 ที่ถูกสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NotI*



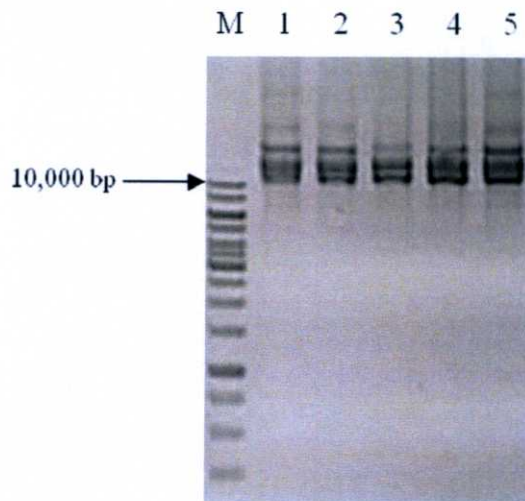
ภาพที่ 4.8 ผลการตรวจสอบการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane 1 คือ ยีนเซลลูเลส *Cel5_A24/10* ที่ถูกสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NodI*

4.2.3 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี Colony PCR

หลังจากทำการเชื่อมต่อยีนเซลลูเลส *Cel5_A24/10* เข้าสู่เวกเตอร์ pKLAC2 ตามวิธีการในข้อ 3.4.2 พบว่าปรากฏโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 6 โคโลนี จึงเก็บโคโลนีสีขาวทั้งหมดมาเลี้ยงต่อบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน เก็บเป็น master plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12-16 ชั่วโมงคัดเลือก จากนั้นนำโคโลนีทั้งหมดไปตรวจสอบหาพลาสมิดลูกผสมที่มียีนเซลลูเลสแทรกอยู่ ด้วยวิธี Colony PCR โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ *Cel5A24_pKLAC2F* (forward primer) และ *Cel5A24_pKLAC2R* (reverse primer) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ควรปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,200 bp ซึ่งยีนเซลลูเลสมีขนาด 2,163 bp รวมกับไพรเมอร์ *Cel5A24_pKLAC2* ประมาณ 70 bp จากผลการทดลองพบว่ามี 5 โคลน ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดตามความคาดหมายไว้ ได้แก่ pKLAC2-*Cel5_24/10* โคลนที่ 1, 2, 4, 5 และ 6 (ภาพที่ 4.9) จึงนำโคลนที่ได้มาทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาพที่ 4.10) จึงสุ่มคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมที่ได้โคลนที่ 2, 5 และ 6 ไปส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen, South Korea) เพื่อเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลสด้วยโปรแกรม BioEdit



ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิดถูกผสมด้วยวิธี Colony PCR ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8% Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane N คือ negative control และ Lane 1-6 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนเซลล์ลูเกต pKLAC2-Cel5_A24/10 โคลนที่ 1-6 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.10 ผลการตรวจสอบการสกัดพลาสมิดถูกผสมโดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep Kit ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane 1-5 คือ พลาสมิดถูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10 โคลนที่ 1, 2, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

4.2.4 ผลการเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลส

ส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลส pKLAC2-Cel5_A24/10 โคลนที่ 2, 5 และ 6 เพื่อทำการเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cel5_A24* แบบ mature gene (วิทิตา สาริตโกวิทชัย. 2554) โดยใช้โปรแกรม BioEdit ผลจากการวิเคราะห์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลส pKLAC2-Cel5_A24/10 โคลนที่ 2 (pKLAC2-Cel5_A24/10C2) มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Cel5_A24* แบบ mature gene มากที่สุด โดยมีลำดับเบสที่แตกต่างไป 9 เบส ส่วนโคลนที่ 5 (pKLAC2-Cel5_A24/10C5) มีลำดับเบสที่แตกต่างไป 16 เบส และโคลนที่ 6 (pKLAC2-Cel5_A24/10C6) มีลำดับเบสที่แตกต่างไป 21 เบส (ภาพที่ 4.11) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโนต่อไป

4.2.5 ผลการเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลลูเลส

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลลูเลส pKLAC2-Cel5_A24/10C2, pKLAC2-Cel5_A24/10C5 และ pKLAC2-Cel5_A24/10C6 ไปแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) และนำลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสได้ไปเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโนกับยีน *Cel5_A24* แบบ mature gene (วิทิตา สาริตโกวิทชัย. 2554) โดยใช้โปรแกรม BioEdit จากผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบความถูกต้องพบว่า ลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 3 โคลน ไม่พบว่ามี stop codon เกิดขึ้นภายในยีน ซึ่งพบว่าโคลน pKLAC2-Cel5_A24/10C2 ไม่มีลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป ขณะที่โคลนที่ pKLAC2-Cel5_A24/10C5 และ pKLAC2-Cel5_A24/10C6 พบลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป 1 และ 3 กรดอะมิโน ตามลำดับ (ภาพที่ 4.12) ดังนั้นจึงคัดเลือกโคลน pKLAC2-Cel5_A24/10C2 ที่มีลำดับกรดอะมิโนถูกต้องไปใช้งานในขั้นต่อไป

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
												
Cel5_A24 mature gene	1	GCCGCTTTCGAGAAAAACGCTCAGCAGACTGTTGCCGATATGGGTCTGGGGTGGAACTCGGCACCTCGCTGGACAGCTATTTCAGGTACTACGATAGGCT											100
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1											100
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1											100
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1											100
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200		
												
Cel5_A24 mature gene	101	CTAACAGAGGAAGCACATCTTCCGAAACTGCATGGGGCAATCCCGCAACGACCAAAGCCATGATCGACATGGTAAAGAAATCAGGTGTGAAAACAGTTCG											200
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	101											200
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	101											200
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	101											200
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300		
												
Cel5_A24 mature gene	201	TGTACCTGTTACCTGGTACGAACACATGGATCCTGTCACCTACAAGATCGACGAAACATGGATGAACAGGGTGAAGAGATCGTTGATTATGTACTTGAA											300
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	201											300
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	201											300
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	201											300
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400		
												
Cel5_A24 mature gene	301	GATGATATGTACTGTATCATCAATGTGCATCACGATACAGGTGAAAAGGGCTGGCTGAAAGCGAACAGCACAAACCTTCAGACAAAGAAAGCCATGTTCA											400
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	301											400
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	301											400
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	301											400
		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500		
												
Cel5_A24 mature gene	401	CATCTATCTGGGAACAGGTTAGCGACAATTTTGCCGATTACGGCGCAAGCTTCTGTTTGAGGGCTTCAACGAGATACTGGACGACAGTGCGAATCAGTG											500
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	401											500
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	401											500
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	401											500

ภาพที่ 4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ลูลีส pKLAC2-Cel5_A24/10C2, pKLAC2-Cel5_A24/10C5 และ pKLAC2Cel5_A24/10C6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cel5_A24* mature gene (วิทิตา สาริต โกววิทย์ .2554)

		1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
										
Cel5_A24 mature gene	1001	TGAATACTATGCTGGCAGCTGCAGGTTTCAGAGGTTAAACGTTGATCCTCAGAAAGAGGTCAAAGGCGATATCAACGGCGACGGCAAGCTAAACGATACCGA									1100
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1001C.....									1100
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1001									1100
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1001									1100
		1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
										
Cel5_A24 mature gene	1101	CAAGGAAGTCTCCGGAATTATCTGGTGAAAAAGTCCACAAATATCAGCATGAAAGCCGATATCAACAAGGACGGAGAGATCGATATCCTCGACCTCGTC									1200
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1101A.....									1200
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1101A.....									1200
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1101									1200
		1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
										
Cel5_A24 mature gene	1201	GAGATGGAAGAGCTATACTGAACCCCGAGACTGTTCCCGATGAGAACAATCTCTGTGCAAACGAAGACAACCGGGCAAGCAGGACCGATACCTCAGAGG									1300
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1201									1300
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1201									1300
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1201									1300
		1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
										
Cel5_A24 mature gene	1301	GCGGTCAGGGCGAGATGTTCTATGTTGACAACGGCGTATCAATGCAGGTAGATAAGGGCGGTAATTACGAATGGAACGCACAGTCTTCTATGATGCCAT									1400
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1301									1400
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1301									1400
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1301									1400
		1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
										
Cel5_A24 mature gene	1401	CACCCTTGAACAGGGCGCTACTTATAAGCTCTCATTTCGATTATATCAGCAATAAGCCTCAGTCCACAACCTGTTATCGTAAATCAGGGTCACGGCGATTAT									1500
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1401C.....									1500
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1401CG...A.....A.....C.....									1500
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1401C.....									1500

ภาพที่ 4.11 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ลูเลส pKLAC2-Cel5_A24/10C2, pKLAC2-Cel5_A24/10C5 และ pKLAC2Cel5_A24/10C6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cel5_A24* mature gene (วิฑิตา สาริตโกวิทช์ .2554)

		1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	
											
Cel5_A24 mature gene	1501	CTATCCTATTACAGCGATACCCTTAACTGGACGACCTCGTCTCAGCATTACACCGCTACTTTCGATTATACTTCCAAGACCACAATGCCTGCCGTGTTA										1600
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1501										1600
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1501										1600
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1501										1600
		1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	
											
Cel5_A24 mature gene	1601	CATTCAATCTTGGCGGCACTGGCGTGAATGTTTCCTTACAAGGTAACAGTCACAAATCTTCTCTGTCAAGGTCAGCGGAGGTTCTTCTCCTCAAGCGG										1700
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1601										1700
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1601										1700
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1601										1700
		1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	
											
Cel5_A24 mature gene	1701	TTCCACAACAACAGAACCTACTGTACAACAGGCACAAATATGGCGTCTGATGCTTCCAAGTTCAGGCTGGGCAAATACCGAAGGCGGCGCTCTGCA										1800
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1701										1800
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1701										1800
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1701										1800
		1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	
											
Cel5_A24 mature gene	1801	ACATTCAAGAATCTGAGCAACGGTCTTCAGATCGCTGTTAAGAATTCAGGTACAGACGTTTGGCACGTTTCAGGGTATGTATCCCGACCTCACACTCGAAA										1900
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1801										1900
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1801										1900
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1801										1900
		1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	
											
Cel5_A24 mature gene	1901	GAGGCGCAACTTACGAGATCTCTTTCGATTATCAGGCAGACAAGTCCCGTAGAGATGGGCTATAAATTCAGCAGAATTATGACCCCTACGATCAGTACTT										2000
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	1901										2000
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	1901										2000
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	1901										2000

ภาพที่ 4.11 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเซลล์ลูส pKLAC2-Cel5_A24/10C2, pKLAC2-Cel5_A24/10C5 และ pKLAC2Cel5_A24/10C6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cel5_A24* mature gene (วิฑิตา สาริตโกวิทชัย .2554)

		510	520	530	540	550	560	570	580	590	600															
																									
Cel5_A24 mature gene	501	LSYYS	DTLN	WTSS	QHYT	ATFD	YTSK	TDNAC	RVTF	NLGG	TGVN	VPYK	VTNLS	LVKV	SGSS	SSSG	STTE	PVTG	TNMA	SDAK	KFSG	WAN	TEGG	ASA	600	
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	501	600	
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	501	600	
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	501	600	
		610	620	630	640	650	660	670	680	690	700															
																									
Cel5_A24 mature gene	601	TFKN	LSNGL	QIAV	KNSG	TDVW	HVQG	MPDL	TLER	GATY	EISF	DYQA	DKSV	EMGY	KFQQ	NYDP	YDQY	FYAP	LSET	TQKQ	HYSK	TFAM	TEPT	DDNV	ACVETC	700
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	601	700
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	601	700
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	601	700
		710	720																							
																									
Cel5_A24 mature gene	701	GGVN	APVT	VTIT	DLVI	KKIS-	720																			
pKLAC2-Cel5_A24/10C2	701	720																			
pKLAC2-Cel5_A24/10C5	701	720																			
pKLAC2-Cel5_A24/10C6	701	720																			

ภาพที่ 4.12 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนเซลล์ลูเลส pKLAC2-Cel5_A24/10C2, pKLAC2-Cel5_A24/10C5 และ pKLAC2Cel5_A24/10C6 กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *Cel5_A24* mature gene (วิฑิตา สาริตโกวิทชัย .2554)

