

# การโคลนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนส จากแบคทีเรียน้ำพุร้อน

## Cloning and Nucleotide Analysis of a Xylanase Gene From a Hot Spring Bacterium

อริศรา อรรถเวทวรวิธินันท์<sup>1</sup> สุชานนท์ เสมแก้ว<sup>1</sup> สิชล ฮวดรักษาสัตย์<sup>1</sup> ธาปน จงรักษ์<sup>1</sup>  
สุดาทิพย์ จันทน์<sup>1</sup> จิรวรรณ อภิรัชการ<sup>2</sup> และ ชนิตโชต ปิยพิทยานันต์<sup>1\*</sup>

Arisara Arthawedworawuthi<sup>1</sup>, Suchanon Samkaew<sup>1</sup>, Sichon Huadraksasat<sup>1</sup>, Thapana Chongraks<sup>1</sup>,  
Sudathip Chantorn<sup>1</sup>, Jirawan Apiraksakorn<sup>2</sup> and Chanitchote Piyapittayanun<sup>1\*</sup>

### บทคัดย่อ

ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสายพอลิเมอร์ของไซแลนได้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ช่วยฟอกสีในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ และช่วยให้อาหารสัตว์อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายขึ้น เป็นต้น ไซแลนเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่จะมีสมบัติแตกต่างกันไป ดังนั้นการค้นหาและศึกษาไซแลนเนสชนิดใหม่ๆ จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด งานวิจัยนี้ศึกษาไซแลนเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. J12 ที่แยกมาจากแหล่งน้ำพุร้อนในจังหวัดระนอง โดยออกแบคทีเรียโปรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลายด้าน 5' และ 3' ของยีนไซแลนเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ผลที่ได้พบว่ายีนไซแลนเนสมีขนาด 642 คู่เบส และคาดการณ์ว่าโปรตีนจะมีขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน ผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศบ่งชี้ว่าไซแลนเนสชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Glycoside Hydrolases สกุล 11 (GH11) ซึ่งไซแลนเนสในสกุลนี้จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงและยังมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงอีกด้วย

**คำสำคัญ:** *Bacillus* sp., น้ำพุร้อน, ยีนไซแลนเนส, Glycoside Hydrolases 11

<sup>1</sup> ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต เลขที่ 99 หมู่ 18 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, 99 Moo 18, Paholyothin Rd., KlongNeung, Klong Luang, Prathumthani 12120, Thailand.

<sup>2</sup> ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ 123/2002 หมู่ 16 ถนนมิตรภาพ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, 123/2002 Moo 16, Mittraphap Rd., Nai-Maung, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand.

\* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): chanitchote@gmail.com

## ABSTRACT

A xylanase is a class of enzymes that hydrolyzes xylans into xylooligosaccharides. This enzyme is very useful in many industries including paper and pulp bleaching to substitute the use of toxic chemicals, improving animal digestibility in feed industry, etc. Xylanases are found in many organisms including bacteria, yeast, and fungi but their enzymatic activities and optimal conditions vary greatly from one to another. Searching and screening for novel xylanases will provide enzymes of choice to use in various applications to achieve effective outcomes and to reach maximum benefit. This study investigated a xylanase from *Bacillus* sp. J12 isolated from a hot spring in Ranong province. A pair of primers was designed corresponding to the nucleotide sequences at the 5' and 3' end of xylanase genes from closely related bacterial species available in the GenBank database. A Polymerase Chain Reaction (PCR) using genomic DNA as a template gave rise to a 642 base pair product. Therefore, this gene was predicted to encode a xylanase with a molecular weight of approximately 23 kilodaltons. Bioinformatics analysis indicated that *Bacillus* sp. J12 xylanase belonged to a Glycoside Hydrolases family 11 (GH11) in which members in this family had small size (around 20 kilodaltons), high substrate selectivity as well as high catalytic efficiency.

**Key words:** *Bacillus* sp., hot spring, xylanase gene, Glycoside Hydrolases 11

### บทนำ

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของ เฮมิเซลลูโลสที่พบมากในผนังเซลล์ของพืชรองจากเซลลูโลส มีโครงสร้างหลักคือน้ำตาล  $\beta$ -1,4-xylopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า -1,4 ไกลโคซิดิกเป็นสายหลักและมีโซ่กิ่งเป็นพวกหมู่อะซิทิล (acetyl group) หมู่อะราบินโนฟิวราโนซิล (arabinofuranosyl group) และหมู่กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid group) (Sunna and Antranikian, 1997) ในการย่อยไซแลนให้สมบูรณ์ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไซแลนโนไลติก (xylanolytic enzymes) หลายชนิดโดยเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักมี 2 ชนิด

