



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลน การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแสดงออกของยีนลีแวนซูเครสของ
แบคทีเรียที่ได้จากดิน และน้ำ และผลิตภัณฑ์ลีแวนของเอนไซม์

โดย ผศ. ดร. กมลทิพย์ ขัตติยะวงศ์

เดือน ตุลาคม ปี 2561

สัญญาเลขที่ MRG5480232

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลน การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแสดงออกของยีนลีแวนซูเครสของ
แบคทีเรียที่ได้จากดิน และน้ำ และผลิตภัณฑ์ลีแวนของเอนไซม์

ผู้วิจัย สังกัด
ผศ. ดร. กมลทิพย์ ชัตติยะวงศ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยมหวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480232

ชื่อโครงการ : การโคลน, การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแสดงออกของยีนลีสเอนซูเครสของแบคทีเรียที่ได้จากดิน และน้ำ และผลิตภัณฑ์ลีสเอนของเอนไซม์

ชื่อนักวิจัย : [ดร. กมลทิพย์ ขัตติยะวงศ์] [มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์]

อีเมลล์ : faaskmt@ku.ac.th, kamontip.k@ku.ac.th, k_kuttiyawong@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ:

งานวิจัยสนใจการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลีสเอนซูเครสที่ทำงานได้ดี จากน้ำและดิน การโคลน, การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแสดงออกของยีนลีสเอนซูเครสจากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* KK9 ถูกทดลอง นอกจากนี้การสังเคราะห์ลีสเอนและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่ถูกดำเนินการ ยีนลีสเอนซูเครสแทรกอยู่ในพลาสมิด plKK มีขนาด 1.5 kb เมื่อหาลำดับ DNA ของในพลาสมิด plKK ที่มียีนลีสเอนซูเครสแทรกอยู่ พบยีน ขนาด 1,431 bp และโปรตีนมีกรดอะมิโน 477 ตัว และค่า pI/molecular weight ที่ได้จากการคำนวณ 7.13/53.4 kDa. signal peptide sequence ที่ทำนายมี กรดอะมิโน 29 ตัวที่ปลาย N-terminal ลำดับกรดอะมิโนของ LS มีความเหมือนกันกับ levansucrase of *Bacillus amyloliquefaciens* XH7 ถึง 94% เอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์สูง และมีขนาด 54 kDa โดยมีอุณหภูมิ และค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 30°C และ 6.0 ตามลำดับ acceptor specificity ถูกอธิบาย โดยปฏิกิริยาการรับถูกทำโดยมี ซูโครสเป็นตัวให้ และมี แซคคาไรด์ ชนิดต่างๆ เป็นตัวรับหมู่ฟรุคโทส LsKK สังเคราะห์ FOSs ชนิดต่างๆ จากตัวรับหลายๆชนิด ประกอบด้วย แลคโทส ทรีฮาโลส ไซโลส อินโนซิทอล แมนนิทอล ไซลิทอล และราฟฟิโนส ซึ่งเป็นตัวรับที่ดี นอกจากนี้ ลีสเอนที่ผลิตได้จากน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น โดยใช้ลีสเอนซูเครส ที่ 30°C ได้ ลีสเอนซึ่งมีขนาดโมเลกุล 11, 1000 และ 4700 kDa โดยมีลีสเอนซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็ก (11 kDa) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนี้ทำการเอนแคปซูเลชันแอสตาแซนธินด้วยลีสเอน โดยใช้ลีสเอนซูเครสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอลและแอสตาแซนธิน ต่อการเอนแคปซูเลชันแอสตาแซนธิน พบว่าที่ 10% Ethanol เอนไซม์สามารถผลิตอนุภาคนาโนลีสเอนได้ดี ประสิทธิภาพของการเอนแคปซูเลชันสารแอสตาแซนธิน คือ 94% อนุภาคนาโนลีสเอน และ อนุภาคนาโนแอสตาแซนธิน-ลีสเอน มี มีขนาดอนุภาคประมาณ 90 nm และ 110 nm ตามลำดับ

คำหลัก: ลีสเอน ลีสเอนซูเครส ฟรุคโคโอลิโกแซคคาไรด์ อนุภาคนาโน *Bacillus amyloliquefaciens*

Abstract

Project Code : MRG5480232

Project Title : Cloning, Nucleotide Sequencing, and Expression of Bacterial Levansucrase Gene from soil and water and its levan products

Investigator : Asst. Dr. Kamontip Kuttiyawong

E-mail Address : faaskmt@ku.ac.th, kamontip.k@ku.ac.th, k_kuttiyawong@yahoo.com

Project Period : 2 years

Abstract:

In this research, we focus on screening for high activity levansucrase from soil and water microorganism. Cloning, nucleotide sequencing and expression of microbial levansucrase gene and levansucrase characterization will be performed. Moreover, synthesis of levan and fructo-oligosaccharides and products identification will be conducted. Cloning, nucleotide sequencing and expression of *Bacillus amyloliquefaciens* KK9 levansucrase gene (*ls*) were carried out. The Levansucrase gene contained a plasmid with 1.5 kb inserted fragment, *plsKK*. DNA sequencing analysis revealed that *plsKK* contained levansucrase gene with open reading frame of 1,431 bp and encodes for a protein with 477 amino acid residue and theoretical pI/molecular weight of 7.13/53.4 kDa. The predicted signal peptide sequence of 29 amino acids was found at *N*-terminal. The amino acid sequence of LS exhibited over 94% homology to levansucrase of *Bacillus amyloliquefaciens* XH7. The recombinant enzyme was highly purified and an apparent size of 54 kDa with an optimum temperature and pH of 30°C and 6.0 were determined. The acceptor specificity is also described. The acceptor reactions were performed with sucrose as a donor substrate and various saccharides as fructosyl acceptors. *LsKK* synthesized a variety of FOSs from various acceptors, with lactose, trehalose, xylose, inositol, manitol, xylitol and raffinose being the good fructosyl acceptors. In addition, the levan was produced from sucrose-based substrate by this enzyme at 30°C has the levan with Mw of 11, 1000 and 4700 kDa, low Mw levan (11 kDa) as a major product. Moreover, astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles were prepared using levan produced by levansucrase. Effect of ethanol and astaxanthin concentration were investigated. Levansucrase was produce high nanolevan particles in 10% Ethanol. The encapsulation capacity of the particles is 94%. The size of levan nanoparticles and astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles were 90 nm and 180 nm, respectively.

Keyword: levan, levansucrase, fructooligosaccharides, nanoparticle, *Bacillus amyloliquefaciens*

บทสรุปผู้บริหาร

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา-ทบทวนวรรณกรรม

ในปัจจุบันความต้องการของผู้บริโภคเรื่องสุขภาพและอาหารที่ควบคุมแคลอรีที่เพิ่มขึ้นทำให้สารให้ความหวานทางเลือกเช่น palatinose^{1, 2} และ oligosaccharides ชนิดต่าง ๆ ทั้ง isomaltulooligosaccharides, oligosaccharides จากถั่วเหลือง และfructooligosaccharides (FOSs)³⁻⁷ได้รับความสนใจมากขึ้น และมีความสำคัญเพิ่มขึ้นเนื่องจากคุณสมบัติที่มากกว่าความหวาน เช่น ใช้เป็นวัสดุประสานใน immediate-release drugs, ใช้เป็น controlled - release matrix⁸, ใช้เป็นสาร anti-HIV⁹ และ anti-tumor¹⁰, ใช้เป็น prebiotic¹¹, ใช้เป็นสารที่มีคอเลสเตอรอล (cholesterol) และ ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ต่ำ¹² เป็นต้น โดยเฉพาะ ลีแวน (Levan) และ ลีแวน โอลิโกแซคคาไรด์ (levan oligosaccharide) ซึ่งเป็น ฟรุคโทโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides) ที่ผลิตจากน้ำตาลทรายได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เพราะนอกจากสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังสามารถที่จะขยายตลาดของน้ำตาลได้มากขึ้น โดยอาศัยสมบัติต่างๆของ มาเป็นจุดขายได้ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มราคาของน้ำตาลทรายให้สูงขึ้นได้โดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตฟรุคโทโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีราคาสูงแทน และการผลิต ฟรุคโทโอลิโกแซคคาไรด์ ยังไม่ซับซ้อน ทำให้ง่ายต่อการผลิตเชิงอุตสาหกรรม

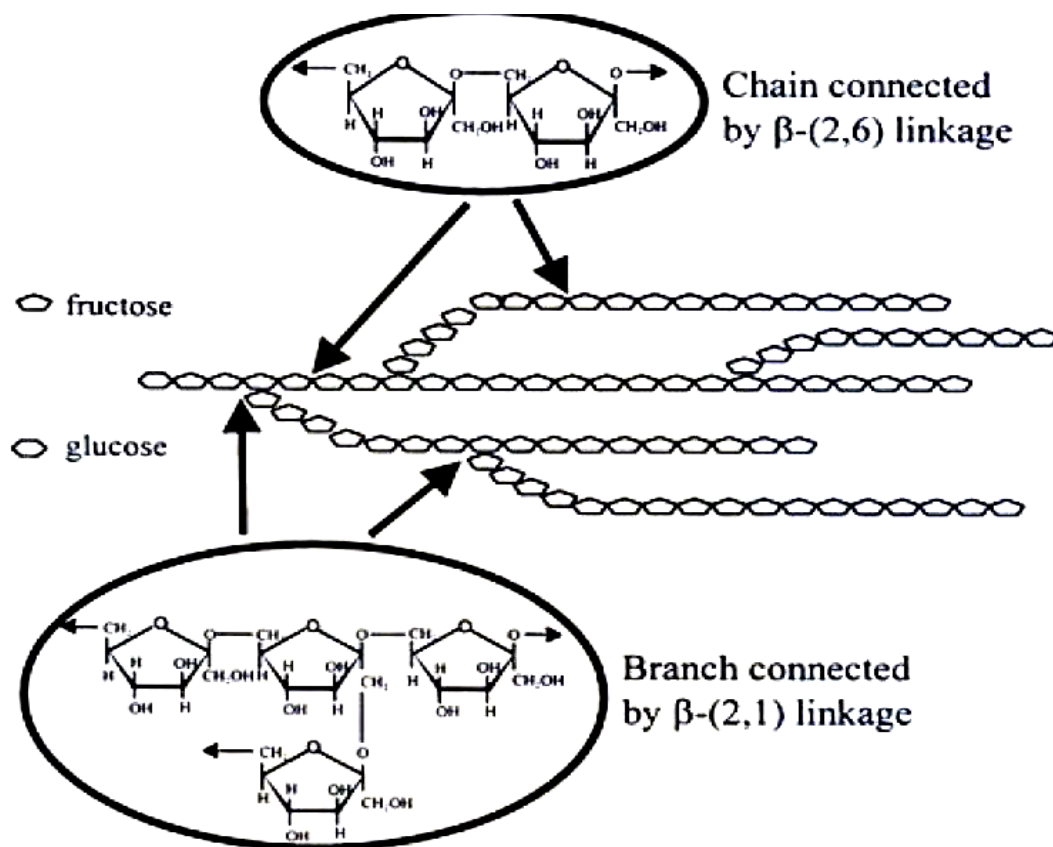
นอกจากนี้จากปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งกลายเป็นปัญหาของโลกในปัจจุบัน ได้มีความพยายามทุกวิถีทางที่จะช่วยกันรักษาสิ่งแวดล้อม การเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพซึ่งได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แทนการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการช่วยรักษาสีสิ่งแวดล้อม เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทางเคมีมักย่อยสลายได้ยาก จึงตกค้างและเป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ชีวภาพมีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้ดีในธรรมชาติ มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกให้ความสนใจกับการค้นหาและผลิตพอลิเมอร์จากธรรมชาติชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมา เพื่อทดแทนพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดเดิม เช่น แป้ง เซลลูโลส และไคติน ซึ่งมีข้อด้อยที่สำคัญคือ ไม่ละลายน้ำ รวมถึงมีความหนืดสูงเกินไป เมื่อมีขนาดโมเลกุลสูงขึ้นไปสมบัติเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อตรงต่อกระบวนการผลิต รูป รส สัมผัส และกลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ทำให้ลีแวนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติได้รับความสนใจในการทำการศึกษาวิจัยมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากลีแวนมีลักษณะเด่นคือ ละลายน้ำได้ดี และเมื่อมีขนาดโมเลกุลสูงขึ้นไปแล้วความหนืดของพอลิเมอร์จะไม่เพิ่มขึ้นมากนัก ลีแวนเป็น โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ของฟรุคโทส โดยแต่ละโมเลกุลของฟรุคโทสสายหลักเชื่อมกันด้วยพันธะ β -(2,6) และสายกิ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ β -(2,1) โดยพันธะทั้งสองชนิดนี้ถูกสร้างจาก ลีแวนซูเครส (levansucrase) ตัวเดียวกัน ในพืช รา และแบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์ลีแวนได้ โดยลีแวนจากพืช เช่น กรามิแนน เป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเมื่อเทียบกับลีแวนจากรา และแบคทีเรียซึ่งมีขนาดโมเลกุลได้มากถึง 10^6 ดาลตัน ลีแวนได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในหลายๆด้าน เพราะมีค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็น prebiotic¹¹, dietary fiber¹³⁻¹⁵ และเนื่องจากลีแวน สามารถละลายน้ำได้ และมีความหนืด ลีแวนจึงสามารถใช้แทน xanthan gum, pullulan และ mannan ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ ส่วนในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางใช้เป็น moisturizing gradient¹⁶⁻¹⁷ ในอุตสาหกรรมยา นำลีแวนที่มีโซ่กิ่ง

และน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มาใช้เป็นวัสดุประสานใน immediate-release drugs ในขณะที่ลิแวนที่มีโซ่กิ่ง และน้ำหนักโมเลกุลสูง ใช้เป็น controlled - release matrix⁸ และใช้เป็น blood plasma extender¹⁸⁻¹⁹ ในทางการเกษตร ลิแวนช่วยเร่งการเจริญเติบโต และการงอกของเมล็ดได้เป็นอย่างดี²⁰ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ลิแวนยังไม่แพร่หลายมากนัก เนื่องจากข้อจำกัดในด้านการผลิต ลิแวนโดยมากสกัดมาจากพืชซึ่งสามารถผลิตได้ในปริมาณน้อยจึงทำให้ลิแวนมีราคาสูงจึงมีความพยายามที่จะผลิตลิแวนโดยอาศัยปฏิกิริยาการหมักของแบคทีเรีย ปัจจุบันพบแบคทีเรียหลายชนิดที่ผลิตลิแวนได้ โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาร่วมกันของเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ไอโซเมอร์เลส (hydrolase isomerase) และโพลิเมอร์เลส (polymerase) ได้แก่ กลูแคนเนส (glucanase), กลูโคไอโซเมอร์เลส (glucoisomerase) และลิแวนซูเครส (levansucrase) โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลักในการสร้างลิแวนคือ ลิแวนซูเครส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายซูโครสให้กลายเป็นกลูโคสและฟรุกโทส จากนั้นนำฟรุกโทสที่ได้ไปต่อกันเป็นลิแวน ลิแวนซูเครสจาก *Zymomonas mobilis* เป็นตัวอย่างของเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจในขณะนี้ เนื่องจากมีลักษณะเด่นหลายประการเช่น เร่งปฏิกิริยาได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 0-40° C โดยมี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาตั้งแต่ 4-8 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิและ pH ต่ำนี้ ทำให้ใช้เอนไซม์ในรูปเซลล์แบคทีเรียได้ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งนับเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตลิแวน นอกจากเอนไซม์ชนิดนี้แล้ว ยังมีเอนไซม์จากแบคทีเรียบางชนิดที่กำลังเป็นที่สนใจเช่นลิแวนซูเครสจาก *Bacillus polymyxa* และ *Lactobacillus reuteri* แต่อย่างไรก็ตามลิแวนซูเครสจากแบคทีเรียทั้งสามชนิดยังมีข้อจำกัดคือ ให้ปริมาณลิแวนน้อย โดย *Bacillus polymyxa*²¹, *Lactobacillus reuteri*²², และ *Zymomonas mobilis*²³ ให้ลิแวนเพียง 26.6, 24.5, และ 23 % ตามลำดับ ในทางทฤษฎีการผลิตลิแวนจากซูโครสโดยเอนไซม์ชนิดนี้จะให้ผลิตภัณฑ์มากถึง 50 % (W/W) โพลิเมอร์ และโอลิโกเมอร์ชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่น่าสนใจในงานวิจัยนี้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ง่าย เลี้ยงง่าย ต้นทุนต่ำ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก ในการวิจัยนี้เราให้ความสนใจลิแวนซึ่งเป็น homopolymer ของฟรุกโทสโดยสายหลักเชื่อมกันด้วยพันธะ β -(2, 6) และสายกิ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ β -(2, 1) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความประสงค์ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนซูเครสที่ทำงานได้ดีจากดินและน้ำ, ทำการโคลนและแสดงออกของยีนลิแวนซูเครส รวมถึงศึกษาสมบัติของลิแวนซูเครส เพื่อผลิตลิแวน และฟรุกโทโอลิโกแซคคาไรด์ และนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ ต่อไป

ลิแวน (Levan)

ลิแวนเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติในกลุ่มของ fructans ซึ่งเกิดจากการรวมกันเป็นสายของน้ำตาลฟรุกโทส โดยสายที่สั้นที่สุดคือ 6-kestose โดยลิแวนเกิดจากการจับตัวรวมกันของมโนเมอร์ฟรุกโทส หลายๆ โมเลกุลเข้าด้วยกันหรือเรียกว่า โพลิฟรุกโทส (Polyfructose) ฟรุกโทสแต่ละหน่วยย่อยในสายหลักเชื่อมกันด้วยพันธะบีต้า-2,6-ไกลโคซิดิก (β -2,6-glycosidic bond) ส่วนในบริเวณโซ่กิ่งที่เชื่อมกับสายหลักนั้นฟรุกโทสทั้งสองหน่วยเชื่อมกับด้วยพันธะบีต้า-2,1-ไกลโคซิดิก (β -(2,1-glycosidic bond)²⁴ แสดงดังภาพที่ 1

ลิแวนพบได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์ โดยลิแวนจากพืชเกิดจากฟรุกโทสตั้งแต่ 10-200 หน่วย มักมีขนาดเล็กกว่าลิแวนจากจุลินทรีย์ซึ่งอาจเกิดจากฟรุกโทส 50-5000 หน่วย ลิแวนจากจุลินทรีย์นั้นมักจะถูกสร้างในรูปเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) โดยการเร่งปฏิกิริยาของลิแวนซูเครส



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของลิแวน

การผลิตลิแวนจากจุลินทรีย์นั้นอาศัยปฏิกิริยา transfructosylation โดยการทำงานของลิแวนซูเครส โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นซึ่งลิแวนจะถูกสังเคราะห์จากซูโครสที่ผิวด้านนอกของแบคทีเรีย การนำไปใช้ประโยชน์ (Application of Levan)

ลิแวนมีลักษณะเป็นสารเมือกที่มีบทบาทเกี่ยวกับระบบ Symbiosis ระบบ phytopathogenesis และระบบการป้องกันในสถานะที่เย็นหรือแล้ง นอกจากนั้นยังเป็นแหล่งอาหารสะสม ในแบคทีเรียที่ก่อโรคต่อพืช ลิแวนจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงของแบคทีเรียและทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านฤทธิ์ของสารที่พืชใช้ในการป้องกันการบุกรุก นอกจากนี้ยังมีการรายงานอีกว่าลิแวนช่วยต่อต้านมะเร็งชนิด sarcoma 180²⁵ โดยสมบัตินี้จะขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของลิแวนด้วย²⁶ ลิแวนซึ่งเป็น Homopolysaccharide สามารถประยุกต์ใช้ในพวอาหาร เครื่องสำอาง เกษตรกรรม อุตสาหกรรมเคมี และนำไปใช้กับอาหารหรือใส่เพิ่มในอาหาร ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้น ใช้เป็นสารช่วยลดแรงตึงผิว เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง โดย acetylated levans จะใช้เป็นรีเอเจนต์ต้าน AIDS ในอนาคต²⁷ โดยปกติสามารถพบลิแวนได้ในธรรมชาติ ส่วนใหญ่พบในพืช และจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Gluconoacetobacter xylinus*, *Microbacterium laevaniformans*, *Rahnella aquatilis* และ *Zymomonas mobilis*²⁸ *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* NRC1aza, *Bacillus* sp. ซึ่งสร้างลิแวนเพื่อป้องกันตัวเอง โดยลักษณะ

ของลีสแวนเป็นเมือกแผ่นฟิล์มบางๆ โปร่งใส เมื่อแห้งแล้วสามารถอยู่ในรูปของเกล็ดหรือผง ความสามารถละลายน้ำค่อนข้างต่ำจะมีบางส่วนที่แขวนลอยอยู่ ดังนั้นจะต้องนำไปละลายในน้ำเป็นเวลานาน ลีสแวนไม่ละลาย หรือละลายตัวในน้ำมัน แต่สามารถละลายได้ใน DMSO ลีสแวนเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่มีพิษ ไม่มีกลิ่น ไม่มีรสชาติ และไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย²⁹

ในปัจจุบันมีการศึกษาลีสแวนเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะในด้านอาหาร เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย สามารถเติมลงไปเพื่อเพิ่มเส้นใยในอาหาร เป็นผลิตภัณฑ์ลดน้ำหนักเพราะมีใยอาหารสูง และมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ซึ่งมีรายงานว่าลีสแวนนั้นมีความเหมาะสมในการซึมผ่านเนื้อเยื่อได้ดีเนื่องจากเป็นไขมันที่ไม่มีขั้ว และยังสามารถเป็นส่วนผสมในเลือดผง เพื่อเพิ่มความหนืด และไม่ให้เกิดการแตกตัว²⁹ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อนำมาใช้ผลิตเป็นยาเพื่อต่อต้าน และยับยั้งการเสี่ยงต่อการเป็นเนื้อร้าย

