

การโคลนและการแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้าง
เอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน *Escherichia coli*

Molecular cloning and expresson of
beta-endoglucanase gene in *Escherichia coli*

เอ๋อมดาว เชื้อบัวหลวง

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การโคลนและการแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้าง
เอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน *Escherichia coli*

Molecular cloning and expression of
beta-endoglucanase gene in *Escherichia coli*

เอ๋อมดาว เชื้อบัวหลวง

สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

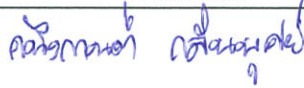
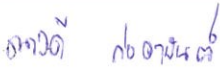
Molecular cloning and expression of
beta-endoglucanase gene in *Escherichia coli*

Auemdao Chaubualung

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (Bachelor of Science)
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2560

หัวข้อสหกิจศึกษา	การโคลนและการแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้าง เอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน <i>Escherichia coli</i> Molecular cloning and expression of beta-endoglucanase gene in <i>Escherichia coli</i>
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเอี่ยมดาว เชื้อบัวหลวง รหัสนักศึกษา 57050786
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ธนาวัต ก่ออนันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.พงศธร ประภัก์ราษฎร์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ประจำปี
การศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. คณิศร กิ่งบุญชัย ประธานกรรมการ	
อ. ธนาวัต ก่ออนันต์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อสหกิจศึกษา	การโคลนและการแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้าง เอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน <i>Escherichia coli</i>
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเอื้อมดาว เชื้อบัวหลวง รหัสนักศึกษา 57050786
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ธนาวัต ก่ออนันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.พงศธร ประภักกรางกุล

บทคัดย่อ

เอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนส (EC 3.2.1.4) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายสารชีวมวลในพืชและในปัจจุบัน เอนไซม์ชนิดนี้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อาทิเช่น กระบวนการผลิตอาหารสัตว์และ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาการโคลนยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส (GenBank CAE51308.1) ที่แปลรหัสเป็นโปรตีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส ผลิตได้จาก *Clostridium thermocellum*. โดยนำยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนสแบบ mature ที่ไม่มี signal peptide ขนาด 2,127 คู่เบส ทำการถ่ายยีนเข้าสู่ vector pET28a (+) และศึกษาการแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLsS เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ทำการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนและสกัดโปรตีนเพื่อวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลการทดลองพบว่า ปรากฏแถบโปรตีนมีขนาดประมาณ 72 กิโลดาลตัน จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นซับสเตรท พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ค่าความกรด-ด่าง 10.0, ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 3.05 U/ml

คำสำคัญ : เบต้าเอนโดกลูคาเนส, การแสดงออกของยีน

Title	Molecular cloning and expression of beta-endoglucanase gene in <i>Escherichia coli</i>
Students	Miss Auemdao Chaubualung Student 57050786
Degree	Bachelor of Science
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Miss thanavadee korarnan
Co-advisor	Dr.Pungsatron Prapalangkrung

Abstract

Beta-endoglucanase (EC 3.2.1.4) is an important enzymes in plant biomass degradation. Present, this enzyme has a current and potential applications in various industrial sectors such as feed animal processing and renewable biofuel production. In this study, the beta-endoglucanase (GenBank CAE51308.1) encoding beta-endoglucanase protein was produced by of *Clostridium thermocellum*. The mature gene without the signal peptide consists of 2,127 bp was transformed into vector pET28a(+) and functionally expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLsS. The SDS-PAGE revealed that molecular mass was approximately 72 kDa. Furthermore, the carboxymethylcellulose (CMC) was used as a substrate for beta-endoglucanase enzyme activity testing. The recombinant enzyme showed optimum activity at pH 10.0 and temperature 40°C for 10 minute (3.05 U/ml).

Keywords: beta-endoglucanase, gene expression

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลส จากจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลอย่างยั่งยืน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ปริญญาานิพนธ์สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ธนาวัต ก่ออนันต์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ และ ดร.พงศธร ประภักกรางกุล จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำปริญญาานิพนธ์นี้มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ คุณอรพิน จันตะแสง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และเทคนิคต่างๆ ระหว่างทำปริญญาานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบคุณคณาจารย์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆน้องๆในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และพี่ๆในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกๆเรื่อง ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้ามอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

เอี่ยมดาว เชื้อบัวหลวง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	1
1.3 ขอบเขต.....	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส.....	2
2.2 เอนไซม์ Glycoside hydrolases หรือ Glycosidases หรือ Glycosyl hydrolases (EC 3.2.1.).....	4
2.2.1 ลักษณะโดยทั่วไปของเอนไซม์ Glycoside hydrolases.....	4
2.3 เอนไซม์ที่ใช้อยู่สารประกอบเซลลูโลส.....	4
2.3.1 แหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส.....	5
2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส.....	7
2.4 การแสดงออกของยีน (Gene expression).....	7
2.4.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน.....	8
2.5 หลักการถ่ายยีน (Transformation).....	9
2.6 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์เซลลูเลส.....	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	17
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก.....	24
ภาคผนวก ก.....	25
ภาคผนวก ข.....	32

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืชชนิดต่างๆ	3
2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate.....	28
3. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate.....	28
4. แสดงความเข้มข้นโปรตีนของตัวอย่าง.....	32
5. ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน.....	33
6. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ pH ต่างกัน	34
7. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เวลาต่างกัน.....	34
8. ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างกัน.....	35

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส	2
2. การย่อยเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืชของเอนไซม์ที่ได้จากราในคลาส Basidiomycetes.....	4
3. แสดงโครงสร้างของ Argonaute (Ago) ใน Piwi domain.....	9
4. แสดงโครงสร้างของ Argonaute (Ago) ใน PAZ domain.....	9
5. แสดงการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XhoI เพื่อตรวจสอบโคลนที่รับยีนลูกผสม.....	17
6. แสดงผลการย่อยยับยั้งสเตรททอนอาหารแข็ง LB ที่ผสมยับยั้งสเตรท CMC ของเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS ที่ได้รับถ่ายยีน Beta-endoglucanase.....	18
7. แสดงการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS – PAGE.....	19
8. กราฟแสดงผลการทดสอบค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (pH 3-11).....	19
9. กราฟแสดงผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ตั้งแต่ 10,20,30,40,50 และ 60 นาที.....	20
10. กราฟแสดงผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 องศาเซลเซียส.....	20
11. แผนที่พลาสมิด pET28a.....	31
12. กราฟมาตรฐานโปรตีน(BSA standard).....	32
13 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส.....	33

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
bp	คู่เบส
kb	กิโลเบส
μ l	ไมโครลิตร
ml	มิลลิลิตร
L	ลิตร
μ g	ไมโครกรัม
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
kDa	กิโลดาลตัน
Unit	ยูนิต
M	โมลาร์
CBD	Cellulose-binding domain
IUM-ME	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันประเทศไทยมีวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรมากมาย เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว พืชสะสมพลังงานจากดวงอาทิตย์ในรูปพลังงานเคมีของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน โดยส่วนมากพบในเนื้อเยื่อพืช หรือเรียกว่า ชีวมวล (biomass) ซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยชานอ้อยเป็นเศษเหลือทิ้งทางกระบวนการหีบอ้อย ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า เส้นใยอ้อยแห้งประกอบด้วย เซลลูโลส ประมาณ 38.59% เฮมิเซลลูโลส 27.89% ลิกนิน 17.79% และฟางข้าวเป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่สามารถนำไปเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น ไบโอดีทานอล เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า ประกอบด้วย เซลลูโลส 32% เฮมิเซลลูโลส 35.7% ลิกนิน 22.3 % เซลลูโลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้อยู่เซลลูโลส ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic ซึ่งจะพบมากภายในส่วนต่างๆ ของพืช และยังสามารถพบอยู่ร่วมกับพอลิเมอร์อื่นๆ อีก เช่น เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เอนไซม์เซลลูเลสจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycosyl hydrolase) เป็นเอนไซม์เชิงซ้อน จากระบบการจัดกลุ่มของ International of Biochemistry and Molecular Biology (IUB – MB,2004) ประกอบด้วยเอนไซม์สำคัญหลัก 3 ชนิด จำแนกตามการทำงาน ได้แก่ เบต้าเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase, EC 3.2.1.4), เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase, EC 3.1.1.21) และเบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase, EC 3.1.1.21) โดยเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนสนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากสามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นโพลีเปปไทด์สายสั้นๆ เพื่อให้เอนไซม์ตัวอื่นสามารถทำงานได้

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนส ศึกษาการแสดงออกยีนและวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสในจุลินทรีย์ดัดแปลงทางพันธุกรรมเพื่อนำไปใช้พัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน *E. coli*
- 2) เพื่อศึกษาการแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน *E. coli*
- 3) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน *E. coli*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ทำการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน *E. coli*
- 2) ทำการศึกษาการแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน *E. coli*
- 3) ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน *E. coli*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

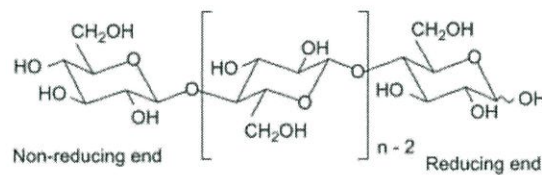
สามารถโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนส และทำการแสดงออกยีนและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน จากจุลินทรีย์ดัดแปลงทางพันธุกรรมเพื่อนำไปใช้พัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลต่อไป

บทที่ 2

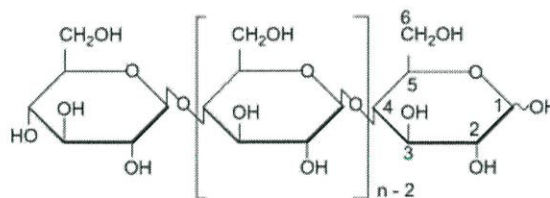
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส

เซลลูโลส (Cellulose) มีสูตรโมเลกุลคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) ที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติประกอบด้วยสารคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง สำหรับโครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส (glucose) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) เป็นหมู่หลักมาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) ที่ตำแหน่งเบต้า-1,4 (β 1,4 glycosidic bond) ได้เป็นสายยาวที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสกว่า 1,000 - 10,000 โมเลกุล ที่มีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ (ภาพที่ 2) โดยเซลลูโลสจะมีหน่วยซ้ำที่เรียกว่าเซลโลไบโอส (cellobiose) และทุกๆ หน่วยที่สองของกลูโคสที่ต่อกันในโมเลกุลของเซลลูโลสจะสามารถหมุนได้ 180 องศา เกิดเป็นพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลกลูโคส ทำให้เซลลูโลสมีความแข็งแรง มีอุณหภูมิการหลอมตัวสูง และไม่สามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ทั่วไป



Sometimes shown as



ภาพที่ 1 ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส (Keshk & Gouda, 2017)

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สามารถพบได้ในเซลล์พืชและแบคทีเรีย สำหรับผนังเซลล์พืช เช่น ผัก ผลไม้ เมล็ดธัญพืช หรือเส้นใยพืช (vegetable fibers) จะประกอบด้วยโครงสร้างพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินหรือที่เรียกว่าลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ที่เป็นเส้นใยที่ไม่ละลายในน้ำ องค์ประกอบของสารประกอบเชิงซ้อนของลิกโนเซลลูโลสในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป และปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของลิกโนเซลลูโลสจะแตกต่างกันตามแต่ละส่วนของพืช (ตารางที่ 1) มักจะพบเซลลูโลสกับเฮมิเซลลูโลสและเพกทินเพื่อทำหน้าที่เสริมสร้างโครงสร้างของลำต้นและกิ่งก้านพืชให้มีความแข็งแรงมาก นอกจากนี้เซลลูโลสจัดเป็นเส้นใยอาหารชนิดที่ไม่ละลายในน้ำ และไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์กระเพาะเดี่ยว

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืชชนิดต่างๆ (Shahzadi *et al.*, 2014)

องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืช	ลิกนิน (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	เซลลูโลส (%)	อ้างอิง
น้ำตาลขานอ้อย	20	25	42	Kim&Day,2011
ข้าวฟ่างหวาน	21	27	45	Kim&Day,2011
ไม้เนื้อแข็ง	18 - 25	24 - 40	40 - 55	Malherbe&Cloete,2002
ไม้เนื้ออ่อน	25 - 35	25 - 35	45 - 50	Malherbe&Cloete,2002
ข้าวโพด	15	35	45	Prasad et al.2007
ซังข้าวโพด	19	26	38	Zhu et al.2005
ฟางข้าว	18	24	32.1	Prasad et al.2007
เปลือกถั่ว	30 - 40	25 - 30	25 - 30	Abbasi & Abbasi,2010
หนังสือพิมพ์	18 - 30	25 - 40	40 - 55	Howard et al.2003
หญ้า	10 - 30	25 - 50	25 - 40	Malherbe & Cloete,2002
ฟางข้าวสาลี	16 - 21	26 - 32	29 - 35	McKendry,2002
เปลือกถั่ว	14	14.8	13.2	John et al.2006
ขานอ้อย	23.35	16.52	54.87	Guimarase et al,2009
ฟองน้ำและเส้นใย	15.46	17.44	66.59	Guimarase et al,2009

คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสหรือซีเอ็มซี (Carboxymethyl cellulose : CMC) หรือโซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (sodium carboxymethyl cellulose) เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ประเภทพอลิเมอร์ชนิดไม่ชอบน้ำ (hydrophobics) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส โดยสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากการดัดแปรหรือปรับปรุงคุณสมบัติของเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช ทำให้มีหมู่เมทิลและหมู่คาร์บอกซีเมทิลเข้ามาแทนที่โครงสร้างเดิม ซีเอ็มซีหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสทั่วไปสามารถเตรียมได้จากเยื่อเซลลูโลสที่มีปริมาณเซลลูโลสคุณภาพสูงหรือแอลฟาเซลลูโลส (alpha cellulose) โดยซีเอ็มซีจะถูกนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารคงสภาพ สารเพิ่มความหนืดเพื่อช่วยในการยัดติดหรือใช้เป็นสารเคลือบผิว ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การซักฟอก กาว กระดาษ อาหารและยา เป็นต้น

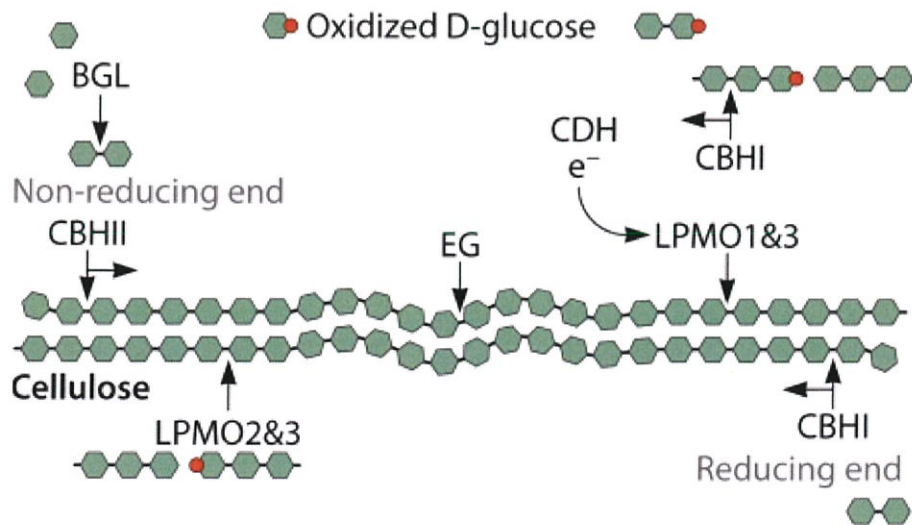
2.2 เอนไซม์ Glycoside hydrolases หรือ Glycosidases หรือ Glycosyl hydrolases (EC 3.2.1.)

2.2.1 ลักษณะโดยทั่วไปของเอนไซม์ Glycosidehydrolases

เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ระหว่างคาร์โบไฮเดรต 2 โมเลกุลหรือมากกว่า หรือ ระหว่างคาร์โบไฮเดรตและโมเลกุลอื่นที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต เช่น เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์อะไมเลส และไลโซไซม์ เป็นต้น ปัจจุบันมีการจำแนกชนิดของเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสตามลำดับของกรดอะมิโนในโครงสร้างของเอนไซม์และโครงสร้างในระดับทุติยภูมิและตติยภูมิ ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับความจำเพาะกับสับสเตรต และการเร่งปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกันกับเอนไซม์อื่น ๆ (Henrissat & Davies, 1997)

2.3 เอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบเซลลูโลส

เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสารประกอบเซลลูโลส มีหลายเอนไซม์ร่วมกันย่อยโพลีเมอร์จากพืชที่เป็นเซลลูโลส ได้แก่ β -1,4- endoglucanase (EG) (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolase (reducing end) (CBHI) (EC 3.2.1.176), cellobiohydrolase (non-reducing end) (CBHII) (EC 3.2.1.91), β -glucosidase (BGL) (EC 3.2.1.21), cellobiose hydrolase (CDH) (EC 1.1.99.18) และเอนไซม์ lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) เอนไซม์เหล่านี้สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ในโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตตั้งแต่สองโมเลกุลขึ้นไป หรือสามารถย่อยพันธะไกลโคซิดิกในโครงสร้างสารประกอบที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตก็ได้ แสดงได้ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 การย่อยเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืชของเอนไซม์ที่ได้จากราในคลาส Basidiomycetes (Rytioja *et al.*, 2014)

การย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่สำคัญ คือ

- 1) Endoglucanase หรือ endo-cellulase หรือ 1,4- β -D-glucanohydrolase, (E.C.3.2.1.4) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ β -1,4-glucosidic แบบสุ่มภายในสายของเซลลูโลสจะย่อยเซลลูโลสที่เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่พันธะ β 1,4-ไกลโคซิดิกของเซลลูโลส, สารประกอบเชิงซ้อนของกลูแคน (lichenin) และของบีต้ากลูแคน อาจจะย่อยพันธะพันธะ β 1,3-ไกลโคซิดิกได้
- 2) Exoglucanase หรือ exo-cellulase หรือ 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, (E.C.3.2.1.91)) จะย่อยเซลลูโลสที่เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่พันธะ β 1,4-ไกลโคซิดิกของเซลลูโลส, เซลโลเตตระโอส ที่ปลาย non-reducing end ได้เป็นเซลโลไบโอส
- 3) β -glucosidase หรือ β -D-glucoside glucohydrolase (E.C.3.2.1.21) จะย่อยพันธะ β 1,4-ไกลโคซิดิกที่ปลาย non-reducing end ของอนุพันธ์ของ β -D-glucosyl ได้น้ำตาล D-กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์

2.3.1 แหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส

โดยในปัจจุบันเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษามากขึ้นโดย พบว่า แหล่งที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีหลายแหล่งด้วยกันโดยส่วนมากมักพบตามแหล่งธรรมชาติ

1) **แหล่งจากเชื้อรา** จุลินทรีย์โดยเฉพาะราเป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากหลายชนิดผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงในลักษณะเอนไซม์นอกเซลล์ โดยราส่วนใหญ่ผลิตเซลลูเลสในรูปไกลโคโปรตีน โดยผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด เอนโดกลูคาเนส, แอกโซกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส เช่น รา *Trichoderma reesei* และ *Humicola insolens*

