



การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของไซแลนเนสจากยีนของ
Pseudomonas boreopolis ไอโซเลท B5

โดย

นางสาวอริศรา อรรถเวทย์วรฤดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของไซแลนเนสจากยีนของ
Pseudomonas boreopolis ไอโซเลท B5

โดย

นางสาวอริศรา อรรถเวทย์วรฤทธิ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



Expression, purification and characterization of a xylanase from
Pseudomonas boreopolis isolate B5

BY

Miss Arisara Arthawedworawuthi



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2015

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวอริศรา อรรถเวทย์วรฤทธิ

เรื่อง

การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของไซแลนเนสจากยีสของ
Pseudomonas boreopolis ไอโซเลท B5

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เมื่อ วันที่ 15 มิถุนายน พ.ศ. 2559

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



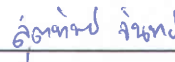
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก



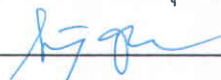
(ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดาทิพย์ จันทร)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์)

คณบดี



(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของ ไซแลนเนสจากยีนของ <i>Pseudomonas boreopolis</i> ไอโซเลท B5
ชื่อผู้เขียน	นางสาวอริศรา อรรถเวทย์วรภูมิ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อาจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดาทิพย์ จันท
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *Pseudomonas boreopolis* isolate B5 ที่แยกมาจากบริเวณแหล่งน้ำพุร้อน โดยนำมาแสดงออกใน *Escherichia coli* BL21 (DE3) และเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสด้วย IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค GST-tag affinity chromatography ผลการทดสอบสมบัติของเอนไซม์พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์คือ 50 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์คือ พีเอช 8 และ 6 ตามลำดับ และรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง โดยยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5 ชนิด พบว่ารีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการย่อยซังข้าวโพดได้ดีที่สุดโดยให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 371.11 ± 4.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส GST-tag affinity chromatography สมบัติของเอนไซม์

Thesis Title	Expression, purification and characterization of a xylanase from <i>Pseudomonas boreopolis</i> isolate B5
Author	Miss Arisara Arthawedworawuthi
Degree	Master degree
Major Field/Faculty/University	Biotechnology Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Dr. Chanitchote Piyapittayanun
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Dr. Sudathip chantorn
Academic Years	2015

ABSTRACT

In this study, a xylanase gene from hot spring *Pseudomonas boreopolis* isolate B5 was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) after IPTG induction. Recombinant xylanase was subsequently purified using GST-tag affinity chromatography. Properties of enzyme were tested in both crude and purified enzymes. Results showed that the optimum temperature of both crude and purified enzyme was at 50 degree Celsius. However, the optimum pH of crude xylanase was 8 while that of purified enzyme was 6. The recombinant enzyme exhibited thermostability with more than 100 percent of residual activity after 5-hour incubation period. Finally, among five agricultural residues tested, corn cobs was shown to be most effectively hydrolyzed by this xylanase with the sugar yield of 371.11 ± 4.44 mg/mL.

Keywords: xylanase, GST-tag affinity chromatography, properties of enzyme

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้โอกาสในการศึกษา คำแนะนำ การช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ของงานวิจัย อีกทั้งยังถ่ายทอดความรู้ที่เป็นแบบอย่างของนักวิจัยที่ดีแก่ข้าพเจ้า รวมถึงกำลังใจ และการดูแลเอาใจใส่ที่มีให้ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุดาทิพย์ จันทร ผศ.ดร.กุลวดี พรรณเชษฐ์ ผศ.ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ สำหรับคำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนอนุเคราะห์ให้สารเคมี และ อุปกรณ์ต่าง ๆ ในงานวิจัย และขอขอบคุณ ผศ.ดร.จิระวรรณ อภิรักษากร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อ แบคทีเรียในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ทุกท่าน ที่อบรมสั่งสอน ให้ความรู้ และให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาการศึกษา รวมถึงพื้นที่วิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ทุก ๆ คน โดยเฉพาะคุณเปรมณัฐ ขุนปักษี และคุณเฉลิมพล รัตนลาโภ ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ ตลอดระยะเวลาทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณลุง คุณป้า ที่ให้โอกาสในการศึกษาในระดับปริญญาโท ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

และวิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ของนักศึกษา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

อริศรา อรรถเวทวรวิ

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

พ.ศ. 2558

สารบัญ

บทคัดย่อ.....	ข
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	1
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose).....	3
2.1.1 เซลลูโลส (cellulose)	3
2.1.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)	4
2.1.3 ลิกนิน (lignin)	6
2.2 ไซลันโนไลติกเอนไซม์ (xylanolytic enzymes).....	7
2.3 แหล่งของไซแลนเนส	9
2.4 การประยุกต์ใช้ไซแลนเนส.....	11
2.5 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	12
บทที่ 3 วิธีการวิจัย.....	14
3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	14
3.2 ขั้นตอนการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 (สุชานนท์ และธำปณ, 2553)..	14
3.2 การเพิ่มปริมาณ pGEX-4T-1-xynB5	15

สารบัญ (ต่อ)

3.2.2 การถ่ายเวกเตอร์ pGEX-4T-1-xynB5 ลงสู่ <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	16
3.2.3 การสกัด pGEX-4T-1-xynB5 จาก <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	16
3.2.4 การถ่ายเวกเตอร์ pGEX-4T-1-xynB5 ลงสู่ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3)	17
3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	18
3.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ ไซแลนเนส	18
3.3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	18
3.3.3 การสกัดรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	19
3.4 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE)	19
3.5 วิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	19
3.6 การทำให้รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสบริสุทธิ์ด้วยวิธี GST-tag affinity chromatography	20
3.7 การศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	20
3.7.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	20
3.7.2 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	21
3.8 การศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทาง การเกษตร	21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	23
4.1 การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	23
4.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	23
4.1.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	24
4.1.2 การสกัดรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	26

สารบัญ (ต่อ)

4.2 การทำรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค GST-tag affinity chromatography	29
4.3 การศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนส	31
4.3.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนส	31
4.3.2 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนส	34
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสสกัดหยาบในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	38
รายการอ้างอิง	40
ภาคผนวก	47
ภาคผนวก ก	48
อุปกรณ์และสารเคมี	48
ภาคผนวก ก	49
อุปกรณ์และสารเคมี	49
1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	49
2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	50
3. สารเคมี	51
4. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้	53
ภาคผนวก ข	60
วิธีการวิเคราะห์	60
1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)	61
2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry <i>et al.</i> , 1951)	62

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก ค	64
ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาวิจัย	64
1. การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์	65
2. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE).....	67
3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	68



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช	3
2 โครงสร้างเซลล์ลูลอส.....	4
3 โครงสร้างของไซแลนไม้เนื้อแข็ง.....	5
4 โครงสร้างของไซแลนไม้เนื้ออ่อน.....	5
5 โครงสร้างของไซแลนพืชตระกูลหญ้า.....	6
6 สารตั้งต้นของการสังเคราะห์ลิคินินประกอบด้วย <i>p</i> -hydroxycinnamyl alcohol 3 ชนิด.....	7
7 โครงสร้างตติยภูมิของไซแลนเนสในไกลโคซิลไฮโดรเลสสกุลที่ 10 และ 11.....	8
8 กลไกการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มไซลันโนไลติก (xylanolytic enzymes).....	9
9 แผนภาพเวกเตอร์ pGEX-4T-1.....	15
10 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสใน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	24
11 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสใน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3).....	26
12 แสดงการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication).....	28
13 แสดงรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	30
14 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบ..	32
15 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	33
16 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบ.....	35
17 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ผลของการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่าง ๆ ด้วยรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส สกัดหยาบ.....	37
19	กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส.....	62
20	กราฟมาตรฐานโปรตีน.....	63
21	หลักการของโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ แสดงการจับกันระหว่างสารที่สนใจ (S) กับลิแกนด์ (L) ในขณะที่อยู่ในคอลัมน์.....	66
22	แสดงการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ติดกับGST-tag ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยสมบัติ ความสามารถในการจับกันระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนกับกลูตาไทโอนที่อยู่ใน คอลัมน์และรีคอมบิแนนท์โปรตีนจะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยกลูตาไทโอนที่มี ความเข้มข้นสูง.....	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร.....	12
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์และสมบัติบางประการของคูไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	14
3	ตารางการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์.....	31



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยไซแลนซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์พืช เอนไซม์ชนิดนี้ประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมผลิตไบโอเอทานอล อุตสาหกรรมผลิตขนมปัง อุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมผลิตไวน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ มีการนำไซแลนเนสเข้ามาใช้ร่วมกับสารเคมี เช่น ก๊าซคลอรีนและคลอรีนไดออกไซด์ในขั้นตอนฟอกจางสีเยื่อกระดาษ เพื่อทำให้เกิดรูพรุนได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้สารคลอรีนสามารถเข้าไปกำจัดลิกนินได้ง่ายขึ้น จึงสามารถลดปริมาณการใช้สารคลอรีนในการฟอกสีเยื่อกระดาษลงได้

จากการศึกษาไซแลนเนสจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดจะพบว่า ไซแลนเนสที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสมบัติแตกต่างกัน จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้แตกต่างกันไปด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาไซแลนเนสจาก *Pseudomonas boreopolis* ไอโซเลท B5 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าไซแลนเนสที่ผลิตจาก *P. boreopolis* ไอโซเลท B5 อาจมีความสามารถในการทนความร้อนได้สูง ทำให้มีความน่าสนใจว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้จะสามารถนำไปใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรม

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสใน *Escherichia coli* BL21 (DE3) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี GST-tag affinity chromatography และศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสจาก *Pseudomonas boreopolis* ไอโซเลท B5 โดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

1.3.2 นำรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผลิตได้ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี GST-tag affinity chromatography

1.3.3 ศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสกัตหายาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ในเรื่องของอิทธิพลของอุณหภูมิและค่าพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

1.3.4 ศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบต่อการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5 ชนิด ได้แก่ กากกาแฟ กากเนื้อมะพร้าว กากถั่วเหลือง ชานอ้อย และซังข้าวโพด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสจาก *P. boreopolis* ไอโซเลท B5 เพื่อใช้เป็นเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม

1.5 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

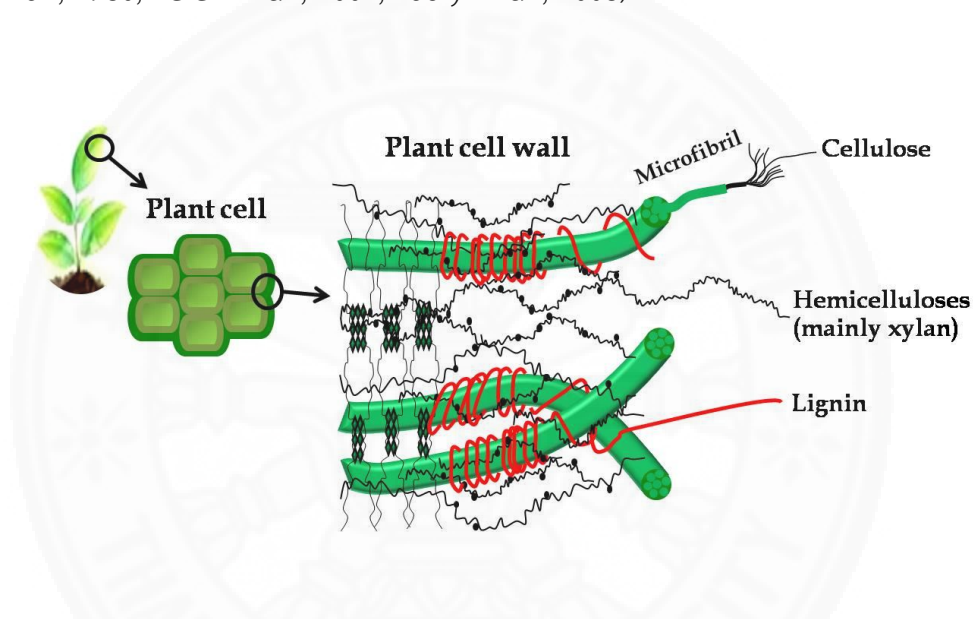
ห้องปฏิบัติการ B503, B403, B401 และ B407 อาคารบรรยายเรียนรวม 5 (บร.5) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose)

ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งอยู่ร่วมกันในผนังเซลล์พืชดังภาพที่ 1 โดยส่วนประกอบดังกล่าวจะมีสัดส่วนแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด (Aspinall, 1980; Pérez *et al.*, 2002; Pauly *et al.*, 2008)

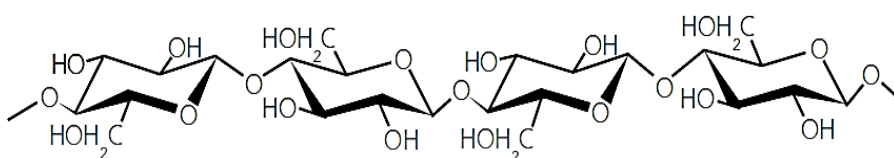


ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช (ที่มา: Ratanakhanokchai *et al.* (2013))

2.1.1 เซลลูโลส (cellulose)

เป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นของกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic linkage) โครงสร้างโมเลกุลเป็นเส้นสายยาว ไม่มีกิ่งก้านสาขา (ภาพที่ 2) ความแข็งแรงและความคงตัวเกิดจากพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนสายโดยแต่ละสายเรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) จะมีการเรียงตัวขนานกันและมีข้อที่เหมือนกัน ไมโครไฟบริลแต่ละสายจะเชื่อมกันเพื่อสร้างเป็นไฟบริล (fibrils) ขนาดใหญ่ โดยเซลลูโลสไฟบริลมีบริเวณที่โครงสร้างเป็นระเบียบ (crystalline region) และส่วนที่บริเวณโครงสร้างไม่เป็นระเบียบ (amorphous region) เซลลูโลสที่ได้จากธรรมชาติส่วนใหญ่จะมีปริมาณโครงสร้างไม่เป็นระเบียบแตกต่างกันซึ่งโครงสร้างไม่

เป็นระเบียบมีความไวกับสารเคมีและเอนไซม์มากกว่าโครงสร้างเป็นระเบียบ ดังนั้นจึงเป็นส่วนที่ง่ายต่อการถูกย่อยด้วยปฏิกิริยาของกรดเบสหรือเอนไซม์ (Pu *et al.*, 2008)



ภาพที่ 2 โครงสร้างเซลลูโลส (ที่มา: Pu *et al.* (2008))

