

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสร้างยีสต์ลูกผสม *Kluyveromyces lactis*
ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสในการผลิตเอทานอล

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT *Kluyveromyces lactis*
PRODUCING AMYLASE FOR ETHANOL PRODUCTION



T123744

ปรียานันท์ ศิระประภาภัสต์

PREEYANUN SIRAPRAPAT

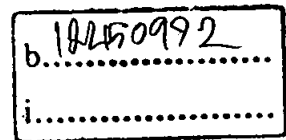
จพ.

2/47217

เลขหมู่..... 2555

เลขทะเบียน... 123744

รับ. เดือน. ปี. 28. 11. 2555



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-AG-M-101-121

**CONSTRUCTION OF RECOMBINANT *Kluyveromyces lactis*
PRODUCING AMYLASE FOR ETHANOL PRODUCTION**

PREEYANUN SIRAPRAPAPAT

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2012

KMITL-2012-AG-M-101-121

COPYRIGHT 2012

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างยีสต์ลูกผสม *Kluyveromyces lactis* ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสในการผลิตเอทานอล
Construction of Recombinant *Kluyveromyces lactis* Producing Amylase for Ethanol Production

นักศึกษา นางสาวปริญนันท์ ศิริประภาภัสส์
รหัสประจำตัว 52640903
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ	
ผศ.ดร.กัญญา	แซ่เตียว	12 25
ดร.ปรีดา	เลิศวัชรสารกุล	2/24
ผศ.ดร.กัญญา	จิระเจริญรัตน์	กัญญา
ดร.อพัชชา	จินดาประเสริฐ	อพัชชา
ผศ.ดร.กนกรัตน์	ศรีกิจเกษมวัฒน์	กนกรัตน์ อังทองเกษมวัฒน์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 4 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้องโสตฯ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง (ชั้น 3 อาคารบุณนาค L)

คณบดีรับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ ๒๒... เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างยีสต์ลูกผสม <i>Kluyveromyces lactis</i> ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสในการผลิตเอทานอล
นักศึกษา	นางสาวปรียนันท์ ศิริระประภาภัสส์
รหัสประจำตัว	52640903
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2555
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนอะไมเลสในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 13 (GHF13) จากเชื้อ *Bacillus* sp. จำนวน 5 ไอโซเลท (1-16, 5-4, 5-7, 7-13 และ 7-14) ที่แยกได้จากถั่วเน่าที่เป็นอาหารหมักทางภาคเหนือ ซึ่งพบมีการสร้างโซนาในรูปโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นสับสเตรต สามารถเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลสได้จากโคโลนี 1-16/2 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนอะไมเลสของเชื้อ *Bacillus* sp. ใน GHF13 โดยยีนที่ได้มีขนาด 1,665 คู่เบส และสามารถแปลรหัสได้ 555 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 กิโลดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อ *Bacillus cereus* AH676 (ZP_04190019.1) โครงสร้างของโปรตีนจากการวิเคราะห์พบว่ามี signal peptide ที่กรดอะมิโนตัวที่ 1-11 จากปลายด้านหมู่อะมิโน มีโดเมนแอลฟา-อะไมเลสที่ตำแหน่ง 28-374 และมีโดเมน Cyclo-malto-dextrinase ที่ตำแหน่ง 487-518 เมื่อทำการโคลนยีน 1-16/2 แทรกในเวกเตอร์ pKLAC2 และถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์เจ้าบ้าน *Kluyveromyces lactis* GG799 ได้ยีสต์ลูกผสมเรียกว่า pK1-16/2C3A4 ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้หลังออกนอกเซลล์ มีสภาพที่เหมาะสมในการทำงานเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรตที่ pH 5 อุณหภูมิ 80°C มีความเสถียรในสภาวะกรด-ด่างช่วง pH 3-6 สามารถทนความร้อนได้ที่ 50°C นาน 1 ชั่วโมง มีค่า V_{max} และ K_m เท่ากับ 431.93 U/mg และ 2.92 mg/ml ตามลำดับ สารละลาย LiCl NaCl CaCl₂ SrCl₂ HgCl₂ และ EDTA สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เอนไซม์จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 สามารถย่อยแป้งได้ดีกว่าเอนไซม์จากยีสต์ *K. lactis* (wild type) แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ *K. lactis* เอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสมสามารถย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีกว่าเอนไซม์ทางการค้าได้แก่ Heat stable amylase, Termamyl 120 LS และ Spezyme 300 ขณะที่

เอนไซม์ทางการค้าสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งสาลี และแป้งข้าว
เจ้าได้ดีกว่า จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีสต์ลูกผสม *K. lactis* ที่มียีนแอลฟา-อะไมเลสที่โคลนได้จาก
เชื้อ *Bacillus* sp. สามารถนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยแป้งแต่อย่างไรก็ตามยังต้อง
ทำการพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในการหมักเอทานอลต่อไป

Thesis Title	Construction of Recombinant <i>Kluyveromyces lactis</i> Producing Amylase for Ethanol Production
Student	Miss Preeyanun Siraprapapat
Student ID.	52640903
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2012
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Kanya Jirajoenrat
Thesis Co-Advisor	Dr. Aphacha Jindaprasert

ABSTRACT

This study aims to clone an amylase gene in the glycosyl hydrolase family 13 (GHF13) from 5 isolates (1-16, 5-4, 5-7, 7-13 and 7-14) of *Bacillus* sp. cultured from the traditionally fermented soybean of Northern Thailand. The isolates showed halo zone on the agar plate containing the soluble starch. The amylase gene was amplified by polymerase chain reaction using primers specific to the *Bacillus* GHF13 amylase gene from the colony 1-16/2. The gene was 1,665 bp in length and the putative translated sequence was 555 amino acids. The predicted molecular weight was 65 kDa. The amino acid sequence shared the highest identity of 99% to the amylase from *Bacillus cereus* AH676 (ZP_04190019.1). Analyzed protein structure revealed a signal peptide at the amino acid positions 1-11 from N-terminus, alpha-amylase catalytic domain from amino acids 28-374 and cyclo-malto-dextrinase domain from positions 487-518. The gene was cloned into pKLAC2 and transformed into the host yeast *Kluyveromyces lactis* GG799, called pK1-16/2C3A4. The recombinant enzyme was extracellularly secreted. The optimal condition when using a tapioca starch as substrate was at pH 5 and at temperature 80°C. The pH stability was pH 3-6 and the enzyme was able to resist to the temperature at 50°C for 1 hour. The enzymatic V_{max} and K_m values were 431.93 U/mg and 2.92 mg/ml respectively. Solutions including LiCl, NaCl, CaCl₂, SrCl₂, HgCl₂, and EDTA were able to inhibit the enzyme activities. Secreted enzyme from the pK1-16/2C3A4 better degraded the starch but produced less ethanol than that of wild type *K. lactis*. The recombinant enzyme degraded the glutinous rice starch at a higher rate than the commercial enzymes including Heat stable amylase, Termamyl 120 LS and Spezyme 300, whereas the commercial enzymes degraded the tapioca, corn, potato, wheat and

rice starches at a higher rate. This study suggested that the recombinant *K. lactis* containing the alpha-amylase gene of *Bacillus* sp. could be applied for enzyme production for starch degradation, however, it is needed to improve for ethanol fermentation.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เป็นอย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ เป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ เป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รวมทั้ง ผศ.ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสามท่านเป็นอย่างสูงและรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับสนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆคนที่ได้ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจให้กันมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ชายและญาติพี่น้องที่ให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆ ด้านและคอยเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด จนทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี

ปริญญ์ ศิระประกาสต์

ตุลาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XII
สารบัญภาพ.....	XV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัย.....	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เอนไซม์อะไมเลส.....	4
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	7
2.2.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการทำงานของ ของเอนไซม์.....	7
2.2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์.....	8
2.2.3 อิทธิพลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์.....	8
2.3 การศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์อะไมเลส.....	10
2.4 ประโยชน์ของเอนไซม์อะไมเลส.....	12
2.5 แป้ง (starch).....	15
2.5.1 องค์ประกอบภายในแป้ง.....	15
2.5.2 คุณสมบัติของแป้ง.....	16
2.5.3 การผลิตเอทานอลจากแป้ง.....	20
2.6 ยีสต์.....	21
2.6.1 ยีสต์จีนิัส <i>Kluyveromyces</i>	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.2 ยีสต์ <i>Kluyveromyces lactis</i>	23
2.6.3 ประโยชน์ของยีสต์ <i>K. lactis</i> ในอุตสาหกรรม.....	24
2.6.4 การแสดงออกของยีนอะไมเลสในยีสต์ <i>K. lactis</i>	25
2.6.5 การผลิตเอทานอลจากยีสต์ <i>K. latis</i>	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	28
3.1 ที่มาของเชื้อ.....	28
3.2 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง.....	28
3.3 เอนไซม์ทางการค้า.....	28
3.4 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ <i>Bacillus</i> sp.	29
3.5 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอ โดยวิธีแยกขนาดในเจลอะกาโรสภายใต้ กระแสไฟฟ้า.....	29
3.6 การคัดเลือกยีนอะไมเลส.....	30
3.6.1 การออกแบบไพรเมอร์.....	30
3.6.2 การเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	30
3.6.3 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์.....	31
3.6.4 การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์.....	31
3.6.5 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน <i>Esherichia coli</i> DH5 α	31
3.6.6 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>E. coli</i> DH5 α ด้วยวิธี heat shock.....	32
3.6.7 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม.....	32
3.6.8 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening.....	34
3.6.9 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี โคโลนีพีซีอาร์.....	34
3.6.10 การสกัดพลาสมิดลูกผสม.....	34
3.6.11 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....	35
3.6.12 การคัดเลือกโคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ด้วยวิธี activity plate.....	35
3.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนอะไมเลสในยีสต์ <i>K. lactis</i>	36
3.7.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน.....	36

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7.2 การออกแบบไพรเมอร์.....	36
3.7.3 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนอะไมเลสจาก พลาสมิดลูกผสม.....	36
3.7.4 การเชื่อมต่อเวกเตอร์ pKLAC2 เข้ากับยีนอะไมเลส.....	37
3.7.5 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์.....	38
3.7.6 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสในพลาสมิดลูกผสม.....	38
3.7.7 การเตรียมเซลล์เข้าบ้านยีสต์ <i>K. lactis</i>	39
3.7.8 การโคลนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ยีสต์ <i>K. lactis</i>	39
3.7.9 การคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของยีนอะไมเลสด้วยวิธี activity plate.....	41
3.7.10 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์.....	41
3.7.11 การตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมด้วยพีซีอาร์.....	42
3.8 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	42
3.9 การเตรียมโปรตีนอะไมเลส.....	43
3.9.1 การเลี้ยงยีสต์ลูกผสม.....	43
3.9.2 การทำโปรตีนให้เข้มข้น.....	43
3.9.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน.....	43
3.10 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme characterization).....	44
3.10.1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS assay.....	44
3.10.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของ amylase assay.....	44
3.10.2.1 การทดสอบเวลาการบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสมต่อการทำงานของ ของเอนไซม์.....	44
3.10.2.2 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงาน ของเอนไซม์.....	44
3.10.2.3 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน ของเอนไซม์.....	45
3.10.2.4 การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ที่ทนต่อ ความเป็นกรด-ด่าง.....	45

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.10.2.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการทนความร้อน ของเอนไซม์.....	45
3.10.3 การวิเคราะห์การย่อยสลายสับสเตรตของเอนไซม์.....	45
3.10.4 การวิเคราะห์ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์.....	46
3.10.5 การวิเคราะห์สารยับยั้งและสารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์.....	46
3.11 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ <i>K. lactis</i>	46
3.11.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์.....	46
3.11.2 การนับจำนวน โคโลนีของเซลล์ยีสต์.....	47
3.11.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	47
3.11.4 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์.....	47
3.11.5 การวิเคราะห์หาปริมาณแป้งที่เหลืออยู่.....	47
3.11.6 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหาร.....	48
3.11.7 การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์.....	48
3.12 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์จากยีสต์ลูกผสมเทียบกับ เอนไซม์ทางการค้า.....	48
3.12.1 การเตรียมเอนไซม์จากยีสต์.....	48
3.12.2 การเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์จากยีสต์ลูกผสมกับ เอนไซม์ทางการค้า.....	48
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	50
4.1 การโคลนยีนอะไมเลสจากเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.....	50
4.1.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.....	50
4.1.2 การเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลสด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส.....	50
4.1.3 การคัดเลือกลาสมิดลูกผสมด้วยโคโลนีพีซีอาร์.....	52
4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน.....	53
4.2.1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์.....	53
4.2.2 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน.....	54

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....	55
4.2.4 การแปลรหัสยีนอะไมเลส.....	56
4.2.5 การคัดเลือกโคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสด้วย วิธี activity plate.....	56
4.3 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน.....	56
4.3.1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล.....	56
4.3.2 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree).....	68
4.3.3 การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน.....	69
4.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนอะไมเลสในยีสต์ <i>K. lactis</i>	69
4.4.1 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนอะไมเลส จากพลาสมิดลูกผสม.....	69
4.4.2 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี โคลนีพีซีอาร์.....	76
4.4.3 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	77
4.4.4 การคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของยีนอะไมเลส.....	79
4.4.5 การตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมด้วยพีซีอาร์.....	80
4.4.6 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	81
4.5 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในยีสต์ <i>K. lactis</i>	82
4.5.1 การทำโปรตีนให้เข้มข้นขึ้น.....	82
4.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส.....	84
4.6.1 เวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์.....	84
4.6.2 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์.....	85
4.6.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์.....	87
4.6.4 การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ที่ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง....	88
4.6.5 ความสามารถในการทนต่อความร้อนของเอนไซม์อะไมเลส.....	89
4.6.6 ความจำเพาะต่อสับสเตรท.....	90
4.6.7 ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์อะไมเลส.....	92
4.6.8 การวิเคราะห์สารยับยั้งและสารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์.....	93
4.7 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์ <i>K. lactis</i>	95

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.7.1 จำนวนโคโลนีของเซลล์ยีสต์.....	96
4.7.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	98
4.7.3 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์.....	101
4.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่.....	104
4.7.5 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อยีสต์.....	107
4.7.6 ปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ.....	110
4.8 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสมเทียบกับ เอนไซม์ทางการค้า.....	114
4.8.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสม กับเอนไซม์ทางการค้า ในสถานะที่เหมาะสมต่อเอนไซม์นั้นๆ.....	114
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	117
เอกสารอ้างอิง.....	119
ภาคผนวก ก.....	128
ภาคผนวก ข.....	139
ภาคผนวก ค.....	143
ประวัติผู้เขียน.....	146

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การย่อยสลายแป้ง เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ.....	14
2.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน.....	16
2.3 คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิด.....	20
4.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลส เทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastN.....	54
4.2 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของยีน อะไมเลสเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastX.....	55
4.3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford.....	83
4.4 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เวลาต่างๆ.....	84
4.5 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆของปฏิกิริยา.....	86
4.6 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	88
4.7 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสับสเตรทต่างๆ.....	92
4.8 ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4.....	93
4.9 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เติม สารละลายต่างๆ.....	95
4.10 การเจริญของเซลล์ยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	96
4.11 การเจริญของเซลล์ยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน.....	97
4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร YPT ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	99
4.13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร YPT ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน.....	101

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.14 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	102
4.15 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน.....	103
4.16 ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหาร YPT ของเชื้อ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	105
4.17 ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหาร YPT ของเชื้อ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน.....	106
4.18 ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร YPT ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	108
4.19 ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร YPT ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน.....	109
4.20 ปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	111
4.21 ปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน.....	113
4.22 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของยีสต์ <i>K. lactis</i> และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางค้า ในสภาวะที่เหมาะสมต่อเอนไซม์นั้น.....	115

