

การพัฒนาเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส จากเชื้อ *Bacillus* sp. และการแสดงออกในเซลล์
Escherichia coli เพื่อการผลิตเอทานอล

Development of α -amylase Enzyme from *Bacillus* sp. and its Expression in
Escherichia coli for the Production of Ethanol

ภรณ์ สว่างศรี อัจฉราพรรณ ใจเจริญ รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สุภาวดี ง้อเหรียญ
บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ พยุงศักดิ์ รวยอารี หทัยรัตน์ อุไรรงค์

Paranee Sawangsri Adcharapan Chaicharoen Rungnapa Pitaktansakul Supawadee Ngorrian

Boonreunrat Ruengwised Payungsak Rauyaree Hathairat Urairong

ABSTRACT

α -amylase is an important catalytic enzyme for the conversion of starch to sugar in the production of ethanol using cassava as a starting material. *Bacillus* sp. can be used as a source for starch hydrolysis and thermotolerant, thus, we aimed to study the starch digestion efficiency by *Bacillus* spp. derived from collected samples. A total of 476 *Bacillus* isolates were received and the starch digestion efficiency was then evaluated by the measurement of clear zone from colony on 1% (w/v), liquefaction and amylase activity techniques. The result showed that isolate D1-1 show high amylase activity at 2.39 U/ml. Then isolate was identified by partially sequenced and analyzed using 16S rDNA. The sequenced result was exhibited as *B. subtilis* with 99% similarity when compared to 16S rDNA sequences in the GenBank database. In other experiment, α -amylase gene of *Bacillus* sp. D1-1 isolate was obtained by PCR gene cloning technique and the full length nucleotide approximately 1,980 bp (GenBank Accession No. EU195860.1) and peptides (659 amino acids) were further analyzed. α -amylase gene could be overexpression within the protein expression vector pQE-80L and the recombinant was then transformed into *E. coli* BL21(DE3). The production of recombinant protein can be induced by 3 mM IPTG and Lactose. The recombinant α -amylase was further purified using HisTALON™ gravity column and the protein product was analyzed by SDS-PAGE. The size of recombinant α -amylase was molecular weight approximately 73 kDa and crude enzyme efficient activity showed as good as commercial enzyme at temperature 70°C

Key words: α -amylase, protein expression, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

บทคัดย่อ

เอนไซม์แอลฟา อะไมเลส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสลายเม็ดแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาล ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเชื้อ *Bacillus* sp. บางสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยแป้งและทนอุณหภูมิสูง งานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส จากแหล่งต่างๆ ได้ *Bacillus* spp. ทั้งสิ้น 476 ไอโซเลท นำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งโดยวิธีวัดการสร้างวงใสรอบโคโลนี บนอาหารที่มีแป้ง 1% (w/v) ทดสอบการให้น้ำแป้งเหลว และการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า ไอโซเลท D1-1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ได้ดีที่สุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 2.39 U/มิลลิลิตร การจำแนกชนิดของ ไอโซเลท D1-1 โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในส่วนของบริเวณ 16s rDNA เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเหมือน 99% การโคลนยีนแอลฟา อะไมเลส พบขนาดชิ้นส่วนของยีน เท่ากับ 1,980 คู่เบส (GenBank accession no. EU195860.1) และมีลำดับของ เปปไทด์ เท่ากับ 659 อะมิโนแอซิด เมื่อเชื่อมต่อยีนเข้ากับ expression vector pQE-80L แล้วถ่าย ผ่าเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบว่า สามารถชักนำ การแสดงออกของยีนด้วยสาร 3 mM IPTG และ 3 mM Lactose เมื่อนำ crude enzyme ที่ผลิตได้ มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน HisTALON™ Gravity Column แล้วตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์แอลฟา อะไมเลส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73 กิโลดาลตัน และ crude enzyme ที่ ผลิตได้มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 70 °C ซึ่งเทียบเท่ากับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า

คำหลัก: แอลฟา อะไมเลส, การแสดงออกของโปรตีน, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

คำนำ

พลังงานทดแทนหรือพลังงานทางเลือกมีความสำคัญต่อสถานการณ์ในปัจจุบันอันเนื่องมาจาก ปัญหาการขาดแคลนน้ำมันดิบ ส่งผลให้ราคาน้ำมันปรับตัวสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แก๊สโซฮอลล์เป็นพลังงาน ทดแทนชนิดหนึ่ง ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำมันเบนซินและเอทานอล โดยการผลิตเอทานอลในระดับ อุตสาหกรรมทั่วโลก ประมาณร้อยละ 93 ได้จากกระบวนการหมัก และวัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวโพด มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง เป็นต้น ประเทศไทยใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบใน การผลิตเอทานอล เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกได้ตลอดทั้งปี สามารถปรับตัวตามสภาพแวดล้อมได้ดี เก็บเกี่ยว ผลผลิตได้ง่ายและให้ผลผลิตในปริมาณมาก ในห้วงมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ประมาณ ร้อยละ 70-85 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมันสำปะหลังสด 1 ตัน สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 180 ลิตร ในขั้นตอนของกระบวนการผลิตเอทานอลนั้น เอนไซม์อะไมเลสมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในขั้นตอนการ ย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยเอนไซม์อะไมเลส ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสลายเม็ดแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้เร็วยิ่งขึ้น จากนั้นยีสต์จึงจะสามารถ

เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้ (ปาริชาติ และคณะ, 2519) นอกจากการผลิตเอทานอลแล้วเอนไซม์อะไมเลสยังมีความสำคัญในกระบวนการผลิตอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารหมักและเครื่องดื่ม การทำสุรา เหล้าสาเก เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว อุตสาหกรรมน้ำตาล การผลิต crystalline glucose การผลิต sugar syrup ชนิดต่างๆ อุตสาหกรรมทอผ้า ฟอกหนัง การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมแป้งและกระดาษ เป็นต้น (กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2546) ซึ่งจนถึงปัจจุบันประเทศไทยยังมีปริมาณการนำเข้าเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากต่างประเทศอยู่เป็นจำนวนมาก

อะไมเลส จัดเป็นเอนไซม์ประเภท extracellular enzyme สามารถจัดแบ่งชนิดของเอนไซม์ตามตำแหน่งการย่อยแป้งเป็น 2 ประเภท คือ endoamylase และ exoamylase เอนไซม์จำพวก endoamylase จะตัดพันธะในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α (1-4) linkage ได้เป็น reducing group และ dextrin ซึ่งมีลูกโซ่กลูโคสขนาดต่างๆ กัน เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ แอลฟา อะไมเลส (α -amylase) หรือ amylo (1-4) dextrinase ส่วนเอนไซม์จำพวก exoamylase จะตัดพันธะในโมเลกุลของแป้งที่ตำแหน่ง α (1-4) และ α (1-6) bond จาก non-reducing end ได้เป็น D-glucose เพียงอย่างเดียว เอนไซม์ประเภทนี้ คือ เบต้าอะไมเลส (β -amylase) หรือ amylo (1-4) maltosidase หรือ gamma-amylase หรือ amylo (1-4,1-6) glucosidase หรือ glucoamylase หรือ α -D-(1-4) glucan glycohydrolase (Adam, 1953) โดยทั่วไปเอนไซม์อะไมเลสจะถูกผลิตโดยเซลล์พืช และสัตว์ต่างๆ แต่ในปัจจุบันนักวิชาการได้ให้ความสนใจการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้จากจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นสิ่งที่มีความสามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่ายและรวดเร็ว มีความต้องการอาหารที่ไม่ซับซ้อน ทนทานต่อสภาวะอุณหภูมิสูง และมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งความแตกต่างนี้สืบเนื่องมาจากวิวัฒนาการและความหลากหลายทางระบบนิเวศของแหล่งที่อยู่อาศัย แต่การผลิตเอนไซม์จากพืชและสัตว์โดยตรงจำเป็นต้องใช้ปริมาณวัตถุดิบจำนวนมากและมีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูง (ปาริชาติ และคณะ, 2519 ; สุกัญญา, 2522) แบคทีเรียจึงมีความเหมาะสมในแง่ของการผลิตมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเลี้ยงง่าย และสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มักเป็นเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส (Ingle and Erickson, 1978) แต่มีแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างเอนไซม์เบต้าอะไมเลส ซึ่งได้แก่ *B. megatherium*, *B. cereus* และ *B. polymyxa* (Ureda and Marshall, 1980; Thomas *et al.*, 1980 ; Ray *et al.*, 1996; Takasaki, 1979) ในต่างประเทศมีการศึกษาและพัฒนา *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *B. subtilis* (Beckord and Kneen, 1946) *B. diateticus* (Windish and Mhatre, 1965 ; Robyt and Ackerman, 1972) *B. megatherium*, *B. mesentericus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. Polymysea* (Robyt and Ackerman, 1972) รวมถึงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียในรูปการค้าเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น *B. subtilis*, *B. licheniformis* เป็นต้น

เทคนิคทางชีวโมเลกุลสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ให้สามารถควบคุมปริมาณการผลิตได้ทุกขั้นตอน โดยให้มีการแสดงออกของยีนในเซลล์ *Escherichia coli* (*E. coli*) เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว ตลอดจนสามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

ได้โดยง่าย ดังนั้นการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ จึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งซึ่งจะสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิต และปริมาณการนำเข้าเอนไซม์อะไมเลสในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล และอุตสาหกรรมอื่นๆ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp. ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล และพัฒนาวิธีการผลิตเอนไซม์ โดยการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ แล้วให้มีการแสดงออกของยีนในเซลล์ *E. coli* เพื่อให้สามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีนหรือเอนไซม์ได้ตามต้องการ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บรวบรวม และแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ให้บริสุทธิ์

กลุ่มเก็บตัวอย่างดินป่าเสมชันเส้น ดิน น้ำบริเวณลานตาก มันสำปะหลัง และผลิตภัณฑ์จากแป้งเน่าเสียชนิดต่างๆ รวมทั้งสิ้น 35 แหล่ง นำมาแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dilution plate technique บนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว นำมา streak บนอาหาร NA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยแป้งบนอาหาร starch agar