ลีสแวนที่ผลิตได้จาก *Zymomonas mobilis* พบว่ามีชนิด ZAP และ CP4 มีความสามารถในการต่อต้านมะเร็งชนิด sarcoma 180 และ Ehrlich carcinoma ในหนูทดลอง นอกจากนี้ลีสแวนที่ได้จาก *Bacillus subtilis* NRC1aza ได้ผลผลิตออกมา 2 ชนิดคือ L1 และ L2 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน 85.23 kDa และ 31.95 kDa ตามลำดับ ได้ทำการศึกษาผลของพื้นที่ผิวต่อการออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมะเร็งชนิด HepG2 พบว่า L1 มีความสามารถในการต้านเชื้อดีกว่า L2³⁰

ลีสแวนที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. เป็นสารละลายที่มีค่าความหนืดที่แท้จริงเท่ากับ 0.14 dL/g ซึ่งได้นำมาใช้ประโยชน์ด้านอาหาร และกาว³² และนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติของลีสแวนที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. นำมาผสมเข้ากับกลีเซอรอล ซึ่งสามารถผลิตเป็นฟิล์มที่มีคุณสมบัติทนความร้อนคล้ายแก้ว การสร้างลีสแวนให้เป็นวัสดุนาโน หรือการนำลีสแวนมาเป็นตัวที่ทำหน้าที่เป็นฟิล์มห่อหุ้มสารที่เราสนใจเรียกว่า encapsulation พวกสารแอนติออกซิเดนต์ หรือสารให้กลิ่น เป็นต้น

ลีสแวนได้นำมาศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างภูมิคุ้มกันที่มีผลต่อการผลิตลีสแวนของ *Cyprinus carpio juveniles* โดยได้แบ่งกลุ่มประชากรปลาкарปเป็น 5 กลุ่มโดยการให้ปลากินลีสแวนเข้าไปในปริมาณที่ต่างกันดังนี้ (T1) 0.1% levan (T2) 0.2% levan (T3) 0.5% levan (T4) 1.0% levan และ กลุ่มควบคุมผลที่ได้ เมื่อปลาкарปได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สามารถต้านเชื้อได้สูงถึง 100% ดังจะเห็นได้ว่าโฮโมพอลิเมอร์ลีสแวนนั้นมีประโยชน์มากมาย โดยจะดูจากการนำมาประยุกต์ใช้ในแวดวงต่างๆ จึงทำให้มีคณาสนใจศึกษาคุณสมบัติและการสังเคราะห์ลีสแวน และในทางการผลิตจะสนใจในส่วนของการเพิ่มหรือหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต จากการศึกษาแหล่งที่พบของลีสแวนมีทั้งในพืช และสิ่งมีชีวิตอย่าง เช่น พวกจุลินทรีย์บางชนิด ปัจจุบันได้มีการศึกษาการผลิตลีสแวนที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ลีสแวนซูเครสในพวกจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* การประยุกต์ใช้ลีสแวนในด้านต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการประยุกต์ใช้ซีแลนในดินต่างๆ

Application	Usage	Reference
Industrial	Provide viscosity	Shih et al. ²⁸
	Holding capacity for water and chemicals	Ramsay ²⁹ Gabbitto et al. ³⁰
	Selective plugging agent	
Medical/Pharmaceutical	Blood plasma extender	Shih et al. ²⁸ and Kirk ³¹
	Hypocholesterolemic agent	Ben Ammar ³²
	Modification of cell membrane (tumor cells)	Shih et al. ²⁸ and Ahmed ³³ Ben Ammar ³² , Shih et al. ²⁸ and Ahmed ³³
	Tablet binder	
Foods	Add sweetness to foods	Han ³⁴ , Shih et al. ²⁸ and Ahmed ³³
	Fillers	
	Bulking agent	Kirk ³¹
	Substitue for gum arabic	Kirk ³¹ Kirk ³¹
Others	Emulsifier	Shih et al. ²⁸
	Formulation aid	Shih et al. ²⁸
	Stabilizer and thickener	Shih et al. ²⁸
	Surface-finishing agent	Shih et al. ²⁸
	Encapsulating agent	Shih et al. ²⁸
	Carrier for flavour and fragrances	Shih et al. ²⁸
	Cosmetic	Ben Ammar ³²

ลิแวนซูเครส (Levansucrase)

ลิแวนซูเครสจัดอยู่ในกลุ่ม Glycosyltransferases ชื่อในระบบของเอนไซม์นี้ คือ Sucrose: 2, 6-beta-D-fructan 6-beta-D-fructosyltransferase (EC 2.4.1.10) ชื่ออื่นที่ใช้เรียกตามประโยชน์คือ Sucrose 6-fructosyltransferase, beta-2, 6-fructosyltransferase และ beta-2, 6-fructan:D-glucose 1-fructosyltransferase โดยเอนไซม์นี้มีส่วนร่วมในแบ่งและกระบวนการเผาผลาญน้ำตาลที่ได้จากอ้อยหรือหัวบีทหรืออื่นๆ และระบบ two-component ทั่วไป³² ลิแวนซูเครสนี้ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ แสดงดังตารางที่ 2

ลิแวนซูเครสสังเคราะห์จากลิแวนซูเครส โดยใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นเพียงอย่างเดียว สิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดสามารถผลิตลิแวนซูเครสได้ แต่ส่วนใหญ่พบในแบคทีเรียเช่น *Acetobacter xylinum*⁴⁸, *Bacillus subtilis*⁴⁵, *Bacillus megaterium*⁵⁰, *Gluconacetobacter diazotrophicus*⁴¹, *Lactobacillus reuteri*⁵², *Leuconostoc mesenteroides*⁵³, *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*⁵⁴, *Rahnella aquatilis*⁵⁵ and *Zymomonas mobilis*⁵⁶

เมื่อพิจารณาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของลิแวนซูเครสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสามารถแบ่งลิแวนซูเครสออกเป็นสองกลุ่มด้วยกัน โดยกลุ่มแรกคือ ลิแวนซูเครส จากแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนค่อนข้างสูง (> 50%) เมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของกลุ่มที่สองซึ่งเป็น ลิแวนซูเครส จากแบคทีเรียแกรมลบ แต่ยังคงพบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนทั้งสองกลุ่มอยู่บ้าง (<30%)⁵⁷ โดยส่วนใหญ่พบว่า สมบัติที่แตกต่างกันของลิแวนซูเครสและลิแวนซินอยู่กับแบคทีเรียที่ผลิต แต่ยังมีคุณสมบัติบางอย่างที่คล้ายกันระหว่างลิแวนซูเครสจากแหล่งต่างๆ เช่น มีการทำงานสูงที่ pH 5-6 และมีเสถียรภาพที่ pH 4-7, ลิแวนซูเครสไม่สามารถทำงานได้เมื่อ ค่า pH ต่ำกว่า 3 และ ค่า pH มากกว่า 9, ลิแวนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะถูกสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ ต่ำ มากกว่าที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิสูง ในทางตรงกันข้าม ลิแวนซูเครส สามารถไฮโดรลิซิส น้ำตาลได้ต่ำมาก ที่อุณหภูมิต่ำ⁵⁸⁻⁵⁹

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนซูเครสที่ทำงานได้ดีจากดินและน้ำ, ทำการโคลน, หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการแสดงออกของยีนลิแวนซูเครส รวมถึงศึกษาสมบัติของลิแวนซูเครส เพื่อผลิตลิแวน และฟรุคโทโอลิโกแซคคาไรด์ และนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ ต่อไปในอนาคต

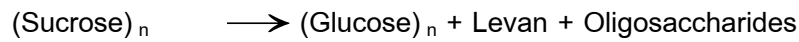
ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิแวน

Microorganism	Reference
<i>Acetobacter acetigenum</i>	Loewenberg and Reese ³³
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Loewenberg and Reese ³³
<i>Actinomyces viscosus</i>	Pabst ³⁴
<i>Achromobacter</i> sp.	Han ³⁵
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Srinivasan and Quastel ³⁶
<i>Aerobacter levanicum</i>	Evans and Hibbert ³⁷
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Han ³¹
<i>Azotobacter chroococum</i>	Hestrin and Goldblum ³⁸
<i>Bacillus asterosporus</i>	Hestrin and Goldblum ³⁸
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Han ³⁵
<i>Bacillus megaterium</i>	Evans and Hibbert ³⁷
<i>Bacillus mesentericus</i>	Han ³⁵
<i>Bacillus polymyxa</i>	Han ³⁵
<i>Corynebacterium levaniformans</i>	Han ³⁵
<i>Corynebacterium beticola</i>	Han ³⁵
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Han ³⁵
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Han ³⁵
<i>Micbacterium laevaniformans</i>	Han ³⁵
<i>Odontomyces viscosus</i>	Han ³⁵
<i>Phytomonas pruni</i>	Han ³⁵
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Fuchs ⁴¹
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Fuchs ⁴¹
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fuchs ⁴¹
<i>Rothia dentocariosa</i>	Han ³⁵
<i>Streptococcus</i> sp.	Han ³⁵
<i>Streptococcus salivarius</i>	Fuchs ⁴¹
<i>Xanthomonas</i> sp.	Han ³⁵
<i>Zymomonas mobilis</i>	Dawes, Ribbons and Rees ⁴²
Yeast	Loewenberg and Reese ³³
<i>Aspergillus sydawi</i>	Loewenberg and Reese ³³
<i>Aspergillus versicolor</i>	Loewenberg and Reese ³³

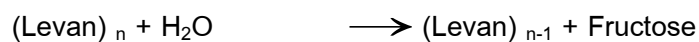
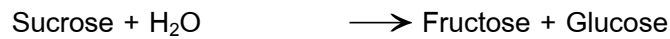
หลักการทำงานของลิแวนซูเครส

ลิแวนซูเครสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม transferase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย้าย fructose จาก sucrose ไปยังตัวรับต่างๆ แสดงดังภาพที่ 2 โดยผลผลิตที่ได้คือ levan ซึ่งเป็น polymer ที่ประกอบไปด้วย D-fructofuranosyl residues ที่สายหลักเชื่อมกันด้วยพันธะ β -(2, 6) และสายกิ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ β -(2, 1) โดยพันธะทั้งสองชนิดนี้ถูกสร้างจากลิแวนซูเครสตัวเดียวกัน ซึ่งเร่งปฏิกิริยาตามลำดับดังนี้

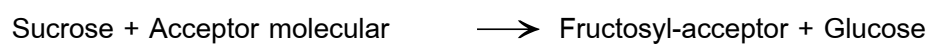
1. Polymerization reaction



2. Hydrolysis reaction



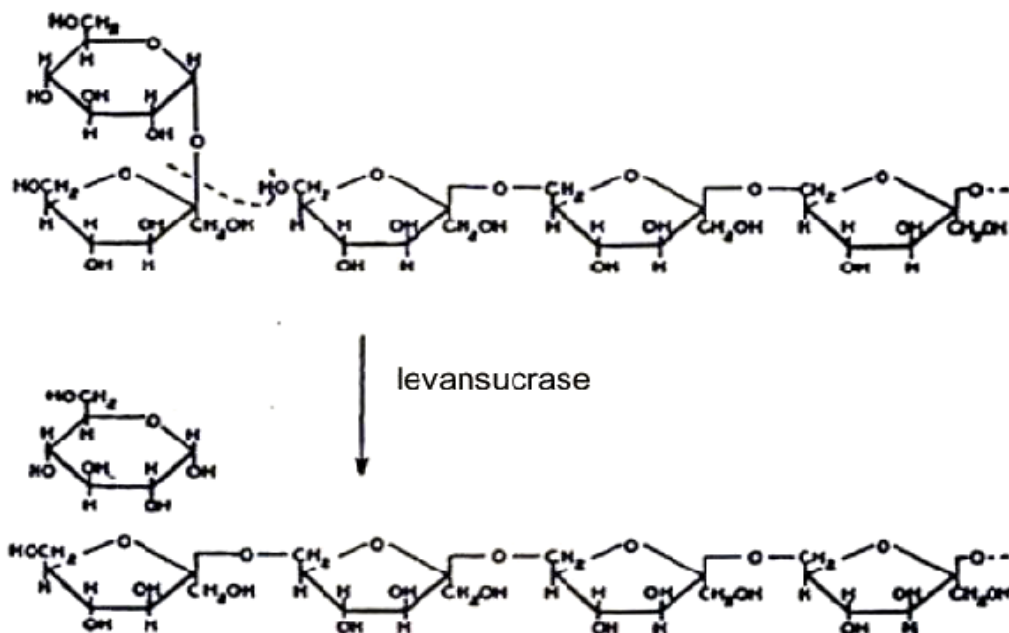
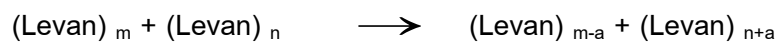
3. Acceptor reaction



4. Exchange reaction



5. Disproportionation reaction



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลิแวนจากซูโครสโดยลิแวนซูเครส

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแกเนสที่ทำงานได้ดี จากน้ำและดิน
2. เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแกเนสโดยวิธีการทดสอบชีวเคมี (เอ พี ไอ) และวิธีเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA ได้
3. เพื่อศึกษาสมบัติของลิแกเนสและลิแกเนสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย
4. ทำการโคลนและการแสดงออกของลิแกเนสจากแบคทีเรียที่คัดเลือก เพื่อเพิ่มปริมาณของลิแกเนส
5. ศึกษาสมบัติของลิแกเนสและลิแกเนสที่ผลิตได้จากยีนลิแกเนส
6. ศึกษาการห่อหุ้มสารแอสตาซานทีนด้วยลิแกเนส เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

2.1. คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนซูเครสที่ทำงานได้ดี จากน้ำและดิน

2.1.1 การเตรียมตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดินและน้ำ โดยแหล่งที่น้ำจะมีแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนซูเครสอยู่ น้ำจะเป็นบริเวณที่มีการทิ้งน้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของแบคทีเรีย เช่น ดินบริเวณโรงงานน้ำตาล, ดินบริเวณที่หีบอ้อย, ดินบริเวณที่ทิ้งกากน้ำตาล และน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำตาล เป็นต้น

2.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและเหลว เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Sucrose เป็น Carbon Source

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ประกอบด้วย 0.05% Yeast extract, 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6% KH_2PO_4 , 2.5% $\text{NH}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 10% Sucrose และ 1.5% agar ส่วนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ประกอบด้วย 0.05% Yeast extract, 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6% KH_2PO_4 , 2.5% $\text{NH}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ และ 10% Sucrose จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2.1.3 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

นำตัวอย่างดิน 1 g ละลายน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 1 mL จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบีบอัดน้ำตัวอย่าง 100 μL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จากนั้นนำ spreader เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานเพาะเชื้อจนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะปรากฏโคโลนีขึ้น

2.1.4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต levansucrase

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง นำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว แล้วทำการแยกเอนไซม์แบบหยาบ (crude enzyme) ออกจากเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวโดยทำการปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำเอนไซม์แบบหยาบไปวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์และทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (Thin Layer Chromatography, TLC) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะจะเป็นลิแวนมายืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

2.1.5 การวัดการทำงานของเอนไซม์ (Levansucrase activity assay)

สามารถวัดการทำงานของเอนไซม์โดยวัดปริมาณของกลูโคสที่ปล่อยออกมาจากการไฮโดรลิซิสของสตักด้วยวิธี DNS method¹ ปฏิบัติการประกอบด้วย 0.25 mM sucrose ใน 50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0 บ่มที่ 37°C กำหนดให้ 1 unit ของ levansucrase เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถปล่อย 1 μmol glucose ต่อ นาที

2.1.6 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (Thin Layer Chromatography, TLC)

ทำการวิเคราะห์โดยใช้แผ่น TLC และใช้ตัวทำละลาย (mobile phase) คือ บิวทานอล : โพรพิลีน : น้ำ ในอัตราส่วน 8 : 1 : 1 ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง จากนั้นเป่าแผ่น TLC ให้แห้ง นำแผ่น TLC จุ่มใน developing solvent ที่ประกอบด้วย กรดซัลฟิวริกเข้มข้น : เอทานอล ในอัตราส่วน 9 : 1 เป่าให้แห้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 10 นาที

2.1.7 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดย High performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์ HPLC มีสภาวะดังนี้

mobile phase: ultrapure water

flow rate: 0.5 mL/min

detector: reflective index, อุณหภูมิที่ 40 °C

runtime: 20 นาที

column: sugar pak, อุณหภูมิที่ 85°C, ขนาด 6.5×300 mm

injective volume: 20 µL

2.2 ทำการระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนซูเครส

2.2.1 วิธีการทดสอบชีวเคมี (เอ พี ไอ)

2.2.2 วิธีเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA

2.3 ศึกษาสมบัติของลิแวนซูเครสและลิแวนที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย

2.3.1 การผลิตลิแวนซูเครส

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่มีซูโครสอยู่ ที่อุณหภูมิ 30-50 °C, เขย่า 250 rpm เป็นเวลา 7 วัน โดยมีการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ทุกวัน โดยการวัดการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme assay) สามารถวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธี DNS โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกเป็นชุดควบคุม โดยนำเอาเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองทำการบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม reaction mixture 450 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 4% Sucrose ใน 1M citrate buffer pH 6.0 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม DNS reagent 500 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิตร แล้วนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ชุดที่สอง ปิเปตเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ลงใน reaction mixture 450 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 4% Sucrose ใน 1M citrate buffer pH 6.0 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม DNS reagent นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิตร แล้วนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณโดยเทียบกับ Standard curve โดย 1U ของเอนไซม์ คือ ปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลต่อนาที

2.3.2 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus liquefaciens*

ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยสารผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย เอนไซม์, 4% sucrose และ buffer ซึ่งมีทั้งหมด 3 ชนิด คือ Sodium citrate, Tris-HCl และ Glycine-NaOH buffer โดยมีการเปลี่ยนแปลง pH ของ buffer ในช่วง pH เท่ากับ 3.0 – 10.0 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยสารผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 4% sucrose, sodium citrate buffer และเอนไซม์ มีการเปลี่ยนแปลงของช่วงอุณหภูมิที่ 30–80°C เป็นเวลา 10 นาที

2.4 ทำการโคลน, การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนลิแวนซูเครสจากแบคทีเรียที่คัดเลือก เพื่อเพิ่มปริมาณของ ลิแวนซูเครส

2.4.1 การโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิแวนซูเครสจากแบคทีเรียที่คัดเลือก

ทำการสกัด Chromosomal DNA ของแบคทีเรียโดยวิธีของ Sambrook และคณะ² จากนั้นจะทำการโคลนโดยใช้ PCR amplification ซึ่งมี DNA เป็นแม่แบบ และ DNA primer ของ ยีนลิแวนซูเครส ทำการออกแบบโดยใช้ข้อมูลของ ยีนลิแวนซูเครสที่มีอยู่ใน Genbank จากนั้นจะนำ PCR product มา

เชื่อมเข้ากับ pJET vector แล้วจึง subcloned เข้า pET19b โดยจะนำ gene ที่ได้ไปหาลำดับ นิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลการทดลองต่อไป

2.4.2 การแสดงออกของรีโบลิวซินเนสจากแบคทีเรียที่คัดเลือก เพื่อเพิ่มปริมาณของรีโบลิวซินเนส

นำลวดเย็บเย็บมาเย็บ *Bacillus amyloliquefaciens* (pETLS) จากสต็อกเก็บเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งชนิด LB แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเป็นการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate หลังจากนั้นเตรียม Starter ทำได้โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด LB ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 125 มิลลิลิตร นำมาเติมแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยวมาโดยใช้ loop เชื้อเชื้อใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด LB นำไปเขย่าด้วยด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเก็บเป็น starter สำหรับนำไปเลี้ยงเชื้อผลิตโปรตีน เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิด LB 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร 2 ขวด แล้วนำมาเติมแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเปิด Starter ที่เตรียมได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่า OD₆₀₀ ให้ได้ค่าในช่วง 0.4-0.6

นำเชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ ในช่วง 0.4-0.6 มาแบ่งจากขวดรูปชมพู่ที่มี 20% ของ LB เป็น 10% จะได้ทั้งหมด 4 ขวด หลังจากนั้นนำมาเติม IPTG ความเข้มข้น 0.1mM นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm นำตะกอนที่ได้ ละลายด้วย 50 mM Citrate buffer pH 6.0 (1mL : 20mL ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น) แล้วนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 30 นาที ปฏิบัติเช่นเดิมไปเรื่อยๆ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส เมื่อได้สารละลายใสแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลาย เรียกเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.4.3 การทำบริสุทธิ์รีโบลิวซินเนส โดย ion exchange chromatography

ในส่วนของการทำบริสุทธิ์รีโบลิวซินเนส นำเอนไซม์หยาบที่ได้มาผ่านคอลัมน์แบบ CM-TOYOPEARL-650M ที่มีสมบัติแลกเปลี่ยนประจุบวก ด้วยอัตราเร็วการไหล 0.8 - 1.0 mL/min ล้างคอลัมน์เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่เอนไซม์รีโบลิวซินเนสและรีโบลิวซินเนสกลายด้วย 50 mM citrate buffer pH 6.0 จนค่า absorbance ที่ 280 nm เป็น 0 ชะคอลัมน์ด้วย 100 mM และ 150 mM NaCl ใน citrate buffer pH 6.0 จนค่า absorbance ที่ 280 nm เป็น 0 โดยแยกเก็บโปรตีนที่ถูกชะออกเป็น fraction จากนั้นนำแต่ละ fraction ไปทดสอบการทำงานของเอนไซม์ (activity) ด้วย DNS method เก็บส่วนที่มีการทำงานของเอนไซม์มา dialysis ด้วย 50 mM citrate buffer pH 6.0 เพื่อกำจัดเกลือออก แล้วทดสอบการทำงานของเอนไซม์อีกครั้ง วัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford reagent เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย SDS-PAGE จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาศึกษาสมบัติของรีโบลิวซินเนสและรีโบลิวซินเนสที่ผลิตได้จากยีนรีโบลิวซินเนส