2) **แหล่งจากแบคทีเรีย** แบคทีเรียมีระบบการย่อยเซลลูโลสได้หลายระบบ ได้แก่ การผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอนไซม์แอกโซกลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกนอกเซลล์ เช่น *Streptomyces* sp. และ *Cellulomonas fimi* จะหลั่งเซลลูเลสออกนอกเซลล์ ระบบเอนไซม์ยึดติดกับเซลล์ หรือเอนไซม์คอมเพลกซ์ (เซลลูโลโซม) พบว่าแบคทีเรียหลายชนิดจะผลิตเอนไซม์ในรูปเซลลูโลโซมขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลโซมของ *Clostridium thermocellum* ประกอบด้วยเอนโดกลูคาเนส, แอกโซกลูคาเนส ,เบต้ากลูโคซิเดสและไซลาเนส จำนวน 6 โมเลกุล และไลเคนเนสจำนวน 2 โมเลกุล โดยมีเอนไซม์แอกโซกลูคาเนส เป็นเอนไซม์หลัก ระบบย่อยเซลลูโลสจากแบคทีเรียชนิดจะมีระบบ saccharification - fermentation ที่สามารถเปลี่ยนสารประกอบเซลลูโลสเป็นเอทานอลได้ในสภาวะปลอดออกซิเจน (anaerobic condition) จากการศึกษาของรัชราและคณะ (2557) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากกระเพาะวัว เอนไซม์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 4.70 U/mg protein เมื่อแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE Toyopearl 650M, Butyl-Toyopearl 650M และ SuperQ-650 ตามลำดับ เอนไซม์จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 67.2 เท่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 KDa และทำงานได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและ pH 6.0 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.0 (รัชราและคณะ, 2557) และการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอนไซม์เซลลูเลสด้วย *E. coli* Glu5 ที่แยกจากลำไส้ปลวก สามารถแสดงออกของยีนเอนโดกลูคาเนสได้ และยังสามารถผลิตเอนไซม์

เซลลูเลสได้อีกด้วย พบว่าเอนไซม์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะของ เอนไซม์ เท่ากับ 18.56 U/mg protein (pH = 4.8 และอุณหภูมิ 50°C) และอัตราการย่อย CMC มีค่าประมาณ 26 mg reducing sugar/g CMC ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (Seneesrisakul *et al.*, 2017)

3) แหล่งจากพืช มีรายงานว่ามีการพบเฉพาะเอนโดกลูคาเนส แต่ไม่พบเอกโซกลูคาเนส ในพืช โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ในพืชต่างจากในจุลินทรีย์ตรงไม่มีบริเวณยึดจับเซลลูโลส (cellulose binding domain, CBD) เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะเกี่ยวข้องกับพัฒนาการของพืช เช่น การสุกของผลไม้ การร่วงของใบ เป็นต้น

4) แหล่งจากสัตว์ สัตว์ส่วนใหญ่ไม่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จึงไม่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ ยกเว้น สัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งมีกระเพาะ 4 ส่วน (ruminants) เช่น โค กระบือ แพะ และแกะ ที่มีจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารช่วยย่อยเซลลูโลสได้

2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ อุณหภูมิ, ความเป็นกรดเป็นด่างและชนิดของสับสเตรต ดังนี้

อุณหภูมิ

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมิมีผลโดยตรงต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์ สาเหตุประการหนึ่ง คือ อุณหภูมิสามารถเปลี่ยนแปลงค่าคงที่ความเร็วของปฏิกิริยา (rate constant, K) ได้ ยิ่งไปกว่านั้นอุณหภูมิอาจเปลี่ยนโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเร่ง อุณหภูมิที่สูงมากทำให้เอนไซม์เสียสภาพอย่างถาวรได้ ดังนั้น ในการเก็บรักษาเอนไซม์เพื่อใช้ในการศึกษาจึงนิยมเก็บที่อุณหภูมิต่ำ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส มีค่าประมาณ 37 – 90 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับสับสเตรตที่ใช้และแหล่งของเอนไซม์ เช่น เมื่อใช้ carboxymethylcellulose เป็นสับสเตรต เมื่อใช้เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่แยกได้จากรา *Penicillium oxalicum* จะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อย CMC ประมาณ 50 °C (Saini *et al.*, 2015) ขณะที่เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่แยกได้จากรา *Aspergillus niger* จะมีช่วงอุณหภูมิการย่อย CMC ที่เหมาะสมประมาณ 50 °C (Farinas *et al.*, 2010)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมที่สุด (optimal pH)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆ กันเอนไซม์ชนิดหนึ่ง ๆ จะทำงานได้ดีไม่เท่ากัน แต่จะมีความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วงหนึ่งที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด เรียกว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สุด (optimal pH) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป ค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีผลต่อการแตกตัวของหมู่ไอออนิกของกรดอะมิโนในบริเวณแอคทีฟที่ที่จะต้องเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรต

ความจำเพาะต่อสับสเตรต (substrate specificity)

เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ต่างกัน เอนไซม์บางชนิดมีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่มีโครงสร้างและพันธะเหมือนกัน แต่อะตอมหรือกลุ่มอะตอมจัดเรียงตัวในตำแหน่งต่างกัน (stereoisomer) ที่เรียกความจำเพาะนี้ว่า ความจำเพาะสเตอริโอ (stereo specificity) นอกจากนี้ ความจำเพาะระหว่างตำแหน่งของหมู่เคมีของสับสเตรตกับของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้สับสเตรตที่มีโครงสร้างคล้ายกันได้หลายชนิด ซึ่งเรียกว่าความจำเพาะแบบนี้ว่า (geometric specificity) เช่น เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็นแอลกอฮอล์ได้หลายชนิด เช่น เมทานอล, โพรพานอลและอัลดีไฮด์

2.4 การแสดงออกของยีน (Gene expression)

ยีน สามารถทำหน้าที่กำหนดลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้นั้น ข้อมูลทางพันธุกรรมที่อยู่ในยีนต้องถูกถ่ายถอดจากดีเอ็นเอ (DNA) มีการถอดรหัสให้เป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) และจากมีการแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอให้เป็นโปรตีนโปรตีน จึงเรียกการถ่ายถอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากยีน (หรือ DNA) ไปสู่อาร์เอ็นเอและโปรตีนนี้ ว่าเป็นการแสดงออกของยีน การถ่ายถอดข้อมูลจากดีเอ็นเอ ไปยังอาร์เอ็นเอ เรียกว่าการถอดรหัส (transcription) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ดีเอ็นเอ เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ซึ่งกระบวนการถอดรหัส นั้นประกอบไปด้วยกระบวนการที่สำคัญ 3 ขั้นตอนคือ Initiation, Elongation และ Termination หลังจากมีการถอดรหัสแล้วก่อนจะมีการแปลรหัส

(translation) ไปเป็นโปรตีน จะมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงอาร์เอ็นเอ ที่สังเคราะห์ได้รวมทั้งมีกลไกในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยที่กระบวนการลอกรหัส การเปลี่ยนแปลงอาร์เอ็นเอ และการควบคุมการแสดงออกของยูคาริโอตจะมีกลไกที่ซับซ้อนกว่าโปรคาริโอต

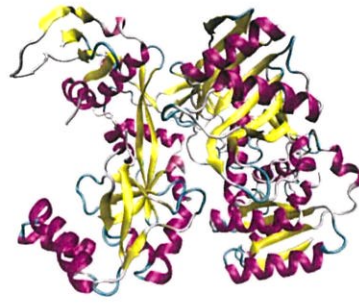
สิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอตจะมีการแสดงออกของยีน ที่มีผลการควบคุมมาจากยีนที่เป็นลักษณะเป็นกลุ่มเรียกว่า โอเพอรอน (operon) ซึ่งประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene), ยีนควบคุม (regulatory gene) และบริเวณบังคับการ (control site) ซึ่งยังแบ่งได้ 2 ส่วนย่อย คือ ยีนส่งเสริม (promoter gene, p) และยีนดำเนินการ (operator gene, o) ยีนควบคุมและยีนโครงสร้างจะมีข้อมูลพันธุกรรมที่จะถูกถอดรหัสเป็น mRNA แล้วแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน เช่น การควบคุมการแสดงออกของ Lac Operon

การควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคาริโอตจะซับซ้อนกว่าในโปรคาริโอต เนื่องจากจีโนมของยูคาริโอตมียีนมากกว่าที่พบในโปรคาริโอต ยีนทั้งหมดนี้ไม่ได้ทำงานพร้อมกัน ซึ่งยีนแต่ละยีนนั้นจะมีการแสดงออกแตกต่างกันตามเวลาและสถานะของเซลล์ เซลล์ยูคาริโอตจะมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงทำให้กระบวนการถอดรหัสเกิดในนิวเคลียส และกระบวนการแปลรหัสเกิดในไซโตพลาสซึม ไม่ได้เกิดต่อเนื่องกันอย่างเหมือนที่เกิดขึ้นในโปรคาริโอต นอกจากนี้สารพันธุกรรมของยูคาริโอตจะแตกต่างจากสารพันธุกรรมของโปรคาริโอตที่สำคัญ คือ ยีนของยูคาริโอตจะอยู่แยกเป็นส่วนๆ ที่เรียกว่าเอกซอน (exon) ซึ่งต้องมีกระบวนการตัดอินทรอน (intron) ออกและเชื่อมเอกซอนเข้าด้วยกัน เช่น การควบคุมการแสดงออกของฮอร์โมนกระตุ้นการเติบโต (growth hormone) ทำให้การควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคาริโอตมีความยุ่งยากกว่าที่พบในโปรคาริโอต