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

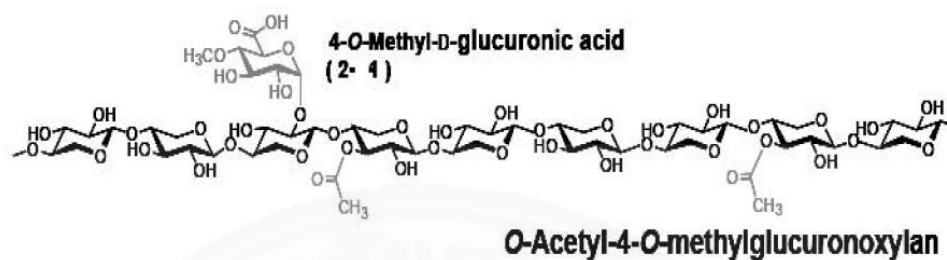
เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วย ไคแลน (xylan) แมนแนน (mannan) กาแลคแทน (galactan) และอะราบินแนน (arabinan) โดยไคแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส (Biely, 1985)

2.1.2.1 ไคแลน (xylan)

ไคแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชรองจากเซลลูโลส มีโครงสร้างหลักคือ น้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิกเป็นสายหลักและมีโซ่กิ่งเป็นพวกกลุ่มของหมู่อะซิทิล (acetyl group), หมู่อะราบินโนฟิวราโนซิล (arabinofuranosyl group), หมู่กรดกลูโคโรนิก (glucuronic acid group) ซึ่งแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด เมื่อใช้จำนวนหน่วยมอนอเมอร์เฉลี่ยในโมเลกุลของพอลิเมอร์หรือที่เรียกว่าองศาของการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization: DP) สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ ไคแลนในไม้เนื้อแข็ง ไคแลนในไม้เนื้ออ่อน และไคแลนในพืชตระกูลหญ้า (Sunna and Antranikian, 1997)

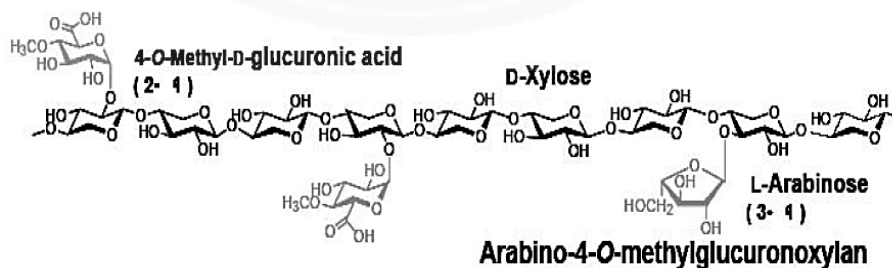
2.1.2.1.1 ไคแลนไม้เนื้อแข็ง (hardwood xylan) เช่น birchwood xylan มีโครงสร้างเป็น o-acetyl-4-o-methylglucuronoxylan มีสายกิ่งคือ 4-o-methyl glucuronic acid และกรดอะซิติกดังภาพที่ 3 มีโครงสร้างหลักคือ น้ำตาลไซโลสโดยน้ำตาลไซโลสทุกๆ 10 โมเลกุลจะเชื่อมกับ 4-o-methylglucuronic acid ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2 ด้วยพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิก ส่วนกรดอะซิติกจะถูกเอสเทอร์ไฟด์ที่หมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลไซโลสที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2

และ/หรือตำแหน่งที่ 3 และไซแลนไม้เนื้อแข็งมีค่าขององศาของการเกิดพอลิเมอร์ ระหว่าง 150-200 (Timell, 1967)



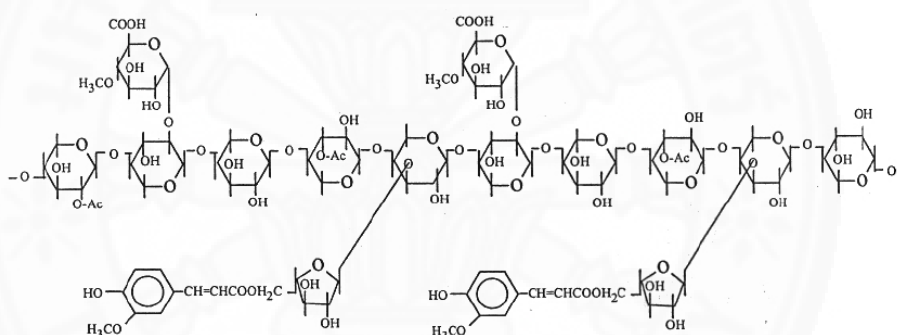
ภาพที่ 3 โครงสร้างของไซแลนไม้เนื้อแข็ง (ที่มา: Bastawade (1992))

2.1.2.1.2 ไซแลนไม้เนื้ออ่อน (softwood xylan) เช่น พวกพืชตระกูลสนและ oat spelt xylan จะมีโครงสร้างเป็น arabino-4-o-methylglucuronoxylan ที่มีสายกิ่งเป็น 4-o-methylglucuronic acid และ L-arabinofuranose ดังภาพที่ 4 โดยน้ำตาลไซโลสทุก ๆ 10 โมเลกุลจะเชื่อมกับ 4-o-methylglucuronic acid ตรงคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2 ด้วยพันธะแอลฟา-1,2ไกลโคซิดิก ส่วน L-arabinofuranose จะเชื่อมกับน้ำตาลไซโลสตรงคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 ด้วยพันธะแอลฟา-1,3ไกลโคซิดิกและไซแลนไม้เนื้ออ่อนมีค่าขององศาของการเกิดพอลิเมอร์ ระหว่าง 70-130 (Timell, 1967)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของไซแลนไม้เนื้ออ่อน (ที่มา: Bastawade *et al.* (1992))

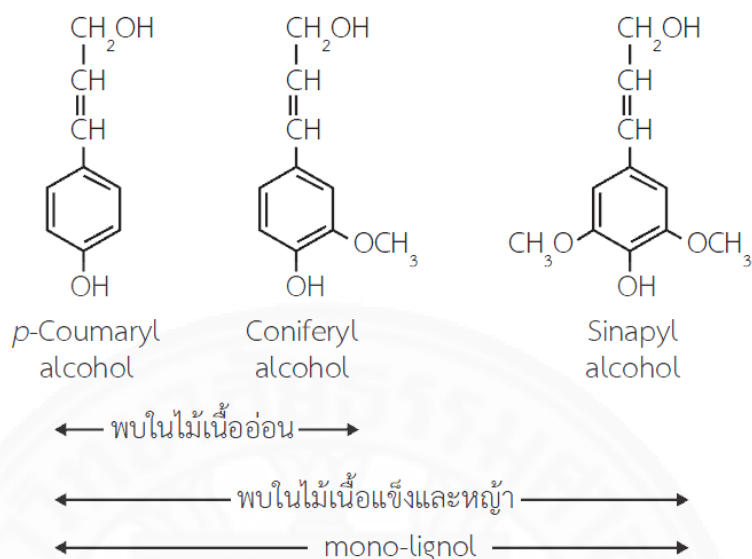
2.1.2.1.3 ไซแลนในพืชตระกูลหญ้า (grass xylan) เช่น ข้าวโพด ข้าว
มีโครงสร้าง เป็น o-acetyl-arabino-4-o-methylglucuronoxylan และมีสายกิ่งเป็น 4-o-methylglucuronic acid และ L-arabinofuranose ดังภาพที่ 5 ซึ่งไซแลนในพืชรตระกูลหญ้าจะมีสายกิ่งพวก 4-o-methylglucuronic acid น้อยกว่าไซแลนในไม้เนื้ออ่อนแต่จะมีสายกิ่งพวก L-arabinofuranose จำนวนมากกว่าในไม้เนื้ออ่อนโดยจะเชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักที่เป็นน้ำตาลไซโลสที่ตำแหน่งที่ 2 และ/หรือตำแหน่งที่ 3 ของคาร์บอนอะตอมด้วยพันธะแอลฟา-1,2ไกลโคซิดิก นอกจากนี้ในโครงสร้างหลักยังพบหมู่ o-acetyl ซึ่งเชื่อมตรงตำแหน่งที่ 2 และ/หรือตำแหน่งที่ 3 ของคาร์บอนอะตอมในโครงสร้างหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งที่ 5 ของคาร์บอนอะตอมของ L-arabinofuranose พบหมู่ feruloyl และหมู่ p-coumaroyl residue และไซแลนในพืชตระกูลหญ้ามียาค่างขององศาของการเกิดพอลิเมอร์ระหว่าง 80-90 (Timell, 1967)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของไซแลนพืชตระกูลหญ้า (ที่มา: Coughlan and Hazlewood (1993))

2.1.3 ลิกนิน (lignin)

เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบรวมอยู่กับเซลลูโลส ลิกนินประกอบด้วย มอนอเมอร์ (monomer) หลัก 3 ชนิด ได้แก่ พาราเคอนาริลแอลกอฮอล์ (*p*-coumaryl alcohol) โคนิเฟอริลแอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และไซนาปิลแอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) ดังภาพที่ 6 ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติทางการยัดหยุ่น จึงส่งผลให้พืชที่มีลิกนินในปริมาณสูงจะเป็นพืชที่มีความแข็งแรงสูงตามไปด้วย ลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (lignase) หรือลิกนินเนส (ligninase) ซึ่งลิกนินเป็นปัญหาสำคัญที่ขัดขวางกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์พืชด้วยเอนไซม์ (ริกาญจน์, 2556)



ภาพที่ 6 มอนอเมอร์ของลิกนิน (ที่มา: Glazer and Nikaido (2007))

2.2 ไซลานโนไลติกเอนไซม์ (xylanolytic enzymes)

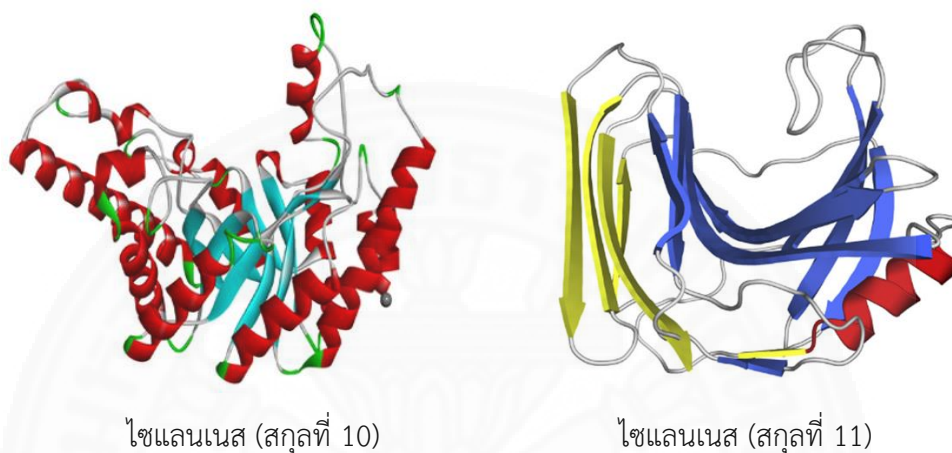
เนื่องจากโครงสร้างของไซแลนมีความซับซ้อนมาก การย่อยไซแลนให้สมบูรณ์จึงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซลานโนไลติกเอนไซม์ เช่น เอนโดไซแลนเนส (endoxylanase) บีต้าไซโลซิเดส (β -xylosidase) เอสเทอเรส (esterase) แอลฟาอะราบินโนซิเดส (α -arabinosidase) และแอลฟากลูคิวโรนิเดส (α -glucuronidase)

หลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกชนิดของไซแลนเนสมี 2 หลักเกณฑ์ คือ 1. กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ 2. ขนาดน้ำหนักโมเลกุลและค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point: pI)

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถแบ่งไซแลนเนสได้เป็น 2 ชนิด คือเอนโดไซแลนเนส (ชื่อตามระบบคือ β -1,4-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการย่อยแบบสุ่มในโครงสร้างหลักของไซแลนได้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ของน้ำตาลไซโลสและเอกโซไซแลนเนส หรือบีต้า-ไซโลซิเดส (ชื่อตามระบบคือ β -1,4-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37) ซึ่งจะย่อยโอลิโกแซ็กคาไรด์จากปลายนอนรีดิวิซ์ (non-reducing) ให้เป็นน้ำตาลไซโลส (เปี่ยมสุข, 2551)

ในขณะที่เมื่อแบ่งไซแลนเนสตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลและค่าไอโซอิเล็กทริก แบ่งไซแลนเนสได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ ไซแลนเนสในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส (glycosyl hydrolase: GH) สกุลที่ 10 และ

11 ซึ่งไซแลนเนส สกุลที่ 10 มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตันและมีค่าไอโซอิเล็กทริกต่ำ มีลักษณะโครงสร้างเป็น $(\beta/\alpha)_8$ barrel รูปร่างคล้ายถ้วย และมีโครงสร้างที่ยืดหยุ่น สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายมากกว่าไซแลนเนสสกุลที่ 11 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 30 กิโลดาลตันและมีค่าไอโซอิเล็กทริกสูง มีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นแผ่นพับบีตา ดังภาพที่ 7 (เปี่ยมสุข, 2551)



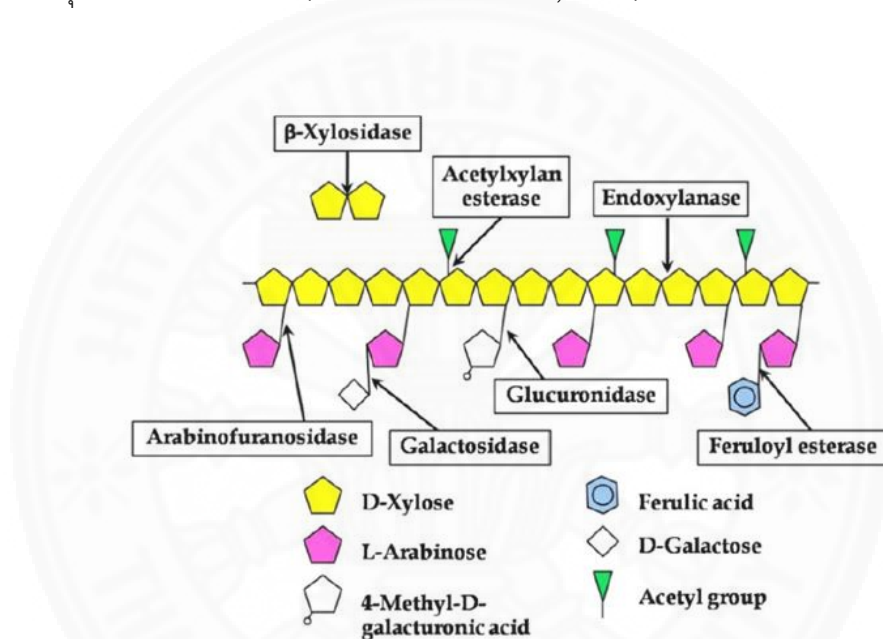
ภาพที่ 7 โครงสร้างตติยภูมิของไซแลนเนสในไกลโคซิลไฮโดรเลสสกุลที่ 10 และ 11
(ที่มา: Bhardwaj *et al.* (1997) ; Paës *et al.* (2012))

