

การแสดงออกของยีนบีตา-ไฮโดรไลเตสของ *Streptomyces* sp. CH7 ใน *Escherichia coli*
และลักษณะสมบัติของเอนไซม์



นายโตมร ทองน้ำวน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

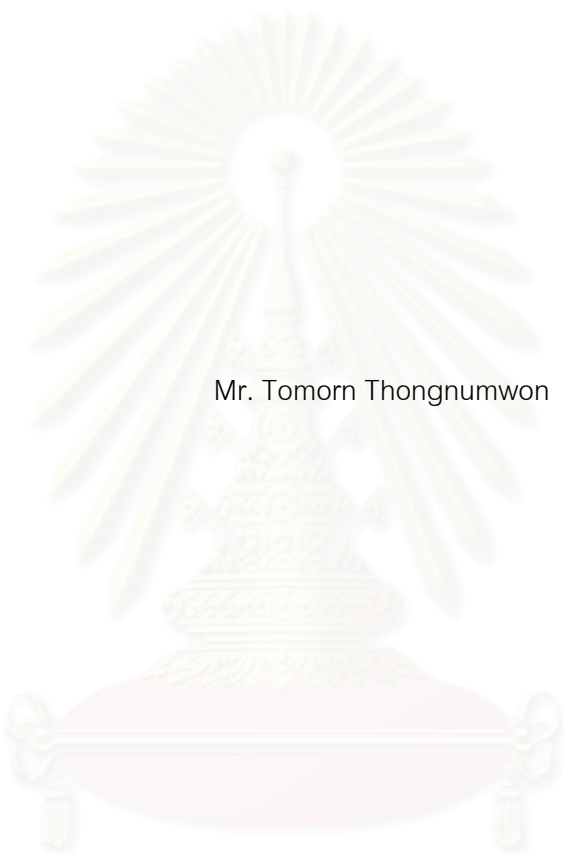
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1172-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF β -XYLOSIDASE GENE OF *Streptomyces* sp. CH7 IN *Escherichia coli*
AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME



Mr. Tomorn Thongnumwon

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1172-7

โตมร ทองน้ำวน : การแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลลิตเดสของ *Streptomyces* sp. CH7 ใน *Escherichia coli* และลักษณะสมบัติของเอนไซม์ (EXPRESSION OF β -XYLOSIDASE GENE OF *Streptomyces* sp. CH7 IN *Escherichia coli* AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 91 หน้า. ISBN 974-17-1172-7

ยีนบีตา-ไซโลลิตเดสของ *Streptomyces* sp. CH7 ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ไม่ต้องการการชักนำใกล้เคียงกับสายพันธุ์ JM109 ที่ชักนำด้วย 0.2 มิลลิโมลาร์ IPTG และยังพบว่าไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน ขณะที่ไซโลสและกลูโคสยับยั้ง ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดคือ 15 ชั่วโมง เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้จากการแสดงออกของยีนนี้มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE-Biogel A และ Sephadex G-200 พบว่ามีรูปแบบการทำให้บริสุทธิ์คล้ายคลึงกับเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์เดิม นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงาน และความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง เช่นเดียวกับบีตา-ไซโลลิตเดสจากสายพันธุ์เดิม เอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 178,000 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์โดยเจลฟิลเตรชันและประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักเท่ากันคือประมาณ 75,000 ดาลตัน

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอที่โคลนได้ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 พบกรอบอ่านรหัสเปิดสมบูร์น 1 กรอบ ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 552 ถึง 2927 และแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 792 กรดอะมิโน ซึ่งคำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลได้ 83,386 ดาลตัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4272284023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: EXPRESSION / β -XYLOSIDASE / *Streptomyces* sp. / *Escherichia coli* /

TOMORN THONGNUMWON : EXPRESSION OF β -XYLOSIDASE GENE OF *Streptomyces* sp. CH7 IN *Escherichia coli* AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D.
91 pp. ISBN 974-17-1172-7

β -Xylosidase gene of *Streptomyces* sp. CH7 in the recombinant plasmid pCH7-1 has comparable expression ability either in *E. coli* strains DH5 α without induction or JM109 induced with 0.2 M IPTG. Furthermore, its expression ability was increased by xylan but repressed by glucose and xylose when used as a carbon source for cultivation. The optimal cultivation time giving maximum enzyme specific activity was 15 h. Purification of β -xylosidase from the recombinant *E. coli* by column chromatography on DEAE-Biogel A and Sephadex G-200 gave similar purification patterns to that of the enzyme from the wild type. The purified enzyme had pH and temperature optimum including its stability to pH and temperature properties similar to that of the wild type. It had molecular weight of 178,000 Da estimated by gel filtration and consisted of 2 identical subunits with molecular weight of 75,000 Da. From the nucleotide sequence analysis of the DNA insert in the recombinant plasmid pCH7-1, it showed one complete open reading frame from nucleotide numbers 552 to 2927 encoding 792 amino acids with calculated molecular weight of 83,386 Da.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology

Student's signature

Field of study Industrial Microbiology

Advisor's signature

Academic year 2002

Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆในการทำงานวิจัยจนสำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ และคุณแม่ ที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในทุกๆด้าน รวมทั้งให้กำลังใจและให้สติแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ฐนิยวัน และอาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ให้ความรู้ คำปรึกษา และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณาเอื้อเฟื้อโปรแกรม DNASIS และแนะนำวิธีการใช้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้และ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ทรรศนีย์ ตั้งสกุล, พี่เฉลิมพล คู่้มพิทักษ์, พี่จิราวรรณ ธนะ, พี่กฤษดา เวทีวุฒาจารย์ และคุณวาทัญญูตา ภูโยธิน สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำ เทคนิค และกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆที่ใช้ชีวิตร่วมกันอยู่ในแผนก เพื่อนๆไม่ใคร่รุ่น 22 และเพื่อนๆชาวทวีธาภิเศก รุ่น 99 สำหรับกิจกรรมคลายเครียดที่มีส่วนช่วยให้มีกำลังใจและกำลังกายในการทำงานวิจัยนี้มาโดยตลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ฅ
บทที่	
1.บทนำ.....	1
2.ปริทรรศน์วรรณกรรม.....	5
3.อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง.....	14
4.ผลการทดลอง.....	30
5.สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	56
รายการอ้างอิง.....	61
ภาคผนวก.....	69
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างปีตา-ไฮไลซิเดส.....	5
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	16
3.2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย.....	16
4.1 ผลของ IPTG ต่อการแสดงออกของยีนปีตา-ไฮไลซิเดสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7 ใน <i>E. coli</i> DH5 α และ JM109.....	31
4.2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการแสดงออกของยีนปีตา-ไฮไลซิเดสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7 ใน <i>E. coli</i> DH5 α และ JM109.....	32
4.3 ขั้นตอนการทำปีตา-ไฮไลซิเดสจากเชื้อรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ให้บริสุทธิ์	39
5.1 สมบัติของปีตา-ไฮไลซิเดสบริสุทธิ์จากรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มียีนปีตา-ไฮไลซิเดสของ <i>Streptomyces</i> sp. CH7 และจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	58
5.2 สมบัติของปีตา-ไฮไลซิเดสบริสุทธิ์จากรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิด pCH7-1 และจาก <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520.....	60

สารบัญญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน.....	2
4.1 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลลิตเดสใน รีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α และ JM109.....	34
4.2 การทำบีตา-ไซโลลิตเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ.....	36
4.3 การทำบีตา-ไซโลลิตเดสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200.....	38
4.4 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในชั้น ตอนต่างๆ.....	41
4.5 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 และที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งได้จากการย้อมแอกติวิตี.....	42
4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาตรที่ใช้ชะโปรตีนออก จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200.....	44
4.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลลิตเดส โดยการใช้อิเลคโตรโฟรีซิสบนไซเดียม โดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล.....	46
4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีน เคลื่อนที่บนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส.....	47
4.9 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลลิตเดส.....	48
4.10 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลลิตเดส.....	49
4.11 ความเสถียรของบีตา-ไซโลลิตเดสต่ออุณหภูมิ.....	50
4.12 ความเสถียรของบีตา-ไซโลลิตเดสต่อความเป็นกรดต่าง.....	51
4.13 ไดอะแกรมแสดงวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	53
4.14 แสดงลำดับดีเอ็นเอของยีนบีตา-ไซโลลิตเดสจาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7.....	54

บทที่ 1

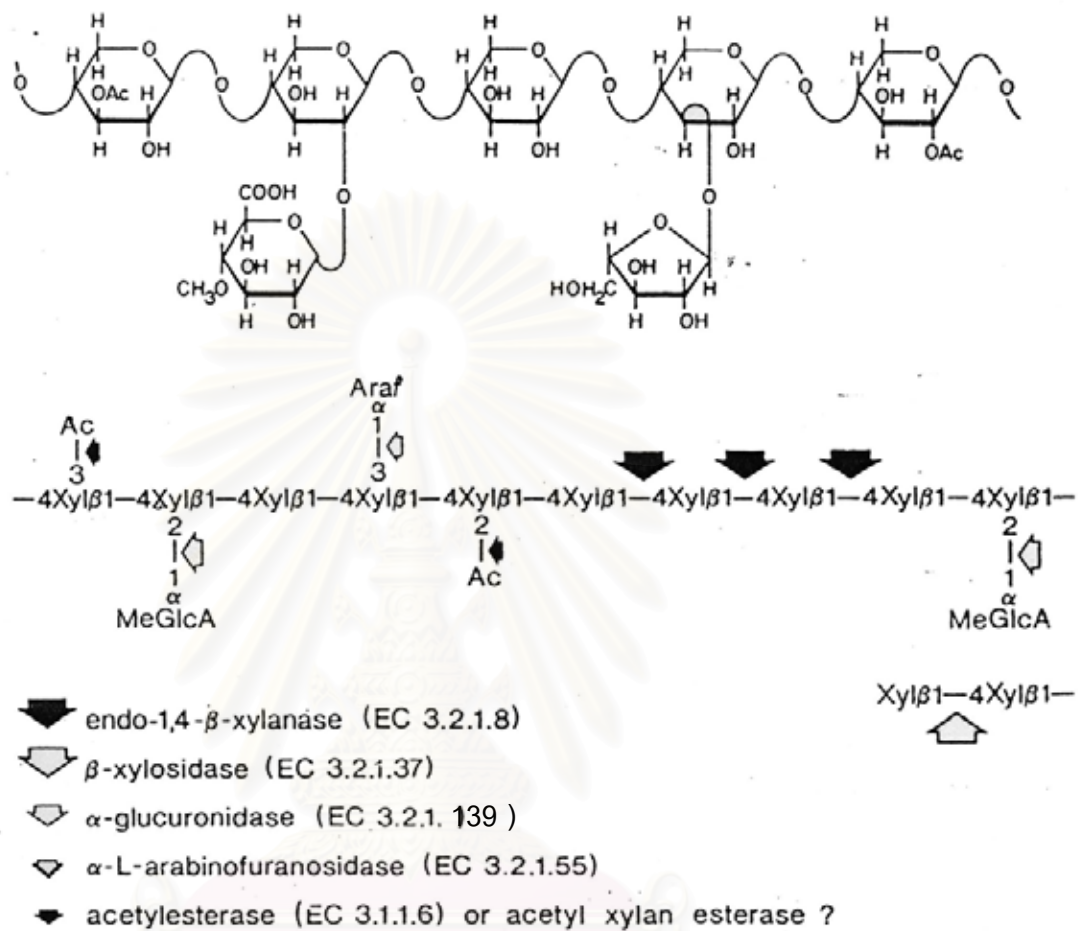
บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในธรรมชาติ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด ชนิดแรกคือ เซลลูโลส (cellulose) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic) ที่เป็นสายโซ่ตรง มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ พบในปริมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ชนิดที่สองคือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส และ/หรือน้ำตาลเฮกซอส ได้แก่ กลูแคน, แมนแนน และไซแลน โดยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลัก ชนิดสุดท้ายคือ ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทพอลิฟีนอลิก (polyphenolic) ซึ่งมักห่อหุ้มชั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเอาไว้ (Wong และคณะ, 1988)

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลลูโลสโดยยึดเกาะกับพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น (เช่น กลูแคน, แมนแนน) ด้วยพันธะนอนโควาเลนต์ (non covalent) และยึดเกาะกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน พบตามธรรมชาติทั้งในไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง พืชล้มลุก ในผนังเซลล์ชั้นแรกของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย รำข้าว ฟางข้าว ชังข้าวโพด เปลือกเมล็ดทานตะวัน (Magee และ Kosaric, 1985) และในเปลือกเมล็ดธัญพืชต่างๆ เป็นต้น (Ericksson และคณะ, 1990) นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการลอกเนื้อไม้เพื่อทำเยื่อกระดาษ (pulping) (Biely, 1985) ปริมาณและโครงสร้างจะแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา เช่น ในไม้เนื้อแข็งพบว่าปริมาณไซแลนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Ward และ Moo-Young, 1985) ในไม้เนื้ออ่อนจะมีไซแลนประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนในไม้ล้มลุกจะมีไซแลนประมาณ 20-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Saddler และคณะ, 1983)

โครงสร้างของไซแลนเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิก (β -1,4-xylosidic) เป็นสายหลัก และมีสารประกอบอื่นๆ มาเชื่อมต่อเป็นหมู่ข้างเคียงเช่น หมู่อะราบินอสต่อกับตำแหน่ง O-3 ของไซโลส หมู่กลูคูโรนิลต่อกับตำแหน่ง O-2 ของไซโลส ส่วนหมู่อะซิติลต่อกับตำแหน่ง O-3 และ O-2 ของไซโลสได้ ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ลักษณะโมเลกุลของไซแลนและการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยไซแลน (Biely, 1985)

Ac	แทน	หมู่อะซิติล
Araf	แทน	แอล-อะราบินโนฟิวราโนส
MeGlcA	แทน	4-โอ-เมทิล-ดี-กลูโคโรนิก แอซิด
Xyl	แทน	ดี-ไซโลส

1.2 การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถย่อยสลายโดยการใช้น้ำสารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน (Tsao และ Chiang, 1983)

1.2.1 การย่อยสลายไซแลนด้วยต่าง

การย่อยสลายไซแลนด้วยต่างมักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ซึ่งจะนำขึ้นของเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นเพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ย และเป็นการกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้สารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) และก๊าซคลอรีน เป็นต้น ทำให้เกิดสารประกอบไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอรีนที่เป็นพิษชนิดอื่นๆ ด้วย (Visser และคณะ, 1992)

1.2.2 การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมี และยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นพิษ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประเภท เช่น กระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ (Jurasek และ Paice, 1992) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำน้ำผลไม้ให้ใสขึ้น และใช้ลดความหนืดของอาหารสัตว์ (Wong และ Saddler, 1992 และ Gilbert และ Hazlewood, 1993) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนประกอบด้วยเอนไซม์สองกลุ่มใหญ่คือ

1. เอนโดไซแลเนส (endo-xylanase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4- β -D-xylan-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลสิติก แบบสุ่ม เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นว่ากลไกแบบภายใน (endo-mechanism) ได้ไซโลสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Gilbert และคณะ, 1993)

2. บีตา-ไซโลสิเดส (β -xylosidase) หรือ 1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4- β -D-xylan-xylohydrolase; EC 3.2.1.37) เอนไซม์นี้จะย่อยสลายพันธะ 1,4-บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ทีละ 1 หน่วยจากปลายด้านนอนรีดิวส์ (non-reducing end) เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้น

นี้ว่ากลไกแบบภายนอก (exo-mechanism) ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Dekker และ Richards, 1976)

นอกจากนี้การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ยังต้องอาศัยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ได้แก่

แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส (α -D-glucuronidase; EC 3.2.1.139) เป็นเอนไซม์ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ที่เชื่อมระหว่างหมู่ 4-โอ-เมธิล-ดี-กลูคูโรนิค แอซิด กับสายหลัก

แอลฟา-แอล-อะราบินอซิเดส (α -L-arabinosidase; EC 3.2.1.55) ย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,3 ของหมู่บนอนรีติวส์ แอลฟา-แอล-อะราบินอซิเดส ได้นำตาลอะราบินอซิ

อะซิไทลเอสเทอเรส (acetyl esterase; EC 3.1.1.6) ย่อยสลายพันธะปีตา-1,2 และ ปีตา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างหมู่อะซิไทลกับสายหลักให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก

นอกจากไซแลเนสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายไซแลนแล้ว ปีตา-ไซโลสิเดสก็จัดเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญเช่นกันเพราะทำหน้าที่ย่อยโอลิโกเมอร์ของไซแลนให้เป็นไซโลส แม้จะมีรายงานเกี่ยวกับการโคลนยีนปีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์อื่นๆ หลายชนิด เช่น *xyiB* จาก *Butyrivibrio fibrisolvens* (Sewell และคณะ, 1989), *bgxA* ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ปีตา-กลูโคซิเดส และปีตา-ไซโลสิเดส จาก *Erwinia chrysanthemi* D1 (Vroemen และคณะ, 1995) และ *xynD* จาก *Aspergillus nidulans* (Perez-Gonzalez และคณะ, 1998) เป็นต้น แต่มีรายงานเกี่ยวกับการโคลนยีนปีตา-ไซโลสิเดสจากเชื้อ *Streptomyces* sp. จากกลุ่มอื่นเพียงฉบับเดียวคือการโคลนยีน *bxIA* ซึ่งผลิตเอนไซม์ปีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiibo และคณะ, 2001)

สำหรับในประเทศไทย จีราวรรณ ณะ (2541) ได้รายงานการโคลนยีนปีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยมี *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้านและ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 ที่แสดงออกแอกติวิตีของปีตา-ไซโลสิเดส งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาปัจจัยต่างๆต่อการแสดงออกของยีนปีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ใน *E. coli* รวมทั้งทำเอนไซม์ที่ได้ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบกับจากสายพันธุ์ดั้งเดิม *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งรายงานโดยพรรคณีย์ ตั้งสกุล (2544)

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 แหล่งของปีตา-ไฮไลซิเดส

ปีตา-ไฮไลซิเดสพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท ยีสต์ รา จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักสร้างและเก็บเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) (Biely, 1985; Bachmann และ McCarthy, 1991) แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่สร้างและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Poutanen และ Puls, 1988; Saraswat และ Bisaria, 1997) ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างปีตา-ไฮไลซิเดส แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างปีตา-ไฮไลซิเดส

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>Aeromonas caviae</i> ME-1	Suzuki และคณะ, 2001
<i>Arxula adenivorans</i>	Buttner และ Bode, 1992
<i>Aspergillus awamori</i>	Tenkanen และคณะ, 1993
<i>A. awamori</i> K4	Kurakake และคณะ, 1997
<i>A. carbonarius</i>	Kiss และ Kiss, 2000
<i>A. flavus</i>	de-Souza และคณะ, 1999
<i>A. nidulans</i>	Kumar และ Ramon, 1996
<i>A. niger</i>	Van-Peij และคณะ, 1997
<i>A. oryzae</i>	Tenkanen และคณะ, 1993
<i>A. oryzae</i> KBN616	Kitamoto และคณะ, 1999
<i>A. phoenicis</i>	Rizzatti และคณะ, 2001
<i>A. sydowii</i> MG49	Ghosh และ Nanda, 1993
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Christov และคณะ, 1999
<i>Bacillus circulans</i>	Ratto และคณะ, 1992
<i>Bacillus</i> sp. KK-1	Jung และคณะ, 1998
<i>B. stearothermophilus</i>	Cho และ Choi, 1998

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<i>B. stearothermophilus</i> 21	Baba และคณะ, 1994
<i>B. stearothermophilus</i> T-6	Bravman และคณะ, 2001
<i>B. subtilis</i>	Lindner และคณะ, 1994
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Utt และคณะ, 1991
<i>Cellulomonas flavigena</i>	Perez-Avalos และคณะ, 1996
<i>Cochliobolus carbonum</i>	Wegener และคณะ, 1999
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Lee และ Forsberg, 1987
<i>Dictyogiomus</i> sp	Ratto และคณะ, 1994
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Habraud และ Fevre, 1990
<i>Neocallimastix patriciarum</i> 27	Zhu และคณะ, 1994
<i>Neurospora crassa</i>	Deshpande และคณะ, 1986
<i>Penicillium funiculosum</i>	Park และคณะ, 2001
<i>Penicillium janthainellum</i>	Hasmann และคณะ, 2000
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Lalaoui และคณะ, 2000
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Cotta และ Whitehead, 1998
<i>Streptomyces olivochromogens</i>	Tenkanen และคณะ, 1993
<i>Streptomyces</i> sp. CH-M-1035	Flores และคณะ, 1996
<i>Streptomyces</i> sp. EC 10	Belfaquih และ Penninckx, 2000
<i>Termitomyces clypeatus</i>	Bhattacharyya และคณะ, 1997
<i>Thermomyces lanuginosus</i> strain SSBP	Singh และคณะ, 2000
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Mai และคณะ, 2000
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	Lee และ Zeikus, 1993
<i>Thermotoga thermarum</i>	Sunna และ Antranikian, 1996
<i>Trichoderma harzianum</i>	Ximenes และคณะ, 1996
<i>Trichoderma koningii</i> G-39	Li และคณะ, 2000
<i>Trichoderma reesei</i>	Herrmann และคณะ, 1997

2.2 การศึกษาบีตา-ไซโลสิเดสในระดับชีวโมเลกุล

มีรายงานเกี่ยวกับการโคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดสจากจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งการแสดงออกของยีนในรีคอมบิแนนท์เซลล์ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Panbangred และคณะ (1983) โคลนยีนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ย่อยสลายไซแลนจาก *Bacillus pumilus* โดยใช้พลาสมิดพาหะ pBR322 และมี *E. coli* C600 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบ 1 โคลนจากทั้งหมด 439 ทรานส์ฟอร์มแมนท์ ที่มีแอกติวิตีของบีตา-ไซโลสิเดสและไซแลเนส เรียกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากโคลนว่า pOXN29 ซึ่งเมื่อตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bg/III* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ชิ้นที่ 1 มีขนาด 10.15 กิโลเบส ที่ประกอบด้วยชิ้น พลาสมิดพาหะ pBR322 และชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนบีตา-ไซโลสิเดส ส่วนชิ้นที่ 2 มีขนาด 5.6 กิโลเบส ที่มียีนไซแลเนส

Sewell และคณะ (1989) โคลนยีนบีตา-ไซโลสิเดส (*xyIB*) จาก *Butyrivibrio fibrisolvens* ซึ่งมีขนาด 3.2 กิโลเบส โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะและมี *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* (มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน) พบว่าคล้ายคลึงกับเอนไซม์บีตา-ไซโลสิเดสจาก *Butyrivibrio fibrisolvens* โดยมี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.5 และความจำเพาะต่อสับสเตรทซึ่งได้แก่ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยไซโลส 2-5 โมเลกุลเหมือนกัน

Whitehead และ Hespell (1990) ได้โคลนยีนไซแลเนส, ไซโลสิเดส และอะราบินิสิเดส จาก *Bacteriodes ovatus* โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะและมี *E. coli* JM83 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าทั้ง 3 ยีนอยู่บนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.8 กิโลเบส และจากการสับโคลนพบว่ายีนไซแลเนสมีขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และแสดงออกอย่างเป็นอิสระจากยีนไซโลสิเดสและอะราบินิสิเดสซึ่งมีขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบสและมีการแสดงออกร่วมกันของทั้งสองเอนไซม์นี้