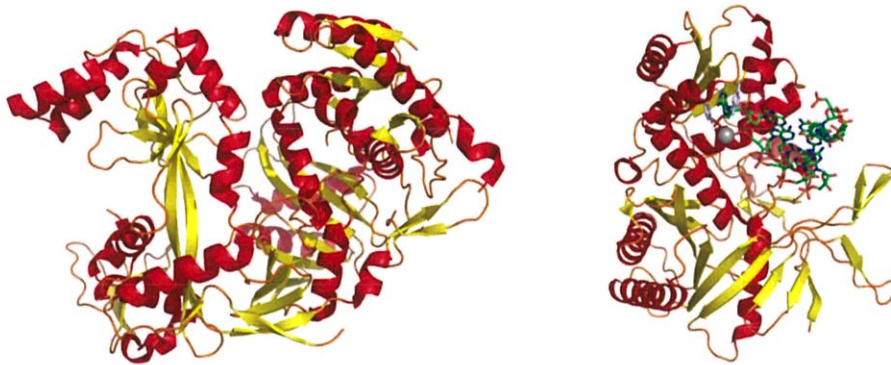
2.4.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน

Argonaute (Ago) เป็นเอนไซม์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของ RNA-induced silencing complex (RISC) complex ที่ทำหน้าที่แยก RNA สายคู่เป็นสายเดี่ยว และเป็นส่วนสำคัญในการนำ siRNA เข้าสู่กระบวนการ RNAi จากการศึกษาในแมลงหวี่ (*Drosophila* spp.) พบว่ามี Ago 5 ชนิด โดย Ago ต่างชนิดกันจะทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่น Ago1 ทำหน้าที่แยก miRNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว และ Ago2 ทำหน้าที่แยก siRNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว

ลักษณะโครงสร้างของ Ago แบ่งเป็น 2 โดเมน คือ PAZ และ Piwi โดย PAZ domain เป็นส่วนประกอบทั้งใน Ago และ Dicer (PAZ domain ใน Dicer อาจมีหน้าที่แตกต่างออกไป) โครงสร้างของ PAZ domain ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ บริเวณของ oligonucleotide-binding (OB) fold ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับกรดนิวคลีอิก และบริเวณของ beta-hairpin ตามด้วย alpha-helix โดย PAZ domain ทำหน้าที่จับกับกรดนิวคลีอิก 2 ตัว ที่ยื่นออกมาจากปลาย 3' ของ siRNA เพื่อช่วยให้ siRNA จับกับ mRNA เป้าหมายได้เสถียรมากขึ้น ส่วน Piwi domain มีคุณสมบัติคล้าย RNase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัด RNA จาก DNA-RNA hybrids ซึ่ง Piwi อาจทำหน้าที่ในการตัด mRNA ให้กับ RISC



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของ Argonaute (Ago) ใน Piwi domain (Pfam:PF02171)



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างของ Argonaute (Ago) ใน PAZ domain (Pfam:PF12212)

2.5 การถ่ายยีน (Transformation)

เมื่อเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนเข้ากับเวกเตอร์แล้วจะต้องมีการนำดีเอ็นเอสายผสมนี้เข้าสู่เซลล์ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับเซลล์เจ้าบ้านและเวกเตอร์ที่ใช้ โดยทั่วไปเซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ bacteria เช่น *E. coli*, *Bacillus* sp., ยีสต์ เช่น *S. cerevisiae*, *Aspergillus* sp., *Neurospora crassa*, เซลล์สัตว์ เซลล์พืช เป็นต้น ดังนั้นเซลล์ที่จะนำมาใช้จะต้องมีความพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอเข้ามาซึ่งเรียกเซลล์เหล่านั้นว่า competent cells ซึ่ง competent cells คือ เซลล์ที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะรับดีเอ็นเอภายนอกเข้าสู่ในเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่มีความพร้อมนี้จะต้องอยู่ในสารละลายหรือสารเคมีหรือที่ทำให้ผนังเซลล์รั่ว สารเคมีที่นิยมนำมาใช้ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดรอยรั่วได้แก่สารที่มีไอออนบวก เช่น Mg^{2+} , Rb^{2+} , Co^{2+} , K^+ และ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นต้น ซึ่งจะเรียกเซลล์ที่ถูกทำให้เกิดผนังเซลล์รั่วด้วยสารเคมีว่า chemically competent cells นอกจากนี้ยังมีการเตรียม competent cell ด้วยกระแสไฟฟ้าวิธีการว่า electroporation โดยใช้เครื่อง electroporator และเรียก ซึ่ง competent cell พวกนี้จะมีประสิทธิภาพในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่า competent cells ที่ผ่านการใช้สารเคมีไอออนบวก

การนำดีเอ็นเอเข้าสู่ competent cells ด้วยสารเคมีประเภทไอออนบวก (cation) ทำให้ผนังเซลล์เกิดเป็นรู โดยการนำ competent cell ผสมรวมกับดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ วางที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายผสมจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจับที่ด้านนอกผนังเซลล์ ซึ่งทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ deoxyribonuclease (Dnase) ที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* หลังจากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จะทำให้ส่วนประกอบของผนังเซลล์

เคลื่อนที่ทำให้สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอถูกดูดเข้าไปในเซลล์ เรียกกระบวนการนี้ว่า heat shock เมื่อนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเหลว เซลล์จะเริ่มซ่อมแซมผนังเซลล์ที่ร้าวกลับไปสู่สภาพเดิม และพลาสมิดเริ่มมีการเพิ่มจำนวน การถ่ายยีน ด้วยวิธีนี้จะได้ประสิทธิภาพในการนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ (efficiency) ค่อนข้างต่ำ ประมาณ 10^5 - 10^6 เซลล์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ แต่การใช้สาร DMSO จะทำให้ประสิทธิภาพในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์สูงขึ้นเป็น 10^6 - 10^7 เซลล์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ

นอกจากการใช้สารเคมีในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์อาจจะใช้ไฟฟ้าแรงสูงที่มีความต่างศักย์สูง ๆ ในการกระตุ้นให้ผนังเซลล์เกิดรูรั่ว เพื่อให้ดีเอ็นเอมีโอกาสเข้าสู่เซลล์ได้ เรียกว่า electroporation การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูง จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกเปิดเป็นรู ทำให้ดีเอ็นเอที่อยู่ในสารละลายภายนอกเซลล์สามารถที่จะผ่านเข้าไปในเซลล์ โดยผ่านทางรูเปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อหยุดการให้กระแสไฟฟ้า เซลล์จะทำการเชื่อมปิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์โดยธรรมชาติ วิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงถึง 10^9 - 10^{10} เซลล์/ไมโครกรัมดีเอ็นเอ

2.6 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์เซลลูเลส

ในปัจจุบันนี้เอนไซม์เซลลูเลสกลายเป็นเอนไซม์ลำดับที่ 3 ที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์, อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมสิ่งทอ, อุตสาหกรรมโรงงานกระดาษ และในปัจจุบันเริ่มมีการขาดแคลนเชื้อเพลิงที่มาจากฟอสซิลและมีความต้องการใช้มากยิ่งขึ้น ดังนั้น แหล่งทางเลือกอื่นสำหรับการหาพลังงานแหล่งใหม่ ทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจ คือ การใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์อื่น

1. อุตสาหกรรมสิ่งทอ ในอุตสาหกรรมสิ่งทอจะการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้แทนหินภูเขาไฟ ในกระบวนการผลิตเสื้อผ้าจากผ้าฝ้าย ทำให้ฝ้ายนุ่มขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังสามารถฟอกสีผ้า ซึ่ง สามารถฟอกสีครามให้จางลง

2. อุตสาหกรรมโรงชกกรีตและผลิตผงชกฟอก เอนไซม์เซลลูเลส เช่น EGIII และ CBHI ทั่วไปใช้ในส่วนผสมของผงชกฟอกสำหรับทำความสะอาดสิ่งทอต่างๆ โดยส่วนผสมดังกล่าวได้เติมลงไปในช่วงทำความสะอาดและในผงชกฟอก มีรายงานว่า EGIII จากเชื้อ *Trichoderma reesei* มีความเหมาะสมสำหรับการใช้ในการชะล้างสิ่ง

3. อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ในอุตสาหกรรมอาหาร เอนไซม์เซลลูเลสใช้ในกระบวนการสกัดน้ำผักและน้ำผลไม้ กระบวนการผลิตน้ำหวานจากดอกไม้ และ กระบวนการสกัดน้ำมันมะกอก และการเติมเอนไซม์กลูคาเนสในข้าวบาร์เลย์ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเบียร์ และยังเติมในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ได้อีกด้วย ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์นั้น จะใช้เอนไซม์เฮมิเซลลูเลส, แพกตินเนส และเซลลูเลส เติมในหญ้าหมักเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร

4. อุตสาหกรรมโรงงานกระดาษ ได้มีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการนำหมัก และสีออกจากกระดาษ นอกจากนั้นการเติมเอนไซม์เซลลูเลสในช่วงแรกของการเตรียมการย่อยกระดาษแข็ง เพื่อให้กระดาษแข็งนุ่มขึ้น เพื่อนำกระดาษแข็งไปผ่านกระบวนการย่อยต่อไป

5. พลังงานชีวภาพ เป็นการนำเอนไซม์มาย่อยสลายสิ่งวัสดุชีวภาพที่เหลือทิ้ง เช่น หญ้าแห้ง และฟางข้าว โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรีย ถูกนำมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสกล่าวคือ ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส นั้น คือ น้ำตาลและน้ำตาลหมักอื่น ๆ จะมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจะใช้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น คือ เอนไซม์ลิกนินและเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส ในการย่อยสลายสิ่งเหลือทิ้งในธรรมชาติแล้วค่อยเติมเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเพื่อย่อยโมเลกุลของสารเซลลูโลสให้ได้เป็น น้ำตาลกลูโคส เพื่อเป็นสับสเตรตในกระบวนการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการคัดเลือกยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส (Beta-endoglucanase) จากฐานข้อมูล GenBank (CAE51308.1) สังเคราะห์ได้จาก *Clostridium thermocellum* ซึ่งมีส่วน CBD (Cellulose binding domain) ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET28a(+) และโคลนเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21(DE3)pLsS (Invitrogen, USA) จากนั้นทำการทดสอบการผลิตโปรตีนและสกัดโปรตีน และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ค่ากรด-ด่าง เวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยใช้ carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma, USA) เป็นซับสเตรต