อย่างไรก็ตามการย่อยสลายโครงสร้างของสารประกอบไซแลนให้สมบูรณ์ นอกจากจะใช้เอนโดไซแลนเนสหรือเอกไซไซแลนเนสแล้ว จำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน เช่น แอลฟาอะราบินอซิเดส (α -arabinosidase) แอลฟากลูคูโรนิเดส (α -glucuronidase) เอสเทอเรส (esterase) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างสารประกอบไซแลนทั้งหลายมีรูปแบบการทำงานร่วมกันที่ส่งเสริมกัน (synergistic action) ดังภาพที่ 8

แอลฟาอะราบินอซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายปลายอนรีดิวิซ์ α -L-arabinofuranosyl group ของ อะราบินแนน (arabinan) อะราบินโนไซแลน (arabinoxylan) และอะราบินโนกาแลคแทน (arabinogalactan) โดยไซแลนเนสจะย่อยสารประกอบไซแลนภายในสายหลักแบบสุ่มก่อน จากนั้น แอลฟาอะราบินอซิเดสจึงเข้าย่อยสายกิ่งที่ตำแหน่งพันธะ 1,3 โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ ไซโลส ไซโลไบโอส และอะราบินโนส

แอลฟากลูคูโรนิเดส เอนไซม์ชนิดนี้จะตัดปลาย 4-o-methylglucuronic acid ออกจากไซโลโอลิโกเมอร์ (xylooligomer) หลังจากนั้นบีต้าไซโลซิเดส (β -xylosidase) จะทำหน้าที่ย่อยไซโลโอลิโกเมอร์ที่ถูกตัดสายกิ่งออกแล้วได้เป็นไซโลส

เอสเทอเรส (esterase) จะทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะระหว่าง O-acetyl residue ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในสายของ acetylxylan โดยเมื่อเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานร่วมกับไซแลนเนสและบีต้าไซโลซิเดสจะประสิทธิภาพในการย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนมากขึ้น ทำให้ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายเพิ่มมากยิ่งขึ้น (Puls and Poutanen, 1989)



ภาพที่ 8 กลไกการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก (xylanolytic enzymes)

(ที่มา: Ratanakhanokchai *et al.* (2013))

2.3 แหล่งของไซแลนเนส

ไซแลนเนสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น สาหร่ายทะเล โปรโตซัว ครัสเตเชียน แมลง หอยทาก และจุลินทรีย์ต่าง ๆ (Polizeli *et al.*, 2005) โดยเฉพาะในจุลินทรีย์จะสามารถผลิตไซแลนเนสได้ในปริมาณมากและสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่หลากหลาย ซึ่งสมบัติของไซแลนเนสจะแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งผลิตเอนไซม์

การศึกษาของ Jalal *et al.* (2009) ได้โคลนยีนไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ R5 แล้วนำไปแสดงออกใน *E. coli* BL21 พบว่าไซแลนเนสชนิดนี้ประกอบด้วย 213 กรดอะมิโน และพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 23 กิโลดาลตัน และไซแลนเนสชนิดนี้เมื่อทำให้บริสุทธิ์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6 และ Qu and Shao. (2011) ได้โคลนยีน *xynA* จาก *Bacillus pumilus* ARA โดยนำไปแสดงออกใน *E. coli* โดยพบว่ายีน *xynA* มีขนาด 687 คู่เบส และโปรตีนมีขนาด 23 กิโลดาลตัน เมื่อรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนิกเกิลโครมาโตกราฟี (Nikle Affinity chromatography) และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 6.6 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Ko *et al.* (2010) ผลิตไซแลนเนสจาก *Paenibacillus campinasensis* BL11 โดยการโคลนยีน พบว่ายีนไซแลนเนสมีขนาด 1131 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเมื่อแปลรหัสจะได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 337 กรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณเท่ากับ 41 กิโลดาลตัน ทำงานได้ดีที่ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 7

นอกจากนี้ยังมีไซแลนเนสจากที่ผลิตได้จากแอคติโนมัยซิต ดังงานวิจัยของ Pearsai *et al.* (2014) ศึกษาไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces mexicanus* 901 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำไซแลนเนสบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเรชัน ซึ่งพบว่าไซแลนเนสชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 3-6 นอกจากนี้ Li *et al.* (2008) ศึกษาการแสดงออกของยีนไซแลนเนสจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S9 โดยนำไปโคลนเข้าสู่ *E. coli* และพบว่า ไซแลนเนสจากแบคทีเรียชนิดนี้ มีลักษณะเด่นคือสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 80 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วงตั้งแต่ 60-80 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ยังมีการผลิตไซแลนเนสจากเชื้อราดังงานวิจัยของ Liu *et al.* (2006) ศึกษารีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสจาก *Aspergillus niger* ซึ่งพบว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5 และสามารถย่อยเป็รชู้ดไซแลน และรำข้าวได้ดี นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Zhou *et al.* (2008) ได้โคลนยีนและศึกษาสมบัติของไซแลนเนสจากเชื้อรา *Aspergillus usarii* พบว่าไซแลนเนสชนิดนี้ ทำงานได้เหมาะสมที่พีเอช 4.2 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่จะทำงานไม่ได้ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ซึ่งจุดเด่นของเอนไซม์ตัวนี้ คือจะทำงานได้ดีในสภาวะกรด ดังนั้นไซแลนเนสชนิดนี้ จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมที่มีสภาวะเป็นกรด

จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นพบว่าไซแลนเนสที่มีแหล่งที่มาต่างกัน มีสมบัติที่แตกต่างกัน จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสมและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2.4 การประยุกต์ใช้ไซแลนเนส

ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยไซแลนของผนังเซลล์พืช ปัจจุบันมีการนำไซแลนเนสมาใช้ในอุตสาหกรรมกันอย่างแพร่หลายเช่น

อุตสาหกรรมกระดาษ ในปัจจุบันขั้นตอนการฟอกจางสีของกระดาษมีการใช้คลอรีนไดออกไซด์เพื่อกำจัดลิกนินเพื่อให้กระดาษขาวและมีความเหนียว แต่การใช้คลอรีนทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการนำไซแลนเนสมาช่วยในการย่อยไซแลน ทำให้คลอรีนสามารถเข้าจับกับลิกนินได้ง่ายมากขึ้น จึงเป็นการลดปริมาณการใช้คลอรีนโดยที่ไซแลนเนสจะไม่ทำให้คุณภาพของกระดาษเสียไป (Saleem *et al.*, 2009)

อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ พบว่าอาหารสัตว์ผลิตมาจากธัญพืชซึ่งมีส่วนประกอบของไซแลนค่อนข้างมาก เมื่อสัตว์รับประทานเข้าไปจะทำให้ย่อยได้ยาก จึงได้มีการนำไซแลนเนสมาผสมในอาหารสัตว์เพื่อช่วยในการย่อยอาหารของสัตว์ และยังทำให้สัตว์สามารถดูดซึมอาหารได้ดีขึ้นและมีน้ำหนักตัวมากขึ้นด้วย (เปี่ยมสุข, 2551)

อุตสาหกรรมผลิตขนมปัง เนื่องจากขนมปังผลิตจากพวกธัญพืชซึ่งมีปริมาณเส้นใยสูง ทำให้ขนมปังมีความแข็งกระด้าง แต่เมื่อมีการนำไซแลนเนสเข้ามาช่วยย่อยไซแลน ส่งผลให้ขนมปังมีความอ่อนนุ่มรับประทานมากขึ้นและยังได้ปริมาณขนมปังมากขึ้นด้วย (เปี่ยมสุข, 2551)

อุตสาหกรรมผลิตน้ำผลไม้โดยไซแลนเนสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดน้ำผลไม้ออกจากกากใย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพในการกรองทำให้น้ำผลไม้มีความใสมากขึ้น มีกลิ่นหอมมากขึ้น (เปี่ยมสุข, 2551)

อุตสาหกรรมผลิตไบโอเอทานอลจากเซลลูโลส กระบวนการย่อยเซลลูโลสมักถูกกีดขวางด้วยโครงสร้างของไซแลน และลิกนิน ทำให้กระบวนการย่อยด้วยเซลลูเลสเพื่อให้ได้น้ำตาลที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ไบโอเอทานอลต่ำ ดังนั้นจึงได้นำไซแลนเนสเข้าไปช่วยในขั้นตอนการปรับสภาพขั้นต้นเพื่อให้ได้ปริมาณไบโอเอทานอลเพิ่มมากขึ้น (ภูมิหทัย และประมุข, 2554)

การผลิตสารพรีไบโอติกส์ (prebiotics) อุตสาหกรรมประเภทนี้ใช้ไซแลนเนสย่อยไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อให้ได้ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งจัดเป็นน้ำตาลโอลิโกเมอร์ของไซโลส ที่มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกส์ สามารถทำงานร่วมกับจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ (probiotics) ได้ดี โดยเฉพาะกับบิฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria) ซึ่งสามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโตของบิฟิโดแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ได้ จึงถูกนำมาใช้ในการทำเครื่องดื่มพรีไบโอติกส์ (มณชัย, 2556)

2.5 วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในประเทศไทยมีมากมาย เช่น กากกาแฟ กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด (Chantorn *et al.*, 2014) วัสดุเหลือใช้ทางชีวภาพส่วนใหญ่มักเป็นสารพวกกลีโคเซลลูโลส ดังตารางที่ 1 โดยวัสดุเหลือใช้ทางชีวภาพเมื่อถูกย่อยสลายสมบูรณ์จะให้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ต่อไปนี้มากมาย

ตารางที่ 1 ปริมาณองค์ประกอบของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (% น้ำหนักแห้ง)

สารตั้งต้น	เซลลูโลส(%)	เฮมิเซลลูโลส(%)	ลิกนิน(%)	เถ้า(%)
ชานอ้อย	33	30	29	4
ฟางข้าวบาร์เลย์	40	20	15	11
ต้นเบิช	40	33	21	4
ซังข้าวโพด	42	39	14	2
เปลือกข้าวโพด	43.8	39.6	14.3	1.6
ฟางข้าวโอ๊ต	41	16	11	12
สน	41	10	27	8
ฟางข้าว	32	24	13	12
แกลบ	35	15	19	20
ฟางข้าวสาลี	30	24	18	10
กากกาแฟ	35	46	19	-

ที่มา: Barber and Beredito de Barder. (1976)

โดยงานวิจัยนี้ใช้กากกาแฟ กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด ดังนั้น จะเห็นได้ว่าสารประกอบในพืชต่างชนิดกันก็ประกอบด้วยปริมาณสารที่แตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้อินทรีย์หลายชนิดร่วมกัน งานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบประสิทธิภาพของไซแลนเนสต่อการย่อย วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในระดับอุตสาหกรรม



บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเติมกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอัตราส่วนระหว่างแบคทีเรียต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเก็บรักษาเซลล์ดังกล่าวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 (สุขานนท์ และฐานปน, 2553)

รีคอมบิแนนท์ไซเลนเนสนี้เป็นการนำ *Pseudomonas boreopolis* ไอโซเลท B5 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อนในจังหวัดระนอง (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.จิระวรรณ อภิรักษากร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ซึ่งถูกเตรียมไว้ในอาหารแข็ง จากนั้นจึงนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดจีโนมส์ดีเอ็นเอโดยประยุกต์วิธีการจากกิตติพัฒน์ (2549) จากนั้นนำจีโนมส์ดีเอ็นเอของ *Pseudomonas boreopolis* ไอโซเลท B5 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ Bxyn-F และ Bxyn-R ดังตารางที่ 2 เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอซึ่งผลผลิตภัณฑของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขนาด 639 คู่เบส

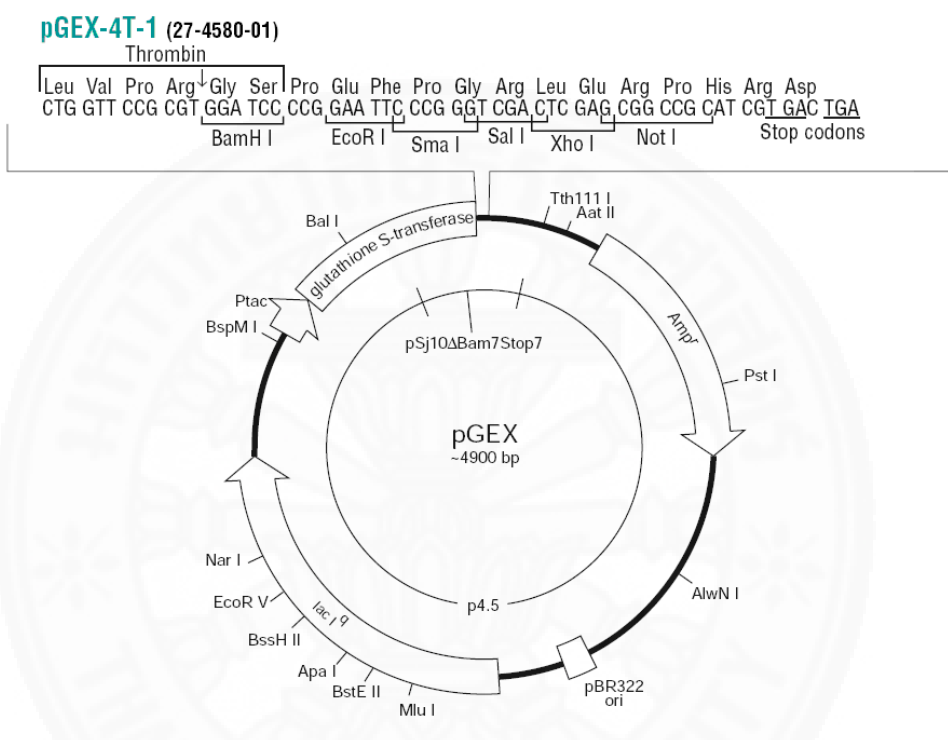
ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์และสมบัติบางประการของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	Tm (องศาเซลเซียส)
Bxyn-F	GCGGATCC*TTTAAGTTTAAAAAGAAATTTCTTAGTTGGA	59.1
Bxyn-R	GCGGCCGC**TTACCACACTGTTACGTTAGAACTTCCACT	67.7

หมายเหตุ * แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI

** แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Not*I

จากนั้นนำเวกเตอร์ pGEX-4T-1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 4,900 คู่เบส ดังภาพที่ 9 และชิ้นยีนไซแลนเนสที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สมาตต์ด้วยเอนไซม์ *NotI* และ *BamHI* หลังจากนั้นนำมาเชื่อมเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase เพื่อผลิตเวกเตอร์สายผสมและนำไปฟิสิกส์คอมบิแนนท์ไซแลนเนสต่อไป