2.5 ศึกษาสมบัติของรีโบลิวซินเนสและรีโบลิวซินเนสที่ผลิตได้จากยีนรีโบลิวซินเนส

2.5.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของรีโบลิวซินเนส

ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยสารผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.1 Unit ของเอนไซม์, 4% sucrose และ buffer ซึ่งมีทั้งหมด 3 ชนิด คือ Sodium citrate, Tris-HCl และ

Glycine-NaOH buffer โดยมีการเปลี่ยนแปลง pH ของ pH 3-12 Britton-Robinson buffer ในช่วง pH เท่ากับ 3.0 – 10.0 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยสารผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.1 Unit ของเอนไซม์, 4% sucrose, sodium citrate buffer และเอนไซม์ มีการเปลี่ยนแปลงของช่วงอุณหภูมิที่ 30–80°C เป็นเวลา 10 นาที

2.5.2 ศึกษา substrate specificity ของเอนไซม์

ศึกษา transfructosylation โดยใช้ซูโครส เป็นตัวให้ฟรุกโทส (donor substrate) และน้ำตาลต่างๆ เป็นตัวรับ (acceptor substrate) โดย ปฏิกิริยา transfructosylation ประกอบไปด้วย 1 u/mL ลีแวนซูเครส บริสุทธิ์ ใน 50 mM citrate buffer pH 6.0 บ่ม 30°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยมี 50 mM sucrose และ 500 mM saccharide ศึกษาชนิด ขนาด และปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิค TLC และ MS

2.5.3 ศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์

ศึกษา จลศาสตร์ของเอนไซม์บริสุทธิ์ โดยใช้ซูโครส เป็นสารตั้งต้น ตัวให้ฟรุกโทส (donor substrate) และน้ำตาลต่างๆ เป็นตัวรับ (acceptor substrate) โดย ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 0.1 u/mL ลีแวนซูเครสบริสุทธิ์และ 3.13 - 100 mM ซูโครส ในสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของลีแวนซูเครส

2.6 การศึกษาสมบัติของลีแวน

ลีแวนผลิตโดยทำการบ่มลีแวนซูเครสบริสุทธิ์ และ 40% ซูโครสใน 50 mM sodium acetate buffer, pH 6 ที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนด้วย 96% ethanol ที่เย็น (ปริมาตรสองเท่าของปริมาตรสาร) แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 rpm 10 นาที ตะกอนที่ได้นำไป dialysis ด้วยน้ำ แล้วจึงนำไปทำให้แห้งด้วยการ lyophilized แล้วจึงนำลีแวนที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป

2.6.1 การวิเคราะห์ลีแวนที่ได้โดย Nuclear magnetic resonance

ลีแวนละลายใน D₂O และ ทำการวิเคราะห์ที่ 40 °C โดย NMRS-500 125 MHz สำหรับ ¹³C และ 500 MHz สำหรับ ¹H Chemical shifts วัด โดยเทียบกับ dimethylsilapentane-5-sulphonate (DSS) ซึ่งเป็น internal standard

2.6.2 การวิเคราะห์ขนาดของลีแวนที่ได้โดย High performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์ HPLC มีสภาวะดังนี้

mobile phase: ultrapure water

flow rate: 0.5 mL/min

detector: reflective index ที่ 23°C

runtime: 30 นาที

column: Asahipak GF-510 HQ ขนาด 7.3x300 mm

injective volume: 20 µL

2.7 การเอนแคปซูเลชัน Astaxanthin ด้วยลีแวนโดยใช้ลีแวนซูเครส

2.7.1 การศึกษาอิทธิพลของควมมีขั้วของตัวทำละลายที่มีผลต่อการเอนแคปซูเลชัน Astaxanthin

ปีเปตต์ 4 % sucrose 400 ไมโครลิตร ปีเปตต์ 50 mM Citrate buffer pH 6 250 ไมโครลิตร จากนั้นปีเปตต์น้ำกลั่น 4018 ไมโครลิตร ปีเปตต์ 50 % Ethanol 625 (จะให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น

10% Ethanol) ไมโครลิตร เรียกว่า reaction mixture ที่มีปริมาตรรวม 4843 ไมโครลิตร จากนั้นปั๊มสารผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บีเบตต์เอมไซม์ลีสแวนซูเครส ลงไป 157 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเขย่าและควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำการทดลองตามข้อ (2.7.1) แต่เปลี่ยนเป็นบีเบตต์ 50 % Ethanol 1250, 1875, 2500 และ 3125 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20, 30, 40 และ 50% Ethanol ตามลำดับ

2.7.2 การเอนแคปซูล Astaxanthin ด้วยอนุภาคนาโนลิแวน

บีเบตต์ 4 % sucrose 40 ไมโครลิตร บีเบตต์ 50 mM Citrate buffer pH 6 25 ไมโครลิตร จากนั้นบีเบตต์น้ำกลั่น 178 ไมโครลิตร บีเบตต์ 10% Ethanol 50 ไมโครลิตร บีเบตต์ Astaxanthin 50 ไมโครลิตร เรียกว่า reaction mixture ที่มีปริมาตรรวม 343 ไมโครลิตร ปั๊มสารผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บีเบตต์เอมไซม์ลีสแวนซูเครส ลงไป 157 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเขย่าและควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอนุภาคนาโนที่ได้มาเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

2.7.3 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน Astaxanthin NanoLevan และ Nanoastaxanthin

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน Astaxanthin NanoLevan และ Nanoastaxanthin ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) ซึ่งวัดเป็นของเหลว โดยมี 10% Ethanol เป็น Blackground

2.7.4 ศึกษาสภาวะของการกระจายตัวอนุภาคนาโน

ศึกษาด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscopy (TEM) ทั้งในส่วนที่เป็น supernate และ pelleted หลังจากการเอนแคปซูลด้วยอนุภาคนาโนลิแวน

ผลการวิจัย

3.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแกนด์จากน้ำ และดิน

3.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

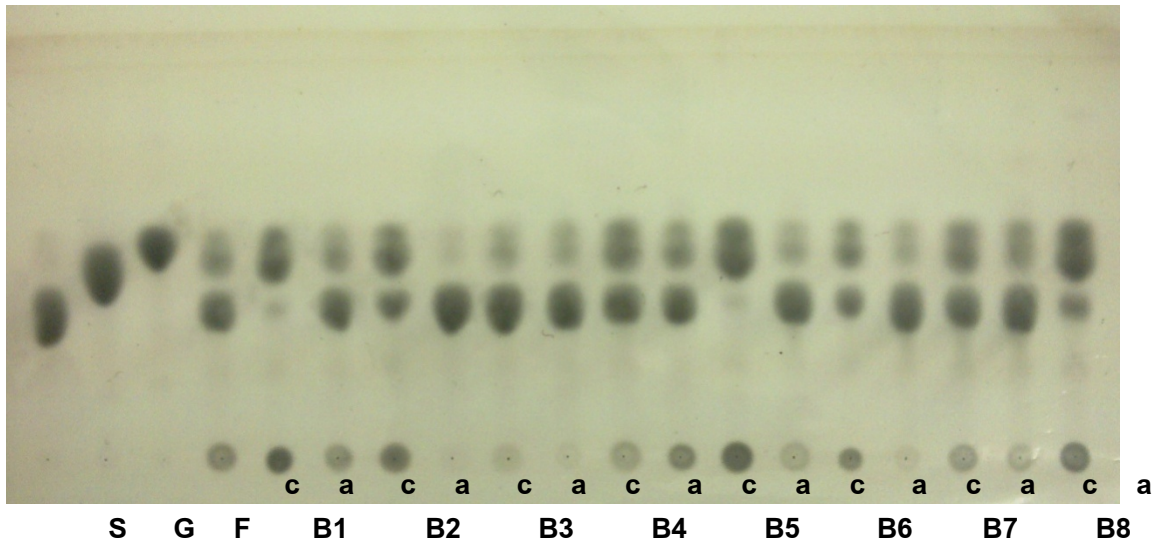
ตัวอย่างที่ทำการศึกษาเป็นดิน และน้ำที่มาจากโรงงานน้ำตาล จังหวัดบุรีรัมย์ และจากดิน และน้ำที่คาดว่าจะมีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ลิแกนด์ได้ โดยพิจารณาจากแหล่งอาหารที่น่าจะมีซูโครสอยู่ สามารถเตรียมตัวอย่างได้ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง จาก 9 แหล่ง

3.1.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อจากดิน และน้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและแบบเหลวที่มีซูโครส เป็นแหล่งของคาร์บอน

เมื่อเปิดตัวอย่าง 100 μ L ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจนแห้ง จากนั้นนำไปหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะปรากฏโคโลนีขึ้น โดยกระจายตัวอย่างทั่วทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จากการศึกษาพบจำนวนเชื้อทั้งหมด 291 เชื้อ

3.1.3 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์แบบหยาบโดยใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น ด้วยวิธี โครมาโทกราฟี แบบแผ่นเคลือบ (Thin Layer Chromatography, TLC)

จากการทดลองทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาลและพอลิเมอร์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์แบบหยาบโดยใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น ด้วยวิธี TLC ตัวอย่างแสดงดังภาพที่ 3 และ 4 ซึ่งพบว่าการทำงานเอนไซม์แบบหยาบที่ได้จากเชื้อ B1, B2, B5, B6, B8, F1, BS, H7 และ H9 สามารถย่อยซูโครส โดยสังเกตพบปริมาณของซูโครสที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และมีปริมาณของน้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลกลูโคสเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของน้ำตาลฟรุคโตส มีน้อยกว่าน้ำตาลกลูโคส ซึ่งน้ำตาลฟรุคโตสที่หายไปอาจจะนำไปสร้างเป็นพอลิเมอร์ ซึ่งเห็นเป็นจุดเข้มขึ้นบริเวณใกล้จุดเริ่มต้นของสารตัวอย่าง (spot) ของแผ่น TLC คาดว่าอาจจะเอนไซม์ลิแกนด์ จากนั้นนำเชื้อจากสต็อกเชื้อมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate ตัวอย่างเชื้อดังแสดงในภาพที่ 5 - 7 นำผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะน่าจะเป็นลิแกนด์มายืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ต่อไป



ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการวัดการทำงานของเอนไซม์ แบบหยาบที่ได้จากเชื้อ B1-B5, I6, B7 และ B8

กำหนดให้

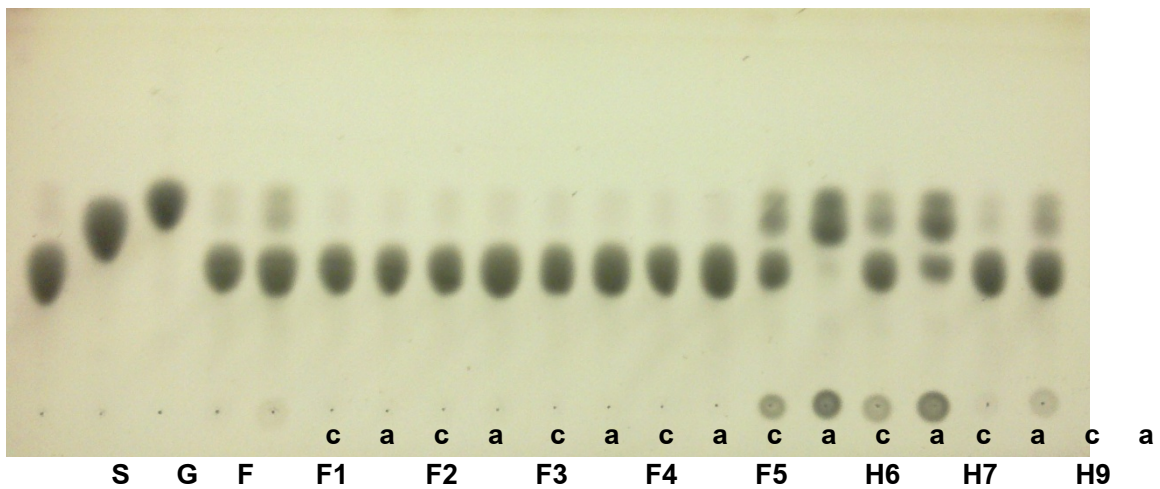
S = Sucrose standard

G = Glucose standard

F = Fructose standard

c = Inactivated enzyme ใช้เป็นตัวควบคุมการทดลอง

a = Activated enzyme



ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการวัดการทำงานของเอนไซม์ แบบหยาบที่ได้จากเชื้อ F1-F5, H6, H7 และ H9

S = Sucrose standard

G = Glucose standard

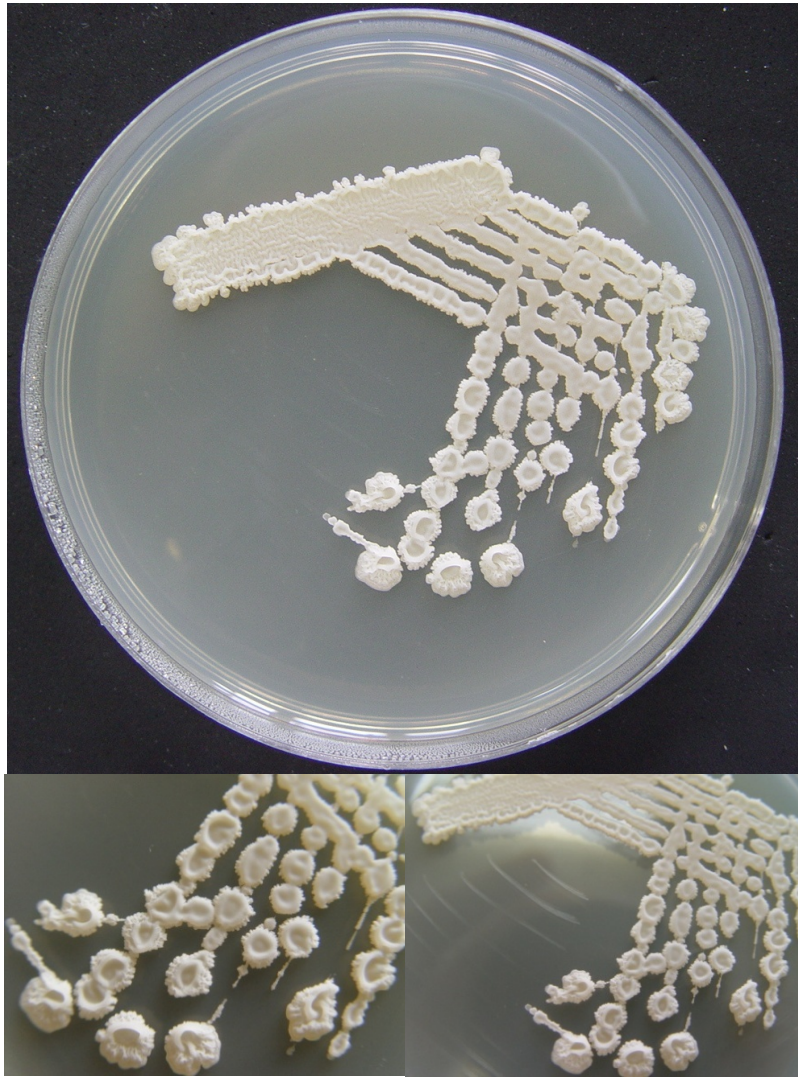
F = Fructose standard

c = Inactivated enzyme ใช้เป็นตัวควบคุมการทดลอง

a = Activated enzyme



ภาพที่ 5 เชื้อแบคทีเรีย B1 ที่คัดเลือกได้ ซึ่งน่าจะสามารถผลิตสีแวนชูเครสได้



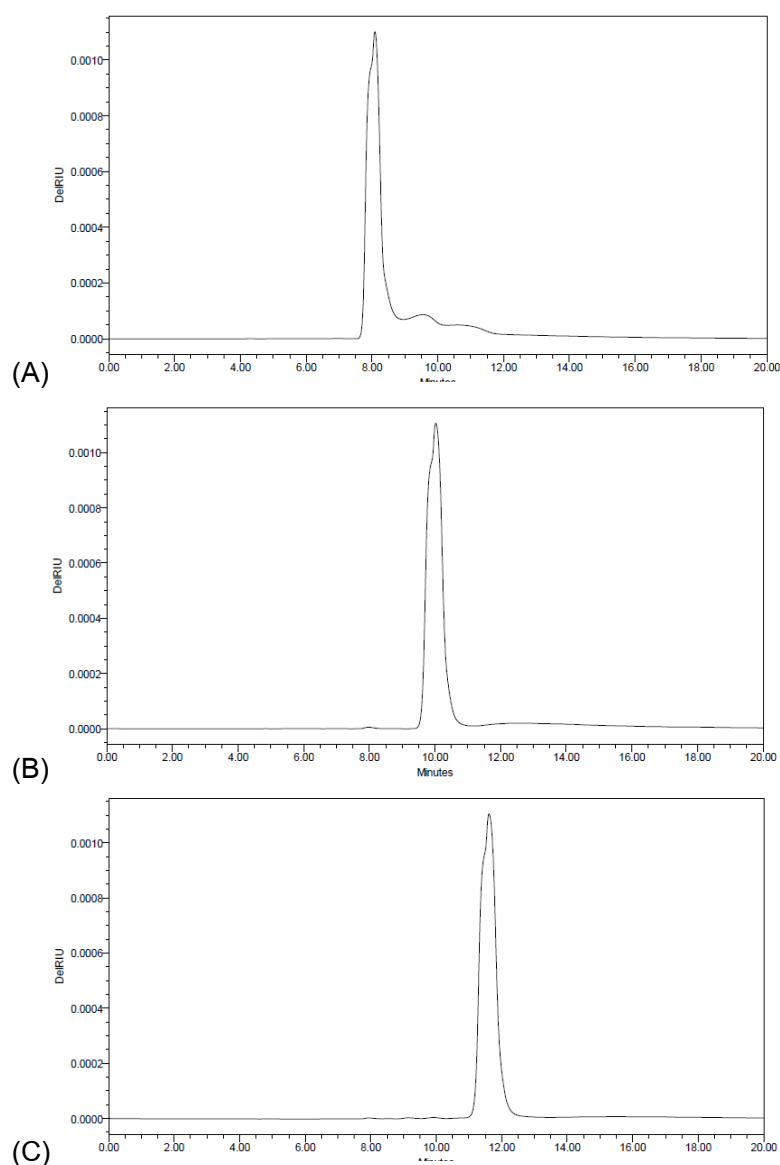
ภาพที่ 6 เชื้อแบคทีเรีย I6(B6) ที่คัดเลือกได้ ซึ่งน่าจะสามารถผลิตลิแวนซูเครสได้



ภาพที่ 7 เชื้อแบคทีเรีย H6(BS) ที่คัดเลือกได้ ซึ่งน่าจะสามารถผลิตลิแวนซูเครสได้

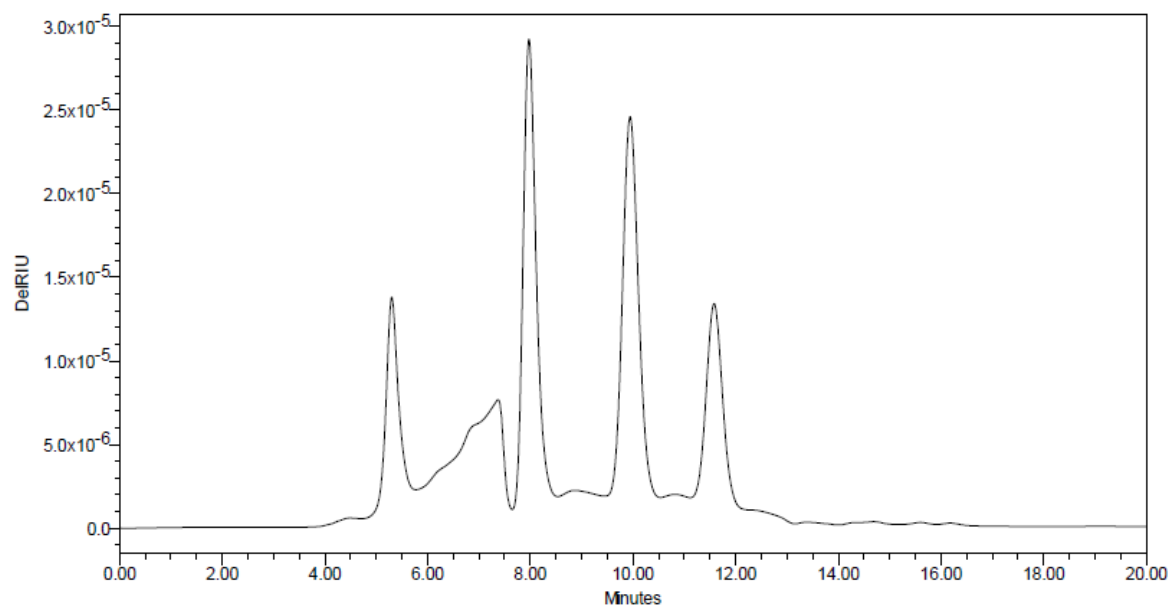
3.1.6 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดย High performance liquid chromatography (HPLC)