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ก1 การเตรียม polyacrylamide gel.....	135
ก2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate.....	136
ก3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate.....	136
ข1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm. ของโปรตีนมาตรฐานที่ ความเข้มข้นต่างๆ.....	140
ข2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm. ของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ ความเข้มข้นต่างๆ.....	141
ข3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm. ของแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	142

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	5
2.2 การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ และสมการของ Michaelis-Menten.....	11
2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของซับสเตรทเริ่มต้น.....	11
2.4 สมการของ Lineweaver-Burk.....	12
2.5 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน.....	15
2.6 การเปลี่ยนแปลงความหนืดของน้ำแป้งที่ระยะต่างๆ.....	18
2.7 การคืนตัวของแป้ง.....	19
3.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 13 จาก ฐานข้อมูลเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.	33
3.2 โครงสร้างของพลาสมิดลูกผสมที่มียีนอะไมเลส 1-16/2 ที่โคลนเข้าเวกเตอร์ pKLAC2 เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> I และ <i>Eco</i> RI.....	40
4.1 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลส โดยทำการตรวจสอบบน เจลอะกาโรส 0.8%.....	51
4.2 ผลการสกัดแยกยีนอะไมเลสออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ โดยทำการ ตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8%.....	51
4.3 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสด้วยวิธี size screening ตรวจสอบ บนเจลอะกาโรส 0.8%.....	52
4.4 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการทำโคโลนีพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบบน เจลอะกาโรส 0.8%.....	53
4.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลสโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 กับยีน Exo-alpha-1,4-glucosidase.....	57
4.6 การแปลรหัสยีนอะไมเลสที่ได้จากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7.....	63
4.7 ผลการทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของโคลนที่ 1-16/2 และ 1-16/4.....	65
4.8 ผลการทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของโคลนที่ 1-16/7.....	65
4.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนอะไมเลสจากโคลนที่ 1-16/2 กับเอนไซม์ Alpha-glucosidase.....	66
4.10 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงตำแหน่งความสัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จาก โคลน 1-16/2 กับเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น.....	68

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.11 การเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีนที่แปลรหัสจากยีน 1-16/2 กับโปรตีนจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Pfam.....	70
4.12 ผลการวิเคราะห์ signal peptide ของยีนอะไมเลส 1-16/2 ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 server.....	71
4.13 โครงสร้างของโปรตีนอะไมเลสที่ได้จากโคลน 1-16/2.....	72
4.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของยีนอะไมเลส 1-16/2.....	73
4.15 ผลผลิตฟิชีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลส โดยทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8%.....	76
4.16 ผลผลิตฟิชีอาร์ที่ได้จากการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีโคลนนิ่งฟิชีอาร์ โดยทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8%.....	77
4.17 ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสในเวกเตอร์ pKLAC2 โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i> ทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 1%.....	78
4.18 ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสในเวกเตอร์ pKLAC2 โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NdeI</i> ทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 1%.....	79
4.19 ผลผลิตฟิชีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8%.....	81
4.20 การแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4.....	82
4.21 การทำให้โปรตีน pK1-16/2C3A4 เข้มข้นขึ้นด้วยคอลัมน์ Vivaspin 20.....	83
4.22 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เวลาต่างๆ.....	85
4.23 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆของปฏิกิริยา.....	86
4.24 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่อุณหภูมิต่างๆของการบ่ม.....	88
4.25 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง.....	89
4.26 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ทนต่อความร้อน.....	90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.27	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ใน สับสเตรตต่างๆ..... 92
4.28	การเจริญเติบโตของเซลล์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน..... 97
4.29	การเจริญเติบโตของเซลล์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน..... 98
4.30	การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในการเลี้ยงของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับ ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในอาหาร YPT ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน..... 99
4.31	การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในการเลี้ยงของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับ ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในอาหาร YPT ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน..... 100
4.32	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบ กับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน..... 102
4.33	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบ กับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน..... 104
4.34	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งที่เหลือในอาหาร YPT ของ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับ ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน..... 105
4.35	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งที่เหลือในอาหาร YPT ของ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับ ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน..... 107
4.36	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร YPT ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบ กับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน..... 108
4.37	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร YPT ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบ กับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน..... 110

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.38 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับ ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	111
4.39 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ <i>K. lactis</i> เปรียบเทียบกับ ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน.....	113

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ภาพภาคผนวกที่	
ก1	แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pTZ57R/T..... 137
ก2	แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pKLAC2..... 148
ข1	กราฟโปรตีนมาตรฐาน..... 140
ข2	กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน..... 141
ข3	กราฟแป้งมันสำปะหลังมาตรฐาน..... 142
ค1	เครื่อง Ebuliometer..... 144
ค2	แผ่นสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและ % แอลกอฮอล์..... 145

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Da	Dalton
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS	3,5-Dinitrosalicylic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
g	Gram
GHF	Glycoside hydrolase family
IPTG	Isopropyl- β -D thiogalactoside
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilo Volt
LB	Lubia-Bertani
YP	Yeast extract, Peptone
mg	Milligram
mg/ml	Milligram per milliliter
mM	MilliMolar
M	Molar
ng	Nanogram
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside
μ g	Microgram
μ g/ μ l	Microgram per microlite
μ g/ml	Microgram per milliliter
μ l	Microlite
μ M	MicroMolar
μ Mole	MicroMole
$^{\circ}$ C	Degree Celsius
%	Percentage

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปัจจุบันประเทศไทยประสบกับปัญหาการค่าน้ำมันในตลาดโลกที่ผันผวน มีการปรับราคาที่สูงขึ้น ในขณะที่จำนวนประชากรของประเทศเพิ่มขึ้น และเศรษฐกิจของประเทศกำลังเติบโต ทำให้ความต้องการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเป็นที่ต้องการมากขึ้นตามไปด้วย ถึงแม้ประเทศไทยจะมีแหล่งทรัพยากรปิโตรเลียม ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติเป็นของตนเอง แต่ก็ไม่เพียงพอต่อความต้องการของประชากรในประเทศ ทำให้ประเทศไทยหันมาใช้เอทานอลเป็นส่วนผสมในน้ำมันเชื้อเพลิง เช่นเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำมันเบนซิน 90% และเอทานอล (บริสุทธิ์ 99.5%) 10% (บุญยพัต สุภานิช. 2546) เพื่อลดปริมาณการนำเข้าน้ำมัน ซึ่งการผลิตเอทานอลในประเทศไทยที่เหมาะสม คือ การใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้ในประเทศมาใช้เป็นพลังงานทดแทน นอกจากจะช่วยลดการนำเข้าน้ำมันแล้ว ยังช่วยยกระดับพืชผลทางการเกษตร และยังคงมลพิษไอเสียทางอากาศได้อีกด้วย

วัตถุดิบที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอลของไทย ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง แต่อ้อยเป็นวัตถุดิบที่มีราคาแพง ปลูกได้ตามฤดูกาล (de Moraes *et al.* 1995) จึงไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต ขณะที่มันสำปะหลังนั้นเป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนทานต่อสภาพดินและอากาศ สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ซึ่งในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง จะต้องนำแป้งไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยวิธีการทางเคมี หรือ วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งการย่อยแป้งด้วยวิธีการทางเคมีจะใช้กรดร่วมกับความร้อน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง ทำให้ได้ผลผลิตอื่นนอกจากน้ำตาลกลูโคส ขณะที่วิธีการชีวภาพจะใช้กระบวนการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยแป้งให้ได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า แต่จะมีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่า (Altintas *et al.* 2002)

เอนไซม์อะไมเลสถือได้ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อภาคอุตสาหกรรมการผลิตในวงกว้าง เช่น อุตสาหกรรมทอผ้า การทำขนมปัง การทำน้ำผลไม้ให้ใส การผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง เป็นต้น โดยเอนไซม์อะไมเลสจะเข้าไปทำการย่อยสลายสารจำพวกแป้งให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยทั่วไปเอนไซม์อะไมเลสนั้นสามารถหาได้ง่ายจากจุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และจากเชื้อรา มีราคาถูก เอนไซม์อะไมเลสที่ได้มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พึงประสงค์ของเอนไซม์ที่จะนำไปใช้ (ปราณี อานเป็ร้อง. 2547)

ยีสต์ *Kluyveromyces lactis* เป็นยีสต์ใหม่ที่อุตสาหกรรมให้การยอมรับว่ามีความปลอดภัยในการนำไปใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นยูคาริโอต (eukaryote) ปัจจุบันได้มีการนำยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการผลิตเอทานอล เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทน แต่ปัญหาในการผลิตเอทานอล คือ จะต้องอาศัยน้ำตาล ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการหมักให้ได้ผลผลิตเป็นเอทานอล ในการผลิตโดยทั่วไปใช้ผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี แป้ง และมันฝรั่ง ซึ่งผลผลิตเหล่านี้มีองค์ประกอบของแป้งเป็นส่วนใหญ่ และจะทำการเติมเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแป้งนั้นจะให้เอทานอลในปริมาณที่สูง เอนไซม์อะไมเลสที่ใส่เข้าไปนั้นจะไปทำการย่อยสลายผลผลิตให้น้ำตาล จากนั้นยีสต์จะใช้น้ำตาลทำให้เกิดกระบวนการหมัก และผลิตเอทานอลออกมา โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และเอทานอล 2 โมเลกุล (ไกรยศ แซ่ลิ้ม, 2550)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทำการนำยีสต์อะไมเลสจากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งจากถั่วเน่า พบเชื้อ *Bacillus* sp. และทำการโคลนยีสต์อะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp. เข้าสู่ยีสต์ *K. lactis* เพื่อทำให้ยีสต์ *K. lactis* นั้นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้การหมักผลผลิตน้ำตาลของยีสต์ที่จะเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ โดยไม่ต้องอาศัยการเพิ่มเติมน้ำตาลหรือการเติมเอนไซม์ต่างๆ ในกระบวนการผลิต ซึ่งจะ เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในการผลิตให้มีความรวดเร็ว ลดต้นทุนการผลิต นำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีสต์อะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp. และการแสดงออกของเอนไซม์อะไมเลสในยีสต์ *K. lactis*
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสม
3. เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ลูกผสม

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
2. ห้องปฏิบัติการกลางโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4 ขั้นตอนการวิจัย

แบ่งได้ 5 ขั้นตอน คือ

1. การเลี้ยง และสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Bacillus* sp.
2. การโคลนยีนอะไมเลสจากดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส
3. ศึกษาการแสดงออกของยีนอะไมเลสในยีสต์ *K. lactis*
4. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส
5. ศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ลูกผสม

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ยีนอะไมเลสที่สมบูรณ์จากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากถั่วเน่า
2. ได้ยีสต์ลูกผสม *K. lactis* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส
3. ทราบความสามารถในการแสดงออกของยีนอะไมเลสในยีสต์ลูกผสม
4. ทราบความสามารถในการผลิตเอทานอลจากยีสต์ลูกผสม

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์อะไมเลส

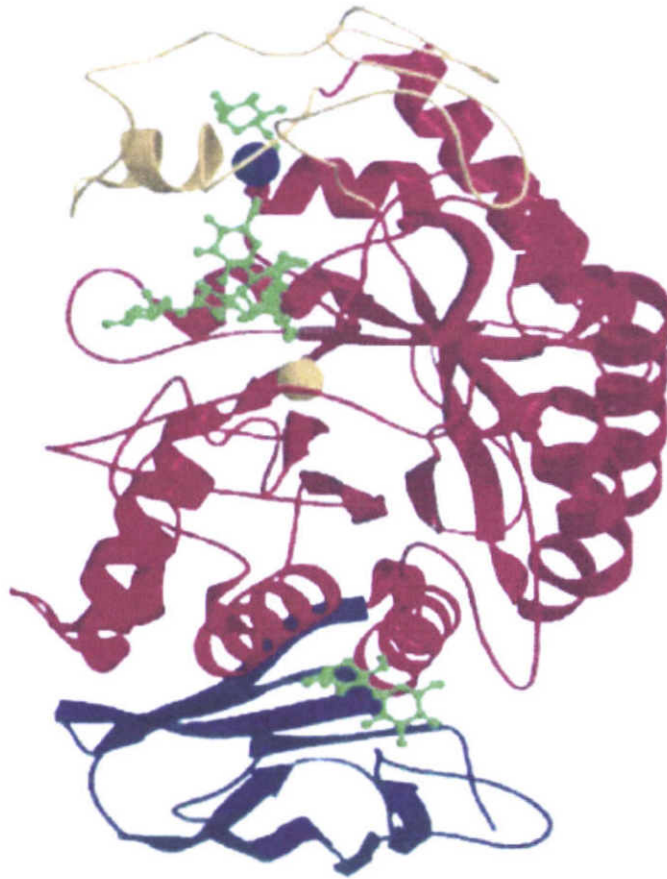
เอนไซม์อะไมเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลแป้ง ไกลโคเจน (glycogen) และอนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์ ให้ได้เดกซ์ทริน (dextrin) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) อะไมเลสถูกจัดอยู่ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส (glycosyl hydrolases family; GHF) ในหลายแฟมิลี เช่น แฟมิลีที่ 13 ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) แฟมิลีที่ 14 ได้แก่ เบต้าอะไมเลส (β -amylase) แฟมิลีที่ 15 ได้แก่ แกมมาอะไมเลส หรือ กลูโคอะไมเลส (γ -amylase) เป็นต้น ซึ่งในแต่ละแฟมิลีมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือ inverting (GHF 14 และ GHF 15) และ retaining (GHF 13) (Henrissat *et al.* 2011) เอนไซม์อะไมเลสมีโครงสร้างและบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาที่เหมือนกัน โดยมีส่วนประกอบหลักอยู่ 3 ส่วนคือ domain A เป็นส่วนที่ใหญ่ที่สุด (มี active site และ Ca^{2+} เป็น binding site) domain B อยู่ระหว่าง domain A และ C และจับกับ domain A ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (เป็นส่วนที่เป็น long loop ที่มีส่วนระหว่าง β -strand และ α -strand ของ domain A ที่มี Ca^{2+} เป็น binding site) และ domain C เป็นส่วนที่มีโครงสร้าง β -sheet เชื่อมกับ domain A ด้วยสายโพลีเปปไทด์ (ภาพที่ 2.1) แอลฟาอะไมเลสทุกตัวจะจับกับ Ca^{2+} อย่างน้อย 1 ตัว เพื่อให้โครงสร้างมีความสมบูรณ์ และสามารถเริ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ได้ (Junior *et al.* 2006; Monteiro de Souza and Magalhães. 2010; Tao *et al.* 2008)

ปราณี อานเป็รื่อง (2547) ได้แบ่งชนิดของเอนไซม์อะไมเลสออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1. แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) มีชื่อทางการค้าเป็นที่รู้จักกันว่า Termamyl[®] และมีชื่อสามัญว่า ไดเอสเทส (diastase) และมีชื่อตามระบบว่า α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 พบทั่วไปทั้งในอาณาจักรพืชและสัตว์ ตลอดทั้งในคน มักพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งเป็นโอลิโกและไดแซ็กคาไรด์ โดยจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังลำไส้สู่ร่างกายเป็นเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 มี Ca^{2+} 1 ตัวต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล และจะถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนไอออน เช่น Cl^- , Br^- , F^- มีค่า pK ของหมู่ที่แตกไอออนได้ในบริเวณแรงอยู่ที่ 6.5-8.0 ซึ่งหมู่ที่ว่านี้อาจเป็นหมู่imidazoleหรือหมู่อะมิโน แต่เมื่อพิจารณาจากค่า ΔH_{on} เป็น 4 kcal/mole ดังนั้นน่าจะเป็นหมู่imidazole

ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายก็คือ เจาจะงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α -1,4 ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์ ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan)

และลิมิตเดกซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงรูปเดิม (α -configuration)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (domain A คือ สีแดง, B สีเหลือง, C สีน้ำเงิน, Ca^{2+} ลูกวงกลมสีน้ำเงิน, Cl^{-} ลูกวงกลมสีเหลือง และ โครงสร้างสีเขียว คือตำแหน่ง active site (Monteiro de Souza and Magalhães. 2010)

2. เบต้า-อะไมเลส (β -amylase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า α -1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 ซึ่งพบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังออกเป็นข้าวมอลต์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ และมักพบร่วมกับแอลฟา-อะไมเลส มีมวลโมเลกุล 152,000 (กรัมจากมันเทศ) ซึ่งโดยทั่วไปจะมีค่าสูงกว่าแอลฟา-อะไมเลส มี pH optimum ที่ 5.6 จากการพิจารณา pH activity profile มีลักษณะแบบรูปประฆังคว่ำที่มีหมู่ที่แตกไอออนได้ที่บริเวณแรงอยู่ 2 หมู่ คือ ที่ $\text{pK}_1 = 2.5-3.5$ และ $\text{pK}_2 = 8.0-8.5$ นอกจากนี้มีสารพวกซัลไฟดริล (sulfhydryl reagents) เป็นตัว

ยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายของเบต้า-อะไมเลสจะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α -1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านที่ไม่มีหมู่อินทรีย์เข้าสู่ภายในสาย ไปที่ละ 1 หน่วยของมอลโทส หรือที่ละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่ α -1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็นกลูแคน ลิมิตเดกซ์ทริน และส่วนใหญ่เป็นมอลโทสที่มีโครงสร้างต่างไปจากเดิม คือได้ β -configuration หรือ เบต้า-มอลโตส

3. แคมมา-อะไมเลส หรือ กลูโคอะไมเลส หรือ อะมิโลกลูโคซิเดส (γ -amylase, glucoamylase, amyloglucosidase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า γ -1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา มี pH optimum ที่ 4.0-4.4 และมีหมู่ไวปฏิกิริยา 2 หมู่ คือ ที่ $pK_1 = 2.9$ และ $pK_2 = 5.9$ รวมทั้งมี $\Delta H^0_1 = 0$, $\Delta H^0_2 = -0.8$ kcal/mole จากค่า pK และ ΔH^0 ที่ปรากฏนี้คาดว่าน่าจะมีหมู่ไวปฏิกิริยาทั้ง 2 หมู่ เป็นหมู่คาร์บอกซิลในลักษณะที่หมู่ที่ 1 เป็น COO^- (เกลือ) และหมู่ที่ 2 เป็น $COOH$ (กรด)

ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งก็คือ สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคซิลที่เป็น α -1,4, α -1,6 และ α -1,3 แต่จะช้ากว่า α -1,4 การตัดสายพอลิเมอร์จะเหมือนกับเบต้า-อะไมเลส แต่ตัดปลายสายเข้าไปที่ละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีโครงสร้างต่างไปจากเดิม คือได้ β -configuration หรือ เบต้า-ดี-กลูโคส และส่วนของกลูแคน และลิมิตเดกซ์ทริน

van der Maarel *et al.* (2002) ได้ทำการแบ่งเอนไซม์อะไมเลสตามการเข้าทำปฏิกิริยากับแป้งเป็น 4 ชนิด ได้แก่

1. เอนไซม์เอนโด-อะไมเลส (endo-amylase) จะเข้าทำการย่อยสลายที่ภายในพันธะ α -1,4 ไกลโคซิดิกของอะไมโลสหรืออะไมโลเพคติน ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส

2. เอนไซม์เอ็กโซ-อะไมเลส (exo-amylase) จะเข้าทำการย่อยสลายภายนอกที่พันธะ α -1,4 ได้แก่ เบต้า-อะไมเลส หรือ ย่อยสลายที่พันธะ α -1,4 และ α -1,6 ได้แก่ แคมมา-อะไมเลส หรือ กลูโคอะไมเลส

3. เอนไซม์ดีبرانซิงค์ (debranching enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และเอนไซม์พูลลานเนส (pullanase) สามารถย่อยพันธะ α -1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคติน ไกลโคเจนเด็กซ์ทรินที่มีกิ่งก้านและสารโอลิโกแซคคาไรด์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยพันธะ α -1,6 ไกลโคซิดิกของพอลิกลูแคนและเบต้า-ลิมิตเด็กซ์ทรินได้

4. เอนไซม์ทรานเฟอร์เอส (transferases) ได้แก่ เอนไซม์อะไมโลมอลเตส (amylomaltase) และเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานเฟอร์เอส (cyclodextrin glycosyltransferase) สามารถย่อยพันธะ α -1,4 ไกลโคซิดิก ระหว่างตัวให้กับตัวรับของพันธะไกลโคซิดิกใหม่

แอลฟา-อะไมเลสจะย่อยสลายแป้งที่ภายในพันธะ α -1,4 แบบสุ่ม (Tao *et al.* 2008) แต่จะไม่สามารถย่อยสลายที่พันธะ α -1,6 ในขณะที่ไอโซอะไมเลสและพอลลูทานเนส จะย่อยสลายได้เฉพาะตำแหน่งพันธะ α -1,6 เท่านั้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของโอลิโกแซคคาไรด์ต่างๆ เบต้า-อะไมเลสจะย่อยสลายพันธะ α -1,4 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) ให้ได้มอลโตส สำหรับกลูโคสอะไมเลสจะย่อยแป้งที่พันธะ α -1,3, α -1,4 และ α -1,6 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์เข้าไปที่ละโมเลกุล ผลการย่อยจะได้กลูโคส แม้ว่าอะไมเลสจะเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ก็ตาม แต่ไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์ทุกชนิดในกลุ่มนี้จะย่อยแป้งได้ ทั้งนี้เพราะการย่อยเม็ดแป้งจะเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีสารจำพวกเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ไขมัน (fat) อะไมโลเพคติน (amylopectin) และโปรตีน (protein) ห่อหุ้มเม็ดแป้งไว้ (Fogarty. 1983)

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

Totoro *et al.* (1991) พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์หรือกิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเข้มข้นของสับสเตรท และตัวยับยั้ง

2.2.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการทำงานของเอนไซม์

การทำงานของเอนไซม์จะขึ้นกับ pH ของโซ่ข้างของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง (active site) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH โซ่ข้างดังกล่าวจะได้รับหรือสูญเสียโปรตรอนไป ทั้งนี้ขึ้นกับค่า pK_a ของกรดอะมิโนแต่ละตัว การที่โปรตรอนหลุดออกไปหรือเพิ่มเข้ามาจะมีอิทธิพลต่อเอนไซม์โดยตรง ดังนั้นความเร็วของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนแปลงไปตาม pH กราฟที่ได้มีลักษณะคล้ายระฆังคว่ำ นอกจากนี้พบว่า pH มีผลกระทบโดยตรงต่อประจุไฟฟ้าในโมเลกุลของเอนไซม์และสับสเตรท ซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ (denature) ได้เช่นกัน กิจกรรมเอนไซม์จะสูงสุดที่ค่า pH ค่าหนึ่ง เรียก pH นี้ว่า optimal pH ซึ่งเป็นค่า pH ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด ส่วนมากมีค่า pH ระหว่าง 5.0-9.0 แต่เอนไซม์บางชนิดอาจมี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานต่ำหรือสูงมาก เช่น เอนไซม์เปปซิน (pepsin) ทำงานได้ดีที่ pH เท่ากับ 1.5 เป็นต้น (อรอุมา สวัสดิ์กิจ. 2546)

Ivanova *et al.* (1993) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* 44MB82 มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH ระหว่าง 6.0-6.5 ขณะที่เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. thermooreovorans* NP54 มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ pH เท่ากับ 8.0 (Narang and Satyanarayana. 2001) และเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงที่ได้จากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH ระหว่าง 4.6-6.6 (Nguyen *et al.* 2002)

2.2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

พจน์ ศรีบุญถือ และคณะ (2543) กล่าวว่า เมื่ออุณหภูมิของระบบการทำงานของเอนไซม์สูงขึ้นจะมีผลต่อปฏิกิริยาที่เร่ง โดยเอนไซม์อยู่ 2 ประการคือ

1. อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะสูงขึ้นเช่นเดียวกับปฏิกิริยาเคมีทั่วไป ในการศึกษาการเพิ่มขึ้นของอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นนั้น นิยมเรียกว่า สัมประสิทธิ์ของอุณหภูมิ (temperature coefficient, Q10) ซึ่งหมายถึงค่าที่เพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทุก 10°C โดยทั่วไปแล้วค่า Q10 ของปฏิกิริยาเอนไซม์ส่วนใหญ่มักจะมีค่าเท่ากับ 2 หมายความว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาใดๆจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าโดยประมาณ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น 10°C

2. อัตราเร็วของการทำงานของเอนไซม์จะเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิใกล้ 0°C เอนไซม์จะไม่ทำงานแต่ยังคงสภาพธรรมชาติเดิมอยู่ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะเริ่มทำงาน โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีการทำงานดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก $0-40^{\circ}\text{C}$ และการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า $40-60^{\circ}\text{C}$ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึงจุดๆหนึ่งเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดเรียกว่า optimal temperature ซึ่งหมายถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจากจุดนี้แล้วอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์จะเริ่มลดลงตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงมากเกินไปจะทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ที่เป็น โปรตีน ทำให้สูญเสียสภาพทางธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างระดับทุติยภูมิ ตติยภูมิ หรือ จตุรภูมิ ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างสิ้นเชิง เอนไซม์ก็จะหยุดการทำงานในที่สุด อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์บางชนิดที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง (thermostable enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) เช่น แบคทีเรียที่เจริญบริเวณรอบบ่อน้ำพุร้อน เป็นต้น

Coronado *et al.* (2000) พบว่า เชื้อ *Halomonas meridian* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 15% w/v โดยการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37°C ขณะที่ Narang and Satyanarayana (2001) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. thermooreovorans* NP54 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 100°C และ Deutch (2002) รายงานว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนเกลือจากเชื้อ *B. dipsosauri* DD1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 60°C

2.2.3 อิทธิพลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์

พจน์ ศรีบุญถือ และคณะ (2543) กล่าวว่า การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถทำให้ช้าลงหรือหยุดลงได้โดยใช้ตัวยับยั้ง ซึ่งตัวยับยั้งจะจับกับหมู่ที่ทำปฏิกิริยาในบริเวณเร่งหรือ

บริเวณอื่นๆ การยับยั้งเอนไซม์มี 2 ประเภท คือ การยับยั้งแบบไม่ผันกลับ (irreversible inhibition) และการยับยั้งแบบผันกลับ (reversible inhibition)

1. การยับยั้งแบบไม่ผันกลับ การยับยั้งแบบนี้ตัวยับยั้งจะจับและยึดกับ โมเลกุลของเอนไซม์อย่างเหนียวแน่น โดยสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโน ทำให้การแยกตัวระหว่างโมเลกุลของตัวยับยั้งกับเอนไซม์เป็นไปได้น้อยมาก เมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งมากกว่าเอนไซม์แล้วจะสามารถยับยั้งหรือหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งหมดได้ ตัวอย่างเช่น สารไอโอโดอะซิเตต (iodoacetate) ไอโอโดอะซิทาไมด์ (iodoacetamide) และคลอโรอะซิโตฟีโนน (chloroacetophenone) เป็นต้น

2. การยับยั้งแบบผันกลับ การยับยั้งแบบนี้ตัวยับยั้งสามารถจับรวมตัวได้กับ โมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ทำให้สามารถแยกตัวยับยั้งออกจากเอนไซม์ได้ง่าย เมื่อตัวยับยั้งถูกกำจัดออกไปแล้ว เอนไซม์จะกลับมีประสิทธิภาพดังเดิม แบ่งการยับยั้งแบบนี้ได้ 3 แบบย่อย คือ

2.1 การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ตัวยับยั้งมีคุณสมบัติเด่นชัดอยู่หนึ่งประการ คือ โครงสร้างทางเคมีของตัวยับยั้งจะมีส่วนคล้ายคลึงกับสับสเตรท เรียกว่า substrate analogue ทำให้ตัวยับยั้งจับกับ โมเลกุลของเอนไซม์ตรงบริเวณเร่งได้ แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้ง (enzyme-inhibitor complex) ทำให้สับสเตรทไม่สามารถจับรวมกับเอนไซม์ได้ จึงเกิดการแข่งขันระหว่างสับสเตรทกับตัวยับยั้งเพื่อแย่งจับกับเอนไซม์ ในกรณีที่ตัวยับยั้งมากกว่าสับสเตรทจะทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์มีอัตราเร็วลดลงหรือหยุดการทำงานได้ แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการเพิ่มปริมาณสับสเตรทในระบบมากขึ้น ความสามารถในการยับยั้งจะลดลงและเอนไซม์จะสามารถทำงานได้ตามปกติ

2.2 การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) เป็นการยับยั้งที่ตัวยับยั้งมีโครงสร้างไม่เหมือนกับสับสเตรทจึงเข้าจับกับเอนไซม์คนละบริเวณกับที่สับสเตรทเข้าจับ ตัวอย่างที่สำคัญของตัวยับยั้ง ได้แก่ ไอออนของโลหะหนักต่างๆ เช่น Ag^+ , Pb^{2+} และ Hg^{2+} ไอออนเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับหมู่ $-SH$ ของซิสเตอีนที่บริเวณเร่งทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการเร่งปฏิกิริยา แก้ไขโดยการเติมสารคีเลติง (chelation agent) ซึ่งสามารถจับ ไอออนของโลหะหนักได้ เช่น ethylenediaminetetraacetate acid (EDTA) สารออกซิไดซิงเอเจนต์ต่างๆ จะออกซิไดส์หมู่ $-SH$ ของซิสเตอีน และสารพวกฟลูออไรด์ ซึ่งจะรวมตัวกับแคทไอออนที่มีประจุบวกสอง เช่น ไอออนของ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ดังนั้นเอนไซม์ที่ต้องการแคทไอออนดังกล่าวเป็นปัจจัยร่วมในการทำงานจะถูกยับยั้งด้วย

2.3 การยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันโดยตรง (uncompetitive inhibition) การยับยั้งแบบนี้ต่างจากสองแบบแรก คือจะเกิดขึ้นหลังจากที่เอนไซม์จับกับสับสเตรทเกิดเป็น

เอนไซม์-ซับสเตรท คอมเพล็กซ์ (enzyme-substrate complex) แล้วเท่านั้น ซึ่งตัวยับยั้งยังสามารถเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ได้

Lin *et al.* (1998) พบว่า ไอออนของ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 5 mM ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. TS-23 ในขณะที่ไอออนของ Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} และ EDTA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และ Deutch (2002) พบว่า ไอออนของ Cd^{2+} และ Zn^{2+} ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ทนอุณหภูมิสูงจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626 ในขณะที่ไอออนของ Ca^{2+} และ Ba^{2+} กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