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งโดยวิธีวัดการสร้างวงใส (clear zone) รอบโคโลนี บนอาหารแข็งที่มีแป้ง 1% (w/v) (Buonocore *et al.*, 1976) ถ้ายเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากข้อ 1 ลงบนอาหารโดยใช้ปลายไม้จิ้มฟันแตะเชื้อมาจุดลงบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบปฏิกิริยาการย่อยแป้งด้วยสารละลายไอโอดีน บันทึกวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Ø) คัดเลือกไอโซเลทที่สร้างวงใสกว้างไว้ศึกษาต่อไป ในข้อ 2.2

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการทำให้น้ำแป้งเหลว (liquefaction)

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแป้ง 1% (w/v) (Buonocore *et al.*, 1976) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที่ นาน 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบกิจกรรมการย่อยแป้งโดยดัดแปลงตามวิธีของ Hesseltine *et al.* (1963)

2.3 การวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแป้ง 1 % เป็นองค์ประกอบ นำเข้าเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 250 รอบ/นาที่ นาน 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่ (อุณหภูมิ 4°C) เก็บเฉพาะส่วนใส (crude enzyme) นำมาวัดกิจกรรมการย่อยแป้งตามวิธี Nelson-Somogyi (Nelson, 1944) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Lowry, 1951) โดยกำหนดให้ 1 หน่วยยูนิต (U) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลาร์/นาที่ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 40°C

2.4 การศึกษาการย่อยแป้งของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3 ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 1 % เป็นองค์ประกอบ นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 55°C นาน 72 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการย่อยแป้งตามวิธีของ Hesseltine *et al.* (1963) เช่นเดียวกับข้อ 2.2 บันทึกผล แล้วคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูง เพื่อนำไปใช้ในการโคลนต่อไป

3. การจำแนกเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Bacillus* sp.

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1X TE buffer 500 ไมโครลิตร ทำการสกัด genomic DNA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Maloy (1990) ตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD_{260/280} และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกบน 1% agarose gel ใน 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แฉแผ่นเจลในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (BIORAD) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนบริเวณ 16S rDNA โดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain

Reaction)

การจำแนกชนิดโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) โดยใช้ universal primer Forward F1 : S16,1 (5' AGAGTTTGATCITGGCTCAG 3') และ Reverse R5 : S16,12 (5' ACGGITACCTTGTTACGACTT 3') (Lane, 1991; Alm *et al.*, 1996) เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดังนี้ 10x PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 4mM dNTP 2 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 μM primer Forward F1 : S16,1 1 ไมโครลิตร, 5 μM primer Reverse R5 : S16,12 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immolase) 0.15 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย ddH₂O จากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีโปรแกรมอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนี้ ขั้นตอน Pre-Denature 95°C 7 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 55°C 30 วินาที, Extension 72°C 2 นาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5% agarose gel

3.3 การเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

นำผลผลิต PCR ที่เหลือจากข้อ 3.2 ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร และ 95% Ethanol ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน PCR ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย ddH₂O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

3.4 การหาลำดับเบสในส่วนของบริษัท 16S rDNA

3.4.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้ ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม) 1 ไมโครลิตร, BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 µM Primer F1 : S16, 1.6 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วย ddH₂O รวมปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ Pre-Denature 96°C 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Denature 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extension 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ

3.4.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 3.4.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าว ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (ddH₂O 16 ไมโครลิตร : 95% Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง ปลอຍตะกอนให้แห้งในที่มืด

3.4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนจากข้อ 3.4.2 ที่ได้จาก Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้แห้งที่อุณหภูมิ 4°C แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที แล้วนำตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

4. การโคลนยีนแอลฟา อะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp.

4.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Bacillus* sp. ขั้นตอนทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนแอลฟา อะไมเลส จาก genomic DNA โดยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีนแอลฟา อะไมเลส ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์

Bamy401F 5' TTTGGTACCATGTTTGCAAAACGATTCAAAACCTCTTTACTG 3' และ Bamy401R 5' TTTAAGCTTTCAATAAGGAAGAGAACCGCTTAAGCCCGAGTC 3' เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดังนี้ 10x PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 4mM dNTP 2 ไมโครลิตร, 50 mM มิลลิกรัม Cl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 µM primer Forward (Bamy401F) 1 ไมโครลิตร, 5 µM primer Reverse (Bamy401R) 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immolase) 0.15 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วย ddH₂O มีขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ Pre-Denature 95°C 7 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 60°C 30 วินาที, Extension 72°C 2 นาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5% agarose gel

4.3 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลนยีน

เตรียมผลผลิต PCR (ยีนแอลฟา อะไมเลส) ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพวิธี Electrophoresis บน 1.5% agarose gel จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.4 การเชื่อมต่อชิ้นยีนแอลฟา อะไมเลส เข้ากับ Cloning vector

นำชิ้นยีนแอลฟา อะไมเลส จากข้อ 4.3 มาเชื่อมต่อเข้ากับ T&A Cloning vector (RBC Bioscience) เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยารวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้ Ligation Buffer A 1 ไมโครลิตร, Ligation Buffer B 1 ไมโครลิตร, T&A Cloning vector 2 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร, PCR product (จากข้อ 4.3) 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย ddH₂O นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat shock transformation (Fritsch *et al.*, 1989) นำ competent cell ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 14-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีชิ้น insert ของยีนแอลฟา อะไมเลส ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB-Ampicillin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 14-16 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้สกัด พลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

4.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยวิธี Electrophoresis บน 1.5% agarose gel และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

4.6 การตรวจสอบการปรากฏของยีนแอลฟา อะไมเลส ใน Cloning vector โดยเทคนิค PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.5 ไปตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13-F 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3' และ M13-R 5' TCACACAGGAAACAGCTATGA C 3' ตั้งรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ Pre-Denature 95°C 7 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 60°C 30 วินาที, Extension 72°C 2 นาที จำนวน 25 รอบ และอุณหภูมิ 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี Electrophoresis บน 1.5% agarose gel

4.7 การเชื่อมต่อชิ้นยีนแอลฟา อะไมเลส เข้ากับ Protein Expression Vector pQE-80L (QIAGEN)

4.7.1 การเตรียมชิ้นยีนแอลฟา อะไมเลส และ pQE-80L Vector (ขนาด 4,751 คู่เบส)

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นยีนแอลฟา อะไมเลส จากข้อ 4.5 และพลาสมิดดีเอ็นเอของ pQE-80L vector นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *HindIII* เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาปริมาตรทั้งสิ้น 20 ไมโครลิตร ดังนี้ พลาสมิดดีเอ็นเอของยีนแอลฟา อะไมเลส/ pQE-80L Vector 2 ไมโครลิตร, 1X FastDigest Buffer 2 ไมโครลิตร, 1U FastDigest enzyme *KpnI* 1 ไมโครลิตร, 1U FastDigest enzyme *HindIII* 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย ddH₂O ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำมาแยกด้วย 1.2% low melting gel electrophoresis ข้อมด้วย Gel Star (Cambrex) ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการบนเครื่อง Dark Reader Transilluminator สกัดดีเอ็นเอจากเจลโดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit จะได้ชิ้นยีนแอลฟา อะไมเลส ขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และเวกเตอร์ขนาดประมาณ 5 กิโลเบส โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *HindIII*

4.7.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีนแอลฟา อะไมเลส เข้ากับ pQE-80L Vector

การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Expression vector pQE – 80L เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดังนี้ ชิ้นดีเอ็นเอของยีนแอลฟา อะไมเลส (100 นาโนกรัม) 2 ไมโครลิตร, pQE- 80L vector (50 นาโนกรัม) 2 ไมโครลิตร, 1X Ligation Buffer 2 ไมโครลิตร, T4 DNA ligase

1 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วย ddH₂O บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เก็บหลอดปฏิกิริยา Ligation ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

4.8 การถ่ายฝากยีนยีนแอลฟา อะไมเลส เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

ถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (Ligation) เข้าไปเพิ่มปริมาณใน competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ DH5 α) โดยวิธี heat shock transformation (Fritsch *et al.*, 1989) แล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็ง LB-ampicillin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.4) คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.5) เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมต่อไป

4.9 การตรวจสอบการปรากฏของยีนใน Expression Vector (pQE-80L Vector)

4.9.1 การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบการปรากฏของยีนในพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pQE (forward) 5' CGGATAACAATTTACACAG 3' และ pQE (reverse) 5' GTTCTGAGGTCATTACTGG 3' ตั้งรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ขั้นตอน Pre-Denature 95°C 7 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 55°C 30 วินาที, Extension 72°C 3 นาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5% agarose gel เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20°C

4.9.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบความถูกต้องในการเชื่อมต่อยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Hind*III เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาปริมาณทั้งสิ้น 20 ไมโครลิตร ดังนี้ พลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร 1X FastDigest Buffer 2 ไมโครลิตร, 1U FastDigest enzyme *Kpn*I 1 ไมโครลิตร, 1U FastDigest enzyme *Hind*III 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วย ddH₂O นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 40 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis บน 1.5% agarose gel

4.10 การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตโปรตีน

ทำการถ่ายฝากยีนอะไมเลสเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยการนำพลาสมิดดีเอ็นเอของพลาสมิดสายผสม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีคอมพิเทนตเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยวิธี heat shock transformation (Fritsch *et al.*, 1989) จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB-Ampicillin คัดเลือกโคโลนีสีขาวขนาดใหญ่ที่คาดว่าจะมีชั้นยีนสอดแทรกอยู่ ตรวจสอบการปรากฏของยีนและความถูกต้องในการถ่ายฝากด้วยเทคนิค PCR (ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.9.1)

5. การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแอลฟา อะไมเลส

5.1 การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน (fusion protein) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

เตรียมเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีนแอลฟา อะไมเลส ในอาหารเหลว LB-Ampicillin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 จากนั้นทำการเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) และ Lactose เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก

2 ชั่วโมง จนครบ 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาวิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein บน 8% SDS-PAGE ใน Tris-glycine buffer ที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) ตรวจดูปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง

5.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ปริมาณ fusion protein ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีนแอลฟาอะไมเลส ในอาหารปริมาตร 1 ลิตร (ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1) ชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย 3mM Lactose นาน 6 ชั่วโมง เก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นทำการแยกขนาด fusion protein ด้วยชุด HisTALON™ Gravity Columns Purification Kit (Clontech) ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย HisTALON xTractor Buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร/ตะกอนเซลล์ 100 มิลลิกรัม เติม DNaseI 1 ไมโครลิตร/ตะกอนเซลล์ 100 มิลลิกรัม นำไปปั่นไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Ultrasonicator เป็นเวลา 1 นาที โดยแบ่งเป็นช่วงสั้นๆ ช่วงละ 10 วินาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใส (crude extract) ไว้ที่ -20°C จากนั้นทำการล้าง HisTALON Gravity Columns ด้วย Equilibrate Buffer จำนวน 5-10 column นำ crude extract ที่เก็บไว้มาผ่าน column ล้างด้วย Equilibration Buffer 8 เท่าของ column ตามด้วย Wash Buffer 7 เท่าของ column เติม Elute Buffer 5-8 เท่าของ column เก็บสารละลายโปรตีนที่ผ่าน column ออกมาเป็นส่วนๆ (fraction) ส่วนละ 1 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณ fusion protein ที่ได้ด้วยวิธี Bradford protein assay โดยนำโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยากับ Bradford Reagent Solution (Fermentas) เป็นเวลา 5 นาที วัดค่า OD₅₉₀ วิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ fusion protein ด้วยวิธี SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989) วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของ fusion protein โดยเปรียบเทียบกับ protein molecular weight standards

5.3 การทดสอบกิจกรรมของ crude protein โดยวิธี Bioassay technique

ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ในอาหาร LB-Ampicillin ชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยสาร 3 mM Lactose นาน 6 ชั่วโมง (ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1) ทดสอบกิจกรรมของ crude enzyme ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยหยดลงในอาหารแป้ง (1 ลิตร : มันสำปะหลังบดอบแห้ง 10 กรัม ผงวุ้น 20 กรัม และน้ำกลั่น) ที่เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 55, 65 และ 70°C นาน 6 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการย่อยแป้งมันสำปะหลังของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยการเททับด้วยสารละลายไอโอดีน สังเกตการเกิดวงใส (clear zone) เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวม และแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ให้บริสุทธิ์

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อ *Bacillus* spp. จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดินป่า เศษมันเส้น ดิน และน้ำบริเวณลานตากมันสำปะหลัง และผลิตภัณฑ์จากแป้งเน่าเสียชนิดต่างๆ เมื่อนำมาคัดแยกเชื้อโดยวิธี dilution spread plate บนอาหาร NA นำบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) นาน 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถแยกเชื้อ *Bacillus* spp. บริสุทธิ์ ได้ทั้งสิ้น 476 ไอโซเลท โดย 236 ไอโซเลท สามารถแยกได้จากดินป่าใน

จังหวัดลำพูน พะเยา แพร่ น่าน เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ พิษณุโลก ระนอง ภูเก็ต ชุมพร ตรัง 197 ไอโซเลต แยกได้จากน้ำเสียและมันเส้นบริเวณลานตากมันสำปะหลัง และ 43 ไอโซเลต แยกได้จากผลิตภัณฑ์จากแป้งเน่าเสียชนิดต่างๆ (Table 1)

2. การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการย่อยแป้งบนอาหาร starch agar

เชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ ทั้งสิ้น 476 ไอโซเลต ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยวิธีวัดการสร้างวงใส (Clear zone) ในอาหารแข็งที่มีแป้ง 1% เป็นองค์ประกอบ (Figure 1) หลังการตรวจสอบการย่อยแป้งโดยเททับด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่าสามารถแบ่งเชื้อ *Bacillus* spp. ได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่สร้างวงใส จำนวน 198 ไอโซเลต กลุ่มที่ 2 ระดับต่ำ (วงใส 1 - 19 มิลลิเมตร) จำนวน 186 ไอโซเลต กลุ่มที่ 3 ระดับปานกลาง (วงใส 20 - 39 มิลลิเมตร) จำนวน 76 ไอโซเลต และกลุ่มที่ 4 ระดับดี (วงใส > 40 มิลลิเมตร) จำนวน 16 ไอโซเลต โดยพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เก็บรวบรวมจากน้ำเสียและมันเส้นบริเวณลานตากมันสำปะหลังให้ตัวอย่างเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งบนอาหารในระดับปานกลางและดี (วงใส > 20 มิลลิเมตร) จำนวน 43 และ 11 ไอโซเลต คิดเป็น 21.8% และ 5.5% ตามลำดับ จากจำนวนที่แยกได้ทั้งสิ้น 197 ไอโซเลต (Table 1)

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการทำให้น้ำแป้งเหลว (liquefaction)

การทดสอบการทำให้น้ำแป้งเหลว (liquefaction) เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาล โดยการนำเชื้อ ในกลุ่มที่ 3 (ระดับปานกลาง) จำนวน 76 ไอโซเลต และ กลุ่มที่ 4 (ระดับดี) จำนวน 16 ไอโซเลต ซึ่งผ่านการคัดเลือบนอาหาร starch agar (จากข้อ 2.1) รวมทั้งสิ้น 92 ไอโซเลต มาทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแป้ง 1% เป็นองค์ประกอบ จากการทดลองพบเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้ง ซึ่งมีการเปลี่ยนสีของสารละลายไอโอดีนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน (Figure 2) ในระดับต่างๆ ดังนี้ ระดับต่ำ (+ = สีน้ำเงินเข้ม) จำนวน 29 ไอโซเลต, ระดับกลาง (++ = สีน้ำตาลเข้ม) จำนวน 36 ไอโซเลต, ระดับดี (+++ = สีน้ำตาลอมเขียว) จำนวน 16 ไอโซเลต และระดับดีมาก (++++ = สีเหลือง) จำนวน 11 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต LP11-2, LP11-6, C5-1, D1-1, E1-6, Aa1-4, Aa3-1, Aa6-2, G1-2, Y-5 และ 7*-2 ซึ่ง Skoog *et al.* (1996) ได้อธิบายการเปลี่ยนสีของสารละลายไอโอดีนในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไว้ว่า สีน้ำเงินที่เกิดจากการเติมสารแขวนลอยแป้งลงในสารละลายไอโอดีน (I_2) นั้นเกิดจากไอโอดีน (I_2) เข้าไปแทรกตัวอยู่ในโครงสร้างแบบบันไดเกลียว (helical chain) ของแป้ง เช่น amylose ทำให้เห็นเป็นสารสีน้ำเงิน ซึ่งบันทึกผลได้ว่าเกิดปฏิกิริยาการย่อยแป้งต่ำมาก

Table 1. Source sampling of various *Bacillus* spp. isolates and the results of clear zone induction

Source	Code	Number of isolates	Ø clear zone (mm.)			
			0	1-19	20-39	> 40
1. soil		(236)	(120)	(98)	(14)	(4)
- Chumphon	CP	20	4	16	-	-
- Lamphun	LP	24	10	8	2	4
- Nan	Nan	23	12	9	2	-
- Phayao	PY	31	8	15	8	-
- Phrae	PR	38	17	19	2	-
- Phetchabun	PS	17	11	6	-	-
- Phitsanulok	PS	17	12	5	-	-
- Phuket	PK	19	16	3	-	-
- Ranong	RN	23	16	7	-	-
- Uttaradit	UTD	8	7	1	-	-
- Trang	TR	16	7	9	-	-
2. waste water and cassava chip on cassava drying ground		(197)	(77)	(66)	(43)	(11)
- Buri Ram	A,B,C,D	37	20	10	4	3
- Kamphaeng Phet	Aa,Bb,Cc	74	21	19	27	7
- Kanchanaburi	K	12	8	4	-	-
- Nakhon Ratchasima	E,F,G,H,I	74	28	33	12	1
3. flour products		(43)	(1)	(22)	(19)	(1)
- cassava flour	1	3	-	3	-	-
- fermented cassava flour	1*	3	-	3	-	-
- cassava flour (Chok chai)	2	5	-	1	4	-
- maize flour (G3 Nestle Load)	3	3	-	1	2	-
- maize flour with germ	4	4	-	3	1	-
- cassava flour 11436	6	3	-	2	-	1
- fermented maize flour	7*	3	-	-	3	-
- cassava flour (1 year)	8	3	-	3	-	-
- cassava flour (Kamphaeng Phet)	9	9	1	4	4	-
- cassava flour 11645	10*	2	-	1	1	-
- fermented cassava	Y	5	-	1	4	-
Total		476	198	186	76	16



Figure 1. Amylase activity test on 1% soluble starch agar.

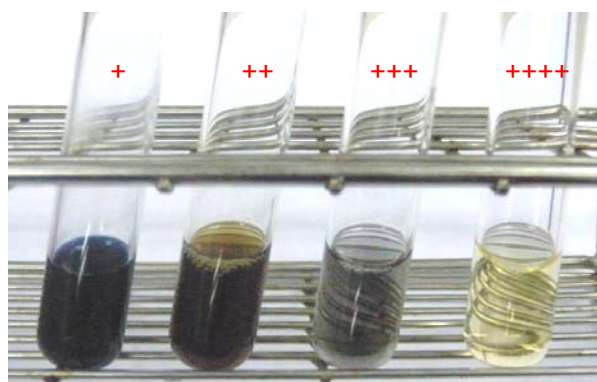


Figure 2. Effects of amylase activity assay by iodine color changes on 1% starch broth medium.