นำ reaction mixer ของตัวอย่าง B1 มาทำการวิเคราะห์ HPLC เพื่อยืนยันผลจากการวิเคราะห์ด้วย TLC โดยมี sucrose, glucose, fructose เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งผล HPLC chromatogram แสดงดังภาพที่ 8 และ 9 จาก HPLC chromatogram พบว่า ปริมาณฟรักโทสสุทธิของตัวอย่างเมื่อมีการหักลบปริมาณฟรักโทสของชุดควบคุมออกแล้ว มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณกลูโคสสุทธิของตัวอย่างเมื่อมีการหักลบปริมาณกลูโคสของชุดควบคุมออกแล้ว แสดงว่าปริมาณฟรักโทสบางส่วนหายไป ซึ่งแสดงว่าฟรักโทสที่หายไปนั้นมีเอนไซม์ levansucrase นำในการสร้าง levan ดังนั้นตัวอย่าง B1 จึงมีการผลิต Levansucrase

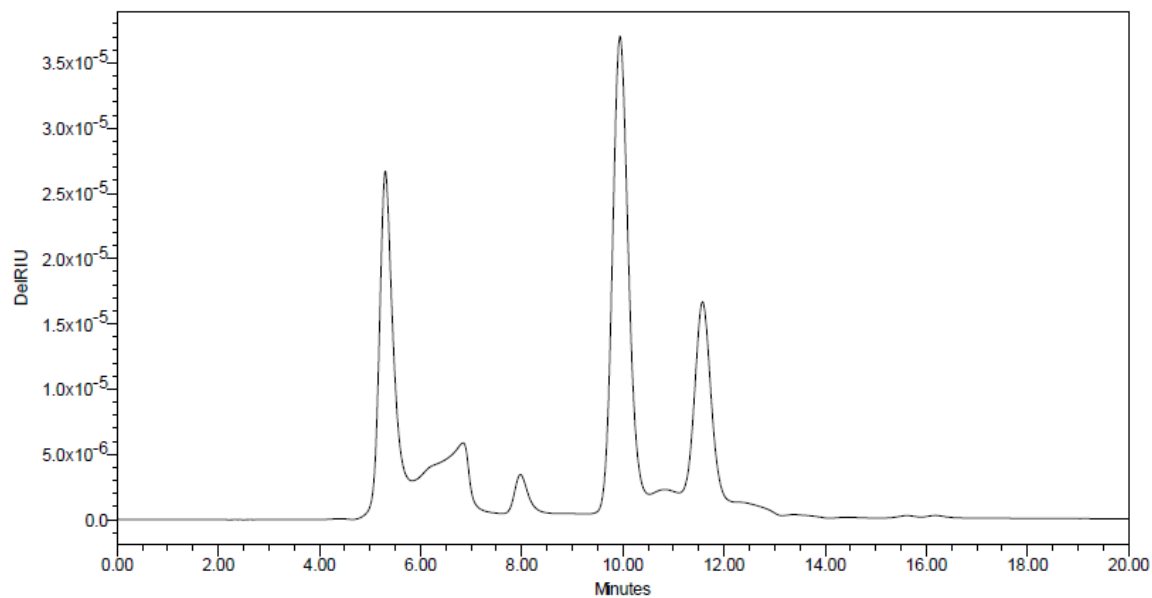


ภาพที่ 8 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน ซึ่งได้แก่ sucrose(A), glucose(B), fructose(C)

(A)



(B)



ภาพที่ 9 HPLC chromatogram ของตัวอย่าง B1

(A) = HPLC chromatogram ของตัวอย่าง B1 ที่เป็นตัวควบคุม

(B) = HPLC chromatogram ของตัวอย่าง B

3.2 ทำการระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนซูเครส

3.2.1 วิธีการทดสอบชีวเคมี (เอ พี ไอ) โดยส่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ ที่มีแอคติวิตีของลิแวนซูเครสสูงคือ B1, B6 และ BS ไปวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์พบว่า

B1: <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.8%ID
B6: <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	94.7%ID
BS: <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	96.1%ID

(รายละเอียดดังตารางแนบในภาคผนวก)

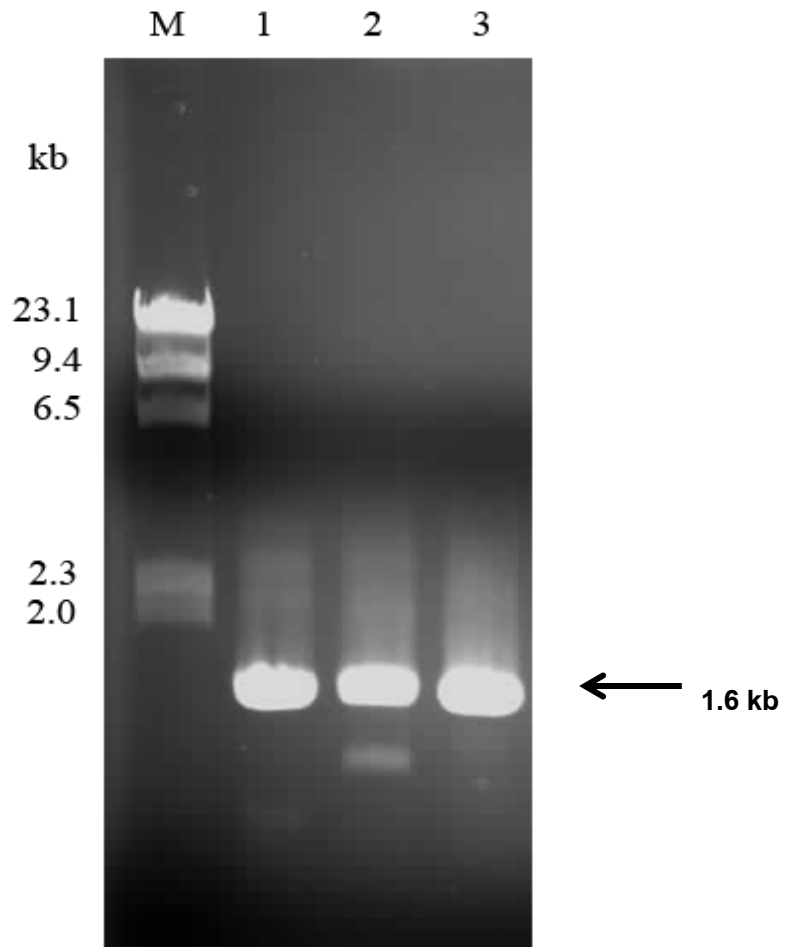
3.2.2 วิธีเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA

เนื่องจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีไม่สามารถระบุปีชีส์ของแบคทีเรียที่แยกได้ ผู้วิจัยจึงต้องการยืนยันผลอีกครั้งโดยเลือกใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนซึ่งมีการอนุรักษ์สูง ทำการทดลองเพื่อเพิ่มยืนยัน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ pA และ pH' และโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งสามชนิดเป็นแม่แบบ ได้ผลดังภาพที่ 10 จากการทดลองวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ที่ได้ มีขนาดประมาณ 1.6 kb จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM T-Easy แล้วส่งเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Top-10 เพื่อคัดเลือก *E. coli* ที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอพาหะที่มียีน 16S rRNA แทรกอยู่โดยวิธี blue-white screening สกัดดีเอ็นเอพาหะออกจากเซลล์ *E. coli* แล้วนำไปตัดที่ตำแหน่งจำเพาะด้วย *EcoRI* จากนั้นตรวจสอบขนาดโดย agarose gel electrophoresis ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 11 จากการทดลองพบว่าสามารถโคลนยีน 16s rRNA โดยเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะได้จริง ดังจะเห็นได้ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 และ 900 คู่เบส หลุดออกมาจากดีเอ็นเอพาหะขนาด 3.3 kb โดยเรียกดีเอ็นเอพาหะที่มียีน 16S rRNA แทรกอยู่นี้ว่า p16s_B1 p16s_B6 และ p16s_BS ตามลำดับ

จากนั้นนำ p16S_B1, p16S_B6 และ p16S_BS มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยยีน 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. B1, B6 และ BS มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1542, 1540 และ 1543 คู่เบสตามลำดับ(แสดงดังภาคผนวก 1) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ พบว่ายีน 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. B1, B6 และ BS เหมือนกับยีน 16S rRNA ของ *Bacillus amyloliquefaciens* XH7 (CP002927.1), *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* CAU B946 (HE617159.1) และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* RO-NN-1 (CP002906.1) ตามลำดับ โดยทั้งหมดมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99 % ซึ่งเป็นระดับที่ใช้ระบุปีชีส์ได้

จากผลการทดลองทำการระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตลิแวนซูเครสทั้ง 2 วิธี คือวิธีการทดสอบชีวเคมี และวิธีเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA ทำให้ยังไม่สามารถระบุปีชีส์ที่แน่นอนของแบคทีเรียที่แยกได้ดังนั้นในขั้นนี้จึงกำหนดให้แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ B1 B6 และ BS เป็น *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B6 และ *Bacillus* sp. BS ตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้เลือกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. B1 ซึ่งได้จากน้ำ มาทำการทดลอง เนื่องจากลิแวนซูเครส ที่ผลิตได้ มี activity สูง



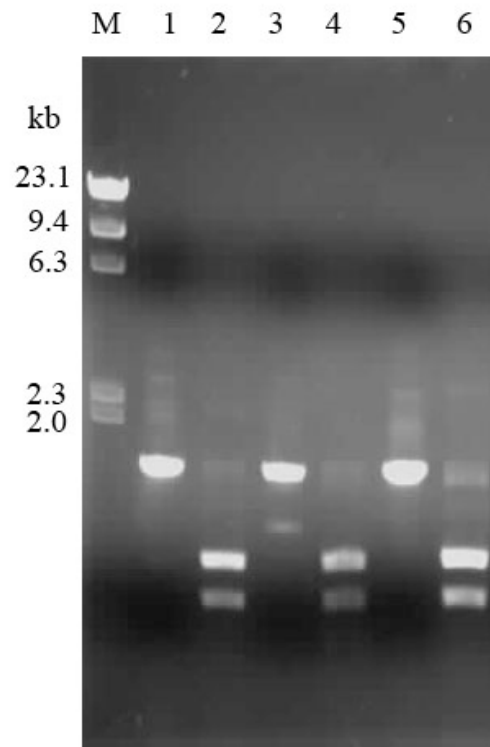
ภาพที่ 10 แสดงยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียที่แยกได้ เมื่อเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR โดยใช้ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ pA และ pH' ได้ ขึ้นยีนขนาดประมาณ 1600 คู่เบส

โดยกำหนดให้ Lane M เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /HindIII

Lane 1 PCR product จาก แบคทีเรีย B1

Lane 2 PCR product จาก แบคทีเรีย B6

Lane 3 PCR product จาก แบคทีเรีย BS



ภาพที่ 11 การโคลนยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียที่แยกได้ทดลองตัดชิ้นยีน 16S rRNA ออกจากดีเอ็นเอพหุ โดยการตัดที่บริเวณจำเพาะด้วย *EcoRI* โดยกำหนดให้

Lane M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /HindIII
Lane 1	p16S_B1
Lane 2	p16S_B1/ <i>EcoRI</i>
Lane 3	p16S_B6
Lane 4	p16S_B6/ <i>EcoRI</i>
Lane 5	p16S_BS
Lane 6	p16S_BS/ <i>EcoRI</i>

3.3 ศึกษาสมบัติของลิแวนซูเครสและลิแวนที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย

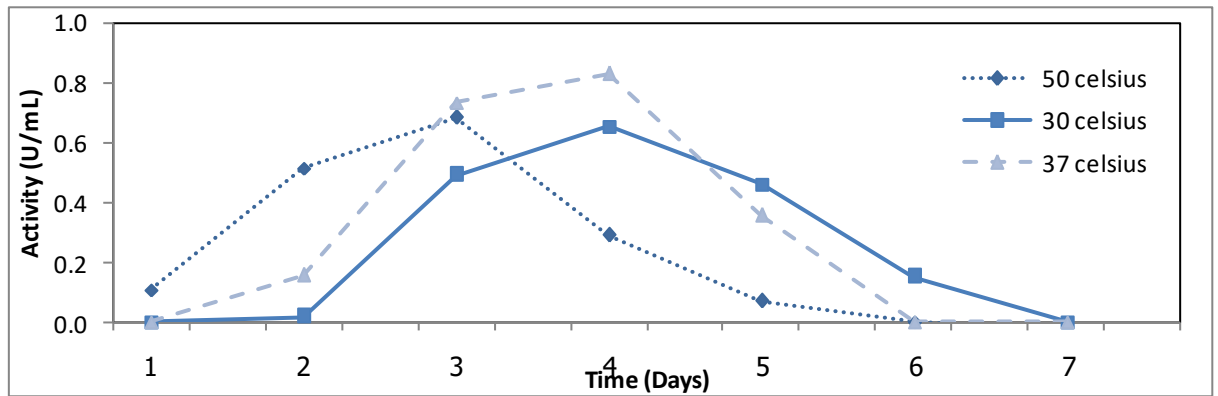
3.3.1 การผลิตลิแวนซูเครส

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่มีซูโคสอยู่ ที่อุณหภูมิ 30-50°C, เขย่า 250 rpm เป็นเวลา 7 วัน โดยมีการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ทุกวัน

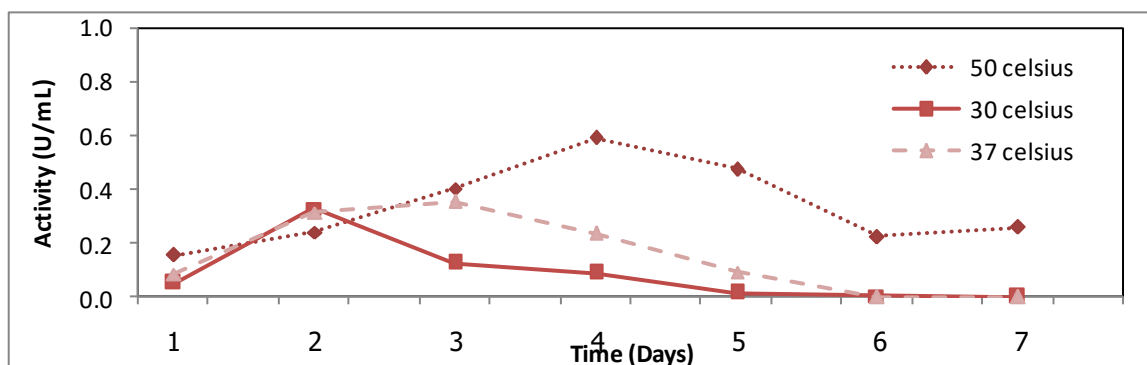
การศึกษาการผลิตลิแวนซูเครส จาก *Bacillus* sp. B1 ด้วยอาหารเลี้ยง LBS ที่อุณหภูมิห้อง, 37°C และ 50°C พบว่าที่อุณหภูมิห้อง และ 37°C มีแนวโน้มการทำงานของเอนไซม์ที่คล้ายกัน คือ เอนไซม์มีการทำงานได้ดีเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1-4 โดยมีค่า activity ในช่วง 0.0-0.6 และ 0.0-0.8 U/mL ตามลำดับ โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 คือ 0.6 และ 0.8 U/mL ตามลำดับ จากนั้นเอนไซม์ทำงานลดลงจนกระทั่งไม่มี activity ในวันที่ 6 และ วันที่ 7 ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 50°C เอนไซม์มีการทำงานได้ดีเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1-3 โดยมีค่า activity ในช่วง 0.1-0.8 U/mL โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 คือ 0.8 U/mL จากนั้นเอนไซม์ทำงานลดลงจนกระทั่งไม่มี activity ในวันที่ 6 ดังแสดงในภาพที่ 12

การศึกษาการผลิตลิแวนซูเครส จาก *Bacillus* sp. B1 ด้วยอาหารเลี้ยง MMS ที่อุณหภูมิห้อง, 37°C และ 50°C พบว่าที่อุณหภูมิห้อง แนวโน้มการทำงานของเอนไซม์ คือ เอนไซม์มีการทำงานได้ดีเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1-3 โดยมีค่า activity ในช่วง 0.0-0.3 U/mL โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 คือ 0.3 U/mL ตามลำดับ จากนั้นเอนไซม์ทำงานลดลงจนกระทั่งไม่มี activity ในวันที่ 5 ที่อุณหภูมิ 37°C เอนไซม์มีการทำงานได้ดีเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1-3 โดยมีค่า activity ในช่วง 0.1-0.4 U/mL ตามลำดับ โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 คือ 0.4 U/mL ตามลำดับ จากนั้นเอนไซม์ทำงานลดลงจนกระทั่งไม่มี activity ในวันที่ 6

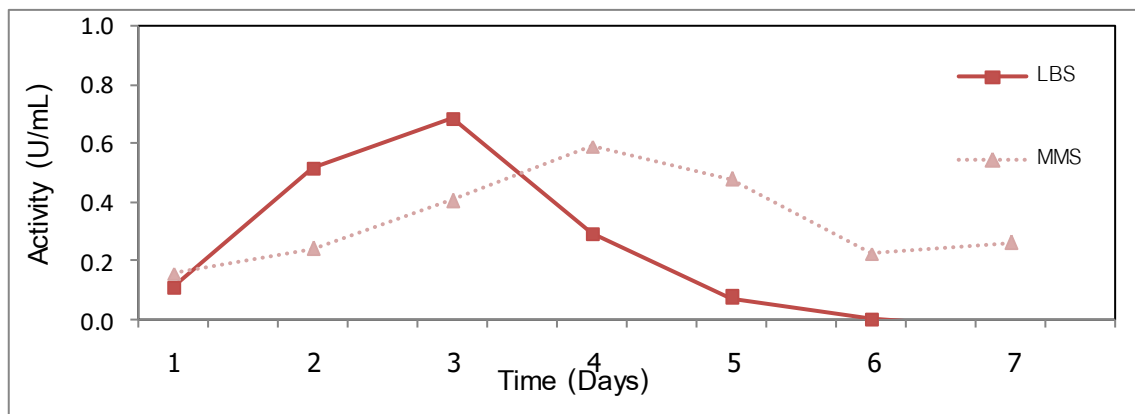
ส่วนที่อุณหภูมิ 50°C เอนไซม์มีการทำงานได้ดีเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1-4 โดยมีค่า activity ในช่วง 0.2-0.6 U/mL โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 คือ 0.6 U/mL จากนั้นเอนไซม์ทำงานลดลงจนกระทั่งเหลือ activity เท่ากับ 0.3 U/mL ดังแสดงในภาพที่ 13 ซึ่งจากผลทดลองการวัดการทำงานของเอนไซม์จากอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวทั้ง 2 ชนิด พบว่าภาวะที่ดีที่สุดในการเลี้ยง *Bacillus* sp. B1 คือ ที่อุณหภูมิ 50 °C โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ LBS ใช้เวลาน้อยที่สุดในการผลิต คือ 3 วัน ส่วนอาหารเลี้ยงแสดงดังภาพที่ 14



ภาพที่ 12 กราฟแสดงการผลิต Levansucrase ของ *Bacillus amyloliquefaciens* ในอาหาร LBS ที่อุณหภูมิต่างๆระหว่างวันที่ 1-7



ภาพที่ 13 กราฟแสดงการผลิต Levansucrase ของ *Bacillus amyloliquefaciens* ในอาหาร MMS ที่อุณหภูมิต่างๆระหว่างวันที่ 1-7



ภาพที่ 14 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการทำงานของ Levansucrase ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LBS และ MMS ที่อุณหภูมิ 50°C ระหว่างวันที่ 1-7

3.3 การศึกษาสมบัติของลิแวนซูเครส

3.3.1. การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Levansucrase จาก *Bacillus amyloliquefaciens*

การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Levansucrase จาก *Bacillus amyloliquefaciens* ด้วยอาหารเลี้ยง LBS ที่อุณหภูมิ 50°C โดยสารผสมของปฏิกิริยาโดยมีการเปลี่ยนแปลง pH ของ buffer ในช่วง pH เท่ากับ 3.0–10.0 พบว่าเอนไซม์มีแนวโน้มการทำงานเพิ่มขึ้นตั้งแต่ pH เท่ากับ 3.0–6.0 โดยมีค่า activity ในช่วง 0.9–1.2 U/mL โดยเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH เท่ากับ 6.0 จากนั้นเอนไซม์ทำงานลดลงจนกระทั่งเหลือ activity เท่ากับ 0.3 U/mL ที่ pH เท่ากับ 10.0 ดังแสดงในภาพที่ 15

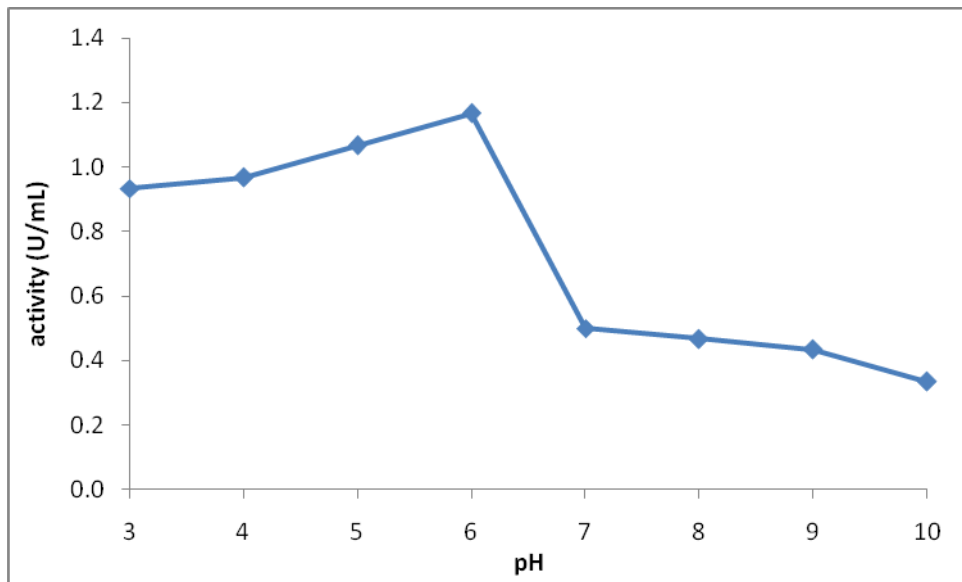
3.3.2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Levansucrase จาก *Bacillus amyloliquefaciens*