Utt และคณะ (1991) ศึกษาชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.2 กิโลเบสที่โคลนได้จากโครโมโซมของ *Butyrivibrio fibrisolvens* โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะและมี *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบยีน *xyIB* ขนาด 1.551 กิโลเบส ซึ่งเป็นรหัสสำหรับโปรตีนที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอลฟา-แอล-อะราบินิฟิวราโนสิเดส และบีตา-ไซโลสิเดส น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ได้เท่ากับ 60 กิโลดาลตัน และแอกติวิตีจำเพาะของอะราบินิสิเดสมากกว่าไซโลสิเดสประมาณ 1.6 เท่า

Flint และคณะ (1991) ศึกษาการแสดงออกของยีน *xynA* และ *xynB* ที่ได้จาก *Ruminococcus flavifaciens* 17 โดยสับโคลนยีนทั้ง 2 นี้เข้าพลาสมิดพาหะ pUC13 และใช้ *E. coli* HB101 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าโคลนที่มียีน *xynA* มีแอกติวิตีของไซแลเนส, แอกติวิตีของเซลโลไบโอสิดเอส (cellobiosidase) และไซโลลิเดสเล็กน้อย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนโดยเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่เป็นไซโลไบโอสและไซโลส ส่วนโคลนที่มียีน *xynB* มีแอกติวิตีของไซแลเนสเพียงอย่างเดียวซึ่งจะย่อยสลายไซแลนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลไบโอสและไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากทั้ง 2 ยีนนี้เท่ากับ 5.5

Pan และคณะ (1991) โคลนยีนไซแลเนส (*xynA*) และยีนปีตา-ไซโลลิเดส (*xynB*) จาก *Bacillus pumilus* โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยการแสดงออกของยีนทั้งสองต้องอาศัย GAP (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) promoter ของเซลล์เจ้าบ้าน พบว่าไซแลเนสที่ได้จาก *Saccharomyces cerevisiae* มีเมโทอินันเพิ่มขึ้นที่ปลายด้าน N (N-terminus) แต่มีแอกติวิตีจำเพาะไม่ต่างกับไซแลเนสที่ได้จาก *Bacillus pumilus* ส่วนปีตา-ไซโลลิเดสพบว่ามีแอกติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกับที่ได้จาก *Bacillus pumilus* และมีลำดับเบสที่ปลายด้าน N เหมือนกัน

Baba และคณะ (1994) โคลนยีนที่เป็นรหัสสำหรับปีตา-ไซโลลิเดส (*xyIA*) และไซแลเนส (*xynA*) จาก *Bacillus stearothermophilus* 21 เข้าสู่ *E. coli* JM109 โดยมี pUC19 เป็นพลาสมิดพาหะ ได้โคลน 13E และ 2F ที่มีขึ้นดีเอ็นเอขนาด 4.2 และ 10.6 กิโลเบส ตามลำดับ เมื่อศึกษาแผนที่เรสทริกชันของยีนพบว่าขึ้นส่วนยีนที่โคลนได้จากโคลน 13E และ 2F มีแผนที่บางส่วนคล้ายกันและมีทิศทางการแสดงออกเช่นเดียวกับโปรโมเตอร์ของ *lacZ* ซึ่งจากแผนที่เรสทริกชันของยีนและลำดับเบสพบว่ายีนทั้ง 2 ใช้โปรโมเตอร์ของตัวเอง ขนาดของยีน *xyIA* เท่ากับ 2.1 กิโลเบส ส่วนยีน *xynA* มีขนาดเท่ากับ 1.0 กิโลเบส

Fukumura และคณะ (1995) ตัดยีน *xynB* จาก *Clostridium stercorarium* F-9 โดยสับโคลนดีเอ็นเอขนาด 2.4 กิโลเบส จากพลาสมิด pMF6 ที่มียีน *xynB* เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pBluescriptIII KS⁺ และ KS⁻ ได้พลาสมิดลูกผสม pMF6-1 และ pMF6-2 ตามลำดับ โดยใช้ *E. coli* XL1-Blue เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่า *xynB* ประกอบด้วยกรอบอ่านรหัสเปิด 1 กรอบ (ORF) ที่มีขนาด 1.161 กิโลเบส เป็นรหัสสำหรับไซแลเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 44.377 กิโลดาลตัน นอกจากพบแอกติวิตีของไซแลเนสจากยีน *xynB* แล้วยังพบแอกติวิตีของเซลลูเลส, ปีตา-ไซโลลิเดส และเซลโลไบโอส

Vroemen และคณะ (1995) โคลนยีน *bgxA* ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ปีตา-กลูโคซิเดส และปีตา-ไซโลลิเดส จาก *Erwinia chrysanthemi* D1 โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะและมี *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pXYN1 ซึ่งมียีน *bgxA* ไม่เสถียรเมื่ออยู่ใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α แต่เสถียรเมื่ออยู่ในสายพันธุ์ JM109 และ HB101 และยีนนี้สามารถแสดงออกได้ดีในทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวภายใต้ *lac* promoter

Suh และคณะ (1996) โคลนยีน *xyIB* ที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ปีตา-ไซโลลิเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* โดยใช้พลาสมิดพาหะ pBR322 และมี *E. coli* HB101 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบ 6 โคลนจากทั้งหมด 10,000 ทรานส์ฟอร์มแมนท์ ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์อะราบีโนฟิวราโนซิเดส โดย 1 โคลนมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 5 กิโลเบส ซึ่งคล้ายกับยีน *arfI* ที่เป็นรหัสของแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนซิเดส (Eom และคณะ, 1995) ส่วนอีก 5 โคลนมีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.5 กิโลเบส ที่สร้างโปรตีนซึ่งแสดงแอกติวิตีทั้งแอลฟา-แอล-อะราบีโนฟิวราโนซิเดส และปีตา-ไซโลลิเดส

Perez-Gonzalez และคณะ (1998) โคลนยีนปีตา-ไซโลลิเดส (*xynD*) จาก *Aspergillus nidulans* แล้วให้แสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านคือ *Aspergillus nidulans* G191 พบว่าเอนไซม์ปีตา-ไซโลลิเดสที่สร้างมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 85 กิโลดาลตัน การแสดงออกของ *xynD* ถูกควบคุมที่ระดับการถอดรหัสโดยจะถูกชักนำด้วยไซแลนและไซโลสแต่จะถูกกด (repress) ด้วยกลูโคส

จิรวรรณ ณะ (2541) รายงานเกี่ยวกับการโคลนยีนปีตา-ไซโลลิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยใช้ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะและมี *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) ขนาดประมาณ 3.6 กิโลเบส ซึ่งมีแอกติวิตีของปีตา-ไซโลลิเดสสูงกว่าเซลล์เจ้าบ้านประมาณ 30 เท่า

Tsujibo และคณะ (2001) โคลนยีน *bxIA* ซึ่งผลิตเอนไซม์บีตา-ไซโลลิเดสจาก *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 โดยใช้ pET-BXL เป็นพลาสมิดพาหะและมี *E. coli* BL21 (DE3) pLysE เป็นเซลล์เจ้าบ้าน พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จากการแสดงออกของยีนมีน้ำหนักโมเลกุล 82 กิโลดาลตัน ซึ่งเท่ากับกับบีตา-ไซโลลิเดสจาก *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 เอนไซม์ให้แคติวิตีสูงสุดที่ความเป็นกรดต่างในช่วง 6.0-7.0 และที่ช่วงอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส

2.3 การทำบีตา-ไซโลลิเดสให้บริสุทธิ์

มีรายงานเกี่ยวกับการทำบีตา-ไซโลลิเดสจากจุลินทรีย์รีคอมบิแนนท์หลายชนิดให้บริสุทธิ์โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ กัน รวมทั้งบางรายงานมีการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Bernier และคณะ (1987) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลลิเดสที่ได้จากการโคลนยีนจาก *Bacillus subtilis* เข้าสู่ *E. coli* JM105 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยผ่านคอลัมน์ CH-Sepharose 4B ซะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์บัพเฟอร์ที่มีไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ผสมอยู่แล้ว นำมาทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟีบนคอลัมน์ P-300

Xu และคณะ (1991) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลลิเดสที่ได้จากการโคลนยีน *xynB* จาก *Bacillus pumilus* IPO เข้าสู่ *E. coli* JM103 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B ซะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยเกรเดียนท์เส้นตรงของไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ นำมาผ่านคอลัมน์เดิมอีกครั้งซะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยเกรเดียนท์เส้นตรงของไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-400 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟีบน HPLC คอลัมน์ (TSK-G3000SW) พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 70 เท่า

Hudson และคณะ (1991) ศึกษาการทำบีตา-ไซโลลิเดสให้บริสุทธิ์โดยเอนไซม์นี้ได้จากการโคลนยีนของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงและเจริญได้โดยไม่ต้องการอากาศ *Caldocellum saccharolyticum* ซึ่งแสดงออกใน *E. coli* นำเซลล์มาทำให้แตกด้วย Triton X-100 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำส่วนใสมาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose ซะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยเกรเดียนท์เส้นตรงของไซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยอัลตราฟิลเตรชัน แล้วผ่านลงในคอลัมน์ CM-Sepharose คอลัมน์ TSK Fractogel HW 55 และ

คอลัมน์ Bio-Gel HTP hydroxyapatite อะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์โดยกรดเดียนท์เส้นตรงของ โฟแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20-500 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 550 เท่า คงเหลือแอกติวิตี 4.30 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไฮโดรไลเดสโดยการใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ว่ามีค่าเท่ากับ 53,000 ดาลตัน ในขณะที่ น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไฮโดรไลเดสจากสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 76,000 ดาลตัน (Luthi และ คณะ, 1990)

Sakka และคณะ (1993) ทำบีตา-ไฮโดรไลเดสที่ได้จากการโคลนยีน *xyIA* จาก *Clostridium stercorarium* เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* JM109 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M อะโปรตีนที่จับกับ คอลัมน์ด้วยกรดเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-500 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาทำ เจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟีบน HPLC คอลัมน์ (TSK-G3000SW) พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ เพิ่มขึ้น 3.5 เท่า คงเหลือแอกติวิตี 46 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจลพบว่าประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย หน่วยละ 53,000 ดาลตัน เอนไซม์ทำงาน ได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0

Lee และ Zeikus (1993) ทำบีตา-ไฮโดรไลเดสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* (pXPH3) ที่ได้จากการโคลนยีนของ *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI ให้บริสุทธิ์ โดย เลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1 ลิตรในอาหารที่มีการเติมแอมพิซิลลิน ทำให้เซลล์แตกโดยวิธี French press นำส่วนไซมาเซนตริฟิวจ์แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น ผ่านลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออนลบ Q-Sepharose อะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยกรดเดียนท์ เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ ทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Superose-12 พบว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีแอกติวิตีเหลืออยู่ถึง 50.3 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.1 เท่า พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไฮโดรไลเดสเท่ากับ 55,000 ดาลตัน เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสและที่ค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 5.5 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เสถียรต่อค่าความเป็นกรด ต่างในช่วง 5.0-6.6

Jung และคณะ (1998) ทำปฏิตา-ไซโลลิเดสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มียีนจาก *Bacillus* sp. KK-1 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 35-75 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ Phenyl-Sepharose 2 ครั้ง ครั้งแรกชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วย เกรเดียนต์เส้นตรงของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1,000-0 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหล เท่ากับ 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ครั้งที่สองชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์เส้นตรงของ แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 400-0 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อ ชั่วโมง ตามด้วยคอลัมน์ Resource-S ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์เส้นตรงของ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-400 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาทำเจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี บนคอลัมน์ Superose 12 HR 10/30 และคอลัมน์ Hydroxyapatite พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ เพิ่มขึ้น 22.1 เท่า เหลือแอกติวิตี 3.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของปฏิตา-ไซโลลิเดสเท่ากับ 140,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย หน่วยละ 62,000 ดาลตัน เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เสถียรต่อค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6.5-10.0

Suzuki และคณะ (2001) ทำปฏิตา-ไซโลลิเดสที่ได้จากการโคลนยีน *xysB* จาก *Aeromonas caviae* ME-1 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* DH5 α ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Poros HQ ซึ่งเป็น คอลัมน์ที่แลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange column) ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วย เกรเดียนต์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาทำ เจลฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี บนคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 จากนั้นนำลำดับส่วนที่มี แอกติวิตีมาผ่านคอลัมน์ Poros HQ อีกครั้งโดยชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์เส้นตรง ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์เหลือแอกติวิตีอยู่ 19 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของปฏิตา-ไซโลลิเดสเท่ากับ 150,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย หน่วยละ 75,000 ดาลตัน เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและที่ค่า ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เสถียรต่อ ค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 5.0-8.0

Tsujibo และคณะ (2001) ศึกษาการทำปฏิกิริยา-ไฮไลซิเดสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* BL21 (DE3) pLysE ซึ่งมียีนปฏิกิริยา-ไฮไลซิเดสของ *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 ให้บริสุทธิ์โดยทำโครมาโทกราฟีบนคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วย เกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ แล้วนำมาทำเจลฟิเตรชัน โครมาโทกราฟี บนคอลัมน์ Sephadex G-100 จากนั้นนำลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีมาผ่านคอลัมน์ UNO Q และ Superdex 200 นำลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีมาผ่านคอลัมน์ UNO Q อีกครั้ง โดยชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิโมลาร์ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของปฏิกิริยา-ไฮไลซิเดสโดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลเท่ากับ 85,000 ดาลตัน ในขณะที่น้ำหนักโมเลกุลจากกรดอะมิโนเท่ากับ 82,000 ดาลตัน เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที เสถียรต่อค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6.0-7.0 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมปรากฏว่ามีสมบัติที่คล้ายคลึงกัน

ทรรศนีย์ ตั้งสกุล (2544) ศึกษาการทำปฏิกิริยา-ไฮไลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40-70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-Gel A ชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วย เกรเดียนท์เส้นตรงของโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 300-1,000 มิลลิโมลาร์ 2 รอบ จากนั้นนำมาทำเจลฟิเตรชัน โครมาโทกราฟี บนคอลัมน์ Sephadex G-200 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเจลฟิเตรชันเท่ากับ 183,000 ดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย หน่วยละ 93,000 ดาลตัน เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที เสถียรต่อค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6.0-9.0

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาปัจจัยต่างๆต่อการแสดงออกของยีนปฏิกิริยา-ไฮไลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ใน *E. coli* รวมทั้งทำเอนไซม์ที่ได้ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบกับจากสายพันธุ์ดั้งเดิม *Streptomyces* sp. CH7 ซึ่งรายงานโดยทรรศนีย์ ตั้งสกุล (2544)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environmental incubator shaker) รุ่น G-25R ของ New Brunswick Scientific Co., Inc. U.S.A.
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิดำยน้ำ (Water bath shaker) แบบ reciprocal รุ่น 1086 ของ Geosellschaft für labortechnik (GFL), Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น T-42K ของ Kontron Instrument, Italy.
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของ Kubota, Japan.
5. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (Digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของ Eutech Cybernetics, Singapore.
6. เจลแชมเบอร์ (Gel chamber) พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจลของ Mupid, Japan
7. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) รุ่น 3-3602 ของ Fotodyne, U.S.A.
8. เครื่อง Gene Pulser II Electroporation System ของ BioRad, U.S.A.
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic[®] 401 ของ Milton Roy, U.S.A.
10. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของ Sartorius, U.S.A.
11. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co., Ltd., Japan. และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan.
12. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 บริษัท ISSCO, U.S.A.
13. ตู้แช่แข็ง (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo Electronic Co., Ltd., Japan.
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของ Memmert, Germany.
15. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
16. เครื่องโครมาโทกราฟี (Low Pressure Liquid Chromatography) รุ่น Econo ของ BioRad, U.S.A.

17. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแผ่น (Slap gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของ BioRad, U.S.A.

3.2 เคมีภัณฑ์และเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์

1. เรสทริกชันเอนไซม์และเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีนของ Promega, U.S.A. และ New England Biolabs Inc., U.S.A.
2. เอนไซม์ T4-DNA ligase ของ New England Biolabs Inc., U.S.A.
3. ชุดแยกดีเอ็นเอ GENE CLEAN II kit ของ BIO 101, U.S.A.
4. พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.
5. พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ของ Sigma, U.S.A.
6. อะลูมินา (Alumina) ของ Sigma, U.S.A.
7. ดีอีเอจี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-gel A) ของ Bio-Rad, U.S.A.
8. เซฟาเดกซ์ จี-200 (Sephadex G-200) ของ Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A.
9. Ampicillin (D- α -Aminobenzylpenicillin) ของ Sigma, U.S.A.
10. IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside) ของ Sigma, U.S.A.
11. ไซแลนจากไม้เบิร์ช (Xylan from birchwood) ของ Sigma, U.S.A.
12. ไซโลส (D-Xylose) ของ Sigma, U.S.A.
13. กลูโคส (D-Glucose Monohydrate) ของ Merck, Germany
14. อะคริลามิด (Acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
15. N,N'-เมทิลีนบิสอะคริลามิด (N,N'-Methylene bis acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.
16. N,N,N',N'-เททระเมทิลีนไดอะมีน (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine, TEMED) ของ Sigma, U.S.A.
17. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) ของ Sigma, U.S.A.
18. สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-200 (Coomassie Brilliant Blue G-250) ของ Fluka, Switzerland.
19. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) ของ BDH, England.

20. 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) ของ Sigma, U.S.A.
21. ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลช่วงกว้าง (Broad range) ของ Sigma, U.S.A.

ตารางที่ 3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์	จีโนมไทป์	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	[ϕ 80dlacZ Δ M15 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) relA1 deoR</i> Δ (lacZYA-argF)U169]	Promega
<i>Escherichia coli</i> JM109	[<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) relA1 supE44</i> Δ (lac-proAB) F' <i>traD36 proAB lacI^f</i> Δ M15]	Yanish-Perron และคณะ, 1985

ตารางที่ 3.2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

พลาสมิด	พีนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pSM84	pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>SmaI</i> ขนาดประมาณ 1.6 กิโลเบส	เตรียมได้จากการทดลอง
pSM082	pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>SmaI</i> ขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส	เตรียมได้จากการทดลอง
04SM16	pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>SmaI</i> ขนาดประมาณ 0.6 กิโลเบส	เตรียมได้จากการทดลอง
04SM18	pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>SmaI</i> ขนาดประมาณ 0.4 กิโลเบส	เตรียมได้จากการทดลอง
pPst5	pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>PstI</i> ขนาดประมาณ 3.3 กิโลเบส	เตรียมได้จากการทดลอง
pSP2	pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>PstI-SacI</i> ขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส	เตรียมได้จากการทดลอง
pCH7sac	pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>SacI</i> ขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบส	เตรียมได้จากการทดลอง

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมรีคอมบิแนนท์ *E. coli* JM109

3.3.1.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาอีคอมบิแนนท์ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pCH7-1

นำเชื้ออีคอมบิแนนท์ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pCH7-1 (ภาคผนวก ค ข้อที่ 1) ที่ได้จาก การโคลนของจีราวรรณ ธนะ (2541) ซึ่งเก็บอยู่ในลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี กลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ มาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก ข้อที่ 1) 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มใน เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง บ่มเหียงเก็บเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหียงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที บ่มล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ และปั่น ล้างด้วยสารละลายซูโครสเข้มข้น 10.3 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ แบ่งเก็บเซลล์ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอดโดยเติมกลีเซอรอลลงไปจนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาเซลล์ไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.1.2 การเตรียม *E. coli* JM109 เพื่อใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการนำพลาสมิดเข้าสู่ เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (BioRad Laboratories, 1993)

ขีดแยกเชื้อ *E. coli* JM109 ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ก ข้อที่ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ถ่ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ถ่ายเซลล์ที่เตรียมได้ 3 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยง เชื้อเหลวสูตรเดิมปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำที่สภาวะ เดิมจนกระทั่งสามารถวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.5 บ่มเหียงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน น้ำใส่ทิ้งแล้วปั่นล้างที่สภาวะเดิมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร 1 รอบ และกลีเซอรอล เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 2 รอบตามลำดับ เทส่วนน้ำใส่ทิ้งแล้วเติมกลีเซอรอล ความเข้มข้นเท่าเดิมปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจาย แบ่งเก็บเซลล์ใส่หลอดไมโคร

3.3.1.4 การนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* JM109 โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (BioRad Laboratories, 1993)

ตั้งค่าเครื่องอิเล็กโทรพอเรชัน (Gene Pulser II Electroporation System ของ BioRad, U.S.A.) ให้มีค่าความต้านทานไฟฟ้าเท่ากับ 200 โอห์ม ค่าความจุไฟฟ้าเท่ากับ 25 ไมโครฟารัด และค่าความต่างศักย์เท่ากับ 2.5 กิโลวัตต์ เดิมพลาสมิดที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1.3 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ประมาณ 200 นาโนกรัม) ลงในเซลล์เจ้าบ้านที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1.2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดสำหรับทำอิเล็กโทรพอเรชันที่มีความกว้างภายในเท่ากับ 0.2 เซนติเมตร ซึ่งแช่เย็นไว้ วางหลอดลงในช่องบนแท่นสำหรับวางหลอด ดันหลอดเข้าไปให้สัมผัสกับแผ่นประจุขั้วบวกและลบให้ครบวงจร กดปุ่มทำอิเล็กโทรพอเรชัน แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่เย็นลงไปทันที ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดไมโครพิวค์ นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที นำส่วนผสมทั้งหมดมาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สังเกตโคโลนีเดี่ยวที่ขึ้นคือรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ต้องการ

3.3.2 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีการสืบโคลน

3.3.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสโอดแทรกที่มียีนบีตา-ไฮไลซิเดสจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 ที่มียีนบีตา-ไฮไลซิเดสของ *Streptomyces* sp. CH7 จาก *E. coli* DH5 α ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านตามวิธีการในข้อ 3.3.1.3 แล้วนำมาตัดแบบสมบูรณด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยผสมดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ 4 หน่วย ป่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

กำจัดเอนไซม์ออกโดยการสกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์มในสัดส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนน้ำใสไปใส่หลอดไมโครพิวค์หลอดใหม่ เติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ เติมเอทานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 15 นาที ปั่นล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 รอบที่สภาวะเดิม เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง วางทิ้งไว้ให้แห้ง แขนวลอยตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ TE แล้วนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้ชุด แยกดีเอ็นเอ GENECLEAN II kit (BIO 101, U.S.A.) ตามวิธีการในคู่มือ

3.3.2.2 การเตรียมชิ้นส่วนของพลาสมิดพาหะ

นำพลาสมิดพาหะ pUC18 มาตัดแบบสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ตามวิธี ในข้อ 3.3.2.1 แล้วนำมากำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) ตามสัดส่วนที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต (Promega, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำเช่นนี้ 2 รอบ สำหรับการเติม CIAP จะแบ่งเติมปริมาณเป็นครั้งหนึ่งต่อ 1 รอบของการบ่ม หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยาของ CIAP (ภาคผนวก ข ข้อที่ 4) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร, สารละลายโปรตีนเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และ 100 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย ในปฏิกิริยาเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