4.2.6 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเซลลูเลสเข้าสู่ยีสต์ *K. lactis* ด้วยวิธี heat shock

นำพลาสมิดลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10 โคลนที่ 2 (pKLAC2-Cel5_A24/10C2) ที่มีลำดับครอสมิโนที่ถูกต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงไป มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacII* เพื่อให้ดีเอ็นเอลูกผสมมีลักษณะเป็นเส้นตรงสามารถแทรกเข้าไปในจีโนมของยีสต์ได้ จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านยีสต์ *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีในข้อ 3.4.5 จากนั้นทำการคัดเลือกยีสต์ลูกผสมที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

4.2.7 การคัดเลือกโคลนยีสต์ลูกผสม *K. lactis* ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี DNS assay

กลุ่มเลือกโคลนของยีสต์ลูกผสม *K. lactis* ที่ได้จากข้อ 4.2.6 มาจำนวน 26 โคลน โดยทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี DNS assay เพื่อหาโคลนที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ดีที่สุดตามวิธีการจากข้อ 3.7.1 จากการทดสอบพบว่ายีสต์ *K. lactis* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ 8.055 U/mg ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2 โคลนที่ 3 มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดที่ 23.916 U/mg (ตารางที่ 4.1) จากนั้นทำการเลือกโคลนที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่มากกว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จาก *K. lactis* (wild type) จำนวน 12 โคลน คือ โคลนที่ 1, 2, 3, 6, 8, 15, 16, 19, 21, 23, 25 และ 26 ไปทำการคัดเลือกกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC

ตารางที่ 4.1 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2

pKLAC2-Cel5_A24/10C2	specific activity (U/mg protein)
<i>K. lactis</i> (wild type)	8.055
1	16.661
2	11.612
3	23.916
4	4.790
5	3.730
6	9.326

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2

pKLAC2-Cel5_A24/10C2	specific activity (U/mg protein)
<i>K. lactis</i> (wild type)	8.055
7	5.519
8	8.323
9	6.521
10	2.281
11	5.123
12	7.367
13	7.093
14	5.314
15	8.146
16	12.565
17	7.092
18	3.599
19	10.484
20	3.428
21	10.217
22	5.996
23	8.685
24	3.145
25	22.660
26	8.653

4.2.8 การคัดเลือกยีสต์ลูกผสม *K. lactis* ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Activity plate)

ทำการคัดเลือกโคลอนด้วยวิธีการทดสอบการย่อยกับสับสเตรท carboxyl methyl cellulose (CMC) นำโคลอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.7 ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์มากกว่ายีสต์ *K. lactis* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) จำนวน 12 โคลอน คือ โคลอนที่ 1, 2, 3, 6, 8, 15, 16, 19, 21, 23, 25 และ 26 มาเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 3.4.6 หลังจากราดทับด้วย congo red นาน 10 นาที แล้วล้างด้วย 1 M NaCl นาน 10 นาที สังเกตวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ จากการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับ negative control คือ *K. lactis* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ซึ่งไม่สามารถย่อยสับสเตรทได้ และพบว่า โคโลนีที่ 3 เป็นเพียงโคโลนีเดียวที่ปรากฏวงใสล้อมรอบ (ภาพที่ 4.13) แสดงว่ายีสต์โคโลนีดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและย่อยสับสเตรท CMC ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงนำโคโลนีที่ 3 ไปใช้ในขั้นตอนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

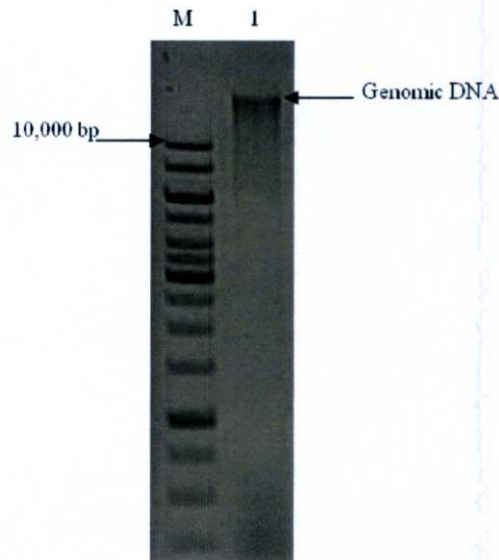


ภาพที่ 4.13 ผลการย่อยสลายสับสเตรท CMC บนอาหารแข็ง โดย wt คือ เชื้อยีสต์ *K. lactis* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) หมายเลข 1-3 คือ เชื้อยีสต์ลูกผสม

4.2.9 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ลูกผสม

นำยีสต์ลูกผสมโคลอนที่ 3 (pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3) ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.8 มาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 3.4.7 ทำการตรวจสอบในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% จากภาพที่ 4.14 พบว่าแถบจีโนมิกดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มีความเข้มข้นเท่ากับ 847 ng/ μ l เมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของกรดนิวคลีอิกจาก

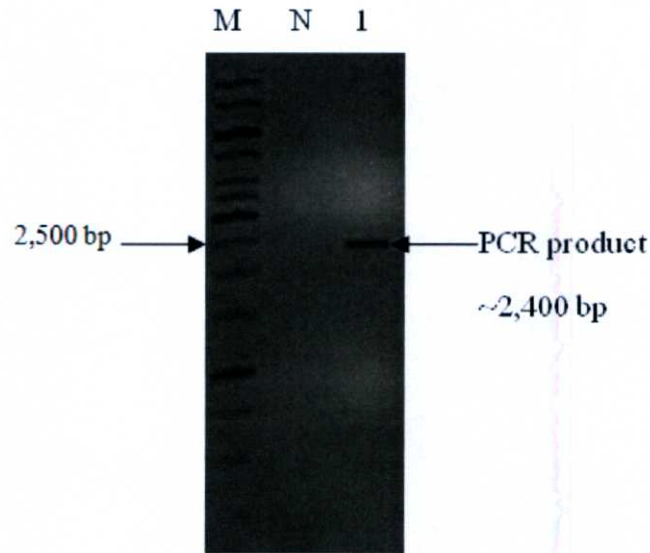
ค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.91 และการปนเปื้อนของโปรตีนจากค่า A_{260}/A_{230} เท่ากับ 1.72 แสดงว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้งานต่อไปได้



ภาพที่ 4.14 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้

4.2.10 การตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

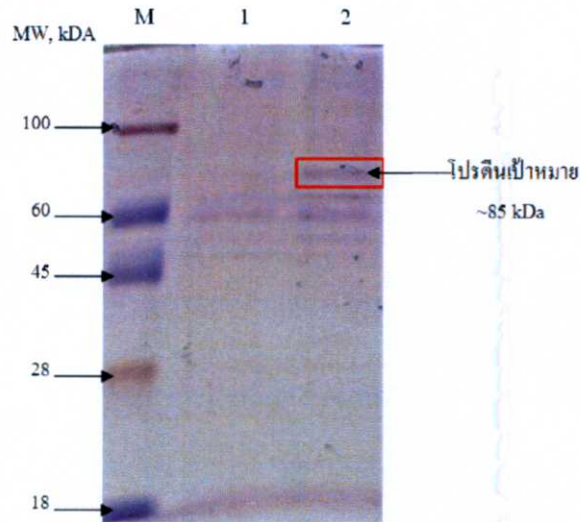
นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้สกัดได้จากข้อ 4.2.9 มาทำการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ตามวิธีการในข้อ 3.4.8 และนำไปตรวจสอบขนาดในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังไว้ควรมีขนาดของอินซูลินประมาณ 2,100 bp รวมกับส่วนของเวกเตอร์จนถึงตำแหน่งของไพรเมอร์ pKAC2 ประมาณ 300 bp จากผลการทดลองพบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,400 bp ซึ่งเป็นขนาดตามที่ต้องการ (ภาพที่ 4.15) จึงนำโคลน pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 ไปทำการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel



ภาพที่ 4.15 ผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (100 ng), Lane N คือ negative control, Lane 1 คือผลผลิตพีซีอาร์ของยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3

4.2.11 ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)

นำยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPGal ปริมาตร 2 ml เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นำ crude protein ที่แยกได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE โดยความเข้มข้น 10 µg วัดโดยวิธี Bradford Assay ตามวิธีการในข้อ 3.5 โดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐาน pre-stain protein marker (Tiangen, China) พบว่าปรากฏโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 85 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนเซลลูเลสเป้าหมาย (วิฑิตา สาริตโกวิทชัย .2554) (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.16 ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีน วิเคราะห์บนเจล 10% SDS-PAGE โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน, Lane 1 คือ เชื้อยีสต์ *K. lactis* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) Lane 2 คือ โปรตีน pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3

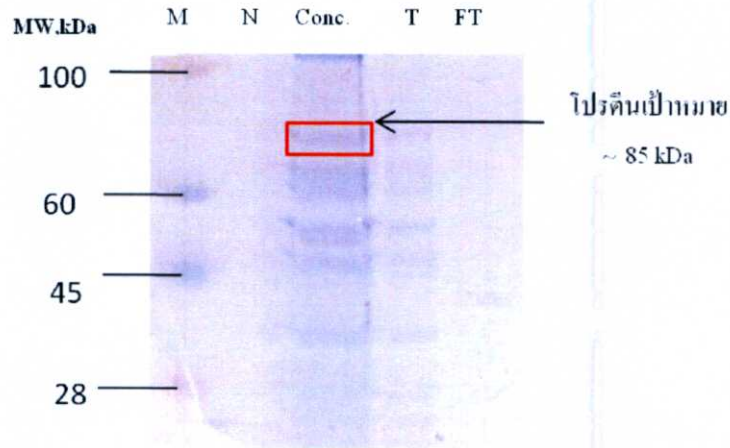
4.3 การเตรียมโปรตีนเซลลูเลส

4.3.1 การเพาะเลี้ยงและทำโปรตีนให้เข้มข้น (protein concentration)

นำเชื้อยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPGal เพื่อผลิตเอนไซม์ลูกผสม ตามวิธีการในข้อ 3.6.1 และเก็บส่วนน้ำใสเป็น crude protein นำมาทำให้เข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านคอลัมน์ ultrafiltration โดยการกรองและปั่นเหวี่ยงผ่านคอลัมน์ Vivaspin 20 (GE Healthcare, Sweden) และตรวจสอบด้วย 10% SDS-PAGE (ภาพที่ 4.17) พบว่าปรากฏโปรตีนที่ได้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 85 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนเซลลูเลสเป้าหมาย เมื่อกรองโปรตีนผ่านคอลัมน์ Vivaspin 20 พบว่า โปรตีนมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เมื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford พบว่าโปรตีนก่อนการกรองมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.047 mg/ml ขณะที่โปรตีนหลังการกรองมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.237 mg/ml ตามลำดับหรือประมาณ 5 เท่า นอกจากนี้คอลัมน์ที่ใช้ยังช่วยกรองโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่เล็กกว่า 30 kDa ออกจากโปรตีนรวมอีกด้วย

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้แบบหลังออกนอกเซลล์มีปริมาณ 52.32 U/mg และหลังจากทำให้เข้มข้นขึ้นได้โดยใช้คอลัมน์ ultrafiltration เอนไซม์มีความเข้มข้น 92.81 U/mg

เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโปรตีน Cel5_A24 จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET28a(+) โดยใช้ระบบ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta ซึ่งมีการผลิตโปรตีนแบบภายในเซลล์ (intracellular) และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพียง 0.02 mg/ml (วิฑิตา สาริตโกวิทชัย, 2554) จะเห็นได้ว่าระบบการผลิตโดยใช้ยีสต์ *K. lactis* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส Cel5_A24 ได้มากกว่าถึง 11.85 เท่า