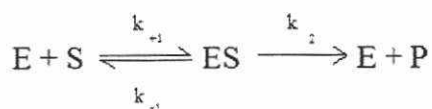
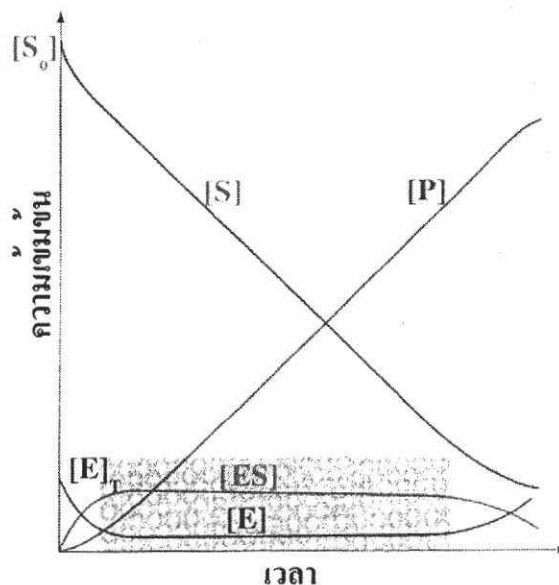
2.3 การศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์อะไมเลส

ประดิษฐ์ สุคนธวรินทร์ กล่าวว่า Leonor Michaelis และ Maud Menten เป็นผู้เสนอความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของซับสเตรท โดยเสนอขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาไว้ดังสมการในภาพที่ 2.2 โดยอัตราเร็วของปฏิกิริยาภายใต้สมการของ Michaelis-Menten คือ $V = (V_{\max} [S]) / (K_m + [S])$ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของซับสเตรท ซึ่งค่าความเร็วสูงสุด (maximum velocity, V_{\max}) เป็นความเร็วเริ่มต้นที่วัดได้ โดยถือว่าเป็นความเร็วของปฏิกิริยาที่วัดได้จากการทำงานของเอนไซม์ทุกโมเลกุล เนื่องจากความเร็วสูงสุดเป็นความเร็วที่วัดจากเงื่อนไขที่เอนไซม์ทุกโมเลกุลทำงาน ซึ่งบอกถึงการทำงานของเอนไซม์นั้นๆ ทำงานได้สูงสุดแล้ว จึงใช้ค่า maximum velocity นี้บอกความสามารถการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) และค่า K_m เป็นอัตราส่วนของค่าคงที่ของปฏิกิริยาในทิศทางสลาย ES-complex ต่อค่าคงที่ของปฏิกิริยาในทิศทางสร้าง ES-complex และถ้าแทนที่ความเร็วเริ่มต้น (V) ด้วย $V_{\max}/2$ (ภาพที่ 2.3) ในสมการ Michaelis-Menten จะพบว่า $K_m = [S]$ หมายความว่าที่ตำแหน่งของความเร็วเริ่มต้นมีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของ V_{\max} ซึ่ง K_m จะมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของซับสเตรท

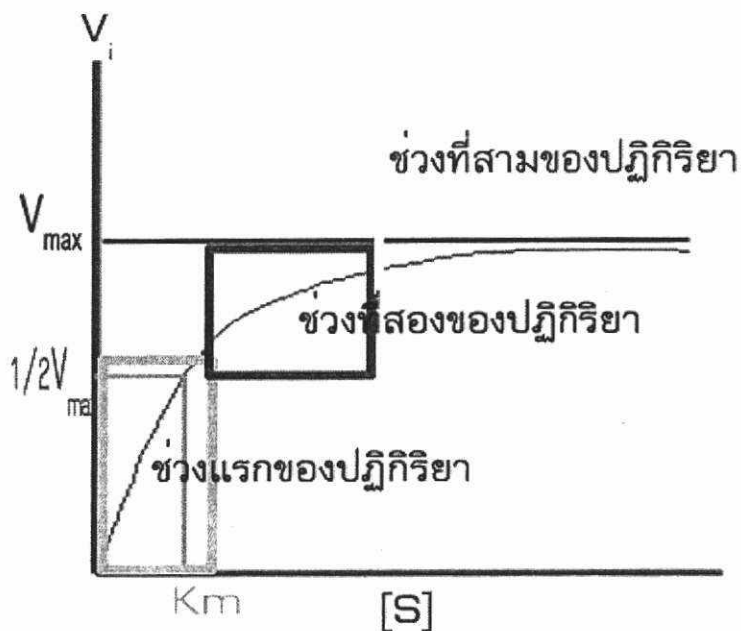
ประโยชน์ของค่า K_m มีอยู่ 2 ข้อ คือ

1. ใช้บอกความชอบพอระหว่าง E กับ S ถ้า K_m มีค่าน้อย แสดงว่า E กับ S มีความชอบพอกัน หรือ S นั้นเป็นซับสเตรทที่แท้จริงของ E
2. ใช้ในทางปฏิบัติเพื่อบอกภาวะที่เอนไซม์อิ่มตัวด้วยซับสเตรท ทั้งนี้ถ้าความเข้มข้นของซับสเตรท [S] ในสารละลายที่เร่งปฏิกิริยา (reaction mixture) มีค่าประมาณ 2-5 เท่าของ K_m แสดงว่าเป็นการเกิดปฏิกิริยาในภาวะที่เอนไซม์อิ่มตัวด้วยซับสเตรท เป็นภาวะที่เอนไซม์ทุกโมเลกุลทำงาน ค่าความเร็วเริ่มต้นที่วัดได้ถือเป็นค่า V_{\max}

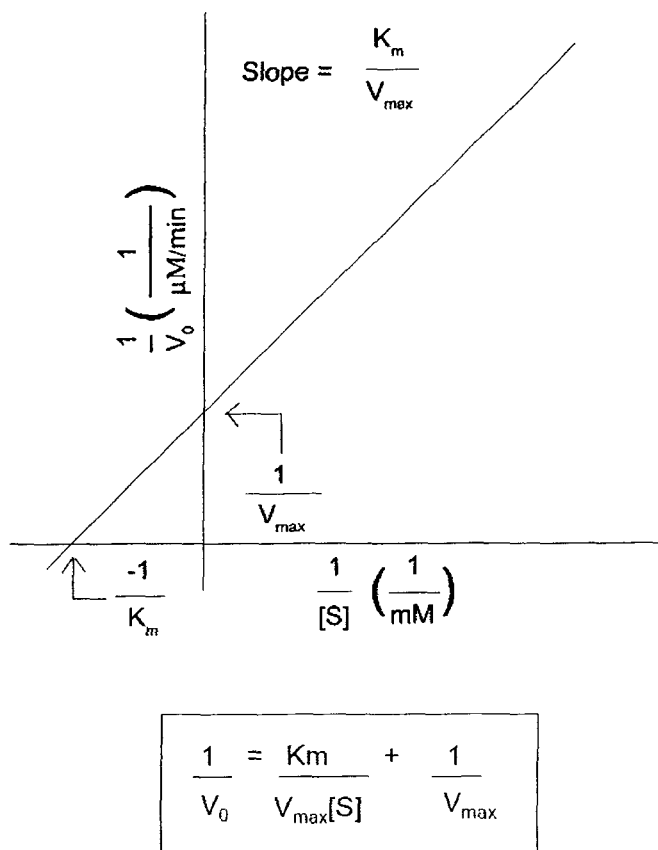
เนื่องจากกราฟ Hyperbola (ภาพที่ 2.3) ที่ได้อาจมีความคลาดเคลื่อนในการหาค่า V_{\max} และ K_m เพราะความเข้มข้นของซับสเตรทยังไม่สิ้นสุด ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงสมการของ Michaelis-Menten ให้เป็นสมการเส้นตรงของ Lineweaver-Burk (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ และสมการของ Michaelis-Menten (ภิญโญพานิชพันธ์. 2555)



ภาพที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น (ภิญโญพานิชพันธ์. 2555)



ภาพที่ 2.4 สมการของ Lineweaver-Burk (ภิญโญ พานิชพันธ์, 2555)

Qodah *et al.* (2006) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อ *B. sphaericus* มีค่า V_{max} ของเอนไซม์เท่ากับ 260 U/mg และมีค่า K_m เท่ากับ 0.96 mg/ml และ Haq *et al.* (2010) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* EMS-6 มีค่า V_{max} ของเอนไซม์อยู่ที่ 2,778 U/mg และค่า K_m เท่ากับ 8.3 mg/ml ขณะที่ Metin *et al.* (2010) พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* HBF62 มีค่า V_{max} อยู่ที่ 5,000 U/mg และค่า K_m เท่ากับ 0.2 mg/ml โดยทั่วไปค่า K_m ของราและยีสต์จะอยู่ที่ 0.13-5 mg/ml (Pandey *et al.* 2000; Gupta *et al.* 2003) ซึ่งค่า K_m ที่ต่ำจะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Metin *et al.* 2010)

2.4 ประโยชน์ของเอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรม ใช้ประโยชน์ในกระบวนการย่อยสลายแป้ง เช่น การผลิตน้ำเชื่อม ผงซักฟอก อุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้ และอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งแอลฟา-อะไมเลสที่ทนต่อความร้อนนั้นเป็นที่ต้องการมากในการผลิต

น้ำตาลพวกกลูโคส (glucose) ฟรุกโตส (fructose) และมอลโตสไซรัป (maltose syrups) และโมเลกุลต่างๆของแป้งที่ถูกย่อย (Horváthová *et al.* 2006; Hmidet *et al.* 2008; Tao *et al.* 2008;)

เต็มศิริ และคณะ (2543) กล่าวว่า เอนไซม์อะไมเลสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆดังนี้

1. อุตสาหกรรมทอผ้า ในการทอผ้าจะต้องนำด้ายดิบมาจึงบนเครื่องทอ ซึ่งจะทำให้ด้ายดิบขาดได้ง่าย ดังนั้นก่อนที่จะเอามาทอต้องนำเส้นด้ายไปชุบน้ำแป้ง เพื่อให้เส้นด้ายมีความทนทานต่อแรงดึง หลังจากทอผ้าเป็นผืนจึงต้องเอาแป้งที่ตกค้างออกโดยใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อย จากนั้นนำไปซักด้วยน้ำร้อน เพื่อทำลายเอนไซม์ วิธีการที่กล่าวมาใช้กับการทอผ้าจากฝ้าย ขนแกะ และแพรเทียม

2. อุตสาหกรรมทำขนมปัง แป้งที่ใช้ในการทำขนมปังจะเติมเอนไซม์อะไมเลสชนิด dextrinoinic enzyme ลงไปเพื่อย่อยโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลง แล้วเติมชนิด saccharogenic enzyme ลงไปเพื่อเปลี่ยนแป้งบางส่วนให้เป็นน้ำตาล

3. การทำน้ำผลไม้ให้ใส ปกติผลไม้คั้นจะมีความขุ่น เพราะมีปริมาณแป้งสูง จึงต้องใส่เอนไซม์ อะไมเลสลงไปบ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80-90°F หลังจากนั้นก็กรองน้ำตาลออกสามารถนำไปทำเยลลี่ได้

4. การผลิตแอลกอฮอล์และเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ใช้เป็นครั้งแรกในประเทศจีน โดยผลิตแอลกอฮอล์จากเชื้อราที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นญี่ปุ่นก็นำหลักการนี้มาผลิตแอลกอฮอล์ประมาณ 1,700 ปี มาแล้ว ซึ่งแตกต่างจากยุโรปและอเมริกาที่จะใช้ข้าวหมอลักกันในระยะแรก แต่ปัจจุบันทั้งยุโรปและอเมริกาดำรงก็หันมาใช้เอนไซม์จากราแทนเอนไซม์จากข้าวหมอลัก

5. การผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมจากแป้ง ระยะแรกการผลิตกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆ จะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยกรด เกิดการย่อยแบบสุ่มจึงได้สารหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส และเตตราแซคคาไรด์ ทำให้เกิดสารเจนติโอไบโอส (gentiobiose) กรดลิวูลินิก (levulinic acid) และสารพวกเฟอฟูรัส (ferfurus) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสไม่ดีเกิดขึ้น ปัจจุบันการผลิตน้ำเชื่อมจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์เป็นที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการผลิตกลูโคสและน้ำเชื่อมที่มีกลูโคส เป็นต้น

เอนไซม์อะไมเลสมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการแปรรูปต่างๆ มีความสำคัญต่อการผลิตไม่ว่าจะเป็นเครื่องอุปโภค หรือบริโภค โดยจะใช้เอนไซม์อะไมเลสเข้าไปช่วยย่อยสลายพันธะของแป้งให้ได้ผลผลิตต่างๆซึ่งสามารถนำไปใช้งานกับอุตสาหกรรมประเภทนั้นๆได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การย่อยสลายแป้งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ

ผลผลิตของการย่อยสลายแป้ง	การนำไปใช้ประโยชน์
มอลโทเดกซ์ทริน	สารเพิ่มความข้น, สารเพิ่มความคงตัว
น้ำเชื่อมผสม (42-63 สมมูลเดกซ์โทรส)	เครื่องดื่ม ลูกกวาด น้ำซอส แยม ไอศกรีม
น้ำเชื่อมมอลโทสสูง	ลูกกวาดชนิดแข็ง
น้ำเชื่อมกลูโคส	เครื่องดื่มไวน์ เบียร์
น้ำเชื่อมไอโซกลูโคส (ฟรุกโทสสูง)	น้ำผลไม้ น้ำซอส โยเกิร์ต

ที่มา : ปรานี อานเป็รื่อง (2547)

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง (2553) กล่าวว่า การผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการแปรรูปอาหารในปัจจุบันผลิตจากจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ แต่ส่วนใหญ่จะผลิตจากจุลินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เนื่องจากการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อดีคือ

1. ผลิตได้ปริมาณมากและไม่เปลืองพื้นที่ โดยการใช้งัดหมัก (fermentor) ขนาดใหญ่ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ pH การให้อากาศ ให้เหมาะสมกับการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในสภาพการหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation)

2. ใช้ระยะเวลาสั้น (1-3 วัน) ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ทำการผลิต

3. เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นสูง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมนั้น ได้ผ่านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มาแล้วให้เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต ซึ่งจะให้ผลตอบแทนในการลงทุนสูง

4. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมจะขับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) จึงไม่ต้องสกัด ทำให้ง่ายแก่การเก็บเกี่ยวผลผลิต ในกรณีที่จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์บางอย่างที่มีศักยภาพทางการค้าแต่เป็นเอนไซม์ที่ไม่ถูกขับออกมานอกเซลล์ (intracellular enzyme) จะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงมาก โดยจะต้องเก็บเกี่ยวจุลินทรีย์แล้วนำมาผ่านเครื่องทำให้เซลล์แตกแล้วจึงทำการสกัดเอาเอนไซม์ที่ต้องการ

5. สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่ขึ้นกับทำเลที่ตั้ง ฤดูกาลและโรคระบาด

6. การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะมีต้นทุนต่ำกว่า

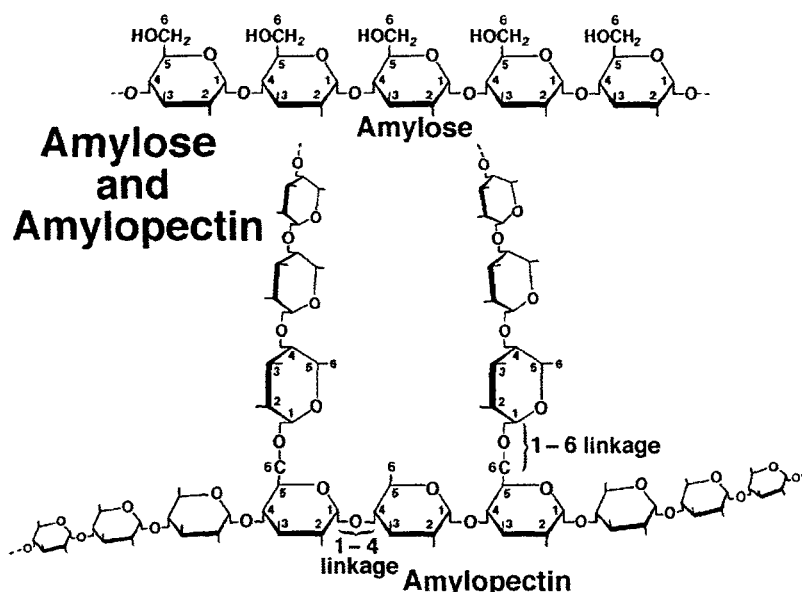
อะไมเลสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเป็นเอนไซม์ที่ถูกค้นพบตัวแรก (บุญเทียม พันธุ์เพ็ง, 2553) มีความสำคัญต่อภาคอุตสาหกรรม แม้ว่าจะมียีสต์หลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งได้แต่แหล่งของเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้จากแบซิลัสและ *Aspergillus* (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549)