กำจัดเอนไซม์ออกโดยการสกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์มในสัดส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อ ปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนน้ำใสไปใส่หลอดไมโครพิพซ์หลอดใหม่ เติมนิโคเตียมคลอไรด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ เติมนิโคเตียมคลอไรด์ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ปั่นล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 500 ไมโครลิตร 2 รอบ ที่สภาวะเดิม เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง วางทิ้งไว้ให้แห้ง แขนวลอยตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ TE

3.3.2.3 การเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะและการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109

เชื่อม (ligate) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.1 กับพลาสมิดพาหะที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.2 เข้ากันด้วยเอนไซม์ T4-DNA ligase ในอัตราส่วนพิกโตโมลต่อพิกโตโมลเท่ากับ 5 ต่อ 1 ตามลำดับ โดยความเข้มข้นรวมของดีเอ็นเอทั้งหมดประมาณ 1.5-1.6 ไมโครกรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ T4-DNA ligase ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด (New England Biolabs, Inc., U.S.A.) เติมสารละลาย ATP เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 มิลลิโมลาร์ เติมเอนไซม์ T4-DNA ligase ให้ได้ความเข้มข้น 6 หน่วย ปริมาตรด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 7.5 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอทั้งหมดเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-13 ชั่วโมง

กำจัดเอนไซม์ออกโดยการสกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์มในสัดส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนน้ำใสไปใส่หลอดไมโครพิพิจหลอดใหม่ เติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ เติมเอทานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ปั่นล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 500 ไมโครลิตร 2 รอบที่สภาวะเดิม เทส่วนน้ำใสทิ้ง วางทิ้งไว้ให้แห้ง แขนวลอยตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE แล้วทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (สับโคลน) ที่เตรียมได้เข้าสู่ *E. coli* JM109 ตามวิธีการในข้อ 3.3.1.4

3.3.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์คือสับโคลนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 โดยมีรายละเอียดของสับโคลนต่างๆดังนี้

1. สับโคลน pSM84 คือ pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SmaI* แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.6 กิโลเบส มาเชื่อมกับ pUC18
2. สับโคลน pSM082 คือ pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SmaI* แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส มาเชื่อมกับ pUC18
3. สับโคลน 04SM16 คือ pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SmaI* แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.6 กิโลเบส มาเชื่อมกับ pUC18
4. สับโคลน 04SM18 คือ pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SmaI* แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.4 กิโลเบส มาเชื่อมกับ pUC18
5. สับโคลน pPst5 คือ pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PstI* แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.3 กิโลเบส มาทำการเชื่อมตัวเอง (re-ligate)
6. สับโคลน pSP2 คือ pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PstI-SacI* แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส มาเชื่อมกับ pUC18
7. สับโคลน pCH7sac คือ pCH7-1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบส มาทำการเชื่อมตัวเอง (re-ligate)

นำแต่ละสับโคลนมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี dideoxynucleotide chain termination โดยใช้ universal forward และ reverse primers ที่เหมาะสม ซึ่งดำเนินการโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS แล้วเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastP version 2.2.1 และ BlastN version 2.2.1

3.3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลสิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

3.3.4.1 การศึกษาผลของ IPTG ต่อการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลสิดีส

นำรีคอมบิแนนท์ *E. coli* DH5 α และ JM109 ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.3.1.4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติม IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0, 0.2, 0.5 และ 0.75 มิลลิโมลาร์ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง บั่นเหวียงเก็บเซลล์โดยใช้เครื่องบั่นเหวียงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บั่นล้างเซลล์ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.5 (ภาคผนวก ข ข้อที่ 5) 2 รอบ ที่สภาวะเดิม เทส่วนน้ำใส่ทิ้งแล้วนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยบดรวมกับผงอะลูมินาในโกร่ง ด้วยอัตราส่วน น้ำหนักเซลล์เปียกต่อผงอะลูมินาเท่ากับ 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.5 ลงไปในปริมาตรน้อยที่สุดเพื่อเป็นตัวทำลาย นำส่วนผสมที่ได้ไปบั่นเหวียงโดยใช้เครื่องบั่นเหวียงชนิดควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใส่ที่ได้ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของบีตา-ไซโลสิดีส และปริมาณโปรตีนเพื่อคำนวณหาแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

3.3.4.1.1 การตรวจสอบแอกติวิตีของบีตา-ไซโลสิดีส

การตรวจสอบแอกติวิตีของบีตา-ไซโลสิดีสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Nakanishi และคณะ (1987) โดยสารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนอล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 และสารละลายบีตา-ไซโลสิดีส ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยาผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องบั่นผสม (vortex mixer) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1 หน่วยของปีตา-ไฮโลลิเดส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนอล ปีตา-ดี-ไฮโลไพราโนไซด์ แล้วให้ พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะข้างต้น

3.3.4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก ข ข้อที่ 6) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ข ข้อที่ 6) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.4.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการแสดงออกของยีนปีตา-ไฮโลลิเดส

นำเชื้อรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้ภาวะการชักนำที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 แปรชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบดังนี้ ไส้แลน, ไส้โลส และกลูโคส ที่ 0, 0.2, 0.5 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นแยกเก็บเซลล์ นำมาเตรียมปีตา-ไฮโลลิเดสและวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.4.1

3.3.4.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อต่อการแสดงออกของยีนปีตา-ไฮโลลิเดส

นำรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.2 แปรระยะเวลาการบ่มเชื้อที่ 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกเก็บเซลล์

นำมาเตรียมปีตา-ไซโลสิดีสและวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.3.4.1

3.3.5 การทำปีตา-ไซโลสิดีสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ให้บริสุทธิ์

นำ *E. coli* DH5 α มาเลี้ยงภายใต้ภาวะที่เหมาะสมและเตรียมปีตา-ไซโลสิดีสตามวิธีการในข้อ 3.3.4 เพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์

3.3.5.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.3.5.1.1 การทำปีตา-ไซโลสิดีสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีไอเออี ไบโอ-เจล เอ

ล้างสารแขวนลอยดีไอเออี ไบโอ-เจล เอ ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจลนอนกัน เทส่วนน้ำใส่พร้อมกับเจลละเอียด (fine particles) ที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆครั้งจนไม่มีเม็ดเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ ครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 นำเจล, คอลัมน์ และสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้ไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สูญญากาศประมาณ 15-30 นาที 2-3 ครั้ง แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 25 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 44.19 มิลลิลิตร ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายเอนไซม์ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับดีไอเออี ไบโอ-เจล เอ ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออกโดยใช้ 300-1000 มิลลิโมลาร์ โฟแทสเซียมคลอไรด์เกรดเดียนทีใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล เก็บลำดับส่วนละ 1.6 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวบรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีของปีตา-ไซโลสิดีสสูงเข้าด้วยกัน ลดปริมาตรตัวอย่างโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube (Vivaspin จาก VivaScience, Sartorius AG, Göttingen, Germany) ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล (molecular weight cut-off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำไปเติมกลีเซอรอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้, แอกติวิตี และปริมาณโปรตีน

3.3.5.1.2 การทำปิตา-ไซโลสดีเอสบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

แซเซฟาเด็กซ์ จี-200 ในน้ำกลั่นปริมาณมากเกินพอ โดยค่อยๆไปเรียงเจลลงในน้ำกลั่น ใช้แท่งแก้วทวนเบาๆให้เจลแขวนลอยเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อให้เจลพองตัวเต็มที่ ปล่อยให้เย็น เทส่วนน้ำใส่พร้อมเจลละเอียด (fine particles) ที่ทำเช่นนี้หลายครั้ง ครั้งสุดท้ายแช่เจลใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 50 มิลลิโมลาร์ โฟแทสเซียมคลอไรด์ ผสมอยู่ นำเจล, คอลัมน์ และสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้ไปกำจัดฟองอากาศออกโดยวิธี sonication ภายใต้สุญญากาศประมาณ 15-30 นาที 2 ครั้ง แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร สูง 25 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 19.64 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 50 มิลลิโมลาร์ โฟแทสเซียมคลอไรด์ และ 15 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ผสมอยู่ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำปิตา-ไซโลสดีเอสที่ได้จากข้อ 3.3.3.1.1 มาใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์เดิม เก็บลำดับส่วนละ 0.3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีในแต่ละลำดับส่วน รวบรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีสูงเข้าด้วยกัน นำไปลดปริมาตรตัวอย่างโดยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ซึ่งมีเมมเบรนที่มีการคัดขนาดโมเลกุล (molecular weight cut-off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำไปเติมกลีเซอรอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้, แอกติวิตี และปริมาณโปรตีน

3.3.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของปิตา-ไซโลสดีเอส โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Native polyacrylamide gel electrophoresis) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)

ประกอบแผ่นแก้วขนาด 8.3 x 10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3 x 10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข ข้อที่ 7) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ชับน้ำออก เทสารละลายผสมสแตคกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข ข้อที่ 7) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้

จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอีเลคโตรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อที่ 7) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอีเลคโตรโฟรีซิส เต็มอีเลคโตรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอีเลคโตรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานมาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข ข้อที่ 7) เตรียมให้ได้ความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเท่ากัน หยอดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการอีเลคโตรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว และย้อมสีโปรตีน (Dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน สำหรับการย้อมแอกติวิตี (activity staining) ทำโดยแช่เจลในพารา-ไนโตรฟีนอล ปิตา-ดี-ไฮโดไพราโนไซด์ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบสีเหลืองของพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น

3.3.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของปีตา-ไฮโลสิเดส

3.3.7.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของปีตา-ไฮโลสิเดส โดยการทำให้เจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ คะตะเลส, โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และไซโทโครม ซี ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 232,000, 66,000 และ 13,237 ดาลตัน ตามลำดับ ลงในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200 ในภาวะเดียวกับที่ใช้ทำปีตา-ไฮโลสิเดสให้บริสุทธิ์ในข้อ 2.3.3.1.2 นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.7.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสดีส โดยการใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)

นำบีตา-ไซโลสดีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และติดตามด้วยการย้อมแอมคริตวีดีแล้วแยกออกจากเจล และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 8.3×10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.3×10.2 เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง ประกบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล เทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข ข้อที่ 8) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ชับน้ำออก เทสารละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข ข้อที่ 8) ให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อที่ 8) นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกบเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เติมน้ำอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานมาเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะใช้วิเคราะห์ (sample buffer) (ภาคผนวก ข ข้อที่ 8) หยอดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วทำการ อิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว และย้อมสีโปรตีน (Dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสดีสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของบีตา-ไซโลสดีสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

3.3.8 การศึกษาสมบัติของบีตา-ไซโลลิสเดสจากกรีกอคมบีแนนท์ *E. coli*

3.3.8.1 คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลลิสเดส

นำบีตา-ไซโลลิสเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.4.1.1 โดยแปรคุณสมบัติที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35-70 องศาเซลเซียส

3.3.8.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงานของบีตา-ไซโลลิสเดส

นำบีตา-ไซโลลิสเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.4.1.1 โดยแปรความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างๆดังนี้

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0-6.5
100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0-8.0
100 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0-9.0

3.3.8.3 ความเสถียรของบีตา-ไซโลลิสเดสต่ออุณหภูมิ

บ่มบีตา-ไซโลลิสเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิในช่วง 40-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอกติวิตีของบีตา-ไซโลลิสเดสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.1.1 โดยมีบีตา-ไซโลลิสเดสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.3.8.4 ความเสถียรของบีตา-ไซโลลิสเดสต่อความเป็นกรดต่าง

บ่มบีตา-ไซโลลิสเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่ pH 4.0-9.5 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆดังระบุในข้อ 3.3.6.2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหาแอกติวิตีของบีตา-ไซโลลิสเดสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในข้อ 3.3.4.1.1 โดยมีบีตา-ไซโลลิสเดสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลลิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ใน *E. coli*

จิราวรรณ ณะ (2541) โคลนยีนบีตา-ไซโลลิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7 โดยใช้ *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 ที่สามารถแสดงออกแอคติวิตีของบีตา-ไซโลลิดีส งานวิจัยนี้ต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนนี้โดยแปรปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน

E. coli สายพันธุ์ DH5 α ไม่มี *lac* i^f ส่วน JM109 มี *lac* i^f ที่ทำให้มีการผลิตรีเพรสเซอร์ต่อ p_{lac} ในปริมาณสูง ยีนที่แสดงออกภายใต้ p_{lac} จึงต้องมีไอโซโพรพิล-บีตา-ดี-ไทโอกาแลคโตไพราโนไซด์ (Isopropyl- β -D-thiogalacto pyranoside, IPTG) เป็นสารชักนำ งานวิจัยนี้จึงได้ทรานสฟอร์ม pCH7-1 เข้าสู่ *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลลิดีสเมื่ออยู่ภายใต้ปัจจัยต่างๆ

4.1.1 ผลของ IPTG

จากการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้รับ pCH7-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติม IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆกันในช่วง 0-0.75 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ผลการทดลองในตารางที่ 4.1 พบว่า IPTG ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลลิดีสในเซลล์เจ้าบ้าน DH5 α ขณะที่เซลล์เจ้าบ้าน JM109 ต้องการ IPTG อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันมากนักที่ความเข้มข้นต่างๆกันของ IPTG และเมื่อเปรียบเทียบกับ DH5 α แล้ว IPTG ก็ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนนี้ใน JM109 ให้สูงขึ้น

จากข้อมูลข้างต้นจึงเลือกเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์และไม่เติม IPTG สำหรับรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และ DH5 α ตามลำดับ สำหรับการศึกษปัจจัยอื่นๆต่อไป

ตารางที่ 4.1 ผลของ IPTG ต่อการแสดงออกของยีนบีตา-ไฮโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ใน *E. coli* DH5 α และ JM109

ความเข้มข้นของ IPTG (มิลลิโมลาร์)	DH5 α			JM109		
	แอกติวิตี (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	แอกติวิตี จำเพาะ (หน่วยต่อ มิลลิกรัม โปรตีน)	แอกติวิตี (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	แอกติวิตี จำเพาะ (หน่วยต่อ มิลลิกรัม โปรตีน)
0	0.305	2.919	0.104	0.034	3.496	0.010
0.2	0.385	3.948	0.098	0.178	2.889	0.062
0.5	0.288	3.326	0.087	0.105	2.044	0.051
0.75	0.292	2.970	0.098	0.167	2.541	0.066

4.1.2 ผลของแหล่งคาร์บอน

สุมาลี อึ้งใจธรรม (2539) ศึกษาการผลิตบีตา-ไฮโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 พบว่าการสร้างเอนไซม์นี้ต้องการไฮโดรเจนเป็นสารชักนำ งานวิจัยนี้จึงแปรแหล่งคาร์บอนต่างๆเพื่อศึกษาว่ามีผลต่อการแสดงออกของยีนบีตา-ไฮโลสิเดสจากเชื้อดังกล่าวหรือไม่เมื่ออยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์

จากการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในข้อ 4.1.1 แปรชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์ และกลูโคส ที่ 0-0.75 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ผลการทดลองในตารางที่ 4.2 พบว่าเมื่อเติมไฮโดรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์แอกติวิตีจำเพาะของบีตา-ไฮโลสิเดสที่ได้จะสูงขึ้น ในขณะที่เมื่อเติมไฮโดรเจนและกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์กลับมีผลไปลดแอกติวิตีของบีตา-ไฮโลสิเดสต่างๆที่ปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไฮโดรเจนมากนัก จึงเลือกที่จะใส่ไฮโดรเจนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาปัจจัยต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการแสดงออกของยีนปีตา-ไฮไลซิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ใน *E. coli* DH5 α และ JM109

ความเข้มข้นของ แหล่งคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	DH5 α			JM109		
	แอกติวิตี (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	แอกติวิตี จำเพาะ (หน่วยต่อ มิลลิกรัม โปรตีน)	แอกติวิตี (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	แอกติวิตี จำเพาะ (หน่วยต่อ มิลลิกรัม โปรตีน)
ไม่เติมแหล่ง คาร์บอน	0.340	3.178	0.107	0.131	2.576	0.051
<u>ไซแลน</u>						
0.2	0.479	3.743	0.128	0.301	3.582	0.084
0.5	0.442	3.652	0.121	0.254	3.387	0.075
0.75	0.412	3.579	0.115	0.229	3.268	0.070
<u>ไซโลส</u>						
0.2	0.082	3.915	0.021	0.049	3.249	0.015
0.5	0.045	3.236	0.014	0.026	2.933	0.009
0.75	0.032	3.231	0.010	0.022	2.785	0.008
<u>กลูโคส</u>						
0.2	0.054	4.534	0.012	0.026	2.878	0.009
0.5	0.030	3.735	0.008	0.016	2.322	0.007
0.75	0.025	3.561	0.007	0.012	2.289	0.005

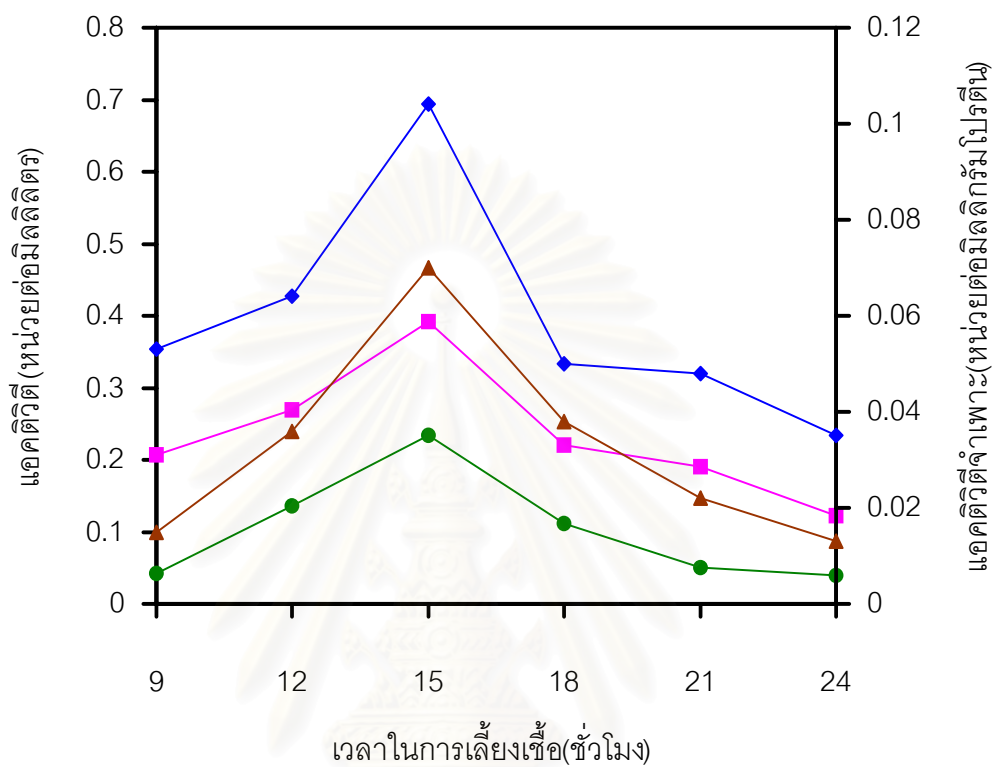
4.1.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1.2 โดยแปรระยะเวลาบ่มเชื้อที่ 9,12,15,18,21 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 4.1 พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ให้แอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 15 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาปัจจัยต่างๆต่อการแสดงออกของยีนบีตา-ไฮไลดีเอสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ DH5 α สามารถผลิตเอนไซม์บีตา-ไฮไลดีเอสที่มีแอกติวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ JM109 ดังนั้นในการศึกษาสมบัติของบีตา-ไฮไลดีเอสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* จึงเลือกสายพันธุ์ DH5 α เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อกับการแสดงออกของยีนบีตา-ไซโลสิดเอสในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และ JM109

- แอดคิตวีตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร) ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α
- ◆ แอดคิตวีตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α
- แอดคิตวีตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร) ของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109
- ▲ แอดคิตวีตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109

4.2 การทำปิตา-ไซโลสิดสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* DH5 α ให้บริสุทธิ์

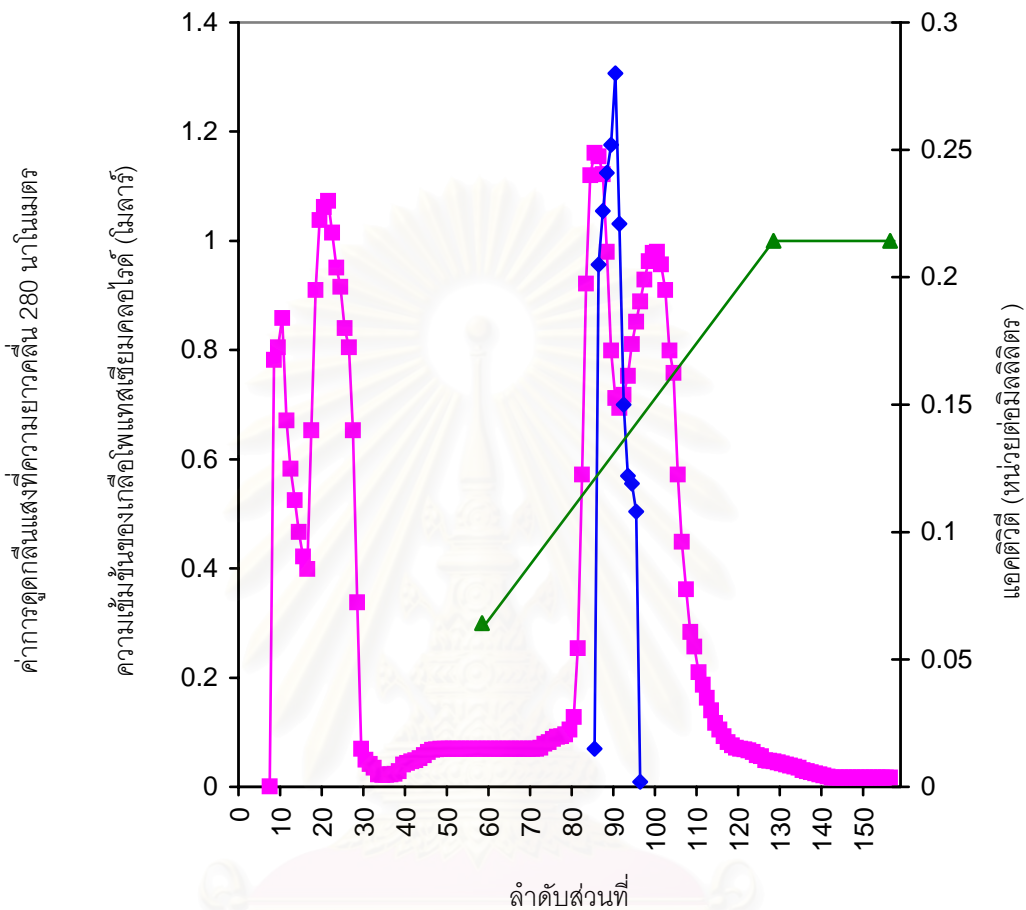
4.2.1 การทำปิตา-ไซโลสิดสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.2.1.1 โครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