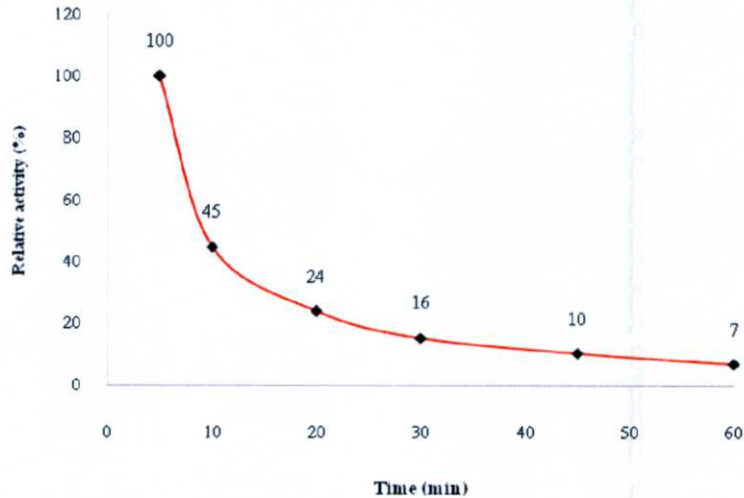
ภาพที่ 4.17 โปรตีนรวมก่อนและหลังทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยคอลัมน์ ultrafiltration วิเคราะห์บนเจล 10% SDS-PAGE โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน, N คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ YPGal, Conc. คือ โปรตีนหลังการกรองผ่านคอลัมน์, T คือ โปรตีนรวมทั้งหมด (total protein), FT คือ ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (flow through)

4.4 การทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

4.4.1 การทดสอบเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal time)

นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้น จากข้อ 4.3.1 มาทดสอบหาเวลาการบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสม ต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่มกับสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมฟอสเฟตที่ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°C (วิฑิตา สาริตโกวิทชัย, 2554) นาน 5, 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ ด้วยวิธี DNS assay ของ Miller ในข้อ 3.7.1 นำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน พบว่าระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์นาน 5 นาที ให้ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด เท่ากับ 81.65 ± 0.02 U/mg protein คิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพัทธ์เท่ากับ 100% (ตารางภาคผนวก ข3) และเมื่อบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ในระยะเวลาที่นานขึ้น 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

อย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 4.18) ดังนั้นจึงเลือกกระยะเวลานาน 5 นาที ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ถูกผสมต่อไป

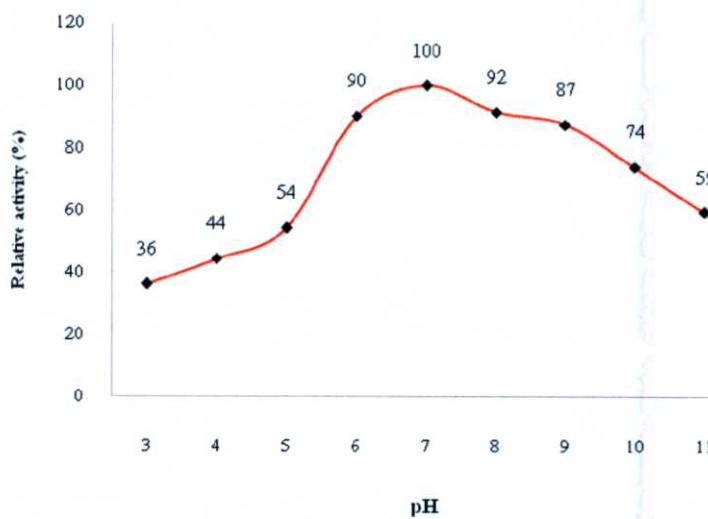


ภาพที่ 4.18 ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ถูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อบ่มที่ระยะ เวลา 5-60 นาที (100% =81.65±0.02 U/mg protein)

4.4.2 การทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal pH)

นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากยีสต์ถูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มาหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม โดยบ่มกับสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 0.1 M pH ตั้งแต่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลานาน 5 นาที ด้วยวิธี DNS assay ของ Miller ในข้อ 3.7.1 จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน พบว่า การบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 7.0 ให้ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 91.00±0.02 U/mg protein คิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพัทธ์เท่ากับ 100% (ตารางภาคผนวก ข4) โดยที่เอนไซม์สามารถทำงานได้มากกว่า 50% เมื่อบ่มในบัฟเฟอร์ pH 5.0-11.0 (ภาพที่ 4.19) ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ถูกผสมคือ pH 7.0 โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Ohara *et al.* (2000) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Ruminococcus albus* F-40 ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 5 แสดงออกใน *E. coli* มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ pH 7.0 Ko *et al.* (2010) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก

เชื้อ *P. campinasensis* BL11 ที่มีารแสดงออกใน *E. coli* โดย pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ pH 7.0 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ขณะที่ Sadhu *et al.* (2013) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากมูลโค ที่ pH 7.0 เอนไซม์มีการทำงานได้ดีที่สุด และงานวิจัยของ Park *et al.* (2007) ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Fibrobacter succinogenes* S85 ที่คัดแยกได้จากกระเพาะรูเมน แสดงออกใน *E. coli* มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ pH 7.0

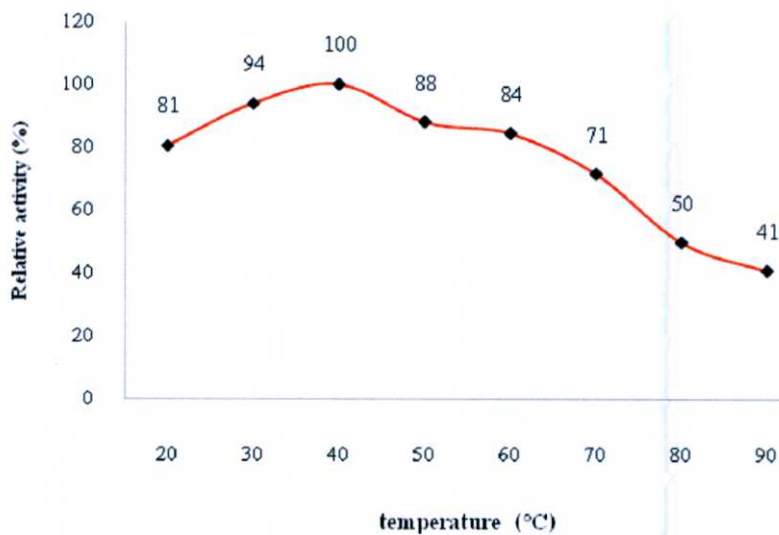


ภาพที่ 4.19 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อบ่มที่ pH 3.0-11.0 (100% = 91.00±0.02 U/mg protein)

4.4.3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimal temperature)

นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยบ่มกับสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมฟอสเฟตที่ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M บ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C นาน 5 นาที ด้วยวิธี DNS assay ของ Miller ในข้อ 3.7.1 จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ 20°C-90°C โดยที่อุณหภูมิ 40°C เอนไซม์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 92.81±0.02 U/mg protein คิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพันธ์เท่ากับ 100% (ตารางภาคผนวก ข5) เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงขึ้น พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเรื่อยๆ (ภาพที่ 4.20) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสมคือ 40°C ใช้เป็นอุณหภูมิในการทดสอบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ohara *et al.* (2000) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก

Ruminococcus albus F-40 ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 5 แสดงออกใน *E. coli* อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 40°C ขณะที่ Taguchi *et al.* (2004) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Ruminococcus albus* F-40 แสดงออกใน *E. coli* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 40°C และ Ogura *et al.* (2006) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Lysobacter* sp. IB-9374 แสดงออกใน *E. coli* อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 40°C

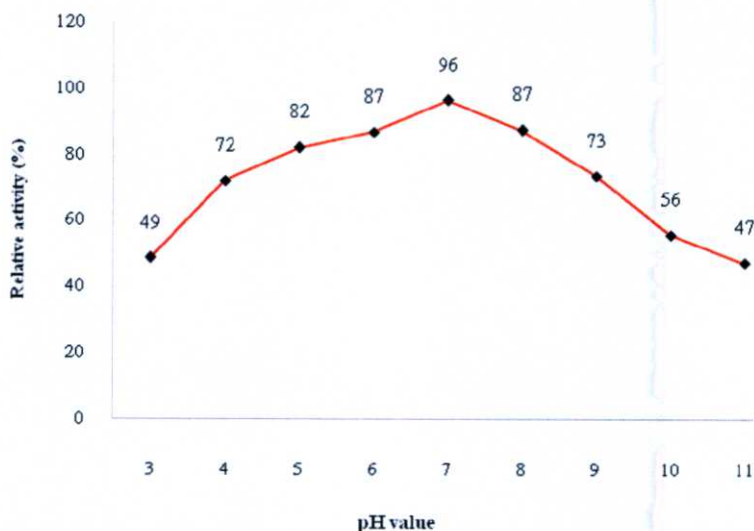


ภาพที่ 4.20 ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อบ่มโดยใช้อุณหภูมิ 20-90 °C (100% = 92.81±0.02 U/mg protein)

4.4.4 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ (pH stability)

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 M ตั้งแต่ pH 3.0-11.0 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ในสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตที่ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 5 จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ตั้งแต่ pH 3.0-11.0 ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง โดยคิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ (relative activity) ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มคิดเป็น 100% พบว่าเอนไซม์เซลลูเลส สามารถทนสภาวะความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์

ในช่วง pH 3.0-11.0 ได้ โดยเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้มากกว่า 50% ในช่วง pH 4.0-10.0 แม้ผ่านการบ่มในสารละลายที่มีค่า pH ดังกล่าวจนถึง 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.21) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Taguchi *et al.* (2004) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Ruminococcus albus* F-40 แสดงออกใน *E. coli* สามารถในการทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ ในช่วง pH 4.0-10.0 ขณะที่ CAF *et al.* (2014) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus* sp. K-11 สามารถทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ได้ดีในช่วง pH 4.0-9.0 ขณะที่ Hong *et al.* (2001) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* แสดงออกใน ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เอนไซม์มีความสามารถในการทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ ในช่วง pH 3.0-10.0 และจากการศึกษาของ Gong *et al.* (2012) รายงานว่า เอนไซม์ Cel14b22 จาก แบคทีเรีย ที่คัดแยกได้จากกระเพาะรูเมนของโคนม โดยไม่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิค metagenome amplification อยู่ในกลุ่มโกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 5 แสดงออกใน *E. coli* สามารถทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ได้ดีในช่วง pH 4.0-10.0

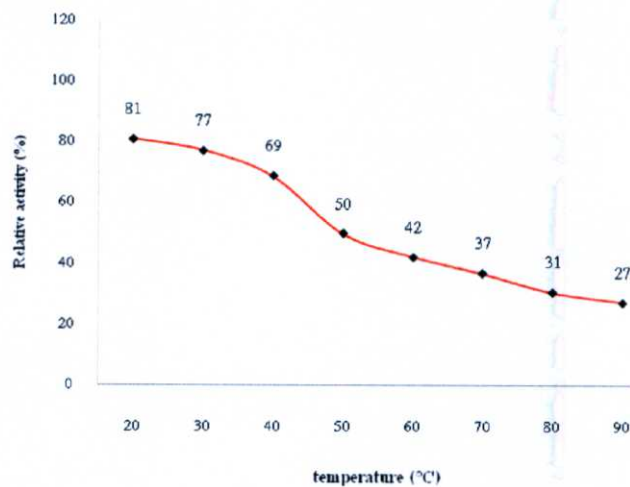


ภาพที่ 4.21 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์การทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0-11.0 ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์

4.4.5 การทดสอบความสามารถในการทนต่อความร้อนของเอนไซม์ (Thermo stability)

นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตที่ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M บ่มที่อุณหภูมิ 20-90°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ในสับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ที่มีสารละลาย

บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตที่ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 5 เปรียบเทียบกับ เอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 20-90 °C นาน 1 ชั่วโมง โดยคิดค่า กิจกรรมเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่ม คิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพันธ์เท่ากับ 100% พบว่าเอนไซม์ยังคงแสดง กิจกรรมที่ระดับมากกว่า 50% หลังผ่านการบ่มในอุณหภูมิ 20-50 °C นาน 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.22) Quay *et al.* (2011) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลส *Aspergillus niger* ที่แสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* มีความสามารถในการทนต่อความร้อนของเอนไซม์ ในช่วงอุณหภูมิ 30-55 °C พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus subtilis* YJ1 มีความสามารถในการทนความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 20-50 °C Guo *et al.* (2008) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Ampullaria crosseana* แสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* พบว่าในช่วงอุณหภูมิ 20-50 °C เอนไซม์ยังคงสภาวะการทำงานได้ดี Gong *et al.* (2012) รายงานว่า เอนไซม์ Cell4b22 จากแบคทีเรีย ที่คัดแยกได้จากกระเพาะรูเมนของโคนม โดยไม่มีการเพาะเลี้ยง เชื้อโดยใช้เทคนิค metagenome amplification อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 5 แสดงออกใน *E. coli* พบว่าเอนไซม์มีความสามารถในการทนความร้อนได้ดียังคงแสดงกิจกรรมที่ ระดับมากกว่า 80% หลังผ่านการบ่มในอุณหภูมิ 20-40 °C นาน 1 ชั่วโมง และกิจกรรมเอนไซม์จะ สูญเสียไปเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 55 °C