3.1 การถ่ายยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock

ทำการถ่ายยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส ซึ่งได้ทำการตัดส่วนของ signal peptide ออกไป (mature gene) และเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) เรียบร้อยแล้ว โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จากนั้นทำการถ่ายยีนด้วยวิธี heat shock ดังนี้ นำ competent cell (BL21(DE3)pLsS) มาแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และดูดพลาสมิด ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใส่ใน competent cell นำไปแช่น้ำแข็งอีก 30 นาที จึงนำมาบ่มใน Heat box ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วด้วยการนำมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อาหารและเชื้อจะแบ่งชั้นกัน ทำการดูดส่วนใสออก แล้วนำเซลล์มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Chloramphenical ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเชยเชื้อที่เป็น single colony จากอาหารแข็ง LB มาเลี้ยงต่อบน master plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เชยเชื้อจาก master plate จากข้อ 3.1 มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Chloramphenical ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นสกัดพลาสมิดตามวิธีในคู่มือของ GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, EU) ดังนี้ เติมหาสารละลาย Resuspension Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ต่อมาดูดของเหลวทั้งหมดย้ายมาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์อันใหม่ และเติมหาสารละลาย Lysis Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมหาสารละลาย Neutralization Solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง แล้วนำไป

ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทั้งหมดใส่ใน GeneJET spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาเติมสารละลาย Wash Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน collection tube แล้วเติมสารละลาย Wash Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง เพื่อให้ Wash Solution ที่ค้างใน GeneJET spin column ออกให้หมด ต่อมาย้าย GeneJET spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์อันใหม่ แล้วเติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตรวจสอบพลาสมิดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.3 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการตรวจสอบชิ้นส่วนของยีนได้รับการถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ จากข้อ 3.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เนื่องจากเวกเตอร์ที่มียีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส แบบ mature มีตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะของ NcoI และ XhoI ดังนั้น ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของยีนที่ทำการเชื่อมต่อเข้าไปกับพลาสมิดเวกเตอร์ ปฏิกริยามีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x fast digest green buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, fast digest enzyme NcoI ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, fast digest enzyme XhoI ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 11 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยุดกิจกรรมของยีนด้วยการนำไปบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยการแยกด้วยวิธีเจลอะกาโรส โดยเตรียมผงอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน 1X TAE buffer อุณหภูมิห้องอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้เย็นลงแล้วเลในภาตเจล ใส่หัวและทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการผสมดีเอ็นเอกับ 6x loading dye ในอัตราส่วน 5:1 และ Novel Juice (Gene DireX, USA) ในอัตราส่วน 5:1 (เพื่อติดตามแถบดีเอ็นเอ) จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb (Gene DireX, USA) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documatation (Syngene genius, Germany)

3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

3.5.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแบคทีเรียจาก master plate จากข้อ 3.1 มาเลี้ยงเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 ml ที่มียาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Chloramphenicol ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อเริ่มต้นมา 2 มิลลิลิตร (10 %

v/v) เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จนวัดค่า OD₆₀₀ ได้ประมาณ 0.4-0.6 จึงทำการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 mM นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ และล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 1X PBS buffer ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

3.5.2 การสกัดโปรตีน

นำตะกอนเซลล์ที่ได้ในข้อ 3.5.1 มาเติมสารละลาย 1X PBS buffer ปริมาตร 32 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4.8 มิลลิลิตร และเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเขย่าตัวอย่างทุก ๆ 30 นาที เมื่อครบเวลา 3 ชั่วโมง นำมาเติมสารละลาย MgCl₂ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนและส่วนใสออกจากกันด้วยเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนตะกอนและส่วนใสด้านบนไปวัดความเข้มข้นและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS – PAGE

3.5.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (Bradford, 1976) โดยเตรียมสารละลาย Bradford โดยใช้อัตราส่วนสารละลาย Bradford ต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ส่วน จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA) (Merck, Germany) ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวัดความเข้มข้นของโปรตีนจะผสมสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Bradford ที่เจือจางแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณสมการถดถอยเชิงเส้น $y = ax \pm b$ โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA และทำการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างได้จากสมการถดถอยเชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน ตามลำดับ

3.5.4 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS – PAGE

ตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่สกัดได้จากข้อ 3.5.2 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ด้วยเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Invitrogen, USA) โดยใช้เจล NUPAGE 4 – 12 % Bis – Tris gel (Invitrogen, USA) ผสมตัวอย่างโปรตีนกับ loading buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยอดโปรตีนตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Gene DireX, USA) หลังจากนั้นทำการแยกโปรตีนโดยใช้ 1X NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen, USA) เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเจลไปย้อมสีใน staining solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปล้างใน destaining solution เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือจนกว่าโปรตีนส่วนเกินจะถูกล้างออก บันทึกภาพเจลที่ได้จาก SDS-PAGE

3.6 การทดสอบการย่อยยับยั้ง CMC บนอาหารแข็ง LB

ใช้เข็มเย็บเชื้อแบคทีเรียจาก master plate (จากข้อ 3.1) มาขีดลงบนอาหารแข็ง LB ที่มี CMC เป็นยับยั้ง และที่มี IPTG, ยาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Chloramphenicol ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมสีด้วย congo red 10 นาที แล้วเทออกล้างด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 10 นาที ทดลองซ้ำ 2 รอบ และเททับด้วยกรดอะซิติก แล้วสังเกตวงใสที่ปรากฏ

3.7 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ (enzyme characterization)

เพื่อพิจารณาว่าเอนไซม์ที่ได้จากการโคลนที่คุณสมบัติที่ดี ที่จะนำไปใช้หรือไม่ ซึ่งเอนไซม์เบต้าแอมิลเลส จะทำหน้าที่ในการย่อยยับยั้ง CMC อยู่ในประเภทของเซลลูโลส โดยการวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์ เวลาและอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด สับสเตรตที่ใช้ คือ carboxymethyl cellulose (CMC) ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะได้ผลผลิตหลังจากการย่อยสลาย คือ น้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นจะวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะใช้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาทั้งหมดประมาณ 1 มิลลิลิตร มีเอนไซม์เซลลูเลสปริมาตร 100 ไมโครลิตร, CMC ความเข้มข้น 1 % ในสารละลาย pH ต่างๆ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม DNS reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่น้ำเย็นทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่าดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Miller (1959) (Miller, 1959) เพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดย 1 ยูนิตของเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูเลสให้ได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml) ดังสมการ

$$\text{สูตรคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (U/ml)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลน้ำตาลกลูโคส} \times \text{เวลา} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์}}$$

3.7.1 การวิเคราะห์เวลาการบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimal time)

บ่มเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ CMC ความเข้มข้น 1 % ที่ละลายในโซเดียมซิเตรต 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH ประมาณ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30, 45, 60 นาที ตามลำดับ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้และเลือกระยะเวลาของการบ่มที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ ค่าเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์ตามปฏิกิริยาตามขั้นตอนที่ 3.7

3.7.2 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimal pH)

เริ่มต้นจากพิจารณาตั้งแต่ ค่า pH 3-11 โดยละลาย CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลาย ดังนี้ pH 3-6 จะใช้โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (CH_3COONa) ที่ความเข้มข้น 50 mM และ pH 7-11 จะใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_3PO_4) ที่ความเข้มข้น 50 mM จากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์ตามปฏิกิริยาตามขั้นตอนที่ 3.7 ข้างต้น

3.7.3 การทดสอบการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

หลังจากวิเคราะห์ค่ากรด-ด่าง ที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายซับสเตรทได้ดีที่สุด แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์กับซับสเตรทจะแตกต่างกัน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้มีค่าระหว่าง 30 – 80 องศาเซลเซียส โดยใช้ CMC ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด จากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์ตามปฏิกิริยาตามขั้นตอนที่ 3.7 ข้างต้น

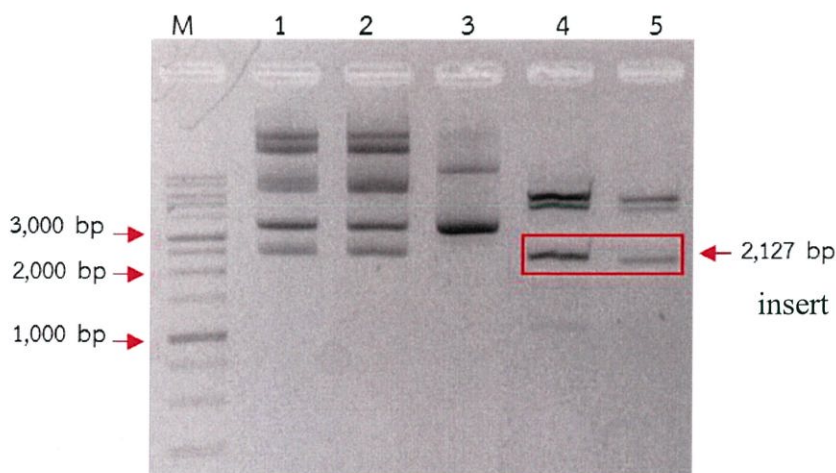
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ผลการทดสอบการโคลนยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนสแบบ mature gene (Endo-M) และเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pET28a(+) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ทำการถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21(DE3)pLysS เพื่อใช้สำหรับการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนและสกัดโปรตีนตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ค่ากรด-ด่าง เวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยใช้ carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นซับสเตรท ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