ทรรศนีย์ ตั้งสกุล (2544) ได้รายงานการทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของปิตา-ไซโลสิดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 งานวิจัยนี้จึงได้นำปิตา-ไซโลสิดสที่ได้จากการแสดงออกของยีนปิตา-ไซโลสิดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ใน *E. coli* มาทำให้บริสุทธิ์พร้อมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์นี้เพื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์จากเชื้อดั้งเดิม

โดยนำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากการบดเซลล์แล้วละลายใน 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 98.67 มิลลิกรัมภายหลังจากกำจัดเศษเซลล์ออกแล้วและมีแอกติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 6.00 หน่วย มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนอออนลบ (Anion exchanger) ดังวิธีการในข้อ 3.3.5.1.1 พบว่าเอนไซม์จับกับตัวกลางชนิดนี้ ดังนั้นจึงสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ออกไปได้ และยังสามารถกำจัดโปรตีนที่มีประจุต่างกับเอนไซม์มากๆออกไปโดยการชะด้วยเกรเดียนท์ของเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.3-1.0 โมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 4.2 พบว่า ปิตา-ไซโลสิดส ถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 85-95 ซึ่งมีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.58-0.64 โมลาร์ เมื่อรวมลำดับส่วนที่มีแอกติวิตีเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นแล้ววัดปริมาตรรวมได้ 3.0 มิลลิลิตร มีแอกติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 2.15 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 13.75 มิลลิกรัม แอกติวิตีจำเพาะ 0.16 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.67 เท่า และยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 35.83 เปอร์เซ็นต์

สถาบันนวัตกรรมการ
จุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 การทำปฏิกิริยา-ไซโลสิเดสให้กับวัสดุโดยคอลล์มันน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

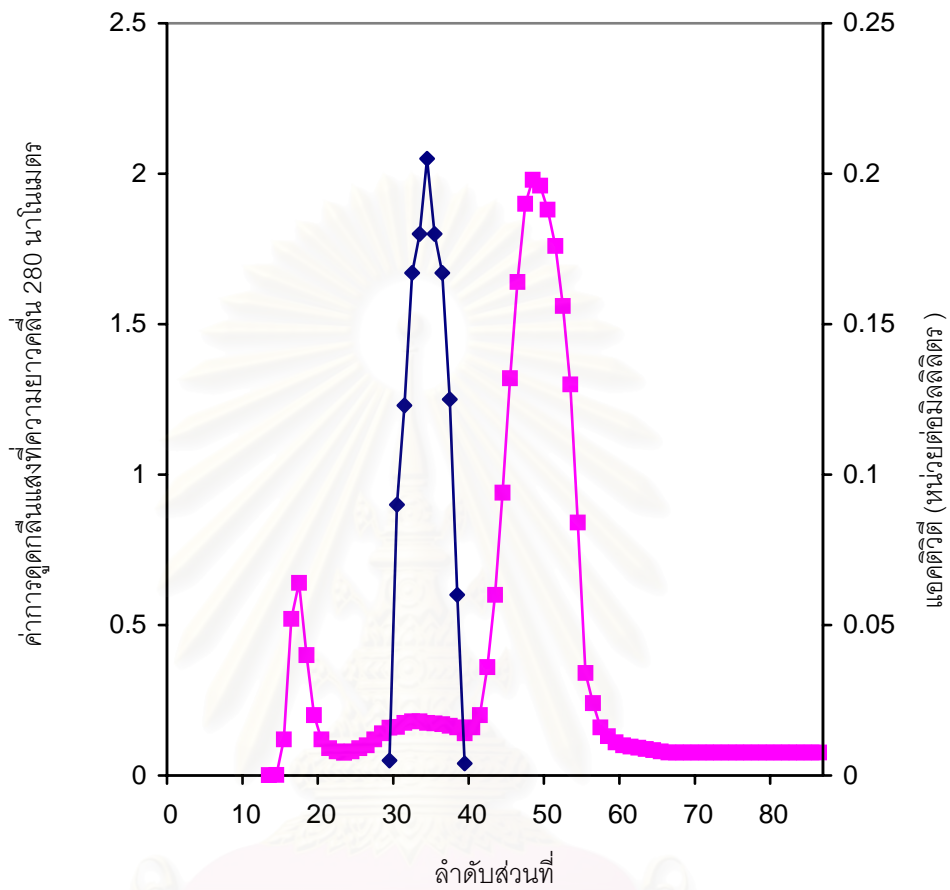
- ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- ◆ ค่าของแอสติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
- ▲ ความเข้มข้นของเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ (โมลาร์)

4.2.1.2 โครมาโทกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200

นำเอนไซม์ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไปโอ-เจล คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 13.75 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ผลการทดลองในรูปที่ 4.3 พบว่าปีตา-ไซโลสิดีสถูกชะออกมาหลัง void volumn ในลำดับส่วนที่ 29-39 เมื่อรวมลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกันวัด แอคติวิตีรวมได้ 0.32 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.99 มิลลิกรัมและแอคติวิตีจำเพาะ 0.32 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.33 เท่า และยังคงเหลือแอคติวิตีอยู่ 5.33 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองในข้อ 4.2.1.1 และ 4.2.1.2 พบว่าปีตา-ไซโลสิดีสที่ได้จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* มีรูปแบบการถูกชะออกจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีทั้ง 2 ชนิดคล้ายคลึงกับปีตา-ไซโลสิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ที่รายงานโดยทรรศนีย์ ตั้งสกุล (2544)

ขั้นตอนและผลการทำปีตา-ไซโลสิดีสจากเชื้อรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ให้บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.3 การทำปฏิกิริยา-ไซโลสดีเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-200

- ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- ◆ ค่าของแอดติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 4.3 ขั้นตอนการทำปิตา-ไซโลสิเดสจากเชื้อรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอกติวิตี ทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีน ทั้งหมด (มก.)	แอกติวิตี จำเพาะ (หน่วยต่อ มก.โปรตีน)	แอกติวิตี (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดเอนไซม์	7	6.00	98.67	0.06	100	1
ดีอีเออี ไบโอ-เจล อะกาโรส	3	2.15	13.75	0.16	35.83	2.67
เซฟาเดกซ์ จี 200	1	0.32	0.99	0.32	5.33	5.33

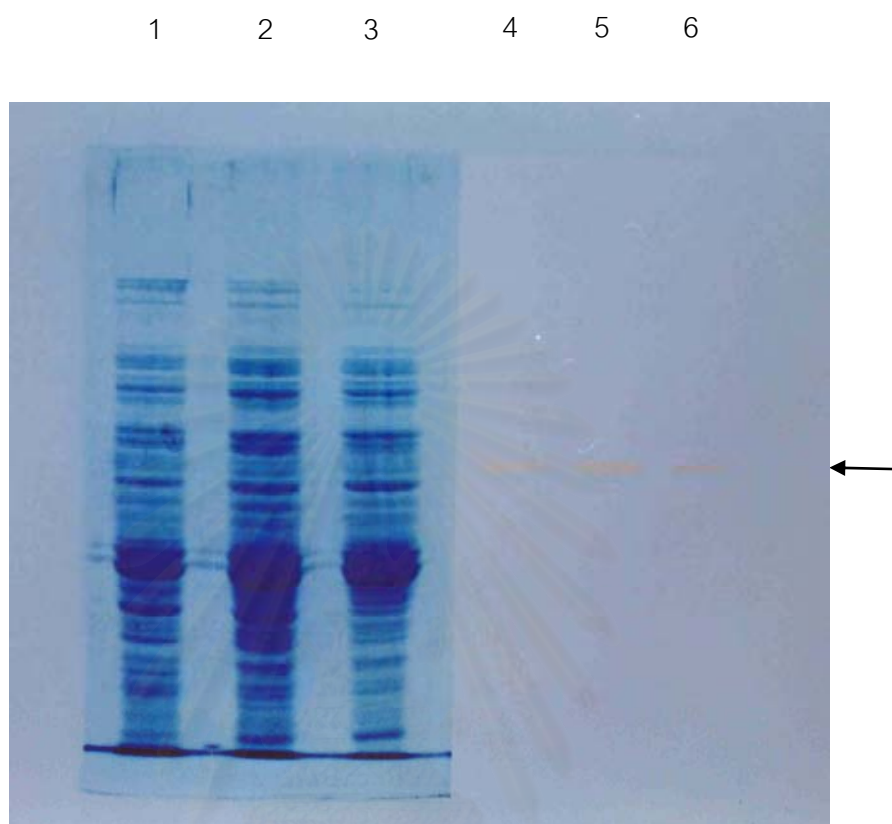
4.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของปิตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นตัดแผ่นเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปย้อมสีโปรตีน (Dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู อีกส่วนหนึ่งนำไปย้อมแอกติวิตี (Activity staining) โดยใช้ 2.5 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนอล ปิตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 จากการย้อมด้วยสีคูแมสซี บลู พบว่า ปิตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนนั้นยังคงมีแถบโปรตีนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อตรวจสอบว่าแถบโปรตีนใดเป็นปิตา-ไซโลสิเดส จึงได้นำเจลส่วนที่ย้อมแอกติวิตีมาเปรียบเทียบกับแถบสีเหลืองจะแสดงแอกติวิตีของปิตา-ไซโลสิเดสที่ย่อยสลายพารา-ไนโตรฟีนอล ปิตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ แล้วได้พารา-ไนโตรฟีนอลซึ่งเป็นสารสีเหลือง ผลการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่าแถบโปรตีนที่แสดงแอกติวิตีของปิตา-ไซโลสิเดสไม่ใช่แถบโปรตีนหลัก (major protein) ซึ่งให้แถบสีน้ำเงินเข้ม

จากนั้นได้พยายามทำเอนไซม์นี้ให้บริสุทธิ์เพื่อให้ถึงระดับโปรตีนเดี่ยว (homogeneity) โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะนำตัวอย่างไปใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จึงนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนเซฟาเด็กซ์ จี-200 มาทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วย้อมแอกติวิตี ตัดเจลเฉพาะแถบสีเหลือง สะโปรตีนออกมาและทำให้เข้มข้นโดยการปั่นเหวี่ยงใน concentrator tube ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยแสดงแถบหนาของเอนไซม์ 1 แถบ แต่ก็ยังมีแถบของโปรตีนปนเปื้อนอยู่เล็กน้อย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน
ขั้นตอนต่างๆ

แถวที่ 1-3 ย้อมสีด้วยสีคูแมสซี บลู

แถวที่ 4-6 ย้อมแอกติวิตี้ด้วยพารา-ไนโตรฟินิล ปีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์

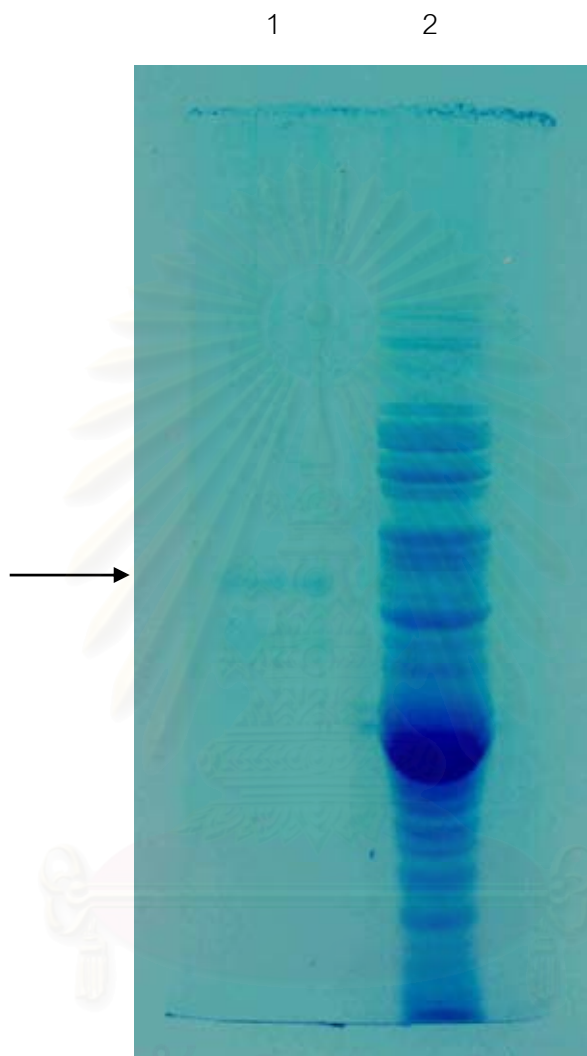
(ทุกตัวอย่างใช้ปริมาณโปรตีน 7 ไมโครกรัม)

แถวที่ 1 สารสกัดเอนไซม์

แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี โบโอ-เจล เอ

แถวที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

แถวที่ 4-6 สารสกัดเอนไซม์



รูปที่ 4.5 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 และที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งได้จากการย้อมแอดคิวิตี

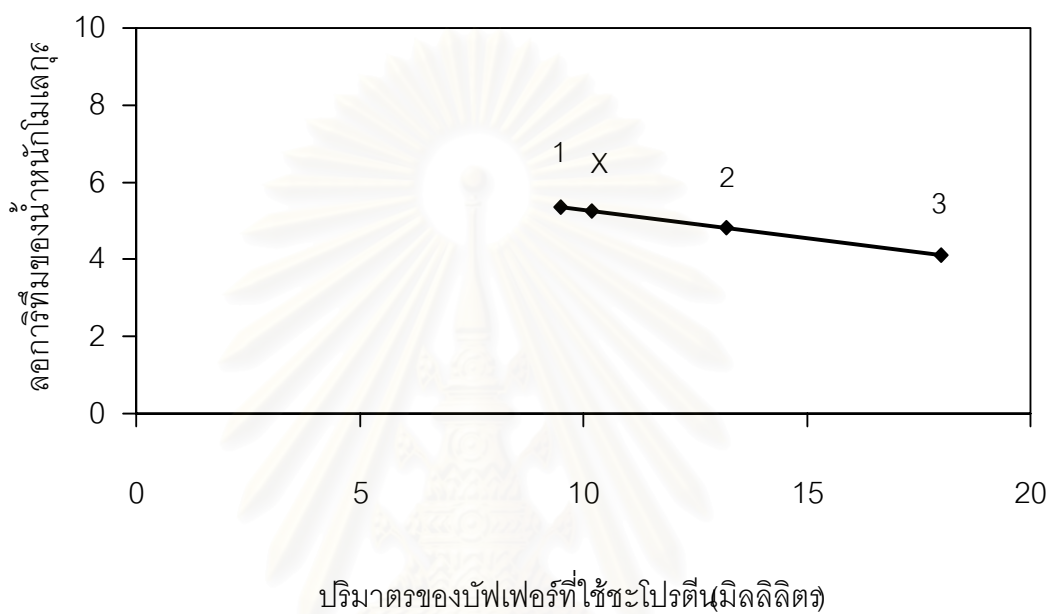
แถวที่ 1 เอนไซม์ที่ชะออกจากพอลิอะคริลาไมด์เจล ย้อมสีด้วยสีคูแมสซี บลู
(ปริมาณโปรตีน 1 ไมโครกรัม)

แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 (ปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม)

4.4 การวิเคราะห์น้ำหมักโมเลกุลของบีตา-ไฮไลซิเดส

4.4.1 การหาน้ำหมักโมเลกุลของบีตา-ไฮไลซิเดสโดยการทำให้เจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

การทดลองนี้ได้หาน้ำหมักโมเลกุลของบีตา-ไฮไลซิเดสโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน โดยใช้โปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ได้แก่ คะตะเลส โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน และ ไฮโดโครม ซี ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 232,000, 66,000 และ 13,237 ดาลตัน ตามลำดับ เป็นโปรตีนมาตรฐานผ่านโปรตีนเหล่านี้ลงบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ซึ่งเป็นคอลัมน์เดียวกันและภายใต้สภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในการทำบีตา-ไฮไลซิเดสให้บริสุทธิ์ ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองที่ 3.3.5.1.2 และติดตามลำดับส่วนที่โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะโปรตีนออกมาจากคอลัมน์ได้ผลดังรูปที่ 4.6 จากกราฟดังกล่าวพบว่าบีตา-ไฮไลซิเดสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 178,000 ดาลตัน



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับปริมาณที่ใช้ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

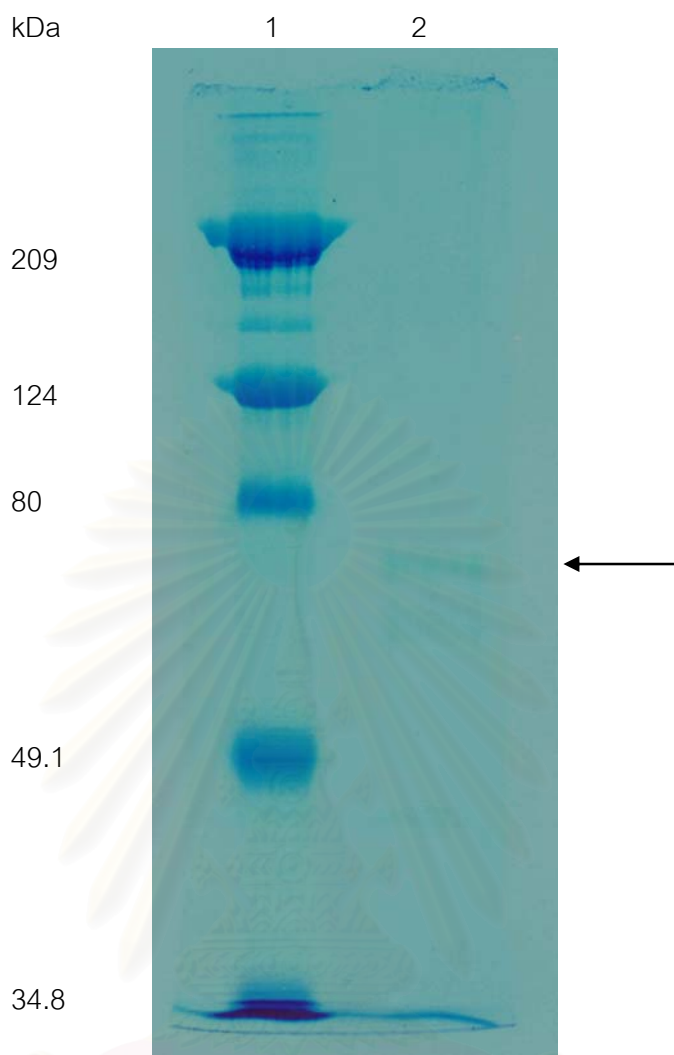
1. คะตะเลส	น้ำหนักโมเลกุล	232,000	ดาลตัน
2. โบวไนซีรั่มอัลบูมิน	น้ำหนักโมเลกุล	66,000	ดาลตัน
3. ไฮโดโครม ซี	น้ำหนักโมเลกุล	13,237	ดาลตัน
X คือ บีตา-ไฮโลสิเดส			

4.4.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของปีตา-ไซโลไซด์ โดยการใช้อัลตราไวโวลต์เรโซแนนซ์ฟลูออเรสเซนซ์และ ซิลิซิลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล

นำปีตา-ไซโลไซด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอัลตราไวโวลต์เรโซแนนซ์ฟลูออเรสเซนซ์และติดตามด้วยการย้อมแอสติวดีแล้วแยกออกจากเจล มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้อัลตราไวโวลต์เรโซแนนซ์ฟลูออเรสเซนซ์และซิลิซิลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 และจากการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนซิลิซิลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล แสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 75,000 ดาลตัน และเมื่อประเมินร่วมกับผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลเพอร์เมเอชันซึ่งมีค่าประมาณ 178,000 ดาลตัน จึงคาดว่าปีตา-ไซโลไซด์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



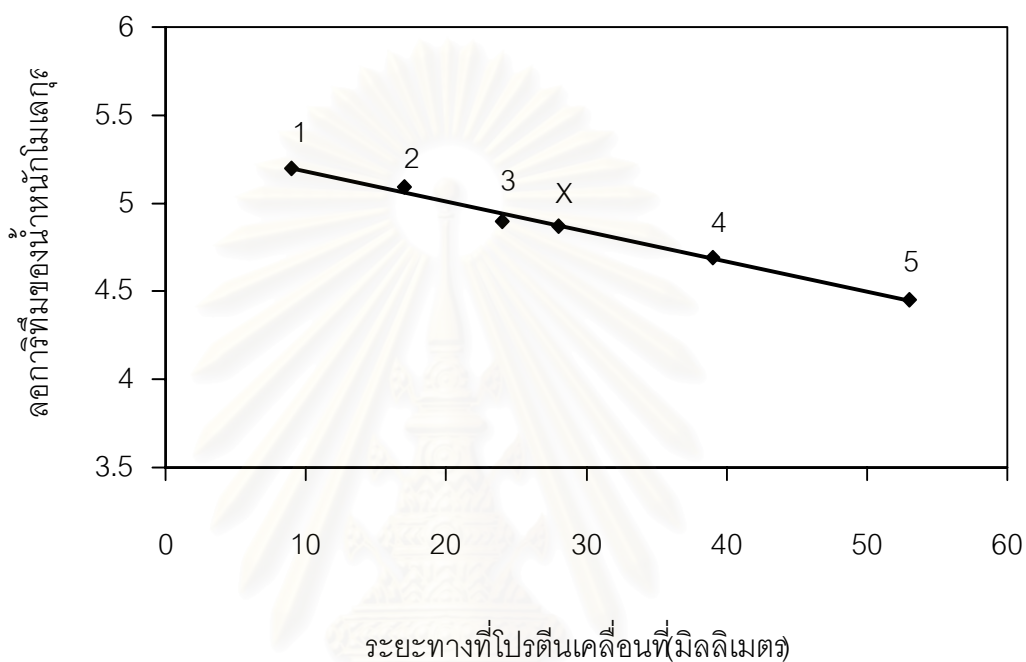
รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลสิดีส โดยการทำให้เลคโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจล

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลช่วงกว้าง

แถวที่ 2 บีตา-ไซโลสิดีสที่ผ่านการทำให้เลคโทรโฟรีซิส (1 ไมโครกรัม)

โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลช่วงกว้างได้แก่

ไมโอซิน (Myosin)	น้ำหนักโมเลกุล	209,000	ดาลตัน
บีตา-กาแลคโตสิดีส (β -Galactosidase)	น้ำหนักโมเลกุล	124,000	ดาลตัน
โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin)	น้ำหนักโมเลกุล	80,000	ดาลตัน
โอวัลบูมิน (Ovalbumin)	น้ำหนักโมเลกุล	49,100	ดาลตัน
คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล	34,800	ดาลตัน



รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟรีซิส

1. ไมโอซิน (Myosin)	น้ำหนักโมเลกุล	209,000	ดาดตัน
2. บีตา-กาแลคโตไซด์ (β-Galactosidase)	น้ำหนักโมเลกุล	124,000	ดาดตัน
3. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin)	น้ำหนักโมเลกุล	80,000	ดาดตัน
4. โอวัลบูมิน (Ovalbumin)	น้ำหนักโมเลกุล	49,100	ดาดตัน
5. คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase)	น้ำหนักโมเลกุล	34,800	ดาดตัน