- low activity (dark blue color = +)
- moderate activity (dark brown color = ++)
- high activity (brown-green color = +++)
- very high activity (yellow color = ++++)

2.3 การวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

โดยนำเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 11 ไอโซเลท (จากข้อ 2.2) มาทำการศึกษากิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ไอโซเลทที่ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 3 อันดับแรก ได้แก่ ไอโซเลท D1-1 (2,154.35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร), E1-6 (1,844.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ Aa1-4 (1,823.58 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา คือ ไอโซเลท G1-2, 7*-2, C5-1, Aa3-1, LP11-2, Aa6-2, Y-5 และ LP11-6 ตามลำดับ โดยทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. licheniformis* (control) ยกเว้นไอโซเลท LP11-6 ซึ่งให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุด

ส่วนค่า specific activity คำนวณได้จากสัดส่วนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีนทั้งหมด โดยไอโซเลท D1-1 ให้ค่า specific activity สูงสุด เท่ากับ 2.19 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน รองลงมา คือ ไอโซเลท 7*-2, E1-6, Aa3-1, G1-2, Aa6-2, LP11-6, Aa1-4, C5-1, LP11-2 และ Y-5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังให้ค่า Reducing sugar เท่ากับ 2,154.35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน เท่ากับ 1.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และให้ค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 2.39 หน่วย/มิลลิลิตร [1 หน่วย (U) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ ที่ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลาร์/นาที่ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 40 °C] (Table 2)

Table 2. Starch hydrolysis activity assay occurred in amylase enzymes produced by different*Bacillus* isolates

Isolates	Reducing sugar	Enzymes activity	Total protein	Specific activity
LP11-2	1,477.43	1.64	1.25	1.32
C5-1	1,644.10	1.83	1.37	1.33
D1-1	2,154.35	2.39	1.09	2.19
E1-6	1,844.10	2.05	1.11	1.84
Aa1-4	1,823.58	2.02	1.43	1.42
Aa3-1	1,515.89	1.68	1.06	1.58
Aa6-2	1,285.12	1.43	0.92	1.55
Y-5	1,141.53	1.27	1.26	1.01
7*-2	1,685.12	1.87	0.90	2.08
G1-2	1,767.17	1.96	1.26	1.56
LP11-6	1,059.48	1.18	0.82	1.43
<i>B. licheniformis</i>	1,200.51	1.33	1.48	0.90

Remarks: One enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol of reducing sugar $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ at 40°C , with D-glucose as the standard, under the standard assay conditions described above.

2.4 การทดสอบการย่อยแป้งของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่อุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาการย่อยแป้งของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ทั้ง 11 ไอโซเลท (จากข้อ 2.2) ในอาหารเหลวที่มีแป้ง 1 % เป็นองค์ประกอบ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 55°C แล้วนำมาทดสอบการย่อยแป้งโดยวิธีการทำให้น้ำแป้งเหลว (liquefaction) หลังจากบ่มเชื้อนาน 72 ชั่วโมง ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 และ 45°C พบว่า เชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 11 ไอโซเลท มีกิจกรรมการย่อยแป้งได้ดี โดยให้สีในปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนในระดับดี (+++ = สีน้ำตาลอมเขียว) และดีมาก (++++ = สีเหลือง) ส่วนที่สภาวะอุณหภูมิ 55°C พบ 2 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งที่ดี คือ ไอโซเลท D1-1 และ E1-6 (Table 3) ซึ่งเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งที่อุณหภูมิสูงมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล หรือ อุตสาหกรรมการผลิต crystalline glucose และการผลิต sugar syrup ชนิดต่างๆ เนื่องจากในกระบวนการผลิตจำเป็นต้องทำให้แป้งสุกโดยใช้ความร้อน แล้วจึงใช้เอนไซม์ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลต่อไป ซึ่งหากว่าเอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงก็จะช่วยประหยัดพลังงานและเวลาในการลดอุณหภูมิของแป้งสุกได้

งานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท D1-1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งที่ดี และสามารถทนต่ออุณหภูมิ 55°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการโคลนยีนอะไมเลสต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cornelis *et al.* (1982) รายงานว่า แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม เกือบทุกสายพันธุ์สามารถพบอยู่ตามธรรมชาติ ในดิน น้ำ และอากาศ ซึ่งทำให้สามารถผลิตเอนไซม์และสารสำคัญบางอย่างที่มีคุณสมบัติที่ดี เพื่อให้ตอบสนองกับความต้องการของผู้ใช้ หรือวัตถุประสงค์ของการใช้งาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

Table 3. The starch hydrolysis activity assay of cassava flour inoculate by 11 *Bacillus* isolates compared with *B. licheniformis* at 37, 45 and 55 °C.

Isolates	Hydrolysis Activity		
	37 °C	45 °C	55 °C
G1-2	++++	++++	+
C5-1	++++	++++	+
7*-2	++++	+++	+
Aa1-4	+++	++++	+
Aa3-1	+++	++++	+
Aa6-2	+++	++++	+
D1-1	++++	++++	++++
E1-6	++++	++++	+++
LP11-2	++++	++++	+
LP11-6	++++	++++	+
Y-5	++++	++++	+

Remarks: The level of iodine color changes in starch hydrolysis activity assay.

- low activity (dark blue color = +)
- moderate activity (dark brown color = ++)
- high activity (brown-green color = +++)
- very high activity (yellow color = ++++)

3. การจำแนกเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต D1-1 โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

จำแนกเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต D1-1 ซึ่งผ่านการคัดเลือกโดยวิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การวัดการสร้างวงใสรอบโคโลนี การทดสอบการทำให้ น้ำแป้งเหลว (liquefaction) และการวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีการทางชีวโมเลกุล พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเหมือน 99 % (Figure 3a, 3b)

4. การโคลนยีนแอลฟา อะไมเลส จากเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต D1-1

การเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลส จาก genomic DNA ของเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลต D1-1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bamy401F, Bamy401R ซึ่งมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *HindIII* ที่ปลาย 5' พบว่าผลผลิต PCR ของยีนยีนอะไมเลสที่ได้ มีขนาดประมาณ 2 กิโลเบส (Figure 4a.) เมื่อนำยีนยีนอะไมเลสที่ได้เชื่อมต่อเข้าสู่เวกเตอร์พาหะ T&A cloning vector แล้วทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat shock transformation (Fritsch *et al.*, 1989) คัดเลือกโคลนที่มี ยีนยีนอะไมเลสแทรกอยู่ เมื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ พบว่าพลาสมิดที่สกัดได้มีขนาดประมาณ 5 กิโลเบส (Figure 4b) แล้วนำไปวิเคราะห์การเรียงลำดับของสารพันธุกรรม เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีน พบว่ายีนอะไมเลส มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,980 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และมีความคล้ายคลึงกับยีนแอลฟา อะไมเลส ของเชื้อ *B. subtilis* (Accession No. EU195860.1) ที่ความเหมือน 99% (Figure 5) เมื่อนำลำดับเบสไปเข้าโปรแกรม <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> เพื่อหาตำแหน่ง ORF พบว่า สามารถแปลรหัสเป็น โปรตีนโดยมีลำดับของกรดอะมิโนเท่ากับ 659 อะมิโนเอซิด (Figure 6) และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI พบมีความคล้ายคลึงกับ

ลำดับเบสโปรตีน แอลฟา อะไมเลส ของเชื้อ *B. subtilis* (Accession No. ABW75769.1) ที่ ความเหมือน 99% (Figure 7)

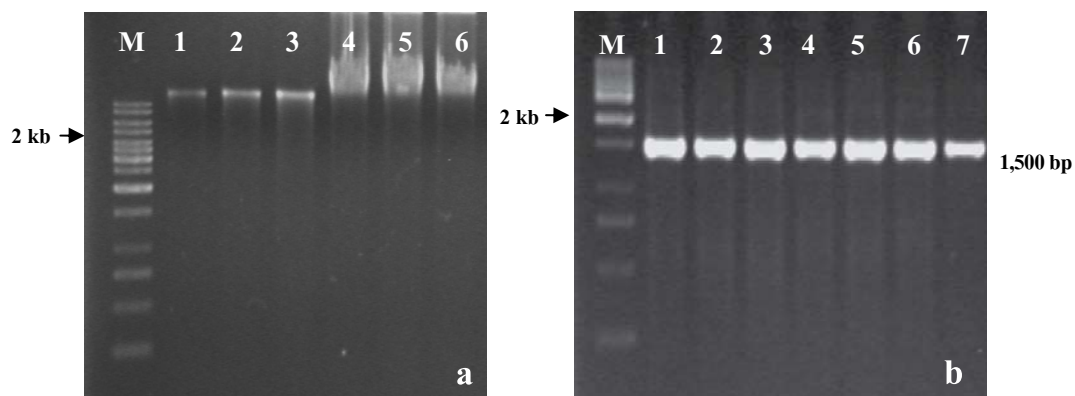


Figure 3 a. Genomic DNA isolated from *Bacillus* sp. analyzed on 1% agarose gel. Lane M, 1 kb DNA ladder (Fermentas); lane 2-4, DNA mass standard marker; lane 1-6, Genomic DNA from from *Bacillus* sp. D1-1.
b. PCR products of 16S rDNA regions derived from amplifying genomic DNA of *Bacillus* spp. by using specific primer F1:S16, 1 (forward) and R5 : S16,12 (reverse) (Lane, 1991). Lane M, 1 kb DNA ladder (Fermentas); lane 1-7, PCR products from *Bacillus* sp. D1-1.

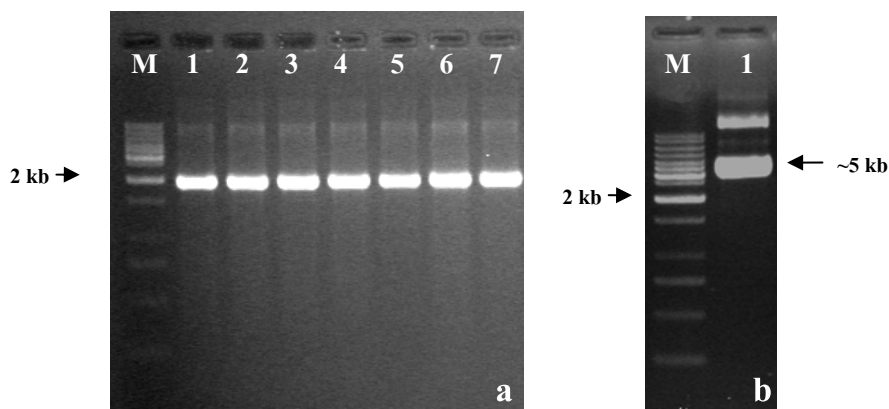


Figure 4 a. PCR Product of α -amylase gene (1,980 bp) from *Bacillus* isolate D1-1. Lane M; 1 kb DNA ladder (Fermentas), lane 1-7; PCR product from *Bacillus* sp. D1-1.
b. Recombinant plasmid DNA of α -amylase gene separated by 1.5 % agarose gel. Lane M; 1 kb DNA ladder (Fermentas), lane 1; DNA of T&A Cloning vector ligated with α -amylase gene (size ~5 kb)

```

> gb|EU195860.1| Bacillus subtilis strain FS321 alpha-amylase gene, complete cds
Length=1980

Score = 3485 bits (1887), Expect = 0.0
Identities = 1949/1980 (99%), Gaps = 0/1980 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   ATGTTTGCAAACGATTCAAACCTCTTTACTGCCGTTATTCGCCGGATTTTATTGCTG 60
          |||
Sbjct 1   ATGTTTGCAAACGATTCAAACCTCTTTACTGCCGTTATTCGCCGGATTTTATTGCTG 60

Query 61   TTTCATTTGGTTCTGGCAGGACCGGCGGCTGCCAGTGTCTGAAACGGCGAACAAATCGAAT 120
          |||
Sbjct 61   TTTCATTTGGTTCTGGCAGGACCGGCGGCTGCCAGTGTCTGAAACGGCGAACAAATCGAAT 120

Query 121  GAGCTTACAGCACCGTCGATCAAAGCGGAACCATCTTCATGCATGGAATTGGTGTTC 180
          |||
Sbjct 121  GAGCTTACAGCACCGTCGATCAAAGCGGAACCATCTTCATGCATGGAATTGGTGTTC 180

Query 181  AATACGTTAAACATAATATGAAGGATATTCATGATGCAGGATATACAGCCATTTCAGACA 240
          |||
Sbjct 181  AATACGTTAAACATAATATGAAGGATATTCATGATGCAGGATATACAGCCATTTCAGACA 240

Query 241  TCTCCGATTAAACAGTAAAGGAAGGGAACCAAGGAAATAAAAGCATGTGCAACTGGTAC 300
          |||
Sbjct 241  TCTCCGATTAAACAGTAAAGGAAGGGAACCAAGGAAATAAAAGCATGTGCAACTGGTAC 300

Query 301  TGGCTCTATCAGCCGACATCGTACCAAAATGGCAACCGTTACTTAGGAACTGAACAAGAA 360
          |||
Sbjct 301  TGGCTCTATCAGCCGACATCGTACCAAAATGGCAACCGTTACTTAGGAACTGAACAAGAA 360

Query 361  TTTAAAGAAATGTGTGCAGCGCTGAAGAATATGGCATAAAGGTCATTGTTGACGCGGTC 420
          |||
Sbjct 361  TTTAAAGAAATGTGTGCAGCGCTGAAGAATATGGCATAAAGGTCATTGTTGACGCGGTC 420

Query 421  ATCAATCATACCACAGTGACTATGCAGCGATTTCGAATGAAATTAGAGTATTCCAAC 480
          |||
Sbjct 421  ATCAATCATACCACAGTGATTATGCCGCGATTTCGAATGAGATTAGAGTATTCCAAC 480

Query 481  TGGACACATGGAACACACAAATAAAACTGGTCTGATCGATGGGATGTCACGCAGAAT 540
          |||
Sbjct 481  TGGACACATGGAACACGCAAAATAAAACTGGTCTGATCGATGGGATGTCACGCAGAAT 540

Query 541  TCATTGCTCGGGCTGTATGACTGGAATACACAAAATACACAAGTACAGTCTATCTGAAA 600
          |||
Sbjct 541  TCATTGCTCGGGCTGTATGACTGGAATACACAAAATACACAAGTACAGTCTATCTGAAA 600

Query 601  CGGTTCTTAGAAAGAGCATTGAATGACGGGGCAGAGGATTTCGCTTTGATGCCGCCAAA 660
          |||
Sbjct 601  CGGTTCTTAGAAAGAGCATTGAATGACGGGGCAGAGGATTTCGCTTTGATGCCGCCAAA 660

Query 661  CATATAGAGCTTCGGATGATGGCAGTTACGGCAGTCAATTTTGGCCGAATATCACAAT 720
          |||
Sbjct 661  CATATAGAGCTTCGGATGATGGGAGTTACGGCAGTCAATTTTGGCCGAATATCACAAT 720

Query 721  ACAGCTGCAGAGTTCCAATACGGAAAAATCCTGCAGGATAGTGCTCCAGAGATGCTTCA 780
          |||
Sbjct 721  ACATCTGCAGAGTTCCAATACGGAGAAATCCTGCAGGATAGTGCTCCAGAGATGCTGCA 780

Query 781  TATGCGAATTATATGAATGTGACAGCGTCTAACTATGGGCATTCCATAAGGTCCGCTTTA 840
          |||
Sbjct 781  TATGCGAATTATATGAATGTGACAGCGTCTAACTATGGGCATTCCATAAGGTCCGCTTTA 840

Query 841  AAGAATCGCAATCTGGGCGTGTGAAATATCTCCACTATGCATCTGATGTGTCTGGGGAC 900
          |||
Sbjct 841  AAGAATCGTAATCTGGGCGTGTGAAATATCTCCACTATGCATCTGATGTGTCTGGGGAC 900

Query 901  AAGCTAGTGACATGGGTGGAGTGCATGATACGTATGCCAATGATGATGAAGAGTCGACA 960
          |||
Sbjct 901  AAGCTAGTGACATGGGTAGAGTGCATGATACGTATGCCAATGATGATGAAGAGTCGACA 960

Query 961  TGGATGAGCGATGATGATATCCGTTTAGGCTGGGCGGTGATAGCTTCTCGTTCAAGCAGT 1020
          |||
Sbjct 961  TGGATGAGCGATGATGATATCCGTTTAGGCTGGGCGGTGATAGCTTCTCGTTCAAGCAGT 1020

```

Figure 5. Nucleotide sequence alignment of *B. subtilis* D1-1 α -amylase gene compared with the same regions of *B. subtilis* (accession No. EU195860.1) in GenBank database (NCBI) (99% similarity). The start (ATG) and stop (TGA) codons are highlighted.

```

Query 1021 ACGCCTCTTTTCTTTTCCAGGCCTGAGGGAGGCGGAAATGGTGTGAGATTCCCGGGGAAA 1080
Sbjct 1021 ACGCCTCTTTTCTTTTCCAGACCTGAGGGAGGCGGAAATGGTGTGAGATTCCCGGGGAAA 1080

Query 1081 AGCCAAATAGGCGATCGCGGGAGTGCTTTATTTGAAGATCAGGCTATCACTGCGGTCAAT 1140
Sbjct 1081 AGCCAAATAGGCGATCGCGGGAGTGCTTTATTTGAAGATCAGGCTATCACTGCGGTCAAT 1140

Query 1141 AGATTTACAATGTGATGGCAGGACAGCCTGAGGAACCTCGAATCCGAATGGAACAAC 1200
Sbjct 1141 AGATTTACAATGTGATGGCTGGACAGCCTGAGGAGCTCTGAATCCGAATGGAACAAC 1200

Query 1201 CAGATATTTATGAATCAGCGGGCTCACATGGCGTTGTGCTGGCAATGCAGGTTTCATCC 1260
Sbjct 1201 CAGATATTTATGAATCAGCGGGCTCACATGGCGTTGTGCTGGCAATGCAGGTTTCATCC 1260

Query 1261 TCTGTTTCTATCAATACGCCAACAAAATTCGCTGATGGCAGATATGACAATAAAGCTGGG 1320
Sbjct 1261 TCTGTTTCTATCAATACGCCAACAAAATTCGCTGATGGCAGGATATGACAATAAAGCTGGG 1320

Query 1321 GCAGGTTCAATTTCAAGTGAATGATGGTAACTGACAGGCACGATCAATGCCAGGTCGTG 1380
Sbjct 1321 GCAGGTTCAATTTCAAGTGAATGATGGTAACTGACAGGCACGATCAATGCCAGGTCGTG 1380

Query 1381 GCTGTGCTTTATCCTGATGATATTGCAAAAGGCGCTCATGTTTTCTTGAGAATTACAAA 1440
Sbjct 1381 GCTGTGCTTTATCCTGATGATATTGCAAAAGGCGCCCATGTTTTCTTGAGAATTACAAA 1440

Query 1441 ACAGGTGTAACACATTCTTTCAATGATCAACTGACGATTACCTTGCGTGAGATGCGAAT 1500
Sbjct 1441 ACAGGTGTAACACATTCTTTCAATGATCAACTGACGATTACCTTGCGTGAGATGCGAAT 1500

Query 1501 ACAACAAAAGCGGTTTATCAAATCAATAATGGACAGAGACGGCGTTTAGGGATGGAGAT 1560
Sbjct 1501 ACAACAAAAGCGGTTTATCAAATCAATAATGGACAGAGACGGCGTTTAGGGATGGAGAT 1560

Query 1561 CAATTACAAATCGGAAAAGGAGATCCATTTGGCAAAACATACACCATCATGTTAAAAGGA 1620
Sbjct 1561 CAATTACAAATCGGAAAAGGAGATCCATTTGGCAAAACATACACCATCATGTTAAAAGGA 1620

Query 1621 ACGAACAGTGATGGTATAACGAGGGCCGAGGAATACAGTTTTGTAAAAGAGATCCAGCT 1680
Sbjct 1621 ACGAACAGTAATGGTGTAAACGAGGGCCGAGGAATACAGTTTTGTAAAAGAGATCCAGCT 1680

Query 1681 TCGGCCAAAACCATCGGCTATCAAAATCCGAATCATTGGAGCCAGGTAATGCTTATATC 1740
Sbjct 1681 TCGGCCAAAACCATCGGCTATCAAAATCCGAATCATTGGAGCCAGGTAATGCTTATATC 1740

Query 1741 TATAAATGATGGGAGCGGGCAATTGAATTGACCGGATCTTGCGCTGGAACCAATG 1800
Sbjct 1741 TATAAATGATGGGAGCGGGCAATTGAATTGACCGGATCTTGCGCTGGAACCAATG 1800

Query 1801 ACTAAAAATGCAGACGGAATTTACAGCTGACGCTGCTGCGGATACGGATACAACCAAC 1860
Sbjct 1801 ACTAAAAATGCAGACGGAATTTACAGCTGACTCTGCTGCGGACACGGATACAACCAAC 1860

Query 1861 GCCAAAGTGATTTTAAATAATGGCAGCGCCCAAGTGCCCGGCCAGAATCAGCCTGGCTTT 1920
Sbjct 1861 GCCAAAGTGATTTTAAATAATGGCAGCGCCCAAGTGCCCGGCCAGAATCAGCCTGGCTTT 1920

Query 1921 GATTACGTGCAAAATGGTTTATATAATGACTCGGGCTTAAGCGGTTCTCTTCCTTATTGA 1980
Sbjct 1921 GATTACGTGCAAAATGGTTTATATAATGACTCGGGCTTAAGCGGTTCTCTTCCTTATTGA 1980

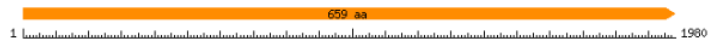
```

Figure 5. (cont.) Nucleotide sequence alignment of *B. subtilis* D1-1 α -amylase gene compared with the same regions of *B. subtilis* (accession No. EU195860.1) in GenBank database (NCBI) (99% similarity). The start (ATG) and stop (TGA) codons are highlighted.