ภาพที่ 4.22 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์การทนต่อความร้อนของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 20-90 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์

4.4.6 การทดสอบการย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (Substrate specificity)

นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มาทดสอบความสามารถของเอนไซม์ต่อการย่อยสลายสับสเตรท ชนิดต่างๆ ได้แก่ 1% CMC, 1% Avicel, 1% กระดาษกรอง (Filter paper Whatman no.1) และ 1% Xylan ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมฟอสเฟตที่ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M บ่มที่อุณหภูมิ 40°C นาน 5 นาที จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยสลายสับสเตรท CMC ได้ดีโดยมีค่าแอกติวิตีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 93.91 ± 0.02 U/mg protein ย่อยสลายสับสเตรท Xylan ได้ค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 4.04 ± 0.03 U/mg protein และสามารถย่อยสลายสับสเตรท Avicel และ กระดาษกรองได้เพียงเล็กน้อย โดยมีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.62 ± 0.02 U/mg protein, และ 0.06 ± 0.01 U/mg protein ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) สอดคล้องกับการศึกษาของ Ohara *et al.* (2000) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Ruminococcus albus* F-40 ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี 5 แสดงออกใน *E. coli* พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อย่อยสลายสับสเตรท CMC เท่ากับ 197 U/mg และแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุดเมื่อย่อยสลายสับสเตรท xylan เท่ากับ 3.1 U/mg แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อย่อยสลายสับสเตรท Avicel ขณะที่ Kalawong *et al.* (2014) ได้ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากของเหลวในกระเพาะหมักของวัว ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มากที่สุด >99% พบว่าเอนไซม์มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรท CMC ได้สูงที่สุด (100%) มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรท xylan ประมาณ 20% และย่อยกระดาษกรองได้ 4% เมื่อเทียบกับสับสเตรทที่เป็น CMC ขณะที่ Vijayaraghavan and Vincent (2012) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus* sp. มีค่ากิจกรรมสูงสุดต่อสับสเตรท CMC เท่ากับ 16.5 U/mg protein และจากการศึกษาของ Quay *et al.* (2011) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* ATCC10574 ที่แสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* X-33 สามารถย่อยสลายสับสเตรท CMC ได้สูงที่สุด เท่ากับ 9.47 U/mg แต่ไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อย่อยสลายสับสเตรท filter paper และ Avicel ขณะที่งานวิจัยของ Yin *et al.* (2010) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus subtilis* YJ1 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด เมื่อย่อยสลายสับสเตรท CMC คิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ 100% รองลงมาคือ Avicel, xylan และ filter paper คิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ คือ 34%, 14% และ 5% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 ในการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ

Substrate	Specific activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
1% CMC	93.91±0.02	100
1% Xylan	4.04±0.03	4
1%Avicel	0.62 ±0.02	1
Filter paper	0.06±0.01	0

4.4.7 การเปรียบเทียบระบบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากระบบยีสต์ *K. lactis* และระบบ

E. coli

เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตในระบบของยีสต์ *K. lactis* และผลิตในระบบ *E. coli* (ตารางที่ 4.3) เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนเซลลูเลสในระบบยีสต์ *K. lactis* โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของน้ำตาลกลูโคสภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ LAC4 เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโปรตีน Cel5_A24 จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET28a(+) โดยใช้ระบบ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta ซึ่งมีการผลิตโปรตีนแบบภายในเซลล์ (intracellular) และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพียง 0.02 mg/ml (วิทิตา สาทิต โกวิตชัย, 2554) ขณะที่ยีสต์ลูกผสม *K. lactis* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 0.237 mg/ml จะเห็นได้ว่าระบบการผลิตโดยใช้ยีสต์ *K. lactis* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส Cel5_A24 ได้มากกว่าถึง 11.85 เท่า จากการเปรียบเทียบระบบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากระบบยีสต์ *K. lactis* และระบบ *E. coli* พบว่าการผลิตโปรตีน Cel5_A24 จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET28a(+) โดยใช้ระบบ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta ซึ่งมีการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยมีการเชื่อมต่อกับโปรตีน เพื่อทำการแยกโปรตีนลูกผสม Cel5_A24 ออกจากโปรตีนอื่นๆ ได้ แต่การผลิตโปรตีน Cel5_A24 โดยใช้ระบบยีสต์ *K. lactis* ซึ่งไม่มีการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมที่ได้เป็น crude protein จึงเป็นไปได้อุณหภูมิที่เหมาะสมและ thermo stability ในการทำงานของเอนไซม์ จะแตกต่างกัน เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตในระบบ *E. coli* นั้น เริ่มทดสอบที่อุณหภูมิตั้ง 30-80°C ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตในระบบยีสต์ *K. lactis* เริ่มทดสอบที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-90°C แต่ยังคงพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากทั้ง 2 ระบบนั้น มีความสามารถทนต่อความร้อนได้ เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80°C นาน 1 ชั่วโมง ส่วนสภาวะที่เหมาะสม pH stability ที่ผลิตในระบบยีสต์ *K. lactis* โดยเอนไซม์ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้น นำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งในช่วง pH 4.0-10.0 เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตในระบบ *E. coli* นั้น เอนไซม์ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์แล้วนำไปบ่มที่

อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ในช่วง pH 4.0-9.0 เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด อาจเป็นเพราะขณะทำการทดลองอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน และเนื่องจากแบคทีเรียเป็นโปรคาริโอต ไม่มีกระบวนการ glycosylation ส่วนยีสต์เป็นยูคาริโอต ซึ่งมีกระบวนการ glycosylation

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบระบบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากระบบยีสต์ *K. lactis* และระบบ *E. coli*

สถานะที่เหมาะสม	Cel5_A24 จาก <i>K. lactis</i>	Cel5_A24 จาก <i>E. coli</i> *
Protein Purity	Crude protein	Purified protein
Yield of crude protein	0.237 mg/ml	0.02 mg/ml
pH	7.0	7.0
temperature	40°C	30°C
pH stability	4.0-10.0	4.0-9.0
thermo stability	20-50°C	30-40°C
Substrate		
- CMC	93.91 U/mg protein	189.32 U/mg protein
- Avicel	0.62 U/mg protein	0.13 U/mg protein
- Filter paper	0.06 U/mg protein	0.05 U/mg protein

หมายเหตุ : * Cel5_A24 จาก *E. coli* วิทิตา สาริต โกวิทชัย (2554)

4.4.8 การวิเคราะห์สารยับยั้ง และสารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (Inhibit-activator enzyme)

นำเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 มาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรท CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมฟอสเฟตที่ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นเติมสารละลายดังต่อไปนี้ 10 mM CaCl₂, 10 mM LiCl, 10 mM SrCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 50 mM EDTA, 50 mM HgCl₂, 1% SDS, 5% SDS, 10% SDS บ่มที่อุณหภูมิ 40°C นาน 5 นาที เติมสารละลาย DNS นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน โดยเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่ได้เติมสารละลายต่างๆไป (non metal ions)

โดยให้ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์เท่ากับ 100 % พบว่า เมื่อเติมสารละลาย 10 mM CaCl_2 และ 10 mM SrCl_2 จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทำให้ทำงานได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่ได้เติมสารละลายลงในปฏิกิริยา คิดเป็นค่าฤทธิ์สัมพัทธ์เท่ากับ 116% และ 103% ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลายต่างๆ ได้แก่ 10 mM NaCl , 10 mM LiCl , 10 mM MgCl_2 , 10 mM EDTA, 50 mM EDTA, 1% SDS, 5% SDS, 10% SDS และ 50 mM HgCl_2 ปรากฏว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลงเรื่อยๆ (ตารางที่ 4.2) จากงานวิจัยของ Gaur and Tiwari (2015) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus vallismortis* RG-07 พบว่าเมื่อเติมสารละลาย CaCl_2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 184% เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่ได้เติมสารละลายต่างๆ ลงไป (100%) รองลงมาคือ MgCl_2 (175%) และ NaCl (141%) เมื่อเติมสารละลาย HgCl_2 (25%) มีผลเป็นตัวขัดขวางกิจกรรมของเอนไซม์ ขณะที่ Lee *et al.* (2008) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แสดงออกใน *E. coli* เมื่อเติมสารละลาย HgCl_2 และ EDTA จะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อเติม CaCl_2 ให้ค่ากิจกรรมสูงขึ้น Zhang *et al.* (2013) ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bursaphelenchus xylophilus* ที่แสดงออกใน *E. coli* เมื่อเติม สารละลาย EDTA และ SDS ทำให้การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งลดลงเหลือ $36 \pm 2.5\%$ และ $10.9 \pm 1.8\%$ เมื่อเติม CaCl_2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย $102.1 \pm 3.0\%$ และเมื่อเติมสารละลาย MgCl_2 มีผลยับยั้งต่อเอนไซม์เพียงเล็กน้อย $88.8 \pm 2.9\%$ Quay *et al.* (2011) รายงานว่าเมื่อเติมสารละลาย SDS และ EDTA ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเหลือ 51% และ 10% ตามลำดับ เมื่อเติม MgCl_2 และ CaCl_2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น และเมื่อเติมสารละลาย NaCl พบว่าไม่มีผลต่อเอนไซม์ Taguchi *et al.* (2004) รายงานว่าเมื่อเติมสารละลาย HgCl_2 จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส CAF *et al.* (2014) เมื่อเติมสารละลาย CaCl_2 มีผลเป็นตัวส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ 164%

ตารางที่ 4.4 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 เมื่อเติมสารละลายแต่ละชนิด

Metal ions	Specific activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
no metal ions	69.08±0.01	100
10 mM CaCl ₂	80.10±0.01	116
10 mM LiCl	36.85±0.02	53
10 mM SrCl ₂	71.05±0.02	103
10 mM NaCl	50.16±0.02	73
10 mM MgCl ₂	20.70±0.01	30
10 mM EDTA	9.48±0.01	14
50 mM EDTA	10.92±0.01	16
50 mM HgCl ₂	1.62±0.02	2
1% SDS	3.08±0.01	4
5% SDS	3.42±0.01	5
10% SDS	5.74±0.01	8

4.4.9 การทดสอบการย่อยวัสดุเยื่อใย

โดยใช้วัสดุเยื่อใย 1% ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด บ่มกับเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 20 ยูนิต และวัสดุเยื่อใยที่ไม่ได้บ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แต่บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 แทน บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 3 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน จากนั้นดูดส่วนใสมา 100 µl ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมฟอสเฟตที่ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 300 µl จากนั้นเติมสารละลาย DNS (dinitrosalicylic acid reagent) ต้มในน้ำเดือด 95 °C นาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสของยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 สามารถย่อยสลายซังข้าวโพดได้ดีที่สุดได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 219.51 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุ รองลงมาคือ ชานอ้อย และฟางข้าว ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 208.32 และ 159.46 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุ ตามลำดับ (ตาราง 4.3) นิรนาม (2555) กล่าวว่า องค์ภายในเซลล์พืชของฟางข้าวประกอบด้วย เซลลูโลส 32.1% เฮมิเซลลูโลส 24% และลิกนิน 12.5% ชานอ้อยประกอบด้วย เซลลูโลส 33.4 % เฮมิเซลลูโลส 30% และ