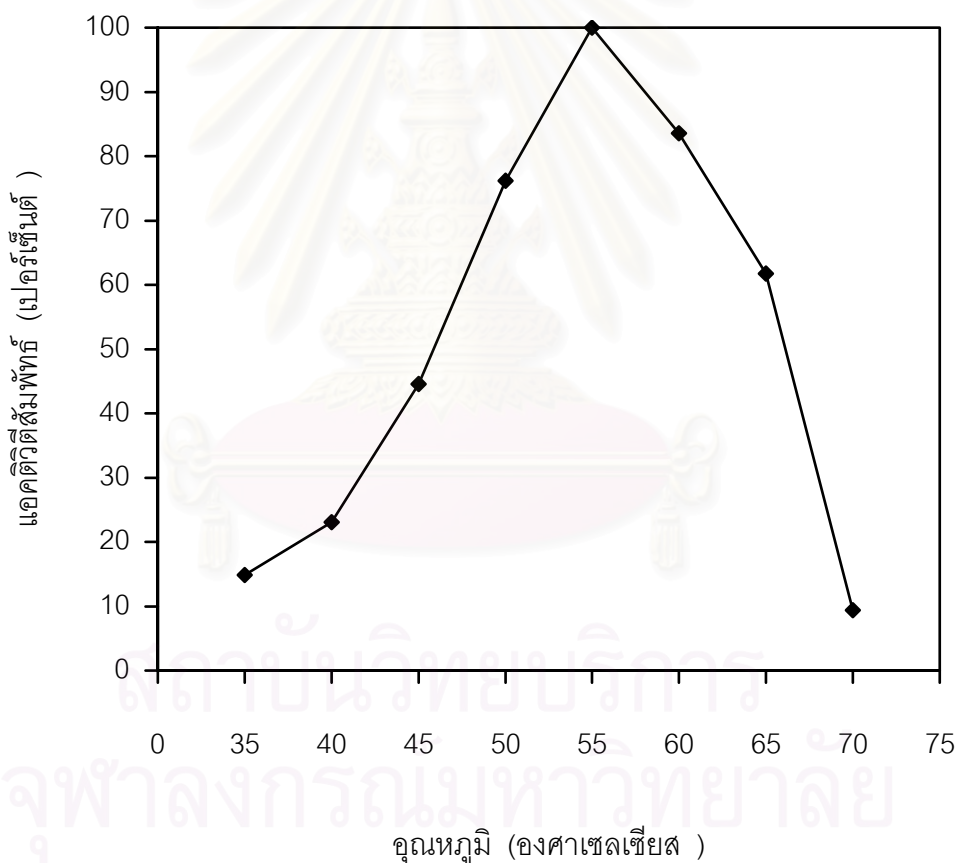
X คือ บีตา-ไฮโลไซด์

4.5 การศึกษาสมบัติของปีตา-ไซโลสิเดสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วดังกล่าวข้างต้น มาศึกษาสมบัติต่างๆดังต่อไปนี้

4.5.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของปีตา-ไซโลสิเดส

จากการนำปีตา-ไซโลสิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณเท่าๆกัน มาหาแอกติวิตี โดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35-70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ให้แอกติวิตีสูงสุด ดังรูปที่ 4.9

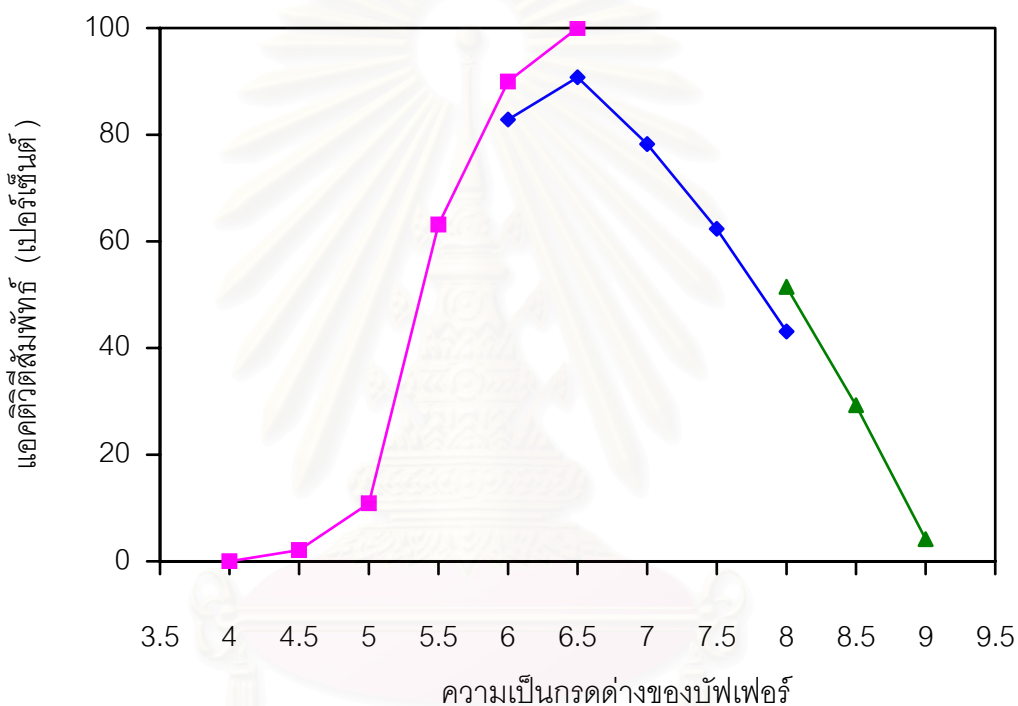


รูปที่ 4.9 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของปีตา-ไซโลสิเดส

กำหนดให้แอกติวิตีสัมพัทธ์ ณ อุณหภูมิที่แอกติวิตีของปีตา-ไซโลสิเดสสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

4.5.2 ผลของความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของบีตา-ไซโลลีสเดส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของบีตา-ไซโลลีสเดสโดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 6.0-7.0 โดยที่ pH 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นี้



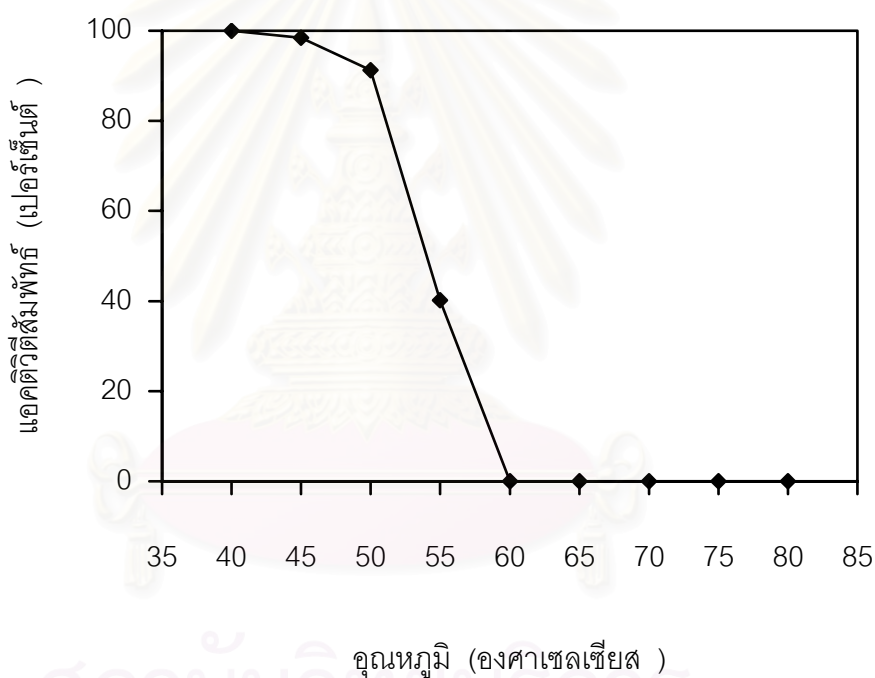
รูปที่ 4.10 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลลีสเดส

- อะซิเตทบัฟเฟอร์
- ◆ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- ▲ ทริสบัฟเฟอร์

กำหนดให้แอกติวิตีสัมพัทธ์ ณ ความเป็นกรดต่างที่แอกติวิตีของบีตา-ไซโลลีสเดสสูงสุด เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

4.5.3 ความเสถียรของบีตา-ไฮโลสிடีสต่ออุณหภูมิ

นำบีตา-ไฮโลสிடีสมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 40-80 องศาเซลเซียส บ่มนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอกติวิตีที่เหลือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าบีตา-ไฮโลสிடีสมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 45 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่สูงถึงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอกติวิตีอย่างสิ้นเชิงที่ 60 องศาเซลเซียส

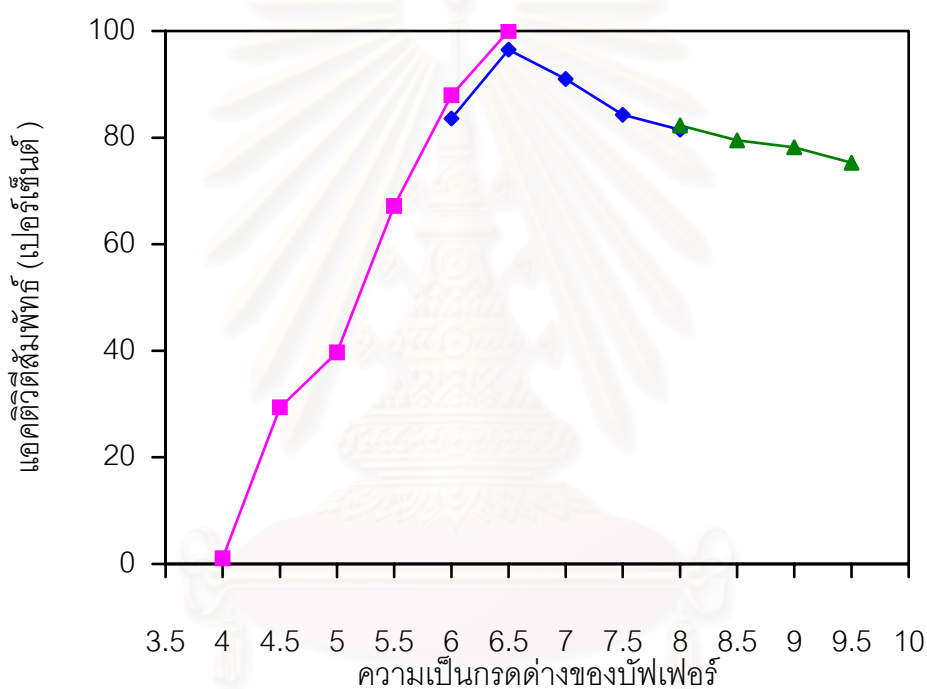


รูปที่ 4.11 ความเสถียรของบีตา-ไฮโลสிடีสต่ออุณหภูมิ

กำหนดให้แอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

4.5.4 ความเสถียรของบีตา-ไฮโลสிடีสต่อความเป็นกรดต่าง

เมื่อนำบีตา-ไฮโลสிடีสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาบ่มในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่มีความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหาแอกติวิตีที่เหลือภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดต่างในช่วงสูงคือ ตั้งแต่ 6.0-9.5 แต่ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 6.0 ลงมาเอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอกติวิตีอย่างสิ้นเชิงที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.0 ดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 ความเสถียรของบีตา-ไฮโลสிடีสต่อความเป็นกรดต่าง

- อะซิเตทบัฟเฟอร์
- ◆— ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- ▲— ทริสบัฟเฟอร์

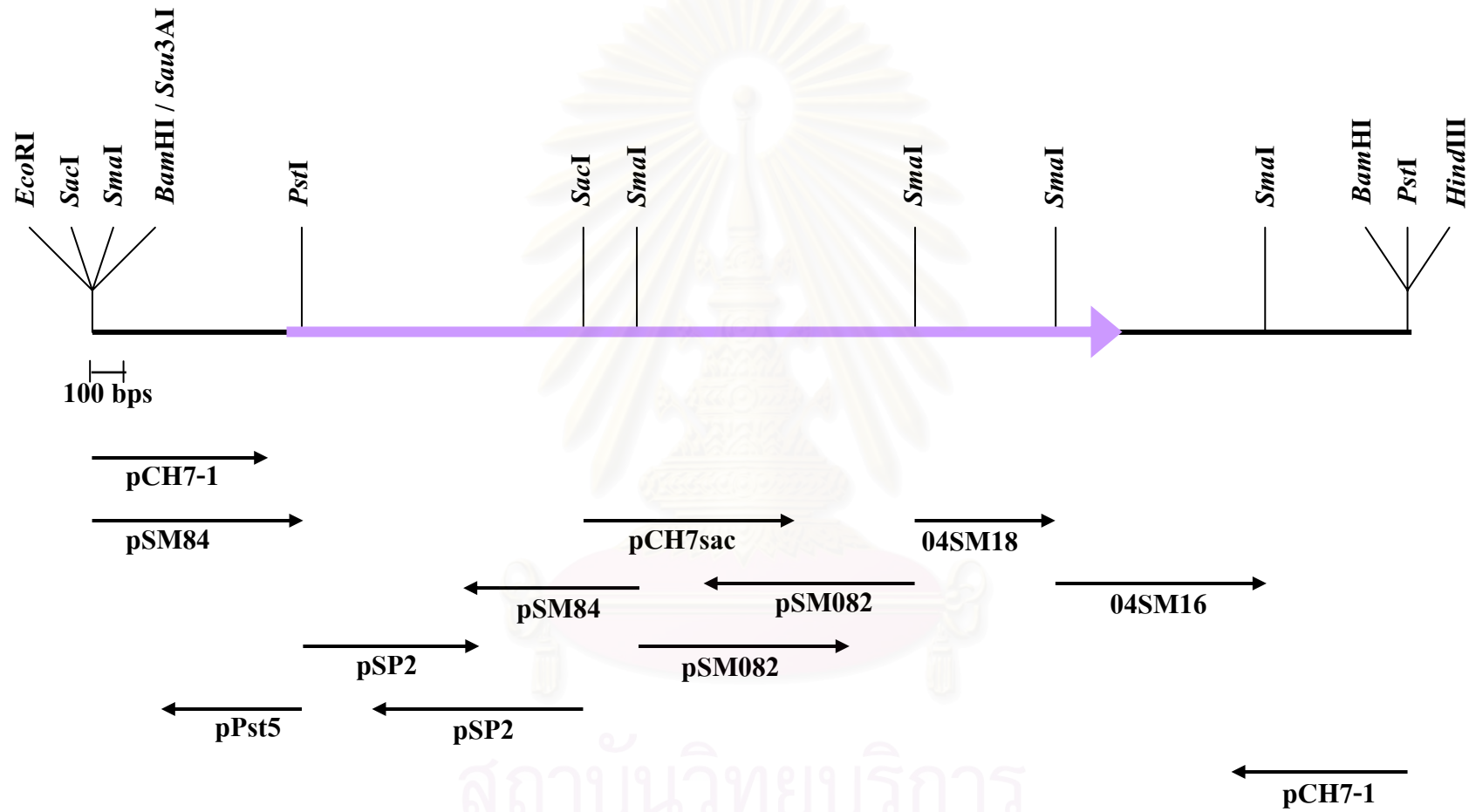
กำหนดให้แอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่มเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

4.6 การหาลำดับดีเอ็นเอของยีนบีตา-ไซโลลิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7

งานวิจัยนี้ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 โดยมีไดอะแกรมการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) สมบูรณ์ 1 กรอบ ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 552 ถึง 2927 ซึ่งถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งหมด 792 กรดอะมิโน คำนวณเป็นน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 83,386 ดาลตัน

จากการเปรียบเทียบความเหมือน (homology) กับยีนบีตา-ไซโลลิดีสใน Genbank โดยโปรแกรม BlastP version 2.2.1 ซึ่งเปรียบเทียบจากลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีความคล้ายคลึงกับบีตา-ไซโลลิดีสจาก *Streptomyces coelicolor* (GenBank accession No. AL117385) 72 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค ข้อที่ 2), จาก *Streptomyces lividans* (GenBank accession No. AF043654) 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค ข้อที่ 2) และจาก *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (GenBank accession No. AB053119) 56 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค ข้อที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BlastN version 2.2.1 พบว่ายีนนี้คล้ายคลึงกับบีตา-ไซโลลิดีสจาก *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (GenBank accession No. AB053119) 85 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค ข้อที่ 6), จาก *Streptomyces coelicolor* (GenBank accession No. AL117385) 84 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค ข้อที่ 4) และจาก *Streptomyces lividans* (GenBank accession No. AF043654) 82 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค ข้อที่ 5)



รูปที่ 4.13 ไลอะแกรมแสดงวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ลูกศรเส้นทึบใหญ่แสดงกรอบอ่านรหัสเปิดของยีนบีตา-ไซโลสดีสและทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน ลูกศรเส้นทึบเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1 GATCATCATCAAGCTGCACCTCTACGACAGCCTGCTCGCCCTGATCCTCCCCTGATCG 59
 60 CCTTCGCCATCCCCTGTCCGTCTGGTGCTCGCCAACTTCATCCGCGACGTGCCGAAG 119
 120 ACCTCTTCGACTCGATGCGGGTGGACGGCGCCACCGAATGGACGACGCTGTGGCGGCTGG 179
 180 CGGCGCCCCTCACCCGGCCCGCCATCCTCACCCTCACCGTCTTCAACGCCCTGACCATCT 239
 240 GGAACGGCTTCTGTGCGCGTGGTCTCACCAGAGCCCCGACCGCAGGACCCTGCCCG 299
 300 TCGCCCTGTGGGCCTTCCAGGGCGAGTACGGCGTCAACGTCCCAGGCGCTGGCCGCCG 359
 360 TCGTCTGACCACCTGCCCCGTCTGGTGCTGTACGCCTTCGGCCGCGCCAGCTGCTCA 419
 420 GCGGCCTGACCGCGGGCTTTCAGCCGCTGACCGGCACCGGCACCGGCGGGACGCCGACCCC 479
 480 GCCCCGACTCCACCCGTCCACCGGCACGCCCGCCCCGCCCGCTCGGGGGCCCCGGCGGG 539
 540 CGGAGGAGGAAAAGTGAACGCCGACGTGGCCGCGGAGAGCCCCTCCGCCCCCTCCCTCTGG 599
 1 **RBS** M N A D V A A E S P S A P S L W 16
 600 AACGACCCGACCGCCCCCTGCGCCGACGCGTTCGACGCGCTGATCGACGCCATGACCCCTG 659
 17 N D P T A P V A A R V D A L I D A M T L 36
 660 CAGGAGAAGACCGCACAGCTGGTTCGGGGCATGGGCCGGCGCCTCCGACGAGGGCGGGCAA 719
 37 Q E K T A Q L V G A W A G A S D E G G Q 56
 720 GTGGCCCCCACCAGCACGAGATGGAGGAGCCCGTTCGATCTCGACGCGCTCCTGCCCCAC 779
 57 V A P H Q H E M E E P V D L D A L L P H 76
 780 GGAATCGGCCAACTGACCCGACCGTTTCGGCACCGTCCCCTGCGACCCCGCCCTCGGCGCG 839
 77 G L G Q L T R P F G T V P D V P A L G A 96
 840 CTCTCCCTGGCCCGACCCAGGCCCGGATCGCCGCTCCAACCGCTTCGGCATCCCCGCC 899
 97 L S L A R T Q A R I A A S N R F G I P A 116
 900 CTCGCGCACGACGAGTGCCTGGCCGGCTTCGCGCCCTGGGGCGCCACCGCCTACCCCGTC 959
 117 L A H D E C L A G F A A W G A T A Y P V 136
 960 CCGCTGTCTGGGGCGCCGCTTCGACCCCGGCTGGTTCGGCGCATGGCCCGCCGCATC 1019
 137 P L S W G A A F D P G L V R R M A A A I 156
 1020 GGCCGTGACATGCGCGCCGTTCGCGTCCACAGGGCCTCGCGCCCGTCTTCGACGTCTGTC 1079
 157 G R D M R A V A S T R A S R P S S T S C 176
 1080 GCGACGTCCGCTGGGGCCGCGTGGAGGAGACCATCGGGCAGGACCCGTACCTCGTTCGGCA 1139
 177 A T S A G A A W R R P S A R T R T S S A 196
 1140 CCATCGGCACCGCCTACGTTTCAGGGCCTGGAGTCCGCGGGATCGTCGCCACGCTCAAAG 1199
 197 P S A P P T F R A W S P P G S S P R S K 216
 1200 CACTTCGCCGATACTCGGCCTCCCAGCGCCGGCCGCAATCTTTGCGCCCGTCTTCGATGG 1259
 217 H F A G Y S A S R A G R N L C A R L R W 236
 1260 GACCCGCGGAACCGCGCCGACGTGGTTCGCCCGCTTCGAGATGGCCGTCCGCGAGGGT 1319
 237 D P R E R A D V V L P P F F E M A V E G 256
 1320 GGCGCCCGTCCGTGATGAACGCCTACACCGACACCGACGGCGTGCCTCCGCGGCCGAC 1379
 257 G A R S V M N A W T D T D G V P S A A D 276
 1380 GAGAACCTGCTCACCGGGCTGCTGCGGGACACCTGGGGCTTCGACGGCACCGTGGTTCGCC 1439
 277 E N L L T G L L R D T W G F D G T V V A 296
 1440 GACTACTTCGCCGTTCGCTTCTGGCGACCTGCACGGTGTTCGCGCCCGACTGGGCGGAC 1499
 297 D Y F A V A F L A T L H G V A A D W A D 316
 1500 GCCGCGGGCACGGCGCTGCACGCGGGCATCGACGTCGAACTGCCCAACGTCAAGACGTAC 1559
 317 A A G T A L H A G I D V E L P N V K T Y 336
 1560 GGCGCACCGCTCACCGAAGCCGTTCGCGGACGGCCGCGTCCCAGGAGGACTCGTTCGACCGC 1619
 337 G A P L T E A V A D G R V P E E L V D R 356
 1620 GCTCTGCGCCGGTCTCCTCACCCAGAAGGTGACGCTCGGCCTGCTCGACCCGGACTGGGAC 1679
 357 A L R R V L T Q K V T L G L L D P D W D 376
 1680 CCCGTGCCGGCCGCCCTGGACGGAACGGACCCCGCCGACCCCGAGGCCCTGCGCGGACGC 1739
 377 P V P A A L D G T D P A D P E A L R G R 396
 1740 GTCGACCTGGACAGCCCCGGGAACCGCGCCCTGGCCCGCACGCTCGCCGAGGAAGCGGTC 1799
 397 V D L D S P G N R A L A R T L A E E A V 416
 1800 GTCCTGCTCGCAACGACGGCACGCTGCCGCTGGACCGCCCCCGCCGATCGCCCTGATC 1859
 417 V L L A N D G T L P L D R P R I A L I 436
 1860 GGACCCAACCGCGAACAACCCCGTGTCTGGCTGCTACTCCTTCCCAGCACATC 1919
 437 G P N A D E P T A V L G C Y S F P Q H I 456
 1920 GGCGTCCAGCACCCCGGGACGCCCTCGGCATCGCCCTGCCACCCTGCGTGAGACGCTC 1979
 457 G V Q H P G T P L G I A L P T L R E T L 476
 1980 GCCACCGAGTTCGCCGACGCCCGCTCACGTACGTCGCGGCACCGGCGTTCGACGACGGG 2039
 477 A T E F P D A A V T Y V R G T G V D D G 496

รูปที่ 4.14 แสดงลำดับดีเอ็นเอของยีนบีตา-ไฮโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7