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ levansucrase จาก *Bacillus amyloliquefaciens* ด้วยอาหารเลี้ยง LBS ที่ pH เท่ากับ 6.0 โดยสารผสมของปฏิกิริยา มีการเปลี่ยนแปลงของช่วงอุณหภูมิที่ 30–80°C พบว่าเอนไซม์มีแนวโน้มการทำงานเพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 30°C – 50°C โดยมีค่า activity ในช่วง 1.0–1.2 U/mL เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50°C คือมีค่า activity เท่ากับ 1.2 U/mL จากนั้นเอนไซม์มีการทำงานลดลงจนกระทั่งเหลือ activity เท่ากับ 0.3 U/mL ที่อุณหภูมิ 80°C ดังแสดงในภาพที่ 16

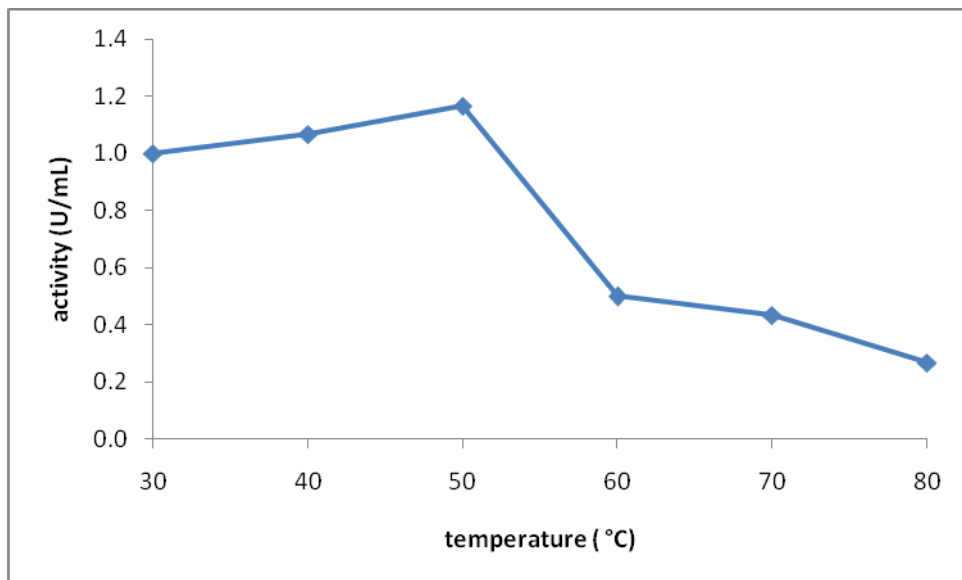
3.4 การโคลน, การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนลิแวนซูเครสจากแบคทีเรียที่คัดเลือก เพื่อเพิ่มปริมาณของ ลิแวนซูเครส

3.4.1 การโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิแวนซูเครสจากแบคทีเรียที่คัดเลือก

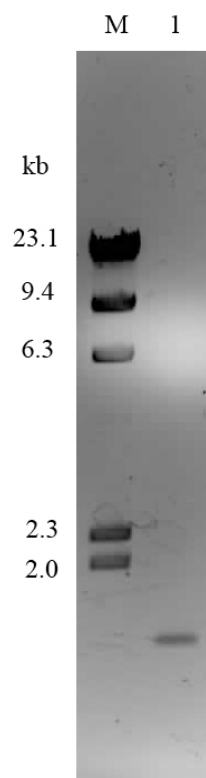
ทำการสกัด Chromosomal DNA ของแบคทีเรียโดยวิธีของ Sambrook และคณะ² จากนั้นจะทำการโคลนโดยใช้ PCR amplification ซึ่งมี chromosomal DNA เป็นแม่แบบ และ DNA primer ของ ยีนลิแวนซูเครส ทำการออกแบบโดยใช้ข้อมูลของ ยีนลิแวนซูเครสที่มีอยู่ใน Genbank เนื่องจากผู้ทดลองยังไม่สามารถระบุพีซีอาร์ที่แน่นอนของแบคทีเรียที่แยกได้ ผู้ทดลองจึงออกแบบดีเอ็นเอไพรเมอร์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งแปลรหัสให้ลิแวนซูเครสจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังแสดงในภาคผนวก เมื่อทดลองใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ดังกล่าวเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp. B1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตลิแวนซูเครสที่มีแอกติวิตีสูงที่สุดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR พบดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1.5 kb เพียงชนิดเดียว ดังแสดงในภาพที่ 17



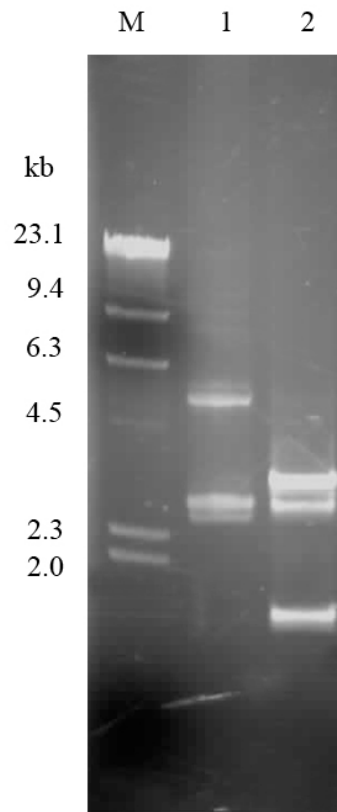
ภาพที่ 15 กราฟแสดงการทำงานของ Levansucrase ในช่วง pH 3-10 ที่อุณหภูมิ 37°C



ภาพที่ 16 กราฟแสดงการทำงานของ Levansucrase ในช่วงอุณหภูมิ 30-80°C ที่ pH 6.0



ภาพที่ 17 การเพิ่มจำนวนยีนลีแวนซูเครสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.B1 ด้วยเทคนิค PCR โดยกำหนดให้ Lane M $\lambda/HindIII$
Lane 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1.5



ภาพที่ 18 การโคลนยีนลีแวนซูเครส
โดยกำหนดให้

Lane M	λ /HindIII
Lane 1	pls_jet
Lane 2	pls_jet/EcoRI

จากนั้นทำดีเอ็นเอดังกล่าวให้บริสุทธิ์แล้วเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ โดยใช้ pJet cloning kit (fermentus, USA) แล้วส่งเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Top-10 เพื่อคัดเลือก *E. coli* ที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอพาหะที่มียีนลิแวนซูเครส แทรกอยู่โดยวิธี blue-white screening สกัดดีเอ็นเอพาหะออกจากเซลล์ *E. coli* แล้วนำไปตัดที่ตำแหน่งจำเพาะด้วย *EcoRI* จากนั้นตรวจสอบขนาดโดย agarose gel electrophoresis ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 18 จากการทดลองพบว่าสามารถโคลนยีนลิแวนซูเครส ได้จริงดังจะเห็นได้ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส หลุดออกมาจากดีเอ็นเอพาหะขนาด 3 กิโลเบส โดยเรียกดีเอ็นเอพาหะที่มียีนลิแวนซูเครสแทรกอยู่นี้ว่า pls_jet

จากนั้นนำ pls_jet มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบ open reading frame ขนาด 1419 คู่เบส (ภาพที่ 19) เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิแวนซูเครส จาก *Bacillus* sp. B1 กับยีนลิแวนซูเครสจากแบคทีเรียที่มีรายงานใน GenBank พบว่ายีนดังกล่าวมีความเหมือนกับยีนลิแวนซูเครสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* (EU668142.1) มากที่สุดโดยมีความเหมือน 96 %

เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 472 ตัว เมื่อตรวจหา signal peptide โดย SignsiP พบ signal peptide อยู่ทางด้านปลายอะมิโนของสายพอลิเปปไทด์ โดยมีตำแหน่งตั้งอยู่ระหว่างอะลานีนตำแหน่งที่ 29 และไลซีนตำแหน่งที่ 30 พบโดเมนอนุรักษ์ 4 โดเมนที่พบเสมอในกลุ่มของไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส ได้แก่ WMNDPNG ซึ่งเป็นโดเมนที่ประกอบด้วยกรดแอสพาทิกตำแหน่งที่ 86 ซึ่งทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ โดเมน WSGSA โดเมน RDP ซึ่งเป็นโดเมนที่ประกอบด้วยกรดแอสพาทิกตำแหน่งที่ 247 ซึ่งทำหน้าที่เป็น transition state stabilizer และ IERAN ซึ่งเป็นโดเมนที่ประกอบด้วยกรดกลูตามิกตำแหน่งที่ 342 ซึ่งทำหน้าที่เป็น acid/base catalyst เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากลำดับกรดอะมิโนพบว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 52974.12 ดาลตัน และมี pI เป็น 7.13

atgaacatcaaaaagattgtaaaacgagccacagtttctaactttttacaactgcacttctg
 M N I K K I V K R A T V L T F T T A L L
 gcagggggagcaactcaagccttcgcgaaagaaaatacccaaaaaccttacaagaagacg
 A G G A T Q A F A K E N T Q K P Y K E T
 tacggcgtctctcatatcacacgccatgatatgctgcagatccctaaacagcagcaaagt
 Y G V S H I T R H D M L Q I P K Q Q Q S
 gaaaaataccaagtgcctcaattcgatcaatcaacgattaaaaatattgaatctgcaaaa
 E K Y Q V P Q F D Q S T I K N I E S A K
 ggactcgtatgtgtgggacagctggccgctccaaaacgctgacggaacagtagctgaatac
 G L D V W D S W P L Q N A D G T V A E Y
 aacggctatcacgctcgtgtttgcacttgcaggaagcccgaagacgctgatgacacatca
 N G Y H V V F A L A G S P K D A D D T S
 atctacatgttttatcaaaaggctcggcgacaactcgattgacagctggaaaaacgcgggc
 I Y M F Y Q K V G D N S I D S W K N A G
 cgtgtctttaaagacagcgataagttcaacgccaacgatgaaatcctgaaagatcagaca
 R V F K D S D K F N A N D E I L K D Q T
 caagaatggctcgggttctgccacccttacttctgacggaaaaatccgtttattctacact
 Q E W S G S A T L T S D G K I R L F Y T
 gacttttccggtaaacattacggtaaacaaagtcttacaacggcgaggtaaatgtgtca
 D F S G K H Y G K Q S L T T A Q V N V S
 aaatccgacagcagcgtcaacatcaacggagtgaagatcacaaaacgatttttgacggc
 K S D S T L N I N G V E D H K T I F D G
 gacggaaaaacatatcagaacggttcagcagtttatcgatgaaggcaactatacatccggc
 D G K T Y Q N V Q Q F I D E G N Y T S G
 gacaaccatacgtgtgagagaccctcactacgttgaagacaaaggccataaataccttgta
 D N H T L R D P H Y V E D K G H K Y L V
 ttcgaagccaacacgggaacagaaaacggataccaaggcgaagaatctttatttaacaaa
 F E A N T G T E N G Y Q G E E S L F N K
 gcgtactacggcggcagcacgaacttcttccgtaaaagaaagccagaagcttcagcagagt
 A Y Y G G S T N F F R K E S Q K L Q Q S
 gctaaaaaacgcgatgctgaattagcgaacggcgccctcggtatgatagagttaaataat
 A K K R D A E L A N G A L G M I E L N N
 gattacacattgaaaaaagtcgatgaagccgctgatcacttcaaacacggtaactgacgaa
 D Y T L K K V M K P L I T S N T V T D E
 atcgatcgggcgcaacgttttcaaaatgaacggcaaatggtagtttactgattcagcgc
 I E R A N V F K M N G K W Y L F T D S R
 ggttcaaaaatgacgatcgacggtattaattcaaacgatattttacatgcttggttatgta
 G S K M T I D G I N S N D I Y M L G Y V
 tcaaactctttaacaggtccttacaagccgctgaacaaaacaggtcttgtagtgcgaatg
 S N S L T G P Y K P L N K T G L V L Q M
 ggtcttgatcctaacgatgtgacgttcacatactctcacttcgcagtgccctcaagccaaa
 G L D P N D V T F T Y S H F A V P Q A K
 ggcaacaatgtcgtgatcacaagctacatgacaaacagaggcttctttgaggataaaaag
 G N N V V I T S Y M T N R G F F E D K K
 gcaacttttgcgccaagcttcttaatgaacatcaaaggcaagaaaacatccgttgtaaaa
 A T F A P S F L M N I K G K K T S V V K
 aacagcatccttgaacaaggacaaaactgcagtcaaccaataa
 N S I L E Q G Q T A V N Q -

ภาพที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของลิแวนซูเครสจาก *B. amyloliquefaciens*

Signal peptide เน้นด้วยขีดเส้นใต้ 1 เส้น บริเวณที่มีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเร่งปฏิกิริยา เน้นด้วยขีดเส้นใต้ 2 เส้น

3.5 การแสดงออก และการทำบริสุทธิ์ของลิแกนด์จาก recombinant LsKK

การแสดงออกของยีนลิแกนด์ (*ls*) ใน *E. coli* Top-10 โดยถูกเหนี่ยวนำด้วย 0.1mM IPTG พบว่าเอนไซม์อยู่ในเซลล์ จะต้องทำการแตกเซลล์เพื่อนำเอนไซม์ออกมา โดยใช้เครื่อง sonicator

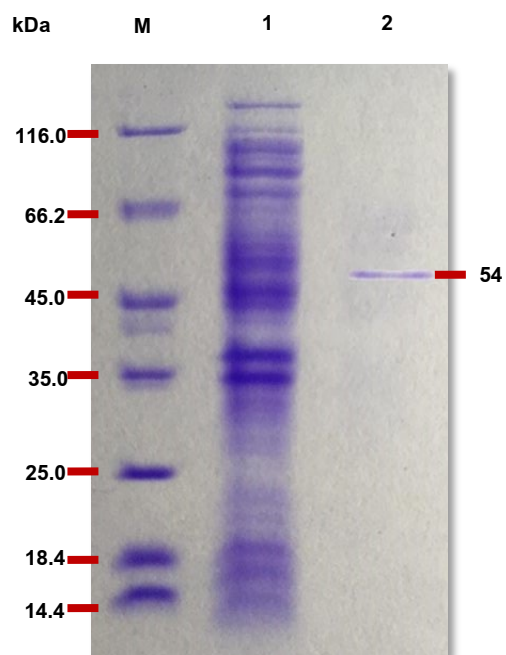
ในส่วนของการทำบริสุทธิ์ลิแกนด์ นำเอนไซม์หยาบที่ได้มาผ่านคอลัมน์แบบ CM-TOYOPEARL-650M ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 และภาพที่ 20 SDS-PAGE พบว่าสามารถทำให้ลิแกนด์บริสุทธิ์ขึ้น 58 เท่า โดยมีการได้กลับคืนมาของเอนไซม์ 45% โดยมีความบริสุทธิ์ถึง 95% และ SDS-PAGE พบแบนโปรตีนเพียง 1 แบน ขนาด 54 kDa

ตาราง 5 การทำบริสุทธิ์ของลิแกนด์ โดย ion-exchange chromatography

Purification step	Total volume (mL)	Protein		Activity		Fold	Yield (%)
		Protein (mg/mL)	Total protein (mg x 10 ³)	Activity (U/mL)	Total activity (U x 10 ⁴)		
Crude l	25	6.47	161.65	4.72	118	1.00	100.0
TOYOPEARL-650M	52	0.05	2.62	2.15	112	57.79	94.8

3.5 ศึกษาสมบัติของลิแกนด์และลิแกนด์ที่ผลิตได้จากยีนลิแกนด์

เอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์สูง และมีขนาด 54 kDa (ภาพที่ 23) โดยมีอุณหภูมิ และค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 30°C และ 6.0 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 21-22 acceptor specificity ถูกอธิบาย โดยปฏิกิริยาการรับถูกทำโดยมี ซูโครสเป็นตัวให้ และมี แคลคไรด์ชนิดต่างๆ เป็นตัวรับ หมู่ฟรุกโทส LsKK สังเคราะห์ FOSs ชนิดต่างๆ จากตัวรับหลายๆชนิด ประกอบด้วย แลคโทส หรือ ฮาโลส ไชโลส อินโนซิтол แมนนิทอล ซิลิทอล และราฟฟิโนส ซึ่งเป็น ตัวรับที่ดี แสดงดังภาพที่ 23 นอกจากนี้ ลิแกนด์ที่ผลิตได้จากน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น โดยใช้ลิแกนด์ ที่ 30°C ได้ ลิแกนด์ที่มีขนาดโมเลกุล 11, 1000 และ 4700 kDa โดยมีลิแกนด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก (11 kDa) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ LsKK ถูกแสดงด้วย MM type kinetics (ภาพที่ 24) พบว่าค่า K_m คือ 7.14 mM สำหรับปฏิกิริยา hydrolysis

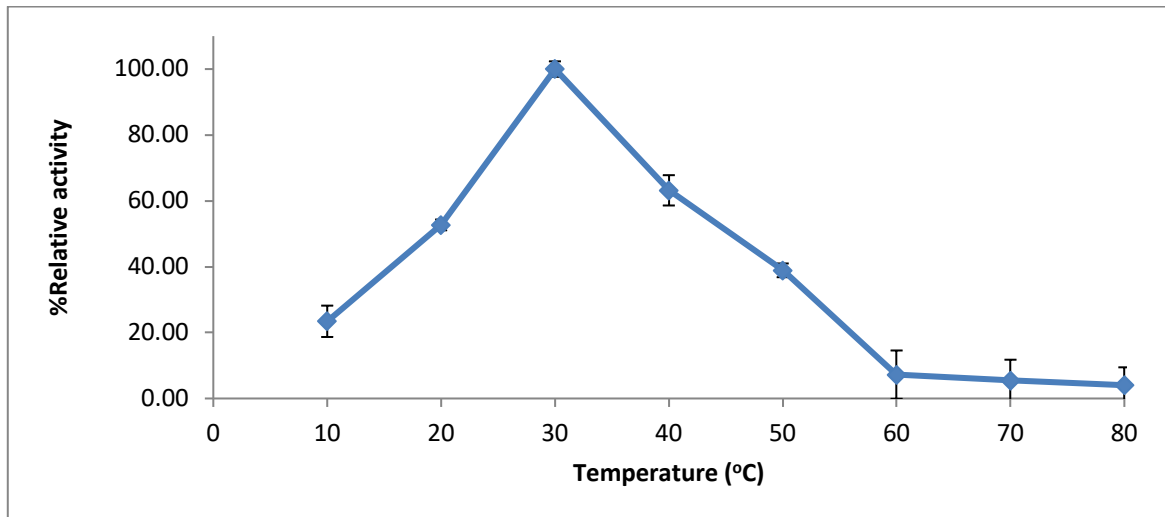


ภาพที่ 20 การวิเคราะห์การทำบริสุทธิ์ของลิแวนซูเครส โดย ion-exchange chromatography ด้วย SDS-PAGE

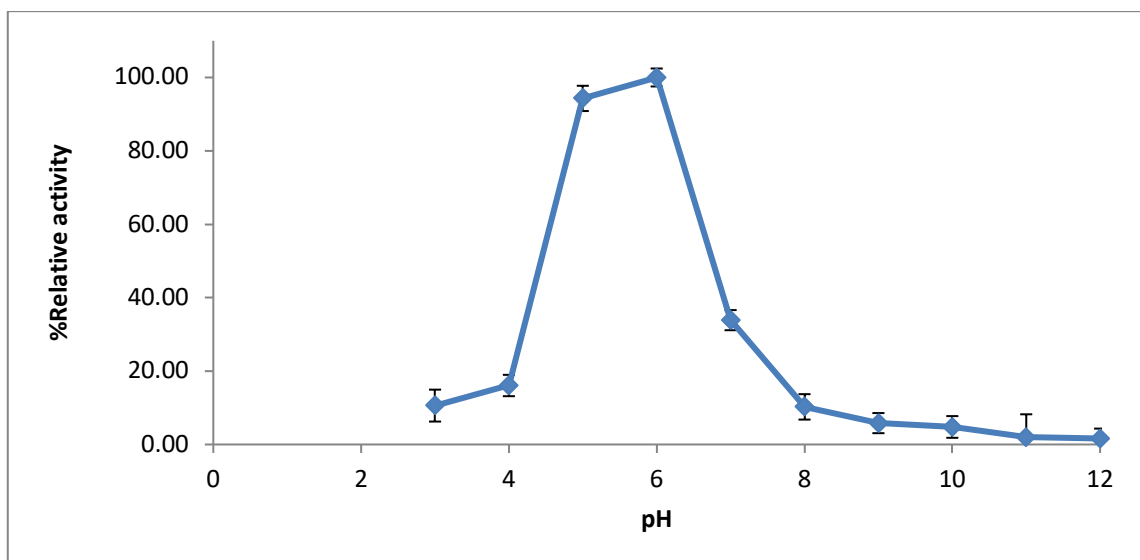
Lane M: protein molecular weight marker,