ลิกนิน 18.9 % ส่วนซังข้าวโพดประกอบด้วย 45% เซมิเซลลูโลส 35 % และลิกนิน 15% วิมลทิพย์ ไตรปัญญา (2550) รายงานว่า *Bacillus* สายพันธุ์ TW-1 ที่คัดแยกมาจากถ้ำหมักแก๊สชีวภาพ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส และ คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลส เท่ากับ 6.41 U/mg protein และ 0.14 U/mg protein ตามลำดับ และมีกิจกรรมของเอนไซม์อะราบิโนฟูราโนซิเดส เบต้าไซโลซิเดส เบต้ากลูโคซิเดส เพียงเล็กน้อย พบว่าเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยสามารถย่อยเปลือกข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมา คือซังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว และ แกลบ ตามลำดับ Kalawong *et al.* (2014) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสมีความสามารถในการย่อยของเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้โดยย่อยซังข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ฟางข้าว Harini and Kumaresan (2014) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* สามารถย่อยซังข้าวโพดได้ดีที่สุด (0.370 mg/ml) กุสุมา แก้วอินทจักร และคณะ (2549) เอนไซม์สกัดรวมจาก *Bacillus circulans* B-6 พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสและคาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสสามารถย่อยซังข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว ตามลำดับ Tabka *et al.* (2011) รายงานว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *Trichoderma reesei* ร่วมกับ *A. Niger* พบว่าสามารถย่อยสลายฟางข้าวสาทิให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 49 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุ Rosgaard *et al.* (2007) รายงานว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* สามารถย่อยสับสเตรทฟางข้าวบาร์เลย์ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 7 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ข่อยจากวัสดุ 1 กรัม

วัสดุย่อย	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (mg)
ฟางข้าว	159.46
ชานอ้อย	208.32
ซังข้าวโพด	219.51

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ยีนเซลลูเลสที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ *cel5_A24* แบบ mature gene ซึ่งจำแนกได้จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะหมักของกระบือปลัก พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเซลลูเลสจากเชื้อ *Ruminococcus albus* 77% ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส แฟมิลีที่ 5 จัดอยู่ในกลุ่ม endoglucanase มีขนาด 2,163 bp ที่เชื่อมต่อไว้ในพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T จากวิทิตา สาริตโกวิทชัย (2554)

เมื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานและความสามารถในการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 พบว่าเอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ดีเมื่อปรับที่ pH 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 40°C และสามารถทนสภาวะความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ ในช่วง pH 3.0-11.0 ได้ แต่สามารถทนความเป็นกรด-ด่างได้ดีในช่วง pH 4.0-10.0 ส่วนความสามารถในการทนต่อความร้อนเอนไซม์สามารถทนความร้อนได้เมื่อปรับนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90°C และเอนไซม์ยังคงแสดงกิจกรรมที่ระดับมากกว่า 50% หลังผ่านการปรับในอุณหภูมิ 20-50°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อทดสอบการย่อยสลายสับสเตรท พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยสับสเตรท CMC ได้ดี และย่อยสับสเตรท Xylan, Avicel และ กระดาษกรองได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเติมสารละลาย 10 mM CaCl₂ และ 10 mM SrCl₂ เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น และเมื่อเติมสารละลายต่างๆ ได้แก่ 10 mM NaCl, 10 mM LiCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 50 mM EDTA, 1% SDS, 5% SDS, 10 %SDS, 50 mM HgCl₂ ปรากฏว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลงเรื่อยๆ เอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยสลายซังข้าวโพคได้ดีที่สุด ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 219.51 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุ รองลงมาคือ ซานอ้อยและฟางข้าว ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 208.32 และ 159.46 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุ ตามลำดับ

ควรมีการนำยีสต์ลูกผสมที่มียีนเซลลูเลสไปทำการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณที่มากขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อการนำไปใช้จริง และควรนำสภาวะที่เหมาะสมที่ทำการทดสอบได้ ไปทดสอบในสภาวะจริง

เอกสารอ้างอิง

- กุศมา แก้วอินทชะจักร์คิน เลย์ คู และกนก รัตนะกนกชัย. 2549. การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดย cellulosome-like multienzyme complex จาก *Bacillus circulans* B-6. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 100-108.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พิมพ์ครั้งที่ 7. หน้า 1-735.
- นิรนาม. 2555. โครงการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสเชิงพาณิชย์. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. **เอนไซม์ทางอาหาร**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. **เอนไซม์ตัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประกาศ โฉลกพันธ์รัตน์. 2553. **การเพาะเลี้ยงยีสต์**. ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. <http://home.kku.ac.th/pracha/Yeast%20Culture.htm#การเจริญเติบโตและการใช้อาหาร>
- พัชรา วีระกะลีส. 2544. **พลังงานและเมแทบอลิซึม**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรารุณี ครุสง และ กรวิกา สุขศรีวงษ์. 2539. “เทคโนโลยีชีวภาพ.” ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วันเชิญ โปธาเจริญ. 2551. เอกสารประกอบสื่อการเรียนรู้ความหลากหลายทางชีวภาพ เจ็ดพันปีก่อนคริสตกาล. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.
- วิทิตา สาริตโกวิทชัย. 2554. **การโคลนและการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 5 จากรูเมนกระบือปลัด**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- วิมลทิพย์ ไตรปัญญา จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ กนก รัตนะกนกชัย และ คิน เลย์ คู. 2550. การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 85-92.

- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. **ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. พันธุศาสตร์ของยีสต์และแนวทางการใช้ประโยชน์. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18 National Genetics Conference 2013 (NGC2013).
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. **ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ จามจุรีโปรดักท์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น, สำนักพิมพ์ ม.เกษตรศาสตร์, พิมพ์ครั้งที่ 3 กทม. หน้า 1-282.
- Akbarzadeh, A., Omid, S., Siadat, R., Motallebi, M., Zamani, M.R., Tashnizi, M.B. and Moshtaghi, S. 2014. "Characterization and High Level Expression of Acidic Endoglucanase in *Pichia pastoris*". **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 172 : 2253–2265.
- Anné, J., Maldonado, B., Van I.J., Van, M.L. and Bernaerts, K. 2012. "Recombinant protein production and streptomycetes". **Journal of Biotechnology**. 158(4) : 159-167.
- Anomuous. 2013. <http://teachline.ls.huji.ac.il/72346/PlantCell/cellwall.html>. 04/03/13.
- Ariffin, H. Abdullah, N., Kalsom, M.S.U., Shirai, Y. and Hassan, M.A. 2006. "Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3". **International Journal of Engineering and Technology**. 3(1) : 47-53.
- Ayers, W.A. 1959. "Phosphorolysis and synthesis of cellobiose by cell extracts from *Ruminococcus flavefaciens*". **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 140 : 219-229.
- Barnett, I.A., Payne, R.W and Yarrow, D. 2000. "**Yeasts characteristics and identification**". Cambridge University Press. UK.
- Barras, F., Bortoli, G.I., Bauzan, M., Rouvier, J., Gey, C., Heyraud, A. and Henrissat, B. 1992. "Stereochemistry of the hydrolysis reaction catalyzed by endoglucanase Z from *Erwinia chrysanthemi*". **FEBS Letters**. 300(2) : 145-8.
- Bayer, A.B. Morag, E. Lamed, R. Yaron, S. and Shoham, Y. 1998. "Cellulosome structure: four pronged attack using biochemistry, molecular biology, crystallography and bioinformatics". In *Carbohydrases from Trichoderma reesei and Other Microorganisms*. Ed. M Claeysens, W Nerinckx, K Piens, pp. 39-65. London.
- Beguin, P. and Aubert, J.P. 2000. "Cellulase". **Journal Encyclopedia of microbiology**. 744-758.

- Béguin, P. and Aubert, J.P. 1994. "The biological degradation of cellulose". **FEMS Microbiology Reviews**. 13 : 25-58.
- Belghith, H., Ellouz, C.S. and Gargouri, A. 2001. "Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) Cellulases". **Journal of Biotechnology**. 89(2-3) : 257-262.
- Bhat, M.K. 2000. "Cellulases and related enzymes in biotechnology". **Biotechnology Advances**. 18(5) : 335-383.
- Binnie, C., Douglas, C.J. and Stewart D.I.H. 1997. "Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*". **Trends in Biotechnology**. 15(8) : 315-320.
- Bonekamp, F.J. and Oosteromm, J. 1994. "On the safety of *Kluyveromyces lactis*: a review". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 41 : 1-3.
- CAF, Y., Valipour, E., and Arikan, B. 2014. "Study on Cold-Active and Acidophilic Cellulase (CMCase) from a novel psychrotrophic isolat *Bacillus* sp. K-11". **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 3(5) : 16-25.
- Cai, S., Li, J., Hu, F.Z., Zhang, K., Luo, Y., Janto, B., Boissy, R., Ehrlich, G. and Dong, X. 2010. "Cellulosilyticum ruminicola, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes". **Applied and Environmental Microbiology**. 76 : 3818-3824.
- Çalik, E. and Çalik, P. 2011. "Production of recombinant proteins by yeast cells". **Biotechnology Advances**. 30 : 1108-1118.
- Chandra, M.S., Viswanath, B. and Reddy, B.R. 2007. "Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*". **Indian Journal of Microbiology**. 47 : 323-328.
- Colussi, P.A. and Taron, C.H. 2005. "*Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but rennin full function in *K. lactis*". **Applied and Environment Microbiology**. 71 : 7092-7098.
- Cottrell, M.T., Yu, L. and Kirchman, D.L. 2005. "Sequence and expression analyses of Cytophaga-like hydrolases in a Western Arctic Metagenomic Library and the Sargasso Sea". **Applied and Environmental Microbiology**. 71(12) : 8506-8513.
- Coutinho, P.M. and Henrissat, B. 1999. "Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach." *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*.

- D'Amore, T., Celotto, G., Russell, I. and Stewart, G.G. 1989. "Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C". **Enzyme and Microbial Technology**. 11 : 411-416.
- Das, S. and Hollenberg, C.P. 1982. "A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*". **Current Genetics**. 6 : 123-128.
- Dashtban, M., Schraft, H. and Qin, W. 2009. "Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives". **International Journal of Biological Sciences**. 5 : 578-595.
- Davison, A. and Blaxter, M. 2005. "Ancient Origin of Glycosyl Hydrolase Family 9 Cellulase Genes". **Molecular Biology and Evolution**. 22 : 1273-1284.
- Delgado, O.D., Martínez, M.A., Abate, C.M. and Siñeriz, F. 2002. "Chromosomal integration and expression of green fluorescent protein in *Zymomonas mobilis*". **Biotechnology Letters**. 24 : 1285-1290.
- Dhillon, G.S., Oberoi, H.S., Kaur, S., Bansal, S. and Brar, S.K. 2011. "Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi". **Industrial Crops and Products**. 34(1) : 1160-1167.
- Dominguez, R., Souchon, H., Spinelli, S., Dauter, Z., Wilson, K.S., Chauvaux, S., Beguin, P. and Alzari, P.M. 1995. "A common protein fold and similar active-site in two distinct families of β -glycanases". **Nature Structural Biology**. 2(7) : 569-576.
- Dujon, B. Sherman, D. Fisher, G. 2004. "Genome evolution in yeasts". *Nature* 430 : 35-44.
- Entian, K.D. and Barnett, J.A. 1983. "Some genetical and biochemical attempts to elucidate the energetics of sugar uptake and explain the Kluyver effect in the yeast *Kluyveromyces lactis*". **Current Genetics**. 7: 323-325.
- Feng, Y.M., Zhang, B.Y., Zhang, Y.S. and Hiroshi, F. 1997. "Secretory expression of porcine insulin precursor in *Kluyveromyces lactis* and its conversion into human insulin". *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao*. 29 : 129-134.
- Feng, S., Zhang, L., Han, X. and Zhang, Y. 2010. "Codon optimization of the calf prochymosin gene and its expression in *Kluyveromyces lactis*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26 : 895-901.