2040	GACCTGACCGCCTCGACGAGGCGGTACGGGCGGCCCGTGAGGCGGACGTCACCGTCGCG	2099
497	D L T G L D E A V R A A R E A D V T V A	516
2100	GTGCTCGGCGACCGCGCCGGCCTGTTTCGGCCGCGGCACCGAGGCGAGGGCTGCTACGCG	2159
517	V L G D R A G L F G R G T S G E G C Y A	536
2160	GAGACACTGGAGTTGCCCGGCGCAACAGCAGCTCCTGGACGCGCTGCTGGACTCGGGC	2219
537	E T L E L P G A Q Q Q L L D A L L D S G	556
2220	ACCCCGTTCGTCACCGTCTGCTCGCGGCGCCCTACGCACTCGGCCGTGCGGTGACG	2279
557	T P V V T V L L A G R P Y A L G R A V T	576
2280	GAGTCGGCGGCGATCGTGCAGTCCTTCTTCCCGGCGAGGAAGGCACGCACGCCATCGCC	2339
577	E S A A I V Q S F F P G E E G T H A I A	596
2340	GGGGTGCTCAGCGCCGGGTCAACCCCTCCGGACGCTCCCCGTGCGCGTGCCGCGCACC	2399
597	G V L S G R V N P S G R L P V G V P R T	616
2400	CCGGGCTCCAGCGCGGCACCTACCTCGGAGCGCGGCTCGCCACGCGCGGCGACGCGTCC	2459
617	P G L Q R G T Y L G A R L A H A G D A S	636
2460	GCCGTCGACCCGGCCCCCGGTTCCCTTCGGCCACGGCCTGTCTACACCCGCTTCGAC	2519
637	A V D P A P A F P F G H G L S Y T R F D	656
2520	TGGACGGACCTGACCGCGGACACCCAGGAGGCCCCACGGACGGTGAGTTCATCCTTGCA	2579
657	W T D L T A D T Q E A P T D G E F I L A	676
2580	CTCACCGTCCGCAACAAGGGCGACCGTCCCGGCACGGAGGTGCTCCAGCTCTACCTTCAC	2639
677	L T V R N K G D R P G T E V V Q L Y L H	696
2640	GACCCGTCGCTCCGTCGTCAGCCGCTCCAGCGCTCGTCGGCTACACACGGGTGGCG	2699
697	D P V A S V V Q P L Q R L V G Y T R V A	716
2700	TTGGAACCGGGGAGTCCCGCGCCTGACCGTCACGGTCCCGGCCGACCTGGCGTCTTTC	2759
717	L E P G E S R R L T V T V P A D L A S F	736
2760	ACGGCCGCGACGGACGGCGCATCGTCAACCGGGCGAACTGGAAGTGGAGTGGCCGCG	2819
737	T G R D G R R I V E P G E L E L R L A A	756
2820	TCCAACACGGACCGGCGCCTGACGGCCCGGTCACACTGACCGGCACGGAACGCCACGTCG	2879
757	S N T D R R L T A R V T L T G T E R H V	776
2880	GACCACACGCGACGCTGCACGCCACGTTACGCGAGAAGCCTGCCACCT GAAC CGGACGGG	2939
777	D H T R R L H A T F T Q K P A T *	792
2940	GGCGCGCGCACACTCCGGGGTGCCGCGCACCCCGGTGCCCGGCGTTACGGGTAACGGA	2999
3000	CGCCGGTCAGGGTCACACTGACCGGCACGGAACGCCACGTGGACCACACGCGACGCTGC	3059
3060	ACGCCACGTTACGCGAGAAGCCTGCCACCTGAACGGACGGGGGCGCGGCACACTCCGG	3119
3120	GGTCCCGCGCACCCCGGTGCCCGGCGTTACGGGTAACGGACGCCGCTCAGGTCCTCCCG	3179
3180	CACCGCCACAGGCGCGGGCGACGGCCGGTTCGGCGCCCTCCTCGCCGAGGCGGGCCTC	3239
3240	GGTCACCGGGCGCGGGTCTCCAGAGCCGGGCGGGCCGAAGAAGTGCCCGCCCCGACC	3299
3300	TCCGGGTGCGTCCGGCACGCAGCTGCGGCAGCGCCCTGCTTACCCGACTGGGTGGCC	3359
3360	AGAAGGCCCCCGCGGATCAGCCGGCCGAACCGGCCGCGATGTTCCAGGCGCGGGG	3419
3420	GTAGTTGGTCGGGTGAGTCCCGGGTGGGCCAGCGGCTGACCACGGGCAGCCGNCGGCC	3479
3480	CGCAGCCGGCGGTCCAGTTCGAGGCCGAAGAGGTGGTGCAGCTTCGAGCGGCCGTAGC	3539
3540	GGAGGACGCCCGGTAGCCGTGCTCGGACATCAGGTGCGCGAAGTCGAGGTGCGCGTCTT	3599
3600	GTGGGTGATCGAGCTGAGGGACACCACCGGCCCGGACCCCGCGGTGAGCGGTCGAG	3659
3660	CAGCAGCCCGGTGAGGGCGTAGGGCCCCAGCATGTTTCGTGCCACATGCAGTTCGAACCC	3719
3720	GTCGGCGGTGGTCCGGCGAGGCCGAGATGCACCAGGCCGGCGTTGTTGACCAGCACGTC	3779
3780	GACCGAGGGTGGTCCGGCGGTGAGCTTCGCCGCGAACCAGCCCGCACCGCAGCGACGCG	3839
3840	CAGGTCCAGTTCGCGGACCTCGGTGTCGCCCGGGATCC	3877

รูปที่ 4.14 (ต่อ)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ปัจจุบันยังมีรายงานค่อนข้างน้อยมากเกี่ยวกับการโคลนยีนบีตา-ไซโลสดีเอสจาก *Streptomyces* sp. ใน *Escherichia coli* รวมทั้งศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากการแสดงออกของยีน

Streptomyces sp. CH7 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกจากแหล่งดินในประเทศไทยและพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการผลิตบีตา-ไซโลสดีเอส เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนหรือวัสดุทางการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น กากเมล็ดฝ้าย, ชั่งข้าวโพด และฟางข้าว เป็นต้น เป็นแหล่งคาร์บอน (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539) จิรวรรณ ธนะ (2541) ได้โคลนยีนบีตา-ไซโลสดีเอสจากจุลินทรีย์นี้ โดยมี *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้านและ pUC18 เป็นพลาสมิดพาหะ ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 แต่เนื่องจากยังไม่ได้มีการศึกษาภาวะเหมาะสมในการแสดงออกของยีนที่โคลนได้งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน

จากการทดลองพบว่าแม้จะนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 เข้าสู่ *E. coli* JM109 และชักนำการแสดงออกด้วย IPTG แต่ความสามารถในการแสดงออกของยีนให้แอกติวิตีของบีตา-ไซโลสดีเอสก็ยังไม่สูงกว่าเมื่ออยู่ในสายพันธุ์ DH5 α ซึ่งสามารถแสดงออกได้โดยไม่ต้องถูกชักนำด้วย IPTG เพราะไม่มียีน *lac I* ดังนั้น IPTG จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนถ้ายีนนี้อยู่ในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม

เมื่อเติมไซแลนลงไปในการเลี้ยงเชื้อของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่ามีการชักนำให้ได้แอกติวิตีของบีตา-ไซโลสดีเอสสูงขึ้นเช่นเดียวกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (สุมาลี อึ้งใจธรรม, 2539) ในขณะที่เมื่อเติมไซโลสและกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลไปกวดการแสดงออกของยีนโดยพบว่าแอกติวิตีของบีตา-ไซโลสดีเอสลดลงประมาณ 8 และ 6 เท่า ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Bernier และคณะ (1987) ที่พบว่าไซโลสจะไปกวดการสร้างบีตา-ไซโลสดีเอส และ Whitehead และ Hespell (1990) พบว่า แอกติวิตีจำเพาะของบีตา-ไซโลสดีเอสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นตัวชักนำจะสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลสและกลูโคส 200 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ แสดงว่ากลไกการสร้างบีตา-ไซโลสดีเอสของจุลินทรีย์เหล่านี้ถูก

ควบคุมโดยการชักนำด้วยสับสเตรท (substrate induction) และถูกกดโดยคะทาโบไลท์ (catabolite repression) สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าการสร้างปีตา-ไซโลสิเดสในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ก็ยังคงถูกควบคุมโดยกลไกดังกล่าว จึงคาดว่ายีนที่โคลนได้อาจมีส่วนของ regulator gene ติดมาด้วย แต่เมื่อพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้นี้พบเพียง ribosome binding site ที่เริ่มต้นที่ตำแหน่งที่ 4 เหนือ start codon ซึ่งทำหน้าที่จับกับเบสคู่สม บริเวณปลาย 3' ของ 16S rRNA เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณดังกล่าวของ *Streptomyces* (Kieser และคณะ, 2000) อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบบริเวณ -10 และ -35 ซึ่งเป็นบริเวณโพรโมเตอร์ และไม่พบส่วนที่คาดว่าเป็น regulator gene จึงทำให้ยังไม่อาจสรุป กลไกความสัมพันธ์ของไซแลน, ไซโลส และกลูโคส ต่อการแสดงออกของยีนนี้ใน *E. coli* ได้

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อพบว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้แอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นกว่าที่รายงานโดย Bernier และคณะ (1987) ที่พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มียีนปีตา-ไซโลสิเดสของ *Bacillus subtilis* เท่ากับ 22 ชั่วโมง และ Tsujibo และคณะ (2001) รายงานว่าเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มียีนปีตา-ไซโลสิเดสของ *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 เท่ากับ 21 ชั่วโมง

เมื่อนำปีตา-ไซโลสิเดสที่ได้จากการแสดงออกของยีนในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCH7-1 ใน *E. coli* มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE-Biogel A และ Sephadex G-200 พบว่ามีรูปแบบของการชะออกจากคอลัมน์คล้ายคลึงกับปีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ที่รายงานโดยทรรศนีย์ ตั้งสกุล (2544) นอกจากนี้ยังพบว่ามือน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์โดยเจลฟิลเทรชันประมาณ 178,000 ดาลตัน ซึ่งไม่แตกต่างมากนักจากสายพันธุ์เดิมคือประมาณ 183,000 ดาลตัน (ทรรศนีย์ ตั้งสกุล, 2544) และพบว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือประมาณ 75,000 ดาลตัน จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE ซึ่งสอดคล้องกับทรรศนีย์ ตั้งสกุล (2544) ที่พบว่าปีตา-ไซโลสิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่คล้ายกัน แต่รายงานดังกล่าวพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 93,000 ดาลตัน อย่างไรก็ตามจากการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้พบว่ามีค่าเท่ากับ 83,386 ดาลตัน ซึ่งอยู่ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้โดย SDS-PAGE จากรายงานนี้กับรายงานของทรรศนีย์ ตั้งสกุล (2544) ดังนั้นความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้โดย SDS-PAGE อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเจลที่ใช้ต่างกัน รวมทั้งการใช้ชุดโปรตีนมาตรฐานที่แตกต่างกัน

ส่วนผลของการศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ในแง่คุณสมบัติและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง พบว่าไม่แตกต่างจากบีตา-ไซโลลิดีสของ *Streptomyces* sp. CH7 (ทรรศนีย์ ตั้งสกุล, 2544) (ตารางที่ 5.1) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าบีตา-ไซโลลิดีสจากยีนของ *Streptomyces* sp. CH7 ที่ได้จากการแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ไม่แตกต่างจากเอนไซม์ของสายพันธุ์ดั้งเดิม

Tsujibo และคณะ (2001) ได้ศึกษาสมบัติของบีตา-ไซโลลิดีสจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เปรียบเทียบกับเอนไซม์จากสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 ก็พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน

ตารางที่ 5.1 สมบัติของบีตา-ไซโลลิดีสบริสุทธิ์จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pCH7-1 และจาก *Streptomyces* sp. CH7 (ทรรศนีย์ ตั้งสกุล, 2544)

สมบัติของบีตา-ไซโลลิดีสบริสุทธิ์	บีตา-ไซโลลิดีส	
	จากรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i>	จาก <i>Streptomyces</i> sp. CH7
น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน	178,000 ดาลตัน	183,000 ดาลตัน
น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE	75,000 ดาลตัน (2 หน่วยย่อย)	93,000 ดาลตัน (2 หน่วยย่อย)
อุณหภูมิที่เหมาะสม	55 องศาเซลเซียส	55 องศาเซลเซียส
ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม	6.5	6.5
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	50 องศาเซลเซียส 30 นาที	50 องศาเซลเซียส 30 นาที
ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง	6.0-9.5	6.0-9.0

ในส่วนของการศึกษาเกี่ยวกับยีนบีตา-ไฮโลลิเดส แม้จะมีรายงานค่อนข้างมากจากจุลินทรีย์อื่นๆ แต่จาก *Streptomyces* มีรายงานจนถึงปัจจุบันเพียง 3 ชนิดเท่านั้น คือ *Streptomyces coelicolor* (GenBank accession No. AL117385), *Streptomyces lividans* (GenBank accession No. AF043654) และ *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (GenBank accession No. AB053119)

ผลของการเปรียบเทียบความเหมือนของยีนบีตา-ไฮโลลิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 ของงานวิจัยนี้กับยีนทั้ง 3 ข้างต้น พบว่าในระดับลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนสูงสุดถึง 72% กับของ *S. coelicolor* และต่ำสุดเพียง 56% กับของ *S. thermoviolaceus* OPC-520 แต่เมื่อเทียบในระดับลำดับนิวคลีโอไทด์กลับมีความเหมือนสูงสุดถึง 85% กับของ *S. thermoviolaceus* OPC-520 อย่างไรก็ตามช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเปรียบเทียบกันได้ค่อนข้างสั้นมากคือ identity 284/384 (ภาคผนวก ค ข้อที่ 6) ในขณะที่ช่วงการเปรียบเทียบกับของเชื้ออีก 2 ชนิดยาวกว่ามากคือ identity 1944/2310 (84%) จาก *S. coelicolor* (ภาคผนวก ค ข้อที่ 4) และ identity 866/1055 (82%) จาก *S. lividans* (ภาคผนวก ค ข้อที่ 5)

ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาตีพิมพ์ในวารสารใดๆเลยถึงรายละเอียดการศึกษา ยีน รวมทั้งเอนไซม์บีตา-ไฮโลลิเดสจาก *S. coelicolor* และ *S. lividans* โดยมีปรากฏแต่เพียงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ดังกล่าวไว้ข้างต้น ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงในแง่สมบัติของบีตา-ไฮโลลิเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 กับจาก *Streptomyces* ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ แต่สำหรับบีตา-ไฮโลลิเดสจาก *S. thermoviolaceus* OPC-520 นั้น Tsujibo และคณะ (2001) ได้รายงานการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 5.2 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับบีตา-ไฮโลลิเดสจากงานวิจัยนี้ พบว่ามีสมบัติคล้ายคลึงกันมากยกเว้นบีตา-ไฮโลลิเดสจาก *S. thermoviolaceus* OPC-520 ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์เพียง 1 สาย (monomer) ดังนั้นจึงอาจอธิบายได้ว่าโครงสร้างโปรตีนส่วนใหญ่ของบีตา-ไฮโลลิเดสจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้แตกต่างกันมาก แต่จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนสั้นๆมีความคล้ายคลึงกันสูงถึง 85% (ภาคผนวก ค ข้อที่ 6) นั้นอาจเนื่องมาจากเอนไซม์จากเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีส่วนที่เป็น catalytic domain ที่คล้ายกันมากซึ่งสอดคล้องกับความคล้ายคลึงของสมบัติของเอนไซม์ทั้งสองนี้

งานวิจัยนี้จึงเป็นการให้ข้อมูลเกี่ยวกับยีนและเอนไซม์ปีตา-ไฮไลติเดสจาก *Streptomyces* เพิ่มขึ้นมาอีก 1 ชนิด ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อนี้ต่อไป

ตารางที่ 5.2 สมบัติของปีตา-ไฮไลติเดสบริสุทธิ์จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pCH7-1 และจาก *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiibo และคณะ, 2001)

	สมบัติของปีตา-ไฮไลติเดสจาก	
	<i>Streptomyces</i> sp. CH7 ที่แสดงออกใน <i>E. coli</i>	<i>Streptomyces</i> <i>thermoviolaceus</i> OPC-520 ที่แสดงออกใน <i>E. coli</i>
น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน	178,000 ดาลตัน	85,000 ดาลตัน
น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE	75,000 ดาลตัน (2 หน่วยย่อย)	85,000 ดาลตัน
น้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณจากกรดอะมิโน	83,386 ดาลตัน	81,912 ดาลตัน
อุณหภูมิที่เหมาะสม	55 องศาเซลเซียส	50 องศาเซลเซียส
ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม	6.5	6.5
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	50 องศาเซลเซียส 30 นาที	50 องศาเซลเซียส 30 นาที
ความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง	6.0-9.5	6.0-7.0

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จิราวรรณ ณะ. 2541. การโคลนยีนบีตา-ไซโลลิตเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทรรศนีย์ ตั้งสกุล. 2544. การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของบีตา-ไซโลลิตเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุมาลี อึ้งใจธรรม. 2539. ไซแลนเนสและบีตา-ไซโลลิตเดสจาก *Streptomyces* spp. ที่ชอบร้อนและชอบต่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Baba, T., Shinke, R., and Nanmori, T. 1994. Identification and characterization of clustered gene for thermostable xylan-degrading enzymes, β -xylosidase and xylanase, of *Bacillus stearothermophilus* 21. Appl. Environ. Microbiol. 60(7): 2252-2258.
- Bachmann, S. L., and McCarthy, A. L. 1989. Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermomonospora fusca*. J. Gen. Microbiol. 35: 17-20.
- Belfaquih, N., and Penninckx, M.J. 2000. A bifunctional β -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10. 27: 114-121.
- Bennier, Jr. R., Desrochers, M., Paice, M.G., and Yaguchi, M. 1987. Isolation and characterization of β -xylosidase from a recombinant *Escherichia coli* strain. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 409-419.
- Bhattacharyya, S., Khowala, S., Kumar, A., and Sengupta, S. 1997. Purification and characterization of an extracellular β -xylosidase of *Termitomyces clypeatus*. Biotechnol. Prog. 13: 822-827.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic system. Trend in Biotechnol. 3(11): 286-290.
- Bio-Rad Laboratory, 1993. Method in Electroporation. Life Science Group: Bio-Rad Laboratories, Inc.

- Buttner, R., and Bode, R. 1992. Purification and characterization of β -xylosidase activities from the yeast *Arxula adenivorans*. J. Basic. Microbiol. 32(3): 159-166.
- Cho, S.G., and Choi, Y.J. 1998. Regulation of β -xylosidase (XylA) synthesis in *Bacillus stearothersophilus*. J. Microbiol. Biotechnol. 8(1): 14-20.
- Christov, L.P., Myburgh, J., Neill, F.H., Van Tonder, A., and Prior, B.A. 1999. Modification of the carbohydrate composition of sulfite pulp by purified and characterized β -xylanase and β -xylosidase of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Prog. 15: 196-200.
- Cotta, M.A., and Whitehead, T.R. 1998. Xylooligosaccharide utilization by the ruminal anaerobic bacterium *Selenomonas ruminantium*. Curr. Microbiol. 36: 183-189.
- Dekker, R.F.H., and Richards, G.N. 1976. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr Biochem. 32: 277-352.
- Deshpande, V., Lachke, A., Mishra, C., Keskar, S., and Rao, M. 1986. Mode of action and properties of xylanases and β -xylosidase from *Neurospora crassa*. Biotechnol. Bioeng. 28: 1832-1837.
- De-Souza, C.G., Girardo, N.S., Costa, M.A. and Peralta, R.M. 1999. Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus flavus*. J. Basic. Microbiol. 39(3): 155-160.
- Ericksson, K.E.L., Blanchette, R.A., and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Ozach GmbH and Co., Berlin, Germany. p. 181-222.
- Flint, H. J., McPherson, C. A., and Martin, J. 1991. Expression of two xylanase gene from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* 17 cloned in pUC13. J. Gen. Microbiol. 137: 123-129.
- Flores, M.E., Perea, M., Rodriguez, O., Malvaez, A., and Huitron, C. 1996. Physiological studies on induction and catabolite repression of β -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. J. Biotechnol. 49: 179-187.

- Fukumura, M., Sakka, K., Shimada, K., and Ohmiya, K. 1995. Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium xynB* gene encoding and extremely thermostable xylanase, and characterization of the translated product. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(1): 40-46.
- Gilbert, M., Yaguchi, M., Watson, D.C., Wong, K.K.Y., Breuil, C., and Saddler, J.N. 1993. A comparison of 2 xylanases from the thermophilic fungi *Thielavia terrestris* and *Thermoascus crustaceus*. App. Microbiol. Biotechnol. 40(4): 508-514.
- Gilbert, H.J., and Hazlewood, G.P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol. 139:187-194.
- Ghosh, M., and Nanda, G. 1993. Thermostability of β -xylosidase from *Aspergillus sydowii* MG49. FEBS. Lett. 330(3): 275-278.
- Habraud, M., and Fevre, M. 1990. Purification and characterization of an extracellular β -xylosidase from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. FEMS. Microbiol. Lett. 17(1): 11-16.
- Hasmann, F.A., Pessoa, A., and Roberto, I.C. 2000. β -xylosidase recovery by reversed micelles use of cationic surfactant. Appl. Biochem. Biotechnol. 84-6: 1101-1111.
- Herrmann, M.C., Vrsanska, M., Jurickova, M., Hirsch, J., Biely, P., and Kubicek, C.P. 1997. The β -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional β -D-xylan xylohydrolase. Biochem. J. 321: 375-381.
- Hudson, R.C., Schofield, L.R., Coolbear, T., Daniel, R.M., and Morgan, H.W. 1991. Purification and properties of an aryl β -xylosidase from a cellulolytic extreme thermophile expressed in *Escherichia coli*. Biochem. J. 273: 645-650.
- Jung, K. H., Young, C. C., Lee, J. C., Park, S. H., and Yoon, K. H. 1998. Purification and characterization of the *Bacillus* sp. KK-1 beta-xylosidase from a recombinant *Escherichia coli*. J. Microbiol and Biotechnol. 8(3): 258-268.
- Jurasek, L., and Paice, M.G. 1992. Saving bleaching chemicals and minimizing pollution with xylanase. In Proceeding if the International Symposium on Pollution Prevention in the Manufacture of Pulp and Paper, Opportunities and Barriers. Pulp and Paper Cluster, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. p. 105-107.

- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. 2000. Practical Streptomyces Genetics. The John Innes foundation. Norwich. UK.
- Kiss, T., and Kiss, L. 2000. Purification and characterization of an extracellular β -D-xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. World J. Microbiol. Biotechnol. 16: 465-470.
- Kitamoto, N., Yoshino, S., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N. 1999. Sequence analysis, Overexpression, and antisense inhibition of a β -xylosidase gene, *xylA*, from *Aspergillus oryzae* KBN616. Appl. Environ. Microbiol. 65(1): 20-24.
- Kurakake, M., Osada, S., Komaki, T. 1997. Transxylosylation of β -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61(12): 2010-2014.
- Kumar, S. and Ramon, D. 1996. Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans*. FEMS. Microbiol. Lett. 135(2-3): 287-293.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lalaoui, F., Halama, P., Dumortier, V., and Paul, B. 2000. Cell wall-degrading enzymes produced in vitro by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness. Plant Pathology. 49(6): 727-733.
- Lee, S. F. and Foresberg, C. W. 1987. Isolation and some properties of a β -xylosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Environ. Microbiol. 53(4): 651-654.
- Lee, Y.E., and Zeikus, J.G. 1993. Genetic organization, sequence and biochemical characterization of recombinant β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI. J. Gen. Microbiol. 139: 1235-1243.
- Li, Y.K., Yao, H.J., and Cho, Y.T. 2000. Effective induction, purification and characterization of *Trichoderma koningii* G-39 β -xylosidase with high transferase activity. Biotechnol. Appl. Biochem. 31: 119-125.
- Lindner, C., Stulket, J., and Hecker, M. 1994. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. Microbiol. 140: 753-757.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 267-275.