คือเอนโดไซแลนเนส (Endo- $\beta$ -1,4-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเบต้า -1,4 ไกลโคซิดิกแบบสุ่มในโครงสร้างสายหลักของไซแลนได้เป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์และเบต้าไซโลซิเดส ( $\beta$ -xylosidases; EC 3.2.1.37) ทำหน้าที่ย่อยพันธะเบต้า -1,4 ไกลโคซิดิกจากปลายสายได้เป็นน้ำตาลไซโลส (เปี่ยมสุข, 2551; Juturu and Wu, 2012) ไซแลนเนสจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Glycoside Hydrolases (GH) โดยไซแลนเนสแต่ละชนิดจะถูกจำแนกลงในสกุลย่อยต่างๆ คือ GH สกุล 5 8 10 11 และ 30 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางโครงสร้างและความจำเพาะต่อสับ

เสตรทไนบรราคาไซเลนเนสทั้ง 5 สกุลนี้ GH11 จัดเป็นสกุลที่มีขนาดของโปรตีนเล็กที่สุด (ประมาณ 20 กิโลดาลตัน) มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง อีกทั้งมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูง (Paës *et al.*, 2012) ดังนั้นจึงได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยกันมากทั้งในแง่การศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ สมบัติและการทำงานของเอนไซม์ รวมถึงแนวทางการนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆ มีรายงานว่าไซเลนเนสสกุล GH11 ที่แยกได้จากราส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรด แต่พวกที่แยกได้จากแบคทีเรียมักจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.0-9.0 อีกทั้งไซเลนเนสสกุล GH11 มักมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 35-85 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดว่าครอบคลุมอุณหภูมิในช่วงกว้าง (Paës *et al.*, 2012) ปัจจุบันไซเลนเนสได้เข้าไปมีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมการย่อยชีวมวลเพื่อการผลิตไบโอเอทานอล และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อช่วยย่อยสับสเตรทขนาดใหญ่ให้เป็นแหล่งพลังงานที่สัตว์สามารถย่อยและดูดซึมได้ง่าย เป็นต้น (เปี่ยมสุข, 2551; Subramaniyan and Prema, 2002; Gupta and Kar, 2008)

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์มาใช้ในการโคลนยีนเพื่อผลิตเอนไซม์กันอย่างกว้างขวางมากขึ้น เนื่องจากเป็นระบบที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย จึงมีประโยชน์ทั้งในแง่การศึกษาวิจัยเพื่อศึกษาโครงสร้างและสมบัติของเอนไซม์ เช่น Huang *et al.* (2006) ผลิตไซเลนเนสที่แยกจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B10 ใน *Escherichia coli* และพบว่าเอนไซม์มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในกระบวนการกำจัดยาง

เหนียวออกจากเส้นใยพืช จึงได้มีการนำไปใช้จริงในกระบวนการกำจัดยางเหนียวออกจากป่านรามิ (Xiao *et al.*, 2004) งานวิจัยนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เพิ่มปริมาณยีนไซเลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อนในประเทศไทย และสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนไซเลนเนสชนิดนี้แทรกอยู่ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์รวมถึงลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลรวมถึงการคาดการณ์โครงสร้างและหน้าที่ของยีน ทางผู้วิจัยวางแผนจะนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นไปผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ใน *Escherichia coli* expression system เพื่อศึกษาหน้าที่และสมบัติการทำงานของเอนไซม์โดยคาดหวังว่าไซเลนเนสชนิดนี้จะสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกในการนำไปใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

*Bacillus* sp. J12 (Accession number KP 996492) เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากบ่อน้ำพุร้อนรักษะวาริน ตำบลเขานิวเวศน์ อำเภอเมืองจังหวัดระนองซึ่งมีอุณหภูมิสูงประมาณ 65 องศาเซลเซียส จากการทดสอบเบื้องต้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซเลนเนสเมื่อเลี้ยงบน Oat spelt xylan นำแบคทีเรียชนิดนี้มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์และเทอาหารส่วนบนทิ้ง จากนั้นกระจายเซลล์แบคทีเรียโดยการเติมสารละลาย Saline-EDTA และเติม

DNA extraction buffer บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเติมสารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนบนแล้วเติมสารละลาย 3 M sodium acetate พีเอช 5.2 และ absolute ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ระเหยจนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0

#### การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนส โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนสจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank และใช้โปรแกรม FastPCR เวอร์ชัน 6.1 (Kalendar *et al.*, 2014) ช่วยในการออกแบบ โดยได้เพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น recognition site สำหรับ *Bam*HI เข้าที่ปลาย 5' ของ forward primer (Bxyn-F) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น recognition site สำหรับ *No*I เข้าที่ปลาย 5' ของ reverse primer (Bxyn-R) เพื่อให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสามารถนำไปต่อกับพลาสมิด pGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences) จากนั้นตรวจสอบสมบัติไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม IDT Oligo Analyzer เวอร์ชัน 3.1 (Owczarzy *et al.*, 2008)

