1. **แผนงานวิจัย** : อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน

2. **โครงการวิจัย** : การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์

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

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Production of Recombinant Alpha-amylase and Glucoamylase in Yeast

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวภรณี สว่างศรี	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ** :

เอนไซม์ย่อยแป้งที่เกี่ยวข้องในขบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง มี 2 ชนิดด้วยกัน คือ แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ซึ่งปัจจุบันมีการใช้เทคนิครีคอมบิแนนท์เอนไซม์เข้ามาช่วยในการผลิตเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติหรือปริมาณที่ต้องการได้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์นำยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ เพื่อยีสต์สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส เพื่อใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังในการผลิตเอธานอลได้ในขั้นตอนเดียว และเพื่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป โดยเพิ่มปริมาณยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sap* I และนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pD1214-AT (ATUM, USA) นำพลาสมิดลูกผสมถ่ายฝากเข้าเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสสามารถ ย่อยแป้งได้ โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน

Abstract

Alpha-amylase and glucoamylase is an enzyme that catalyses the breakdown of starch into sugars. Alpha-amylase and glucoamylase has been used for the production ethanol from cassava. In this study, a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc-1 was constructed that contained the genes encoding alpha-amylase and glucoamylase. The alpha-amylase and glucoamylase genes were inserted into yeast expression plasmid pD1214-AT. Recombinant alpha-amylase and glucoamylase were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast expression plasmid under the control of the SS_Alphafactor secretion signal, alpha-amylase and glucoamylase activities were secreted into the culture medium. The results showed that recombinant enzyme of the alpha-amylase and glucoamylase synergistically enhanced starch degradation.

6. คำนำ :

จากวิกฤตการณ์ที่น้ำมันมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เกิดความต้องการพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงประเภทต่างๆ เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ ลม น้ำ ไฮโดรเจนและชีวมวล โดยเฉพาะพลังงานทดแทนจากภาคการเกษตร สามารถนำปาล์มน้ำมันและสบู่ดำ ผลิตเป็นไบโอดีเซล อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่างและมันสำปะหลัง ผลิตเป็นเอทานอล เพื่อนำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน ผลิตเป็นแก๊สโซฮอล์

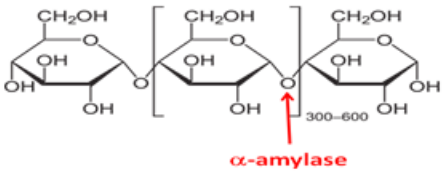
ประเทศไทยเริ่มใช้เอทานอลผสมน้ำมันเบนซินเพื่อการผลิตแก๊สโซฮอล์มานานกว่า 20 ปีแล้ว โดยดำเนินการจากแนวพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวเมื่อปี 2528 ในโครงการส่วนพระองค์ ครั้งนั้นได้ศึกษาการผลิตแก๊สโซฮอล์เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน โดยผลิตเอทานอลจากอ้อย หลังจากนั้นก็เกิดความตื่นตัวทั้งจากภาครัฐและเอกชนเข้ามาร่วมพัฒนาและนำไปทดสอบกับเครื่องยนต์อื่นๆ เป็นต้นมา (อัมพร, 2537)

ประเทศไทยมีวัสดุที่มีศักยภาพผลิตเอทานอลหลายชนิด แต่จากการประเมินขั้นต้นพบว่าตามสภาพที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน ทั้งมันสำปะหลังและอ้อยมีความเหมาะสมมากกว่าพืชชนิดอื่นในการที่มีวัตถุดิบปริมาณมากพอสำหรับการผลิตอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ นอกจากนั้นประเทศไทยมีความพร้อมด้านความรู้ความเข้าใจรายละเอียดและเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง (อัมพร, 2537)

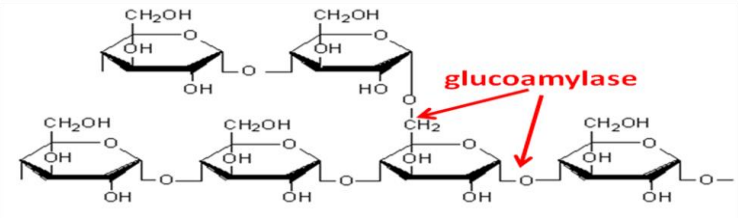
เอนไซม์ย่อยแป้งที่เกี่ยวข้องในขบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง จะเห็นว่ามี 2 ชนิดด้วยกัน คือ แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยแอลฟาอะไมเลสจะตัดพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก ระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ผลผลิตที่ได้คือ oligosaccharide และ α-limit-dextrin (ภาพที่ 1)

ส่วนกลูโคอะไมเลสจะตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก ซึ่งการทำงานจะตัดโมเลกุลที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสอย่างเดียว (ภาพที่ 2)

แหล่งของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีหลายชนิดด้วยกัน ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตัดพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก



ภาพที่ 2 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตัดพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและคุณสมบัติบางประการ

แหล่งของจุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล(Da)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)
α-Amylase		
Bacillus subtilis	41,000	
B. amyloliquefaciens	49,000	70
B. licheniformis	62,000	90
Glucoamylase		
Aspergillus awamori	83,700-88,000	60
A. niger I	99,000	
A. oryzae I	76,000	60
A. oryzae II	38,000	40
Penicillium oxalicum I	84,000	55-60
Rhizopus delemar	100,000	40