ORF Sequence

unnamed sequence

Coding region: 1..1980



[\[Edit\]](#) - [\[Delete\]](#) - [\[Add new ORF\]](#) - [\[Locate multiple cutters that excise this ORF\]](#) - [\[Silent Mutagenesis\]](#)

Protein sequence:

> 659 aa

```

MFAKRFKTS LPLFAGFLLL FHLVLGAPAA ASAETANKSN ELTAPSIKSG
TILHAWNWSF NTLKHNMKDI HDAGYTAIQT SPINQVKEGN QGNKSMSNMY
WLYQPTSYQI GNRYLGTEQE FKEMCAAAEE YGIKVIVDAV INHTTSDYAA
ISNEIKSIPN WTHGNTQIKN WSDRWDVTQN SLLGLYDWN TQNTQVQSYLK
RFLERALNDG ADGFRFDAK HIELPDDGSY GSQFWPNITN TAAEFQYQKI
LQDSASRDAS YANYMNVAS NYGHSIRSAL KNRNLGVSNI SHYASDVSA
KLVTWVESH DTYANDEEST WMSDDDIRLG WAVIASRSGS TPLFFSRPEG
GGNGVRFPGK SQIGDRGSAL FEDQAITAVN RHHNMAGQP EELSNPNNGN
QIFMNRGSH GWLANAGSS SVSINTPTKL PDGRYDNKAG AGSFQVNDGK
LTGTINARSV AVLYPDDIAK APHVLENYK TGVTHSFNDQ LTITLRADAN
TTKAVYQINN GPETAFRDGD QFTIGKDPF GKTYTIMLKG TNSDGITRAE
EYSFVKRDP SAKTIGYQNP NMSQVNAYI YKHGDSRAIE LTGSMWPKPM
TKNADGIYTL TLPADTDTN AKVIFNNGSA QVPGNQPGF DYVQNGLYND
SGLSGSLPY

```

Figure 6. The amino acid sequence of α -amylase gene (659 amino acids) analyzed by NEBcutter2 software.

```

>gb|ABW75769.1| alpha-amylase [Bacillus subtilis]
Length=659

Score = 1353 bits (3502), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 651/659 (99%), Positives = 659/659 (100%), Gaps = 0/659 (0%)

Query 1 MFAKRFKTSLLPLFAGFLLL FHLVLGAPAAASAETANKSNELTAPSIKSGTILHAWNWSF 60
Sbjct 1 MFAKRFKTSLLPLFAGFLLL FHLVLGAPAAASAETANKSNELTAPSIKSGTILHAWNWSF 60

Query 61 NTLKHNMKDIHDAGYTAIQTSPINQVKEGNQGNKSMSNMYWLYQPTSYQIGNRYLGTEQE 120
Sbjct 61 NTLKHNMKDIHDAGYTAIQTSPINQVKEGNQGNKSMSNMYWLYQPTSYQIGNRYLGTEQE 120

Query 121 FKEMCAAAEEYGIKVIVDAVINHTTSDYAAISNEIKSIPNWIHGNTQIKNWSDRWDVTQN 180
Sbjct 121 FKEMCAAAEEYGIKVIVDAVINHTTSDYAAISNEIKSIPNWIHGNTQIKNWSDRWDVTQN 180

Query 181 SLLGLYDWN TQNTQVQSYLKRFLERALNDGADGFRFDAK HIELPDDGSYGSQFWPNITN 240
Sbjct 181 SLLGLYDWN TQNTQVQSYLKRFLERALNDGADGFRFDAK HIELPDDGSYGSQFWPNITN 240

Query 241 TAAEFQYQKILQDSASRDASYANYMNVASNYGHSIRSALKNRNLGVSINSHYASDVSA 300
Sbjct 241 TAAEFQYQKILQDSASRDASYANYMNVASNYGHSIRSALKNRNLGVSINSHYASDVSA 300

Query 301 KLVTWVESHDTYANDDEESTWMSDDDIRLGWAVIASRSGSTPLFFSRPEGGGNGVRFPGK 360
Sbjct 301 KLVTWVESHDTYANDDEESTWMSDDDIRLGWAVIASRSGSTPLFFSRPEGGGNGVRFPGK 360

Query 361 SQIGDRGSALFEDQAITAVNRHHNMAGQPEELSNPNNGNQIFMNRGSHGVLANAGSS 420
Sbjct 361 SQIGDRGSALFEDQAITAVNRHHNMAGQPEELSNPNNGNQIFMNRGSHGVLANAGSS 420

Query 421 SVSINTPTKLPDGRYDNKAGAGSFQVNDGKLTGTINARSVAVLYPDDIAKAPHVLENYK 480
Sbjct 421 SVSINTPTKLPDGRYDNKAGAGSFQVNDGKLTGTINARSVAVLYPDDIAKAPHVLENYK 480

Query 481 TGVTHSFNDQLTITLRADANTTKAVYQINNGPETAF+DGDQFTIGKGDFFGKTYTIMLKG 540
Sbjct 481 TGVTHSFNDQLTITLRADANTTKAVYQINNGPETAF+DGDQFTIGKGDFFGKTYTIMLKG 540

Query 541 TNSDGITRAEYYSFVKRDPASAKTIGYQNPNNHWSQVNAYIYKHGDSRAIELTGSWPGKPM 600
Sbjct 541 TNSDGITRAEYYSFVKRDPASAKTIGYQNPNNHWSQVNAYIYKHGDSRAIELTGSWPGKPM 600

Query 601 TKNADGIYTLTLPADTDTTNAKVIFFNNGSAQVPGNQPGFDYVQNGLYNDSGLSGSLPY 659
Sbjct 601 TKNADGIYTLTLPADTDTTNAKVIFFNNGSAQVPGNQPGFDYVQNGLYNDSGLSGSLPH 659

```

Figure 7. Amino acids sequence of α -amylase gene from *B. subtilis* D1-1 compare with *B. subtilis* (Accession No. ABW75769.1) in Protein database (NCBI).

การสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแอลฟา อะไมเลส ใน Expression Vector pQE-80L โดยการตัดชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอตรงส่วนของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *HindIII* ของยีนแอลฟา อะไมเลส และ พลาสมิดเวกเตอร์ pQE-80L vector สามารถตรวจพบชิ้นส่วนของ Expression Vector pQE-80L ที่ได้มีขนาดประมาณ 4.8 กิโลเบส และได้ชิ้นส่วนของยีนแอลฟา อะไมเลส ขนาดประมาณ 2 กิโลเบส (Figure 8) ภายหลังจากนำชิ้นส่วนของยีนแอลฟา อะไมเลส มาเชื่อมต่อกับ Expression Vector pQE-80L โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสม ขนาดประมาณ 7 กิโลเบส (Figure 9a, 9b) ถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α สามารถตรวจสอบพบการปรากฏของยีนแอลฟา อะไมเลส ด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *HindIII* ซึ่งจะได้อินตอน 2 ขนาด คือ ชิ้นขนาด 4.8 กิโลเบส สำหรับเวกเตอร์ pQE-80L และ ชิ้นยีนแอลฟา อะไมเลส ขนาด 1,980 คู่เบส สำหรับการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์เวกเตอร์ pQE (forward), pQE (reverse) และการใช้ไพรเมอร์ของยีนแอลฟา อะไมเลส Bamy401F, Bamy401R ทำให้ได้ขนาดของผลผลิต PCR ประมาณ 2 กิโลเบส และ 1,980 คู่เบสตามลำดับ (Figure 10)

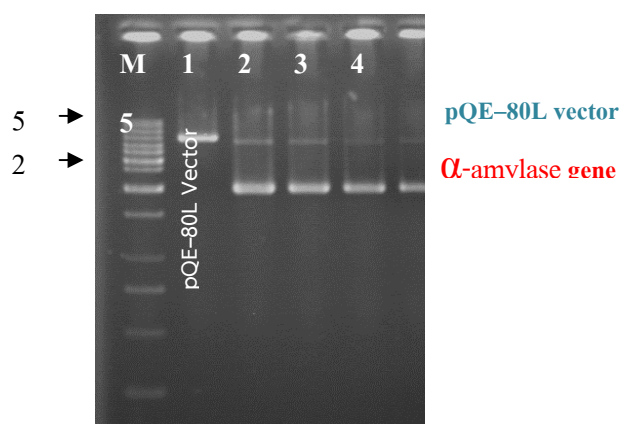


Figure 8. The purified DNA fragment of a protein expression vector (pQE-80L) and α -amylase gene were digested with enzyme *KpnI* and *HindIII* before combined these two DNA fragment as recombinant DNA. Lane M; 1 kb ladder (Fermentas), lane 1; Plasmid DNA of expression vector pQE-80L digested with specific enzyme *KpnI* and *HindIII*, lane 2-5; Plasmid DNA of α -amylase gene digested with specific enzyme *KpnI* and *HindIII*.

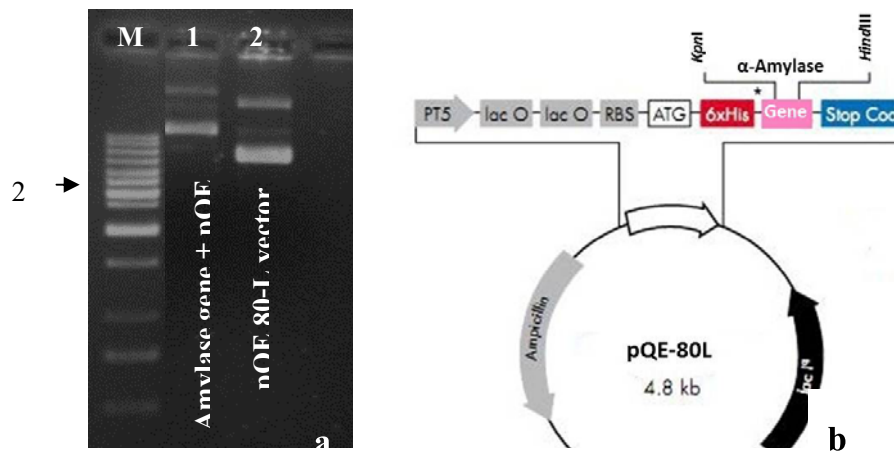


Figure 9 a. The recombinant plasmid DNA of alpha amylase gene insert to pQE-80L vector. Lane M; 1 kb ladder (Fermentas), lane 1; Plasmid DNA fragment of alpha amylase gene insert into expression vector pQE-80L, lane 2; Plasmid DNA fragment of expression vector pQE-80L. b. The map of recombinant pQE-80L vector.