ภาพที่ 9 แผนภาพเวกเตอร์ pGEX-4T-1

(ที่มา: <http://www.suggestkeyword.com/cGdleCBwbGFzbWlk/>)

3.2 การเพิ่มปริมาณ pGEX-4T-1-xynB5

3.2.1 การเตรียมคอมพีเทนเซลล์

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และ BL21 (DE3) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB โดยใช้เทคนิค Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปริมาตร 400 ไมโครลิตร

มาถ่ายลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 40 มิลลิลิตร หรือในอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เช้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งมีการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.6 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่เย็นจัด ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนอย่างเบา ๆ ด้วยส่วนผสมของแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cells) ที่ได้ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 200 ไมโครลิตร

3.2.2 การถ่ายเวกเตอร์ pGEX-4T-1-xynB5 ลงสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α

เติม pGEX-4T-1-xynB5 20 นาโนกรัมโดยประมาณ ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่เป็นคอมพีเทนต์เซลล์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เช้าเบา ๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำมาแช่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายหลอดลงมาใส่ถังน้ำแข็งทันที บ่มให้เซลล์เย็น 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ลงไป 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เช้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการ spread plate แบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (กิตติพัฒน์, 2549)

3.2.3 การสกัด pGEX-4T-1-xynB5 จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มี pGEX-4T-1-xynB5 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline denaturation (Birnboim and Doly, 1979) โดยเปิดแบคทีเรียลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วเทอาหารเหลวทิ้งให้หมด จากนั้นเติม solution I (ภาคผนวก ก) ที่เย็นจัดลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเปิดขึ้นลงหรือเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารจนไม่มีตะกอนเซลล์ติดที่ก้นหลอด เติม solution II (ภาคผนวก ก)

ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด พลิกหลอดไปมา ในขั้นตอนนี้ห้ามเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร แล้วจึงเติม solution III (ภาคผนวก ก) ลงไป 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา ประมาณ 10 วินาที แล้วนำไปปั่นในน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสแล้วถ่ายลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนขาวติดมา และเติมฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์(25:24:1) ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนบนใสหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์(24:1) ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนบนใสหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลลงไป 1 เท่า ผสมสารละลายโดยการพลิกหลอดไปมาแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทไอโซโพรพานอลทิ้งโดยระวังอย่าให้ตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอออกไปด้วย ล้างตะกอนพลาสมิดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทหรือปิเปตเอทานอลทิ้งให้หมด เปิดฝาหลอดตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ตะกอนพลาสมิดแห้ง แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วย TE buffer pH8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเติม DNase-free RNase ลงไป 3 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันและเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.4 การถ่ายเวกเตอร์ pGEX-4T-1-xynB5 ลงสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

เติม pGEX-4T-1-xynB5 20 นาโนกรัมโดยประมาณ ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีคอมพิเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปปั่นในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำมาแช่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายหลอดมาแช่ในถังน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ลงไป 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเพลทแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (กิตติพัฒน์, 2549)

3.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

3.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มี pGEX-4T-1-xynB5 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วปิเปตเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานประมาณ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5-0.6 จึงชักนำเซลล์ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่สภาวะดังนี้ เติม Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, และ 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 30, และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4, 6, 12, และ 24 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกจากส่วนใส ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกเก็บส่วนใสและตะกอนเซลล์ออกจากกันเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มี pGEX-4T-1-xynB5 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วปิเปตเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติมแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานประมาณ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5-0.6 จึงชักนำเซลล์ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่สภาวะดังนี้ เติม Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกจากส่วนใส ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกเก็บส่วนใสและตะกอนเซลล์ออกจากกันเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.3 การสกัดรีคอมบิแนนท์ไซเลนเนส

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.1 มาละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่เย็น ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้คลื่นเสียง ความถี่สูง (ultrasonication) รุ่น sonics vibracell VCX505 ที่ระดับพลังงานของคลื่นเสียง (amplitude) 60 เปอร์เซ็นต์ ช่วงเวลาปล่อยคลื่นเสียง (pulse on) 8 วินาที ช่วงเวลาหยุด 8 วินาที (pulse off) เป็นเวลา 4 นาที โดยหลอดทดลองจะต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลาที่เครื่องทำงาน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกส่วนใสเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลในขั้นตอนต่อไป

3.4 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE)

เตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยการนำส่วนใสและตะกอนเซลล์ที่ถูกปั่นแยกออกจากกัน มาผสมกับ 5X sample buffer (ภาคผนวก ก) แล้วต้มสารละลายส่วนใสและสารละลายตะกอนเซลล์ในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที สำหรับหลอดที่มีตะกอนเซลล์ ให้นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอย่างแรงก่อน จากนั้น นำสารละลายโปรตีนทั้ง 2 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึง หยอดสารละลายโปรตีนใน พอลิอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยจ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำเจลไปนํ้าย้อมด้วยสารละลาย coomassie staining (ภาคผนวก ก) เป็นเวลาข้ามคืนและทำการล้างสีย้อมเจลออกด้วยสารละลาย destaining (ภาคผนวก ก) จนกระทั่งเจลใส แล้ววิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบขนาดและความเข้มข้นของแถบโปรตีนกับแถบ โปรตีนมาตรฐาน

3.5 วิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซเลนเนส

วิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซเลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซเลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเติมสารละลายเอนไซม์เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ลงใน 0.5 มิลลิลิตรที่มีเบิร์ชวู้ดไซเลน (birchwood xylan) 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรที่ละลายอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid, DNS (Miller and Gail, 1959) แล้วคำนวณหากิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซเลนเนส โดยกำหนดให้

1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นแล้วให้น้ำตาลไซโลสเป็น 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3.6 การทำให้รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสบริสุทธิ์ด้วยวิธี GST-tag affinity chromatography

นำส่วนใสที่ได้จากขั้นตอน 3.3.3 มากรองด้วยตัวกรอง (filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เตรียมคอลัมน์ GSTrap-FF ให้พร้อมด้วย binding buffer (ภาคผนวก ก) โดยผ่านคอลัมน์ในปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้นนำส่วนใสที่กรองแล้วผ่านลงไปในคอลัมน์ GSTrap-FF โดยใช้ความเร็ว 1-5 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสจับกับกลูตาไธโอน (glutathione) โดยทำ 2 ครั้ง แล้วล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ โดยใช้ความเร็ว 1-5 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่จับกับกลูตาไธโอนออก จากนั้นชะรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยความเร็ว 1-5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยแบ่งเก็บใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร จนครบแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE

3.7 การศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

3.7.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

3.7.1.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

วิเคราะห์หากิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากข้อ 3.3.3 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS โดยแสดงผลในรูปของกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (relative activity) โดยกำหนดกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์เป็นกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุด

3.7.1.2 การศึกษาความคงตัวของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบ อุณหภูมิต่าง ๆ (thermostability)

วิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบโดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 และ 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผสมกับ ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ พีเอช 8.0 ที่มีเบียร์ชวูดไซแลน 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 3.7.1.1) นาน 15 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS จากนั้นคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปของ กิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ (residual activity) โดยกำหนดให้กิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์เป็นกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงที่สุด

3.7.2 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

3.7.2.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อการทำงานของ รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

วิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากข้อ 3.3.2 โดยใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ ที่มีค่า พีเอชต่าง ๆ ดังนี้ ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate-phosphate buffer) ที่มีค่าพีเอช 3.0-6.0 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 และไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (glycine-NaOH buffer) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0, 9.0 และ 10.0 ที่มีเบียร์ชวูดไซแลน 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วบ่มสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.7.1.1) นาน 15 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS จากนั้นคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์ในรูปของกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ โดยกำหนดกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์เป็นกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุด

3.8 การศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบในการย่อย วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

3.8.1 การเตรียมวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 5 ชนิด คือ กากกาแฟ กาก ถั่วเหลือง กากมะพร้าว ขานอ้อย และ ชังข้าวโพด มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 3 วัน จากนั้นทำการแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อน (sieve plate) ขนาด 30 mesh เก็บตัวอย่าง วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดปริมาณ 100 กรัม และเก็บไว้ที่ไว้ในอุณหภูมิห้อง

3.8.2 นำรีคอมบีแนนท์ไซแลนเนสที่มีกิจกรรมของไซแลนเนสเริ่มต้นเท่ากับ 93.136 ยูนิต์ ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ผสมกับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ กากกาแฟ กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายอยู่ใน ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 ปริมาตร 70 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 360 นาที โดยการแบ่งทดสอบตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุก เวลาต่าง ๆ ดังนี้ 0, 30, 60, 90, 120, 240 และ 360 นาที เมื่อครบเวลาต่าง ๆ แล้ววิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS เทียบกับชุดควบคุม (ภาคผนวก ข) โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 1

สมการที่ 1

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}}{\text{ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส}}$$

(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

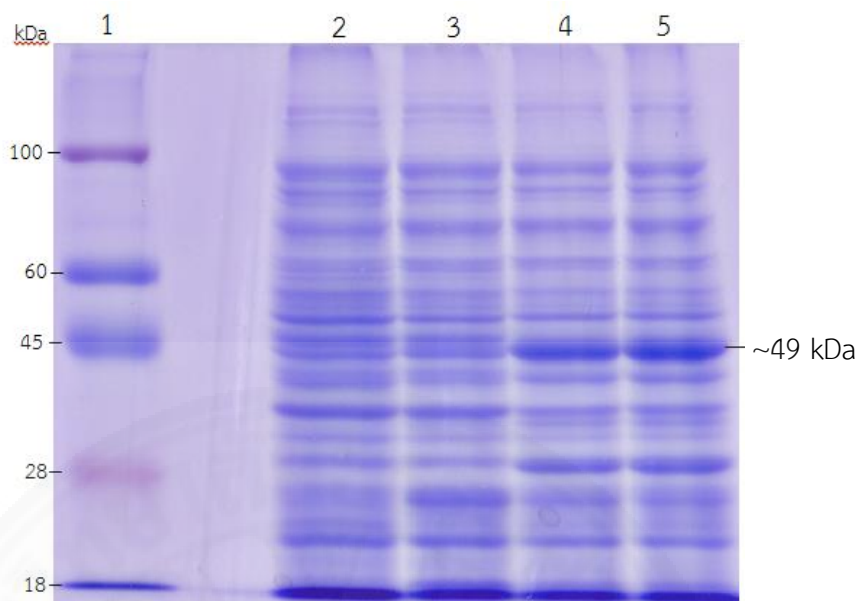
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

4.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

ผลการผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสจาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 โดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.1, 0.5, และ 1 มิลลิโมลาร์ เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดังภาพที่ 10 พบว่า whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ไม่ถูกชักนำด้วย IPTG (ช่องที่ 2) และ whole cell lysate จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (ช่องที่ 3) ไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่เด่นชัดที่ขนาดประมาณ 49 กิโลดาลตัน ในขณะที่ whole cell lysate จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ช่องที่ 4) และ whole cell lysate จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ช่องที่ 5) ปรากฏแถบโปรตีนที่เด่นชัดที่ขนาดประมาณ 49 กิโลดาลตันเช่นเดียวกัน เมื่อเทียบกับ whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ไม่ถูกชักนำด้วย IPTG (ช่องที่ 2) โดยโปรตีนที่ได้มีขนาด 49 กิโลดาลตันตรงกับค่าที่ได้จากการคำนวณ คือ ขนาดของ GST-tag 26 กิโลดาลตัน รวมกับไซแลนเนส 23 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yoon. (2009) ที่ได้โคลนยีนไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* AMX-4 โดยไซแลนเนสที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 23 กิโลดาลตันเช่นเดียวกับ *Bacillus subtilis* XP10 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไซแลนเนสด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 23 กิโลดาลตัน (Sanaa *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยของ Ratanakhanokchai *et al.* (1999) พบไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. Strain K-1 มีน้ำหนักโมเลกุลของไซแลนเนสเท่ากับ 23 กิโลดาลตันเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 10 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ช่องที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5

ช่องที่ 3 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

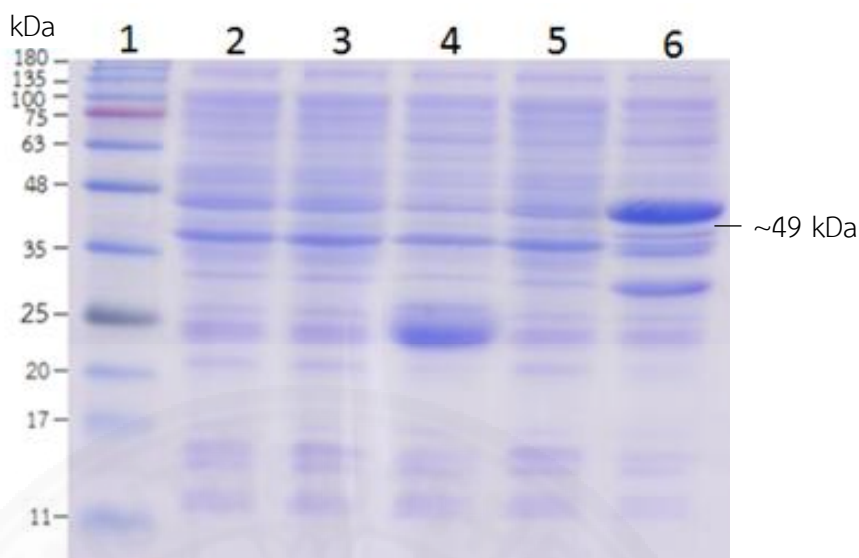
ช่องที่ 4 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

ช่องที่ 5 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

4.1.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

ผลการผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสจาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 โดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดังภาพที่ 11 ตัว

ควบคุม ได้แก่ whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ไม่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 (ช่องที่ 2), whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1 ไม่ถูกชักนำด้วย IPTG (ช่องที่ 3), whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1 ถูกชักนำด้วย IPTG (ช่องที่ 4) และ whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ไม่ถูกชักนำด้วย IPTG (ช่องที่ 5) โดยพบว่า whole cell lysate จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG (ช่องที่ 6) ปรากฏแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 49 กิโลดาลตันอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม



ภาพที่ 11 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ช่องที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ช่องที่ 3 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1