#### การเพิ่มปริมาณยีนไซแลนเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. J12 ที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไซแลนเนส โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาดังนี้คือดีเอ็นเอต้นแบบ 200 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ (1X) dNTPs (0.2 มิลลิโมลาร์)  $MgCl_2$  (1.5 มิลลิโมลาร์) ไพรเมอร์ Bxyn-F และ Bxyn-R (อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์) และ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิต) และกำหนดสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังนี้คือ เริ่มต้นการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ 2 วัฏจักร โดยวัฏจักรที่ 1 จำนวน 15 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 42 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที หลังจากนั้นตามด้วยวัฏจักรที่ 2 จำนวน 20 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 52 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที หลังจากนั้นทำ extension รอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที นำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 2.0 เปอร์เซ็นต์ และความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นนำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction (RBC Bioscience)

#### การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนไซแลนเนส (pGEX-4T-1-xyn)

นำพลาสมิด pGEX-4T-1 และผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตัดด้วยเอนไซม์

NoI และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction และนำทั้งพลาสมิดและผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสไปตัดอีกครั้งด้วยเอนไซม์ *Bam*HI โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นนำพลาสมิดและผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสมาเชื่อมต่อกัน (ligation) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas) เพื่อสร้างเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-*xyn* โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาดังนี้คือ ซินดีเอ็นเอผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสและพลาสมิด pGEX-4T-1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างละ 30 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ (1X) และเอนไซม์ T4 DNA ligase (5 ยูนิต) และใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อในการปรับปริมาตรรวมเป็น 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อเตรียมทำทรานสฟอร์มเมชันต่อไป

#### การทรานสฟอร์มพลาสมิด pGEX-4T-1-*xyn* เข้าไปใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue

เติมผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาการเชื่อมต่oprมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าไปใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่ถูกทำให้เป็นคอมพิเทนต์ (competent cells) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำมา heat shock โดยแช่ลงในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วย้ายหลอดลงมาสั้ดถึง

น้ำแข็งทันที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ลงไป 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เช้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกระจาย (spread plate) แบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

#### การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-*xyn*

การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส ทำได้โดยสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาสกัดพลาสมิดเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ปริมาณ 100 นาโนกรัม และใช้ไพรเมอร์ Bxyn-F (0.2 ไมโครโมลาร์) และ Bxyn-R (0.2 ไมโครโมลาร์) ในการเพิ่มปริมาณยีนไซแลนเนสโดยมีองค์ประกอบอื่นๆ ในปฏิกิริยาดังนี้คือ บัฟเฟอร์ dNTPs (0.2 มิลลิโมลาร์) MgCl<sub>2</sub> (1.5 มิลลิโมลาร์) และ Taq DNA polymerase (5 ยูนิต) และกำหนดสภาวะของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังนี้คือ เริ่มต้นการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นเข้าวัฏจักรปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีและเพิ่ม extension รอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที นำผลผลิตปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 2.0 เปอร์เซ็นต์ และ

ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ส่วนการตรวจสอบพลาสมิด pGEX-4T-1-*xyn* ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดย นำพลาสมิดที่สกัดได้ข้างต้นมาตัดด้วย *NotI* และ *BamHI* แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ และความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์

### การวิเคราะห์ยีนไซแลนเนสด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนสที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEX-4T-1-*xyn* ที่ผ่านการตรวจสอบและยืนยันเบื้องต้น โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Biodesign (ประเทศไทย) และเนื่องจากยีนไซแลนเนสแทรกอยู่ในพลาสมิด pGEX-4T-1 จึงใช้ไพรเมอร์ pGEX 3' (5' CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG3') และไพรเมอร์ pGEX 5' (5'GGGCTGGCAAGCCA CGTTTGGTG3') ซึ่งทำให้สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนสได้ทั้ง 2 สายโพลีนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Blast (Altschul *et al.*, 1990) เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันจาก GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalW เวอร์ชัน 2 (Larkin *et al.*, 2007) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogentic tree) กับลำดับกรดอะมิโนของไซแลนเนส GH11 อื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016)

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

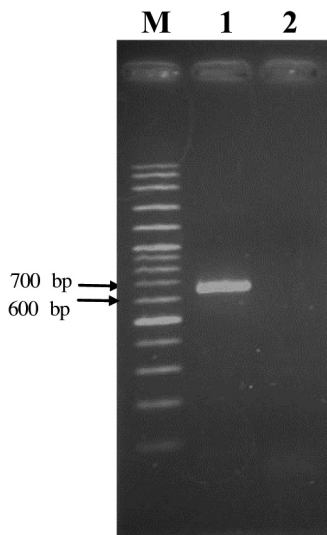
การออกแบบไพรเมอร์และการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณยีนไซแลนเนส

ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ที่ออกแบบมามีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นดังนี้ Bxyn-F (5' GCGGATCCTTTAAGTTTAAAAAGAATTTC TTAGTTGG 3') มีค่า Tm เท่ากับ 59.1 องศาเซลเซียส และ Bxyn-R (5'GCGGCCGCTTACCACACTGTTACGTTAGAACTTCC 3') มีค่า Tm เท่ากับ 67.7 องศาเซลเซียส เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus sp.* J12 มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและใช้ไพรเมอร์ Bxyn-F และ Bxyn-R ในการเพิ่มปริมาณยีนไซแลนเนส พบว่าผลผลิตของปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขนาดประมาณ 650 คู่เบส (ภาพที่ 1) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับยีนไซแลนเนสจากแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่ม *Bacillus* ที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank

### การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนไซแลนเนส (pGEX-4T-1-*xyn*)

เมื่อนำพลาสมิด pGEX-4T-1 และผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* และ *BamHI* และเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วทรานสฟอร์มเข้าไปใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่เป็นเซลล์คอมพิเทนต์ พบว่าเมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการทรานสฟอร์มไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีโคโลนีจำนวนหนึ่งสามารถเจริญขึ้นมาได้ จากนั้นสุ่มเลือกมา 3 โคโลนีมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำไปสกัดพลาสมิดเพื่อยืนยันว่าโคโลนีเหล่านั้นได้รับการทรานสฟอร์มพลาสมิด pGEX-4T-1-*xyn* เข้าไป





**ภาพที่ 1** การเพิ่มปริมาณยีนไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12  
 แถว M: 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis); แถว 1: ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเมอไรเซชันของ *Bacillus* sp. J12 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ; แถว 2: ตัวควบคุมผลลบที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ

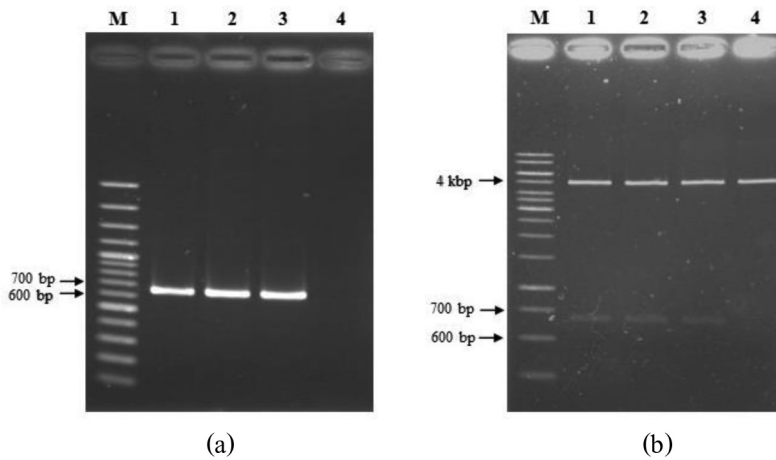
#### การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xyn

เมื่อนำพลาสมิดที่สกัดได้จาก *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลลินมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเมอไรเซชัน โดยใช้ไพรเมอร์ Bxyn-F และ Bxyn-R พบว่ามีแถบดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเมอไรเซชันขนาดประมาณ 650 คู่เบส ปรากฏบนเจลอะกาโรสซึ่งคาดว่าจะเป็ยีนไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 จากทั้ง 3 โคลนีสี่ที่สุ่มมา (ภาพที่ 2a) นอกจาก

นั้นผลการตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเมื่อนำทั้ง 3 พลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเมอไรเซชัน (ภาพที่ 2a) มาตัดด้วย *NotI* และ *BamHI* พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ ประมาณ 4,900 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของพลาสมิด pGEX-4T-1 และประมาณ 650 คู่เบส ซึ่งคาดว่าจะเป็ยีนไซแลนเนส (ภาพที่ 2b) จึงแสดงให้เห็นว่ายีนดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็ยีนไซแลนเนสได้แทรกเข้าไปในพลาสมิด pGEX-4T-1 ที่ระหว่างจุดตัดเอนไซม์ *BamHI* และ *NotI* เป็นผลสำเร็จและมีทิศทางการเชื่อมต่อที่ถูกต้องด้วย จึงเป็นที่มาของการเรียกชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนที่คาดว่าจะเป็ยีนไซแลนเนสนี้ว่าพลาสมิด pGEX-4T-1-xyn

#### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนส

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนสที่แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xyn โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ pGEX 3' และ pGEX 5' ทำให้สามารถยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 2 สายโพลีนิวคลีโอไทด์โดยพบว่ายีนไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 มีขนาด 642 คู่เบสเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Blast (Altschul *et al.*, 1990) และ Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. JS อยู่ 98 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับของ *Bacillus* sp. THCM3 อยู่ 97 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-*xyn*

แถว M: 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

(a) แถว 1-3: ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่คาดว่าจะเป็ยีนไซแลนเนสเมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดจากโคลนที่ 1 2 และ 3 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ; แถว 4: ตัวควบคุมผลลบที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ; (b) แถว 1-3: รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-*xyn* จากโคลนที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ที่ผ่านการตัดด้วย *NotI* และ *BamHI*; แถว 4: พลาสมิด pGEX-4T-1 ที่ผ่านการตัดด้วย *NotI* และ *BamHI*

### การคาดการณ์โครงสร้างของไซแลนเนส

เมื่อใช้โปรแกรม CLC Sequence Viewer เวอร์ชัน 7 (Qiagen) แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่าไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 มีขนาด 213 กรดอะมิโนและจากการคำนวณโดยใช้โปรแกรม ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005) พบว่าไซแลนเนสที่โคลนได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 23.24 กิโลดาลตัน

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนด้วยโปรแกรม PROSITE (De Castro *et al.*, 2006) และ InterPro (Mitchell *et al.*, 2015) พบว่าภายในโครงสร้างของโปรตีนไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 ประกอบด้วย GH11 (Glycosyl hydrolase family 11) domain อยู่ระหว่างกรด

อะมิโนตำแหน่งที่ 20-213 โดยโปรตีนนี้มีตำแหน่ง active site 2 ตำแหน่งได้แก่ GH11 active site 1 อยู่ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 103 - 113 ซึ่งมี Consensus pattern ดังนี้ [PSA]-[LQ]-x-E-[YF]-Y-[LIVM](2)-[DE]-x-[FYWHN] โดย E คือกรดอะมิโนกลูตามัทตำแหน่งที่ 106 เป็น active site residue ที่ทำหน้าที่เป็น Nucleophile และ GH11 active site 2 อยู่ระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 197 - 208 ซึ่งมี Consensus pattern ดังนี้ [LIVMF]-x(2)-E-[AG]-[YWG]-[QRFGS]-[SG]-[STAN]-G-x-[SAF] โดย E หรือกรดอะมิโนกลูตามัทตำแหน่งที่ 200 เป็น active site residue ที่ทำหน้าที่เป็น Proton donor จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phobius (Käll *et al.*, 2004) และ SignalP -4.1 (Petersen *et al.*, 2011) พบว่าลำดับ



```

Bacillus sp. J12      ATGTTTAAAGTTAAAAAGAATTTCTTAGCTGGATTAACGGCAGCTTTAATGAGTATAAGT
Bacillus sp. JS      ATGTTTAAAGTTAAAAAGAATTTCTTAGTGGATTAACGGCAGCTTTAATGAGTATAAGC
Bacillus sp. THCM3   ATGTTTAAAGTTAAAAAGAATTTCTTAGTGGATTAACGGCAGCTTTAATGAGTATAAGC
*****

Bacillus sp. J12      TTGTTTTTCGGCAACCGCCTCTGCAGCTAGCACAGACTACTGGCAAATTTGGACTGATGGG
Bacillus sp. JS      TTGTTTTTCGGCAACCGCCTCTGCAGCTAGCACAGACTACTGGCAAATTTGGACTGATGGT
Bacillus sp. THCM3   TTGTTTTTCGGCAACCGCCTCTGCAGCTAGCACAGACTACTGGCAAATTTGGACTGATGGT
*****

Bacillus sp. J12      GCGGGAACAGTAAACGCCGTCATGGATCTGGCGGGAATTACAGTGTTAATTTGGTCTAAT
Bacillus sp. JS      GCGGGAACAGTAAACGCCGTCATGGATCTGGCGGGAATTACAGTGTTAATTTGGTCTAAT
Bacillus sp. THCM3   GCGGGAACAGTAAACGCCGTCATGGATCTGGCGGGAATTACAGTGTTAATTTGGTCTAAT
*****

Bacillus sp. J12      ACCGGAATTTGTTGTTGGTAAAGGCTGGACTACAGTTTCGCCAATTTAGGACAATAAAC
Bacillus sp. JS      ACCGGAATTTGTTGTTGGCAAAGGCTGGACTACAGTTTCGCCAATTTAGGACGATAAAC
Bacillus sp. THCM3   ACCGGAATTTGTTGTTGGCAAAGGCTGGACTACAGTTTCGCCAATTTAGGACGATAAAC
*****

Bacillus sp. J12      TATAATGCCGGAGTTTGGGCGCCGAATGGCAATGGATATTGACTTTATATGGTTGGACG
Bacillus sp. JS      TATAATGCCGGAGTTTGGGCGCCGAATGGCAATGGATATTGACTTTATATGGTTGGACG
Bacillus sp. THCM3   TATAATGCCGGAGTTTGGGCGCCGAATGGCAATGGATATTGACTTTATATGGTTGGACG
*****

Bacillus sp. J12      AGAGCACCTCTCATTGAATATTATGATAGTGGATTATGGGGTACTTACAGACCTACCGGA
Bacillus sp. JS      AGAGCACCTCTCATTGAATATTATGATAGTGGATTATGGGGTACTTACAGACCTACCGGA
Bacillus sp. THCM3   AGAGCACCTCTCATTGAATATTATGATAGTGGATTATGGGGTACTTACAGACCTACCGGA
*****

Bacillus sp. J12      ACGTATAAAGGTACTGTAAGAGTGTATGGAGGTACATATGACATATATACAACAACACGT
Bacillus sp. JS      ACGTATAAAGGTACTGTAAGAGTGTATGGAGGTACATATGACATATATACAACAACACGT
Bacillus sp. THCM3   ACGTATAAAGGTACTGTAAGAGTGTATGGAGGTACATATGACATATATACAACAACACGT
*****

Bacillus sp. J12      TATAACGCACCTTCCATTGATGGCGATAACACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTGTTCGT
Bacillus sp. JS      TATAACGCACCTTCCATTGATGGCGATCGCACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTGTTCGC
Bacillus sp. THCM3   TATAACGCACCTTCCATTGATGGCGATCGCACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTGTTCGC
*****

Bacillus sp. J12      CAGACGAAGACCAACAGGAAGTAAACGCTACAATCACTTTACGCAATCATGTGAACGCA
Bacillus sp. JS      CAGTCTGAAGACCAACCGGAAGCAACGCTACAATCACTTTACGCAATCATGTGAACGCA
Bacillus sp. THCM3   CAAACGAAGACCAACCGGAAGCAACGCTACAATCACTTTACGCAATCATGTGAACGCA
** *****

Bacillus sp. J12      TGGAAAGCCATGGAATGAATCTGGGAAGTAAATGGGCTTACCAAGTCATGGCGACAGAA
Bacillus sp. JS      TGGAAAGCCATGGAATGAATCTGGGCAAGTAAATGGGCTTACCAAGTCATGGCGACAGAA
Bacillus sp. THCM3   TGGAAAGCCATGGAATGAATCTGGGCAAGTAAATGGGCTTACCAAGTCATGGCGACAGAA
*****

Bacillus sp. J12      GGATATCAAAGTAGTGGAACTTCTAACGTAACAGTGTGGTAA
Bacillus sp. JS      GGATATCAAAGTAGTGGAACTTCTAACGTAACAGTGTGGTAA
Bacillus sp. THCM3   GGATATCAAAGTAGTGGAACTTCTAACGTAACAGTGTGGTAA
*****
    
```