- Fang, W., Gao, H., Cao, Y. and Shan, N. 2014. "Cloning and expression of a xylanase xynB from *Aspergillus niger* IA-001 in *Pichia pastoris*". **Journal of Basic Microbiology**. 54 : 190–199.
- Fanutti, C., Ponyi, T., Black, G.W, Hazlewood, G.P. and Gilbert, H.J. 1995. "The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain". **Journal of Biological Chemistry**. 270(49) : 29314-29322.
- Galante, Y.M, and Formantici, C. 2003. "Enzyme Applications in detergency and in manufacturing industries". **Current Organic Chemistry**. 7(13) : 1399-1422.
- Gaur, R. and Tiwari, S. 2015. "Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07". **BMC Biotechnology**. 15-19.
- Gerngross, T.U. 2004. "Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi". **Nature Biotechnology**. 22 : 1409-1414.
- Gong, X., Gruninger, R.J., Qi, M., Paterson, L., Forster, R.J., Teather, R.M. and McAllister, T.A. 2012. "Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene". **BMC Research Notes**. 5:566-577.
- Guo, R., Ding, M., Zhang, S., Xu, G. and Zhao, F. 2008. "Expression and characterization of two secreted His6-tagged endo- β -1,4-glucanases from the mollusc *Ampullaria crosseana* in *Pichia pastoris*". **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. 40(5) : 419-425.
- Harini, S and Kumaresan, R. 2014. "Production Of Cellulase From Corn Cobs By *Aspergillus niger* Under Submerged Fermentation". **International Journal of ChemTech Research**. 6(5) : 2900-2904.
- Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L. and Mornon, J.P. 1989. "Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis". **Gene**. 81(1) : 83-95.
- Henriksson, M. and Berglund, L.A. 2007. "Structure and properties of cellulose nanocomposite films containing melamine formaldehyde". **Journal of Applied Polymer Science**. 106 : 2817-2824.
- Henrissat, B., Coutinho, P.M., Lombard, V. and Drula, E. 2015. "Carbohydrate-Active Enzymes Database. [online]. Available: <http://www.cazy.org/>. 02/01/2015.

- Herai, S., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Maseda, H., Ikeda, H. and Omura, S. 2004. "Hyper-inducible expression system for streptomycetes". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 101(39) : 14031-14035.
- Hong, J., Tamaki, H., Akiba, S., Yamamoto, K. and Kumagai, H. 2001. "Cloning of a gene encoding a highly stable endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast". **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 92(5) : 434-441.
- Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H. and Tamaki, H. 2007. "Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes." **Journal of Biotechnology**. 130 : 114-123.
- Hong, J., Ye, X. and Zhang, Y.H.P. 2007. "Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications". **Langmuir**. 23 : 12535-12540.
- Huang, H., Yang, P., Luo, H., Tang, H., Shao, N., Yuan, T., Wang, Y., Bai, Y. and Yao, B. 2008. "High-level expression of a truncated 1,3-1,4- β -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 78 : 95-103.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. 1997. "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". **Gene**. 96 : 23-28
- Iwamoto, S., Nakagaito, A.N. and Yano, H. 2007. "Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites". **Applied Physics A: Materials Science & Processing**. 89 : 461-466.
- Jin, X., Meng, N. and Xia, L-M. 2011. Expression of an Endo- β -1,4-glucanase Gene from *Orpinomyces* PC-2 in *Pichia pastoris*". **International Journal of Molecular Sciences**. 12 : 3366-3380.
- Johnson, E.A., Madia, A. and Demain, A.L. 1981. "Chemically defined minimal medium for the growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*". **Applied and Environmental Microbiology**. 41 :1060-1062.
- Juturu, V. and Wu, J.C. 2012. "Microbial xylanases. Engineering, production and applications". **Biotechnology Advances**. 30: 1219-1227.
- Kalawong, R., Anantalabhochai, S. and Wagayama, M., 2014. "Purification and Characterization of Bacterial Cellulase from Cow's Rumen". **Graduate Research Conference**.

- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Hessler, N., Hornung, M., Schmauder, H.P. and Marsch, S. 2006. "Nanocelluloses as innovative polymers in research and application". **Polysaccharides**. 205: 49-96.
- Ko, C.H., Tsai, C.H., Lin, P.H., Chang, C.H., Tu, J., Wang, Y.N. and Yang, C.Y. 2010. "Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*". **Bioresource Technology**. 101(20) : 7882-7888.
- Koivula, A., Ruohonen, L., Wohlfahrt, G., Reinikainen, T., Teeri, T.T., Piens, K., Claeysens, M., Weber, M., Vasella, A., Becker, D., Sinnott, M.L., Zou, J.Y., Kleywegt, G.J., Szardenings, M., Ståhlberg, J. and Jones, T.A. 2002. "The active site of cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei* : The roles of aspartic acids D221 and D175". **Journal of the American Chemical Society**. 124 : 10015-10024.
- Koshland, D.E.J. 1953. "Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions". **Biological Reviews**. 28(4) : 416-436.
- Kudo, T. 2009. "Termite-microbe symbiotic system and its efficient degradation of lignocelluloses". **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 73 : 2561-2567.
- Kumar, S., Sharma, H. K., and Sarkar, B. C. 2011. "Effect of Substrate and Fermentation Conditions on Pectinase and Cellulase Production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in Submerged (SmF) and Solid State Fermentation (SSF)". **Food Science and Biotechnology**. 20(5) : 1289-1298.
- Kumar, V. 2011. "Identification of the sequence motif of glycoside hydrolase 13 family members". **Bioinformatics**, 6 : 61-63.
- Laloux, O., Cassart, J.P., Delcour, J., van Beeumen, J. and Vandenhoute, J. 1991. "Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. **FEBS Letters**. 289 : 64-68.
- Li, X.L., Chen, H. and Ljungdahl, L.G. 1997. "Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex". **Applied and Environmental Microbiology**. 63(12) : 4721-4728.
- Lamed, R., Setter, E., Kenig, R. and Bayer, E.A. 1983. "The cellulosome: a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities". **Biotechnol Bioeng**. 13 :163-181.

- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, L.K., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C. and Lee, J.W. 2008. "Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull". **Bioresource Technology**. 99 : 378-386.
- Lejeune, A., Eveleigh, D.E. and Colson, C. 1988. "Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* in *Zymomonas mobilis*". **FEMS Microbiology Letters**. 49 : 363-366.
- Li, S., Shen, W., Chen, X., Shi, G. and Wang, Z. 2011. "Secretory expression of *Rhizopus oryzae* α -amylase in *Kluyveromyces lactis*". **African Journal of Biotechnology**. 10(20) : 4190-4196.
- Li, W., Huan, X., Zhou, Y., Ma, Q. and Cen, Y. 2009. "Simultaneous cloning and expression of two cellulose genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from Golden Takin (*Budorcas taxicolor Bedfordi*).". **Biochem Biophys Res Commun**. 383 : 397-400.
- Linger, J.G., Adney, W.S. and Darzins, A. "Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by *Zymomonas mobilis*". **Applied and Environmental Microbiology**. 76 : 6360-6369.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van, Zyl, W.H. and Pretorius, I.S. 2002. "Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 66(3) : 506-577.
- Miller, C.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar". **Analytical Chemistry**. 31 : 426-428.
- Ogura, J., Toyoda, A., Kurosawa, T., Chong, A.L., Chohnan, S. and Masaki, T. 2006. "Purification, Characterization, and Gene Analysis of Cellulase (Cel8A) From *Lysobacter* sp. IB-9374". **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. 70(10) : 2420-2428.
- Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. and Ohmiya, K. 2000. "Sequence of *egV* and Properties of *EgV*, a *Ruminococcus albus* Endoglucanase containing a Dockerin Domain". **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. 64(1) : 80-88
- Oishi, H., Morimoto, T., Watanabe, Y. and Tamai, Y. 1999. "Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces lactis*, and cloning of phospholipase B". **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 63 : 83-90.
- Olson, L.A. "Treatment of denim with cellulose to produce a stone washed appearance". US Pat. 4912056 (to Ecolab Inc, USA) 27 March 1990.

- Olson, L.A. and Stanley, P.M. "Cellulase compositions and methods that introduce variation in color density into cellulosic fabrics, particularly indig dyed denim". US Pat 5006126 (to Ecolab Inc, USA) 9 April 1991.
- Opassiri, R., Pomthong, B., Onkoksoong, T., Akiyama, T., Esen, A. and Ketudat, J.R. 2006. "Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 beta-glucosidase". **BMC Plant Biology**. 6:33.
- Perez, J., Munoz-Dorado, T.R. and Martinez, J. 2002. "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin an overview." **International Microbiology**. 5: 53-63.
- Park, J.S., Russell, J.B. and Wilson, D.B. 2007. "Characterization of a family 45 glycosyl hydrolase from *Fibrobacter succinogenes* S85". **Anaerobe**. 13(2) : 83-88.
- Ponnambalam, A.S., Deepthi, R.S. and Ghosh, A.R. 2011. "Qualitative display and measurement of enzyme activity of isolated cellulolytic bacteria". **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**. 1 : 33-37.
- Quay, D.H.X., Bakar, F.D.A., Rabu, A., Said, M., LLLias, R.M., Mahadi, N.M., Hassan, O. and Murad, A.M.A. 2011. "Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, *EglA*, in *Pichia pastoris*". **African Journal of Biotechnology**. 10 : 2101-2111.
- Reddy, N. and Yang, Y. 2009. "Natural cellulose fibers from soybean straw". **Bioresource Technology**. 100(14) : 3593-3598
- Robin S, Petrov K, Dintinger T, Kujumdzieva A, Tellier C & DionM (2003) Comparison of three microbial hosts for the expression of an active catalytic scFv. *Molecular Immunology*. 39 : 729-738.
- Rosgaard, L. Pedersen, S. Langston, J. Akerhielm, D., Cherry, J.R. and Meyer, A.S. 2007. "Evaluation of Minimal *Trichoderma reesei* Cellulase Mixtures on Differently Pretreated Barley Straw Substrates". **Biotechnology Progress**. 23(6): 1270–1276.
- Sadhu, S. and Maiti, T.K. 2013. "Cellulase Production by Bacteria: A Review". **British Microbiology Research Journal**. 3(3) : 235-258.
- Sadhu, S., Saha, P., Sen, S.K., Mayilraj, S. and Maiti, T.K. 2013. "Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung". **Springer Plus**. 2-10.

- Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniants, T. 1989. "**Molecular Cloning: A Laboratory Cold Spring Harbor**", New York: Cold Spring Habor Press.
- Saranraj, P., Stella, D. and Reetha, D. 2012. "Microbial cellulases and its applications: a review". **International Journal of Biochemistry & Biotech Science**. 1 : 1-12.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.F. 1989. "High efficiency transformation of intract yeast cells using single stranded nucleic acid as carrier." *Current Genetics*. 16: 339-349.
- Sharma, R., Katoch, M., Srivastava, P. and Qazi G. 2009. "Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi". **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 25(12) : 2083-2094.
- Shoham, Y., Lamed, R. and Bayer, E.A. 1999. "The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides". **Trends Microbiol**. 7(7) : 275-281.
- Song, J., Liu, B. Liu, Z., Yang, Q. 2010. "Cloning of two cellobiohydrolase genes from *Trichoderma viride* and heterogeneous expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*". **Molecular Biology Reports**. 37(4) : 2135-2140.
- St John, F.J., González, J.M. and Pozharski, E. 2010. "*Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: a dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups*". **FEBS Letters**. 584(21) : 4435-41.
- Streatfield, S.J. 2007. "Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants". **Plant Biotechnology Journal**. 5(1) : 2-15.
- Sukumaran, R.K., Singhania, R.R. and Paney, A. 2005. "Microbial cellulose-Production, applications and challenges". **Journal of Scientific & Industrial Research**. 64 : 832-844.
- Swennen, D., Paul, M.F., Vernis, L., Beckerich, J.M., Fournier, A. and Gaillardin, C. 2002. "Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*". **Microbiology**. 148 : 41-50.
- Tabka, M.G., Gimbert, H.I., Monod, F., Asther, M. and Sigoillot, J.C. 2006. "Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment". **Enzyme and Microbial Technology**. 39(4): 897-902.