ช่องที่ 4 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

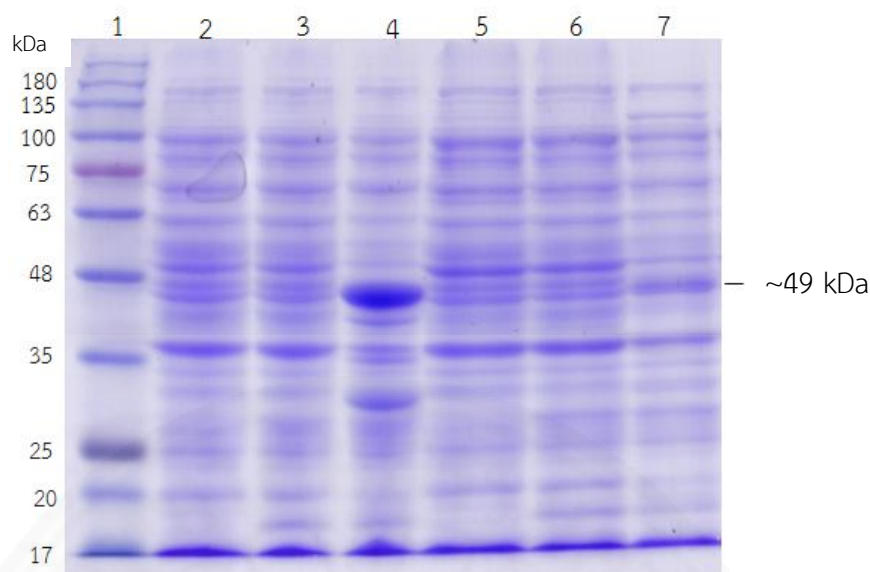
ช่องที่ 5 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5

ช่องที่ 6 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

4.1.2 การสกัดรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

ผลจากการสกัดรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) แล้ววิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดลองดังภาพที่ 12 โดยจะสังเกตในช่องที่ 7 คือ soluble fraction ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 และถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่ได้ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องใช้คลื่นเสียงความถี่สูง พบว่ามีแถบ

โปรตีนปรากฏอยู่ที่ขนาดประมาณ 49 กิโลดาลตัน โดยคาดว่าจะเป็ขนาดเป้าหมายของรีคอมบิแนนท์ไฮแลนเนส ซึ่งอยู่ในตำแหน่งตรงกันกับ whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนถูกนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ช่องที่ 4) จากผลการสกัดรีคอมบิแนนท์ไฮแลนเนสนี้จะพบว่าสามารถสกัดรีคอมบิแนนท์ไฮแลนเนสจากส่วน soluble fraction ออกมาได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG (ช่องที่ 4) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ารีคอมบิแนนท์ไฮแลนเนสบางส่วนนั้นอยู่ในส่วนของ inclusion body โดยอาจเป็นผลมาจากการผลิตโปรตีนเป็นไปอย่างรวดเร็วและผลิตในปริมาณมาก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yilin *et al.* (2011) ที่นำยีนไฮแลนเนสจาก *Thermomyces lanuginosus* มาแสดงออกใน *E. coli* แล้วเกิด inclusion body เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 12 แสดงการทำให้เซลล์แตกโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication)

ช่องที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ช่องที่ 3 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5

ช่องที่ 4 : whole cell lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

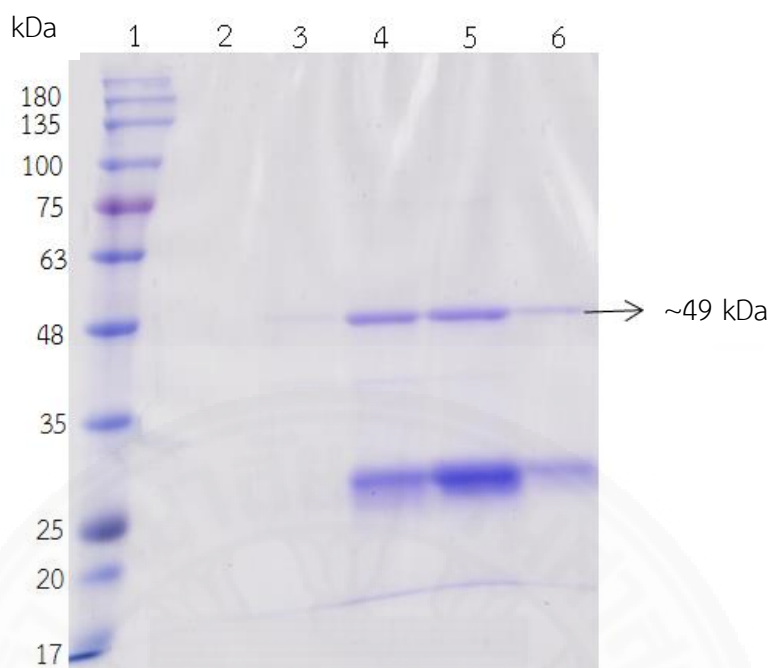
ช่องที่ 5 : soluble fraction ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication)

ช่องที่ 6 : soluble fraction ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication)

ช่องที่ 7 : soluble fraction ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1-xynB5 ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication)

4.2 การทำรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค GST-tag affinity chromatography

ผลจากการนำรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสมาผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค GST-tag affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์ GSTrap-FF แล้ววิเคราะห์ผลด้วยการทำเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดลองดังภาพที่ 13 พบว่าเมื่อทำการชะโปรตีนที่ต้องการออกจากคอลัมน์ด้วย glutathione ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปรากฏแถบโปรตีนขนาดที่คาดหวัง (49 กิโลดาลตัน) อย่างเด่นชัดในช่องที่ 4-6 ซึ่งก็คือโปรตีนที่ได้จากการชะใน fraction ที่ 3-5 ในขณะที่ fraction ที่ 1 และ 2 ไม่ปรากฏโปรตีนหรือปรากฏเพียงเล็กน้อยตามลำดับ แม้ว่าจากภาพที่ 15 จะปรากฏแถบโปรตีนในตำแหน่งประมาณ 49 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนคาดหวังแล้ว ยังปรากฏแถบโปรตีนในตำแหน่งขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน จึงคาดว่าเป็น GST-tag เนื่องจากสามารถยึดเกาะกับส่วนของคอลัมน์ได้ ในขณะที่งานวิจัยของ Li *et al.* (2009) ได้นำยีนจาก *Thermobifida fusca* YX ตัดและต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEX-6P-1 และนำมาแสดงออกใน *E. coli* BL21 (DE3) เช่นเดียวกัน แต่ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์นั้น เมื่อทำการชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกมาแล้วยังมีการตัด GST-tag ออกจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย ด้วยเหตุนี้เมื่อวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE เช่นเดียวกัน จึงทำให้ไม่ปรากฏแถบโปรตีนสองแถบดังผลการทดลองนี้ นอกจากนี้ยังมีการนำรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ปริมาณผลผลิต (Yield) และค่าการเพิ่มความบริสุทธิ์ (purified fold) โดยเทียบกับรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสสกัดหยาบซึ่งให้ผลดังตารางที่ 3



ภาพที่ 13 แสดงรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ช่องที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 : รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ fraction ที่ 1 ที่ถูกชะ (elution) ออกจากคอลัมน์ GSTtrap-FF

ช่องที่ 3 : รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ fraction ที่ 2 ที่ถูกชะ (elution) ออกจากคอลัมน์ GSTtrap-FF

ช่องที่ 4 : รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ fraction ที่ 3 ที่ถูกชะ (elution) ออกจากคอลัมน์ GSTtrap-FF

ช่องที่ 5 : รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ fraction ที่ 4 ที่ถูกชะ (elution) ออกจากคอลัมน์ GSTtrap-FF

ช่องที่ 6 : รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ fraction ที่ 5 ที่ถูกชะ (elution) ออกจากคอลัมน์ GSTtrap-FF

ตารางที่ 3 ตารางการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

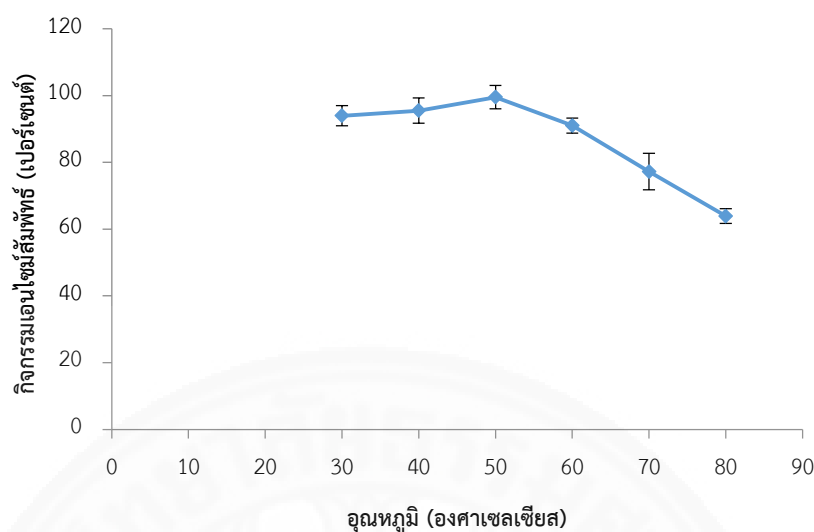
โปรตีน	ปริมาณ โปรตีน ทั้งหมด (มก./มล.)	กิจกรรม เอนไซม์ (ยูนิต/ มล.)	กิจกรรมเอนไซม์ จำเพาะ (ยูนิต/ มก.)	Yield (%)	Purified fold
รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส	1070.83	93.14	86.98	100	1
รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์	266.04	35.58	133.74	38.20	1.54

4.3 การศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

4.3.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

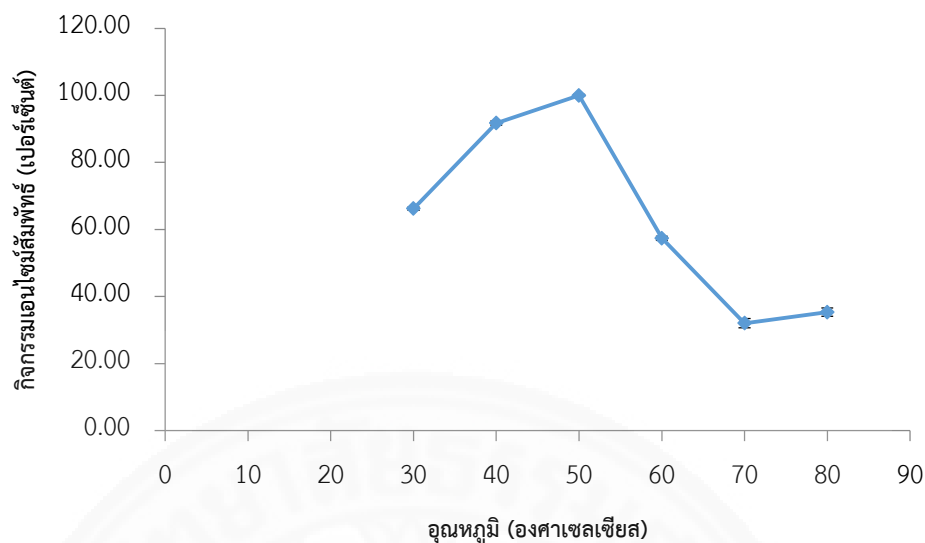
4.3.1.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ผลการทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่ทำให้รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด โดยตรวจสอบด้วยวิธี DNS ซึ่งแสดงผลดังภาพที่ 14 พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดและกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 50 องศาเซลเซียส (427.78 ± 3.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ในขณะเดียวกันพบว่าที่อุณหภูมิ 30, 40, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสนั้นเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ โดยให้ค่าของกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 403.83 ± 2.99 , 410.49 ± 3.80 , 391.23 ± 2.26 , 331.98 ± 5.46 และ 274.69 ± 2.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) จากผลที่ได้นี้พบว่ารีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงและอยู่ในช่วงกว้าง คือ 30-60 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบ

ผลการทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธี DNS ซึ่งแสดงผลดังภาพที่ 15 โดยพบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดและ กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 50 องศาเซลเซียส (26.89 ± 0.296 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ส่วนที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 60 องศาเซลเซียสนั้นรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสามารถทำงานได้ โดยให้ค่าของกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 17.80 ± 0.48 , 24.67 ± 0.59 และ 15.43 ± 0.59 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แต่ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียสนั้น พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 8.62 ± 1.41 และ 9.51 ± 1.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)



ภาพที่ 15 ผลอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ผลการทดสอบข้างต้นพบว่าทั้งรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 50 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Meeta *et al.* (2013) รายงานว่าได้ศึกษาไชลเลนเนสจาก *Paenibacillus macquariensis* ที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่เดียวกันยังพบว่าไชลเลนเนสที่ได้จาก *Bacillus* sp. YJ6 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 50 องศาเซลเซียสเช่นกัน (Yin *et al.*, 2010)

4.3.1.2 การศึกษาความคงตัวของรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสสกัดหยาบที่อุณหภูมิต่าง ๆ (thermostability)

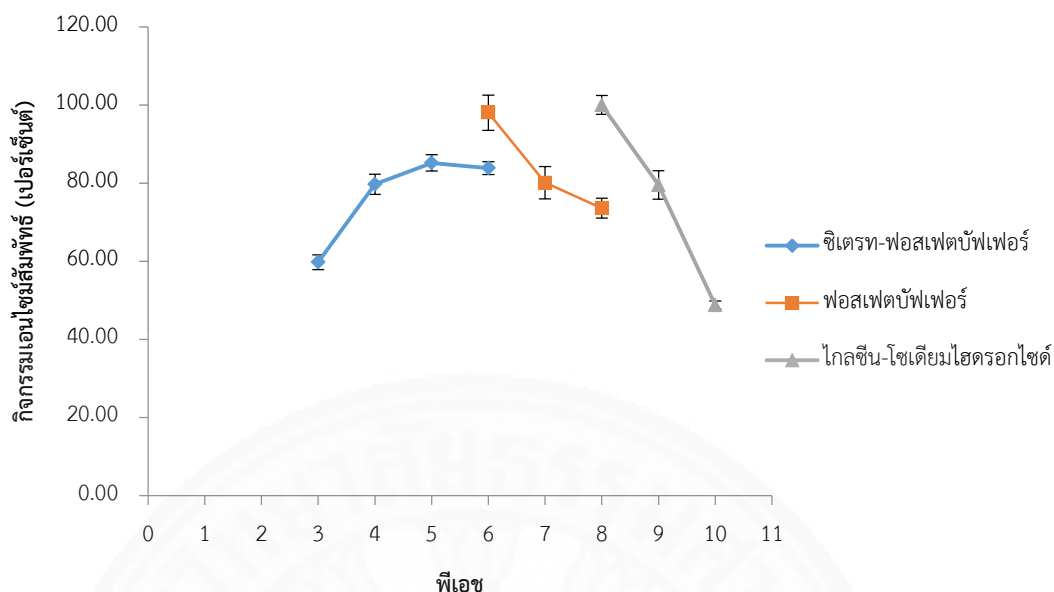
ผลการศึกษาอุณหภูมิที่ทำให้รีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสสกัดหยาบมีความมีความคงตัวมากที่สุด ทดสอบโดยนำรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็น 5 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธี DNS พบว่าในสภาวะทดสอบบ่มรีคอมบิแนนท์เอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส รีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสมีความคงตัวมากที่สุดคือ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไชลเลนเนสสกัดหยาบให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือเท่ากับ 49.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al.* (2007) รายงานว่าไชลเลนเนสที่ผลิตจาก *Lentinus edodes* M290 นั้นมีความคงตัวที่