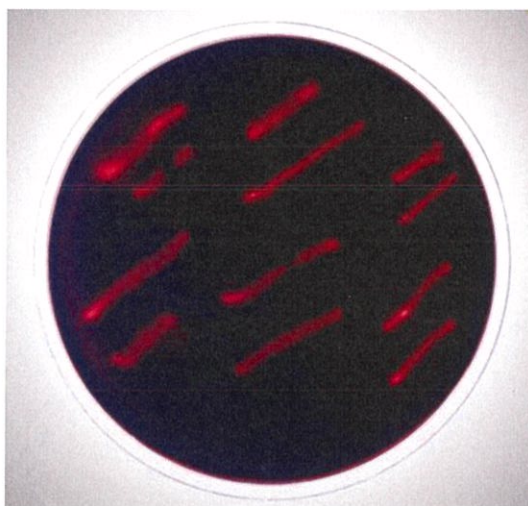
การถ่ายยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21(DE3)pLysS แล้วตรวจสอบยีนลูกผสม โดยสุ่มเลือกโคลนมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, EU) แล้วนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XhoI และตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9) พบว่า ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XhoI ได้ชิ้นยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนสแบบ mature gene (endo-M) มีขนาด 2,127 bp แสดงว่าแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3)pLysS ได้รับการถ่ายยีนได้ จึงนำโคลนที่รับการถ่ายยีนไปศึกษาการแสดงออกยีนต่อไป



ภาพที่ 5 แสดงการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XhoI เพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้รับยีนลูกผสม โดย M = 1Kb ladder , 1 = Endo-M1 ไม่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, 2 = Endo-M2 ไม่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, 3 = pET28a(+) ไม่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, 4 = Endo-M1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XhoI, 5 = Endo-M2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XhoI

4.2 ผลการทดสอบการย่อยยับยั้งสเตรท CMC บนอาหารแข็ง LB

การทดสอบกิจกรรมการย่อยยับยั้งสเตรทของเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนส โดยนำเชื้อจาก master plate ถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของ CMC ความเข้มข้น 1 %, 1mM IPTG, Kanamycin (50 μg /ml) และ Chloramphenicol (34 μg /ml) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย congo red เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที พบว่า เชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่ได้รับถ่ายยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส เกิดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 10) แสดงว่า เอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนส สามารถย่อยยับยั้งสเตรท CMC ได้ จึงทำการคัดเลือกโคลนของยีน Endo-M ไปเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์และทดสอบการทำงานของเอนไซม์ ต่อไป

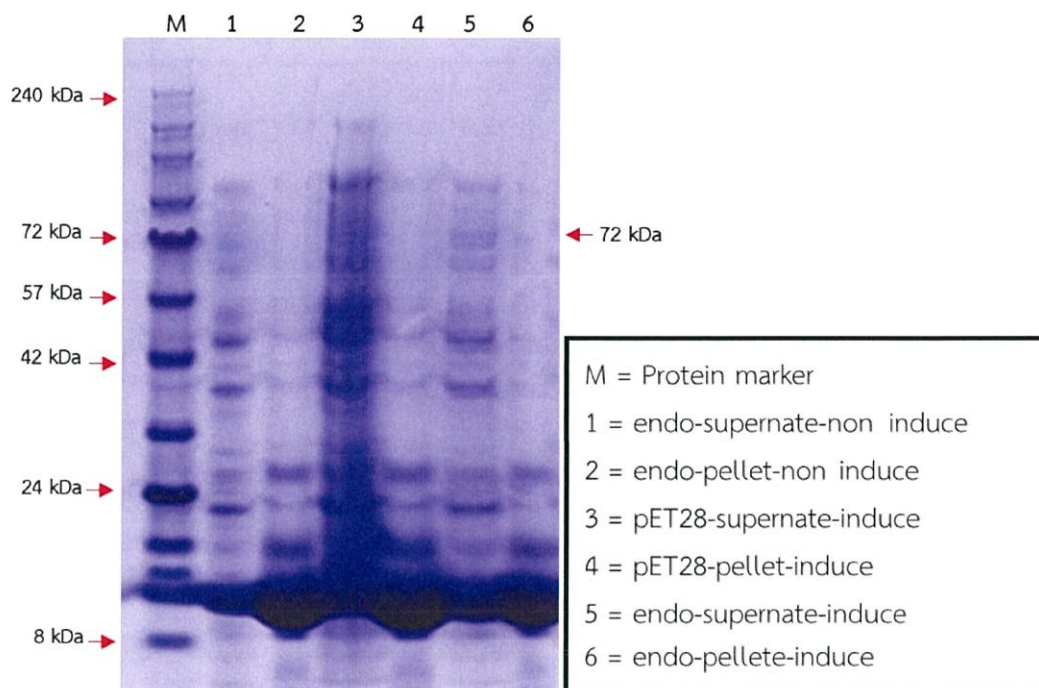


ภาพที่ 6 แสดงผลการย่อยยับยั้งสเตรทบนอาหารแข็ง LB ที่ผสม CMC ของเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่ได้รับถ่ายยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนส

4.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E. Coli*

4.3.1 ผลการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนในเชื้อแบคทีเรีย *E. Coli*

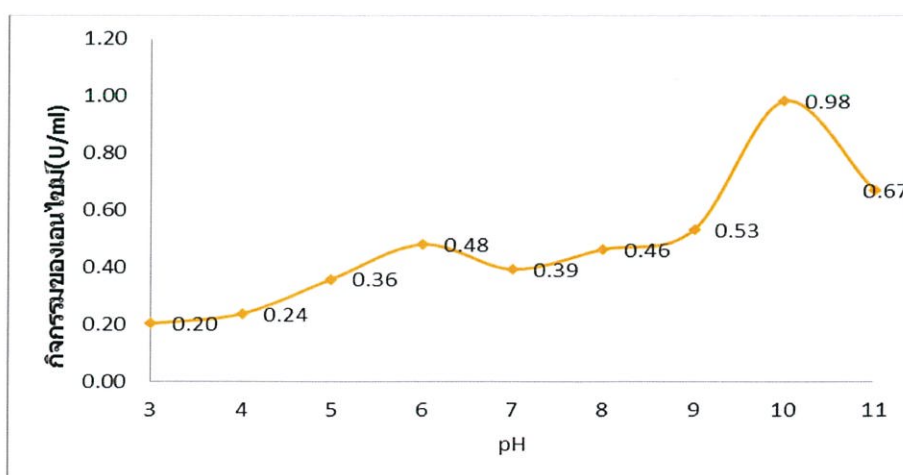
การเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ด้วย 1mM IPTG ในอาหาร LB ที่มี Kanamycin (50 μg /ml) และ Chloramphenicol (34 μg /ml) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เมื่อทำการสกัดแยกเอนไซม์เป็นส่วนใส และตะกอน พบว่า สามารถสกัดเอนไซม์ออกมาอยู่ในส่วนใส เมื่อทำการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS – PAGE มีขนาดประมาณ 72 kDa (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 7 แสดงการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS - PAGE โดยโปรตีนที่สกัดได้มีขนาดประมาณ 72 kDa

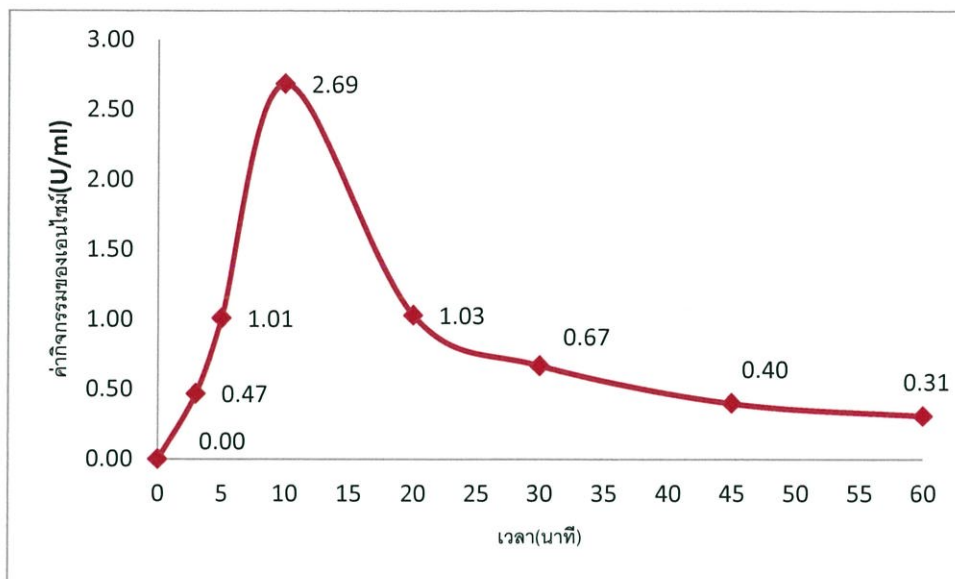
4.4 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ (enzyme characterization)

ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ที่ค่า pH ที่เหมาะสม คือ pH 10 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.98 Unit/ml (ภาพที่ 12)