2.5 แป้ง (starch)

2.5.1 องค์ประกอบภายในแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6 : 10 : 5 มีสูตรเคมีทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสที่ไม่มีน้ำปน (anhydroglucose unit) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านปลายของสายพอลิเมอร์มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่า reducing end group (กลีแวนรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543)

แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (amylose) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (amylopectin) (กลีแวนรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543) (ภาพที่ 2.5) ซึ่งมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.2) โดยที่อะไมโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อเป็นสายตรงด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด α -1,4 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1×10^5 ถึง 1×10^6 และอะไมโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของน้ำตาลกลูโคส โดยน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อเป็นสายตรงจะต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด α -1,4 และส่วนที่เป็นกิ่งจะมีพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสสายสั้นประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสประมาณ 24-30 หน่วย และจะถูกเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นสายตรงด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิด α -1,6 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1×10^7 ถึง 1×10^9 (Steinbüchel and Rhee, 2005) แป้งแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่แตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้แป้งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน (Oates, 1997)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน (Moore *et al.* 1998)

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

คุณสมบัติ	อะไมโลส	อะไมโลเพคติน
ลักษณะโครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคส เกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลกลูโคส เกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	α -1,4	α -1,4 และ α -1,6
ขนาด	200-2,000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 10,000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้ดีกว่า	ละลายน้ำได้น้อยกว่า
ลักษณะเมื่อต้มในน้ำ	มีความข้นหนืดน้อยและขุ่น	ข้นหนืดมากและใส
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีแดงม่วงหรือสีน้ำตาลแดง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนแล้วทิ้งไว้จะจับ ตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

ที่มา : Kerr. 1950; van Beynum and Roels. 1985

2.5.2 คุณสมบัติของแป้ง

1. การพองตัวของแป้งในน้ำเย็น (cold water swelling of starch)

เม็ดแป้งไม่สามารถละลายได้ในน้ำเย็น เนื่องจากโมเลกุลของแป้งจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก แต่แป้งมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) มาก จึงสามารถดูดน้ำได้เมื่อทำให้เปียก หรือ ต้มทิ้งไว้ในที่ที่มีความชื้นสูง เม็ดแป้งจะค่อยๆ พองตัว ซึ่งการพองตัวสามารถย้อนกลับได้ โดยเม็ดแป้งจะหดตัวเมื่อทำให้แห้ง ในเม็ดแป้งโมเลกุลของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินจะจัดเรียงตัวกันเป็นกลุ่ม แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบเหมือนผลึกจะมีการพองตัวอย่างจำกัด เรียกส่วนนี้ว่า ส่วนผลึก (crystalline region) ส่วนกลุ่มที่มีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ ดูดน้ำได้ดี เรียกส่วนนี้ว่า ออสัญฐาน (amorphous region) (เพลงพิณ ศิวาพรักษ์. 2541) เนื่องจากเม็ดแป้งอยู่ในรูปของร่างแหไมเซลล์ (micelle network) การจัดเรียงตัวลักษณะนี้ทำให้เม็ดแป้งละลายในน้ำเย็น ได้ยาก ดังนั้นแป้งที่อยู่ในน้ำเย็นเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำ และพองตัวได้เล็กน้อยเท่านั้น (Leach *et al.* 1959)

2. การเจลาติไนเซชัน (gelatinization)

เมื่อให้ความร้อนกับสารละลายน้ำแป้ง พันธะไฮโดรเจนจะอ่อนลง เม็ดแป้งจะดูดน้ำแล้วพองตัว ซึ่งไม่สามารถผันกลับได้ (irreversible) ส่วนผสมของน้ำแป้งจะมีความหนืดมากขึ้นและใสขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของน้ำอิสระที่เหลืออยู่รอบๆ เม็ดแป้งเหลือน้อยลง เม็ดแป้งเคลื่อนไหวได้ยากขึ้น ทำให้เกิดความหนืด เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเกิดเจลาติไนเซชัน และอุณหภูมิที่สารละลายเริ่มเกิดความหนืด เรียกว่า อุณหภูมิเริ่มเจลาติไนซ์ และเมื่อตรวจวัดด้วย

เครื่องมือวัดความหนืด มักจะเรียกจุดนี้ว่า อุณหภูมิที่เริ่มมีความหนืดเพิ่มขึ้น (pasting temperature) หรือเวลาที่เริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืด (pasting time) (กถำณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543) ซึ่งเมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ คือ เกิดการพองตัวของเม็ดแป้ง และเครื่องหมายการหักเหของแสงในเม็ดแป้ง (birefringence)

อุณหภูมิเจลาติไนเซชัน เป็นอุณหภูมิที่แสดงถึงช่วงอุณหภูมิที่เม็ดแป้งเริ่มสูญเสียเครื่องหมายการหักเหของแสงในเม็ดแป้ง และสูญเสียอย่างสมบูรณ์ (สมพร ศรีสุข. 2545) ขณะที่อุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของแป้ง ขึ้นอยู่กับสัดส่วนปริมาณอะไมโลส และอะไมโลเพคติน ปริมาณไขมัน และการจัดเรียงตัวของโมเลกุลอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในเม็ดแป้ง ซึ่งการจัดเรียงตัวของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินในเม็ดแป้งมีความหนาแน่นสม่ำเสมอ ทำให้เม็ดแป้งมีขนาดต่างกัน การเกิดเจลาติไนเซชันของเม็ดแป้งจากชนิดและแหล่งเดียวกันก็จะไม่พร้อมกันทุกเม็ดด้วย (เพลงพิณ สีวาพารักษ์. 2541)

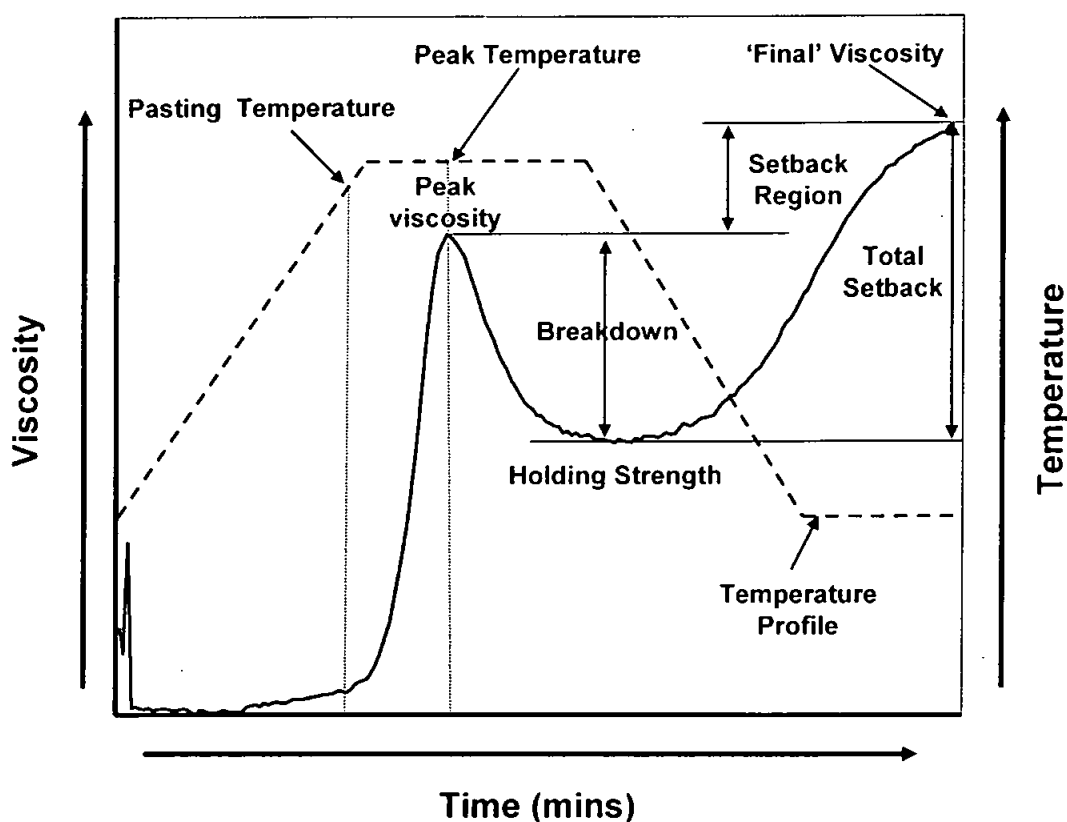
3. ความหนืด (viscosity)

ความหนืดเป็นคุณสมบัติเฉพาะ และแตกต่างกันไปตามชนิดของแป้ง เมื่อเม็ดแป้งซึ่งแขวนลอยในน้ำได้รับความร้อนจนถึงระดับหนึ่งจะพองตัวขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่ความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วนี้ เรียกว่า pasting temperature (ภาพที่ 2.6) ความหนืดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ เพราะเม็ดแป้งมีการพองตัวมากขึ้น และจะมีเม็ดแป้งบางส่วนที่แตกสลายอยู่เรื่อยๆ เมื่อใดก็ตามส่วนที่แตกสลายมากกว่าส่วนที่พองตัวเพิ่มขึ้น ความหนืดจะลดลง จุดที่น้ำแป้งมีความหนืดสูงสุด เรียกว่า peak viscosity (Leach. 1965) ถ้าเม็ดแป้งไม่คงตัวและแตกมาก ความหนืดจะลดลงเมื่อสิ้นสุดการต้มที่อุณหภูมิ 95°C ในช่วงการทำให้เย็นจากอุณหภูมิ 95°C เป็น 50°C ความหนืดจะสูงขึ้น การที่น้ำแป้งสุกมีความหนืดเพิ่มขึ้นเนื่องจากการคืนตัวของน้ำแป้งสูง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า retrogradation โดยกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระของเม็ดแป้งที่แตกสลาย และโมเลกุลอิสระที่ละลายออกมาในน้ำแป้งสุก โดยเฉพาะโมเลกุลของอะไมโลสที่มีขนาดที่เหมาะสมจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนใหม่ และกักน้ำไว้ (อรรรรณ เคหสุขเจริญ. 2529)

4. การพองตัวและการละลาย (swelling and solubility)

ความสามารถในการพองตัว และการละลายของเม็ดแป้งขึ้นกับอุณหภูมิ เมื่อแป้งได้รับความร้อนจะเกิดปฏิกิริยาเคมี ทำให้พันธะไฮโดรเจนที่ยึดโมเลกุลของแป้งเข้าด้วยกันมีการเปลี่ยนแปลง โมเลกุลของแป้งจึงแยกออกจากกัน และเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำขึ้น การพองตัวของเม็ดแป้งจะเกิดขึ้นเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างขององค์ประกอบหลักของเม็ดแป้ง ซึ่งองค์ประกอบหลักนั้นมีอัตราส่วนที่เป็นผลึก และส่วนอสัณฐานต่างกัน เม็ดแป้งที่มีส่วนผลึกมากจะมีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่น ทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งแข็งแรงกว่า โดยทั่วไปส่วนที่เป็นอสัณฐานของเม็ดแป้งจะแข็งแรงน้อยกว่าส่วนที่เป็นผลึก จึงทำให้

ส่วนที่เป็นออสซิลโลแกรมของตัวได้อ่อนและได้มาก เมื่อถึงอุณหภูมิระดับหนึ่งจะทำให้ส่วนที่เป็นผลึก ซึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้างอย่างมีระเบียบเป็นรูปวงแหวนเริ่มบิดเบี้ยวไป ที่อุณหภูมินั้นเรียกว่า อุณหภูมิเจลลิตในเซชัน แสดงว่า โมเลกุลในส่วนที่เป็นผลึกมีการดูดซับน้ำไว้บ้าง ทำให้เม็ดแป้ง พองตัวมากขึ้น โมเลกุลในส่วนที่เป็นรูปผลึกที่เหลืออยู่เกิดสภาพคล้ายร่างแห เรียกว่า ร่างแหไม เซลล์ (micelle network) ชิดเหนียวกันไว้ ทำให้เม็ดแป้งคงสภาพอยู่ได้ แต่อาจมีโมเลกุล อะไมโลสและอะไมโลเพคติน ซึ่งมีขนาดเล็กและเป็นอิสระกระจายตัวออกจากเม็ดแป้ง ทำให้เม็ด แป้งพองตัวเต็มที่ สารละลายแป้งจะมีความหนืดสูงสุดจนในที่สุดเม็ดแป้งจะแตกออก ซึ่งปริมาณ แป้งแห้งในน้ำ 100 ml ที่อุณหภูมิ 95°C เมื่อเม็ดแป้งมีปริมาตรแทนที่น้ำทั้งหมด เรียกว่า ค่าความ เข้มข้นวิกฤติ (critical concentration value) (อรวรรณ เกษสุขเจริญ. 2529)

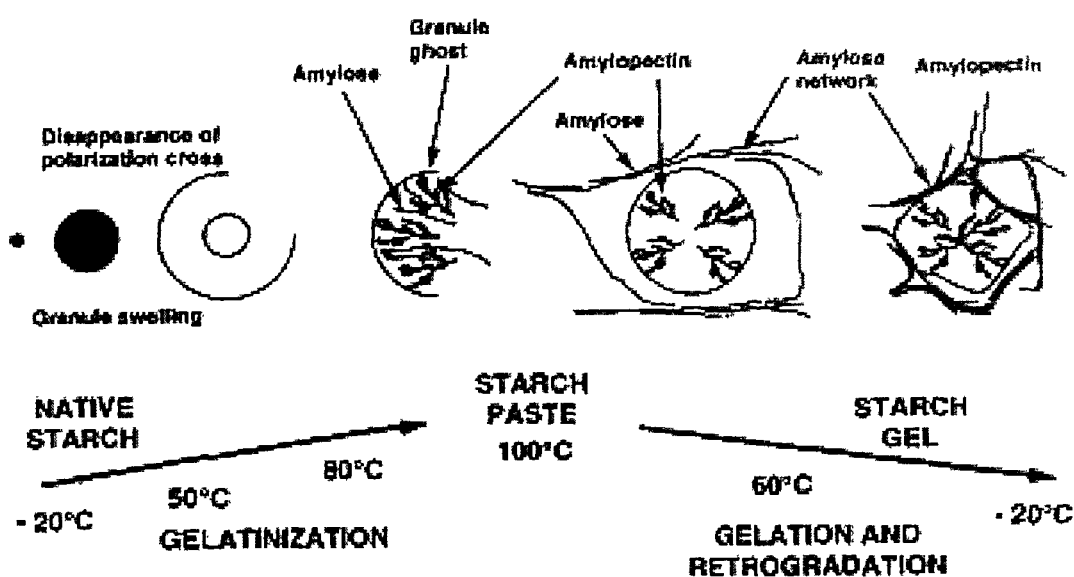


ภาพที่ 2.6 การเปลี่ยนแปลงความหนืดของน้ำแป้งที่ระยะต่างๆ (Saunders. et al. 2011)

5. การคืนตัวของแป้ง (retrogradation)

การคืนตัวของแป้งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อแป้งได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่เกิดเจลาตีในเซชันแล้วให้ความร้อนต่อไป จะทำให้เม็ดแป้งพองตัวเพิ่มขึ้น จนถึงจุดที่พองตัวเต็มที่และแตกออก โมเลกุลของอะไมโลสขนาดเล็กระจัดกระจายออกมาทำให้ความหนืดลดลง เมื่อปล่อยให้เย็นตัวโมเลกุลอะไมโลสที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล เกิดเป็นร่างแหสามมิติโครงสร้างใหม่ที่สามารถอุ้มน้ำ และไม่มี การดูดน้ำเข้ามาอีก มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิดลักษณะเจลเหนียวคล้ายฟิล์มหรือผลึก (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543)

การคืนตัวของแป้งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ขึ้นกับเวลา ซึ่งเป็นกระบวนการจัดเรียงตัวโครงสร้างใหม่อีกครั้งให้เป็นโครงสร้างที่เป็นระเบียบ ภายหลังจากเกิดเจลาตีในซ์ โดยช่วงแรกสายของแป้ง 2 สาย หรือมากกว่า 2 สายจะรวมตัวกันเกิดเป็น junction point ง่ายๆ ซึ่งต่อมาจะพัฒนาให้มีความเป็นระเบียบมากขึ้นจนมีลักษณะเป็น โครงร่างผลึกในตอนสุดท้าย เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (ภาพที่ 2.7) การคืนตัวของแป้งโดยทั่วไปจะเกิดได้ดีเมื่อมีความเข้มข้นสูง และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งแป้งแต่ละชนิดมีอัตราการคืนตัวของน้ำแป้งสูงแตกต่างกัน (Gordon and Davis. 1998)



ภาพที่ 2.7 การคืนตัวของแป้ง (Bornet. 1993)

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิด

Starch type	Amylose (%)	Amylopectin (%)	Gelatinization temperature (°C)	Paste clarity
Corn	28	72	62-80	Opaque
Waxy corn	1	99	63-74	Clear
Potato	21	79	58-65	Clear
Wheat	25	75	53-72	Slightly opaque
Sorghum	26	74	68-78	-
Rice	17	83	61-80	Slightly opaque
Casava/Tapioca	17	83	52-65	Clear-translucent
Sago	27	73	60-74	Clear-translucent

ที่มา : Whistler and BeMiller. 1999

2.5.3 การผลิตเอทานอลจากแป้ง

ไกรยศ แซ่ลิ้ม (2550) กล่าวว่า การผลิตเอทานอลจากแป้ง จะต้องนำแป้ง ไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยวิธีการทางเคมี เพื่อให้แป้งอยู่ในสภาพที่เหมาะสมก่อนจะทำการหมักต่อไป ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาลนั้นมี 3 วิธี คือ

1. การใช้กรด เป็นวิธีการดั้งเดิม โดยจะใช้กรดรวมกับการใช้ความร้อน ปฏิกริยาการย่อยจะเกิดแบบสุ่ม เนื่องจากการใช้กรดเป็นปฏิกริยาที่รุนแรง โดยกรดจะย่อยน้ำตาลกลูโคสที่ได้ให้เป็นผลผลิตอย่างอื่น เช่น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-hydroxymethylfurfural) ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการสลายน้ำตาลโดยใช้ความร้อน นอกจากนี้แล้วการใช้กรดยังทำให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์ขึ้น (Schenck and Hebeda. 1992)

Agu *et al.* (1997) ได้ศึกษาผลของการใช้ความร้อนและปริมาณความเข้มข้นของกรดต่อการย่อยสลายมันสำปะหลัง เพื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปผลิตเอทานอล พบว่า การใช้ปริมาณความเข้มข้นของกรดสูงจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น แต่ก็ทำให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์สูงขึ้นตามไปด้วย โดยสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งคือ ใช้ปริมาณความเข้มข้นของกรด 0.3 M H₂SO₄ แล้วนำไปต้มเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปรับค่า pH ให้เป็นกลางด้วย 1 M NaOH แล้วนำน้ำตาลที่ได้ไปหมักจะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 3.5% (v/v)

นอกจากนี้อาจใช้กรดควบคู่กับการให้เอนไซม์ในการย่อยแป้ง โดยการย่อยแป้งด้วยกรด แล้วจึงเติมเอนไซม์ย่อยต่อไป ในปัจจุบันการใช้กรดในการย่อยแป้งไม่เป็นที่นิยม

เนื่องจากจะต้องทำการปรับ pH ให้เป็นกลางก่อนนำไปใช้ ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิต

2. การใช้เอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาล เอนไซม์ที่ใช้จะอยู่ในกลุ่มเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส เบต้า-อะไมเลส และแกมมา-อะไมเลส

3. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และราบางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จุลินทรีย์เหล่านี้ถ้าหากนำมาใช้ต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อ และมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ บางครั้งอาจใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาช่วยปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูง เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus* เป็นต้น เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *Rhizopus oryzae* เป็นต้น ส่วนยีสต์ ได้แก่ *Endomycosis fibuligera*, *Lipomyces kononenkoae*, *Trichosporon pullulans*, *Candida Antarctica* เป็นต้น (Wanderley et al. 2004)

2.6 ยีสต์

ยีสต์เป็นฟังไจ (fungi) กลุ่มหนึ่ง โดยฟังไจแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. รา (mold) คือ ฟังไจที่วงจรชีวิตส่วนใหญ่เป็นเส้นใยฟู (hyphae) และเป็นเส้นใยแท้ (true mycelium)
2. ยีสต์ (yeast) คือ ฟังไจที่วงจรชีวิตส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยวและเส้นใยเทียม (pseudomycelium)

ยีสต์มีขนาดและรูปร่างใหญ่กว่าแบคทีเรีย มีขนาด 1-10 ไมครอน ส่วนใหญ่มีเซลล์เดี่ยว (single cell) มีน้อยชนิดที่เจริญเป็นเส้นใย ผิวโคโลนีของยีสต์ส่วนใหญ่จะเรียบเหมือนแบคทีเรีย เซลล์ยีสต์ทุกชนิดเมื่อย้อมสีด้วยวิธีแกรมจะติดสีแกรมบวก (บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2550)

ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว ส่วนใหญ่เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) มีน้อยชนิดที่เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบฟิชชัน (fussion) (สาวิตรี ลิมทอง. 2549) ลักษณะการเจริญของยีสต์ แบ่งเป็น oxidative yeast คือ ยีสต์ที่เจริญที่ผิวหน้าของอาหารเหลว หรือที่ที่มีออกซิเจน และ fermentative yeast คือ ยีสต์ที่เจริญได้ในทุกส่วนของอาหารเหลว หรือเจริญได้ทั้งในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน (บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2550)

ยีสต์สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย เช่น น้ำตาล กรดอินทรีย์ กรดไขมัน ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ และพอลิเมอร์หลายชนิด มีบางชนิดที่เป็นเชื้อโรคทำให้เกิดโรคพืชและโรคสัตว์ ในธรรมชาติยีสต์แต่ละชนิดมีแหล่งที่อยู่จำเพาะขึ้นอยู่กับลักษณะสรีรวิทยาของยีสต์ชนิดนั้น ได้แก่ ความสามารถในการใช้สารประกอบบางชนิดและความสามารถในการเจริญในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ (สาวิตรี ลิมทอง. 2549)

ปัจจุบันยีสต์ใช้ผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหลายชนิดแบ่งกว้างๆได้เป็น

1. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ และวีสกี
2. ผลิตภัณฑ์จากการหมัก เช่น เอทานอล และกลีเซอรอล
3. ผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ เช่น ยีสต์ขนมปัง ยีสต์อาหารคน และยีสต์อาหารสัตว์
4. ผลิตภัณฑ์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามินบีและวิตามินดี เอนไซม์ เช่น อินเวอร์เทส

(invertase) แลกเทส (lactase) และไลเปส (lipase) และ อาร์เอ็นเอ (RNA) (สาวิตรี ลิมทอง. 2549)

นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการใช้ยีสต์ผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น น้านมที่ปราศจากแลคโทส (lactose-free milk) สารให้ความหวาน เช่น อะราบิทอล (arabitol) ไซลิทอล (xylitol) สารให้สี เช่น แอสตาแซนทิน (astaxanthin) และอัลฟา-คาโรทีนอยด์ (α -carotenoid) พอลิแซ็กคาไรด์ เช่น ฟอสโฟแมนแนน (phosphomannan) และพูลูลูแลน (pullulan) กรดอะมิโน เช่น แอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) และสารให้กลิ่นรส รวมทั้งสารต่างๆสำหรับการรักษาและดูแลสุขภาพ เช่น ยารักษาโรค วัคซีน ฮอร์โมน และโพรไบโอติก (probiotic) ในปัจจุบันยังมีการใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) เพื่อการผลิตโปรตีนที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท (สาวิตรี ลิมทอง. 2549)

2.6.1 ยีสต์จีนัส *Kluyveromyces*

ยีสต์ *Kluyveromyces* พบทั่วไปในดิน ผลไม้ และวัสดุพวกพืช สามารถหมักน้ำตาลได้เร็ว และใช้สับสเตรทได้หลายชนิด ยีสต์จีนัสนี้สามารถผลิตเอนไซม์แลคเตส (lactase) มาข่อยน้ำตาลแลคโตส (lactose) ได้ (Brady *et al.* 1994) มีความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°C เช่น *K. marxianus* เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 52°C (Banat and Marchant. 1995) และหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 50°C (Banat *et al.* 1992) *K. fragilis* เจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 46°C (Szczodrak and Targonski. 1988) ในขณะที่ *K. lactis* เจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40°C (D'Amore *et al.* 1989)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ (multipolar budding) บางครั้งอาจสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแอสโคสปอร์ ผิวเรียบรูปร่างคล้ายไต รูปกลม หรือ รูปไข่ จำนวน 1-16 สปอร์/แอสคัส ไม่ใช่ในเตรท ไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) และไม่เกิดปฏิกิริยากับสี Diazonium blue B (Barnett *et al.* 2000; Kurtzman and Fell. 1998)

2.6.2 ยีสต์ *Kluyveromyces lactis*

ยีสต์ *K. lactis* ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการผลิตเอนไซม์แลคเตส (β -galactosidase) ตั้งแต่ปี 1950 และใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน bovine chymosin (renin/r protein) (van den Berg *et al.* 1990) การผลิต r-protein ของยีสต์ *K. lactis* มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ การเหนี่ยวนำของ promotor ที่ชื่อ *LAC4* ซึ่งจะถูควบคุมด้วยปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพียงเล็กน้อย รวมถึงความสามารถในการใช้สับสเตรออย่างน้ำตาลแลคโตสและหางนม ยีสต์สายพันธุ์นี้ได้รับการยอมรับเป็น GRAS (Generally recognized as safe) มีความสามารถในการหลังโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลใหญ่ได้ (Wésolowski-Louvel *et al.* 1996) มีลำดับเบสของจีโนมที่สมบูรณ์ (Dujon *et al.* 2004) และถูกนำไปใช้ทางการค้าในการศึกษาโปรตีนจากบริษัท NEB (Colussi and Toron. 2005) ขณะที่งานวิจัยส่วนใหญ่จะรายงานที่ตำแหน่ง MAT α mating ของสายพันธุ์ CBS 2359 แต่สายพันธุ์ที่เป็น wild type strain GG799 ได้ถูกนำมาใช้เป็นชุด kit ทางการค้าที่ได้รับการยอมรับในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Çalik and Çalik. 2011)

K. lactis ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติในการหลังเอนไซม์ออกมาทั้งภายนอกและภายในเซลล์ในปริมาณที่สูง (over expression) เช่น ช่วยในการย่อยน้ำตาลแลคโตสในอุตสาหกรรมการผลิตนม หมักน้ำตาลแลคโตสในการผลิตแอลกอฮอล์ในอุตสาหกรรมการหมัก ส่วนในอุตสาหกรรมการผลิตยา *K. lactis* ถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยาในการรักษาโรคสำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น interleukin, interferon, lysozyme, serum albumin, insulin precursor เป็นต้น และยังสามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารในเด็กอ่อน (van Ooyen *et al.* 2006)

ยีสต์ถูกนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการศึกษาผลผลิตโปรตีนที่ได้จากการตัดต่อพันธุกรรมในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยีสต์เป็น Eukaryote เซลล์เดียว ทำให้ง่ายต่อการปรับปรุงพันธุกรรมและเลี้ยงง่าย โตเร็ว ซึ่งถือเป็นข้อได้เปรียบ ใช้เป็นแบบจำลองของสิ่งมีชีวิตพวก Eukaryote ได้ในการสังเคราะห์โปรตีน ประหยัดในการศึกษา เพราะยีสต์โตเร็ว ผลิตโปรตีนได้มาก และไม่เป็นโรค หรือ ก่อโรค หรือ ไม่เป็นไวรัส (Çalik^a and Çalik^b. 2011)

K. lactis สามารถให้ผลการแสดงออกของโปรตีนออกมาสูงและหลังโปรตีนออกนอกเซลล์ เชื้อเลี้ยงง่าย โตเร็ว สามารถให้ผลการแสดงออกของยีนได้หลากหลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดยไม่จำเป็นต้องดูการแสดงออกของยีนใน *E. coli* ก่อน สามารถทำการถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ได้ง่ายและเร็ว ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายกับยาปฏิชีวนะที่มีราคาแพง จึงเป็นที่สนใจในทางการค้าเป็นอย่างมาก (NEB: *K. lactis* Protein Expression Kit, USA) และยังมีคุณสมบัติเป็นคิลเลอร์ยีสต์ (killer yeast) ซึ่งจะมีการปลดปล่อยสารพิษพวกโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนออกนอกเซลล์ เปรียบเสมือน

ยาปฏิชีวนะ เรียกว่า คิลเลอร์ท็อกซิน (killer toxin) มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (สุนีย์ แวมะ. 2552; Schaffrath and Breunig. 2000)

การนำยีสต์มาผลิตเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์พวกยีสต์และมีสับสเตรทเป็นสารประกอบพวกแป้งหรือน้ำตาล โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และเอทานอล 2 โมเลกุล ภายใต้สภาพที่ปราศจากอากาศ (Phaff *et al.* 1968) ในกระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งการทำงานโดยความร้อน การคัดแยกยีสต์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ ซึ่ง *K. lactis* เป็นสายพันธุ์ที่ทนร้อนและสามารถผลิตเอทานอลได้มาก (Hacking *et al.* 1984; D'Amore *et al.* 1989)

2.6.3 ประโยชน์ของยีสต์ *K. lactis* ในอุตสาหกรรม

Van Ooyen *et al.* (2006) กล่าวว่า ยีสต์ *K. lactis* ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ เนื่องจากความสามารถในการผลิตโปรตีนเป้าหมายในปริมาณสูง ซึ่งสามารถผลิตออกมาได้โดยการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (secreted enzyme) และการผลิตภายในเซลล์ (intracellular enzyme) เช่น เอนไซม์ bovine prochymosin ที่พบในนม (van den Berg *et al.* 1990) ยีสต์ *K. lactis* นั้นสามารถผลิตเอนไซม์แลคเตส (lactase) ได้ และถูกนำมาผลิตเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ชื่อว่า Maxi-lact™ (DSF Food Specialties, Deft, Netherlands) ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยเพียงพอที่จะนำมาใช้ (Generally Regarded as Safe : GRAS) และถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์พวกนมเป็นหลัก เพื่อช่วยในการย่อยน้ำตาลแลคโตสในน้ำนม และเชื้อยีสต์ที่ทำให้แห้งและทำให้หมดฤทธิ์ถูกนำมาใช้เป็นโปรตีนเสริมในอาหาร นอกจากนี้ยีสต์ *K. lactis* ถูกนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออกของยีนในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถผลิตโปรตีนที่ใช้ในการรักษา (therapeutic protein) ในอุตสาหกรรมการผลิตยา ซึ่งมีโปรตีนที่เป็น therapeutic มากมายที่ถูกผลิตโดยยีสต์ *K. lactis*

โปรตีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่ยีสต์ *K. lactis* ผลิตได้ในปริมาณที่สูง ได้แก่ interleukin 1-β, interferon α A, β-lactoglobulin, lysozyme, macrophage colony stimulating factor, serum albumin และ insulin precursor ยีสต์ *K. lactis* ถูกใช้ในการสร้างสารแอนติบอดี single-chain Fv มากที่สุด แต่ข้อเสียอย่างเดียวในการใช้ยีสต์ *K. lactis* และยีสต์อื่นๆ รวมทั้งการใช้เชื้อราในระบบการแสดงออกของยีน เพื่อผลิตใช้สำหรับการรักษานั้น โปรตีนที่หลั่งออกมาจะผ่านกระบวนการ glycosylation ที่ไม่เหมือนในมนุษย์ ซึ่งจะมีผลต่อครึ่งชีวิตของเนื้อเยื่อและความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโปรตีนที่ใช้ในการรักษา อย่างไรก็ตามมีความก้าวหน้าขอบเขตในการใช้งาน โปรตีนจากยีสต์ในกระบวนการ glycosylation

ของมนุษย์ โดยการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ในกระบวนการ glycosylation จากมนุษย์ใน ยีสต์ ซึ่งเป็นความหวังในการนำยีสต์มาผลิตโปรตีนเพื่อใช้ในการรักษาต่อไปในอนาคต

ปัจจุบันพบว่ามียีสต์มากกว่า 40 ชนิดที่ถูกนำมาศึกษาการแสดงออกในระบบ ของยีสต์ *K. lactis* ซึ่งโปรตีนต่างๆได้มาจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วย นม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถของยีสต์ *K. lactis* ว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนที่ ได้จากแหล่งต่างๆ เพื่อนำไปพัฒนาปรับใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตต่างๆ

2.6.4 การแสดงออกของยีนอะไมเลสในยีสต์ *K. lactis*

Tokunaga *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน แอลฟา-อะไมเลส เพื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสระหว่าง *K. lactis* และ *S. cerevisiae* โดยใช้ shuttle vector ในการถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ พบว่า *K. lactis* strains MD2/1 ที่ใช้ เวกเตอร์ pM16 จะสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสออกมาได้สูงกว่า *S. cerevisiae* strain YNN27 จากการตรวจสอบด้วยการนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง yeast plus soluble starch (YPS) บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบด้วยสารละลายไอโอดีน ผลที่ได้คือ โคลโลนิของ *K. lactis* MD2/1 (pM16) มีวงสีที่ใหญ่กว่า *S. cerevisiae* YNN27 (pM16) และ *K. lactis* MD2/1 (pM16) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อยู่ที่ 0.527 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ขณะที่ *S. cerevisiae* YNN27 (pM16) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อยู่ที่ 0.141 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$

Tanaka *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการแสดงออกของ HEW (hen egg white) lysozyme ระหว่าง *K. lactis* และ *S. cerevisiae* โดยใช้เวกเตอร์ pSV-HeLz ในการถ่าย ยีนเข้าสู่ยีสต์ พบว่า *K. lactis* MD2/1 มีความสามารถในการผลิต lysozyme อยู่ที่ 8.6 U ซึ่งมีค่า มากกว่า *S. cerevisiae* YNN27 ถึง 2 เท่า ขณะที่ความเสถียรของเวกเตอร์ pSV-HeLz ในอาหาร YPD ของ *K. lactis* MD2/1 อยู่ที่ 30-33.8% และ *S. cerevisiae* YNN27 อยู่ที่ 60-70% แต่ *K. lactis* MD2/1 ยังคงสามารถผลิต lysozyme ได้มากกว่า แม้จะมีค่าความสามารถของเวกเตอร์ต่ำกว่า *S. cerevisiae* แสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะมีเวกเตอร์ที่เสถียรมาก แต่ก็ไม่ได้ส่งผลต่อการแทรกเข้าสู่ โครโมโซมของยีสต์ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญต่อผลการแสดงออกของยีน

Li *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการโคลนยีนแอฟฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อที่ย่อยสลายและใช้แป้งในการเจริญเติบโต ซึ่งการถ่ายยีนแอลฟา- อะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ *K. lactis* ได้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ 22.4 U/ml เมื่อเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 30°C ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส ที่ค่า pH 7 ยิ่งไปกว่านั้นยีสต์ถูกผสมที่มีประสิทธิภาพในการย่อย แป้งนี้ เมื่อปริมาณเชื้อท้ายสุดที่น้ำหนัก 12.25 g/l กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 11 U/ml ซึ่ง อาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนคือแป้งอยู่ปริมาณ 20 g/l

2.6.5 การผลิตเอทานอลจากยีสต์ *K. lactis*

การผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งเชื้อยีสต์จะมีการเจริญช้ากว่าการเจริญในสภาพที่ใช้ออกซิเจน และไพรูเวตที่ได้จากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และก๊าซคาร์บอน ไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) หลังจากนั้นอะซีตัลดีไฮด์จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยมี NADH_2 และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา (สาวิตรี ลิมทอง. 2549)

Bozzi *et al.* (1997) กล่าวว่า เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase : ADHs) พบได้ในส่วนของไซโทโซล (cytosol) และส่วนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งพบได้ในยีสต์บางสายพันธุ์ ใน *S. cerevisiae* จะพบยีน ADHs ในส่วนของไซโทโซล คือ SADH I จะทำการหมักเปลี่ยนอะซีตัลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอล และ SADH II จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอลไปเป็นอะซีตัลดีไฮด์ ซึ่งการทำงานของยีนขึ้นกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร และในไมโทคอนเดรีย คือ SADH III จะทำหน้าที่เป็นตัวช่วยในปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งไม่สัมพันธ์กับเซลล์ยีสต์ ยีน ADH อื่นที่คล้ายกันคือ SADH IV ในยีสต์ *S. cerevisiae* ถอดรหัสโปรตีนที่ไม่เหมือนกับชนิดก่อนหน้า เนื่องจากมีส่วนของ iron-activated ที่คล้ายกับยีน ADH ในแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ส่วนยีน ADHs ในยีสต์ *K. lactis* มี 4 ยีน ซึ่งพบในไซโทโซล 2 ยีน ได้แก่ KIADH I และ KIADH II และอีก 2 ยีนในไมโทคอนเดรีย ได้แก่ KIADH III และ KIADH IV โดยยีน ADHs ที่พบในไซโทโซลจะมีความคล้ายกับยีน SADH I คือทำหน้าที่ในการหมัก ระดับน้ำตาลกลูโคสในอาหารจะส่งผลต่อยีนในการเจริญของเซลล์ ซึ่งตรงข้ามกับยีนที่ถอดรหัสจากไมโทคอนเดรีย จะถูกกำหนดการทำงานโดยแหล่งคาร์บอน ความเป็นจริงยีน KIAHD IV จะมีความพิเศษ ซึ่งจะถูกเหนี่ยวนำในระดับการถอดรหัสของเอทานอล และไม่ขึ้นกับน้ำตาลกลูโคส ขณะที่ยีน KIADH III จะถูกเหนี่ยวนำโดยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ในการหายใจ ยกเว้นจากเอทานอล

ยีน ADHs ทั้ง 4 ยีนในยีสต์ *K. lactis* นั้นมีความโดดเด่น และมีความแตกต่างจากยีสต์ *S. cerevisiae* โดยมีความสามารถในวิวัฒนาการที่ซับซ้อนจากการหายใจได้มากกว่า และไม่สะสมเอทานอลไว้สูงในระหว่างการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ

Mazzoni *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาถึงองค์ประกอบที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากยีน KIAHD IV ในยีสต์ *K. lactis* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีลักษณะพิเศษเหนี่ยวนำให้เกิดเอทานอล และไม่ขึ้นกับการใช้น้ำตาลกลูโคสในกระบวนการหายใจ โดยทำการวิเคราะห์ส่วนของ UAS_E ที่เป็นส่วนโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีน KIAHD IV ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญที่ทำให้ยีน KIAHD IV ทำหน้าที่ในการผลิตเอทานอล ส่วนของ

UAS_E ประกอบด้วย 5 STREs (stress response elements) พบได้ในหลายๆ ยีนของยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งจะส่งผลต่อสภาวะของเซลล์ ส่วน KIADH IV นั้นจะไม่มีผลกับสภาวะดังกล่าว โดย STREs ในโปรโมเตอร์ของ KIADH IV นั้นสามารถจับกับแฟคเตอร์ได้โดยไม่ต้องมีการเหนี่ยวนำ

ตามทฤษฎีการผลิตเอทานอลจากกลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอล 0.511 กรัม และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.498 กรัม นั่นคือ มีผลผลิตทางทฤษฎี (theoretical yield) สำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับ 51.1% เนื่องจากน้ำตาลประมาณ 6-12% จะถูกยีสต์ใช้เพื่อการเจริญ และ บางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนท และ higher alcohol หรือ fuel oil ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎีเสมอ ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้อยู่ในช่วงไม่เกิน 90-95% ของผลผลิตทางทฤษฎี โดยผลผลิตพลอยได้ที่เกิดขึ้นเกิดจากการใช้ สับสเตรท 4-5% และถ้าสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างผลผลิตพลอยได้เหล่านั้น จะได้ เอทานอลเพิ่มขึ้น 2.7% ปัจจุบันการผลิตระดับอุตสาหกรรมเอทานอลที่ได้จะมีค่าเพียง 80-90% ของ ผลผลิตทางทฤษฎี ซึ่งกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์นอกจากจะให้ผลผลิตที่ต้องการแล้วยังมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนในรูปของ ATP ด้วย (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549; Panchal, 1990)

Merico *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการใช้น้ำตาลกลูโคส การผลิตเอทานอล และกลีเซอรอล ของยีสต์ *K. lactis* CBS 2359 เทียบกับยีสต์ *S. cerevisiae* และ *S. kluyveri* โดยสภาวะการเลี้ยงยีสต์ *K. lactis* อยู่ภายใต้การควบคุมออกซิเจน (oxygen-limited) ขณะที่ *S. cerevisiae* และ *S. kluyveri* จะเลี้ยงในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobe) พบว่า ปริมาณ การใช้น้ำตาลกลูโคสของ *S. cerevisiae* และ *S. kluyveri* อยู่ที่ 26.8 และ 14.9 mmol/g/h ตามลำดับ ขณะที่ *K. lactis* อยู่ที่ 9.4 mmol/g/h ผลผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* และ *S. kluyveri* อยู่ที่ 35.4 และ 20.5 mmol/g/h ตามลำดับ ขณะที่ *K. lactis* อยู่ที่ 14 mmol/g/h และปริมาณกลีเซอรอลของ *S. cerevisiae* และ *S. kluyveri* อยู่ที่ 4.17 และ 3 mmol/g/h ตามลำดับ ขณะที่ *K. lactis* อยู่ที่ 1.7 mmol/g/h ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาทำการเทียบเป็นผลผลิตของเอทานอลที่ผลิตได้ต่อการใช้น้ำตาล กลูโคส ได้ผลคือ *S. cerevisiae* และ *S. kluyveri* อยู่ที่ 0.4 และ 0.35 g/g glucose ตามลำดับ และ *K. lactis* อยู่ที่ 0.38 g/g glucose แสดงให้เห็นว่า *K. lactis* มีการผลิตเอทานอลได้พอๆกับ *S. cerevisiae*

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

รายละเอียดของอุปกรณ์ และวิธีการเตรียมสารที่ใช้ในการทดลองสำหรับการโคลนยีนที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ จะแสดงในภาคผนวก ก

3.1 ที่มาของเชื้อ

3.1.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่

เชื้อ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 5 ไอโซเลท คือ 1-16, 5-4, 5-7, 7-13 และ 7-14 ที่คัดแยกได้จากถั่วเน่า (อาหารหมักทางภาคเหนือของไทย) ซึ่งไอโซเลททั้งหมดพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยทำการทดสอบกิจกรรมในอาหาร Starch agar ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ใช้สำหรับการโคลนพลาสมิดลูกผสม

3.1.2 เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่

เชื้อยีสต์ *Kluyveromyces lactis* สายพันธุ์ GG799 เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน (*K. lactis* Protein Expression Kit, New England Biolab, USA)

3.2 พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิดเวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่

pTZ57R/T vector (Fermentas, Canada) ที่ใช้สำหรับเป็นโคลนนิ่งเวกเตอร์

pKLAC2 vector (New England Biolab, USA) เป็น expression vector ที่ใช้สำหรับการแสดงออกของโปรตีนใน *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 (New England Biolab, USA)

3.3 เอนไซม์ทางการค้า

3.3.1 Heat stable amylase (Suntaq International Limited, China)

3.3.2 Termamyl 120 LS (Novo Nordisk, Denmark)

3.3.3 Spezyme 300 (Enzyme Solutions, Australia)

3.4 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ *Bacillus* sp.