- Taguchi, H., Hagiwara, D., Genma, T., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. and Ohmiya, K. 2004. "Cloning of the *Ruminococcus albus* *Cel5D* and *Cel9A* Genes Encoding Dockerin Module-containing Endoglucanases and Expression of *Cel5D* in *Escherichia coli*". **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. 68(7) : 1557-1564.
- Thomas, L., Sindhu, R., Binod, P. and Pandey, A. 2014. "An alkali-thermostable xylanase from *Bacillus pumilus* functionally expressed in *Kluyveromyces lactis* and evaluation of its deinking efficiency". **Bioresource Technology**. 165 : 309–313.
- Ushasree, M.V., Vidya, J. and Pandey, A. 2014. "Extracellular expression of a thermostable phytase (*phyA*) in *Kluyveromyces lactis*". **Process Biochemistry**. 49 : 1440–1447.
- van den Berg, J.A., van der Laken, K.J., van Ooyen, A.J.J., Renniers, T.C.H.M., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A.J., Bishop, R.J., Schultz, K., Moyer, D., Richman, M. and Shuster, J.R. 1990. "*Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin". **Nature Biotechnolog.**, 8 : 135-139.
- Vanholme, B., de Meutter, J., Tytgat, T., van Montagu, M., Coomans, A. and Gheysen, G. 2004. "Secretions of plant-parasitic nematodes: A molecular update". **Gene**. 332 : 13–27.
- van Ooyen, A.J.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M.A., Jacobs, D., Colussi, P.A. and Taron, C.H. 2006. "Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*". **FEMS Yeast Research**. 6 : 381-392.
- Vijayaraghavan and Vincent. 2012. "Purification and Characterization of Carboxymethyl Cellulase from *Bacillus* sp. Isolated from a Paddy field". **Polish Journal of Microbiology**. 61(1) : 51-55.
- Vocadlo, D.J., Davies, G.J. 2008. "Mechanistic insights into glycosidase chemistry". **Current Opinion in Chemical Biology**. 12 : 539-555.
- Wamalwa, B.M., Zhao, G., Sakka, M., Shiundu, P.M., Kimura, T. and Sakka, K. 2007. "High-level Heterologous Expression of *Bacillus halodurans* Putative Xylanase Xyn11A (BH0899) in *Kluyveromyces lactis*". **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 71(3) : 688-693.
- Ward, O.P. 2012. "Production of recombinant proteins by filamentous fungi". **Biotechnology Advances**. 30(5) : 1119-1139.

- Watanabe, H. and Tokuda, G. 2001. "Review Animal cellulases". **Cellular and Molecular Life Sciences**. 58 : 1167-1178.
- Watanabe, H. and Tokuda, G. 2010. "Cellulolytic systems in insects". **Annual Review of Entomology**. 55 : 609-632.
- Wésolowski-Louvel, M., Breuning, K.D. and Fukuhara, H. 1996. "**Nonconventional yeasts in biotechnology : a handbook**". Springer-Verlag. Heidelberg.
- Wike, C. R., Maiorella, B., Sciamanna, A., Tangnu, K., Wiley, D. and Wong, H. 1983. "Enzymatic hydrolysis of cellulose". Park Ridge, New Jersey, USA: Noyes Data Coporation. 39-45.
- Wood, TM. 1989. "Mechanisms of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi", In: MP Coughlan (ed.), Enzyme systems for lignocelluloses degradation. **Elsevier Applied Science, London**. 17-35.
- Xiaohong, Z., C. Hongzhang and L. Zuohu, 2004. "CMCase activity assay as a method for cellulase adsorption analysis". **Enzyme and Microbial Technology**. 35: 455-459.
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S.Y. and Wyman, C.E. 2011. "Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass". **Biofuels** 2 : 421-450.
- Yin, L.J., Lin, H.H. and Xiao, Z.R. 2010. "Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1". **Journal of Marine Science and Technology**. 18(3) : 466-471.
- Zhan, F.X., Wang, Q.H., Jiang, S.J., Zhou, Y.L., Zhang, G.M. and Ma, Y.H. 2014. "Developing a xylanase XYNZG from *Plectosphaerella cucumerina* for baking by heterologously expressed in *Kluyveromyces lactis*". **BMC Biotechnology**. 14:107-115.
- Zhang, L., Fan, Y., Zheng, H., Du, F., Zhang, K.Q., Huang, X., Wang, L., Zhang, M., and Niu, Q. 2013. "Isolation and Characterization of a Novel Endoglucanase from a *Bursaphelenchus xylophilus* Metagenomic Library". **PLOS ONE**. 8(12).
- Zhang, X.Z. and Zhang, Y.H.P. 2013. "Cellulase: characteristics, sources, production, and applications". **Bioprocessing Technologies**. 131-146.
- Zhang, Y.H.P., Cui, J.B., Lynd, L.R. and Kuang, L.R. 2006. "A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: Evidences from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure". **Biomacromolecules**. 7 : 644-648.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย อาหารเลี้ยงเชื้อ และแผ่นที่เวกเตอร์

การเตรียมสารละลาย

1. Alkaline lysis I ใช้สำหรับสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

50 mM	Glucose
25 mM	Tris-HCl (pH8.0)
10 mM	EDTA (pH8.0)

นำมาเชื่อมที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

2. Alkaline lysis II ใช้สำหรับสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

0.2 N	NaOH
1%	SDS

3. 50X TAE buffer (Tris-acetate)

242 g	Tris-borate
57.1 ml	Acetic acid
100 ml	EDTA (pH8.0)

ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1 ลิตร

4. 6X loading buffer

0.25%	Bromopheno blue
30%	Glycerol

5. Ethidium bromide 0.5 mg/ml

ละลาย 0.5 mg Ethidium bromide ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ml เก็บในขวดสีชา (เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือในการเตรียมสารละลาย)

6. TB buffer ที่ใช้สำหรับการเตรียม competent cell

10 mM	PIPES
55 mM	MnCl ₂
15 mM	CaCl ₂

250 mM KCl

7. 1M Isopropyl-B-D-thiogalactoside (IPTG)

เตรียม stock IPTG โดยละลาย 2 g IPTG ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 8 ml เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 10 ml กรองด้วย filter ขนาด 0.22 μm เก็บที่ -20°C

8. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal)

ละลาย 20 mg X-gal ใน Dimethylformamide 400 μl แล้วเก็บในหลอดที่กันแสง เก็บที่ อุณหภูมิ -20°C

9. Lysis buffer

140 mM NaCl
 2.7 mM KCl
 10 mM Na_2HPO_4
 1.8 mM KH_2PO_4
 pH 7.3 เติม 1 mM PMSF ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

10. Lysis buffer สำหรับการทำให้ size screening

5 mM EDTA
 10% Sucrose
 0.25% SDS
 0.05% Bromophenol blue
 100 mM NaOH
 10 mM KCl

11. 20% SDS

ชั่ง SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 25 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

12. phenol: chloroform: isoamyl (25:24:1)

25 ml Phenol

24 ml Chloroform

1 ml Isoamyl

ผสม phenol, chloroform และ isoamyl ให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C (ควรทำให้ hood)

13. 1M NaCl

1.2 g NaOH

30 ml น้ำกลั่น

14. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

10.6 g 3,5-dinitrosalicylic acid

19.8 g NaOH

306 g Potassium sodium tartate

8.3 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

7.6 ml Phenol

1,416 ml น้ำกลั่นอุ่น

ละลาย Potassium sodium tartate ในน้ำกลั่นตามปริมาณที่ต้องการ และจึงเติมสารละลายอื่นๆ ลง บรรจุใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ในที่มืด

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria-Bertani broth (LB Broth)

10 g Tryptone

5 g Yeast extract

10 g NaCl

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Luria-Bertani agar (LB agar)

10 g Tryptone

5 g Yeast extract

10 g NaCl

15 g Agar

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. SOB media

2% Tryptone

0.5% Yeast extract

10 mM NaCl

2.5 mM KCL

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. YPGlu/YPGal broth

10 g Yeast extract

20 g Peptone

50 ml 40% Glucose/Galactose

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 950 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม 40% Glucose/Galactose 50 ml

5. YPGlu/YPGal agar

10 g Yeast extract

20 g Peptone

20 g Agar

50 ml 40% Glucose/Galactose

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 950 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม 40% Glucose/Galactose 50 ml

6. YCB agar

12 ml	1 M Tris-HCl
4.68 g	YCB medium powder
8 g	Agar

ละลาย YCB medium powder ในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติม 1 M Tris-HCl ผสมให้เข้ากัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 400 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. CMC agar (Carboxymethyl cellulose agar)

Carboxymethyl cellulose	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Yeast extract	5 g
Agar	15 g

ละลาย CMC ในน้ำอุ่น และคนตลอดจนละลายหมด จากนั้นละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. 40% Glucose/Galactose

ละลาย Glucose/Galactose ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 ml และคนตลอดจนละลายหมด นำไปกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 µm

9. 100x Acetamide

0.75 g	acetamide
--------	-----------

ละลาย acetamide ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 25 ml และคนตลอดจนละลายหมด นำไปกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 µm เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมยาปฏิชีวนะ

1. Ampiclin 100 mg/ml

ละลายยาปฏิชีวนะด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 μm เก็บที่ -20°C

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

1. 5x SDS dye loading buffer

1.9 ml	น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
0.5 ml	0.5M Tris-HCl pH 6.8
0.4 ml	Glycerol
0.8 ml	10% SDS
0.2 ml	2 Mercaptoneethanol
0.2 ml	1% Bromophenol blue

2. 10x protein running buffer (1 ลิตร)

30 g	Tris-base
144 g	Glycine
10 g	SDS

3. Destaining buffer (1 ลิตร)

100 ml	Methanol
100 ml	Acetic acid
800 ml	น้ำกลั่น

4. Coomassie Brilliant Blue stain (2 ลิตร)

2 g	Coomassie Brilliant Blue R-250
1L	Methanol
200 ml	Acetic acid
800 ml	น้ำกลั่น

5. 10% Ammonium persulfate

ละลาย 100 mg Ammonium persulfate ในน้ำกลั่น 1 ml

6. การเตรียมเจลเพื่อทำ SDS-PAGE

เจลมี 2 แบบ คือ 10% separating และ 5% stacking ในการเตรียมเจลทั้ง 2 แบบ แสดงในตารางภาคผนวก ก1

ตารางภาคผนวก ก1 การเตรียม polyacrylamide gel

ส่วนประกอบ	10% Separating gel	5% Stacking gel
น้ำกลั่น	3.4 ml	5.7 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	2.5 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l
30% Acylamide	4 ml	1.7 ml
10% Ammonium persulfate	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

1. การเตรียมสับสเตรท

- 2% CMC

ผสม CMC 2 g อุ้มน้ำให้ CMC ละลายจนหมด ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml

- 2% xylan

ผสม xylan 2 g อุ้มน้ำให้ xylan ละลายจนหมด ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml

2. การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตรดบัฟเฟอร์ pH 3-6

- 0.2 M acetic acid

- 0.2 M sodium acetate (tri-hydrate) (27.2 g/l)

- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางภาคผนวก ก2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate

pH	vol. of 0.2M acetic acid	vol. of 0.2M sodium acetate
3	982.3 ml	17.7 ml
4	847.0 ml	153.0 ml
5	357.0 ml	643.0 ml
6	52.2 ml	947.8 ml

2) การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7-11

- 0.2M disodium hydrogen phosphate (28.4 g/l)