Lane 1: crude enzyme

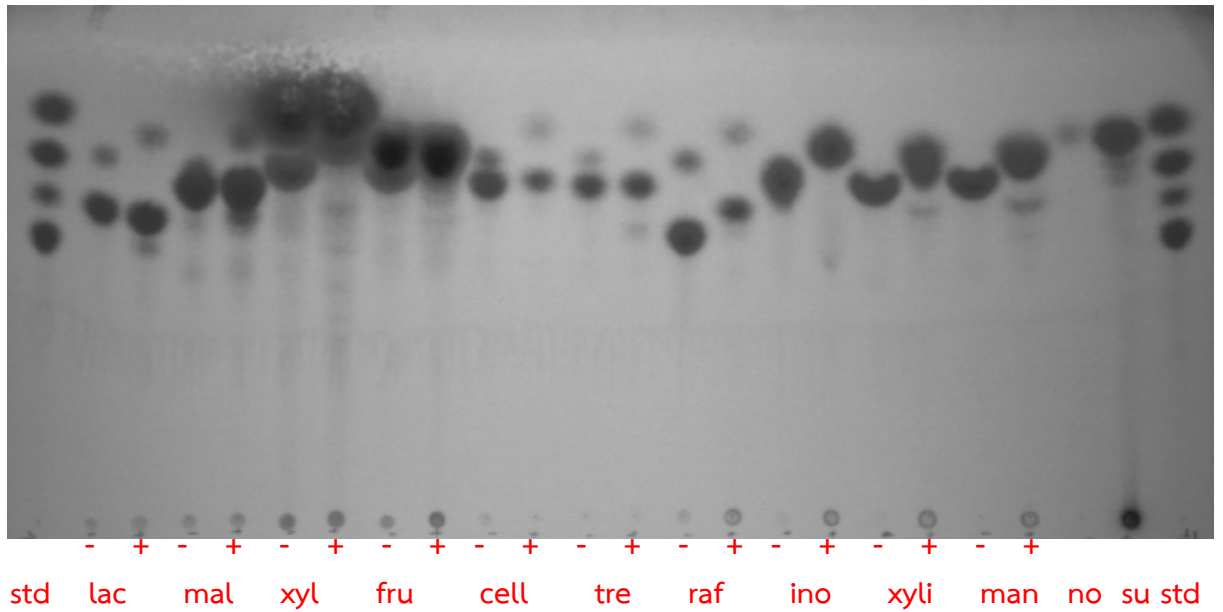
Lane 2: CM-cellulose pooled fraction



ภาพที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของลิแวนซูเครส ที่ 10-80 °C โดยใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น

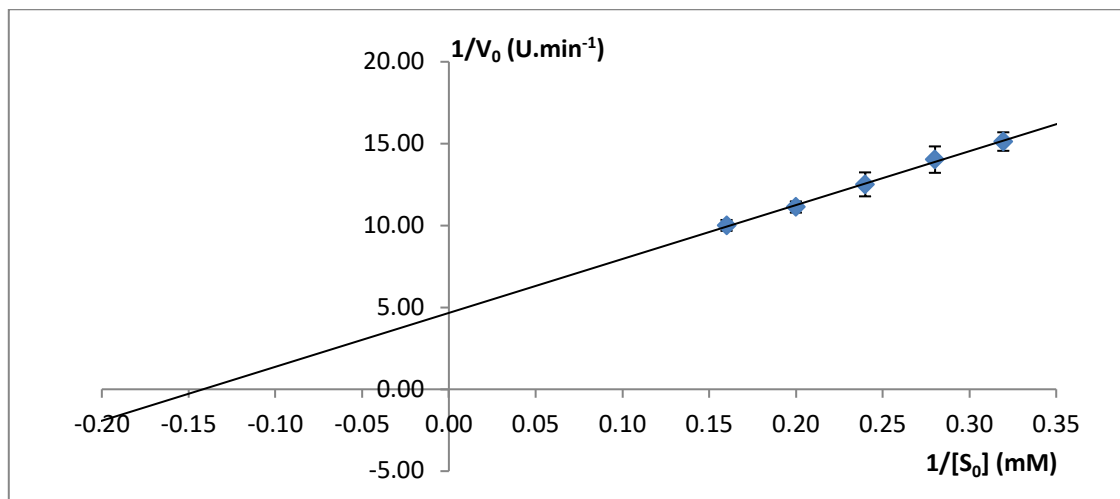


ภาพที่ 22 ผลของ pH ต่อการทำงานของลิแวนซูเครส ที่ pH 3-12 โดยใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น

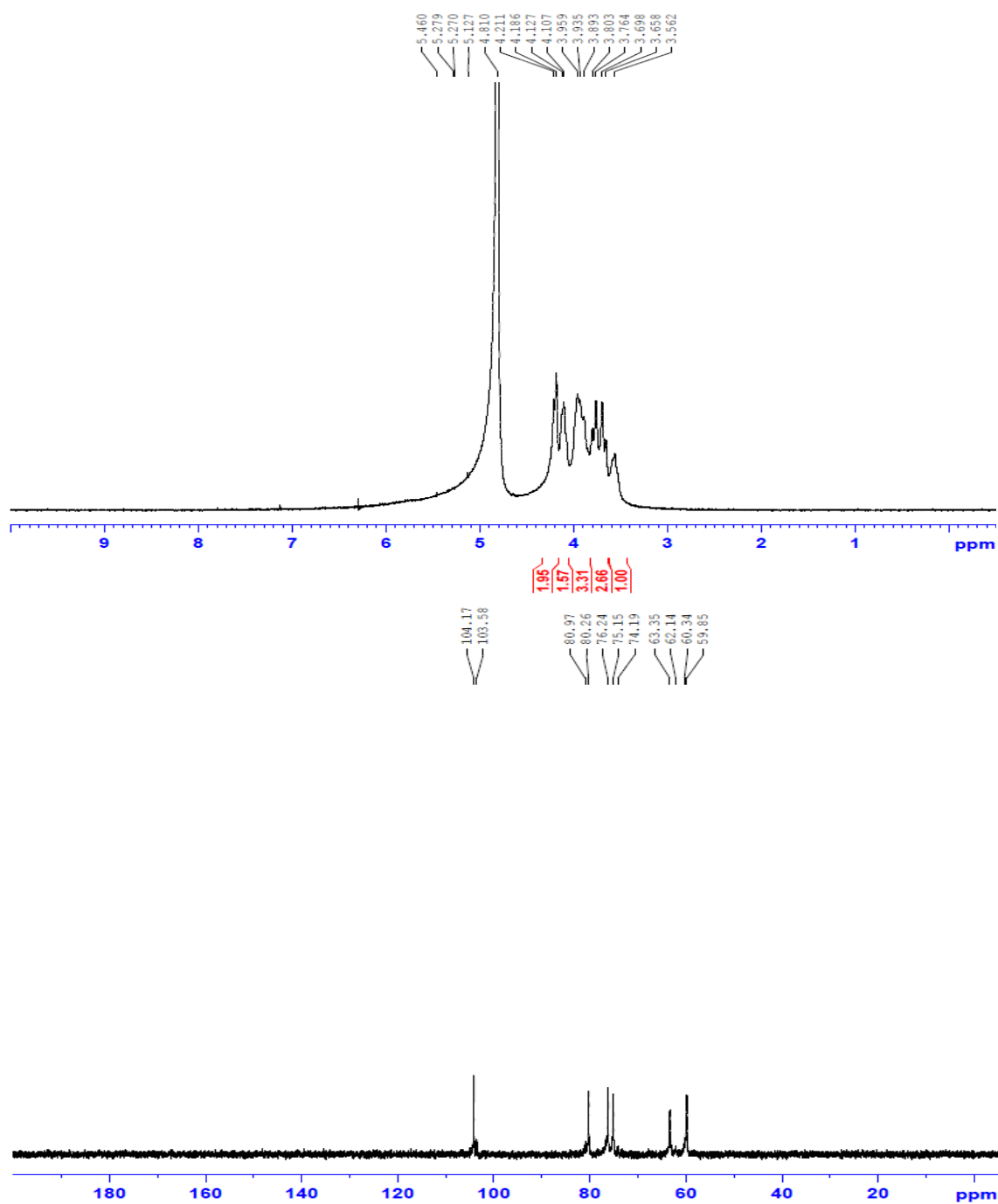


ภาพที่ 23 การวิเคราะห์ TLC ของ transfructosylation products

std, standard; lac, lactose; mal, maltose; xyl, xylose; fru, fructose; cell, cellubiose, tre, trehalose; raf, raffinose; ino, inositol; xyli, xylitol; man, mannitol, no, no acceptor, suc, sucrose (-), no enzyme;(+), enzyme



ภาพที่ 24 Lineweaver-Burke double reciprocal plot of *B. licheniformis* KK9 levansucrase



ภาพที่ 25 ^{13}C -NMR and ^1H -NMR spectrum of the polymer synthesized by LsKK-9

ในการศึกษา¹³C-NMR spectrum ของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก LsKK-9 พบ 6 resonances ที่ 104.2, 80.3, 76.2, 75.1, 62.1 และ 59.9 ppm แสดงดังภาพที่ 25 ซึ่ง resonances มีลักษณะเหมือนลิแวนจาก *B. polymyxa*, *B. subtilis* และ *B. lichenimiss* นอกจากนี้ chemical shift ของ anomeric carbon, 104.2 และ 103.6 ซึ่งให้เห็นว่า พอลิแซคคาไรด์ มีพันธะสองแบบคือ β -(2, 6) linkage ซึ่งเป็นพันธะหลัก และ β -(2, 1) ซึ่งเป็นกิ่ง The ¹H-NMR spectrum แสดง 7 โปรตรอนระหว่าง 3.8 และ 4.8 ppm

3.7 การเอนแคปซูลเลชัน Astaxanthin ด้วยลิแวนโดยใช้ลิแวนซูเครส

3.7.1 การศึกษาอิทธิพลของควมมีขั้วของตัวทำละลายที่มีผลต่อการเอนแคปซูลเลชัน Astaxanthin

การศึกษาดังกล่าวของของควมมีขั้วของตัวทำละลายที่มีผลต่อการเอนแคปซูลเลชัน Astaxanthin โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Ethanol ที่ 10-50% Ethanol โดยเขย่าและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าที่ 0% และ 10% Ethanol จากสารละลายใส มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีขาวขุ่น ลักษณะคล้ายคอลลอยด์ ซึ่งจะมีความขุ่นลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Ethanol เพิ่มขึ้น โดยพบว่า 10% Ethanol สามารถเอนแคปซูลเลชัน Astaxanthin ได้ดี

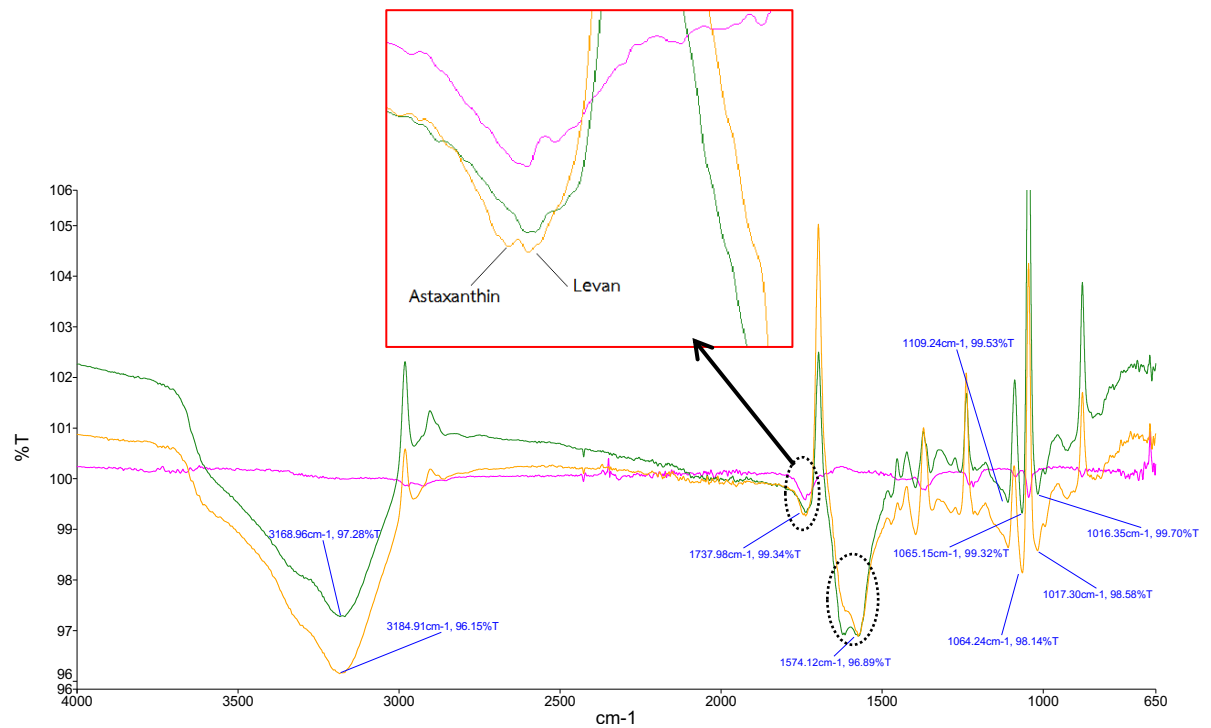
3.7.2 การเอนแคปซูลเลชัน Astaxanthin ด้วยอนุภาคนาโนลิแวน

จากการเอนแคปซูลเลชัน Astaxanthin ด้วยลิแวนซูเครส และนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที พบว่าได้สารละลายใสสีแดงส้ม และได้ตะกอนสีแดงซึ่งตะกอนที่ได้คือ อนุภาคของ นาโนเอนแคปซูลเลชันของสาร Astaxanthin และเปรียบเทียบกับนาโนลิแวนที่ปราศจาก astaxanthin พบว่าได้สารละลายสีขาวขุ่นและมีตะกอนสีขาวขุ่น

3.7.3 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ Astaxanthin NanoLevan และ Nanoastaxanthin

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ Astaxanthin NanoLevan และ Nanoastaxanthin ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) ผลแสดงดังภาพที่ 26

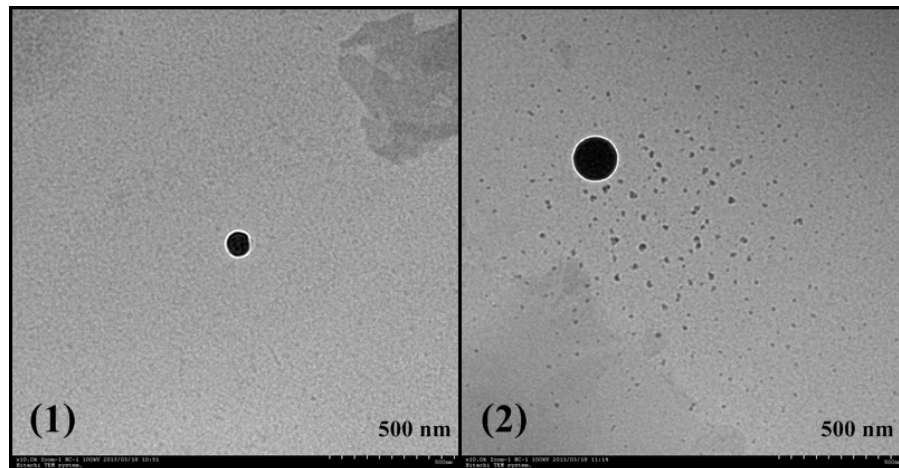
พบว่าสเปกตรัมของ Nanolevan ปรากฏพีดตำแหน่งของ C-O อยู่ที่ 1109.10 cm⁻¹ และพบพีดตำแหน่งของ C-H Stretching อยู่ที่ 2953.90 cm⁻¹, และที่ 1573.90 cm⁻¹ ซึ่งเป็นของหมู่ฟังก์ชันกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต 1622.3 cm⁻¹ และพบตำแหน่งของไกลโคซิดิก อยู่ที่ตำแหน่ง 1698.3 cm⁻¹ ส่วนในการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ Astaxanthin พบว่าปรากฏพีดตำแหน่งของ C=O อยู่ที่ 1738.17 cm⁻¹ และพบพีดตำแหน่งของ C=C อยู่ที่ 878.89 cm⁻¹, พีดตำแหน่ง 3200–3400 cm⁻¹ จะเป็นของหมู่ฟังก์ชัน O-H stretching และในการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันจะพบว่า Nanolevan จะปรากฏพีดที่ตำแหน่ง 1622.3 cm⁻¹ เป็นลักษณะเฉพาะของสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต โดยที่ Nanolevan และ Nanoastaxanthin จะปรากฏพีดตำแหน่งของ C-O-C 1698.3 cm⁻¹ เหมือนกัน ซึ่งเป็นฟังก์ชันของกลุ่มพันธะไกลโคซิดิกแต่จะไม่พบใน Astaxanthin



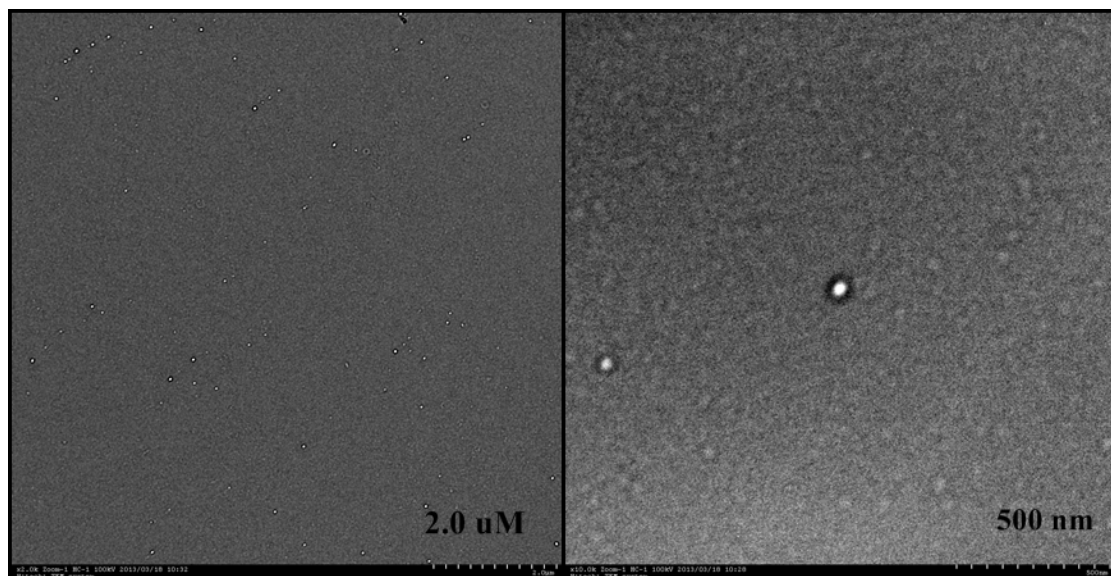
ภาพที่ 26 แสดงการเปรียบเทียบกราฟอินฟราเรดสเปกตรัมระหว่าง Astaxanthin Nanoastaxanthin และ Nanoastaxanthin โดยที่ สีเขียว Nanoastaxanthin, สีส้ม Nanoastaxanthin, สีน้ำเงิน Astaxanthin

3.4 ศึกษาสถานะของการกระจายตัวของอนุภาคนาโน

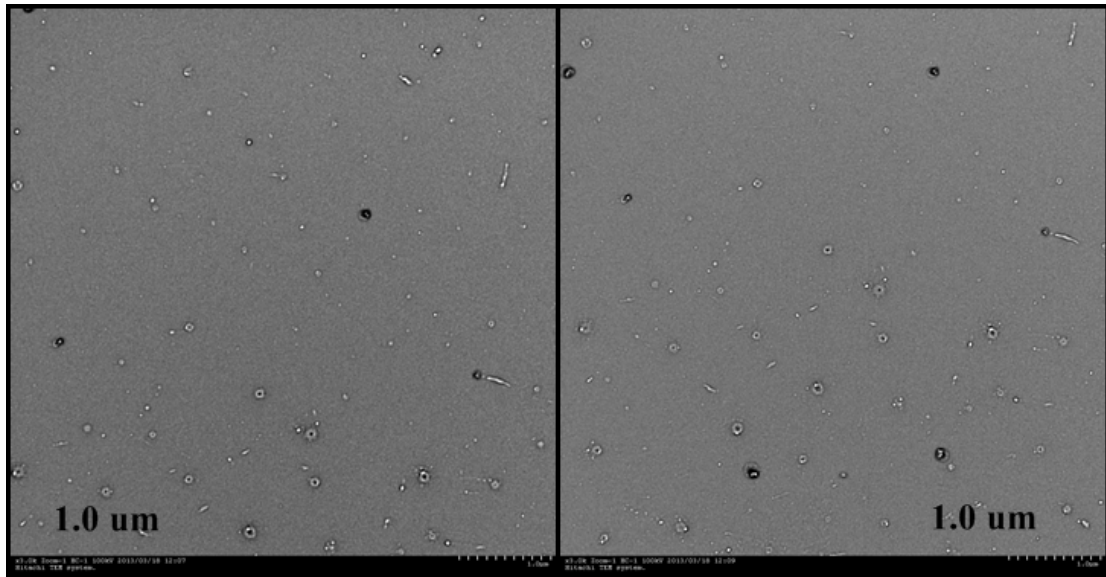
จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคนาโนด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscop โดยใช้ pellet ของ nanoastaxanthin แสดงดังภาพที่ 27 พบว่า ลักษณะของอนุภาคที่ได้ค่อนข้างกลม ขนาดอนุภาคประมาณ 220 nm การกระจายตัวของอนุภาคค่อนข้างน้อย และในส่วน ของ Nanolevan แสดงดังภาพที่ 28 พบว่า อนุภาคจะมีลักษณะค่อนข้างกลม และมีขนาดอนุภาค ประมาณ 90 nm และในส่วนสุดท้ายจะเป็นการวิเคราะห์ห้อนุภาคนาโน ใน supernate แสดงดังภาพที่ 29 พบว่า อนุภาคมีการกระจายตัวดี ขนาดของอนุภาคมีลักษณะค่อนข้างกลม และอนุภาคมีขนาด ประมาณ 110 nm



ภาพที่ 27 แสดงอนุภาค Nanoastaxanthin ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy) กำลังขยาย 500 nm



ภาพที่ 28 แสดงอนุภาค Nanolevan ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy) กำลังขยาย 2.0 μ M และ 500 nm



ภาพที่ 29 แสดงอนุภาค Nanolevan ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy) กำลังขยาย 1.0 nm

สรุปผลและอภิปรายผล

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลิแวนซูเครส จากน้ำและดิน โดยได้คัดเลือก *Bacillus amyloliquefacien* KK9 ซึ่งผลิตลิแวนซูเครสที่ทำงานได้ดี ทำการ การโคลน การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแสดงออกของยีนลิแวนซูเครสจาก *Bacillus amyloliquefacien* KK9 ได้
2. ยีนลิแวนซูเครสแทรกอยู่ในพลาสมิด plsKK มีขนาด 1.5 kb เมื่อหาลำดับ DNA ของในพลาสมิด plsKK ที่มียีนลิแวนซูเครสแทรกอยู่ พบยีน ขนาด 1,431 bp และโปรตีนมีกรดอะมิโน 477 ตัว และค่า pI/molecular weight ที่ได้จากการคำนวณ 7.13/53.4 kDa. signal peptide sequence ที่ทำนายมีกรดอะมิโน 29 ตัวที่ปลาย N-terminal
3. เอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์สูง และมีขนาด 54 kDa โดยมีอุณหภูมิ และค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 30°C และ 6.0 ตามลำดับ ศึกษา acceptor specificity โดยมี ซูโครสเป็นตัวให้ และมี แซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ เป็นตัวรับหมู่ฟรุกโทส พบว่า แลคโทส ทรีฮาโลส ไซโลส อินโนซิทอล แมนนิทอล ไซลิทอล และราฟฟิโนส ซึ่งเป็น ตัวรับที่ดี นอกจากนี้ ลิแวนที่ผลิตได้จากน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น โดยใช้ลิแวนซูเครส ที่ 30°C ได้ ลิแวนซึ่งมีขนาดโมเลกุล 11, 1000 และ 4700 kDa โดยมีลิแวนซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็ก (11 kDa) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก
4. สามารถเอนแคปซูเลชันสาร Astaxanthin ด้วยอนุภาคนาโนลิแวน และจากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของตัวทำละลายที่มีผลต่อการเอนแคปซูเลชัน Astaxanthin ด้วยอนุภาคนาโนลิแวน พบว่า ที่ 10% Ethanol เอนไซม์สามารถผลิตอนุภาคนาโนลิแวนได้ดี การวิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคนาโนด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscop พบว่า Nanoastaxanthin มีอนุภาคเป็นทรงกลม อนุภาคมีการกระจายดี มีขนาดอนุภาคประมาณ 110 nm และในส่วนสุดท้าย Nanolevan ขนาดของอนุภาคมีลักษณะกลมเช่นกัน มีขนาดอนุภาคประมาณ 90 nm

เอกสารอ้างอิง

1. Cheetham, P. S. J., Garrett, C., and Clark. I. Isomaltulose production using immobilized cells. *Biotechnol. Bioeng.* 1985; 27:471-48 1
2. Yun. J. W., Oh, K. K., Kim, J. H., Jeon, Y. J.. and Lee, J. H. Production of palatinose by immobilized cells of *Erwinia raphontici*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 1992; 7:79-83
3. Jung, K. H., Lim, J. Y., Yoo, S. J., Lee, J. H.. and Yoo, M. Y. Production of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol.Lett.* 1987; 9: 703-708
4. Hayashi, S., Nonokuchi, M.. Imada, K., and Ueno, H. Production of fructosyl transferring enzyme by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. *J. Ind. Microbial.* 1990; 5: 395-400
5. Hirayama. M., Sumi, N.. and Hidaka, H. Purification and properties of a fructo-oligosaccharide-producing fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.* 1989; 53: 667673
6. Yun, J. W.. Jung, K. H.. Jeon. Y. J., and Lee. J. H. Continuous production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. *J. Microbial. Biotechnol.* 1992; 2: 98-101
7. Yun. J. W., Jung, K. H.. Oh, J. W.. and Lee, J. H. Semibatch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Biochem Biotechnol.* 1990; 24125: 299-308
8. Guo, J. H, Skinner, G. W., Harcum, W. W., and Barnum, P. E. Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers, *Pharmaceutical Science & Technology Today.* 1998; 1, 254–261.
9. Botos, I., O’Keefe, R. B., Shenoy, R. S., Cartner, K. L., Ratner, M. D., Seeberger, H. P., Boyd, R. M., and Wlodawer, A. Structures of the Complexes of a Potent Anti-HIV Protein Cyanovirin-N and High Mannose. *Oligosaccharides* 2002; 277: 34336–34342
10. Calazans, G. M. T., Lima, R. C., de França, F. P., and Lopes, C. E. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int. J. Biol. Macromol* 2002; 27:245–247.
11. Cummings, H. J., Macfarlane, T. G., and Englyst, N. H. Prebiotic digestion and fermentation1–3. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(suppl):415S–20S.
12. Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S., and Yamaguchi, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J. Nutr. Biochem* 1999; 10: 13–18.
13. Roberfroid, M. B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr Rev* 1996; 54(11 Pt 2):S38-42, 1996
14. Rairakhwada, D., Pal, A. K., Bhathena, Z. P., Sahu, N. P., Jha, A., Mukherjee S. C. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol* 2007; 22(5):477-86

15. Roberfroid and Marcel. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Advances in experimental medicine and biology* 1997; 427: 211-9
16. Kim, K.H., Chung, C.B., Kim, Y.H., Kim, K. S., Han, C. S., and Kim, C. H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Int J Cosmet Sci* 2006 ; 28(3):231
17. Kim, K.H., Chung, C.B., Kim, Y.H., Kim, K. S., Han, C. S., and Kim, C. H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J Cosmet Sci*. 56(6):395-406, 2005
18. Xu, Q., Yajima, T., Li, W., Saito, K., Ohshima, Y., and Yoshikai, Y. Levan (beta-2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signaling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin. *E production.Clin Exp Allergy* 2006; 36(1):94-101
19. Schechter, L., and Hestrin, S. Levan as a blood volume expander: relationship of polymer size and behavior in the organism. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1963; 61: 962–978.
20. Ingrid J. Vereyken, J. Albert van Kuik, Toon H. Evers, Pieter J. Rijken and Kruijff, D. B. Structural Requirements of the Fructan-Lipid Interaction. *Biophysical Journal* 2003; 81: 3147-3154
21. S.Bezzate, M.Steinmetz, and S.Aymerich. Cloning, sequencing, and disruption of a levanase gene of *Bacillus polymyxa* CF43. *J. Bacteriol* 1994; 176: 2177.
22. S.Kralj, G.H.Van Geel-Schutten, H.Rahaoui, R.J.Leer, E.J.Faber, M.J.Van der Maarel, and L.Dijkhuizen. Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with alpha-(1-4) and alpha-(1-6) glucosidic bonds. *Appl. Environ. Microbiol* 2002; 68:4283.
23. K.Kyono, H.Yanase, K.Tonomura, H.Kawasaki, and T.Sakai, Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertas. *Biosci.Biotechnol. Biochem* 1995; 59: 289.
24. Rehm BHA (editor). Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: *Applications and Perspectives* 2009; Caister Academic Press.
25. Calazans, G. M. T., Lima, R. C., de Franca, F. P., and Lopes, C.E. Antitumour activity of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol. Lett.* 1997; 19 : 19-21
26. Calazans G. M.T., Lima, R. C., de Franca FP and Lopes CE. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int.J.Biol. Macromol* 2000; 27: 245.
27. Kang, S. A., Jang, K., Seo, J., Kim, K., Kim, Y. H., Rairakhwada, D., Seo, M., Lee, J., Ha, S., Kim, C., and Rhee, S. Levan: Applications and Perspectives. Microbial

- Production of Biopolymers and Polymer Precursors. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2009; 56:137-140.
28. Yoon EJ, Yoo SH, Cha J.H and Lee HG. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 2004; 34, 191–194.
 29. Rairakhwada, D., J.-W. Seo, M.-Y. Seo, O. Kwon, S.-K. Rhee and C. Kim. 2010. Gene cloning, characterization, and heterologous expression of levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37, 195-204.
 30. (Abdel-Fattah *et al.*, 2012) Abdel-Fattah, A. M., A. M. Gamal-Eldeen, W. A. Helmy, and M. A. Esawy. 2012. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate Polymers* 89, 314-322.
 31. (Arvidson *et al.*, 2005) Arvidson, S. A., B. T. Rinehart and F. Gadala-Maria. 2006. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydrate Polymers* 65, 144-149.
 32. Shih, I. L., Yu, Y.T., Shieh C.J., and Hsieh, C.Y. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J. Agril. Food Chem* 2005; 53: 8211 -8215.
 33. Ramsay, J.K., Microbial products in enhanced oil recovery. *Unpublished Ph. D. Thesis* 1987; McGill University, Montreal, Quebec.
 34. Barrufet, M. A., Bryant, R., and Gabitto, J. F. Combined microbial surfactant-polymer system for improved oil mobility and conformance control. *Annual Progress Report* 2001; Texas A&M University, College Station, Texas.
 35. Kirk, R.E., Othmer, D.F., Kroschwitz, J. I., and Kirk-Othmer, H. H. G. Encyclopedia of Chemical Technology. 1991; 16, Wiley Inc., New York, New York.
 36. Ben Ammar, Y. Characterization of a Thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *J. Biotechnol* 2002; 99: 111-119.
 37. Ahmed, F. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Microbiology* 2005; 51:402–407.
 38. Han, Y.W. Levan production by *Bacillus polymyxa*. *J. Indus. Microbiol* 1989; 4: 447-452.
 39. Hehre, E.J. Enzymic synthesis of polysaccharides: a biological type of polymerization. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem* 1951; 11: 297–337.
 40. Loewenberg, J.R. and E.T. Reese. Observations on microbial fructosans and fructosanases. *Can. J. Microbiol* 1957; 3: 643–650.
 41. Pabst, M.J. Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infection and Immunity* 1977; 15: 518- 526.

42. Han, Y.W. Production and characterization of microbial Levan. *Agril. Food Chem* 1990; 38: 393-396.
43. Srinivasan, S. and Quastel, J. H. Enzymatic syntheses of oligo-and polysaccharides containing DGlucosamine. *Science* 1985; 127: 143-144.
44. Evans, T.H. and Hibbert, H. Advances in Carbohydrate Chemistry. *Academic Press* 1946; New York, New York.
45. Hestrin, S. and Goldblum, J. Levanpolyase. *Nature* 1953; 172: 1064–1047.
46. Fuchs, A. Synthesis of levan by *pseudomonads*. *Nature* 1956; 178: 921.
47. Dawes, E.A., Ribbons, D.W., and Rees, D.A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochem. J* 1966; 98: 804-812.
48. Tajima, K., Uenishi, N., Fujiwara, M., Erata, T., Munekata, M., and Takai, M. The production of a new water-soluble polysaccharide by *Acetobacter xylinum* NCI 1005 and its structural analysis by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 1998; 305: 117–122.
49. Chambert, R., Treboul, G., and Dedonder, R. Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem* 1974; 41: 285-300.
50. Homann, A., Biedendieck, R., Gotze, S., Jahn, D., and Seibel, J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J.* 2007; 407: 189-198.
51. Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F. and Chambert, R. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 1995; 309: 113–118.
52. Van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M. R., Ten Brink, B., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., and Dijkhuizen, L. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and mutant strains. *Appl. Environ. Microbiol* 1999; 65: 3008–3014.
53. Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A., Day, D. F., and Robyt, J. F. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005; 1727: 5 – 15.
54. Hettwer, U., Jaeckel, F. R., Boch, J., Meyer, M., Rudolph, K. and Ullrich, M. S. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. And *P. syringae* pv. *Phaseolicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 3180–3187.

55. Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Ozawa, O., Kanematsu, T., Uchida, T. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1638. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1992; 56: 1373–1377.
56. Song, K. B., Joo, H. K., Rhee, S. K. Nucleotide sequence of levansucrase gene (levU) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). *Biochem. Biophys. Acta* 1993; 1173: 320–324.
57. Song, K. B., and Rhee, S. K. Levansucrase In: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J. and Wong, D. W. S.(Eds.), Handbook of food enzymology, *Marcel Dekker*, New York, 2003; 605-614.
58. Euzenat, O., Guibert, A., and Combes, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem.* 1997; 32: 237-243.
59. Hettwer, U., Gross, M., and Rudolph, K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv *Phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 2834-2839.
60. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem* 1959; 31: 426–428.
61. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. *Cold Spring Harbor* 1989; New York.

ภาคผนวก 1



รายงานผลที่ 2554 / 157

ที่ ผวช.

รายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์

ให้แก่

โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

การทดสอบ / วิเคราะห์ จัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย
วิธีทดสอบ / วิเคราะห์ ระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยวิธีการทดสอบชีวเคมี (เอ พี ไอ)
ภาวะการทดสอบ / วิเคราะห์ : อุณหภูมิ 37 °C
วันที่ทดสอบ / วิเคราะห์ 5 สิงหาคม 2554
ผลการทดสอบ / วิเคราะห์

ผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ ดังนี้

B-1*: <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.8 %ID
B-6*: <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	94.7 %ID
BS*: <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	96.1 %ID

(รายละเอียดดังตารางแนบ)

หมายเหตุ: * ตัวอย่างที่ส่งตรวจเป็นเชื้อสด

ผู้ทดสอบ / วิเคราะห์
น.ส. พิรารรณ ศรีศิลป์

ผู้ตรวจสอบ


(น.ส. สุศุภณัฐ บัณฑิตวงษ์ ณ อุบลราชธานี)

ผู้รับรอง


(นางฉันทรา ชื่นศิริ)

ผู้อำนวยการฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

วันที่ 31.8.54

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้รับไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดลอกหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ตรวจ วว.

แก้ไขครั้งที่: 0

แบบฟอร์มประกาศใช้วันที่ 16 ตุลาคม 2551

FM-BSD-WI-10-02 (ไทย)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

๓๕ หมู่ ๓, เขตในธานี ต.คลองน้ำ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐
โทร: (๐๖) ๕๒๕๗๗๗-๗๐๐๐ โทรสาร: ๐๒๕๗๗ ๗๐๐๑
E-mail: tistr@tistr.or.th Website: www.tistr.or.th



วว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. Characteristics of the bacterial strain B-1: *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Catalase	+
Fermentative production of acid from:	
Glycerol	+
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	+
D-ribose	+
D-xylose	+
L-xylose	-
D-adonitol	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-
D-galactose	-
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	-
L-sorbose	-
L-rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	+
D-mannitol	+
D-sorbitol	+
Methyl-αD-mannopyranoside	-
Methyl-αD-glucopyranoside	+
N-acetylglucosamine	-
Amygdaline	+
Arbutine	+

Remark : + ve = Gram positive bacteria
+ = Positive reaction
- = Negative reaction

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้รับเท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดลอกหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่ากร วว.



วว.
รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. (continued) Characteristics of the bacterial strain B-1: *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from: (continued)	
Esculine ferric citrate	+
Salicine	+
D-cellobiose	+
D-maltose	+
D-lactose (bovine origin)	-
D-melibiose	-
D-saccharose (sucrose)	+
D-trehalose	-
Inuline	-
D-melezitose	-
D-raffinose	+
Amidon (starch)	+
Glycogen	+
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	-
D-lyxose	-
D-tagatose	-
D-fucose	-
L-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Potassium gluconate	-
Potassium 2-ketogluconate	-
Potassium 5-ketogluconate	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria
+ = Positive reaction
- = Negative reaction

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา กัดถ่ายหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าราชการ วว.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

๓๕ หมู่ ๓ เทศบาลตำบลคลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐
โทร. (๐๖) ๐-๒๕๗๗ ๙๐๐๐ โทรสาร ๐-๒๕๗๗ ๙๐๐๙
E-mail : tistr@tistr.or.th Website : www.tistr.or.th

หน้า 3 ของ 7



ว.ว.
รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. Characteristics of the bacterial strain B-6: *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Catalase	+
Fermentative production of acid from:	
Glycerol	+
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	+
D-ribose	+
D-xylose	+
L-xylose	-
D-adonitol	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-
D-galactose	-
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
L-sorbose	-
L-rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	+
D-mannitol	+
D-sorbitol	+
Methyl-αD-mannopyranoside	-
Methyl-αD-glucopyranoside	+
N-acetylglucosamine	-
Amygdaline	+
Arbutine	+

Remark : + ve = Gram positive bacteria
+ = Positive reaction
- = Negative reaction

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นการคิดทบทวน
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดลอกหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ตรวจ วว.



วว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. (continued) Characteristics of the bacterial strain B-6: *Bacillus subtilis/amytoliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from: (continued)	
Esculine ferric citrate	+
Salicine	+
D-cellobiose	+
D-maltose	+
D-lactose (bovine origin)	+
D-melibiose	+
D-saccharose (sucrose)	+
D-trehalose	+
Inuline	-
D-melezitose	-
D-raffinose	+
Amidon (starch)	+
Glycogen	+
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	-
D-lyxose	-
D-tagatose	-
D-fucose	-
L-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Potassium gluconate	-
Potassium 2-ketogluconate	-
Potassium 5-ketogluconate	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria
+ = Positive reaction
- = Negative reaction

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ใส่ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้เป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดลอกหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้อำนวยการ วว.



วว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 3. Characteristics of the bacterial strain BS: *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Catalase	+
Fermentative production of acid from:	
Glycerol	+
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	+
D-ribose	+
D-xylose	+
L-xylose	-
D-adonitol	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-
D-galactose	-
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
L-sorbose	-
L-rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	+
D-mannitol	+
D-sorbitol	+
Methyl-αD-mannopyranoside	-
Methyl-αD-glucopyranoside	+
N-acetylglucosamine	-
Amygdaline	+
Arbutine	+

Remark : +ve = Gram positive bacteria
 + = Positive reaction
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้คือเป็นความคิดทางกฎหมาย
 การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดลอกหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าการ วว.



๖๖.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 3. (continued) Characteristics of the bacterial strain BS: *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from: (continued)	
Esculine ferric citrate	+
Salicine	+
D-cellobiose	+
D-maltose	+
D-lactose (bovine origin)	-
D-melibiose	+
D-saccharose (sucrose)	+
D-trehalose	+
Inuline	+
D-melezitose	-
D-raffinose	+
Amidon (starch)	+
Glycogen	+
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	+
D-lyxose	-
D-tagatose	-
D-fucose	-
L-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Potassium gluconate	-
Potassium 2-ketogluconate	-
Potassium 5-ketogluconate	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria
 + = Positive reaction
 - = Negative reaction

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
 การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดลอกหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าการ วว.

ภาคผนวก 2

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

>B1_16S (1542 base pair)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAG
CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCG
GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCG
GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGTGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTGAGCACTCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGA
CAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA
GTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGGCAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG
CAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTC
GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
ATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
TGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAG
ATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGGCTGCATCACCTC
CTT

>B6_16S (1540 base pair)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACAAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAG
CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGT
CTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGC
GGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGC
GGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA
AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
ACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTT
AGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
ACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTT
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
CATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT
TTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACA
GATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGCATCACCT
CC

>BS_16S (1543 base pair)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAG
CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT
TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCG
GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGGCACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCG
GTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCCTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTAGGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTC
TGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTT
GTCGTGAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGAT
CTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCA
GTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAG
AGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGG
ACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGCATCA
CCTCC

ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้

Bacillus sp. B1

sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Link
CP002927.1	Bacillus amyloliquefaciens XH7, complete genome	2815	2.119e+04	100%	0.0	99%	
CP002634.1	Bacillus amyloliquefaciens LL3, complete genome	2815	1.964e+04	100%	0.0	99%	
CP002627.1	Bacillus amyloliquefaciens TA208, complete genome	2815	1.846e+04	100%	0.0	99%	
FN597644.1	Bacillus amyloliquefaciens DSM7 complete genome	2815	2.812e+04	100%	0.0	99%	
AB201122.1	Bacillus amyloliquefaciens gene for 16S rRNA, partial sequence, strain	2811	2811	100%	0.0	99%	
AB201121.1	Bacillus amyloliquefaciens gene for 16S rRNA, partial sequence, strain	2811	2811	100%	0.0	99%	
HE774679.1	Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum YAU B9601-Y2 complete g	2809	2.799e+04	100%	0.0	99%	
HE617159.1	Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum CAU B946 complete geno	2809	2.802e+04	100%	0.0	99%	
AY149473.2	Bacillus polyfermenticus 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosom	2809	2809	100%	0.0	99%	
EU266071.1	Bacillus subtilis strain ZJ06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2809	2809	100%	0.0	99%	
CP000560.1	Bacillus amyloliquefaciens FZB42, complete genome	2809	2.625e+04	100%	0.0	99%	
EF502020.1	Bacillus subtilis strain EDR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2809	2809	100%	0.0	99%	
HM034816.1	Bacillus subtilis strain DM-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2804	2804	100%	0.0	99%	
HM210636.1	Bacillus subtilis strain SWB8 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2804	2804	100%	0.0	99%	
AB501113.1	Bacillus subtilis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain:	2804	2804	100%	0.0	99%	
GQ395245.1	Bacillus subtilis strain Czk1(BRZ1) 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2804	2804	100%	0.0	99%	
EF176772.1	Bacillus amyloliquefaciens strain LSC04 16S ribosomal RNA gene, parti	2802	2802	99%	0.0	99%	
JF799962.1	Bacillus sp. K7SC-9A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2800	2800	99%	0.0	99%	
JF412546.1	Bacillus amyloliquefaciens strain TUL308 16S ribosomal RNA gene, par	2800	2800	99%	0.0	99%	
AB201123.1	Bacillus sp. HH-01 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: HH-01	2800	2800	99%	0.0	99%	
HM034817.1	Bacillus amyloliquefaciens strain DM-3 16S ribosomal RNA gene, partia	2798	2798	100%	0.0	99%	
GU258545.1	Bacillus subtilis strain Em7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2798	2798	100%	0.0	99%	
GQ395246.1	Bacillus subtilis strain BRZ4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2798	2798	100%	0.0	99%	
AL009126.3	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 complete genome	2798	2.777e+04	100%	0.0	99%	
EU373402.1	Bacillus sp. TPR06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2798	2798	100%	0.0	99%	
EU373378.1	Bacillus sp. TPL08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2798	2798	100%	0.0	99%	