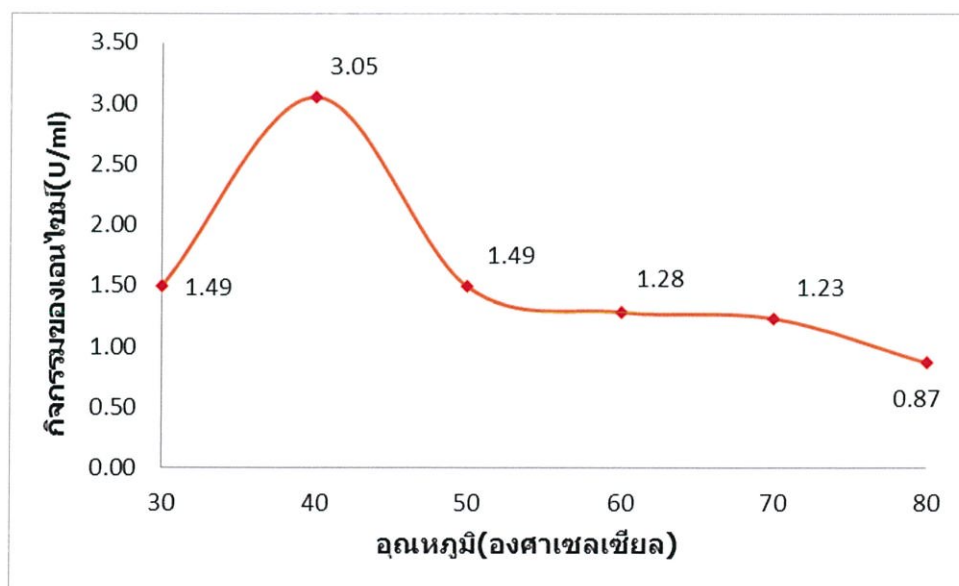
ภาพที่ 8 กราฟแสดงผลการทดสอบค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (pH 3-11)

เวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 10 นาที มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.69 U/ml (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 9 กราฟแสดงผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ตั้งแต่ 10,20,30,40,50 และ 60 นาที

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 40 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.05 U/ml (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 10 กราฟแสดงผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 องศาเซลเซียส

จากศึกษาครั้งนี้ ผลการทดลองโคลนยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนสลงใน *E. coli* BL21(DE3) เมื่อนำมาตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE พบว่า มีขนาดโปรตีนประมาณ 72 kDa มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด เท่ากับ 3.05 U/ml ที่ pH 10, อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเมื่อเทียบกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดย Gupta และคณะ (2013) (Gupta *et al.*, 2013) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสที่มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ คือ beta-1, 4-endoglucanase (Endo5A) โดยโคลนยีนใน *E. coli* BLR(DE3) และวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์โดยใช้ CMC เป็นสับสเตรต พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 0.15 U/ml ที่ pH 7.0, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 30 นาที และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ueda และคณะ (2014) (Ueda *et al.*, 2014) ที่ได้ศึกษายีน endo-1,4- β -glucanase จาก *Eisenia fetida* โดยโคลนยีนใน pCold I vector และศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* ArcticExpress RT (DE3) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ Kessara และคณะ (2017) (Seneesrisakul *et al.*, 2017) ที่ได้ศึกษาการถ่ายยีนเบต้าเอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวกไทยลงในเซลล์ *E. coli* เพื่อให้ผลิตเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนส มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนส เท่ากับ 18.56 U/mg total protein ที่ pH 4.8 และ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การถ่ายยีนเอนโดกลูคาเนส เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* BL21(DE3)pLysS จึงทำการตรวจสอบยีนลูกผสม โดยสุ่มเลือกโคลนสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, EU) แล้วนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XhoI และตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XhoI ได้ขึ้นยีนเป้าหมายขนาดยีน เอนโดกลูคาเนสแบบ mature gene (endo-M) ขนาด 2,127 bp แสดงว่าเชื้อ *E.coli* BL21(DE3)pLysS ได้รับการถ่ายยีนได้

การเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ด้วย 1mM IPTG ในอาหาร LB ที่มี Kanamycin (50 µg /ml) และ Chloramphenicol (34 µg /ml) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้มีการเหนี่ยวนำ พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาอยู่ในส่วนใส (supernate) เมื่อทำการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS – PAGE มีขนาดประมาณ 72 kDa

การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ ที่ผลิตได้จากเชื้อ *E.coli* BL21(DE3)pLysS พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ pH 10, เวลา 10 นาที และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 3.05 U/ml

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ควรทดสอบด้วยเทคนิค western blot เพิ่มเติม เพื่อยืนยันผลให้ชัดเจนว่าเป็นเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนส
2. ในขั้นตอนการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ที่เวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ควรทำการทดสอบที่เวลา 0 และ 5 นาที เพิ่มเติม เพื่อให้ทราบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในสภาวะดังกล่าวหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

- รัชรา,สมบุรณ์ และมาโมรุ, 2557).การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่แยกจากกระเพาะหมักของวัว.(วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต,มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- Bradford, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Farinas, C. S., M. M. Loyo, A. Baraldo, P. W. Tardioli, V. B. Neto and S. Couri, 2010: Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnology*, 27, 810-815.
- Gupta, S., N. Adlakha and S. S. Yazdani, 2013: Efficient extracellular secretion of an endoglucanase and a β -glucosidase in E. coli. *Protein expression and purification*, 88, 20-25.
- Henrissat, B. and G. Davies, 1997: Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 637-644.
- Keshk, S. M. A. S. and M. Gouda, 2017: 9 - Natural biodegradable medical polymers: Cellulose A2 - Zhang, Xiang. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*. Woodhead Publishing.
- Miller, G. L., 1959: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31, 426-428.
- Rytioja, J., K. Hildén, J. Yuzon, A. Hatakka, R. P. Vries and M. Mäkelä, 2014: *Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes*, p. 614-649.
- Saini, R., J. K. Saini, M. Adsul, A. K. Patel, A. Mathur, D. Tuli and R. R. Singhania, 2015: Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource Technology*, 188, 240-246.
- Seneesrisakul, K., S. A. Guralp, E. Gulari and S. Chavadej, 2017: Escherichia coli expressing endoglucanase gene from Thai higher termite bacteria for enzymatic and microbial hydrolysis of cellulosic materials. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 70-79.
- Shahzadi, T., S. Mehmood, M. Irshad, Z. Anwar, A. Afroz, N. Zeeshan, U. Rashid and K. Sughra, 2014: Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Vol.05No.03, 6.
- Ueda, M., A. Ito, M. Nakazawa, K. Miyatake, M. Sakaguchi and K. Inouye, 2014: Cloning and expression of the cold-adapted endo-1, 4- β -glucanase gene from *Eisenia fetida*. *Carbohydrate polymers*, 101, 511-516.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย อาหารเลี้ยงเชื้อ และแผนที่เวกเตอร์

1. การเตรียมสารละลาย

1.) Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

เตรียม stock IPTG โดยละลาย 119.2 มิลลิกรัม IPTG ความเข้มข้น 50 mM ในน้ำ 10 มิลลิลิตร กรองด้วย filter ขนาด 22 ไมโครเมตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.) 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย DNS 5 กรัม ในน้ำกลั่น (อุ่น) 125 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันบน hot plate และละลาย NaOH 5 กรัม ในน้ำกลั่น 75 กรัม แล้วนำไปผสมกับสารละลาย DNS ข้างต้น ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ค่อยๆเติม $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 150 กรัม ในสารละลาย DNS ในขั้นตอนนี้อาจเกิดตะกอน ควรใช้ความร้อยจะช่วยให้ละลายได้ดียิ่งขึ้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.) Lulia-bertani broth (LB Broth)

10 กรัม	Tryptone
5 กรัม	Yeast extract
10 กรัม	NaCl

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.) Lulia-bertani Agar (LB Agar)

10 กรัม	Tryptone
5 กรัม	Yeast extract
10 กรัม	NaCl
15 กรัม	Agar

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

1.) Kanamycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.) Chloramphenicol 34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ละลายยาปฏิชีวนะด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วย filter ขนาด 22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์

1.) Agarose gel

ละลาย Agarose gel 0.4 กรัม ในสารละลาย 1X TAE 60 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม SYBR Safe DNA gel stain 5 ไมโครลิตร ใน Agarose gel ที่ละลายแล้ว

2.) 6X Load Dye

ใช้ 6X Load Dye 2 ไมโครลิตร ผสมกับ PCR product 3 ไมโครลิตร แล้วนำไป run gel

5. การเตรียมสารละลายสำหรับการเหนี่ยวนำให้ยีนเกิดการแสดงออก

1.) Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

0.238 กรัม IPTG
10 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ละลาย IPTG ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วกรองที่กระดาษกรองขนาดรูพรุน 22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

1.) Di-sodium hydrogen phosphate

14.20 กรัม Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
500 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 0.1 M Di-sodium hydrogen phosphate ในน้ำกลั่น และนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.) Sodium dihydrogen phosphate

11.20 กรัม Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)
500 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 0.1 M Sodium dihydrogen phosphate ในน้ำกลั่น และนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.) Sodium hydroxide

2 กรัม Sodium hydroxide (NaOH)
200 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 0.1 M Sodium hydroxide ในน้ำกลั่น และนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.) Sodium hydroxide

4 กรัม Sodium hydroxide (NaOH)
300 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 0.2 M Sodium hydroxide ในน้ำกลั่น และนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.) Disodium phosphate

28.39 กรัม Disodium phosphate (Na_2HPO_4)
 700 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 0.2 M Disodium phosphate ในน้ำกลั่น และนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6.) Sodium chloride

29.22 กรัม Sodium chloride (NaCl)
 300 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 1 M Sodium chloride ในน้ำกลั่น และนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7.) Potassium chloride

37.28 กรัม Potassium chloride (KCl)
 300 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 1 M Potassium chloride ในน้ำกลั่น และนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8.) Potassium dihydrogen phosphate

68.04 กรัม Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
 300 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 1 M Potassium dihydrogen phosphate ในน้ำกลั่น และนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9.) Carboxymethylcellulose Agr (CMC Agar)

1 กรัม CMC
 1.5 กรัม Agar
 60 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

ละลาย 1 CMC ใน Sodium acetate ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วหลังจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อแล้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

1.) การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 3 – 6

- 0.2 M acetic acid
- 0.2M sodium acetate (tri-hydrate) ความเข้มข้น 27.2 กรัม/ลิตร
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางที่2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate

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

2.) การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 7-8

- 0.2M disodium hydrogen phosphate (28.4 กรัม/ลิตร)
- 0.2M HCl
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางที่3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate

pH	0.2M disodium phosphate (ml)	0.2M HCl (ml)	0.2M NaOH (ml)
7	756.0	244	-
8	955.1	44.9	-
9	955.0	45.0	-
10	966.4	-	33.6
11	965.3	-	34.7

8. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE

1. Tris 3 M pH 8.8 (1 ลิตร)

- Tris 365 กรัม
- น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ 700 มิลลิลิตร
- HCl

ละลาย Tris ในน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml ด้วย Distilled water เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

2. Tris 1.5 M pH 8.8 (1 ลิตร)

- Tris 3 M pH 8.8 500 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ 500 มิลลิลิตร

3. Tris 0.5M pH 6.8 (1 ลิตร)

Tris	60.6 กรัม
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	700 มิลลิลิตร

ละลาย Tris ในน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1,000 ml เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

4. 10 % SDS (10 มิลลิลิตร)

SDS	1 กรัม
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	10 มิลลิลิตร

5. 10 % Ammonium persulphate solution ; APS (1มิลลิลิตร) (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

Ammonium persulphate	0.1 กรัม
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	1 มิลลิลิตร

6. 1 % Bromophenol blue (10มิลลิลิตร)

Bromophenol blue	0.01 กรัม
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	10 มิลลิลิตร

7. Loading buffer (15 มิลลิลิตร)

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	5,500 ไมโครลิตร
0.5M Tris – HCl pH 6.8	1,900 ไมโครลิตร
10 % SDS	3,000 ไมโครลิตร
100 % Glycerol	1,500 ไมโครลิตร
0.1 % Bromophenol blue	3,000 ไมโครลิตร
2 – Mercaptoethanol	75 ไมโครลิตร

8. 10X Running buffer (1 มิลลิลิตร)

Glycine	144 กรัม
Tris-base	30 กรัม
SDS	10 กรัม

ละลายสาร Tris-base, Glycine และ SDS และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1,000 ml เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

9. Transfer buffer (1 ลิตร) (25mM Tris pH 8.3, 192mM glycine, 20% (v/v) methanol)

Tris-base	3.03 กรัม
Glycine	14.4 กรัม
Methanol	200 มิลลิลิตร

ละลายสาร Tris-base และ Glycine และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1,000 ml เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

10. Staining solution (2 ลิตร) (40% Methanol, 10% Acetic acid, 0.1% Coomassie blue R-250)

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	1,000 มิลลิลิตร
Methanol	800 มิลลิลิตร
Acetic acid	200 มิลลิลิตร
Coomassie blue R-250	2 กรัม

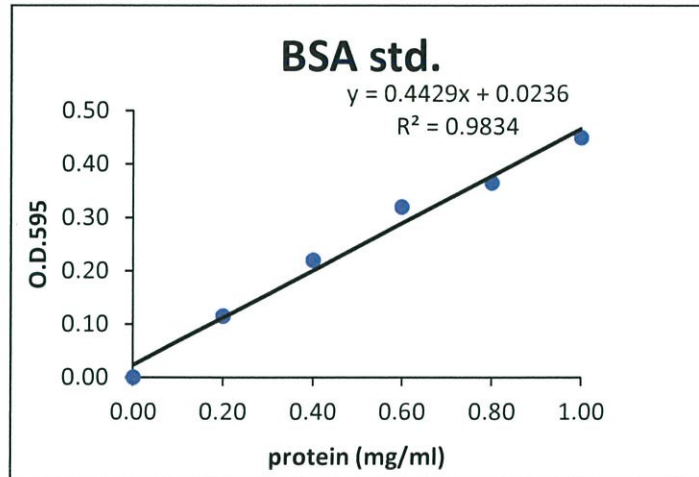
เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

11. Destaining solution (40% Methanol, 10% Acetic acid ; 2 ลิตร)

น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	1,000 มิลลิลิตร
Methanol	800 มิลลิลิตร
Acetic acid	200 มิลลิลิตร

เก็บในตู้เย็น 20 องศาเซลเซียส

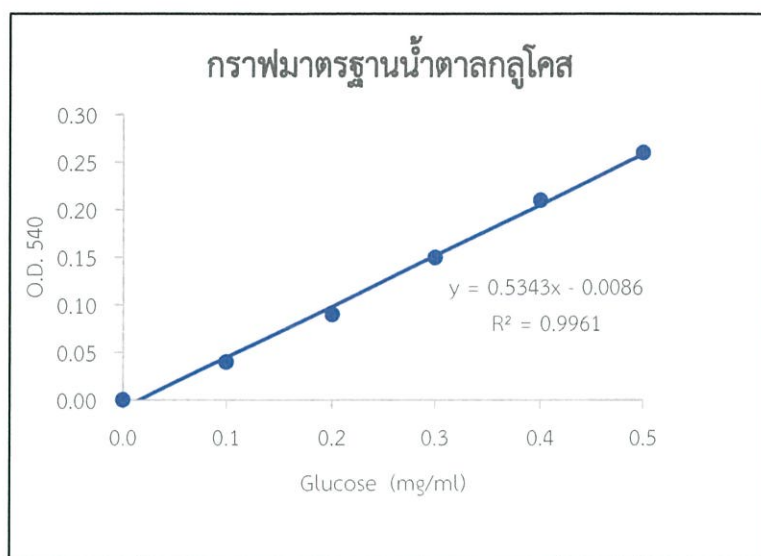
ภาคผนวก ข
ข้อมูลการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานโปรตีน(BSA standard)

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นโปรตีนของตัวอย่าง

Time (min)	Abs 540			reducing sugar			unit/ml
				μMole			
	coltrol	1	2	1	2	เฉลี่ย	
0	0.17	0.18	0.19	0.19	0.30	0.25	0
3	0.17	0.19	0.16	0.30	-0.01	0.14	0.47
5	0.17	0.19	0.23	0.30	0.71	0.50	1.01
10	0.08	0.33	0.33	2.69	2.69	2.69	2.69
20	0.08	0.26	0.28	1.96	2.17	2.06	1.03
30	0.08	0.28	0.25	2.17	1.86	2.01	0.67
45	0.08	0.23	0.26	1.65	1.96	1.80	0.40
60	0.08	0.25	0.25	1.86	1.86	1.86	0.31



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานกลูโคส (glucose standard)

ตารางที่ 5 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

Glucose (mg/ml)	ค่าดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร				
	1	2	3	เฉลี่ย	blank
0.0	0.06	0.06	0.06	0.06	0.00
0.1	0.10	0.10	0.10	0.10	0.04
0.2	0.15	0.15	0.16	0.15	0.09
0.3	0.21	0.21	0.21	0.21	0.15
0.4	0.27	0.27	0.26	0.27	0.21
0.5	0.32	0.33	0.31	0.32	0.26

ตารางที่ 6 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ pH ต่างกัน

pH	ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			reducing sugar (μ Mole)			กิจกรรมของเอนไซม์ (unit/ml)
	control	1	2	1	2	เฉลี่ย	
3	0.11	0.16	0.16	0.61	0.61	0.61	0.20
4	0.09	0.15	0.15	0.71	0.71	0.71	0.24
5	0.09	0.19	0.18	1.13	1.02	1.08	0.36
6	0.08	0.22	0.2	1.54	1.34	1.44	0.48
7	0.10	0.22	0.19	1.34	1.02	1.18	0.39
8	0.08	0.21	0.2	1.44	1.34	1.39	0.46
9	0.10	0.24	0.25	1.54	1.65	1.60	0.53
10	0.05	0.33	0.32	3.00	2.89	2.95	0.98
11	0.07	0.260	0.250	2.06	1.96	2.01	0.67

ตารางที่ 7 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เวลาต่างกัน

Time (min)	Abs 540			reducing sugar			unit/ml
				μ Mole			
	coltrol	1	2	1	2	เฉลี่ย	
0	0.17	0.18	0.19	0.19	0.30	0.25	0
3	0.17	0.16	0.19	-0.01	0.30	0.14	0.47
5	0.17	0.23	0.15	0.71	-0.12	0.30	0.59
10	0.08	0.33	0.33	2.69	2.69	2.69	2.69
20	0.08	0.26	0.28	1.96	2.17	2.06	1.03
30	0.08	0.28	0.25	2.17	1.86	2.01	0.67
45	0.08	0.23	0.26	1.65	1.96	1.80	0.40
60	0.08	0.25	0.25	1.86	1.86	1.86	0.31

ตารางที่ 8 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Abs 540			reducing sugar			กิจกรรมของ เอนไซม์ (unit/ml)
	coltrol	1	2	μMole			
				1	2	เฉลี่ย	
30	0.12	0.26	0.25	1.54	1.44	1.49	1.49
40	0.10	0.38	0.39	3.00	3.10	3.05	3.05
50	0.07	0.2	0.21	1.44	1.54	1.49	1.49
60	0.07	0.18	0.19	1.23	1.34	1.28	1.28
70	0.07	0.18	0.18	1.23	1.23	1.23	1.23
80	0.10	0.18	0.17	0.92	0.82	0.87	0.87



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มสหกิจศึกษา

วันที่ ๑๖ เดือน มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๑

ข้าพเจ้า นางสาวเอี่ยมดาว เชื้อบัวหลวง รหัสประจำตัว ๕๗๐๕๐๗๘๖

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่า
สหกิจศึกษา เรื่อง การโคลนและการแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เบต้าเอนโดกลูคาเนสใน
Escherichia coli

Molecular cloning and expression of beta-endoglucanase gene in *Escherichia coli*

ปีการศึกษา ๒๕๖๑

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้
แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มสหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้วโปรแกรม
อักขราวิสุทธิ์ ๑.๓๖ %

ลงชื่อ.....นางสาวเอี่ยมดาว เชื้อบัวหลวง
(เอี่ยมดาว)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า อาจารย์ธนาวัต ก่ออนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว
ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....ดร.กวี ก่ออนันต์.....

อาจารย์ที่ปรึกษา