- 0.2M HCl

- 0.2M NaOH

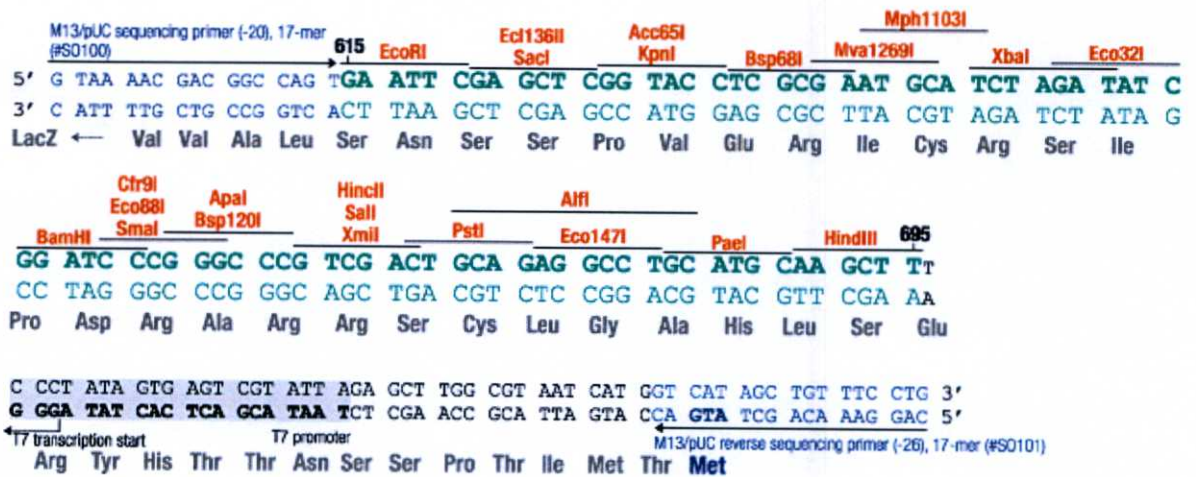
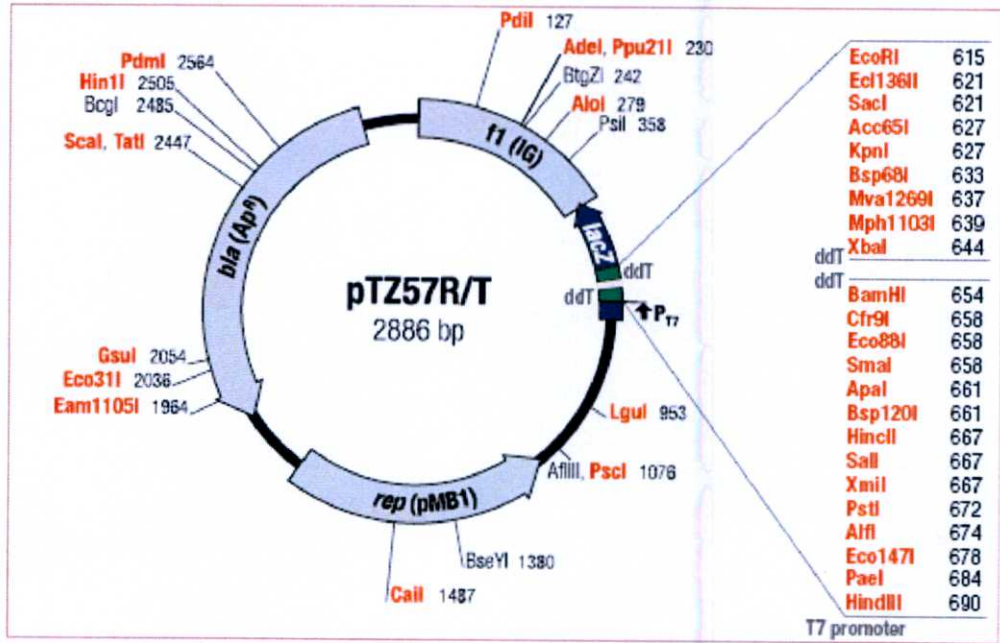
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางภาคผนวก ก3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate

pH	vol. of 0.2M disodium phosphate	vol. of 0.2M HCl	vol. of 0.2M NaOH
7	756.0 ml	244 ml	
8	955.1 ml	44.9 ml	
9	955.0 ml	45.0 ml	
10	966.4 ml		33.6 ml
11	965.3 ml		34.7 ml

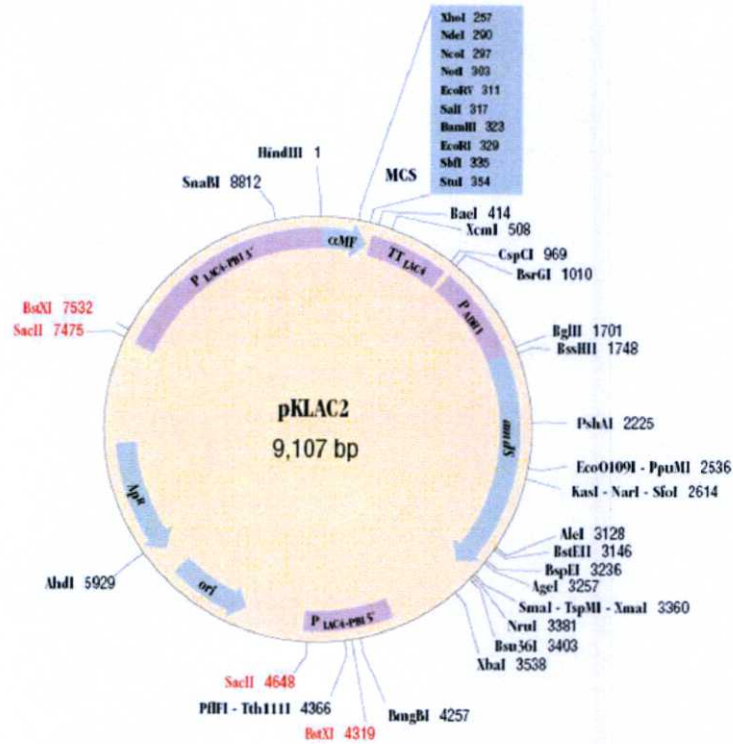
แผนที่เวกเตอร์

1. pTZ57R/T vector



ภาพผนวกที่ 1 แผนที่ชิ้นและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pTZ57R/T

2. pKLAC2 vector



	#S1274 LAC1mt Promoter Sequencing Primer	
9009	GAATTGTGAGCGGATAACAAGCTCAACACTTGAAATTTAGGAAAGAGCAGAAATTTGGCAA	9068
	HindIII	
9069	AAAAAATAAAAAAATAAACACACATACTCATCGAGAAGCTTGAAAAAATGAAATTC	22
	M K F	
23	TCTACTATATTAGCCGATCTACTGCTTAAATTCGGTTGTTATGGCTGCTCCAGTTTCT	82
	S T I L A A S T A L I S V V M A A P V S	
	#S1275 α-Mating Factor Sequencing Primer	
83	ACCGAAACTGACATCGACGATCTTCCAATATCGGTTCCAGAAGAAGCCTTGATTGGATTC	142
	T E T D I D D L P I S V P E E A L I G F	
143	ATTGACTTAACGGGGATGAAGTTTCTTGTGCTGTTAATAACGGAAACCCACTGGT	202
	I D L T G D E V S L L P V N N G T H T G	
	XhoI	
203	ATTCTATTCTTAAACACCACCATCGCTGAAGCTGCTTTCGCTGACAAGGATGATCTCGAG	262
	I L F L N T T I A E A A F A D K D D L E	
	NdeI NcoI NotI EcoRV Sall	
263	AAAAGAGAGGCTGAAGCTAGAAAGCTCATATGTCATGGGCGGCCGCGATATCGTCGAC	322
	K R E A E A R R A H M S M G G R D I V D	
	BamHI EcoRI SbfI StuI	
323	GGATCCGAATTCCTGCAGGTAATTAATAAAGGCCTTGAATCGAAGATTTATACTTAGA	382
	G S E F P A G N *	
383	TAAGTATGACTTACAGGTATATTTCTATGAGATACTGATGATACATGCATGATAATAT	442
443	TTAAACGGTTATTAGTCCGATGTCCTTGTGCGATAATGACGTTCTATCAAAGCAATAC	502
	#S1276 pKLAC1 Reverse Sequencing Primer	

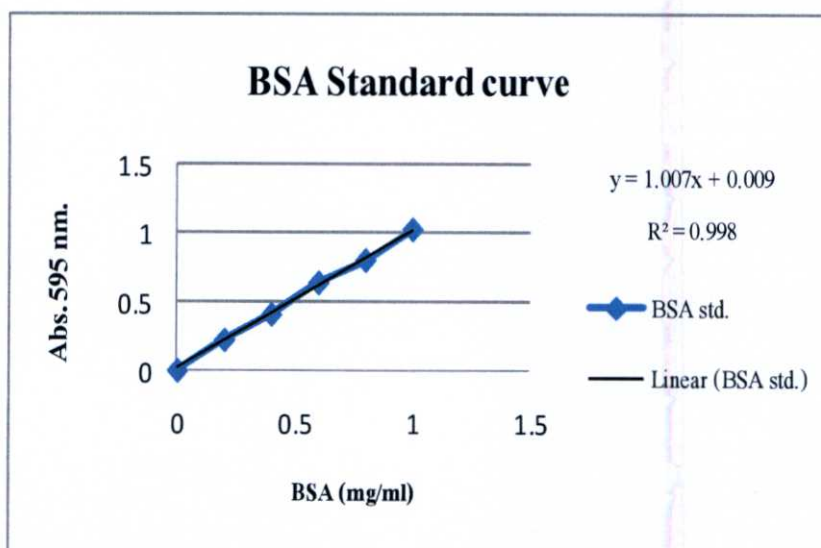
ภาพผนวกที่ ก2 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pKLAC2

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานโปรตีน

ตารางภาคผนวก ข1 แสดงค่ามาตรฐาน BSA ของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

BSA concentration (mg/ml)	Abs 595 nm
0.000	0.000
0.200	0.221
0.400	0.408
0.600	0.636
0.800	0.798
1.000	1.019

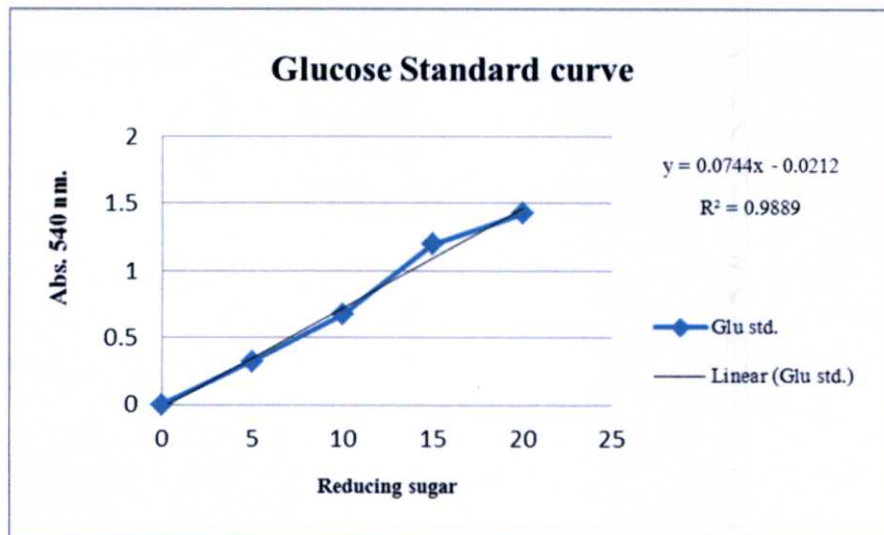


ภาพภาคผนวก ข1 แสดงกราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA standard) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

2. กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก ข2 แสดงค่ามาตรฐานกลูโคสที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

Glucose concentration (mM)	Abs 540 nm
0	0.000
5	0.323
10	0.673
15	1.195
20	1.425



ภาพภาคผนวก ข2 แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคส (Glucose Standard) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

ตารางภาคผนวก ข5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 บ่มที่อุณหภูมิ 20-90°C

อุณหภูมิ (°C)	Specific activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
20	74.83±0.01	82
30	87.31±0.01	94
40	92.81±0.02	100
50	81.60±0.02	88
60	78.32±0.01	84
70	66.34±0.01	71
80	46.13±0.01	50
90	37.89±0.01	41

ตารางภาคผนวก ข6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 การทนต่อสภาวะกรด-ด่างของเอนไซม์ เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0-11.0 ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์

pH stability	specific activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
control	86.05±0.02	100
3	41.81±0.02	49
4	62.03±0.02	72
5	70.62±0.01	82
6	74.77±0.02	87
7	82.96±0.02	96
8	75.19±0.02	87
9	63.23±0.02	73
10	47.97±0.01	56
11	40.63±0.01	47

ตารางภาคผนวก ข7 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม pKLAC2-Cel5_A24/10C2A3 การทนต่อความร้อนของเอนไซม์ เมื่อบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 20-90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์

thermo stability	specific activity (U/mg protein)	Relative activity (%)
control	76.99±0.01	100
20°C	62.23±0.02	81
30 °C	59.27±0.02	77
40°C	52.86±0.01	69
50°C	38.26±0.01	50
60°C	32.35±0.02	42
70°C	28.29±0.02	37
80°C	23.53±0.01	31
90°C	20.95±0.01	27

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจันทร์รา คีมาก
วัน/เดือน/ปีเกิด	4 กรกฎาคม 2530
ที่อยู่	739 ถ.ประชาพัฒนา แขวงทับยาว เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
ประวัติการศึกษา	2552 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ จันทร์รา คีมาก และ กัญญา จิระเจริญรัตน์ “การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก ผสมแบบหึ่งออกนอกเซลล์โดยระบบยีสต์ <i>Kluyveromyces lactis</i> ”. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 29 ระหว่างวันที่ 24-25 ตุลาคม 2556. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ทุนวิจัยที่ได้รับ	สนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)