(พักตร์ประไพ และ วิชัย, 2546)

ช่วงแรกของการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์อะไมเลส จะเป็นการศึกษาคุณสมบัติและการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยตรง เช่น การศึกษาการผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *A. niger* H9 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง (อรพิน, 2530) การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มทนร้อนที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเติบโต และสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีแป้ง (อาคม และคณะ, 2553)

ต่อมาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์จะเป็นการโคลนยีนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ให้มากขึ้น เช่น การโคลนยีนแอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *B. licheniformis* (Shahhoseini *et al*., 2003) จากเชื้อ *Halothermothrix orenii* (Mijts and Patel, 2002) และจากเชื้อ *Streptococcus bovis* 148 (Satoh *et al*.,1993) ถ่ายฝากเข้าสู่ *Escherichia coli.*

Jeang และคณะ (2002) ได้พบแบคทีเรียในดิน *Cytophaga* sp. ซึ่งมีเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ (raw-starch-digesting amylase: RSDA) มีน้ำหนักประมาณ 59 กิโลดาลตัน จากการศึกษาพบว่ายีน RSDA มีความเหมือนกับแอลฟาอะไมเลสในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 3 สายพันธุ์ จึงได้ทำการโคลนยีน RSDA และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* พบว่ายังคงคุณสมบัติของ RSDA เหมือนกับที่ผลิตจาก *Cytophaga* sp.

Özcan และคณะ (2001) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ RSKK 246 ผลิตแอลฟาอะไมเลส ขนาด65 กิโลดาลตัน จึงทำการโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pUB110 และถ่ายฝากเข้าสู่ *B. subtilis* สายพันธุ์ RSKK246, RSKK243, RSKK244, YB886 และ ORBAM โดย recombinant plasmid ที่ใช้ถูกควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ของ *Bacillus* sp. เอง พบว่ามีการแสดงออกสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และยังมีการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลส ให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Yarrowia lipolytica* (Park *et al*., 1997) และ *Saccharomyces cerevisiae* (Southgate *et al*., 1993) ด้วย

นอกจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะได้จากจุลินทรีย์แล้ว ยังพบในพืชด้วย เช่น ข้าว มีรายงานการศึกษาลายพิมพ์ของเอนไซม์อะไมเลสในเมล็ดข้าวที่กำลังงอก (Mitsunaga *et al*., 2001) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส และความมีชีวิตของต้นกล้า (Seedling vigor) (Karrer *et al*., 2004)

ดังที่กล่าวข้างต้นแล้วว่า เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถย่อยได้เฉพาะพันธะ α-1,4 กลูโค ซิดิกหรือย่อยแแป้งสุกเท่านั้น ส่วนกลูโคอะไมเลสย่อยทั้งพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก นั่นคือสามารถย่อยได้ทั้งแป้งสุกและดิบ จึงได้มีการโคลนยีนกลูโคอะไมเลสถ่ายฝากเข้ายังเชื้อรา *A. niger* เพื่อเพิ่มจำนวนชุด (copy number) ของยีนกลูโคอะไมเลส ส่งผลให้เชื้อรา *A. niger* ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้มากขึ้น (Verdoes *et al*., 1994; MacKenziea *et al*., 2000; Yao *et al*., 2001) นอกจากนี้ยังโคลนยีนกลูโคอะไมเลส เพื่อผลิตเอนไซม์ปริมาณมากในยีสต์ *Pichia pastoris* (Liu *et al*., 2005) ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Murai *et al*., 1998; Lin *et al*., 1998; Garc´ıa *et al*., 2005; Kosugi *et al*., 2009) Shigechi และคณะ (2002) ได้ทำการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อให้ยีสต์ผลิตเอนไซม์ได้ทั้งสองชนิด ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์นำยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ เพื่อยีสต์สามารถ

สร้างและหลั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส เพื่อใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังในการผลิตเอธานอลได้ในขั้นตอนเดียว และเพื่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีและเอนไซม์

1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองซื้อมาจากบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย

1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET^{TM} 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

2.2 พลาสมิด

- พลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (pQAMY) จากงานวิจัยก่อนหน้า
- พลาสมิดลูกผสมของยีนกลูโคอะไมเลส (pJAMY) จากงานวิจัยก่อนหน้า
- พลาสมิด pD1214-AT (ATUM, USA)

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 ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร

วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์และเชื่อมต่อยีนแอลฟาอะไมเลส (AAMY) เข้ากับเวคเตอร์

เพิ่มปริมาณยีน AAMY ด้วยเทคนิค PCR ทำโดยใช้พลาสมิดลูกผสม pQAMY (จากงานวิจัยก่อนหน้า) เป็นแม่แบบในส่วนผสมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย pJAMY 1 ไมโครกรัม, 1X PCR buffer with $MgCl_2$, 80 ไมโครโมลร์ dNTPs, ไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์(ประกอบด้วย F-AAMY1214 (5' - TACAC-GTACTTAGTCGCTGAAGCTCTTCTATGTTTGCAAAACG - 3') 0.2 ไมโครโมลาร์ และ R-AAMY1214 (5' - TAGGTACGAACTCGATTGACGGCTCTTCTACCTCAATGGGGAAG - 3') 0.2 ไมโครโมลาร์), 2.5 ยูนิต *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, USA) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 90 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 300 วินาที (ex-tension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และสกัดบริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Kit (Fermentas, USA)