- Magee, R. J. and Kosaric, N. 1985. Bioconversion of hemicellulosic. Adv. Biochem. Bioeng. 32: 64-93.
- Mai, V., Wiegel, J., and Lorenz, W.W. 2000. Cloning, sequencing, and characterization of the bifunctional xylosidase-arabinosidase from the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Gene. 247: 137-143.
- Nakanishi, K., Yokotsuka, K., and Yasui, T. 1987. Induction of membrane bound xylosidase in a *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 65: 1-6.
- Pan, C. X., Xu, W. Z., Akatsuka, H., Negoro, S., Shima, Y., Urabe, I., and Okada, H. 1991. Expression of the xylan-degrading genes of *Bacillus pumilus* IPO in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. 71(5): 303-308.
- Panbangred, W., Kawaguchi, O., Tomita, T., Shinmyo, A., and Okada, H. 1984. Isolation of two β -xylosidase genes of *Bacillus pumilus* and comparison of their gene products. Eur. J. Biochem. 138: 267-273.
- Panbangred, W., Kondo, T., Negoro, S., Shinmyo, A., and Okada, H. 1983. Molecular cloning of the genes for xylan degradation of *Bacillus pumilus* and their expression in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 192: 335-341.
- Park, N.H., Yoshida, S., Takakashi, A., Kawabata, Y., Sun, H.J., and Kusakabe, I. 2001. A new method for the preparation of crystalline L-arabinose from arabinoxylan by enzymatic hydrolysis and selective fermentation with yeast. Biotechnol. Lett. 23: 411-416.
- Poutanen, K., and Puls, J. 1988. Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 425-432.
- Perez-Avalos, O., Ponce-Noyola, T., Magana-Plaza, I., and de la Torre, M. 1996. Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 405-409.
- Perez-Gonzalez, J. A., Van Peji, N. N. M. E., Bezoen, A., MacCabe, A. P., Ramon, D., and De Graaff, L. H. 1998. Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans* *xlnD* gene encoding a β -xylosidase. Appl. Environ. Microbiol. 64(4): 1412-1419.

- Ratto, M., Mahrani, I.M., Ahring, B., and Viikari, L. 1992. Production of xylanolytic enzymes by alkalotolerant *Bacillus circulans* strain. Appl. Environ. Microbiol. 51(4): 746-752.
- Ratto, M., Mahrani, I.M., Ahring, B., and Viikari, L. 1994. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. in enzymatic treatment of kraft pulps. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 130-133.
- Rizzatti, A.C.S., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Rechia, C.G.V., and Polizeli, M.L.T.M. 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 156-160.
- Saddler, J.N., Yu, E.K.C., Mesh-Hartree, M., levitin, N., and Brownell, H.H. 1983. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicellulose by microorganisms for production of liquid fuels. Appl. Environ. Microbiol. 45(1): 153-160.
- Sakka, K., Yoshikawa, K., Kojima, Y., Karita, S., Ohmiya, K., and Shimada, K. 1993. Nucleotide sequence of the *Clostridium sterocarum* xylA gene encoding a bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities, and properties of the translated product. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57(2): 268-272.
- Saraswat, V., and Bisaria, V. S. 1997. Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albomyces* IIS 68. J. Ferment. Bioeng. 83(4): 352-357.
- Sewell, G. W., Utt, E. A., Hespell, R. B., Mackenzie, K. F., and Ingram, L. O. 1989. Identification of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xylosidase gene (xylB) coding region and its expression in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 306-311.
- Singh, S., du Preez, J.C., Pillay, B., and Prior, B.A. 2000. The production of hemicellulases by *Thermomyces lanuginosus* strain SSBP: influence of agitation and dissolved oxygen tension. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54(5): 698-704.
- Suh, J. H., Eom, S. J., Cho, S. G., and Choi, Y. J. 1996. Molecular cloning and expression of the β -xylosidase gene (xylB) of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. J. Microbiol. Biotechnol. 6(5): 331-335.

- Sunna, A., and Antranikian, G. 1996. Growth and production of xylanolytic enzymes by the extreme thermophilic anaerobic bacterium *Thermotoga thermarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 671-676.
- Suzuki, T., Kitagawa, E., Sakakibara, F., Ibata, K., and Kawai, K. 2001. Cloning, expression, and characterization of a family 52 β -xylosidase gene (*xysB*) of a multiple-xylanase-producing bacterium, *Aeromonas caviae* ME-1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(3): 487-494.
- Tenkanen, M., Puls, J., Ratto, M., and Viikari, L. 1993. Enzymatic deacetylation of galacto-glucomannans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 159-165.
- Tsao, G.T., and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology in Berry, S.D.R., and Kristiansen, B. (eds.). The Filamentous fungi : Fungal Technology. John Wiley and Sons Inc. New York. p. 296-326.
- Tsujibo, H., Takada, C., Tsuji, A., Kosaka, M., Miyamoto, K., and Inamori, Y. 2001. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding an intracellular β -D-xylosidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(8): 1824-1831.
- Utt, E.A., Eddy, C.K., Keshav, K.F., and Ingram, L.O. 1991. Sequencing and Expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* *xyIB* gene encoding a novel bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities. Appl. Environ. Microbiol. 57(4): 1227-1234.
- Van-Peij, N.N.M.E., Brinkmann, J., Vrsanska, M., Visser, J., and De-Graaff, L.H. 1997. β -xylosidase activity, encoded by *xlnD*, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. Eur. J. Biochem. 245(1): 164-173.
- Visser, J., Beldman, G., Someren, M.A.K.V., and Voragen, A.G.J. 1992. Xylan and xylanase. Elsevier science publishers. Netherlands.
- Vroemen, S., Heldens, J., Boyd, C., Henrissat, B., and Keen, N. T. 1995. Cloning and characterization of the *bgxA* gene from *Erwinia chrysanthemi* D1 which encodes a β -glucosidase / xylosidase enzyme. Mol. Gen. Genet. 246: 465-477.
- Ward, O.P., and Moo-Young, M. 1989. Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharide. Crit. Rev. Biotechnol. 8: 237-274.

- Wegener, S., Ransom, R.F., and Walton, J.D. 1999. A unique eukaryotic β -xylosidase gene from the phytopathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. Microbiology. 145: 1089-1095.
- Whitehead, T. R., and Hespell, R. B. 1990. The genes for three xylan-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3.8-kilobase region. J. Bacteriol. 172(5): 2408-2412.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganism: functions and applications. Microbiol. Rev. 52(3): 305-317.
- Ximenes, F.A., Silveira, F.Q.P., and Filho, E.X.F. 1996. Production of β -xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. Curr. Microbiol. 33: 71-77.
- Xu, W.Z., Shima, Y., Negoro, S., and Urabe, I. 1991. Sequence and properties of β -xylosidase from *Bacillus pumilus* IPO. Eur. J. Biochem. 202: 1197-1203.
- Zhu, H., Cheng, K.J., and Forsberg, C.W. 1994. A truncated β -xylosidase from the anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum* 27. Can. J. Microbiol. 40: 484-490.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรลูเรีย-เบอ์ทานี (Luria-Bertani, LB)

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.5		

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรลูเรีย-เบอ์ทานี (Luria-Bertani, LA)

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.5		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายสำหรับสกัดพลาสมาหรือรีคอมบิแนนท์พลาสมา

สารละลาย I (Solution I)

สารละลายกลูโคส	50.0	มิลลิโมลาร์
บัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 8.0)	25.0	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ (EDTA, pH 8.0)	10.0	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันแล้วหนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย II (Solution II)

สารละลาย 10 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.2	มิลลิลิตร
สารละลาย 10 เปอร์เซนต์ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	8.8	มิลลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วใช้ทันที

สารละลาย III (Solution III)

สารละลาย 5 โมลาร์ โพแทสเซียมอะซิเตท	50.0	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันแล้วหนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายบัฟเฟอร์ TE

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl)	10.0	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ (EDTA, pH 8.0)	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันแล้วเติมน้ำเข้าที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. ฟีนอลคลอโรฟอร์ม

ผสมฟีนอลที่หลอมละลายโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 65°C แล้วเติมไฮดรอกซีควิโนลีน (8-Hydroxyquinoline) ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เข้ากับคลอโรฟอร์ม ปริมาตรเท่าๆกัน แล้วเติม 0.1 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์, pH 7.6 เขย่าแรงๆให้ผสมกัน ปล่อยให้แยกชั้น ดูดชั้นบนทิ้งไปแล้วสกัดซ้ำด้วย 0.1 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์, pH 7.6 อีก 2-3 ครั้ง เติม 0.1 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์, pH 7.6 ให้ท่วมผิวหน้าของสารละลาย เก็บในขวดสีชา

4. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับหยุดปฏิกิริยาของ CIAP

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 7.5)	10.0	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ (EDTA)	1.0	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	200.0	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.50	เปอร์เซ็นต์

5. สารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์, pH 6.5

สารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยกรดอะซิติกให้ได้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5

6. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1952)

Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3.0	ลิตร

Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

Lowry D

สารละลายโฟลีนฟีนอล (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

7. สารละลายสำหรับการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

สารละลายทริสไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.3		
น้ำกลั่น	600.0	มิลลิลิตร

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ทริส

ทริส	6.0	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.8		
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ทริส

ทริส	18.15	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.8		
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.60	กรัม
BIS (N,N,-Methylene bis acrylamide)	0.40	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

น้ำกลั่น	19.0	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ สารละลายทริส, pH 6.8	5.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	4.0	มิลลิลิตร
2-เมอร์แคปโตเอทานอล	2.0	มิลลิลิตร
สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์บรอมฟีนอลบลู	2.0	มิลลิลิตร

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

สารละลายผสมของเซฟาเรดิงเจล 10 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	4.12	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์ สารละลายทริส, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	3.33	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์เจล

น้ำกลั่น	6.20	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ สารละลายทริส, pH 6.8	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร

สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	0.1	เปอร์เซ็นต์
เมทานอล	40.0	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10.0	เปอร์เซ็นต์

สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining solution)

เมทานอล	40	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10	เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. สารละลายที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

สารละลายทริสไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
ไซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3.0	กรัม
ปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.3		
น้ำกลั่น	600.0	มิลลิลิตร

สารละลายไซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 10 เปอร์เซ็นต์

ไซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

น้ำกลั่น	19.0	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ สารละลายทริส, pH 6.8	5.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	4.0	มิลลิลิตร
สารละลายไซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	8.0	มิลลิลิตร
2-เมอร์แคปโตเอทานอล	2.0	มิลลิลิตร
สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์บรอมฟินอลบลู	2.0	มิลลิลิตร

สารละลายผสมของเซฟาเวติงเจด 10 เปอร์เซ็นต์เจด

น้ำกลั่น	4.02	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์ สารละลายทริส, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.00	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	3.33	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	ไมโครลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร

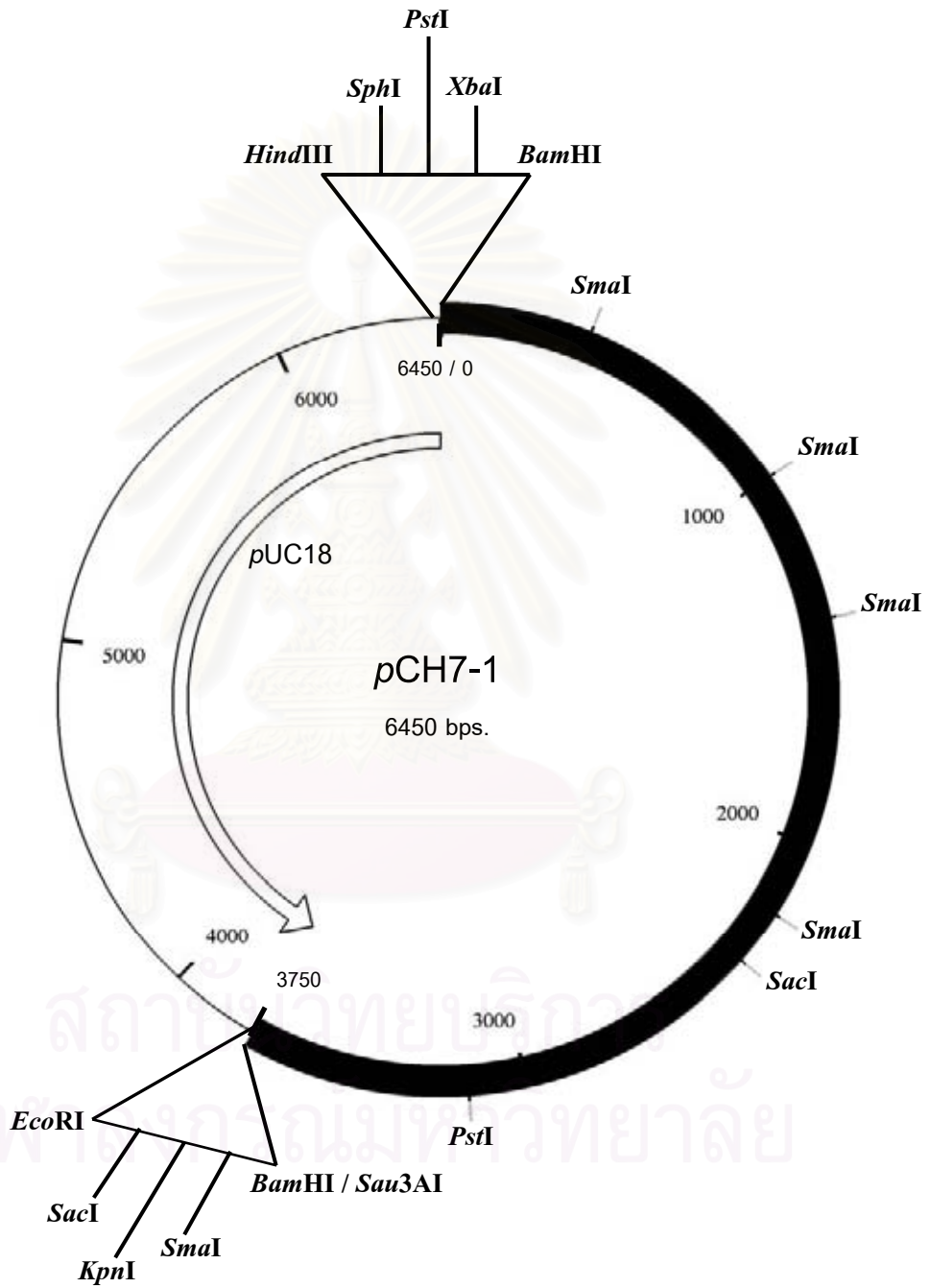
สารละลายสแตกกิงเจด 4 เปอร์เซ็นต์เจด

น้ำกลั่น	6.10	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ สารละลายทริส, pH 6.8	2.50	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100.00	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50.00	มิลลิลิตร
TEMED	5.00	ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. รูปภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของ pCH7-1



2. รูปภาพแสดงการเปรียบเทียบระหว่างลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากยีนปีตา-ไซโลลิดเอสจาก *Streptomyces* sp. CH7, *Streptomyces coelicolor* (AL117385) และ *Streptomyces lividans* (AF043654) โดยโปรแกรม BlastP version 2.2.1 เครื่องหมายดอกจันแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน

```
>gi|5881851|emb|CAB55650.1| (AL117385) putative beta-xylosidase [Streptomyces
coelicolor A3(2)]
Length = 796
```

```
Score = 1010 bits (2611), Expect = 0.0
Identities = 570/791 (72%), Positives = 610/791 (77%), Gaps = 1/791 (0%)
```

```
>gi|3941372|gb|AAC99628.1| (AF043654) BxlA [Streptomyces lividans]
Length = 861
```

```
Score = 753 bits (1945), Expect = 0.0
Identities = 467/778 (60%), Positives = 523/778 (67%), Gaps = 4/778 (0%)
```

```
Strep. sp. CH7      1  MNADVAAESPSAPSLWNDPTAPVAARVDALIDAMTLQEKTAQLVGAWAGASDEGGQVAPH 60
Strep. coelicolor  1  MNADVTVDHTEAVSPWNDDTASVAARVDALIDAMTLREKTAQLYGVWVGASDEGGQVAPH 60
Strep. lividans    1  MTADVAVETTPEIPLWNDPNHPVASRVDALVAAMTLEEKIAQLYGVWVGASDQGGEVAPI 60
      * * * * *           * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *
      * * * * *           * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *

Strep. sp. CH7      61  QHEMEEPVDLDALLPHGLGQLTRPFGTVDPVPALGALSLARTQARIAASNRFGIPALAHD 120
Strep. coelicolor  61  QHDMEEAVDLDALLPTGLGQLTRPFGTVDPVPALGALSLARTQARITATNRFGIPALAHD 120
Strep. lividans    61  STTWRRPSTSTRSCPPGVSVPSPGSPAPSRSTPRSPAPSRSCARRPRITSAGRFGIPAVAHE 120
      * * * * *           * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *

Strep. sp. CH7      121 ECLAGFAAWGATAYPVPLSWGAAFDPLVRRMAAAIGRDMRAVASTRASRPSSTSCATSA 180
Strep. coelicolor  121 ECLAGFAAWGATAYPVPLSWGATFDPDVGRMASAIGRDMRAVGVHQLAPVLDVVRDAR 180
Strep. lividans    121 ECLAGFAPWGATAYPVPLSWGATFDPAVRRMAAAIGRDMRSVGIHQGLAPVLDVVRDGR 180
      * * * * *           * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *

Strep. sp. CH7      181 GAAWRRPSARTRTSSAPSAPPTFRAWSPPGSSPRSKHFAGYSASRAGRNLCARLRWDPRE 240
Strep. coelicolor  181 WGRVEETIGEDPYLVGTIGTAYVRGLESAGIVATLKHFFVGYASRAGRNL-APSSMGPRE 239
Strep. lividans    181 WGRVEETIGEDPYLVGTIGTAYVQGLSAGIVATLKHFFVGYASRAGRNLGPS-SVGTRE 239
      * * * * *           * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *

Strep. sp. CH7      241 RADVVLPPFEMAVREGGARSVMNAWTDTDGVPSAADENLLTGLLRDWTGFDGTVVADYFA 300
Strep. coelicolor  240 RADILLPPFEMAIREGGARSVMNAYTDTDGVPSAADELLTGLLRDWTGFDGTVVADYFA 299
Strep. lividans    240 RTDVLPPFEMAVREGGARSVMNSAYTDIDGVPAADEALLTGAVRDWTGFEFTVVADYFG 299
      * * * * *           * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *
```

<i>Strep. sp. CH7</i>	301	VAF ^L ATLHGVAADWADAAGTALHAGIDVELPNVKTYGAPL ^L TEAVADGRVPEELVDRALRR	360
<i>Strep. coelicolor</i>	300	IAFLKTLHGVA ^A EWADAAGLALRAGVDVELPGVKTYGAPL ^A EAVADGRVPETLVDRALRR	359
<i>Strep. lividans</i>	300	IAFLKTLHGITADWADAAGAALKAGLDVELPTVQDFGTPLVDAVTDGRVPEALIDRAAPR	359
		*** **** * ***** ** ** ***** * * ** ** ***** * *** *	
<i>Strep. sp. CH7</i>	361	VLTQKVTLGLLDPDWD ^F VPAALDGTDPADPEALRGRVLDLSPGNRALARTLAE ^E AVVLLA	420
<i>Strep. coelicolor</i>	360	TLTQKARLGLLDPDWN ^L PAALEGADLDDPAALRGRIDL ^S PANRALARTV ^A E ^E AVVLLS	419
<i>Strep. lividans</i>	360	PGTEG-GARTARPGLEPGPAALDGV ^L SHPEALRGRIDLDRPENRELAREIAEKAVVLLT	418
		* * * **** * * ***** *** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **^	
<i>Strep. sp. CH7</i>	421	NDGTLPLDRPRRIALIGPNADEPTAVLGCYSFPQHIGVQHPGTPLGIALPTLRETLATEF	480
<i>Strep. coelicolor</i>	420	NDGTLPLARPRRIALLGPN ^A EAVAVLGCYSFPQHIGVRYPGTPHGI ^E LPTLRVALAAEF	479
<i>Strep. lividans</i>	419	NDGTLPLARPRRIALIGPNA ^E EATAVLGCYSFPRHVG ^V QHPEVPVGLDLPTLYDTLTAEF	478
		***** ***** **** * ***** ** * * * * ** * **	
<i>Strep. sp. CH7</i>	481	PDAAVTYVRGTGVDDGDLTGLDEAVRAAREADVTVAVLGD ^R AGLFRGTSGEGCYAETLE	540
<i>Strep. coelicolor</i>	480	PDARITFARGTGVDDGDLTGLPEAVRVAREADIALVVLGD ^R AGLFRGTSGEGCDVETLA	539
<i>Strep. lividans</i>	479	PDADIALARGTGVDDGEVSGIGEAVDAARAADV ^V VAVLGD ^R AGLFRGTSGEGCDAESLT	538
		*** ***** * *** ** * ***** ** * *	
<i>Strep. sp. CH7</i>	541	LPGAQQQLLDALLDSGTPVVTVLLAGRPYALGRAVTE ^S AAIVQSFFPGE ^E GTHAIAGVLS	600
<i>Strep. coelicolor</i>	540	LPGAQQRLLDALLDLG ^T PLVTVLLAGRPYSLGRAVEESAAIVQSFFPGE ^E GTHAIAGVLS	599
<i>Strep. lividans</i>	439	LPGAQQRLLDALLDSGTPVVTVLLAGRPYALGRA-RQ ^S AAIVQSFFPGE ^E GTAALAGVLS	597
		***** ***** *** ***** ** * ***** ** * **	
<i>Strep. sp. CH7</i>	601	GRVNPSGRLPVGVPRTPGLQ ^R GTYLGARLAHAGDASAVDPAPAFPF ^G HGLSYTRFDWTDL	660
<i>Strep. coelicolor</i>	600	GRVNPSGRLPVGVPRGPGSQPATYLGAKLAHAGEVSSIDPTPA ^F PF ^G HGLSYTRFDWTDL	659
<i>Strep. lividans</i>	598	GRTSPTGRLPVSVPGSAA-QPTTYLGA ^R LAQASEVSNIDPTPA ^F FG ^F HGLTYTTFAWSDL	656
		** * ***** ** * ***** ** * * ** ** ** **^	
<i>Strep. sp. CH7</i>	661	TADTQEAPTDGEFII ^L ALTVRNKGD ^R PGTEVVQLYLHDPVASV ^V QPLQRLVGYTRVALEPG	720
<i>Strep. coelicolor</i>	660	SVDDQEAPTDGEFTL ^T FTVRNTGGRSGTEVVQLYLHDPVASV ^V QPVQRLVGYARVDLEPG	719
<i>Strep. lividans</i>	657	VAHTKEAPTDGAFSLELTVRNTGERHGTEVVQLYLHDPVASV ^V QPVQRLIGYTRVPLRPG	716
		***** * **** * * ***** ** * ** * **	
<i>Strep. sp. CH7</i>	721	ESRRLTVTVPADLASFTGRDGRRIVEPGELELRLAASNTDRRLTARVTLTGTERHVDHTR	780
<i>Strep. coelicolor</i>	720	EARRLRVTVPADLASFTGRDGRRVVEPGALELRLAASSADPRLTARVALTGVERHLHDHTR	779
<i>Strep. lividans</i>	717	EARRVREVPADLASFNRRDGRRIVEPGDLELRF ^A ASSTEPRLTATVALTGPERVDQ--	774
		* ** * ***** ***** ** * ** * ** * ** * **	
<i>Strep. sp. CH7</i>	781	RLHATFTQKPA	791
<i>Strep. coelicolor</i>	780	RLRSVVEQEPA	790
<i>Strep. lividans</i>		-----	

4. รูปภาพแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีนบีตา-ไฮไลดีเอสจาก *Streptomyces* sp. CH7 กับ *Streptomyces coelicolor* (AL117385) โดยโปรแกรม BlastN version 2.2.1 เครื่องหมายดอกจันแสดงถึงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

>[gi|20520771](https://gi.ncbi.nlm.nih.gov/record/AL117385.2)|[emb|AL117385.2](https://emb.ncbi.nlm.nih.gov/record/AL117385.2)|[SC5G9](https://sc5g9.ncbi.nlm.nih.gov/record/AL117385.2) *Streptomyces coelicolor* cosmid 5G9
Length = 38209

Score = 1637 bits (826), Expect = 0.0
Identities = 1944/2310 (84%), Gaps = 6/2310 (0%)
Strand = Plus / Plus

```

Strep. sp. CH7      590  CTCCCTCTGGAACGACCCGACCGCCCCCGTCGCCGCACGCGTCGACGCGCTGATCGACGC 649
Strep. coelicolor  600  CTCCCCCTGGAACGACACCCTGCTTCCCGTCGCCGCAGAGTCGACGCCCTGATCGACGC 659
      *****
Strep. sp. CH7      650  CATGACCCTGCAGGAGAAGACCGCACAGCTGGTCGGGGCATGGGCCGGCGCCTCCGACGA 709
Strep. coelicolor  660  GATGACCCTGCGGGAGAAGACCGCCAGCTGTACGGAGTCTGGGTGGGCGCCTCCGACGA 719
      *****
Strep. sp. CH7      710  GGGCGGGCAAGTGGCCCCCACCAGCACGAGATGGAGGAGCCCGTCGATCTCGACGCGCT 769
Strep. coelicolor  720  GGGCGGTGAAGTGGCGCCCCACCAGCACGACATGGAGGAGGCCCGTCGATCTCGACGCGCT 779
      *****
Strep. sp. CH7      770  CCTGCCCCACGGACTCGGCCAACTGACCCGACCGTTCGGCACCGTCCCGGTTCGACCCCGC 829
Strep. coelicolor  780  CCTGCCCCACGGACTCGGCCAGCTGACCCGCCCCCTTCGGCACCGTCCCGGTTCGACCCCGC 839
      *****
Strep. sp. CH7      830  CCTCGGCGCGCTCTCCCTGGCCCCGACCCAGGCCCGGATCGCCGCCTCCAACCGCTTCGG 889
Strep. coelicolor  840  CCTGGGTGCGCTCTCCCTGGCCCCGACCCAGGCCCGGATCACCGCCACGAACCGGTTCGG 899
      *** **
Strep. sp. CH7      890  CATCCCCGCTCTCGCGCACGACGAGTGCCTGGCCGGCTTCGCCGCCTGGGGCGCCACCGC 949
Strep. coelicolor  900  CATCCCCGCTCTCGCGCACGACGAGTGTCTGGCCGGCTTCGCCGCCTGGGGTGCACGCGC 959
      *****
Strep. sp. CH7      950  CTACCCCGTCCCGTGTCTTGGGGCGCCGCTTCGACCCCGGCCTGGTGGGGCGCATGGC 1009
Strep. coelicolor  960  CTACCCCGTCCCGTGTCTTGGGGTGCCACCTTCGACCCCGACACGGTGGGGCGCATGGC 1019
      *****
Strep. sp. CH7     1010  CGCCGCCATCGGCCGTGACATGCGCGCCGTC-GCGTCCACCAGGGCTTCGCGCCCGTCCT 1068
Strep. coelicolor  1020  CTCGCCATCGGGCGGGACATGCGTGCCTCGCGCTTCACCAGGGCTTCGCGCCCGTCCT 1079
      * *

```

Strep. sp. CH7 1069 CGACGTCTGCGCGACGTCCGCTGGGGCCGCGTGGAGGAGACCATCGGCGAGGACCCGTA 1128
Strep. coelicolor 1080 GGACGTGGTCCGCGACGCCCGCTGGGGCCGGTTCGAGGAGACCATCGGCGAGGACCCGTA 1139
 ***** ** ***** ***** ** ***** *****

Strep. sp. CH7 1129 CCTCGTCGGCACCATCGGCACCGCTACGTTACAGGCCTGGAGTCCGCCGGGATCGTCGC 1188
Strep. coelicolor 1140 CCTCGTCGGCACCATCGGCACCGCTACGTCGCGGGTCTCGAGTCCGCCGGGATCGTCGC 1199
 ***** ***** * ** * ***** *****

Strep. sp. CH7 1189 CACGCTCAAAGCACTTCGCCGATACTCGGCCTCCCGCGCCGGCCGCAATCTTTGCGCCC 1248
Strep. coelicolor 1200 CACCCTC-AAGCACTTCGTCGGTACTCGGCCTCTCGCGCCGGACGCAA-CCTCGTCCTCC 1257
 *** ** ***** ** ***** ***** ***** * * * *

Strep. sp. CH7 1249 GTCTTCGATGGGACCCGCGGAACGCGCCGACGTGGTGTGCGCCCGTTCGAGATGGCCG 1308
Strep. coelicolor 1258 -TCCTCCATGGG-CCCGCGGAGCGCGCCGACATCCTGCTGCCCCCTTCGAGATGGCGA 1315
 ** * ***** ***** * ***** ** *****

Strep. sp. CH7 1309 TCCGCGAGGGTGGCGCCCGCTCCGTGATGAACGCCTACACCGACACCGACGGCGTCCCT 1368
Strep. coelicolor 1316 TCCGTGAAGCGCGCACGGTCCGTGATGAACGCCTACACCGACACCGACGGCGTCCCT 1375
 ***** ** * ***** ** * ***** ***** *****

Strep. sp. CH7 1369 CCGCGGCCGACGAGAACCTGCTCACCGGGTGTGCGGGACACCTGGGGCTTCGACGGCA 1428
Strep. coelicolor 1376 CCGCGGCCGACGAGAACTGCTCACCGGGTGTGCGCGACACGTGGAGCTTCGACGGCA 1435
 ***** * ***** ***** ***** *****

Strep. sp. CH7 1429 CCGTGGTCCCGACTACTTCGCCGTCGCCTTCCCTGGCGACCCTGCACGGTGTGCGCGCCG 1488
Strep. coelicolor 1436 CCGTCGTCGCCGACTACTTCGCCATCGCCTTCCCTGAAGACCCTGCACGGTGTGGCGGCCG 1495
 ***** ***** ***** ***** ***** ** *****

Strep. sp. CH7 1489 ACTGGGCGGACGCCCGGCACGGCGCTGCACGCGGGCATCGACGTCGAACTGCCCAACG 1548
Strep. coelicolor 1496 AGTGGGCCGACGCCCGGTCTGGCGCTGCGGGCGGGCGTCGACGTCGAACTGCCCGGCCG 1555
 * ***** ***** ***** ***** ***** *****

Strep. sp. CH7 1549 TCAAGACGTACGGCGACCGCTACCGAAGCCGTCGCCGACGGCCGCTCCCGGAGGAGC 1608
Strep. coelicolor 1556 TCAAGACATACGGCGCGCCCTGGCGGAGGCCGTCGCCGACGGCCGTCGCCGAGACGT 1615
 ***** ***** ** * * ** ***** ***** *

Strep. sp. CH7 1609 TCGTCGACCGCGCTCTGCGCCGGTCTCACCAGAAGGTGACGCTCGGCCTGCTCGACC 1668
Strep. coelicolor 1616 TGGTCGACCGGCCCTTCGCCGACACTCACCAGAAGGCGCGGCTCGGCCTGCTCGATC 1675
 * ***** ** * ***** ***** * ***** *****

Strep. sp. CH7 1669 CGGACTGGGACCCCGTCCCGCCGCCCTGGACGGAACGGACCCGGCCGACCCGAGGCC 1728
Strep. coelicolor 1676 CGGACTGGAACCCCTGCCCGCCGCTCGAAGGGCAGACCTCGACGATCCGGCGGCC 1735
 ***** ***** ***** ** * * * ***** * ** * * *****

Strep. sp. CH7 1729 TGC GCGGACGCGTCGACCTGGACAGCCCGGGAAACCGCGCCCTGGCCCGACGCTCGCCG 1788
Strep. coelicolor 1736 TGC GCGGCCGATCGACCTGGACAGTCCGGCGAACCGCGCACTGGCCCGACGCTGGCCG 1795
 ***** ** ***** ***** ***** ***** * ****

Strep. sp. CH7 1789 AGGAAGCGGTCGTCCTGCTCGCCAACGACGGCACGCTGCCGCTGGACCGCCCGCCGCA 1848
Strep. coelicolor 1796 AGGAAGCCGTCGTCGTTGAGCAACGACGGCACGCTGCCGCTCGCGAGGCCGCGCCGCA 1855
 ***** ***** *** * ***** * ** *****

Strep. sp. CH7 1849 TCGCCCTGATCGGACCCAACGCCGACGAACCCACCGCCGTGCTCGGCTGCTACTCCTTCC 1908
Strep. coelicolor 1856 TCGCCCTGCTCGGCCCAACGCCGACGAGGCCGTGCGCGTACTGGGCTGCTATTCTTTC 1915
 ***** **** ***** ** ***** * ***** ***** *

Strep. sp. CH7 1909 CGCAGCACATCGGCGTCCAGCACCCCGGGACGCCCTCGGCATCGCCCTGCCACCCTGC 1968
Strep. coelicolor 1916 CCCAGCACATCGGCGTCCGGTACCCCGGGACCCCGCACGGCATCGAGTCCCCACGCTGC 1975
 * ***** * ***** ** * ***** ***** ****

Strep. sp. CH7 1969 GTGAGACGCTCGCCACCGAGTTCGCCGACGCCCGTACGTCACGTCCGCGGCACCGGCG 2028
Strep. coelicolor 1976 GGGTGGCGCTCGCCCGGAGTTCGCCGACGCTCGGATCACGTTCCGCCGCGGCACCGGCG 2035
 * * * ***** ***** ***** ** ***** *****

Strep. sp. CH7 2029 TCGACGACGGGGACCTGACCGGCCTCGACGAGGCGGTACGGGCGGCCCGTGAGGCGGACG 2087
Strep. coelicolor 2036 TCGACGACGGGGATCTCACCGGCCTCCCGAGGCCGTCCGGGTGGCACGCGAGGCCGACA 2095
 ***** ** ***** ***** ** ***** ** ***** **

Strep. sp. CH7 2088 TCACCGTCGCGGTGCTCGGCGACCGCGCCGGCCTGTTTCGGCCGCGGCACCAGCGGCGAGG 2147
Strep. coelicolor 2096 TCGCTCTGGTGGTGTCTCGGCGACCGCGCCGGCTCTTCGGGCGGGGACCAGTGGGGAAAG 2155
 ** * * ***** ***** ** ***** ** ***** ** * *

Strep. sp. CH7 2148 GCTGCGACGCGGAGACTGGAGTTGCCCGCGCAACAGCAGCTCCTGGACGCGCTGC 2207
Strep. coelicolor 2156 GCTGCGACGTCGAGACGCTGGCACTGCCCGGGCACAGCAGCGTTGCTCGACGCCCTGC 2215
 ***** ***** ***** ***** ** ** ***** * ** ***** ****

Strep. sp. CH7 2208 TGGACTCGGGCACCCCGGTCGTACCGTCTGCTCGGGGCCGCCCTACGCACCTCGGCC 2267
Strep. coelicolor 2216 TGGACCTGGGGACGCCCTTGGTACCGTGTGCTCGCGGGACACCGTACTCCCTCGGCC 2275
 ***** *** ** * ***** ***** ** ** * *****

Strep. sp. CH7 2268 GTGCGGTGACGGAGTCGGCGGCGATCGTGCAGTCCTTCTTCCCGGCGAGGAAGGCACGC 2327
Strep. coelicolor 2276 GTGCCGTCGAGGAGTCCGCGGCGATCGTGCAGTCCTTCTTCCCGGTGAGGAAGGCACCC 2335
 **** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *

Strep. sp. CH7 2328 ACGCCATCGCCGGGGTGCTCAGCGGCCGGGTCAACCCCTCCGACGCTCCCGTCCGCG 2387
Strep. coelicolor 2336 ACGCGATCGCCGGTGTGCTCAGCGGCCGGTCAACCCGTCCGGGCGGCTCCCGTGGGGG 2395
 **** ***** ***** ***** ***** ** ***** ** *

Strep. sp. CH7 2388 TGCCGCGCACCCCGGGCCTCCAGCGCGGCACCTACCTCGGAGCGCGGCTCGCCACGCCG 2447
Strep. coelicolor 2396 TGCCGCGCGGGCCGGGGTCCCAGCCGGCCACCTACCTCGGAGCGAAGCTCGCCACGCCG 2455
 ***** * ***** * ***** * *****

Strep. sp. CH7 2448 GCGACGCGTCCGCCGTCGACCCGGCCCCCGGTTCCCTTCGGCCACGGCCTGTCCTACA 2507
Strep. coelicolor 2456 GCGAGGTGTCCAGCATCGACCCGACACCGGCGTTCCTTCGGTACGGCCTGTCCTATA 2515
 **** * **** * ***** * ** ***** ***** *

Strep. sp. CH7 2508 CCCGCTTCGACTGGACGGACCTGACCGGGACACCCAGGAGGCCCCACGGACGGTGAGT 2567
Strep. coelicolor 2516 CCCGGTTCGACTGGACGGACCTGAGCGTGGACGACCAGGAGGCACCGACGGGCGAGT 2575
 **** ***** ** **** ***** ** ***** ****

Strep. sp. CH7 2568 TCATCCTTGCACTCACCGTCCGCAACAAGGGCGACCGTCCCGGCACGGAGGTCGTCCAGC 2627
Strep. coelicolor 2576 TCACCTCACCTTCACCGTCCGCAACACCGGCGGGCGGTCCGGACCGAGGTCGTCCAGC 2635
 *** ** * ***** ***** ** **** ** *****

Strep. sp. CH7 2628 TCTACCTTCACGACCCGGTCGCCTCCGTTCGTCCAGCCGCTCCAGCGCCTCGTCGGCTACA 2687
Strep. coelicolor 2636 TCTATCTGCACGACCCGGTCGCCTCCGTTCGTCCAGCCGGTGCAGCGGCTCGTCGGCTACG 2695
 **** ** ***** ***** * ***** *****

Strep. sp. CH7 2688 CACGGGTGGCGTTGGAACCGGGGAGTCCCGCCGCTGACCGTCACGGTCCCGGCCGACC 2747
Strep. coelicolor 2696 CCCGGTTCGACCTGGAGCCCGGTGAGCCCCGGCGGCTGCGTGTACCGTCCCGGCCGATC 2755
 * ***** * **** ** ** * ** * ** * ***** ***** *

Strep. sp. CH7 2748 TGGCGTCCTTCACGGCCGCGACGGACGGCGCATCGTGAACCGGGCGAACTGGAAGTGA 2807
Strep. coelicolor 2756 TCGCCTCGTTCACCGGACGCGACGGACGGCGTGTGGTGAACCGGGCGCGCTGGAGCTGA 2815
 * ** ** ***** ** ***** * ***** ***** *****

Strep. sp. CH7 2808 GGCTGGCCGCCTCCAACACGGACCGGCGCCTGACGGCCCGGTCACTGACCGGCACGG 2867
Strep. coelicolor 2816 GGCTGGCCGCCTCCAGCGCGGACCCACGGCTGACCGGAGGGTTCGACTGACCGGAGTCCG 2875
 ***** * ***** ** ***** ** ***** ***** *

Strep. sp. CH7 2868 AACGCCACGTGGACCACACGCGACGCCTGC 2897
Strep. coelicolor 2876 AACGGCACCTGGACCACACGCGGCGCCTGC 2905
 **** ** ***** *****

5. รูปภาพแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีนบีตา-ไซโลลิตเดสจาก *Streptomyces* sp. CH7 กับ *Streptomyces lividans* (AF043654) โดยโปรแกรม BlastN version 2.2.1 เครื่องหมายดอกจันแสดงถึงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

```
>gi|3941366|gb|AF043654.1|AF043654 Streptomyces lividans 1326 BxlS (bxlS), BxlR (bxlR), BxlE (bxlE), BxlF (bxlF), BxlG (bxlG), and BxlA (bxlA) genes, complete cds
Length = 8616
```

```
Score = 523 bits (264), Expect = e-145
Identities = 866/1055 (82%), Gaps = 15/1055 (1%)
Strand = Plus / Plus
```

```
Strep. sp. CH7      1276 CCGACGTGGTGTGCTGCCGCCGTTTCGAGATGGCCGTCGCGAGGGTGGCGCCCGCTCCGTGA 1335
Strep. lividans    6743 CCGACGTCTGTCTCCCGCCGTTTCGAGATGGCCGTCGCGAGGGCGGCTCCCGCTCCGTGA 6802
*****  ****  *****

Strep. sp. CH7      1336 TGAACGCCTACACCGACACCGACGGCGTGCCCTCCGCGGCCGACGAGAACCTGCTCACC- 1394
Strep. lividans    6803 TGTCCGCCTACACCGACATCGACGGGGTGCCCGCAGCGGCCGACGAGCGCTGCTGACCG 6862
**  *****  *****  *****  *  *****  *****  ***

Strep. sp. CH7      1395 GGGCTGCTGCGGGACACCTGGGGCTTCGACGGCACCGTGGTTCGCCGACTACTTCGCCGTC 1454
Strep. lividans    6863 GGGCTG-TGCGCGACACCTGGGGCTTCGAGGGAACGGTTCGTCGCCGACTACTTCGGCATC 6921
*****  ****  *****  **  *  *  *****  *  **

Strep. sp. CH7      1455 GCCTTCCTGGCGACCCTGCACGGTGTGCGCCCGACTGGGCGGACGCCGCCGGCACGGCG 1514
Strep. lividans    6922 GCCTTCCTCAAGACGCTGCACGGCATCACCGCCGACTGGGCGGACGCCGCCGGAGCCGCG 6981
*****  ****  *****  **  *****  *****  *  ***

Strep. sp. CH7      1515 CTGCACGCGGGCATCGACGTGCAACTGCCCAACGT-CAAGACGTACGGCGCACCGCTCAC 1573
Strep. lividans    6982 CTGAAGGCGGGCCTCGACGTGAGCTGCCACCGTCCAAGAC-TTCGGGACCCCGCTCGT 7040
***  *  *****  *****  *****  ***  *****  *  **  *  *****

Strep. sp. CH7      1574 CGAAGCCGTGCGCGACGGCCGCGTCCCGGAGGAGCTCGTTCGACCGCGCTCTGCGCCGGGT 1633
Strep. lividans    7041 CGATGCGGTACCGACGGCCGGGTGCCCGAGGCCCTCATCGACCGGG-CTGCGCCGCGT 7098
***  **  ***  *****  **  *  **  ***  ***  *****  *  *****  **

Strep. sp. CH7      1634 CCTCACCAGAAAGGTGACGCTCGGCCTGCTCGACCCGGACTGGGACCCCGTGCCGGCCGC 1693
Strep. lividans    7099 CCTGGGACAGAAAGCGGAGCTCGGACTGCTCGACCCGGACT-GGAGCCCGGTCCCGCCGC 7157
***  *****  *  *****  *****  *****  ***  *****  **  *****

Strep. sp. CH7      1694 CCTGGACGGAACGGACCCCGCCGACCCCGAGGCCCTGCGCGGACGCGTTCGACCTGGACAG 1753
Strep. lividans    7158 GCTCGACGGAGTGGACCTCTCGCACCCGGAGGCGCTGCGCGGCCGGATCGACCTGGACCG 7217
**  *****  *****  *  *****  *****  *****  **  *****  *  *
```


6. รูปภาพแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีนบีตา-ไซโลสิดีสจาก *Streptomyces* sp. CH7 กับ *Streptomyces thermoviolaceus* (AB053119) โดยโปรแกรม BlastN version 2.2.1 เครื่องหมายดอกจันแสดงถึงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

```
>gi|14549204|dbj|AB053119.1| Streptomyces thermoviolaceus bxlA gene for beta-
xylosidase, complete
      cds
      Length = 2888

Score = 252 bits (127), Expect = 3e-63
Identities = 284/332 (85%), Gaps = 4/332 (1%)
Strand = Plus / Plus

Strep. sp. CH7      881  CCGCTTCGGCATCCCCGCCCTCGCGCACGACGAGTGCCTGGCCGGCTTCGCCGCCTGGGG 940
Strep. thermovio. 563  CCGCTTCGGCATCCCCGCCCTCGCCCACGAGGAGTGCCTGGCCGGTTTCACCGCCTGGGG 622
      *****

Strep. sp. CH7      941  CGCCACCGCCTACCCCGTCCCGCTGTCCTGGGGCGCCGCCTTCGACCCCGGCCTGGT-GC 999
Strep. thermovio. 623  CGCCACCGCCTACCCGGTGCCGCTGGCCTGGGGGGCGACCTTCGACCCACAGCTGGTCGA 682
      *****

Strep. sp. CH7      1000 GGCGCATGGCCGCCCATCGGCCGTGACATGCGCGCCGTCG-CGTCCACCAGGGCCTCG 1058
Strep. thermovio. 683  GGCG-ATGGCCGCGCGCATCGGCCGGGACATGCGGTTCGGTGGGCGTGCACCAGGGCCTGG 741
      **** *****

Strep. sp. CH7      1059 CGCCCGTCCTCGACGTCGTGCGCGACGTCCTGTTGGGGCCGCGTGGAGGAGACCATCGGCG 1118
Strep. thermovio. 742  CGCCGGTCATGGACGTGGTCCGCGACCTGCGCTGGGGCCGGGTGGAGGAGACCATCGGCG 801
      **** * * ***** * *****

Strep. sp. CH7      1119 AGGACCCGTACCTCGTCGGCACCATCGGCACCGCCTACGTTAGGGCCTGGAGTCCGCCG 1178
Strep. thermovio. 802  AGGACCCCTACCTGGTCGGCACCATCGGCAGCGCCTATGTGCGGGCCTGGAGTCCGCCG 861
      ***** *****

Strep. sp. CH7      1179 GGATCGTCGCCACGCTCAAAGCACTTCGCCCG 1210
Strep. thermovio. 862  GGATCGTCGCCACGCT-GAAGCACTTCGCCCG 892
      ***** *****
```

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายโตมร ทองน้ำวน เกิดเมื่อวันอังคารที่ 11 ตุลาคม พ.ศ.2520 ที่กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 91/245/15 หมู่ 11 ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย