รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืช และจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม

2. **โครงการวิจัย** : การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการย่อยแป้งเชิงพาณิชย์ (Production of recombinant alpha amylase and recombinant gluco amylase from microbial for using starch liquefaction in commercial)

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและการสกัดบริสุทธิ์

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : A study of an efficient carbon source for amylase production and purification

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางสาวภรณี สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบและยังเกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง ปัจจุบันนิยมผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเลี้ยงง่ายความต้องการอาหารไม่ซับซ้อน สะดวกในการเก็บเชื้อได้นานโดยไม่ต้องถ่ายเชื้อบ่อยและเป็นแหล่งเอนไซม์ที่มีปริมาณไม่จำกัด ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษากรรมวิธีผลิตและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์อะไมเลสจุลินทรีย์ โดยคำนึงถึงต้นทุนการผลิต ปริมาณและประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยโคลนยีนแอลฟาอะไมเลสเข้ากับ pQE80L เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟาอะไมเลสในเซลล์แบคทีเรีย ชักนำการหลั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีกิจกรรม (activity) การย่อยแป้งสูงกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรีย สามารถใช้ 1 mM

Lactose แทน IPTG กระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ ผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟาอะไมเลสขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน สกัดบริสุทธิ์ได้เอนไซม์ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 5 U/ml ที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและ pH 7.5 และที่สภาวะอุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส, pH7.5 ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งที่ใกล้เคียงกับที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมแป้งต่างๆ เนื่องจากในกระบวนการทำให้น้ำแป้งเหลว (liquefaction) นั้น จะต้องใช้เอนไซม์อะไมเลสช่วยย่อยแป้งในอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง

คำสำคัญ: แอลฟาอะไมเลส

Abstract

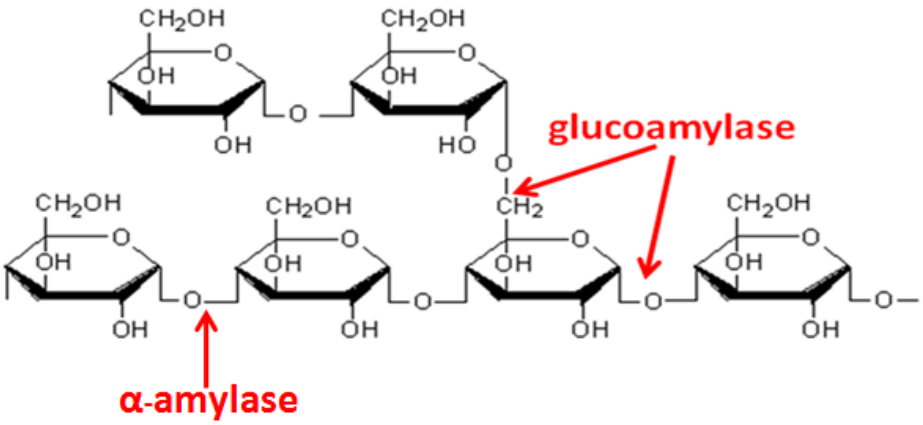
Amylases have potential application in a wide number of industrial processes, especially in ethanol industries from cassava. The recombinant protein technology is widely used for production of enzymes because ease of growth and manipulation using simple laboratory equipment and can generate potentially unlimited supplies of recombinant protein. In this study, Recombinant protein production and purification processes must be low cost to production, efficiency and yields of high-quality enzyme. The *alpha amylase* gene was cloned into a pQE80L expression vector. The optimum condition for the inducing enzyme expression was incubated at 30 degrees C and added 1 mM IPTG or use of 1 mM lactose instead of IPTG. The recombinant alpha amylase was allowed the production of 12.5 mg of purified recombinant proteins per liter of bacterial culture and had a molecular weight about 70 KDa. The recombinant alpha amylase showed a maximum activity about 5 U/ml at pH 7.5 and optimum temperature of 50 °C. Furthermore, the recombinant alpha amylase able to digest soluble starch at pH 7.5 and at a temperature range of 70° C to 90° C. It shows that the recombinant alpha amylase would be beneficial for industrial applications, especially in liquefying saccharification.

Key words: alpha amylase

5. คำนำ :

จากวิกฤตการณ์การขาดแคลนน้ำมันดิบ ทำให้เกิดความต้องการพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงประเภทต่างๆ เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ ลม น้ำ ไฮโดรเจนและชีวมวล โดยเฉพาะพลังงานทดแทนจากภาคการเกษตร สามารถนำปาล์มน้ำมันและสบู่ดำ ผลิตเป็นไบโอดีเซล อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่างและมันสำปะหลัง ผลิตเป็นเอทานอลเพื่อนำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน ผลิตเป็นแก๊สโซฮอล์ ประเทศไทยมีวัสดุที่มีศักยภาพผลิตเอทานอลหลายชนิด แต่จากการประเมินขั้นต้นพบว่าตามสภาพที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน ทั้งมันสำปะหลังและอ้อยมีความเหมาะสมมากกว่าพืชชนิดอื่นในการที่มีวัตถุดิบปริมาณมากพอสำหรับการผลิตอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ นอกจากนั้นประเทศไทยมีความพร้อมด้านความรู้ความเข้าใจรายละเอียดและเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง (อัมพร, 2537)

เอนไซม์ย่อยแป้งที่เกี่ยวข้องในขบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง จะเห็นว่ามี 2 ชนิดด้วยกัน คือ แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส โดยแอลฟาอะไมเลสจะตัดพันธะ α-1, 4 กลูโคซิดิก ระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ผลผลิตที่ได้คือ oligosaccharide และ α-limit-dextrin (ภาพที่ 1) ส่วนกลูโคอะไมเลสจะตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก ซึ่งการทำงานจะตัดโมเลกุลที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสอย่างเดียว (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตัดพันธะ α-1, 4 กลูโคซิดิกและการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตัดพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก

เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ โดยใช้เอนไซม์อะไมเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส เช่น ใช้เอนไซม์อะไมเลสร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรมขนมปังเพื่อทำให้เนื้อขนมปังฟูและลดระดับ

โปรตีนในแป้งขนมปัง และใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกชีวภาพเพื่อกำจัดคราบโปรตีนและคราบแป้งติดแน่นบนเนื้อผ้า สำหรับอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยที่มีการใช้เอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ อุตสาหกรรมการแปรรูปแป้งและผลิตไซรัป อุตสาหกรรมเบเกอรี่ และขนมปังกรอบ อุตสาหกรรมสารปรุงแต่งรสชาติอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มและนม และอุตสาหกรรมเครื่องดื่มและน้ำผลไม้ นอกจากนี้เอนไซม์อะไมเลส ยังเป็นเอนไซม์ย่อยแป้งที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังอีกด้วย

การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเลี้ยงง่าย ความต้องการอาหารไม่ซับซ้อน สะดวกในการเก็บเชื้อได้นานโดยไม่ต้องถ่ายเชื้อบ่อยและเป็นแหล่งเอนไซม์ที่มีปริมาณไม่จำกัด เช่น รายงานของ Khoo และคณะ (1994) ได้ผลิตรีคอมบิเนนท์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและรีคอมบิเนนท์เอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยโคลนยีนจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* ตามลำดับ เข้าสู่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งในยีสต์นี้จะมีความสามารถแสดงออกได้ทั้งสองเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ทั้งสองด้วย affinity chromatography และ gel filtration (Sephadex G-100) ได้เอนไซม์ขนาด 150 กิโลดาลตัน pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สกัดได้ คือ 6.0 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Wong และคณะ (2002) ทำการโคลนยีน barleyalpha-amylase เข้าสู่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และทดสอบแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์จะมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน จะทำให้การสังเคราะห์และการหลั่งของเอนไซม์

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ศึกษากรรมวิธีผลิตและแยกบริสุทธิ์เอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์ โดยคำนึงถึงต้นทุนการผลิต ปริมาณและประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้เพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

6. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. สารเคมีและเอนไซม์

1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองซื้อมาจากบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย

1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบทางชีวโมเลกุล

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermantas
- สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

1.3 เอนไซม์

- Fast digest Sap I (Fermantas, USA)
- T4 ligase (Fermantas, USA)
- GoTaq polymerase (Promega, USA)

2. จุลินทรีย์ พลาสมิด และอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 แบคทีเรียและยีสต์

- แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α
- ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc
- ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SP90

2.2 พลาสมิด

- พลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (pDAAMY) จากงานวิจัยก่อนหน้า
- พลาสมิดลูกผสมของยีนกลูโคอะไมเลส (pDGAMY) จากงานวิจัยก่อนหน้า
- พลาสมิด pGAPZαA
- พลาสมิด pQE80L

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

- อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 2xYT (Himedia, India)
- อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ YPD (Himedia, India)
- อาหารคัดเลือกยีสต์ minimal SD-U (Clontech, USA)

3. เครื่องมือ

3.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems)

3.2 อุปกรณ์การอ่านภาพและบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์

3.3 เครื่อง Spectophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)

3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ควบคุมอุณหภูมิ

3.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.6 ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร

- วิธีการ

1. การนำพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสเข้าสู่เซลล์ยีสต์โดยวิธี LiAc/single-stranded carrier DNA/PEG method

เลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส เจือจางยีสต์ให้ได้ค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.4 ในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่ออีก 2-4 ชั่วโมง จากนั้นแยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1X TE (10 mM Tris,pH 7.5; 1 mM EDTA) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ละลายเซลล์ด้วย 1 XLiAC/0.5XTE (100 mM Lithium Acetate, pH 7.5; 5 mM Tris,pH 7.5; 0 .5 mM EDTA) บ่ ม ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติมพลาสมิดลูกผสม (ข้อ 1, 2) 1 ไมโครกรัม denatured salmon sperm DNA 100 ไมโครกรัม และ 1XLiAC/40% PEG3350/1X TE (100 mM Lithium Acetate, pH 7.5; 40% PEG3350; 10 mM Tris,pH 7.5; 1 mM EDTA) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยยีสต์ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 88 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1X TE ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1X TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำเชื้อไปเกลี่ยบนอาหาร SC-U ที่ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร ตรวจสอบขนาดของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดด้วย colony PCR วิเคราะห์ขนาดด้วย 0.8 % agarose gel

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์ โดยนำยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม เลี้ยงบนอาหารแข็ง YPC (อาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ ของแป้ง) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน หลังจากนั้นนำสารละลายไอโอดีน เทลงบนอาหารแข็ง บ่มที่มืด นาน 15 นาที เทสารละลายไอโอดีนออก สังเกตวงใสรอบโคโลนีของยีสต์

2. การเชื่อมต่อยีนแอลฟาอะไมเลสเข้ากับเวคเตอร์ของแบคทีเรียและตรวจสอบการแสดงออกของยีน

2.1 การสังเคราะห์และเชื่อมต่อยีนแอลฟาอะไมเลส (AAMY) เข้ากับเวคเตอร์ pQE80L

เพิ่มปริมาณยีน AAMY ด้วยเทคนิค PCR ทำโดยใช้พลาสมิดลูกผสม pDAAMY (พลาสมิดลูกผสมเพื่อถ่ายฝากเข้ายีสต์) เป็นแม่แบบในส่วนผสมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย pDAAMY 1 ไมโครกรัม, 1X GoTaq® Colorless Master Mix *(Promega, USA)* และไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์(ประกอบด้วย Falpa-

Bam (5' - TTT GGA TCC ATG TTT GCA AAA CGA TTC AAA ACC TCT TTA CTG - 3') 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Ralpa-Hind (5' - TTT AAG CTT TCA ATG GGG AAG AGA ACC GCT TAA GCC CGA GTC - 3') 0.2 ไมโครโมลาร์), จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และสกัดบริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Kit (Fermentas, USA)

นำผลผลิตจาก PCR และเวคเตอร์ pQE80L ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Hind* III ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยยีน AAMY 20 นาโนกรัม, 1X Fast Digest buffer และ 1 ไมโครลิตร Fast Digest *Bam* HI และ *Hind* III บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และนำยีน AAMY และเวคเตอร์ pQE80L ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Hind* III แล้ว มาเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตรประกอบด้วยยีน AAMY ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Hind* III 10 นาโนกรัม, เวคเตอร์ pQE80L 10 นาโนกรัม, 1x Rapid Ligation Buffer, 5 ยูนิต T4 DNA ligase (Thermo Scientific, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation เริ่มจากการนำแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอ (competent cell) แช่ในน้ำแข็งจนกระทั่งละลายประมาณ 2 ใน 3 ส่วน เติมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้วจำนวน 5 ไมโครลิตร ผสมลงในสารแขวนลอยแบคทีเรีย บ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหาร LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ปั่นตกตะกอนแล้วทิ้งส่วนน้ำใส 700 ไมโครลิตร ละลายเชื้อแบคทีเรีย นำไปเกลี่ยบนอาหาร LB ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของยีน AAMY ที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดโดยเทคนิค colony PCR ทำโดยใช้โคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร เป็นแม่แบบในส่วนผสมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X GoTaq® Colorless Master Mix *(Promega, USA)*, ไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์(ประกอบด้วย Falpa-Bam 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Ralpa-Hind 0.2 ไมโครโมลาร์) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศา

เซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้งจาก มันสำปะหลัง

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิดลูกผสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว LB ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญมีค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 เติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 6-8 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย purification buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) ในอัตราส่วนบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตรต่อตะกอนเซลล์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตร เติม lysozyme ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มบนน้ำแข็ง นาน 30 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze-thaw แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใส (crude extract) ที่มีเอนไซม์แอลฟลาอะไมเลส หยอดลงในอาหารแข็งที่มี 1% แป้ง ตรวจสอบการย่อยแป้งโดยโดยเติมสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร

2.3 การสกัดรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสค่อนข้างบริสุทธิ์

นำ crude extract ที่สกัดได้จากข้อ 2.1 มาผ่านคอลัมน์ nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตรเติม Elution Buffer (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0) เพื่อชะ (elute) เอนไซม์อะไมเลสออกจากคอลัมน์ แล้วนำไปหาค่าความเข้มข้นโปรตีนด้วยการวัดค่า OD_{280} และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์อะไมเลสด้วยวิธี SDS-PAGE ใน 8 เปอร์เซ็นต์ อะคลีลาไมด์เจล

2.4 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

นำสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากข้อ 2.3 วางแผนการทดลองแบบ 4×4 Factorial in CRD จำนวน 7 ซ้ำ ประกอบด้วย ปัจจัยหลัก คือ อุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้แก่ 30 50 70 และ 90 องศาเซลเซียส และ ปัจจัยรอง คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้แก่ 4.5 5.5 6.5 และ 7.5

วัดกิจกรรมของอะไมเลสด้วยวิธี microplate-based starch–iodine assay (Xiao *et al*., 2005) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยนำน้ำแป้ง (2.0 g/L) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเอนไซม์อะไมเลสที่ละลายใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ลง

ใน microplate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M HCl ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา เติม iodine reagent (5 mM I_2, 5 mM KI) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแป้ง

บันทึกผล กิจกรรมของเอนไซม์ต่อการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (U/ml)} = \frac{\text{(A580 control - A580 sample)}}{\text{A580/mg starch} \times 30 \text{ min} \times 0.04 \text{ ml}}$$

A580 control คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตรของน้ำแป้งที่ไม่ได้เติมเอนไซม์
A580 sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตรของน้ำแป้งที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์
A580/mg starch คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตรของน้ำแป้งที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน
30 min คือ เวลาที่ใช้ในการย่อยของเอนไซม์
0.04 ml คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้

- เวลาและสถานที่

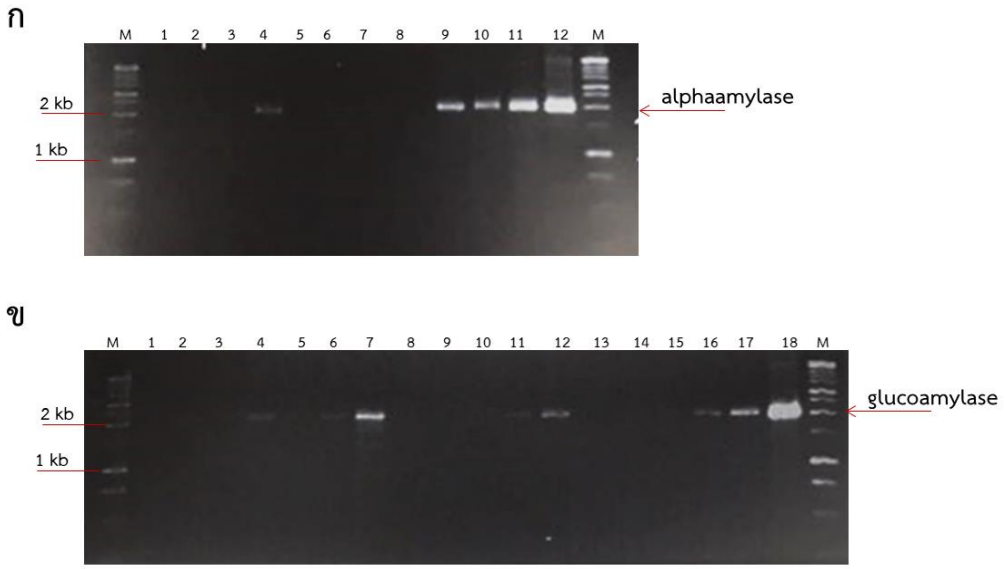
ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2562

ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จ.ปทุมธานี

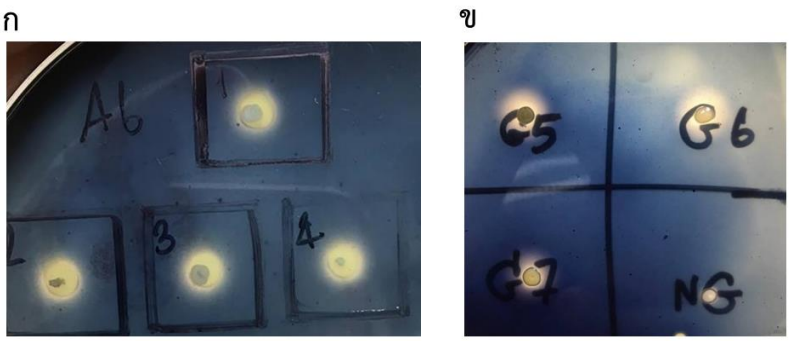
7.ผลการทดลองและวิจารณ์

เนื่องจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสจากงานวิจัยก่อนหน้ามีการสูญหายออกจากเซลล์ จึงดำเนินการถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสมของทั้งสองยีนอีกครั้ง โดยนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนกลูโคอะไมเลสและยีนแอลฟาอะไมเลส ถ่ายฝากเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 ด้วยวิธี LiAc/single-stranded carrier DNA/PEG method ตรวจสอบขนาดของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสด้วยเทคนิค colony PCR พบว่าคัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนของแอลฟาอะไมเลส จำนวน 4 โคลน ส่วนยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนกลูโคอะไมเลส จำนวน 7 โคลน (ภาพที่ 2) จึงนำยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ เลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD เพื่อเก็บไว้เป็น master plate และอีกส่วนเลี้ยงในอาหารแข็ง YPC (อาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้ง) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อย

แป้งของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน หลังจากนั้นนำสารละลายไอโอดีนเทลงบนอาหารแข็งให้ทั่ว บริเวณที่ไม่มีการย่อยแป้งจะเกิดปฏิกิริยาการจับกันของโมเลกุลของแป้งและสารละลายไอโอดีน จะเห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนบริเวณที่มีการย่อยแป้งของเอนไซม์จะเห็นเป็นวงใสๆรอบโคโลนีของยีสต์ จากการทดลองพบว่าเกิดวงใสรอบยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (ภาพที่ 3ก) และยีนกลูโคอะไมเลส ในขณะที่ไม่เกิดวงใสบริเวณเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc (ภาพที่ 3ข) ซึ่งไม่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส แสดงว่ายีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสมีการแสดงออกของเอนไซม์อะไมเลส



ภาพที่ 2 การตรวจสอบการแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลส (ก) และยีนกลูโคอะไมเลส (ข) ในยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก SC-U



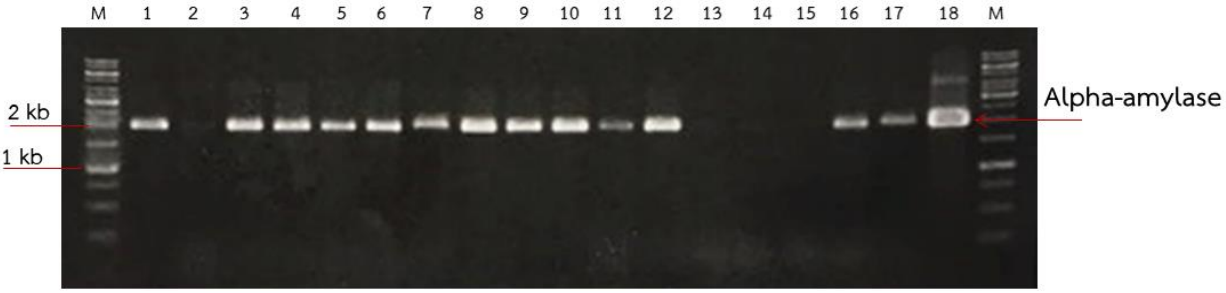
ภาพที่ 3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส (ก) และกลูโคอะไมเลส (ข) ในยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc บนอาหารแข็ง YPC ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้ง

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำโคลนของยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมจาก master plate มาตรวจสอบการย่อยแป้งอีกครั้ง พบว่า ไม่เกิดวงใสรอบยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม จึงตรวจสอบยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสด้วยเทคนิค PCR พบว่า ไม่มียีนดังกล่าวในยีสต์ ซึ่งอาจเกิดการสูญหายของพลาสมิดจากการแบ่งเซลล์ พลาสมิดของยีสต์จะมีจำนวน 10-40 สำเนาต่อเซลล์ และแต่ละครั้งของการแบ่งเซลล์ของยีสต์จะมีความถี่ในการสูญหายของพลาสมิด 1-5 เปอร์เซ็นต์ บางกรณีอาจสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ได้ (Karim *et al.,* 2013; Gnügge *et al.,* 2016) อีกประการหนึ่งสาเหตุการสูญหายของพลาสมิดในยีสต์ เนื่องจากพลาสมิดที่อยู่ในยีสต์ มักอยู่รวมตัวกัน ไม่กระจายตัวอยู่ในเซลล์ (Scott-Drew and Murray, 1998; Velmurugan *et al*., 2000) ดังนั้นเมื่อยีสต์ *S. cerevisiae* มีการแบ่งเซลล์ด้วยวิธี budding ซึ่งเป็นการถ่ายทอดลักษณะที่ไม่สมมาตร (asymmetrical inheritance) จึงทำให้เซลล์ใหม่บางเซลล์ไม่มีพลาสมิดอยู่ (Spokoini *et al*., 2012) นอกจากนี้การถ่ายทอดลักษณะนี้ทำให้เกิดความไม่สมมาตรของโปรตีนระหว่างเซลล์ใหม่และเซลล์เก่า ซึ่งอาจมีการสะสมของโปรตีนที่มากเกินไป จนเป็นพิษทำให้เซลล์ตายได้ (Erjavec and Nystrom, 2007)

การเชื่อมต่อยีนแอลฟาอะไมเลสเข้ากับเวคเตอร์ของแบคทีเรียและตรวจสอบการแสดงออกของยีน

จึงทำการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลสเพื่อนำเข้าเวคเตอร์ของแบคทีเรีย (expression vector) ส่วนยีนกลูโคอะไมเลสเป็นยีนที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* เอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งได้ ต้องมีการปรับแต่งโปรตีนด้วยการเติมโมเลกุลคาร์โบไฮเดรต (O-glycosylation) โดยจะช่วยขยายส่วน peptide backbone และรักษาระยะห่างระหว่างโดเมน catalytic และ starch-binding ให้คงที่ (Williamson et al., 1992) การเติมโมเลกุลคาร์โบไฮเดรต (O-glycosylation) มักเกิดขึ้นในระบบของสิ่งมีชีวิตจำพวก eukaryote ในบริเวณกอลจิคอมเพล็กซ์ (Golgi apparatus) (Flynne, 2008) ดังนั้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจึงไม่เหมาะสำหรับการผลิตจากระบบของแบคทีเรีย

เพิ่มปริมาณยีนแอลฟาอะไมเลส ที่มีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำยีนแอลฟาอะไมเลสทำบริสุทธิ์และย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แทรกเข้ากับพลาสมิด pQE80L และนำเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลสในพลาสมิด ด้วย colony PCR พบว่ามี PCR product ของยีน มีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับยีนแอลฟาอะไมเลส แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลส จำนวน 13 โคลน (ภาพที่ 4) จึงเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB เพื่อเก็บไว้เป็น master plate



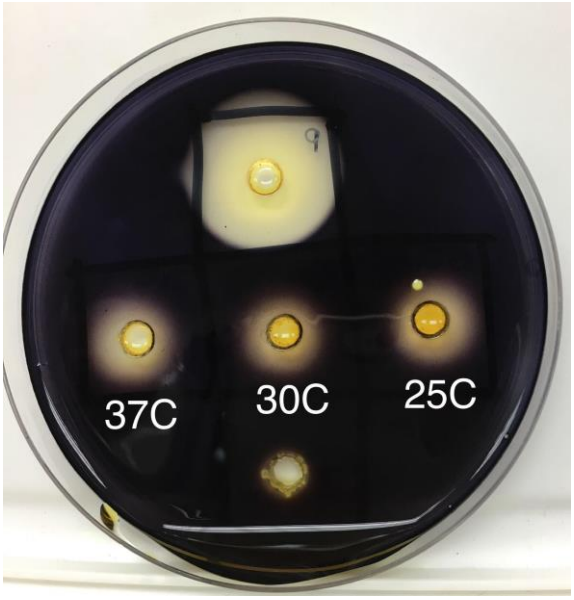
ภาพที่ 4 การตรวจสอบการแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลส ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

นำ crude extract จากแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม ที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ หยอดบนอาหารแข็ง LB (อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย LB ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้ง) บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หลังจากนั้นนำสารละลายไอโอดีนเทลงบนอาหารแข็งให้ทั่ว บริเวณที่ไม่มีการย่อยแป้งจะเกิดปฏิกิริยาการจับกันของโมเลกุลของแป้งและสารละลายไอโอดีน จะเห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนบริเวณที่มีการย่อยแป้งของเอนไซม์จะเห็นเป็นวงใสๆรอบหลุมของเอนไซม์จากการทดลองพบว่าเกิดวงใสรอบหลุมขของ crude extract จากแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส ซึ่งเหมือนกับวงใสบริเวณรอบเอนไซม์อะไมเลสทางการค้า ในขณะที่ไม่เกิดวงใสบริเวณ crude extract จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งไม่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (ภาพที่ 5) เมื่อวิเคราะห์ผลจากข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 1) พบว่า ค่าเฉลี่ยของบริเวณวงใสที่มีการย่อยแป้งของอุณหภูมิที่ใช้ชักนำให้เอนไซม์อะไมเลสมีการแสดงออกของยีนที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 1.30 1.46 และ 1.21 ตามลำดับ นั่นแสดงว่าเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่มีกิจกรรม (activity) การย่อยแป้งสูงกว่าการชักนำที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับรายงาน

ของ Dragosits *et al*. (2000) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตฟาจแอนติบอดี (phage antibody) ในเจ้าบ้านต่างๆ พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* และชักนำการแสดงออกของฟาจแอนติบอดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตฟาจแอนติบอดีที่อยู่ในรูปที่ละลายได้ (soluble protein) สูงมากกว่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเกิดจาการเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่ต่ำ จะเพิ่มการหลั่งของ recombinant protein ออกนอกเซลล์ได้มากขึ้น (Rinas and Hoffmann, 2004)

และจากการทดลองใช้สาร Lactose ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 mM เปรียบเทียบกับการใช้สาร IPTG 1 mM ชักนำให้แบคทีเรียผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลส เมื่อวิเคราะห์ผลจากข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 2) พบว่า การใช้สาร Lactose ความเข้มข้น 1 mM มีค่าเฉลี่ยของบริเวณวงใสที่มีการย่อยแป้งใกล้เคียงกับการใช้สาร IPTG 1 mM (ภาพที่ 6) แสดงว่า ในการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียสามารถใช้ 1 mMLactose กระตุ้นการแสดงออกของยีนอะไมเลสได้ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตโปรตีนในระดับ large scale ได้



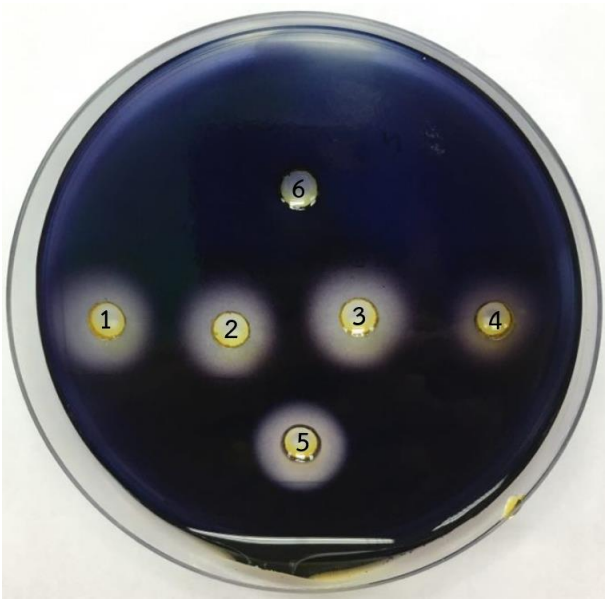
ภาพที่ 5 การย่อยแป้งของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ชักนำให้มีการแสดงออกของยีนที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้ง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของบริเวณวงใสที่มีการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลสที่กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่ใช้ชักนำให้เอนไซม์อะไมเลสมีการแสดงออกของยีน (^{0}C)	ค่าเฉลี่ยของบริเวณวงใสที่มีการย่อยแป้ง (cm)
25	1.30a[1/]
30	1.46b
37	1.21c
F test	**
C.V. (%)	5.69

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 6 การย่อยแป้งของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ชักนำให้มีการแสดงออกของยีนด้วย 1 mM IPTG, 1, 3 และ 5 mM lactose (หลุม 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ) เทียบกับเอนไซม์อะไมเลสทางการค้า (หลุม 5) และ crude extract จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5**α** (หลุม 6) บนอาหารแข็งที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้ง

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของบริเวณวงใสที่มีการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลสที่กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย 1 mM IPTG, 1, 3 และ 5 mM lactose

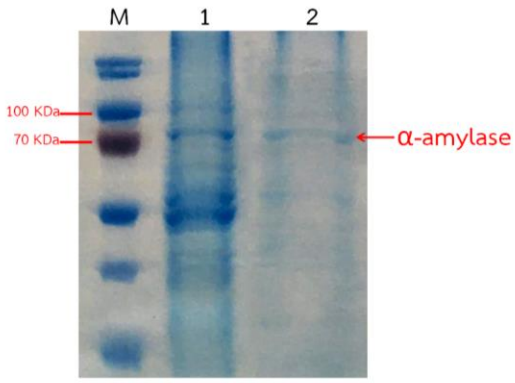
สารที่ใช้ชักนำให้เอนไซม์อะไมเลสมีการแสดงออกของยีน	ค่าเฉลี่ยของบริเวณวงใสที่มีการย่อยแป้ง (cm)
1 mM IPTG	1.63a[1/]
1 mM Lactose	1.61a
3 mM Lactose	1.57b
5 mM Lactose	1.51c
F test	**
C.V. (%)	3.02

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การสกัดรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสค่อนข้างบริสุทธิ์

การสกัดรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสให้บริสุทธิ์ทำโดยอาศัยคุณสมบัติการเป็น Histidine tagged protein เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ Ni-NTA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 7) ซึ่งมีความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสที่วัดด้วยวิธี Bradford assay ได้โปรตีนความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัม จากอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น 1 ลิตร



ภาพที่ 7 ขนาดของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสที่สกัดให้ค่อนข้างบริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ได้โปรตีนขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน (lane 2) เปรียบเทียบกับโปรตีนจากเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่ไม่ผ่านคอลัมน์ Ni-NTA (lane 1) วิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE

ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

จากการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 30 50 70 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์อะไมเลสไม่สามารถย่อยแป้งได้ จึงไม่นำข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติ และผลการวิเคราะห์ข้อมูลตามตารางที่ 3 และ 4 พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำแป้ง มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งสูงที่สุด เท่ากับ 4.65 U/ml รองลงมาคือ อุณหภูมิที่ 70 และ 90 องศาเซลเซียส มีค่าค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง เท่ากับ 3.22 และ 2.59 U/ ml ตามลำดับ และค่าเป็นกรด-ด่างของน้ำแป้งที่ pH 7.5 มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งสูงที่สุด เท่ากับ 4.31 U/ml รองลงมาคือ ค่าเป็นกรด-ด่างของน้ำแป้งที่ pH 4.5, 5.5 และ 6.5 มีค่าค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง เท่ากับ 3.85, 311 และ 2.67 U/ ml ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่าวิเคราะหความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแป้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้ง

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean Square	F
Total	83	153.36		
Treatments	11	143.72	130.65	97.62**
Temperature (T)	2	62.10	31.05	231.99**
pH (P)	3	33.92	11.30	84.48**
T x P	6	47.69	7.94	59.39**
Error	72	9.63	0.13	

CV = 10.49 %

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้งที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแป้ง

อุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (T)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแป้ง (P)				T-mean
	4.5	**5.5**	**6.5**	**7.5**	
50	5.72	5.42	3.40	5.67	4.65
70	3.97	3.79	1.36	3.76	3.22
90	1.86	1.74	3.25	3.50	2.59
P-mean	3.85	3.11	2.67	4.31	

เมื่อนำข้อมูลของอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส วิเคราะห์ทางสถิติแบบ CRD (ตารางที่ 5) พบว่า ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งสูงที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง อยู่ในช่วง 3.40-5.72 U/ml ที่อุณหภูมิ 70 มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง อยู่ในช่วง 1.36-3.97 U/ml และ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง อยู่ในช่วง 1.74-3.50 U/ml

เมื่อนำข้อมูลของค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำแป้งที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส วิเคราะห์ทางสถิติแบบ CRD (ตารางที่ 6) พบว่า ให้ผลที่สอดคล้องกันเช่นเดียวกัน โดยพบว่า น้ำแป้งมันสำปะหลังที่ pH 7.5 มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง อยู่ในช่วง 3.50-5.67 U/ml ของทุกอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา รองลงมาคือ น้ำแป้งมันสำปะหลังที่ pH 4.5 มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง อยู่ในช่วง 1.86-5.72 U/ml และน้ำแป้งมันสำปะหลังที่ pH 5.5 มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งสูงอยู่ในช่วง 1.74-5.42 U/ml ส่วนน้ำแป้งมันสำปะหลังที่ pH 6.5 มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งค่อนข้างต่ำ อยู่ในช่วง 1.36-3.40 U/ml

เอนไซม์อะไมเลสที่ใช้ในการทดลองได้นี้ เป็นรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้จากยีนอะไมเลสของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท D1-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสภาวะเป็นกลาง (pH 7.5) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Souza and Magalhães (2010) รายงานว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้และมีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท มีสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมตั้งแต่ 33-135 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0-10.0

นอกจากนี้ที่สภาวะ pH 7.5 อุณหภูมิที่ 70 และ 90 องศาเซลเซียส ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งที่ใกล้เคียงกับสภาวะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมแป้งต่างๆ เนื่องจากในการทำให้น้ำแป้งเหลว (liquefaction)จะต้องใช้เอนไซม์อะไมเลสช่วยย่อยแป้งในอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง

ตารางที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้ง

ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแป้ง	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง (U/ml)		
	50 ^{0}C	70 ^{0}C	90 ^{0}C
pH 4.5	5.72a[1/]	3.97a[1/]	1.86b[1/]
pH 5.5	5.42a	3.79a	1.74b
pH 6.5	3.40b	1.36b	3.25a
pH 7.5	5.67a	3.76a	3.50a
F test	**	**	**
C.V. (%)	7.65	7.58	17.03

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายแป้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยแป้ง

อุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (^{0}C)	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง (U/ml)			
	pH 4.5	pH 5.5	pH 6.5	pH 7.5
50	5.72a[1/]	5.42a[1/]	3.40a[1/]	5.67a[1/]
70	3.97b	3.79bc	1.36b	3.76b
90	1.86c	1.74c	3.25a	3.50b
F test	**	**	**	**
C.V. (%)	4.12	5.68	19.04	10.64

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

8. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

การถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสมที่มียีนแอลฟาอะไมเลสและพลาสมิดลูกผสมที่มียีนกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ โดยใช้พลาสมิดประเภท Yeast Replicative plasmid พบว่า พลาสมิดที่อยู่ในยีสต์จะไม่เสถียร (unstable) ค่อนข้างสูง และมีการสูญหายของพลาสมิดลูกผสมออกจากเซลล์ของยีสต์ ดังนั้นในการนำยีนแอลฟาอะไมเลสและพลาสมิดลูกผสมที่มียีนกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ ควรใช้พลาสมิดประเภท yeast integrative plasmid หรือ yeast episomal plasmid ซึ่งเป็นลักษณะที่จะแทรกยีนเป้าหมายเข้าไปในโครโมโซมของยีสต์ จะมีจำนวน 10-40 สำเนาต่อเซลล์ และเมื่อแบ่งตัวของยีสต์จะมีความถี่ในการสูญหายของพลาสมิดน้อยกว่าพลาสมิดประเภทแรก

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสไม่เหมาะสำหรับการผลิตในระบบแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นยีนที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นเซลล์แบบยูคารีโอท (Eukaryotic cell) จึงทำการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลสเพื่อนำเข้าเวคเตอร์ของแบคทีเรีย (expression vector) และสกัดรีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสค่อนข้างบริสุทธิ์ มีปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเซลล์แบคทีเรีย 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 5 U/ml ที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและ pH 7.5 การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียใช้สาร IPTG ในการกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอนไซม์ขึ้น หากต้องการผลิตในปริมาณมาก สามารถใช้ Lactose ซึ่งมีราคาถูกกว่า กระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้เช่นกัน ซึ่งจะทำให้ลดต้นทุนของการผลิตเอนไซม์ได้

รีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสจากการทดลองนี้ มาจากยีนอะไมเลสของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ไอโซเลท D1-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, pH7.5 และที่สภาวะอุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส, pH7.5 ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งที่ใกล้เคียงกับที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมแป้งต่างๆ เนื่องจากในกระบวนการทำให้น้ำแป้งเหลว (liquefaction) นั้น จะต้องใช้เอนไซม์อะไมเลสช่วยย่อยแป้งในอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง

9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

จากผลการทดลองพบกว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตขึ้น สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ สภาวะกลาง (pH 7.5) ในทุกอุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ 50 70 และ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการทำน้ำแป้งเหลว (liquefaction) ได้

10.คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คุณวัชรินทร์ ศรีประยูร ผู้มีส่วนช่วยดำเนินการทดสอบให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

11.เอกสารอ้างอิง :

อัมพร ยังโหมด. 2537. สถานการณ์การผลิตมันสำปะหลัง, น.193-205. ใน มันสำปะหลัง (สถาบันวิจัยพืชไร่) กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ ฯ.

Dragosits, M., G. Frascotti, L. Bernard-Granger, F. Vázquez, M. Giuliani, K. Baumann, ... and D. Mattanovich. 2010. Influence of growth temperature on the production of antibody Fab fragments in different microbes: A host comparative analysis. Biotechnology Progress, 27(1), 38–46.

Erjavec, N. and T. Nystrom. 2007. *Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of Saccharomyces cerevisiae. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(26), 10877–10881.*

Flynne, W. G. 2008. *Biotechnology and Bioengineering*. Nova Publishers. pp. 45

Gnügge, R., T. Liphardt,F. and Rudolf. 2016. A shuttle vector series for precise genetic engineering of Saccharomyces cerevisiae. Yeast. 33(3): 83-98.

Karim, A. S., K. A. Curran and H. S. Alper. 2013. Characterization of plasmid burden and copy number in Saccharomyces cerevisiae for optimization of metabolic engineering applications. FEMS Yeast Res 13(1): 107-16.

Khoo, S. L., A. A. Amirul, M. Kamaruzaman, N. Nazalan and M. N. Azizan. 1994. Purification and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus flavus*. Folia Microbiol (Praha);39:392–398.

Rinas U and F. Hoffmann. 2004. Selective Leakage of Host-Cell Proteins during High-Cell-Density Cultivation of Recombinant and Non-recombinant Escherichia coli. Biotechnology Progress 20(3):679-87

Scott-Drew, S. and J. A. Murray. 1998. Localisation and interaction of the protein components of the yeast 2 mu circle plasmid partitioning system suggest a mechanism for plasmid inheritance. J. Cell Sci. 111: 1779-89.

Souza, P. M. and P. O. Magalhães. 2010. Application of microbial α-amylase in industry – A review. Braz J Microbiol. 41(4): 850–861.

Spokoini, R., Moldavski, O., Nahmias, Y., England, J. L., Schuldiner, M., & Kaganovich, D. (2012). *Confinement to Organelle-Associated Inclusion Structures Mediates Asymmetric Inheritance of Aggregated Protein in Budding Yeast. Cell Reports, 2(4), 738–747.*

Velmurugan, S., X. M. Yang, C. S. Chan, M. Dobson and M. Jayaram. 2000. Partitioning of the 2-microm circle plasmid of Saccharomyces cerevisiae. Functional coordination with chromosome segregation and plasmid-encoded rep protein distribution. J. Cell Biol.149(3): 553-66.

Williamson, G., N. J. Belshaw and M. P. Williamson. 1992. O-glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase. Conformation and role in binding. Biochem J. 282(Pt 2): 423–428

Wong, D. W., S. B.Batt, C. C. Lee and G. H. Robertson. 2002. Increased expression and secretion of recombinant alpha-amylase in *Saccharomyces cerevisiae* by using glycerol as the carbon source. Journal of *Protein Chemistry*.21(6): 419-25.

Xiao, Z., Z., R. Storms and A. Tsang. 2005. Microplate-based carboxymethyl-cellulose assay for endoglucanase activity. Anal. Biochem. 342:176–178.