นำผลผลิตจาก PCR ตัดด้วยเอนไซม์ *Sap* I ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยยีน AAMY 20 นาโนกรัม, 1X Fast Digest buffer และ 1 ไมโครลิตร Fast Digest *Sap* I บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และนำยีน AAMY ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sap* I แล้ว และเวคเตอร์ pD1214-AT (ATUM, USA) มาเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย ยีน AAMY ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sap* I 10 นาโนกรัม, pD1214-AT 10 นาโนกรัม, 1x Rapid Ligation Buffer, 5 ยูนิต T4 DNA ligase (Thermo Scientific, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำพลาสมิดลูกผสมถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation เริ่มจากการนำแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอ (competent cell) แช่ในน้ำแข็งจนกระทั่งละลายประมาณ 2 ใน 3 ส่วน เติมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้ว

จำนวน 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 PCR buffer, 2 มิลลิโมล $MgCl_2$, 80 ไมโครโมลาร์ dNTPs, ไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์(ประกอบด้วย F-AAMY1214 0.2 ไมโครโมลาร์ และ R-AAMY1214 0.2 ไมโครโมลาร์), 2.5 ยูนิต *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 90 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)

2. การการสังเคราะห์และเชื่อมต่อยีนกลูโคอะไมเลส (GAMY) เข้ากับเวคเตอร์

เพิ่มปริมาณยีน GAMY ด้วยเทคนิค PCR ทำโดยใช้พลาสมิดลูกผสม pJAMY (จากงานวิจัยก่อนหน้า) และใช้ไพรเมอร์ F-GAMY1214 (5’-TACACGTACTTAGTCGCTGAAGCTCTTCTATGTCGTTCCGATC-3’) และ R-GAMY1214 (5’-TAGGTACGAACTCGATTGACGGCTCTTCTACCCTACCGCCAGG-3’) ในปฏิกิริยา PCR และนำผลผลิต PCR เชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pD1214-AT วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1

3. การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์โดยวิธี 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

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์

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

เวลา และสถานที่ทำการทดลอง

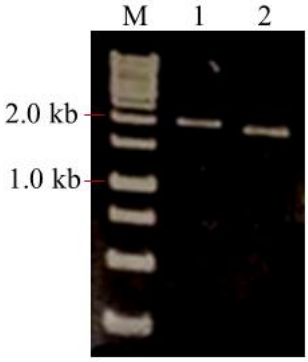
ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 (2 ปี)

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

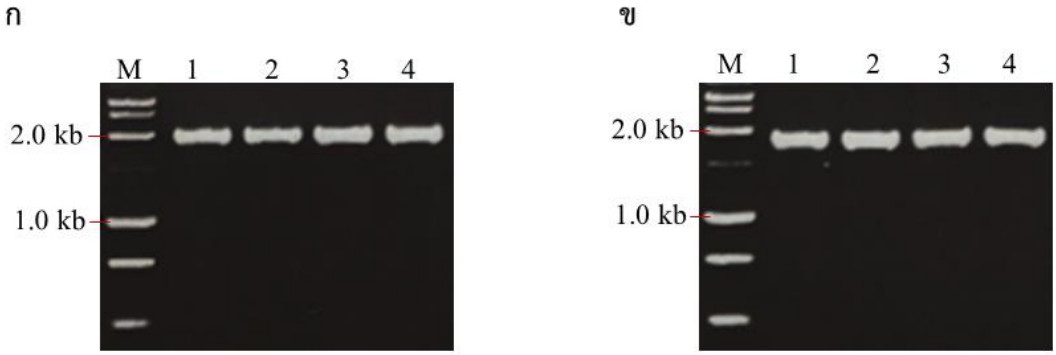
8. ผลการทดลองและวิจารณ์ :

1. การสังเคราะห์ยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

ผลการทำปฏิกิริยา PCR จะได้ยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส ที่มีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส (ภาพที่ 3) จากนั้นนำยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสทำบริสุทธิ์และย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sap I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำที่ปลาย 3’ และ 5’ ของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส นำยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสที่ย่อยแล้ว แทรกเข้ากับพลาสมิด pD1214-AT ที่มีขนาด 5.1 กิโลเบส ซึ่งพลาสมิดถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sap I เป็นเส้นตรงแล้ว เชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 ligase และนำเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสในพลาสมิด pD1214-AT ด้วย colony PCR พบว่ามี PCR product ของทั้ง 2 ยีน มีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสในพลาสมิด (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสแสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของยีนแอลฟาอะไมเลส (lane 1) และยีนกลูโคอะไมเลส (lane 2)

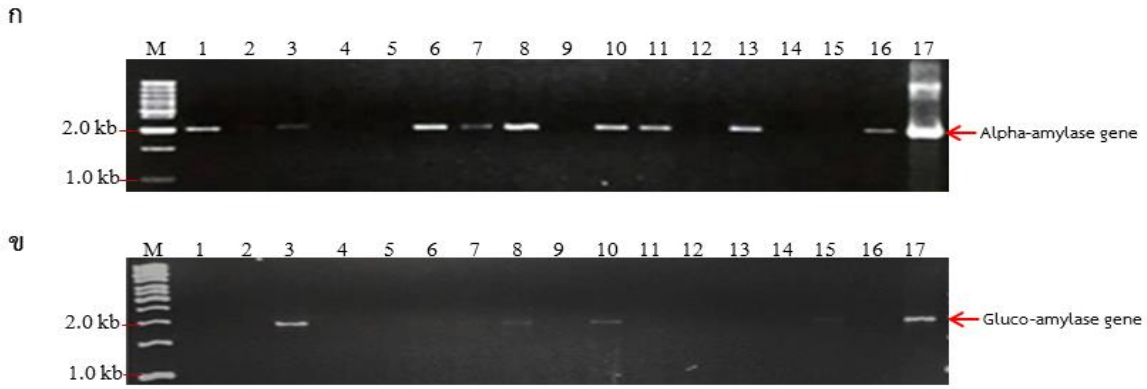


ภาพที่ 4 การตรวจสอบการแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลส (ก) และ ยีนกลูโคอะไมเลส (ข) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5

2. **การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์และการคัดเลือกโคลน**

คัดเลือกพลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกของยีนกลูโคอะไมเลสและยีนแอลฟาอะไมเลส นำมาถ่ายฝากเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 ด้วยวิธี LiAc/single-stranded carrier DNA/PEG method จากนั้นนำยีสต์เลี้ยงในอาหารคัดเลือก SC-U ซึ่งเป็นอาหารที่ขาดกรดอะมิโน uracil ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารนี้ ส่วนยีสต์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะเจริญเติบโตได้ เนื่องจากพลาสมิดมียีน URA3 ทำให้สร้างกรดอะมิโน uracil ซึ่งเป็นกรมอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตได้เอง ดังนั้นเซลล์ยีสต์ที่ได้รับการพลาสมิดลูกผสมจึงสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก SC-U ซึ่งขาดกรดอะมิโน uracil ได้ จากนั้นนำโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก SC-U ตรวจสอบขนาดของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลู

โคอะไมเลสด้วย colony PCR พบว่าคัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนของแอลฟาอะไมเลส จำนน 16 โคโลนี ตรวจพบยีนของแอลฟาอะไมเลส จำนวน 9 โคลน ส่วนยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนกลูโคอะไมเลส คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก จำนวน 16 โคลน ตรวจพบยีนกลูโคอะไมเลส เพียง 3 โคลน (ภาพที่ 5)

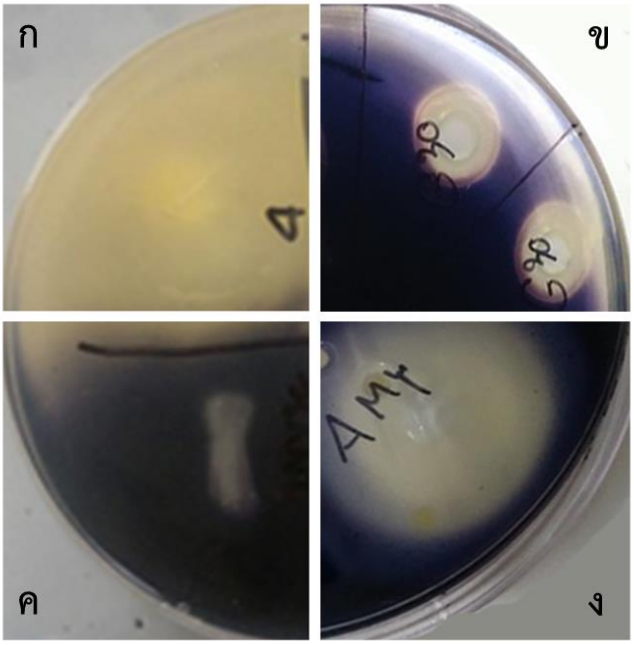


ภาพที่ 5 การตรวจสอบการแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลส (ก) และยีนกลูโคอะไมเลส (ข) ในยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก SC-U

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์

นำยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม เลี้ยงบนอาหารแข็ง YPC (อาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้ง) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน หลังจากนั้นนำสารละลายไอโอดีนเทลงบนอาหารแข็งให้ทั่ว บริเวณที่ไม่มีการย่อยแป้งจะเกิดปฏิกิริยาการจับกันของโมเลกุลของแป้งและสารละลายไอโอดีน จะเห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนบริเวณที่มีการย่อยแป้งของเอนไซม์จะเห็นเป็นวงใสๆรอบโคโลนีของยีสต์ จากการทดลองพบว่าเกิดวงใสรอบยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (ภาพที่ 6ก) และยีนกลูโคอะไมเลส (ภาพที่ 6ข) ซึ่งเหมือนกับวงใสบริเวณรอบเอนไซม์อะไมเลสทางการค้า (ภาพที่ 6ง) ในขณะที่ไม่เกิดวงใสบริเวณเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc (ภาพที่ 6ค) ซึ่งไม่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส และจากการทดลองพบว่า เอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม มีขนาดของวงใสกว้างกว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม นั่นแสดงว่าเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมากกว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม และเอนไซม์จากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมสามารถหลั่งออกมาจากเซลล์ยีสต์ได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้น เนื่องจากพลาสมิด pD1214-AT ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นพลาสมิดที่มี secretion signal ชนิด SS_Alphafactor ที่ช่วยส่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสออกนอกเซลล์ของยีสต์ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Janse และ Pretorius (1995) ใช้ secretion signal ชนิด yeast mating pheromone alpha-factor secretion signal (MF alpha 1S) ซึ่งเป็น secretion signal ที่พบได้ตามธรรมชาติในยีสต์ เพื่อช่วยการหลั่งเอนไซม์จากยีสต์โดยไม่ต้องกระตุ้น และพ

ลาสมิด pD1214-AT นี้ยังมีโปรโมเตอร์ TEF1 ซึ่งเป็น constitutive promoter ที่ทำงานหรือแสดงออกได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นด้วยตัวชักนำใดๆ



ภาพที่ 6 การตรวจสอบการย่อยแป้งของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (ก) และยีนกลูโคอะไมเลส (ข) เทียบกับยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสม (ค) และ เอนไซม์อะไมเลสทางการค้า (ง)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากงานวิจัยนี้สร้างยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งมีความสามารถในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบได้ และยีสต์ที่สร้างขึ้นมานี้สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดออกมาได้โดยใช้โปรโมเตอร์ TEF1 ซึ่งเป็น constitutive promoter ที่ทำงานหรือแสดงออกได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นด้วยสารชักนำใดๆ นอกจากนี้ยีสต์ที่สร้างขึ้นมานี้ยังสามารถหลั่งเอนไซม์ส่งออกมานอกเซลล์ของยีสต์ได้ จึงทำให้สะดวกในการใช้งานเอนไซม์ สามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้งเพื่อผลิตเอธานอลและยังสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในเชิงพาณิชย์ต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

1. สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์ในเชิงพาณิชย์
2. สามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้ง ทำให้ลดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตเอธานอล

11. คำขอบคุณ :

ขอขอบคุณ คุณวัชรินทร์ ศรีประยูร ที่ช่วยงานในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง :

นิรนาม. 2554. การเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation). (8 มกราคม 2554). http://www.champa.kku.ac.th/thanaset/DNAsyn6.pdf.

พักตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2546. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง. วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 11(4): 28-31.

ภูวดี. 2551. ผลิตเอทานอลเพื่อแก๊สโซฮอล์ (Gasohol). (22 พฤษภาคม 2553). http://www.vcharkarn.com/varticle/38199.

อรพิน ภูมิภมร. 2530. การผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อราที่ทำลายหัวมันสำปะหลังโดยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสาตร์). 21:39-40.

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

อาคม เทศนุ่ม สุภาวดี ฉิมทอง นิษก์นิภา สุนทรกุล คิน เลย์ คู จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ และ กนก รัตนะกนกชัย. 2553. การศึกษาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 และการผลิตน้ำตาลจากแป้งดิบและกากมันสำปะหลัง, น.36-44 ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Dalmia, B. K., Z. L. Nikolov. 1994. Characterization of a β-Galactosidase Fusion Protein Containing the Starch-Binding Domain of *Aspergillus glucoamylase*. Enzyme and Microbial Technology. 16:18-23.

Fritsch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 1989. Preparation and Transformation of Competent *E. coli*. Pages 1.74 -1.84. in : Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Garc´ıa, L. L., A. C. Adam, P. Manzanares and J. Polaina. 2005. Improving the Amylolytic Activity of *Saccharomyces cerevisiae* Glucoamylase by the Addition of a Starch Binding Domain. Journal of Biotechnology. 118:167–176.

Giardina, T., A. P. Gunning, N. Juge, C. B. Faulds, C. S. M. Furniss, B. Svensson, V. J. Morris and G. Williamson. 2001. Both Binding Sites of the Starch-binding Domain of *Aspergillus niger* Glucoamylase are Essential for Inducing a Conformational Change in Amylose. Journal of Molecular Biology. 313: 1149-1159.

Janse, B. J and I. S. Pretorius. 1995. One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of Saccharomyces cerevisiae producing alpha-amylase, glucoamylase and pullulanase. Appl Microbiol Biotechnol. 42(6): 878–883.

Jeang, C. J., L. S. Chen, M-Y. Chen and R. J. Shiau. 2002. Cloning of a Gene Encoding Raw-Starch-Digesting Amylase from a *Cytophaga* sp. and Its Expression in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 68:3651-3654.

Karrer, E.E., J.M. Chandler, M.R. Foolad and R. L. Rodriguez. 2004. Correlation between α-Amylase Gene Expression and Seedling Vigor. Biomedical and Life Sciences. 66:163-169.

Kaufmann, E., N. Geisler and K. Weber. 1984. SDS-PAGE Strongly Overestimates the Molecular Masses of the Neurofilament Proteins. FEBS LETTERS. 170(1):81-84.

Kosugi, A., A. Kondo, M. Ueda, Y. Murata, P. Vaithanomsat, W. Thanapase, T. Arai and Y. Mori. 2009. Production of Ethanol from Cassava Pulp *via* Fermentation with a Surface Engineered Yeast Strain Displaying Glucoamylase. Renewable Energy. 34: 1354–1358.

Legal-Coeffet, M. F., A. J. Jacks, K. Sorimachi, M. P. Williamson, G. Williamson and D. B. Archer. 1995. Expression in *Aspergillus niger* of the Starch-Binding Domain of Glucoamylase Comparison with the Proteolytically Produced Starch-Binding Domain. European Journal of Biochemistry. 233: 561-567.

Lin, L. L., Y. J. Ma, H. R. Chien and W. H. Hsu. 1998. Construction of an Amylolytic Yeast by Multiple Integration of the *Aspergillus awamori* Glucoamylase Gene into a *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome. Enzyme and Microbial Technology. 23:360–365.

Liu, S. H., W. I. Choua, C. C. Sheub and M. D. T. Chang. 2005. Improved Secretory Production of Glucoamylase in *Pichia pastoris* by Combination of Genetic Manipulations. Biochemical and Biophysical Research Communications. 326: 817–824.

MacKenziea, D. A., D. J. Jeenesa, X. Goub and D. B. Archer. 2000. Molecular Basis of Glucoamylase Overproduction by a Mutagenised Industrial Strain of *Aspergillus niger.* Enzyme and Microbial Technology. 26:193–200.

Matagne, A., B. Joris and J.-M. Frere. 1991. Anomalous Behaviour of a Protein During SDS/PAGE Corrected by Chemical Modification of Carboxylic Groups. Biochemical Journal. 280:553-556.

Mertens, J. A., C. D. Skory. 2007. Isolation and Characterization of a Second Glucoamylase Gene without a Starch Binding Domain from *Rhizopus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology. 40:874–880.

Mijts, B.N. and B.K.C. Patel. 2002. Cloning, Sequencing and Expression of an α–Amylase Gene, *amy*A, from the Thermophilic Halophile *Halothermothrix orenii* and Purification and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. Microbiology. 148:2343-2349.

Mitsunaga, S.I., O. Kawakami, T. Numata, J.Yamaguchi, K. Fukui and T. Mitsui. 2001. Polymorphism in Rice Amylase at an Early Stage of Seed Germination. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 65:662-665.

Murai, T., T. Yoshino, M. Ueda, I. Haranoya, T. Ashikari, H. Yoshizumi and A. Tanaka. 1998. Evaluation of the Function of Arming Yeast Displaying Glucoamylase on Its Cell Surface by Direct Fermentation of Corn to Ethanol. Journal of fermentation and Bioengineering. 86(6):569-572.

Özcan, n., A. Altinalan and M. S. Ekinci. 2001. Molecular Cloning of an **α**-amylase Gene from *Bacillus subtilis* RSKK246 and Its Expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtillis.* Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 25:197-201.

Park, C.S., C.C. Chang, J.Y. Kim, D.M. Ogrydziak and D.D.Y. Ryu. 1997. Expression, Secretion, and Processing of Rice-Amylase in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 272:6876-6881.

Satoh, E., Y. Niimura, T. Uchimura, M. Kozaki and K. Komagata. 1993. Molecular Cloning and Expression of Two α–Amylase Gene from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli.* Applied and Environmental Microbiology. 59:3669-3673.

Shahhoseini, M., A.A. Ziaee and N. Ghaemi. 2003. Expression and Secretion of an Alpha-Amylase Gene from a Native Strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 Promoter and Putative Signal Peptide of the Gene. Journal of Applied Microbiology. 95:1250-1254.

Shigechi, H., K. Uyamaa, Y. Fujita, T. Matsumoto, M. Uedac, A. Tanaka, H. Fukuda and A. Kondo. 2002. Efficient Ethanol Production from Starch through Development of Novel Flocculent Yeast Strains Displaying Glucoamylase and co-Displaying or Secreting α-Amylase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17:179–187.

Southgate, V.J., A.J.C. Steyn, I.S. Pretorius and H.J.J. V. Vuren. 1993. Expression and Secretion *Bacillus amyloliquefaciens* α-Amylase by Using the Yeast Pheromone α-Factor Promoter and Leader Sequence in *Saccharomyces cerevisiae.* Applied and Environmental Microbiology. 59:1253-1258.

Verdoes, J. C., P. J. Punt, A. H. Stouthamer and C. A.M.J.J. van den Hondel. 1994. The Effect of Multiple Copies of the Upstream Region on Expression of the *Aspergillus niger* Glucoamylase-Encoding Gene. Gene. 145: 179-187.

Wallis, G.L.F., R.J. Swift, F.W. Hemming, A.P.J. Trinci and J.F. Peberdy. 1999. Glucoamylase Overexpression and Secretion in *Aspergillus niger*: Analysis of Glycosylation. Biochimica et Biophysica Acta 1472 (1999) 576-586.

Williamson, G. and N. J. Belshaw. 1993. Properties of the Binding Domain of Glucoamylase. Carbohydrate Polymers. 21:147-149.

Yao, T. T., Y. M. Wang, J. L. Gu and Z. X. Wang. 2006. Overproduction of Glucoamylase by Recombinant *Aspergillus niger* Harboring Multiple Copies of *glaA*. Chinese Journal of Biotechnology. 22: 567-571.

13. ภาคผนวก :

ภาคผนวก ก

การสกัดพลาสมิด
โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะตามที่ระบุสำหรับพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว รอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปสกัดพลาสมิดตามวิธีการดังต่อไปนี้

1. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
2. เติม Lysis Solution ลงในสารละลายข้อ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แลวกลับ หลอดเบาๆ 4-6 ครั้ง เพื่อผสมให้เข้ากัน
3. เติม Neutralization Solution ลงในสารละลายข้อ 2 ปริมาตร 350 ไมโครลิตรแลวกลับ หลอดเบาๆ ทันที 4-6 ครั้ง
4. นำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ใช้ไมโครไปเปตดูดสารละลายใสในข้อ 4 ใสลงใน GeneJET™ spin column
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง
7. ล้าง GeneJET™ spin column ด้วย Wash Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แลว นำไปปั่น เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง
8. ล้าง GeneJET™ spin column ด้วย Wash Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แลว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
9. เทของเหลวในข้อ 8 ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำ ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ออกจาก Column
10. นำ GeneJET™ spin column ไปวางในหลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ GeneJET™ spin column เพื่อละลาย ดีเอ็นเอออกมา บ่ม 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

ภาคผนวก ข

การตรวจขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

1. เตรียม agarose gel 0.8 % ใน 1X TBE buffer
2. อุ่นให้เจลละลาย รอให้เย็นพอที่มือจับได้
3. เทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล แลววาง comb รอให้เจลแข็งประมาณครึ่งชั่วโมง วางถาดเจลลงใน chamber เท 1xTBE ให้ท่วมเจล แลวจึงดึง comb ออก
4. load ดีเอ็นเอตัวอย่างเปรียบเทียบกับ DNA/*Hind* III marker
5. แยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟา 120 โวลต์ ตั้งเวลา 30 นาที
6. แกะเจลออกจากถาดนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide 0.5 M เป็นเวลา 5 นาที เพื่อย้อมสีแถบดีเอ็นเอ
7. นำเจลลงแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างสีส่วนเกินออก เป็นเวลา 10 นาที
8. ตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยใช้เครื่อง Gel Document

ภาคผนวก ค

การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส
(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis : SDS-PAGE)

การเตรียมเจล

1. ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้าด้วยกันคั่นดวย spacers ล็อคให้แนบติดกันด้วย clamp แล้วขัน สกรูให้แน่นวางลงใน casting stand
2. เตรียมสารละลายเจล 8% โดยผสมสารต่อไปนี้ ตามลำดับ คนเบาๆให้เข้ากัน แต่ยังไม่ต้องเติม TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) กับ ammonium persulfate

น้ำปราศจากไอออน	4.6	มิลลิลิตร
30% acrylamide monomer solution	2.7	มิลลิลิตร
1.5 M Tris buffer pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	6	ไมโครลิตร

3. เติม TEMED กับ ammonium persulfate แลวเขย่าวนเบาๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
4. ใช้ไปเปตดูดสารละลายเจลใส่ลงที่มุมแผ่นแก้ว จากนั้นค่อยๆหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ใหเจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
5. เตรียม stacking gel monomer โดยผสมสารต่อไปนี้

น้ำปราศจากไอออน	2.7	มิลลิลิตร
30% acrylamide monomer solution	0.67	มิลลิลิตร
1.0 M Tris buffer pH 6.8	0.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.04	มิลลิลิตร
TEMED	4	ไมโครลิตร

6. เทน้ำที่ปิดหน้าเจลออก ซับให้แห้งด้วยกระดาษ
7. ดูดสารละลายเจลใส่ลงระหว่างแผ่นแก้ว เสียบ comb เพื่อให้เกิดช่อง (well)
8. ทิ้งไว้จนกว่าเจลจะแข็ง ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
9. เอา comb ออก ระวังอย่าให้เจลขาด เติม Tank buffer ลงใน chamber

การทำอิเลคโตรโฟรีซิส

1. ใส่สารตัวอย่างที่ผสมกับ 2x sample buffer แลวหยอดลงในแต่ละช่องของเจล
2. ต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เสียบปลั๊กต่อกับเครื่องจาย กระแสไฟฟ้า
3. ตั้งกระแสไฟฟ้าไว้ที่ 120 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง สำหรับเจล 1 แผ่น
4. ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อ tracking dye ลงมาถึงด้านล่าง
5. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber เอา spacers ออก แล้วใช้ spatula งัดแผ่นแก้วเบาๆ เจลจะติดอยู่ที่แผ่นแก้วข้างหนึ่ง ค่อยๆเทเจลลงในถาดย้อม

การเตรียมสีย้อม PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas, USA)

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในเจล นำไปเข้า microwave ด้วยไฟแรง นาน 1 นาที เขย่าต่อ 5 นาที เทน้ำทิ้ง
2. ทำซ้ำข้อ 1 จำนวน 3 ครั้ง
3. เติม PageBlue™ Protein Staining Solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเข้า microwave ด้วยไฟแรง นาน 30 วินาที เขย่าต่อ 20 นาที เทสารละลายทิ้ง
4. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง

ภาคผนวก ง

การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง (Conventional Process)

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การเตรียมวัตถุดิบ มันสำปะหลังที่ผ่านการแยกเหง้าจะถูกล้างให้สะอาดแล้วบดให้ละเอียดเป็นแป้ง ได้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลัง

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การย่อยแป้ง เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (น้ำตาลกลูโคส) เพื่อให้มีสภาพเหมาะกับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ในขั้นต่อไป โดยวิธีการย่อยแป้งอาจใช้กรดย่อยแป้ง (Acid Hydrolysis) หรือใช้เอนไซน์ (Enzymatic Hydrolysis) ซึ่งวิธีการที่ใช้เอนไซน์เพื่อย่อยแป้งนั้นจะได้รับความนิยมมากกว่าเนื่องจากสะดวกและประหยัดต้นทุน ขั้นตอนนี้จะทำการย่อย 2 ครั้งด้วยกัน