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ 93 เปอร์เซ็นต์และยังพบไซแลนเนส 2 ชนิดที่ผลิตจาก *Trichoderma inhamatum* มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือเท่ากับ 71 และ 77.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Silva *et al.*, 2015) ในขณะที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือลดลงอย่างมากเมื่อบ่มนาน 1 และ 5 ชั่วโมง

4.3.2 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส

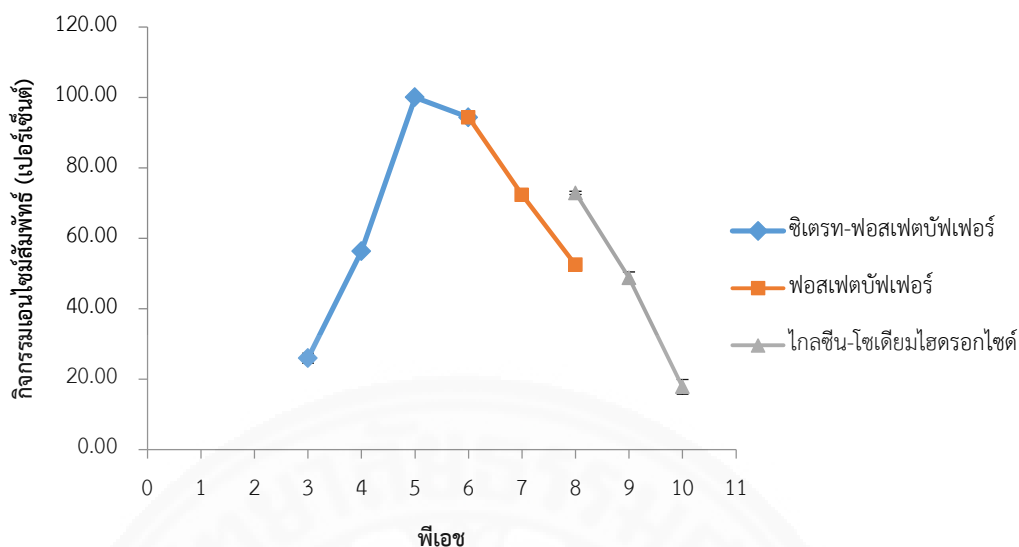
4.3.2.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ผลการทดสอบหาพีเอชที่ทำให้รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด โดยทดสอบที่พีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธี DNS แสดงผลดังภาพที่ 16 โดยพบว่าพีเอช 3.0-6.0 ที่ใช้ไซเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์นั้นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 62.77 ± 1.88 , 83.70 ± 2.57 , 89.43 ± 2.08 และ 88.05 ± 1.63 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) สำหรับพีเอช 6.0-8.0 ที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 102.91 ± 4.51 , 84.15 ± 4.15 และ 77.28 ± 2.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยพบว่าที่พีเอช 6.0 นั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ถึง 98.02 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เริ่มลดลงตามค่าพีเอชที่เพิ่มมากขึ้น สำหรับพีเอช 8.0-10.0 ซึ่งใช้ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ พบว่าที่พีเอช 8.0 ของไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ เป็นพีเอชที่ทำให้รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดและมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (104.96 ± 2.41 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่พีเอช 9.0 และ 10.0 นั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ลดลงตามค่า พีเอชที่เพิ่มมากขึ้น (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 83.51 ± 3.66 และ 57.26 ± 1.04 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ) จากข้อมูลข้างต้นมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shrinivas *et al.* (2010) โดยได้รายงานว่า ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. JB 99 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ พีเอช 8 เช่นเดียวกัน และยังพบว่า *Bacillus* sp. NTU-06 ทำงานได้ดีที่พีเอช 8 เช่นกัน (Wang *et al.*, 2010)



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบ

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยทดสอบพีเอชตั้งแต่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธี DNS ซึ่งแสดงผลดังภาพ 17 โดยเมื่อใช้ซิเตรท-ฟอสเฟตแบคทีเรีย พีเอช 3.0-6.0 จะพบว่าที่พีเอช 3 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พีเอช 4.0-6.0 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยที่พีเอช 5.0 นั้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์สูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ (34.81 ± 0.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ส่วน พีเอช 6.0-8.0 เมื่อใช้ฟอสเฟตแบคทีเรีย พบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด และที่พีเอช 6.0 ยังให้กิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์เท่ากันคือ 94.33 เปอร์เซ็นต์ ในทั้งสองแบคทีเรียอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jakkapan *et al.* (2010) รายงานว่าไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* GN156 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ พีเอช 5 เช่นกัน



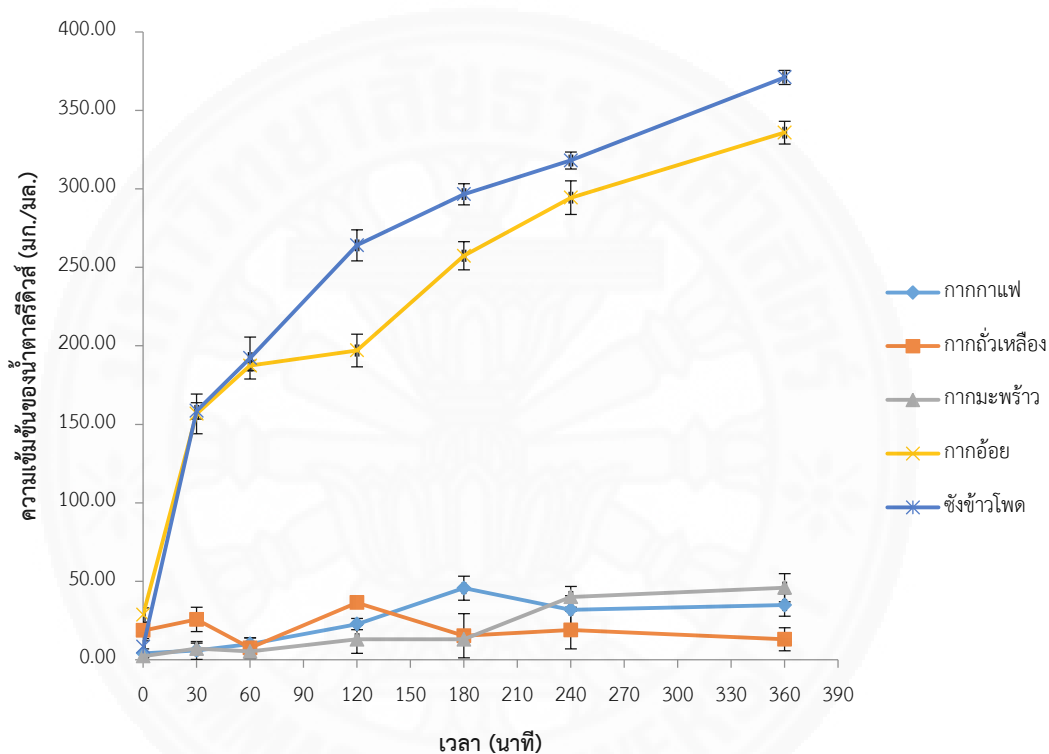
ภาพที่ 17 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจะพบว่ารีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสทั้งสองชนิดมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสารละลายที่เอนไซม์ละลายอยู่ทั้งสองชนิดนั้นต่างกันคือ รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ในขณะที่ รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้นละลายอยู่ในสารละลายของ elution buffer พีเอช 8

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิด ที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 240 และ 360 นาที แสดงผลดังภาพที่ 18 พบว่าเมื่อนำรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบย่อยชาญอ้อยและซังข้าวโพดนาน 360 นาทีให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 371.11 ± 4.44 และ 335.93 ± 7.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้รีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสย่อยกากกาแฟ กากถั่วเหลืองนาน 180 นาทีและกากมะพร้าวาน 360 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 45.56 ± 7.70 , 36.30 ± 0.64 และ

45.93±8.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้น พบว่ารีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยซังข้าวโพดมากที่สุด เนื่องจากซังข้าวโพดมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก (Yang *et al.*, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Damaso *et al.* (2004) ได้รายงานว่ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *Thermomyces lanuginosus* สามารถย่อยซังอ้อยและซังข้าวโพดได้ดี



ภาพที่ 18 ผลของการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่าง ๆ ด้วยรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติของไซแลนเนสจากเชื้อ *Pseudomonas boreopolis* ไอโซเลท B5 โดยทำการโคลนยีนไซแลนเนสลงสู่เวกเตอร์ pGEX-4T-1 (สุชานนท์และฐาปน, 2553) และนำไปแสดงออกใน *E. coli* BL21 (DE3) จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส โดยทำการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1, 0.5, และ 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งพบว่า การเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสโดยเหนี่ยวนำให้การแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์โปรตีนที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจผลด้วยการวิเคราะห์โดยการย้อมเจลโพลีอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ด้วยสารละลายของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งพบว่าขนาดของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสเป้าหมายมีขนาดประมาณ 49 กิโลดาลตัน (ซึ่งเป็นขนาดของ GST ประมาณ 26 กิโลดาลตัน รวมกับไซแลนเนสขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน) จากนั้นทำการสกัดรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสโดยการทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) ซึ่งพบว่าเมื่อสกัดโปรตีนออกมาพบว่ามีโปรตีนในตำแหน่ง 49 กิโลดาลตัน มีเพียงเล็กน้อย จึงคาดว่าน่าจะเกิดจากปัญหาที่เกิดจากเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ที่อาจจะไม่สามารถผ่านสายโปรตีนใหญ่เกิดเป็นโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนได้อย่างถูกต้อง ซึ่งอาจทำให้โปรตีนอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำรวมตัวกัน (inclusion body) (กิตติพัฒน์, 2556)

การทำรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค GST-tag affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์ GStap-FF แล้วชะโปรตีนที่ต้องการออกมาด้วย glutathione ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบโปรตีนที่ขนาด 49 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดที่คาดหวังสำหรับรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส จากนั้นศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสสกัดหยาบและที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในการย่อยเบียร์วู้ดไซแลน คือ 50 องศาเซลเซียส (427.78 ± 3.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 26.89 ± 0.296 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุด คือให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือเท่ากับ 49.92 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์

ไซแลนเนสสกัดหยาบและรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ คือ พีเอช 8.0 (104.96 ± 2.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และพีเอช 5.0 (34.81 ± 0.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

จากนั้นศึกษาการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (กากกาแฟ กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด) ด้วยรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนส พบว่ารีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสนี้มีความสามารถในการย่อยซังข้าวโพดดีที่สุด ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 371.11 ± 4.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รายการอ้างอิง

- กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2549. ปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. 13-33. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.
- กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2556. พันธุวิศวกรรม : เทคโนโลยี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย ธรรมศาสตร์.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม (Carbohydrate modifying enzyme in industry). สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.
- มณชัย เดชสังกรานนท์. 2556. ไฮไลโอไลโกแซ็กคาไรด์: สารพรีไบโอติกเพื่อชีวิตที่ยืนยาว. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.
- ริกาญจน์ ฉัตรสกุลวิไล. 2556. ลิกนิน-แทนนิน. กรมโรงงานอุตสาหกรรม.
- ภูมิหทัย คูประเสริฐยิ่ง และประมุข ภาระกุลสุขสถิต. 2554. การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิต เอทานอล. สรรสาระเทคโนโลยีชีวภาพ.
- เสาวนีย์ กาญจนชุมพล และ ดวงกมล วิรุฬห์อุดมผล. 2556. Protein Detection. สำนักงานวิจัยคณะ แพทย์ศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี.
- สุชานนท์ เสมแก้ว และธำปน จงรักษ์. 2553. การโคลนและการแสดงออกของยีน ไซเลนเนสจาก แบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อน. โครงการปัญหาพิเศษ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.
- Aspinall, G. O. (1980). Chemistry of cell-wall polysaccharides. *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*, 3, 473–500.
- Bai, Y., Wang, J., Zhang, Z., Yang, P., Shi, P., Luo, H., and Yao, B. (2010). A new xylanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with broad-range pH activity and pH stability. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 37, 187–194.
- Barber, S. and Benedito de Barber, C. (1976). An approach to the objective measurement of the degree of milling. *Rice Process Engineering*, 2(2).

- Bastawade, K.B. (1992). Xylan structure, microbial xylanase, and their mode of action. *World journal of microbiology and biotechnology*, 8, 353-368.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in biotechnology*, 3, 280.
- Birnboim, H. C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7, 1513-23.
- Bhardwaj, A., Mahanta, P., Ramakumar S., Ghosh, A., Leelavathi, S., and Reddy, V. S. (1997). Emerging role of N- and C-terminal interactions in stabilizing (β/α)₈ fold with special emphasis on family 10 xylanases. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3).
- Boucherba, N., Benallaoua, S., Copinet, E., Hebal, H., and Francis, D. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil. *Process biochemistry*, 46(2), 519-525.
- Chantorn, S., Natrchalayuth, S., Phannachet, K., and Apiraksakorn, J. (2014). Identification of suitable condition for mannanase production by *Bacillus* sp. GA2(1). *British biotechnology journal*, 5(2), 92-97.
- Choudhury, B., Chauhan, S., Singh, S. N., and Ghosh, P. (2006). Production of xylanase of *Bacillus coagulans* and its bleaching potential. *World journal microbiology and biotechnology*, 22, 283-288.
- Collins, T., Gerday, C., and Georges, F. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29, 3-23.
- Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. (1993). β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems : biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and applied biochemistry*, 17, 259-289.
- Damaso, M. C., de Castro, A. M., Castro, R. M., Andrade, C. M. and Pereira, N. Jr. (2004). Application of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 for enzymatic hydrolysis of corncob and sugarcane bagasse. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113-116.

- Glazer, A.N. and Nikaido, H. (2007). Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology. 2nd ed. Cambridge University Press.
- GE healthcare bio-sciences. (2009). pGEX vector, GST gene fusion system.
- Hwang, T. I., Lim, K. H., Song, Y. H., Cho, J. S., Chang, J., and Park, N. (2010). Cloning and characterization of a xylanase, KRICTPX1 from the strain *Paenibacillus* sp. HPL-001. *Biotechnology advances*, 28, 594-601.
- Jakkapan, P., Jirakarn, S., Sunee, N. and Jirawan, A. (2010). Production, characterization and hydrolysis products of xylanase from *Bacillus subtilis* GN156. *KKU Research Journal*, 15(5), 343-350.
- Jalal, A., Rashid, N., Rasool, N., and Akhtar, M. (2009). Gene cloning and characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(4).
- Ko, C., Tsai, C., Tu, J., Lee, H., Ku, L., Kuo, P., and Lai, Y. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process biochemistry*, 45, 1638-1644.
- Kuhad, R. C. and Singh, A. (2007). Structure and composition of xylan. *Lignocellulose biotechnology*, 275-278.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews*. 23, 411-456.
- Lee, J. W., Gwak, K. S., Kim, S. I., Kim, M., Choi, D. H. and Choi, I. G. (2007). Characterization of xylanase from *Lentinus edodes* M290 cultured on waste mushroom logs. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(11), 1811-1817.
- Li, N., Meng, K., Wang, Y., Shi P., Luo, H., Bai, Y., Yang, P., and Yao, B. (2008). Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 231-240.

- Liu, M., Weng. X., and Sun, J. (2006). Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan. *Protein expression and purification*, 48, 292–299.
- Lowry, O.H., R.N., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, 265-275.
- Meeta, S., Saurabh, M. and Anil, K. (2013). Purification and characterization of alkaline xylanase secreted from *Paenibacillus macquariensis*. *Advances in microbiology*, 3, 32-41.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Ozcan, B.D., Coskun, A., Ozcan, N., and Baylan, M. (2011). Some properties of a new thermostable xylanase from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. isolate DM-15. *Journal of animal and veterinary advances*, 10(2), 138-143.
- Paës, G., Berrin, J., and Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology advances*, 30, 564-592.
- Pauly, M., and K., K. (2008). Cell wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The plant journal*, 54, 559–568.
- Pearsai, K., Werasit, S., Wirat, V. and Mangkorn, R. (2014). Partial purification and characterization of xylanase from *Streptomyces mexicanus* 901. *Thai society for biotechnology 2014*.
- Pérez, J. M.D., J. De-la-Rubia, T. and Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology*, 5, 53-63.
- Prade, R. A. (1995). Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 13, 100–131.
- Polaina, J. and MacCabe, A.P. (2007). Xylanase: molecular properties and applications. *Industrial enzymes structure, functions and applications*, 65-82.

- Polizeli, M. L., Rizzatti, A. C., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., and Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 67, 577-591.
- Pu, Y., Zhang, D., Singh, P.M., and Ragauskas, J. (2008). The new forestry biofuels sector. *Biofuels bioproducts and biorefining*, 2, 58-73.
- Puls, J. and Poutanen, K. (1989). Mechanism of enzyme hydrolysis of hemicelluloses xylanase and procedures for determination of enzyme activities involved. *Enzyme systems for linocellulose degradation*, 151-165.
- Qu, W. and Shao, W. (2011). Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from *Bacillus pumilus* ARA. *Biotechnology letters*, 33(7).
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, L. K. and Tanticharoen, M. (1999). Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 694-697.
- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K. L., Sakka, K., Kosugi, A., and Mori, Y. (2013). *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 multienzyme complex: A Novel system for biomass utilization. *Licensee intech*.
- Saleem, M., Tabassum, M. R., Yasmin, R., and Imran, M. (2009). Potential of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. XTR-10 in biobleaching of wood kraft pulp. *International biodeterioration & biodegradation*, 63(8), 1119-1124.
- Sanaa, T., Magda, M. A., Saleha, Y. A. and Madeha, N. A. (2013). Production and characterization of thermostable xylanase from *Bacillus subtilis* XP10 isolated from marine water. *African journal of biotechnology*, 12(8), 780-790.
- Shrinivas, D., Savitha, G., Raviranjana, K. and Naik, G. R. (2010). A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 suitable for paper and pulp industry: purification and characterization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(7), 2049-2057.

- Silva, L. A. O., Terrasan, C. R. F. and Carmona, E. C. (2015). Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. *Electronic journal of biotechnology*, 18, 307-313.
- Sunna, A. and Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical reviews in biotechnology*, 17(1), 39-67.
- Timell, T. E. (1967). Recent progress in the chemistry of wood hemicellulose. *Wood science and technology*. 1(1), 45-70
- Wang, C. Y., Chan, H., Lin, H. T. and Shyu, Y. T. (2010). Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from *Bacillus* sp. NTU-06. *Annals of applied biology*, 156(2), 187-197.
- Whistler, R. and Masek, E. (1955). Enzymatic hydrolysis of xylan. *Journal of the american chemical society*, 77, 1241-1243.
- Wong, K. Y., Tan, L. U., and Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganism: functions and applications. *Microbiology reviews*, 52(3), 305-317.
- Yang, W., Ajapur K. V., Krishnamurthy, K., Feng, H., Yang, R., Rababah, M. T. (2009). Expedited extraction of xylan from corncob by power ultrasound. *International journal of agricultural and biological engineering*, 2(4), 76-83.
- Yilin, L., Jingjing, P., Huawei, Wu1., Jianzhong, S. and Weilan, S. (2011). An approach to the production of soluble protein from a fungal gene encoding an aggregation-prone xylanase in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 6(4).
- Yin, L., Lin, H., Chiang, Y., and Jiang, S. (2010). Bioproperties and purification of xylanase from *Bacillus* sp. YJ6. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2(4), 76-83.
- Yoon, K. (2009). Cloning of the *Bacillus subtilis* AMX-4 xylanase gene and characterization of the gene product. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(12), 1514-1519.

- Zhang, F., Chen, J., Ren, W., Lin, L., Zhou, Y., Zhi, X., Tang, S., and Li, W. (2012). Cloning, expression, and characterization of an alkaline thermostable GH11 xylanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462^T. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 39, 1109–1116.
- Zhou, C., Bai, J., Deng, S., Wang, J., Zhu, J., Wu, M., & Wu, M. (2008). Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*. *Bioresource technology*, 99(4), 831-838.
- Affinity chromatography. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 กรกฎาคม 2556, จาก <http://ntri.tamuk.edu/fplc/pursammat.html>.
- pGEX-4T-1. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 สิงหาคม 2558, จาก <http://www.suggestkeyword.com/cGdleCBwbGFzbWlk/>

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อุปกรณ์และสารเคมี



ภาคผนวก ก
อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1.1 ออโตปิเปตต์ (auto pipettes) ขนาด 0.1-2.5, 0.5-10, 20-200 และ 200-1000 ไมโครลิตร
- 1.2 กระบอกตวงแก้ว (cylinder) ขนาด 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
- 1.3 ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 50, 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 1.4 ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 1.5 กระบะน้ำแข็ง (ice bucket)
- 1.6 กล่องใส่ทิป (tip boxes)
- 1.7 ทิป (tips)
- 1.8 คิวเวทท์ (cuvettes)
- 1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)
- 1.10 กล่องใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube boxes)
- 1.11 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tubes)
- 1.12 กล่องใส่หลอดสำหรับปฏิกิริยาหลอดโพลีเมอเรส (PCR tubes boxes)
- 1.13 หลอดสำหรับปฏิกิริยาหลอดโพลีเมอเรส (PCR tubes)
- 1.14 หลอดทดลองขนาด 16x100 มิลลิเมตร พร้อมฝาปิด
- 1.15 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (rack)
- 1.16 หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tubes) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- 1.17 หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tubes) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.18 แผ่นกรอง (sterile filter) ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร
- 1.20 แผ่นกรอง (sterile filter) ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

- 1.21 หลอดฉีดยา (syringes)
- 1.22 ขวดสีชา (amber bottles)
- 1.23 จานเพาะเชื้อ (petri dishes)
- 1.24 ห่วงเปียเชื้อ (loops)
- 1.25 ช้อนตักสาร (spatula)
- 1.26 ไม้จิ้มฟัน (tooth pick)
- 1.27 ถุงมือยาง (latex gloves)
- 1.28 แท่งแก้วคนสาร (glass rod)
- 1.29 ปากกาเขียนเครื่องแก้ว (permanent marker)
- 1.30 ขวดน้ำกลั่น (wash bottle)

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) : Innova TM 4900, New Brunswick (USA)
- 2.2 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4 digit analytical balance) : MonoBloc รุ่น AB 204-5 (Switzerland)
- 2.3 เครื่องปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) : sonics vibracell รุ่น VCX505
- 2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) : Jouan รุ่น MR22i (France)
- 2.5 เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) : Turbora รุ่น TTX-4314 (Italy)
- 2.6 เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงช่วงรังสียูวี (UV spectrophotometer) : UV-1201V spectrophotometer SHIMADZU (Japan)
- 2.7 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) : Backman รุ่น PHI 32
- 2.8 เครื่องผสมสารละลาย (vortex) : Vortex Genie 2 : Scientific Industries Ins. (USA)
- 2.9 ชุดอุปกรณ์พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide electrophoresis set) : ATTO รุ่น AE-6530 mPAGE (Japan)

2.10 ชุดอุปกรณ์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (agarose gel electrophoresis set) : Bio-Active (USA)

2.11 เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel document) : UVP รุ่น CA 91789 (USA)

2.12 ตู้เขี่ยเชื้อแบบที่เรีย (laminar flow) : BH 2000 series Class II Biological Safety cabinet (USA)

2.13 ตู้ดูดควัน (hood) : Hemco (USA)

2.14 ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส : SANYO (Thailand)

2.15 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส : Sandenintercool (Thailand)

2.16 หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) : Tomy TM, New Brunswick. (USA)

2.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) : Water bath Julabo Eco Temp TW 20

3. สารเคมี

3.1 30% Acrylamide/Bis solution 29:1

3.2 Absolute ethanol

3.3 Agar

3.4 Agarose

3.5 Ampicillin

3.6 Ammonium persulfate

3.7 Birchwood xylan (บริษัท Sigma)

3.8 Bromophenolblue

3.9 Bovine serum albumin (BSA)

3.10 Coomassie brilliant blue G-250

3.11 Chloroform : isoamylalcohol (24:1)

3.12 Copper(II) sulfate

- 3.13 Deionized distilled water
- 3.14 Dibasic sodium phosphate
- 3.15 1,4-Dithiothreitol (DTT)
- 3.16 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)
- 3.17 95% Ethanol
- 3.18 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 3.19 Follin-Ciocalteu phenol reagent
- 3.20 Glacial acetic acid
- 3.21 Glucose
- 3.22 Glycine
- 3.23 Glycerol
- 3.24 GStap-FF column chromatography
- 3.25 Glutathione
- 3.26 Isopropanol
- 3.27 Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG)
- 3.28 Isoamylalcohol
- 3.29 Luria Bertani agar (LA agar) และ Luria Bertani broth (LB broth)
- 3.30 loading dye solution
- 3.31 2-Mercaptoethanol
- 3.32 Methanol
- 3.33 Monobasic sodium phosphate
- 3.34 Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)
- 3.35 Phosphate Buffer Saline
- 3.36 Potassium chloride

- 3.37 Potassium phosphate
- 3.38 Potassium sodium tartrate
- 3.39 Potassium Acetate
- 3.40 Protein markers
- 3.41 Sodium acetate
- 3.42 Sodium chloride
- 3.43 Sodium hydroxide
- 3.44 TE buffer pH 8
- 3.45 Tris-Cl
- 3.46 Sodium nitrate
- 3.47 Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 3.48 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 3.49 Xylose

4. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้

4.1 Luria-Bertani (LB) broth

ทริปโตเน (Tryptone)	10	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรกต์ (Yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ลงในน้ำกลั่น แล้วคนให้ละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.2 Luria-Bertani (LB) agar

ทริปโตเน (Tryptone)	10	กรัม
---------------------	----	------

ยีสต์เอกซ์แทรกต์ (Yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	15	กรัม

ละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำกลั่น แล้วคนให้ละลาย จากนั้นปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทอาหารลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะอาหารจะแข็งตัว

4.3 กลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์

นำกลีเซอรอลปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.4 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ตารางที่ 4 ปริมาตรสารที่ใช้เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์

Stock solution	ปริมาตร (มิลลิลิตร)		
	พีเอช 6.0	พีเอช 7.0	พีเอช 8.0
สาร X : โมโนโซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 0.2 โมลาร์	87.7	39.0	5.3
สาร Y : ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.2 โมลาร์	12.3	61.0	94.7
ปริมาตรสุทธิ	200		

ทำการผสม Stock solution ของ สาร X และ สาร Y ตามค่าพีเอชที่ต้องการ ดังตารางที่ 4 จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร

4.5 สารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate-phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์
ตารางที่ 5 ปริมาตรที่ใช้เตรียมสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์

Stock solution	ปริมาตร (มิลลิลิตร)			
	พีเอช 3.0	พีเอช 4.0	พีเอช 5.0	พีเอช 6.0
สาร X : กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot 7H_2O$) 0.2 โมลาร์	39.8	30.7	24.3	17.9
สาร Y : โซเดียมฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2 โมลาร์	10.2	19.3	25.7	32.1
ปริมาตรสุทธิ	200			

ทำการผสม Stock solution ของ สาร X และ สาร Y ตามค่าพีเอชที่ต้องการ ดังตารางที่ 5 จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร

4.6 สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (Glycine-NaOH buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ตารางที่ 6 ปริมาตรที่ใช้เตรียมสารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์

Stock solution	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	
	พีเอช 9.0	พีเอช 10.0
สาร X : ไกลซีน 0.2 โมลาร์	50.0	50.0
สาร Y : โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์	8.8	32.0
ปริมาตรสุทธิ	200	

ทำการผสม Stock solution ของ สาร X และ สาร Y ตามค่าพีเอชที่ต้องการ ดังตารางที่ 6 จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร

4.7 สารละลาย DNS (Miller and Gail, 1959)

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)	10	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	200	มิลลิลิตร
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Rochelle salt)	300	กรัม

ชั่ง 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ลงไปทีละน้อย คนให้ละลายซึ่งขั้นตอนนี้ทำบน hot plate จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4.8 การเตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

สารละลาย A ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลายคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 0.5 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จำนวน 20 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จำนวน 4 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย C

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

สารละลาย D

ผสม สารละลายฟอลลินฟีนอลรีเอเจนต์ (Follin-Ciocalteu phenol reagent) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

4.9 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.56 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.10 สารละลาย Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

IPTG 2.38 กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.11 สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

โซเดียมอีดีทีเอ ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 186.1 กรัม

ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (ใช้แบบเกล็ดค่อย ๆ เติมแล้วละลายที่ละเม็ด) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ น้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.12 สารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Tris base 24.22 กรัม

ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอช ให้ได้ 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ น้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.13 สารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 5.6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

โซเดียมอะซิเตท (NaOAc) 20.4 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ น้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.14 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 29.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.15 สารละลายกลูโคส (glucose) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

กลูโคส (glucose) 3.6 กรัม

นำกลูโคสละลายลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 20 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วย filter กรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

4.16 สารละลาย I (solution I) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