Bacillus sp. 6B

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HE617159.1	Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum CAU B946 complete genome	2833	2.826e+04	100%	0.0	99%	
EF502020.1	Bacillus subtilis strain EDR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2833	2833	100%	0.0	99%	
HM034816.1	Bacillus subtilis strain DM-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2828	2828	100%	0.0	99%	
CP000560.1	Bacillus amyloliquefaciens FZB42, complete genome	2828	2.642e+04	100%	0.0	99%	
EF176772.1	Bacillus amyloliquefaciens strain LSC04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2826	2826	99%	0.0	99%	
AB201123.1	Bacillus sp. HH-01 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: HH-01	2824	2824	99%	0.0	99%	
HE774679.1	Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum YAU B9601-Y2 complete genome	2822	2.808e+04	100%	0.0	99%	
HM034817.1	Bacillus amyloliquefaciens strain DM-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
GU826160.1	Bacillus subtilis strain BL4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
GU258545.1	Bacillus subtilis strain Em7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
GQ395246.1	Bacillus subtilis strain BRZ4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
EU373402.1	Bacillus sp. TPR06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
EU373378.1	Bacillus sp. TPL08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
EU373340.1	Bacillus sp. HNR03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
AY149473.2	Bacillus polyfermenticus 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA gene	2822	2822	100%	0.0	99%	
EU266071.1	Bacillus subtilis strain ZJ06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
AF411118.1	Bacillus sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2822	2822	100%	0.0	99%	
DQ676957.1	Bacillus subtilis strain Jinran 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2820	2820	99%	0.0	99%	
AB232386.1	Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: B1144	2820	2820	99%	0.0	99%	
JF499655.1	Bacillus amyloliquefaciens strain scs 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2817	2817	100%	0.0	99%	
HM210636.1	Bacillus subtilis strain SWB8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2817	2817	100%	0.0	99%	
GQ395247.1	Bacillus subtilis strain BRZ6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2817	2817	100%	0.0	99%	
CP002927.1	Bacillus amyloliquefaciens XH7, complete genome	2811	2.117e+04	100%	0.0	99%	
CP002634.1	Bacillus amyloliquefaciens LL3, complete genome	2811	1.964e+04	100%	0.0	99%	
CP002627.1	Bacillus amyloliquefaciens TA208, complete genome	2811	1.845e+04	100%	0.0	99%	
HM583749.1	Bacillus sp. BS14(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2811	2811	100%	0.0	99%	

Bacillus sp. BS

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002906.1	Bacillus subtilis subsp. subtilis RO-NN-1, complete genome	2813	2.806e+04	100%	0.0	99%	
CP002468.1	Bacillus subtilis BSn5, complete genome	2813	2.810e+04	100%	0.0	99%	
AL009126.3	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 complete genome	2813	2.796e+04	100%	0.0	99%	
CP003492.1	Bacillus sp. JS, complete genome	2808	2.801e+04	100%	0.0	99%	
JQ435698.1	Bacillus subtilis strain CE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2808	2808	100%	0.0	99%	
JF412545.1	Bacillus subtilis strain TUL322 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2808	2808	100%	0.0	99%	
GU191916.1	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain SB 3130 16S ribosomal RNA gene	2808	2808	100%	0.0	99%	
GU191904.1	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain SB 3175 16S ribosomal RNA gene	2808	2808	100%	0.0	99%	
AB201120.1	Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: LB-01	2808	2808	100%	0.0	99%	
EU081774.1	Bacillus subtilis strain PY79 tRNA-Arg gene, partial sequence; tRNA-P	2808	2808	100%	0.0	99%	
AB188212.1	Bacillus sp. TUT1206 gene for 16S rRNA, partial sequence	2808	2808	100%	0.0	99%	
AB110598.1	Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial sequence	2808	2808	100%	0.0	99%	
AB177641.1	Bacillus subtilis gene for 16S ribosomal RNA, isolate: H20	2808	2808	99%	0.0	99%	
D26185.1	Bacillus subtilis gene, 180 kilobase region of replication origin	2808	1.120e+04	100%	0.0	99%	
EU567039.1	Uncultured Bacillus sp. clone TCCC 11073 16S ribosomal RNA gene, p	2806	2806	99%	0.0	99%	
EU231616.1	Bacillus subtilis strain TCCC17019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2804	2804	100%	0.0	99%	
AB042061.1	Bacillus subtilis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2802	2802	100%	0.0	99%	
JQ396173.2	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain KISR-1 16S ribosomal RNA gene,	2800	2800	99%	0.0	99%	
EU567055.1	Uncultured Bacillus sp. clone TCCC 11231 16S ribosomal RNA gene, p	2800	2800	99%	0.0	99%	
AB065370.1	Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, complete sequence	2800	2800	100%	0.0	99%	
EF522122.1	Bacillus sp. CU03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2798	2798	100%	0.0	99%	
EF423603.1	Bacillus subtilis strain BCRC 17443 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2798	2798	99%	0.0	99%	
CP002905.1	Bacillus subtilis subsp. spizizenii TU-B-10, complete genome	2796	2.794e+04	100%	0.0	99%	
HQ687501.1	Bacillus subtilis strain KJB06-35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2796	2796	100%	0.0	99%	
HM030757.1	Bacillus subtilis strain M16-10-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2796	2796	100%	0.0	99%	
FJ464987.1	Bacillus sp. DR13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2796	2796	100%	0.0	99%	

Preparation, characterization and release study of astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles

Kamontip Kuttiyawong¹, Santhana Nakapong², Kuakarun Krusong³, Jarunee Kaupiboon⁴, Prakarn Rudeekulthamrong⁵, Shuichiro Murakami⁶, Kazuo Ito⁷ and Piamsook Pongsawasdi³

¹Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart U, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand,

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng U, Bangkok, Thailand,

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn U, Bangkok, Thailand,

⁴Department of Preclinical Science (Biochemistry), Faculty of Medicine, Thammasat U, Pathumthani, Thailand,

⁵Department of Biochemistry, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand,

⁶Department of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture, Meiji Uy, Kawasaki, Japan,

⁷Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka City U, Osaka, Japan

Objectives

1. To prepare the astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles
2. To characterize the astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles
3. To release study of the astaxanthin from nanolevan particles

Results and Discussion

Levansucrase (EC 2.4.1.10) catalyzes the formation of levan from sucrose. Levan, which is a β -2,6-linked fructose homopolymer with some β -2,1-linked branching points has potential applications in the field of food, cosmetics, pharmaceutical and medicine based on its physical and biological properties. Levan is used as a tablet binder, an encapsulating agent, a coating material in drug delivery formulation. Astaxanthin is a natural pigment carotenoid, is endowed with remarkable antioxidant activity in food, drug and cosmetic products. However, the utilization of astaxanthin is limited due to its poor water-solubility, low bioavailability, and the decomposition under light, heat, and oxygen. In order to overcome these drawbacks, astaxanthin was encapsulated within nanolevan particles (ASTA-Nanolevan).

The astaxanthin encapsulated-levan nanoparticle was prepared using levan produced by purified levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens* KK9. Levansucrase produced high nanolevan particles in 10% ethanol. The encapsulation capacity of the particles at 50, 100, 150 and 200 ppm of astaxanthin were 97, 86, 90 and

85%, respectively, at a loading of 4% sucrose (w/v).

The astaxanthin encapsulated-levan nanoparticle was characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. Infrared spectra of astaxanthin encapsulated-levan nanoparticle were compared with levan and astaxanthin (figure 1). In the original spectra of levan shown the broad absorption band at 3288 cm^{-1} is O-H stretching of polyhydroxy group. And the band at 1036 and 1112 cm^{-1} are C-O-C stretching of glycosidic bond. After encapsulated astaxanthin in levan nanoparticles the sharp band at 1737 cm^{-1} is C=O stretching of acetyl group in astaxanthin molecule was found due to the encapsulation of astaxanthin in nanolevan particles, but the sharp band at 1574 cm^{-1} in nanolevan molecule was decrease in the spectra of astaxanthin encapsulated-levan nanoparticle due to the changes in the microenvironment which lead to the formation of hydrogen bonding and the presence of van der Waals forces during their interaction to form the encapsulated nanoparticles.

The astaxanthin encapsulated-levan nanoparticle was characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) (Figure 2). The size of levan nanoparticles and astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles were 80-100 nm and 180-200 nm, respectively. The astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles that were lyophilized and resuspended again were analyzed by Zetasizer. The result showed that the nanoparticles had the same shape of size

distribution as astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles (figure 3). In the addition, the absorption spectra of astaxanthin encapsulated-levan particles were compared to controls; levan, astaxanthin, and astaxanthin mixed with levan (physical mixture). Small shift are observed on the absorption spectra of astaxanthin encapsulated-levan particles (figure 4).

The release study of astaxanthin from nanolevan particles in solution pH 5.5, pH 1.2 and pH 6.8 that is simulate condition in skin, gastric and intestinal juices was investigated. The astaxanthin encapsulated-levan particles could release astaxanthin 31.63% in 1 hour at gastric juice condition. The antioxidant activities of the released astaxanthin from astaxanthin encapsulated-levan nanoparticle and free astaxanthin when dispersed in 3 conditions were measured by DPPH assay. The results found that the released astaxanthin from astaxanthin encapsulated-levan nanoparticle can maintain antioxidant activity has 39.45% while free astaxanthin loses its antioxidant activity.

Conclusion and Acknowledgement

The astaxanthin encapsulated-levan nanoparticles were successfully prepared, characterized and release studied of the astaxanthin from nanolevan particles.

This work was performed under the Core-to-Core Program (JSPS-NRCT). Financial supports from Thailand Research Fund, Kasetsart University, and the Thailand Research Fund: MRG5480232 are appreciated.

References

- (1) Li, M., M.R. Zahi., Q. Yuan., F. Tian and H. Liang. 2016. Preparation and Stability of Astaxanthin Solid Lipid Nanoparticles Based on Stearic Acid. *Eur. J. Lipid. Scie. Technol.* 118: 592–602.
- (2) Nakapong S., Pichyangkura R., Ito K, Iizuka M., Pongsawasdi P. .2013

High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 36-54:30

- (3) E.T. Öner., L. Hernandez. and J. Combie. 2016. Review of Levan Polysaccharide: from a Century of Past Experiences to Future Prospects. *Biotechnology Advances.* 34: 827–844.
- (4) Higuera, C.I., F.L. Valenzuela., and F. M. Goycoolea. 2006. Astaxanthin: A review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 185–196.
- (5) Tachaprutinun, A., T. Udomsup., C. Luadthong. and S. Wanichwecharungruang. 2009. Preventing the Thermal Degradation of Astaxanthin through Nanoencapsulation. *International Journal of Pharmaceutics.* 374: 119–124.

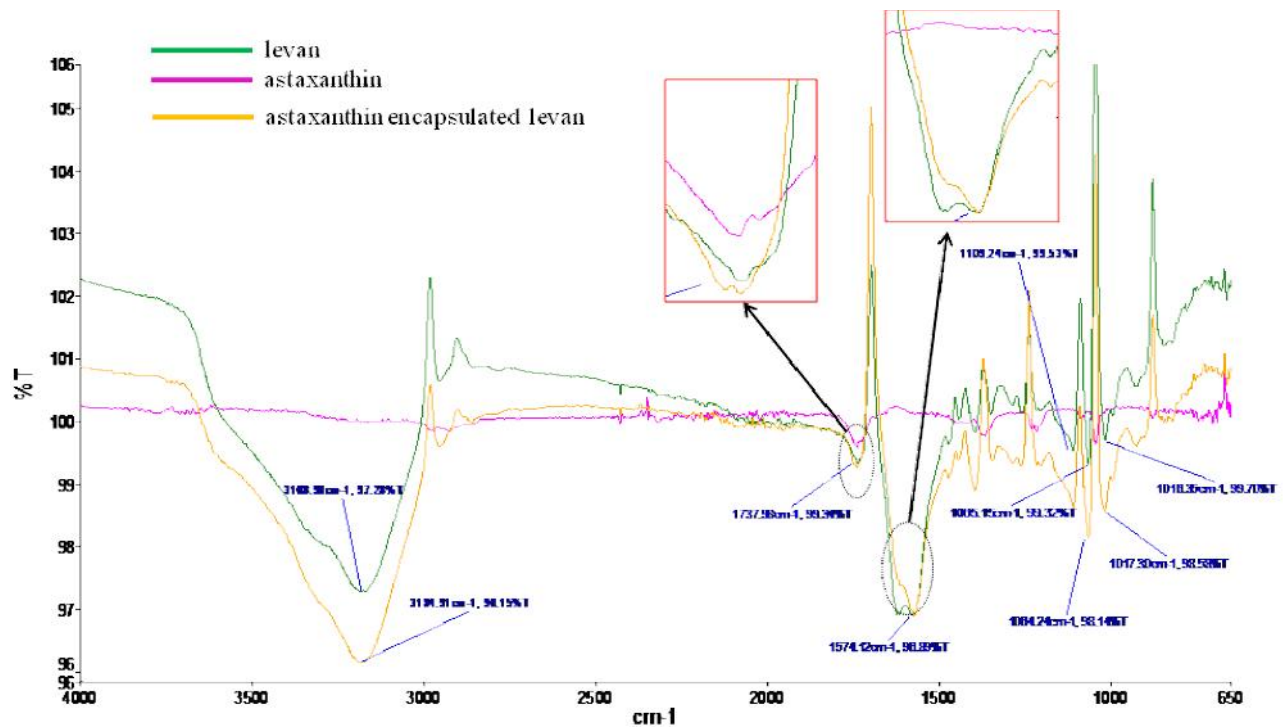
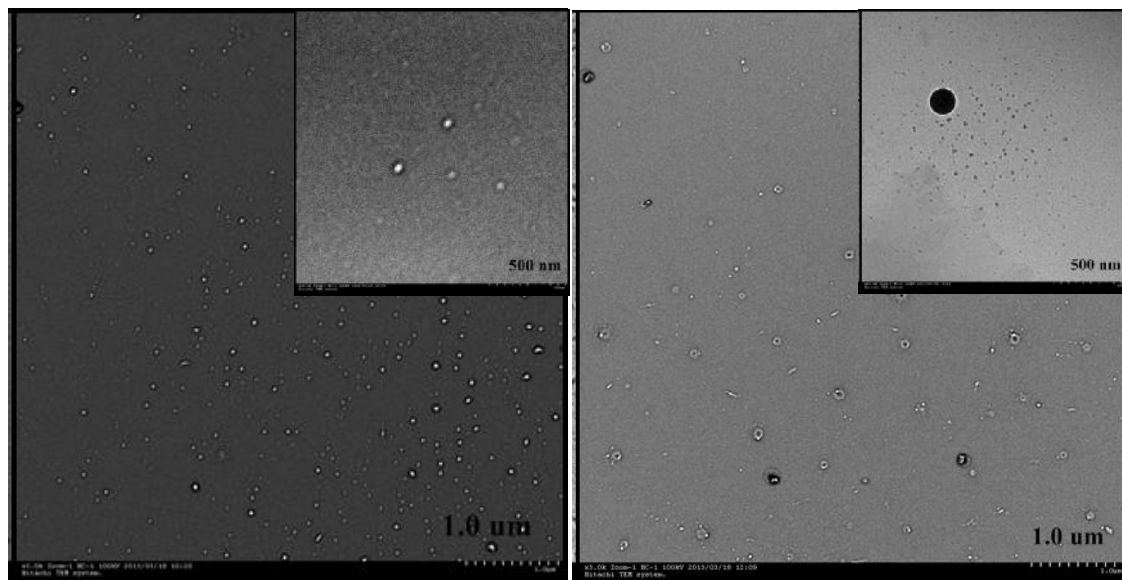


Figure 1 FTIR spectra of levan, astaxanthin and astaxanthin encapsulated-levan



(A)

(B)

Figure 2 Transmission electron micrograph of levan particles (A) and astaxanthin encapsulated-levan particles (B).

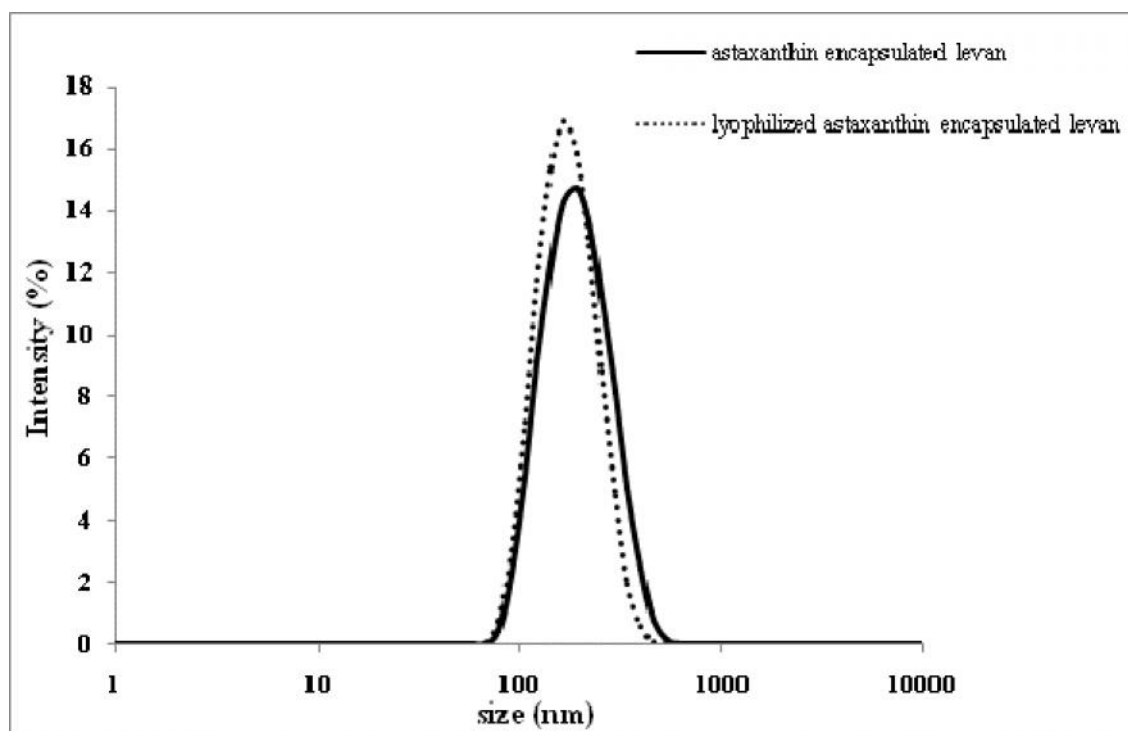


Figure 3 Particle size distribution of astaxanthin encapsulated-levan and lyophilized astaxanthin encapsulated-levan particles.

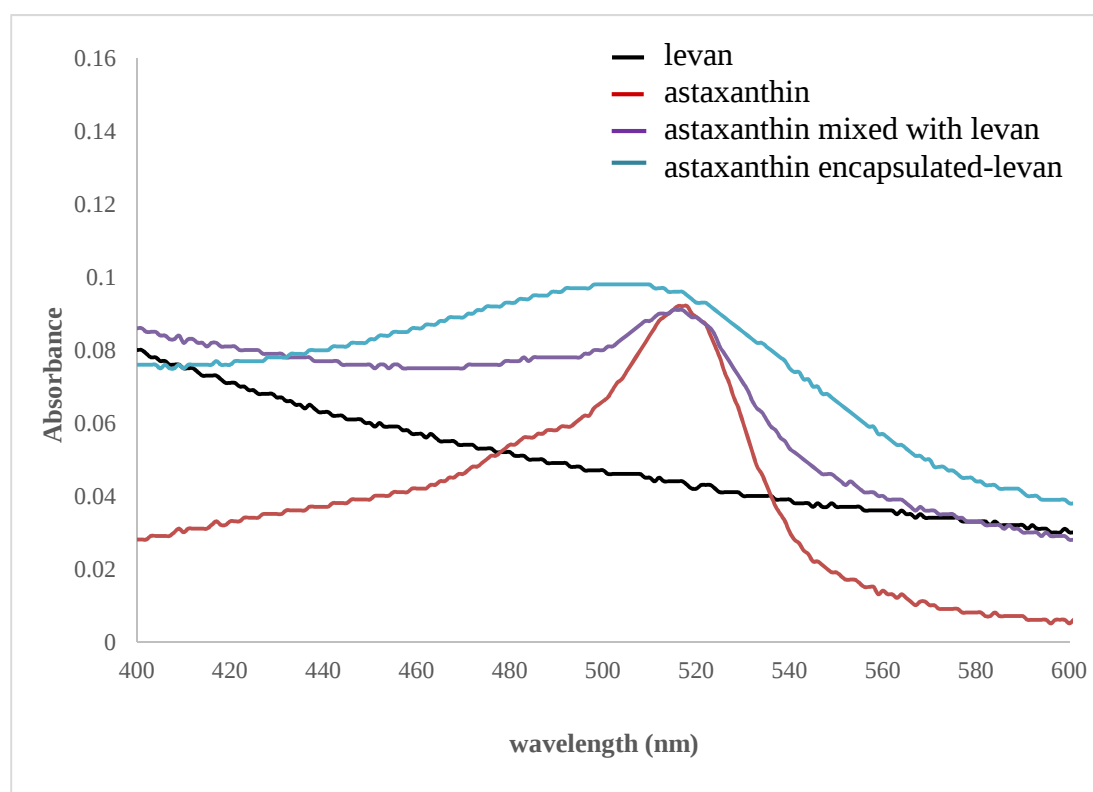


Figure 4 Absorption Spectrum of levan, astaxanthin, astaxanthin mixed with levan and astaxanthin encapsulated-levan particles.