เครื่องหมาย ‘\*’ หมายถึงนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมด และช่องว่างหมายถึงตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน

**ภาพที่ 3** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซเลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 กับไซเลนเนสชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank (ข้อมูล ณ วันที่ 3 เมษายน 2559)

กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-28 เป็นบริเวณ Signal peptide ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ คาดการณ์ว่าเมื่อเสร็จสิ้นการขนส่ง Signal peptide นี้จะถูกตัดออกจากโครงสร้างของโปรตีนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 29

**การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนไซเลนเนส**

จากการนำลำดับกรดอะมิโนของไซเลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) กับลำดับกรดอะมิโนของไซเลนเนส GH11 อื่นๆ

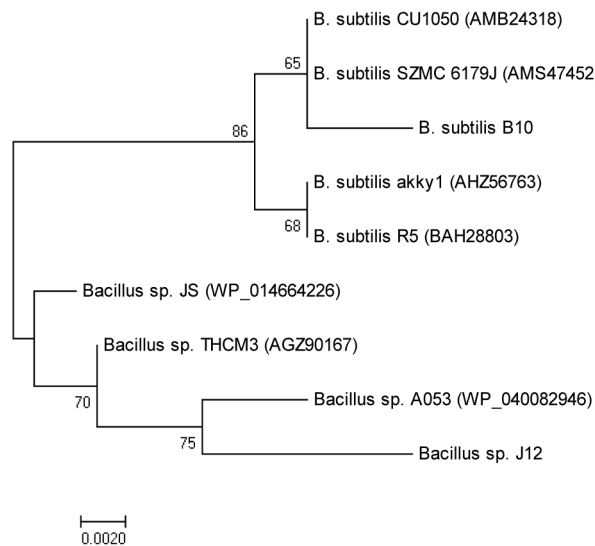
ในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016) ได้แผนภูมิกความสัมพันธ์ดังภาพที่ 4 พบว่า ไชแลนเนส จาก *Bacillus* sp. J12 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความสัมพันธ์เดียวกับ *Bacillus* sp. A053 *Bacillus* sp. THCM3 และ *Bacillus* sp. JS โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ ไชแลนเนสจาก *Bacillus* sp. A053 มากที่สุดด้วยค่า bootstrap 75 เปอร์เซ็นต์