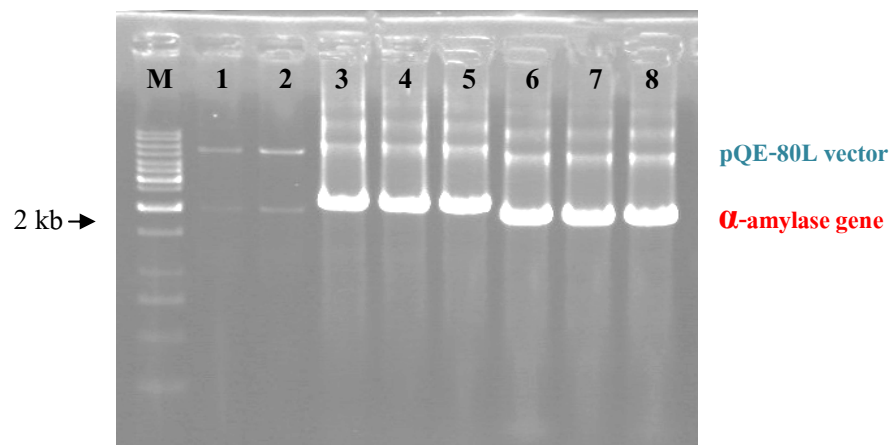


Figure 10. Selected colony of *E. coli* contained recombinant plasmid DNA (pQE-80L- α -amylase gene) were confirmed by enzymes digestion and PCR analysis. Lane M, 1 kb ladder (Fermentas); lane 1-2, Pattern of recombinant plasmid DNA were extracted and digested with specific enzyme *KpnI* and *HindIII*; lane 3-5, α -mylase gene fragment derived from colony amplification using specific primer pQE (forward) and pQE (reverse); lane 6-8, PCR analysis of plasmid DNA (pQE-80L- α -amylase gene) using specific primer Bamy401F (forward) and Bamy401R (reverse).

5. การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแอลฟา อะไมเลส

5.1 การชักนำการแสดงออกของโปรตีน (fusion protein) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

การถ่ายฝากพลาสมิดจีเอ็มเอสสายผสมของยีนแอลฟา อะไมเลส เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เมื่อทำการเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย IPTG และ Lactose ที่ความเข้มข้น 3 mM เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง เก็บเซลล์ทุก 2 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นการแสดงออกของโปรตีนจะเริ่มคงที่โดยรีคอมบิแนนท์แอลฟา อะไมเลส ที่ได้มีขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (Figure 11) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Numan *et al.* (2001) ได้ทำการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลส จากเชื้อ *B. subtilis* RSKK246 พบว่าเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 65 กิโลดาลตัน โดยยีนแอลฟา อะไมเลส ที่โคลนได้มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 1.7 กิโลเบส

5.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ปริมาณ fusion protein ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การทำ crude enzyme ซึ่งได้จากการทำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีนแอลฟา อะไมเลส ซึ่งมีส่วนของ T5 promoter ในการทำหน้าที่ถอดรหัสและแปลรหัสของยีนออกมาเป็นโปรตีน และมีตำแหน่งของ N-terminal 6xHis tag สามารถทำบริสุทธิ์โดยใช้ HisTALON™ Gravity Columns มี TALON Resin (cobalt-based resin) เป็นลิแกนด์ เพื่อให้การทำบริสุทธิ์เกิดความจำเพาะสูง (Froelich *et al.*, 1996; Stephens *et al.*, 1997) โดย TALON Resin จะจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีนที่ตำแหน่งปลายด้าน N-terminal ของโปรตีน (His tag) ทำให้โปรตีนที่ไม่จำเพาะอื่นๆ ให้หลุดออกจากคอลัมน์ แล้วจึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของ imidazole ซึ่งจะเข้าไปจับกับคอลัมน์แทนกรดอะมิโนฮิสทีดีนของโปรตีน ทำให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์หลุดออกมา เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE พบเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73 กิโลดาลตัน (Figure 12)

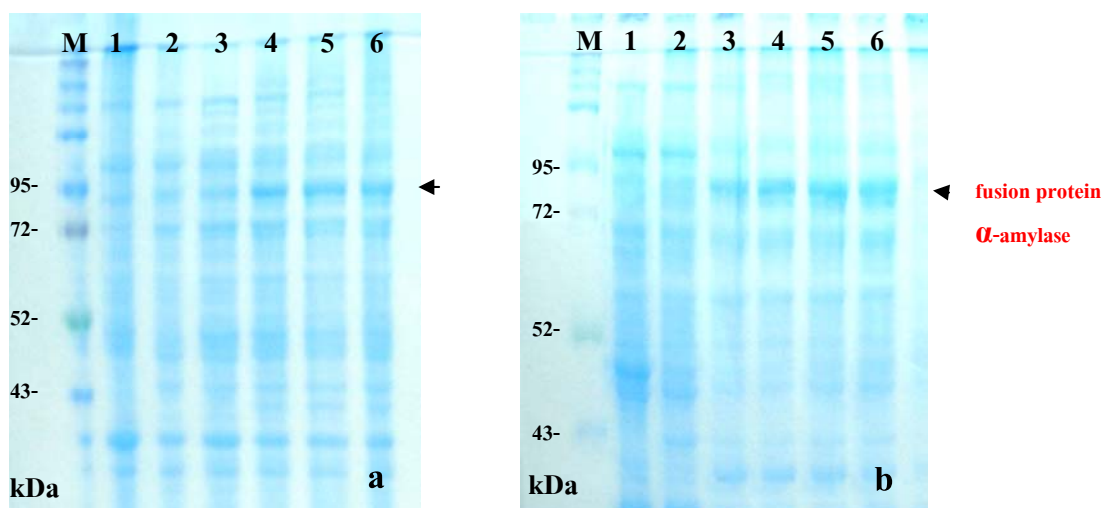


Figure 11 a. SDS-PAGE analysis to detect fusion protein α -amylase generated from pQE-80L vector after induction with 3mM IPTG for 6 hrs. Lane M, molecular mass standards; lane 1, *E. coli* BL21 without induction; lane 2, pQE-80L- α -amylase without induction; lane 3- 6, pQE-80L- α -amylase induction for 2, 4, 6, and 8h respectively.
b. SDS-PAGE analysis to detect fusion protein α -amylase generated from pQE-80L vector after induction with 3mM Lactose for 6 hrs. Lane M, molecular mass standards; lane 1, *E. coli* BL21 without induction; lane 2, pQE-80L- α -mylase without induction; lane 3- 6, pQE-80L- α -amylase induction for 2, 4, 6, and 8hrs respectively.

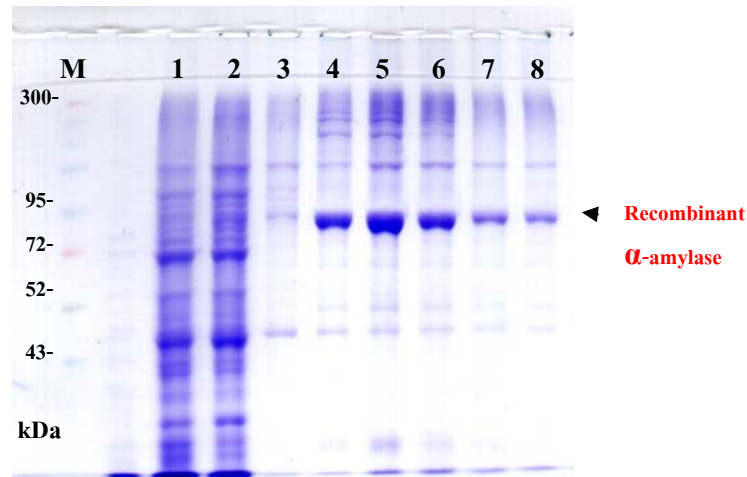


Figure 12. SDS-PAGE analysis of recombinant α -mylase generated from pQE-80L vector after induction with 3mM Lactose for 6 hrs. Lane M, molecular mass standards; lane 1, flow- through fractions; lane 2, washing fractions; lane 3-8, eluted fractions of recombinant α -mylase from purification column.

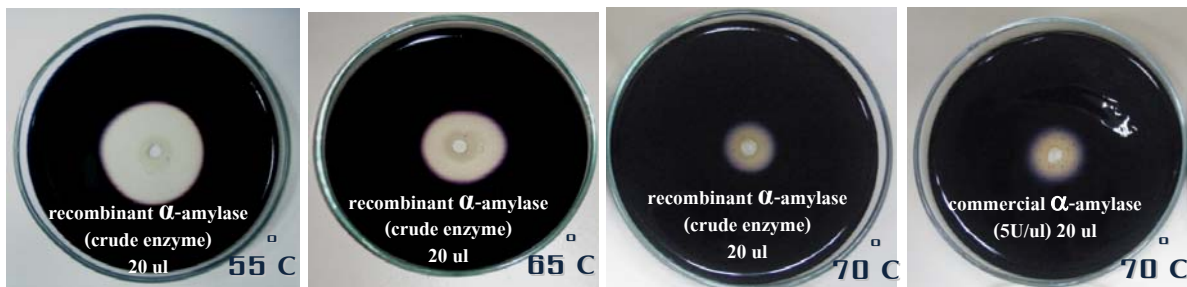


Figure 13. Recombinant α -amylase activity on 1% starch agar at 55°C, 65°C and 70°C for 6 hrs compared with commercial enzyme activity at 70°C.

จากการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์แอลฟา อะไมเลส ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าที่คำนวณได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Matagne *et al.* (1991) ได้ทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่น พบว่าการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่าการคำนวณที่สอดคล้องกับขึ้นประมาณ 30-40 % โดยอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ carboxylic groups ของ Aspartic acid-Asp-D และ Glutamic acid-Glu-E (Kaufmann *et al.*, 2004)

5.3 การทดสอบกิจกรรมของ crude protein โดยวิธี Bioassay technique

การทดสอบกิจกรรมการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยวิธี Bioassay plate technique โดยใช้ crude protein หรือ crude enzyme ที่ได้จากการทำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เมื่อนำมาทดสอบในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1% เป็นองค์ประกอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เปรียบเทียบกับเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส (ที่ผลิตเป็นการค้า ความเข้มข้น 5 ยูนิต/ไมโครลิตร) ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร เท่ากัน พบว่า crude enzyme ทำงานได้ดีที่สุด ที่สภาวะอุณหภูมิสูง 55°C และที่อุณหภูมิสูง 70°C เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมที่ดี

ใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า (Figure 13) ซึ่ง crude enzyme ที่ผลิตได้สามารถพัฒนาศักยภาพให้ดียิ่งขึ้นโดยอาศัยเทคโนโลยีอื่นเข้าช่วย นั่นคือ เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) ซึ่งจัดเป็นวิธีที่ช่วยในการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้สูงขึ้น นอกจากนี้การทำแห้งแบบเยือกแข็งยังช่วยในการคงสภาพกิจกรรมของเอนไซม์และยืดอายุการเก็บรักษาคุณสมบัติของเอนไซม์ให้คงที่ (Carpenter *et al.*, 1990)

สรุปผลการทดลอง

การเก็บรวบรวมเชื้อ *Bacillus* spp. บริสุทธิ์จากแหล่งต่างๆ สามารถคัดแยกได้ทั้งสิ้น 476 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาและคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp. ที่มีศักยภาพในการย่อยแป้งจากแหล่งต่างๆ โดยวัดการสร้างวงใส (Clear zone) รอบโคโลนีบนอาหาร starch agar การทำให้น้ำแป้งเหลว (liquefaction) ในอาหารที่มีแป้ง 1% เป็นองค์ประกอบ และตรวจวัดกิจกรรมการย่อยแป้งในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท D1-1 ซึ่งแยกได้จากน้ำเสียและเศษมันเส้นจากลานมันสำปะหลัง มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง 55°C เมื่อนำมาจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของบริเวณ 16S rDNA แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* ที่ความเหมือน 99%

การโคลนยีนแอลฟา อะไมเลส จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลท D1-1 ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีนอะไมเลสด้วยเทคนิค PCR ตรวจพบชิ้นส่วนของยีนที่ได้มีขนาด 1,980 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับยีนแอลฟา อะไมเลส ของเชื้อ *B. subtilis* (Accession No. EU195860.1) ที่ความเหมือน 99 % และมีลำดับของเปปไทด์โปรตีนเท่ากับ 659 อะมิโนแอซิด ทำการเชื่อมต่อเข้ากับ protein expression vector pQE-80L แล้วถ่ายยีนยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟา อะไมเลส พบว่าสามารถชักนำการแสดงออกของยีนด้วย 3 mM IPTG และ 3 mM Lactose ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยสามารถนำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน HisTALON™ Gravity Columns เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73 กิโลดาลตัน

การทดสอบกิจกรรมของ crude enzyme โดยวิธี Bioassay technique ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง พบว่า รีคอมบิแนนท์แอลฟา อะไมเลส ที่ผลิตได้ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 70°C เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีน (เอนไซม์แอลฟา อะไมเลส) ที่ผลิตได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมมีศักยภาพในการย่อยแป้งได้ดี ที่สภาวะอุณหภูมิ 55°C และที่สภาวะอุณหภูมิ 70°C เอนไซม์ยังมีกิจกรรมที่ดีเทียบเท่ากับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

จากการทดลองยังพบว่าการใช้สาร IPTG และ Lactose ที่ความเข้มข้น 3 mM เท่ากัน มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนแอลฟา อะไมเลส ได้ใกล้เคียงกัน แต่การใช้ Lactose จะช่วยลดต้นทุนการผลิตโปรตีนในระดับ large scale ได้มากยิ่งขึ้น เนื่องจาก Lactose ปริมาตร 1 กิโลกรัม ราคาไม่ถึง 1,000 บาท แต่ในขณะที่ IPTG ปริมาตร 1 กรัม ราคาประมาณ 1,800 บาท (AMRESCO®)

การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

จากผลการทดลองพบว่า crude enzyme ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้าที่อุณหภูมิ 70°C ทำให้นักวิจัยของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สามารถนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อคัดเลือกพันธุ์กรรมมันสำปะหลังที่สามารถผลิตเอทานอลสูง ในช่วงอายุ 8, 12 และ 14 เดือน โดยได้ดำเนินการมาแล้ว 2 ปี

แบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม *Bacillus subtilis* ไอโซเลท D1-1 สามารถนำไปใช้ในกระบวนการย่อยแป้งในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการเอทานอล ผลิต syrup ล้างท่อ และ detergent เป็นต้น

สามารถนำเทคโนโลยีการผลิตเอนไซม์โดยพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ไปปรับใช้กับการ over expression ในเอนไซม์ที่ย่อยสลาย lingocellulose ในโครงการอื่นๆต่อไป และสามารถใช้เป็นต้นแบบในการผลิตเอนไซม์ในเชิงพาณิชย์ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้รวดเร็วกว่าการใช้เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยร่วมกับเอนไซม์ย่อยแป้งชนิดอื่น เช่น เอนไซม์กลูโคสไมเลส การส่งถ่ายยีนอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้ดี หรือ ทนแอลกอฮอล์สูงต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. อมรรัตน์ ชุมทอง มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ในการอนุเคราะห์เชื้อ *Bacillus* spp. บางส่วนสำหรับใช้ในงานวิจัยและนางสาวธนวรรณ พูลเสมอ ผู้ช่วยนักวิจัย สำหรับความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2546. คู่มือวิชาการระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ เล่มที่ 1. กรมควบคุมมลพิษ กรุงเทพฯ. 160 หน้า
- ปาริชาติ วัฒนา ประภา เพื่องฟูพงศ์ และ มวลัย เมืองน้อย. 2519. การผลิต starch syrup จากแป้งมันสำปะหลังโดยการไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ กรด และเอนไซม์กับกรดร่วมกัน. หน้า 303-315. ใน : รายงานผลการวิจัยประเภทอาจารย์และศาสตราจารย์ ประจำปี 2519. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุกัญญา จันทะชุม. 2522. การผลิตและการใช้ประโยชน์ของกลูโคสไมเลสจากเชื้อจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- Adam, M. 1953. Amylase : their kinds and properties and factors which influence their activity. Food Technol. 7 : 35-38.
- Alm, E. W., D. B. Oerther, N. Larsen, D. A. Stahl and L. Raskin. 1996. The oligonucleotide probe database. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 3557-3559.
- Beckord, L. D. and E. Kneen. 1946. Quantity and Quality of amylase produced by various bacterial isolates. Arch. Biochem. 9 : 41-54.
- Buonocore, V., C. Caporale, M. De Rosa and A. Gambacorta. 1976. Stable, inducible thermoacidophilic a amylase from *Bacillus acidocaldarius*. J. Bacteriol. 128 : 515-521.

- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. The William & Wilkins, Co., Baltimore.
- Carpenter, J. F., T. Arakawa and J. H. Crowe. 1990. Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *Dev. Biol. Stand.* 74 : 225-239.
- Cornelis, P., C. Digneffe and K. Willemot. 1982. Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 186 : 507-511.
- Fritsch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Froelich, C. J., J. Turbov and W. Hanna. 1996. Human perforin: rapid enrichment by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) for whole cell cytotoxicity assays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229 (1) : 44-49.
- Hesseltine, C. W., M. Smith, B. Bradle and K. S. Djien. 1963. Investigation on tempeh, an Indonesian food. *Dev. Ind. Microbiol.* 4 : 275-287.
- Ingle, M. B. and R. J. Erickson. 1978. Bacterial α -amylase. *Advances in Appl. Microbiol.* 24 : 257-278.
- Kaufmann, E., N. Geisler and K. Weber. 1984. SDS-PAGE Strongly Overestimates the Molecular Masses of the Neurofilament Proteins. *FEBS Lett.* 170 (1) :81-84.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*. ed. Stackebrandt, E. and M. Goodfellow. pp. 115–175. John Wiley & Sons, Chichester.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- Maloy, S.R., 1990. Experimental techniques in bacterial genetics: Jones and Bartlett series in biology. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Matagne, A., B. Joris and J.-M. Frere. 1991. Anomalous Behaviour of a Protein During SDS/PAGE Corrected by Chemical Modification of Carboxylic Groups. *Biochem. J.* 280:553-556.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153 : 375-380.
- Numan, Z., A. Adem and M. S. EKÜNCÜ. 2001. Molecular Cloning of an α -Amylase Gene from *Bacillus subtilis* RSKK246 and Its Expression in *Escherichia coli* and in *Bacillus subtilis*. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 25 : 197-201.
- Ray, R. R., S. C. Jana and G. Nanda. 1996. Induction and catabolite repression in the Biosynthesis of β -amylase by *Bacillus megaterium* B6. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 38 : 223-230.
- Robyt, J. F. and R. J. Ackerman. 1972. Complex carbohydrates Part B. Method in Enzymology. Academic Press, New York.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Skoog D.A., D.M. West and F.J. Holler. 1996. Fundamentals of Analytical Chemistry, 7th edn. Saunders College Publishing, New York.
- Stephens, L. R., A. Eguinoa, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, F. Cooke, J. Coadwell, A. S. Smrcka, M. Thelen, K. Cadwallader, P. Tempst and P. T. Hawkins. 1997. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89 (1) : 105–114.
- Takasaki, Y. 1979. Preservation of bacterial β -amylase. *Micro. Abstr.* 15 (5) : 8.
- Thomas, M., F. G. Priest and J. R. Stark. 1980. Characteristics of an extracellular β -amylase from *B. megaterium sensu stricto*. *J. Gen. Microbiol.* 118 : 67-72.
- Ureda, S. and J. J. Marshall. 1980. Raw Starch Digestion by *B. polymyxa* beta-amylase. *Micro. Abstr.* 16 (5) : 5.
- Windish, W.W. and N.S. Mhatre. 1965. Microbial amylase. *Advances in Appl. Microbiol.* 7 : 273-283.