กลูโคส (glucose) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร

Tris-Cl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 8.0 2.5 มิลลิลิตร

EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 2 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดที่ผ่านการกรองและการฆ่าเชื้อมาแล้วเทรวมกันในปริมาตรที่กำหนด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4.17 สารละลาย II (solution II) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.4 นอร์มอล 5 มิลลิลิตร

SDS 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.18 สารละลาย III (solution III) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

โพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 60 มิลลิลิตร

กรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial acetic acid) 11.5 มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.19 สารละลายแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

แอมพิซิลลิน	1	กรัม
-------------	---	------

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 5 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วย filter กรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.20 สารละลาย Running buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

(ความเข้มข้น 1X SDS : Tris ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน (glycine) ความเข้มข้น 192 มิลลิโมลาร์ และ SDS ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร พีเอช 8.3)

Tris base	30.3	กรัม
ไกลซีน	144	กรัม
SDS	10	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร (ไม่ต้องปรับพีเอช)

4.21 สารละลาย Coomassie staining ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Coomassie brilliant blue R-250	1	กรัม
เมทานอล	450	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

4.22 สารละลาย Destaining ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

เมทานอล	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์



1. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

1.1. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1.1.1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.1.2. นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งให้เย็นเป็นเวลา 5 นาที

1.1.3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.1.4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

1.2. วิธีการวิเคราะห์ชุดควบคุม

1.2.1 ปิเปต 0.5 มิลลิลิตร ของบัฟเฟอร์ที่มีสารตั้งต้นอยู่ 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2.2 เติมน้ำกลั่นลงไป 0.5 มิลลิโมลาร์ เขย่าให้เข้ากัน

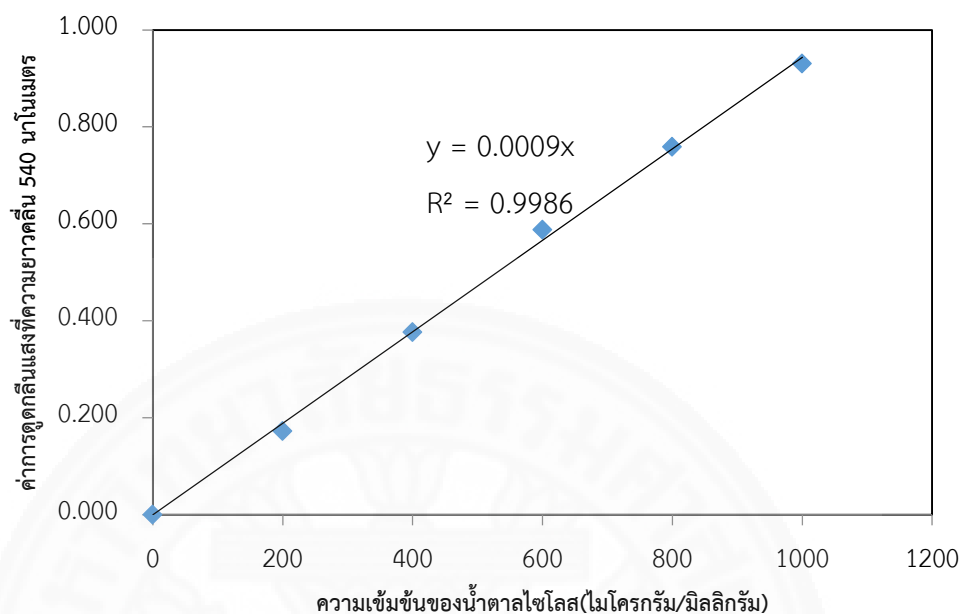
1.2.3 นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งให้เย็นเป็นเวลา 5 นาที

1.2.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และแมนโนส

เตรียมน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็น stock solution จากนั้นเตรียมน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเจือจางจาก stock solution โดยเตรียมที่ความเข้มข้นดังนี้ 0 200 400 600 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS จากนั้นนำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ซึ่งแสดงดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

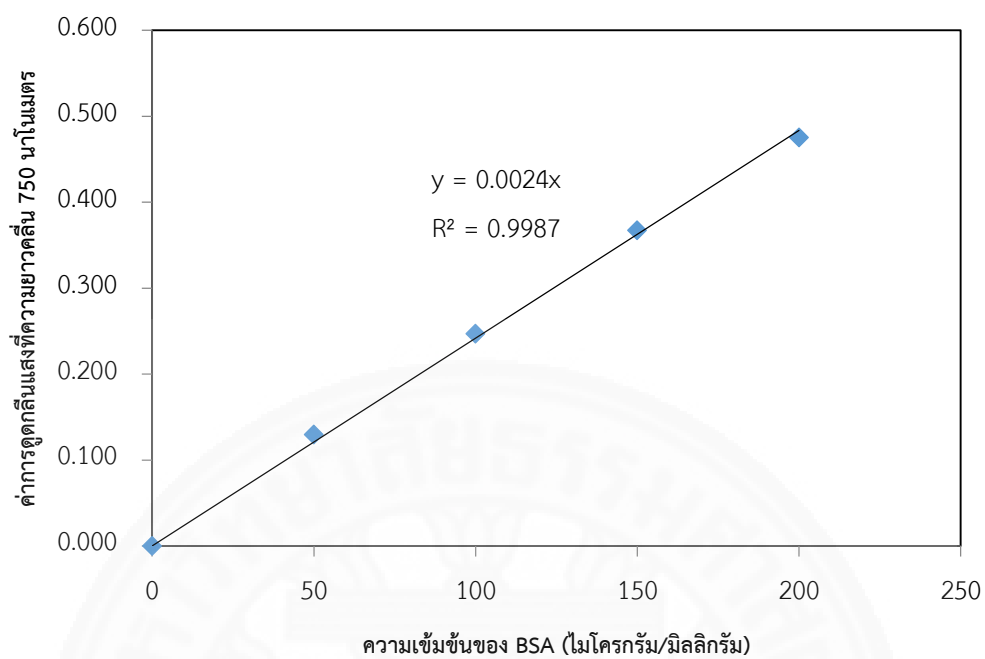
2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

วิธีการ

- 2.1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย C ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- 2.2. เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- 2.3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีนด้วยวิธี Lowry

เตรียมสารละลายที่เป็น stock solution ของโบรินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย BSA ให้มีความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ BSA แสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐานโปรตีน

ภาคผนวก ค
ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาวิจัย

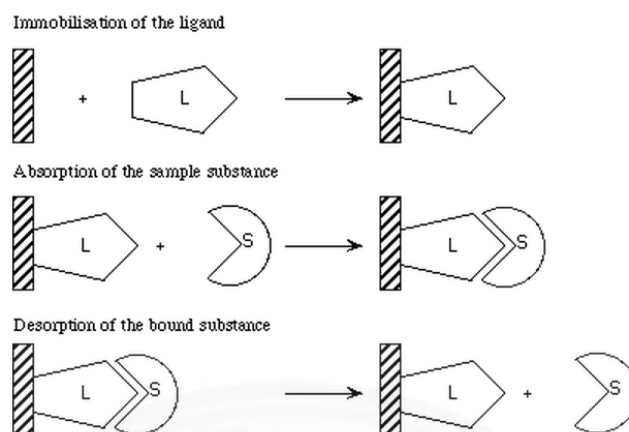


1. การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี วิธีนี้สามารถแยกสารที่ผสมกันอยู่โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน สารต่างชนิดกันจึงเดินทางผ่านวัฏภาคนิ่งออกมาที่วัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกันจึงเกิดการแยกขึ้น ในปัจจุบันมีเทคนิคโครมาโตกราฟีหลายประเภทเช่น thin-layer chromatography, gas-solid chromatography, paper chromatography และ liquid chromatography ซึ่งวิธีที่นิยมใช้กันมากคือ liquid chromatography โดยหนึ่งในวิธีนี้คือ โครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography)

1.1 โครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography)

เป็นการแยกโปรตีนที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารจำเพาะที่เรียกว่าลิแกนด์ (ligand) ถูกเหนี่ยวนำให้ติดอยู่บนเฟสคงที่ (stationary phase) ด้วยพันธะโควาเลนต์ เฟสคงที่นี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เมทริกซ์ (matrix) กลุ่มลิแกนด์ที่ยึดติดกับเมทริกซ์นี้เรียกว่าลิแกนด์ตรึง (immobilized ligand) มีความจำเพาะในการจับกับสารที่สนใจ (sample) หลังจากที่จะล้างสารอื่นที่ไม่จำเพาะกับลิแกนด์ออกไปจากคอลัมน์แล้ว จึงทำการปรับสภาวะเพื่อให้สารที่สนใจหลุดออกจากคอลัมน์โดยลิแกนด์ ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 หลักการของโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ แสดงการจับกันระหว่างสารที่สนใจ (S)

กับลิแกนด์ (L) ในขณะที่อยู่ในคอลัมน์

(ที่มา: http://www.oocities.org/supergeitje/old_thesis/thesisref.html)

1.1.1 สมบัติของสารที่จะนำมาใช้แยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะมีดังนี้

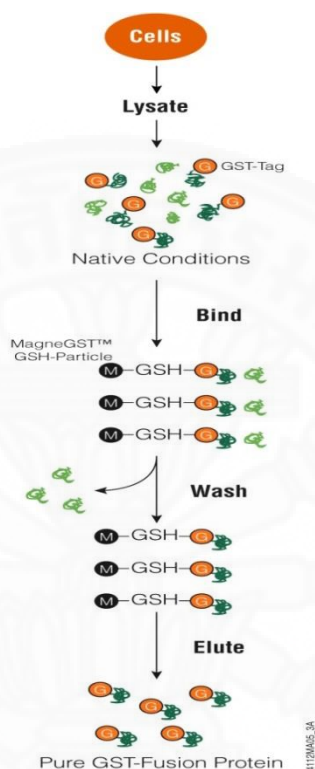
1.1.1.1 มีสมบัติการจับกันอย่างจำเพาะทางชีวภาพ (Specific binding of biological activity) เช่น enzyme active sites, receptor binding sites, antibody binding sites ซึ่งลิแกนด์จะเป็นไปได้ทั้ง natural ligand หรือสารที่เป็น analogue ของ natural ligand จะเป็นการแยกแบบ specific separation

1.1.1.2 มี naturally occurring prosthetic groups เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งคุณสมบัตินี้จะทำให้การแยกเป็นแบบ group separation และลิแกนด์จะเป็นเลกตินหรือน้ำตาล เช่น N-acetyl glucosamine

1.1.1.3 โมเลกุลที่มีการติดหมู่จำเพาะ (affinity tag) เช่น โอลิโกฮิสทีติน (His-tag), glutathione-S-transferase (GST) ซึ่งคุณสมบัตินี้จะเป็นการแยกแบบจำเพาะสำหรับ recombinant fusion proteins

GST Fusion protein purification โดยหลักการของระบบนี้คือโปรตีนที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์จะเชื่อมอยู่กับโปรตีนแท็ก GST (glutathione-S-transferase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สกัดแยกได้จากพยาธิตัวแบน *Schistosoma japonicum* ซึ่งเอนไซม์ GST นี้มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาจับกับกลูตาไทโอนได้อย่างจำเพาะ ซึ่งกลูตาไทโอนเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ

กรดกลูตามิก (glutamic acid) ซิสเทอีน (cysteine) และไกลซีน (glycine) จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เชื่อมอยู่กับ GST ไปผ่านคอลัมน์ที่มีกลูตาไทโอน (glutathione) เป็นลิแกนด์แล้วใช้กลูตาไทโอนที่มีความเข้มข้นสูงในการชะโปรตีนที่ต้องการออกมา ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แสดงการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ติดกับGST-tag ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยสมบัติความสามารถในการจับกันระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนกับกลูตาไทโอนที่อยู่ในคอลัมน์ และรีคอมบิแนนท์โปรตีนจะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยกลูตาไทโอนที่มีความเข้มข้นสูง

(ที่มา: <http://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/protein-purification-and-analysis?cs=y>)

2. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE)

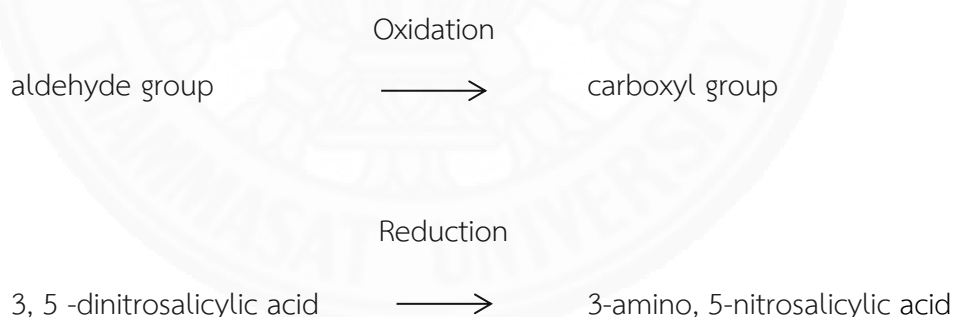
Sodium dodecyl sulfate (SDS) เป็นสารพวก detergent เมื่อจับกับโปรตีนจะทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีประจุเป็นลบสายของโปรตีนยืดตัวออกและเสียสภาพธรรมชาติอัตราส่วนประจุต่อมวลของ

โมเลกุลโปรตีนทุกชนิดมีค่าเท่ากัน ดังนั้น SDS-PAGE จึงเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว โดยสามารถระบุน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างได้เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (เสาวนีย์และดวงกมล, 2556) ภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้นเมื่อย้อมด้วยสีเช่น Coomassie Blue หรือ Silver stain

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

เป็นวิธีหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid, DNS (Miller and Gail, 1959) โดยใช้สาร DNS ในการทดสอบร่วมกับสารตั้งต้นที่จะใช้ทดสอบ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้หรือน้ำตาลรีดิวซ์ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟเทียบกับกราฟมาตรฐาน

โดยวิธีนี้เป็นการตรวจสอบว่ามี carbonyl group ที่อิสระ (หรือที่เรียกว่า reducing sugar) อยู่หรือไม่ โดยจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ aldehyde ในน้ำตาลกลูโคสและกับหมู่ ketone ในน้ำตาลฟรุคโตส และในเวลาเดียวกัน DNS จะถูกรีดิวซ์ให้กลายเป็น 3-amino,5-nitrosalicylic acid ภายใต้อุณหภูมิที่ต่างกัน



และในปฏิกิริยานี้ได้มีการเติม sulfite (ซึ่งตัว sulfite ไม่มีผลต่อสีในปฏิกิริยา) ลงไปดูดซับออกซิเจน เพราะออกซิเจนสามารถรบกวนปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสได้

ในปฏิกิริยาด้านบนแสดงให้เห็นว่า 1 โมลของน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาพอดีกับ 1 โมลของ DNS ซึ่งความแตกต่างของ reducing sugar ก็มีผลทำให้เกิดสีที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้อง calibrate น้ำตาลแต่ละชนิดก่อน