#### การคาดการณ์บทบาทของไชแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12

มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า ไชแลนเนสที่แยกได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ R5 มีสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานและมีเสถียรภาพสูงในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียสและที่ค่า

พีเอชสูงจึงน่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษ (Jalal *et al.*, 2009) ไชแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ R5 นี้มีสมบัติคล้ายคลึงกับ ไชแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B10 (Huang *et al.*, 2009) ที่มีสถานะที่เหมาะสมในการทำงานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและพีเอช 6.0 รวมทั้งมีเสถียรภาพสูงที่พีเอชในช่วงกว้าง ดังนั้นจึงมีสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการกำจัดยางเหนียว (degumming) จากเส้นใยป่าน หรือนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมอาหารได้ด้วย

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ไชแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 กับ ไชแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ R5 และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B10 พบว่ามีความเหมือนกันอยู่



ภาพที่ 4 แผนภูมิกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของไชแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 กับลำดับกรดอะมิโนของไชแลนเนส GH11 อื่นๆ ในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยกำหนดค่าการทำ bootstrap เท่ากับ 1,000 รอบ ตัวเลขบน node แสดงเปอร์เซ็นต์การทำ bootstrap (ข้อมูล ณ วันที่ 14 มิถุนายน 2559)

97.18 และ 96.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบว่าชนิดกรดอะมิโนที่พบในไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 แตกต่างกับของ 2 สายพันธุ์ที่เปรียบเทียบรวม 6 ตำแหน่งได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 10 13 30 43 102 150 ซึ่งเป็นอะลานีน ทรีโอนีน ไกลซีน ทรีโอนีน อะลานีน และแอสพาราจีน ตามลำดับ ในขณะที่ไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ R5 และสายพันธุ์ B10 ที่ตำแหน่งดังกล่าว จะเป็นกรดอะมิโนวาเลีน ซีรีน ซีรีนไอโซลิวซีน ซีรีน และ อาร์จินีน ตามลำดับ ส่วนกรดอะมิโนตำแหน่ง 162 และ 176 ใน *Bacillus* sp. J12 และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ R5 จะมีกรดอะมิโนที่เหมือนกันคือ กลูตามีน แต่ในสายพันธุ์ B10 จะเป็นไทโรซีน (ภาพที่ 5)

จากลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่สมบัติของไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 จะคล้ายคลึงกับไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ R5 และสายพันธุ์ B10 แต่อย่างไรก็ตาม จะสังเกตได้ว่าลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่แตกต่างของ *Bacillus* sp. J12 กลับเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์กันสูงในทั้ง 2 สายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบ จึงบ่งชี้ว่าลำดับกรดอะมิโนของ *Bacillus* sp. J12 มีความเป็นเอกลักษณ์ ซึ่งหากความแตกต่างนี้ส่งผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิหรือตติยภูมิของเอนไซม์ ก็มีความเป็นไปได้ว่าสมบัติบางประการของไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 จะมีความแตกต่างกับไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ R5 และสายพันธุ์ B10

<i>Bacillus</i> sp. J12	MFKFKKNFLAGLTAALMSISLFSATASAAGTDYQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWSN
<i>B. subtilis</i> B10	MFKFKKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN
<i>B. subtilis</i> R5	MFKFKKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN
	***** . * : ***** . ***** *****
<i>Bacillus</i> sp. J12	TGNFVVGKGTGSPERTINYAGVWAPNGNGYLTLYGWTRAPLIEYYVVDSWGTYRPTG
<i>B. subtilis</i> B10	TGNFVVGKGTGSPERTINYAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPPLIEYYVVDSWGTYRPTG
<i>B. subtilis</i> R5	TGNFVVGKGTGSPERTINYAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPPLIEYYVVDSWGTYRPTG
	*****
<i>Bacillus</i> sp. J12	TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDNTTFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA
<i>B. subtilis</i> B10	TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSYHVNA
<i>B. subtilis</i> R5	TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA
	***** . ***** . ***** *****
<i>Bacillus</i> sp. J12	WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW
<i>B. subtilis</i> B10	WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW
<i>B. subtilis</i> R5	WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW
	*****