ครั้งที่ 1 ย่อยแป้งเพื่อทำให้แป้งมีโมเลกุลเล็กหรือทำให้เหลว (Liquefaction) เป็นการเตรียมแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้วิธีการต้มเคี่ยวน้ำแป้งสำปะหลังด้วยเอนไซม์ตัวที่ 1 คือ เอนไซน์แอลฟา อะไมเลส (α-amylase) โดยใช้เคี่ยวรักษาอุณหภูมิที่ประมาณ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 ชั่วโมง

ครั้งที่ 2 ย่อยแป้งทำให้ได้กลูโคสหรือย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification)โดยทำให้ น้ำแป้งสุกก่อนผสมเอนไซม์ตัวที่ 2 คือ กลูโค-อะไมเลส (Glucoamylase หรือ เบต้า-อะไมเลส (beta-amylase) เพื่อย่อยแป้งสุกให้เป็นน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก

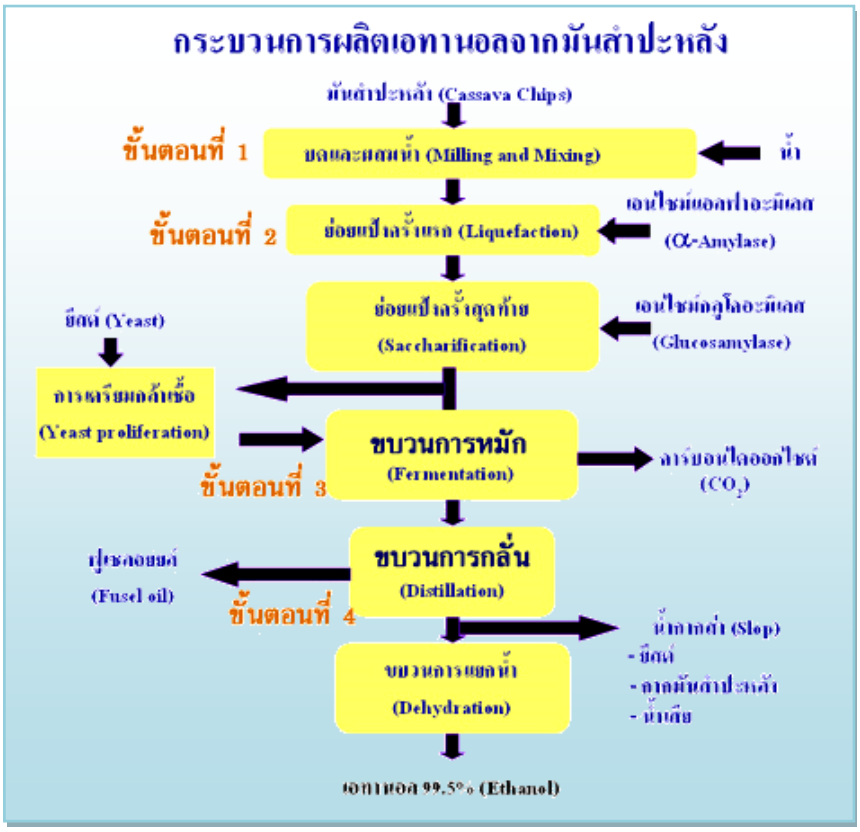
<u>ขั้นตอนที่ 3</u> กระบวนเตรียมหัวเชื้อและการหมัก (fermentation)

การเตรียมหัวเชื้อ(inoculum) เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการหมัก เมื่อเตรียมหัวเชื้อพร้อมแล้ว ก็เข้าสู่ขั้นตอนการหมัก โดยใช้เชื้อยีสต์ Saccaromyces cerevisiae จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมักเช่น อัตราการให้อากาศ อัตรา การกวน ค่าพีเอชและอุณหภูมิ ใช้ระยะเวลาการหมัก ประมาณ 48 ชม. ที่ pH 4-5 โดยทำการหมักในถังหมักที่ได้เตรียมไว้ และใช้เครื่องควบคุมการหมัก (Biostat B) ยีสต์สายพันธุ์นี้ สามารถผลิตเอทานอลได้สูงและสามารถทนสภาพแวดล้อมที่มีเอทานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การกลั่นเอทานอล (Ethanol) ขั้นตอนนี้เป็นการกลั่นเพื่อผลิตเอทานอลและทำให้บริสุทธิ์ เป็นการแยกเอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร ออกจากน้ำหมักและน้ำส่า โดยการกลั่นลำดับส่วนซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้บริสุทธิ์ร้อยละ 95.6 โดยปริมาตร แต่การนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอล์) นั้นจะต้องทำให้เอทานอลมีความบริสุทธ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิค หรือเทคโนโลยีในการกลั่นเพื่อแยกน้ำให้ได้เอทานอลที่บริสุทธิ์ ที่นิยมใช้กันอยู่มี 3 วิธี คือ

1. การดูดซับด้วย (Molecular sieve)
2. การกลั่นอะซีโอโทรป (Azeotropic distillation)
3. เทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง (Membrane technology)

(ภูวดี, http://www.vcharkarn.com/varticle/38199)



ภาพที่ 7 กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

(ภูวดี, http://www.vcharkarn.com/varticle/38199)