เครื่องหมาย ‘\*’ หมายถึงกรดอะมิโนที่อนุรักษ์กัน 100 เปอร์เซ็นต์; ‘:’ หมายถึงกรดอะมิโนต่างชนิดที่มีการอนุรักษ์ระหว่างกลุ่มที่มีสมบัติคล้ายคลึงกันมาก; ‘.’ หมายถึงกรดอะมิโนต่างชนิดที่มีการอนุรักษ์ระหว่างกลุ่มที่มีสมบัติคล้ายคลึงกันเพียงเล็กน้อยและ ช่องว่าง หมายถึงกรดอะมิโนต่างชนิดที่มีสมบัติแตกต่างกัน

**ภาพที่ 5** การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 กับไซแลนเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B10 และสายพันธุ์ R5  
(ข้อมูล ณ วันที่ 18 เมษายน 2559)

## สรุป

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไซแลนเนสจาก *Bacillus* sp. J12 ซึ่งเป็นแบคทีเรียน้ำพุร้อนและโคลนเข้าพลาสมิด pGEX-4T-1 จากนั้นได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโดยพบว่ายีนไซแลนเนสมีขนาด 642 คู่เบสและคาดการณ์ว่าโปรตีนจะมีขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศซึ่งว่าไซแลนเนสชนิดนี้อยู่ในสกุล Glycoside Hydrolases11 (GH11) ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีความสามารถในการทำงานและมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง อีกทั้งยังมีแนวโน้มจะมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงด้วย จึงสอดคล้องกับที่มาของไซแลนเนสชนิดนี้ที่แยกมาจากแบคทีเรียที่อาศัยในแหล่งน้ำพุร้อน ในขั้นตอนต่อไปทางผู้วิจัยจะนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-4T-1-xyn ที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้ไปแสดงออกใน *Escherichia coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ไซแลนเนสและศึกษาสมบัติการทำงานของเอนไซม์ หากไซแลนเนสชนิดนี้มีสมบัติอนุรักษ์กับไซแลนเนสในสกุล GH11 ดังที่คาดการณ์จากลักษณะทางโครงสร้างและยังมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง จะทำให้เอนไซม์ตัวนี้เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาและใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมที่มีขั้นตอนที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานาน

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทป1/14/2554 และ ทน 30/2558 และทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รวมถึงขอบคุณบุคลากรและภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อสถานที่ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์ตัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม (Carbohydrate-Modifying Enzymes in Industry). สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215:403-410.
- De Castro, E., Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A. and Hulo, N. 2006. Scan Prosite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Research** 34: W362-W365.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, pp. 571-607. *In* Walker, J.M., ed. **The Proteomics Protocols Handbook**. Humana Press.
- Gupta, U. and Kar, R. 2008. Optimization and scale up of cellulase free endoxylanase production by solid state fermentation on

- corn cob and by immobilized cells of a thermotolerant bacterial isolate. **Jordan Journal of Biological Sciences** 1(3): 129-134.
- Huang, J., Wang, G. and Xiao, L. 2006. Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology** 97(6): 802-808.
- Jalal, A., Rashid, N., Rasool, N. and Akhtar, M. 2009. Gene cloning and characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 107(4): 360-365.
- Juturu, V. and Wu, J.C. 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances** 30: 1219-1227.
- Kalendar, R., Lee, D. and Schulman, A.H. 2014. FastPCR software for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis, pp. 271-302. In Valla, S. and Lale, R., eds. **DNA Cloning and Assembly Methods**. Humana Press, New York.
- Käll, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E.E.L. 2004. A Combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **Journal of Molecular Biology** 338(5): 1027-1036.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33(7): 1870-1874.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics** 23(21): 2947-2948.
- Mitchell, A., Chang, H.Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S.W., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T.K., Sigrist, C.J.A., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D.A., Wu, C.H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P.D. and Finn, R.D. 2015. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic Acids Research** 34(Database issue): D213-D221.
- Owczarzy, R., Tataurov, A.V., Wu, Y., Manthey, J.A., McQuisten, K.A., Almabrazi, H.G., Pedersen, K.F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N.O., Sailor, C.A., Dawson, R.B. and Peek, A.S. 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Research** 36(suppl 2): 163-169.
- Paës, G., Berrin, J.G. and Beaugrand, J. 2012. GH11 xylanases: structure, function, properties, relationships and applications. **Biotechnology Advances** 30: 564-592.

- Petersen, T.H., Brunak, S., Heijne, G.V. and Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods** 8:785-786.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D.G., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M, Söding, J., Thompson, J.D. and Higgins, D. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology** 7: 539.
- Subramaniyan, S. and Prema, P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology** 22(1): 33-64.
- Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology** 17(1): 39-67.
- Xiao, L., Wang, G.X. and Chen, G.J. 2004. Preliminary study of the optimum working conditions on xylanase during process of ramie degumming. **The Journal of Chongqing University** 27: 48-50.