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. โดยเชื้อโคโลนีของเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Lubia-Bertani broth (LB broth) 5 ml นำไปเขย่าที่ความเร็ว 220 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้น ตักตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้งเหลือตะกอนเซลล์ จากนั้นเติม TE buffer ที่มีส่วนผสมของ 6.7% sucrose ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไป vortex แล้วเติม lysozyme ความเข้มข้น 70 mg/ml ปริมาตร 100 μ l กลับหลอดไปมาแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 20% SDS ปริมาตร 50 μ l กลับหลอดไปมาเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม proteinase K (Vivantis, Malaysia) ความเข้มข้น 20 mg/ml ปริมาตร 10 μ l แล้วนำไปปั่นต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เวลา 10 นาที จากนั้น ทำการดูดส่วนใสออกมาประมาณ 300 μ l ใส่ใน หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ ต่อมาเติม phenol : chloroform : isoamyl (25:24:1) ปริมาตร 700 μ l กลับหลอดไปมาเป็นเวลา 3 นาที จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ ตักตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ เติม 70% เอทานอล 700 μ l กลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่นำเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 μ l จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8% และนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultraspec 1100pro: Amercham Bioscience, UK) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) และ 280 nm (A_{280}) สำหรับดีเอ็นเอ และโปรตีนตามลำดับ โดยคุณภาพดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า A_{260}/A_{280} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยก ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8-2.0 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนที่จะนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3.5 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอโดยวิธีแยกขนาดในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า

นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ผสมกับ 6X loading dye (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 และทำการวิเคราะห์ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ 0.5X TAE pH 8 (ภาคผนวก ก) โดยใช้ 25 ng λ DNA (Fermentas, Canada) เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน เชื่อมกระแสไฟฟ้าเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์เท่ากับ 100 โวลต์ เป็น

เวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลอะกาโรสย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำอีก 5 นาที จึงนำแถบดีเอ็นเอไปตรวจโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง gel documation (Syngene genius; Bio Imaging System, Germany)

3.6 การคัดเลือกยีนอะไมเลส

3.6.1 การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลส โดยออกแบบ specific primers จากยีนไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 13 ของเชื้อ *Bacillus* จากฐานข้อมูล ได้แก่ ยีน alpha-glucosidase จากเชื้อ *B. thuringiensis* serovar konkukian str. 97-27 และ *B. cereus* ATCC 10876 และยีน alpha-amylase จากเชื้อ *B. anthracis* str. H9401 โดย Forward primer เริ่มจากตำแหน่ง ATG มีขนาด 22 เบส คือ BCA_amy2F 5'- ATGAATAAGACATGGTGGAAAG-3' และ Reverse primer เริ่มจากตำแหน่ง stop codon มีขนาด 23 เบส คือ BCA_amy2R 5'-TTATGAAATGCGATAAACCCCTTG-3' (ภาพที่ 3.1)

3.6.2 การเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลสด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลสด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วยสารละลาย 1X ViBuffer A (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1 ที่อุณหภูมิ 20°C) 0.01% Triton™X-100 (Vivantis, Malaysia) 2 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP, 10 µM BCA_amy2F (forward primer) และ 10 µM BCA_amy2R (reverse primer) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) 1 ยูนิต และจีโนมิกดีเอ็นเอ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อัด โนมัตติ (Thermal Cycler; Biometra, Germany) ซึ่งกำหนดอุณหภูมิก่อนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอต้นแบบสามารถแยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาอยู่ในช่วง 55°C เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่เป็นเบสคู่สมกัน จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์อิสระและเหมาะสมกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งสิ้น 35 รอบ และก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้นิวคลีโอไทด์อิสระต่อกันเป็นนิวคลีโอไทด์อย่างครบถ้วน จึงถือว่า

สิ้นสุดขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.5

3.6.3 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

สกัดแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย FarvorPrep™ GEL/PCR Purification kit (Favorgen, Austria) โดยตัดแถบผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เดิมบัฟเฟอร์ FADF 500 µl นำไป vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที vortex ทุก 3 นาที จนกระทั่งเจลละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน FADF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งจากนั้นเติม wash buffer 700 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง จากนั้นเติม elution buffer 40 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.5

3.6.4 การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.6.3 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ ซึ่งเวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลองขั้นตอนนี้คือ pTZ57R/T ตามวิธีการในชุดน้ำยาสำเร็จรูป InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Canada) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของดีเอ็นเอผลผลิตต่อเวกเตอร์เท่ากับ 3 ต่อ 1 โดยปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 20 µl ประกอบด้วย 1X ligation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP; pH 7.8 ที่อุณหภูมิ 25°C), เวกเตอร์ pTZ57R/T 55 ng, เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas, Canada) ความเข้มข้น 5 ยูนิต และผลผลิตพีซีอาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.6.5 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5α

การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5α ตามวิธีการของ Inoue *et al.* (1990) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* DH5α ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB (ภาคผนวก ก) 25 ml บ่มที่อุณหภูมิ 18°C เขย่าที่ความเร็ว 220 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทั้งหมด เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ปริมาตรรวม 200 ml บ่มที่อุณหภูมิ 18°C เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm. ให้มีค่าประมาณ 0.3-0.4 จึงถ่ายเชื้อลงหลอดทดลองขนาด 50 ml แช่หลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งประมาณ 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 10 นาที ทั้งสารละลายส่วนใส และละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB (ภาคผนวก ก) ที่แช่เย็น 16 ml ต่อหลอด แช่หลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 10 นาที ทั้งสารละลายส่วนใส จากนั้นสารละลาย TB ที่แช่เย็น 4 ml ต่อหลอด เขย่าเบาๆ จนตะกอนละลายจนหมด แล้วจึงค่อยๆ เติมสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 7% แช่หลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ ในหลอดไมโครเซนติพีจ์หลอดละ 100 μ l แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C

3.6.6 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock

การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) ทำโดยนำ competent cell ปริมาตร 100 μ l ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายปฏิกิริยาจากข้อ 3.6.4 ปริมาตร 10 μ l ใส่ใน competent cell แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยการแช่ลงในน้ำแข็งเป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 900 μ l แล้วจึงนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 μ g/ml Isopropyl-B-D-thiogalactoside (IPTG) (Vivantis, Malaysia) ความเข้มข้น 0.2 mM/ml และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-Gal) (Vivantis, Malaysia) ความเข้มข้น 0.2 μ g/ml จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 -16 ชั่วโมง

3.6.7 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดถูกผสม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, X-Gal และ IPTG เนื่องจาก pTZ57R/T (Fermentas, Canada) มีบริเวณ *lacZ* gene ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยจะทำการย่อย X-Gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่พลาสมิดที่ถูกสอดแทรกด้วยผลผลิตพีซีอาร์ ที่บริเวณ *lacZ* gene จะทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ เป็นผลให้ได้โคโลนีสีขาว แทนจึงเลือกโคโลนีที่มีสีขาวเก็บเป็น master plate บนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และสุ่มเลือกโคโลนีเป้าหมายเพื่อตรวจสอบด้วยวิธี size screening

BCA_amy2F →

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NC_005957.1  -----CGATGGGATGCAAAAGGAGAGAATGACTATGAATAAGACATGGTGGAAAGAAGCGGTTGCTTATCAAATTTATCCACGTAG
NC_017729.1  AACGTTTGCATAAAATTTCCGATGGGATGCAAAAGGAGAGAATGACTATGAATAAGACATGGTGGAAAGAAGCGGTTGCTTATCAAATTTATCCACGTAG
NZ_CM000715.1 -----GAGAGAATGACTATGAATAAGACATGGTGGAAAGAAGCGGTTGCTTATCAAATTTATCCACGAAG

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NC_005957.1  CTTTATGGATTCAAATGGTGGTATTGGAGATTACAAGGTATTATTGCAAACCTGGATTATTTAAAAGATTTAGGAATAGATGTAATTTGGATTGT
NC_017729.1  CTTTATGGATTCAAATGGTGGTATTGGAGATTACAAGGTATTATTGCGAAACTGGATTATTTAAAAGATTTAGGAATAGATGTAATTTGGATTGT
NZ_CM000715.1 CTTTATGGATTCAAATGGTGGTATTGGAGATTACAAGGTATTATTGCAAACCTGGATTATTTAAAAGATTTAGGTATAGATGTAATTTGGATTGT

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NC_005957.1  CCAATGTATAAGTCACCTAATGATGATAATGGTTATGACATTAGTGATTATCAAGATATTATGGATGAGTTTGGGACGATGGAAGACTTTGATGCTTTAC
NC_017729.1  CCAATGTATAAGTCACCTAATGATGATAATGGTTATGACATTAGTGATTATCAAGATATTATGGATGAGTTTGGGACGATGGAAGACTTTGATGCTTTAC
NZ_CM000715.1 CCAATGTATAAATCGCCTAATGATGATAATGGTTATGATATTAGTGATTATCAAGATATTATGGATGAGTTTGGTACAATGGCAGACTTTGATGCTTTAC

      1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NC_005957.1  ACCCGCAAATTTATGCATATACTCGTACATTAACGATGAAAAAATAGTCGTAATTAGTAATATCTCAAAGAGGAAGCTGTGTATAATGAGGATTTATT
NC_017729.1  ACCCGCAAATTTATGCATATACTCGTACACTAAACGATGAAAAAATAGTCGTAATTAGTAATATCTCAAAGAGGAAGCTGTGTATAATGAGGATTTATT
NZ_CM000715.1 ATCCACAAATTTATGCATATAACGCTACGTTACAGGATGAAAAAGTCATTGTAATTAGTAATATCTCAAAGAGGAAGCTGTGTATAATGAGGGTTCATT

      1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NC_005957.1  TGCCTAGAACGCAAACGTTTGGCTTTTAAATAACTATGAAGTTGCGGAACATGAACAATTAAC TACAATCACGTTAAAGCCTTATGAACAAGGGTTTAT
NC_017729.1  TGCCTAGAACGCAAACGTTTGGCTTTTAAATAACTATGAAGTTGCGGAACATGAACAATTAAC TACAATCACGTTAAAGCCTTATGAACAAGGGTTTAT
NZ_CM000715.1 TGCCTAGAACGCAAACGTTTGGCTTTTAAATAACTATGAAGTTGCGGAACATGAAGAAGTAACAACAATTGCTTTAAACCTTATGAACAAGGGTTTAT

      1710    1720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NC_005957.1  CGCATTTCATAAAAAAAAGGATGCTCTT
NC_017729.1  CGCATTTCATAAAAAAA-----
NZ_CM000715.1 CGCATTTCATAAAAAAAAGGAT-----

```

ภาพที่ 3.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 13 จากฐานข้อมูลเชื้อ *Bacillus* sp.

3.6.8 การคัดเลือกโคลนด้วยวิธี size screening

ใช้ไม้ปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อเก็บโคโลนีที่เลือกใส่ลงใน lysis buffer ที่อุณหภูมิ 25-30 µl คนให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15-30 นาที จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C อีก 5-10 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำไปตรวจสอบขนาดในเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.5 จากนั้นทำการสุ่มเลือกเพื่อนำไปตรวจสอบการสอดแทรกของพลาสมิดลูกผสมต่อไป

3.6.9 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์

คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย สารละลาย IX ViBuffer A (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1 ที่อุณหภูมิ 20°C) 0.01% Triton™ X-100 (Vivantis, Malaysia) 2 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP, 10 µM M13F (forward primer) และ 10 µM M13R (reverse primer) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) 1 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อจาก master plate ที่ได้จากข้อ 3.5.7 ใส่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Thermal Cycler; Biometra, Germany) ซึ่งกำหนดอุณหภูมิก่อนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาอยู่ในช่วง 50°C เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งสิ้น 30 รอบ และก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้นิวคลีโอไทด์อิสระต่อกันเป็นนิวคลีโอไทด์อย่างครบถ้วน จึงถือว่าสิ้นสุดขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบขนาดในเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.5 นำโคลนที่ตรวจสอบแล้วว่ามีสอดแทรกด้วยยีนในขนาดที่ต้องการ มาทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ต่อไป

3.6.10 การสกัดพลาสมิดลูกผสม

นำโคลนที่ได้จากข้อ 3.6.9 มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 3 ml นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้งเหลือตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมสารละลาย P1 buffer ปริมาตร 250 µl ผสมให้เข้ากัน ต่อมาเติม P2 buffer ปริมาตร 250 µl จากนั้นกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง ต่อมาเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 µl แล้วกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000

rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน QIAprep® Spin Miniprep Kit column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่ตามมาเติม PB buffer 500 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่ จากนั้นเติม PB buffer 750 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนติพีพิจ์หลอดใหม่ เติม EB buffer 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำพลาสติกลูกผสมที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.5 จากนั้นนำพลาสติกที่สกัดแล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (First Base, Malaysia) ด้วยไพรมอร์ M13F เป็นไพรมอร์ด้าน forward และ ไพรมอร์ M13R-pUC เป็นไพรมอร์ด้าน reverse เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลส

3.6.11 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มาเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLASTN (basic local alignment search tools) จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลเพื่อหาบริเวณ conserve sequence เพื่อยืนยันว่ายีนที่ทำการโคลนนั้นมีความเป็นไปได้ว่ามียีนอะไมเลส

3.6.12 การคัดเลือกโคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสด้วยวิธี activity plate

ทำการคัดเลือกโคลนที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ดีที่สุด โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 และนำมาทดสอบบนอาหาร Starch agar (ภาคผนวก ก) นำมาเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm. ทำการหยดเชื้อลงในหลุม หลุมละ 10 µl บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบโดยราดทับด้วยสารละลายไอโอดีน (Lugol's solution) ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วทสารละลายไอโอดีนออก พักไว้ 10 นาที แล้วสังเกตวงใสรอบโคโลนี โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1-16 (positive control) และเชื้อ *E. coli* DH5α (negative control) เลือกลูกโคลนที่เกิดวงใสมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนอะไมเลสในยีสต์ *K. lactis*

3.7.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน

เมื่อได้ลำดับกรดอะมิโนของยีสต์ที่สมบูรณ์เรียบร้อยแล้ว นำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาวิเคราะห์หา signal peptide บนยีนด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมจะพบบริเวณ signal peptide นอกจากนี้การแปลรหัสจากดีเอ็นเอเป็นโปรตีนต้องอาศัย tRNA (transfer RNA) ที่มีบริเวณ anticodon ที่เป็นคู่สมกับ codon บนสาย mRNA (messenger RNA) ซึ่งพบว่าใน *E. coli* นั้นมี tRNA ของ codon AUG, AGG, AGA, CUA, CCC และ GGA ในปริมาณที่ต่ำมากหรือที่เรียกว่า rare codon ซึ่งถ้าภายในยีนมี codon เหล่านี้เป็นจำนวนมาก อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลรหัสหรือไม่สามารถแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้

3.7.2 การออกแบบไพรเมอร์

ได้ทำการคัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน ด้วยข้อมูลจากการวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ ซึ่งพิจารณาโดยเลือกเอนไซม์ที่ไม่ตัดขึ้นยีนแต่ตัดเวกเตอร์ที่ตำแหน่ง cloning site โดยได้เลือกเอนไซม์ *XhoI* และ *EcoRI* เพื่อที่จะทำการโคลนเข้าเวกเตอร์ pKLAC2 ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนอะไมเลสนั้นได้ออกแบบตามขั้นตอนที่แสดงในคู่มือของ *K. lactis* Protein Expression Kit (New England Biolab, USA) โดย forward primer คือ 1-16/2_F 5'-CCGCTCGAGAAAAGAATGAATAAGACATGGTGGAA-3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI*, บริเวณตัวเอียง คือ ตำแหน่ง Kex) และ reverse primer คือ 1-16/2_R 5'-CCGGAATTCCTTATGAAATGCGATAAAC CCTTGTTT-3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*)

3.7.3 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนอะไมเลสจากพลาสมิดลูกผสม

ทำการเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลสที่สมบูรณ์ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในขั้นตอนนี้จะใช้พลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 3.6.11 ในปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งเป็นพลาสมิดลูกผสมยีนอะไมเลสโคลน 1-16/2 100 ng, 1X Optimized DyNzyme EXT Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 9 ที่อุณหภูมิ 25°C), 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM (NH₄)₂SO₄, และ 0.01% Triton[®] X-100, 0.2 mM dNTP, 0.5 μ M Forward primer และ 0.5 μ M Reverse primer ที่จำเพาะสำหรับ full length gene (ไพรเมอร์ข้อ 3.7.2), 0.5% DMSO, เอนไซม์ DyNzyme[™] EXT DNA Polymerase (Finnzyme, Finland) 1 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้น 94°C เป็น

เวลา 2 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที ลดอุณหภูมิเป็น 55°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นจึงคงอุณหภูมิที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที เป็นการสิ้นสุดปฏิกิริยา ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.5 และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 3.6.3

3.7.4 การเชื่อมต่อเวกเตอร์ pKLAC2 เข้ากับยีนอะไมเลส

นำเวกเตอร์ pKLAC2 (ภาพผนวก ก) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* โดยในปฏิกิริยา 40 μ l ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 1 μ g, 2X buffer Tango™ with BSA (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA), เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* (Fermentas, Canada) 10 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที นำปฏิกิริยามาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0% ตามวิธีการในข้อ 3.5 และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 3.6.3

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.7.3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยปฏิกิริยารวม 40 μ l ประกอบด้วยผลผลิตพีซีอาร์ 1 μ g, 2X buffer Tango™ with BSA (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA), เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* 10 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที นำปฏิกิริยามาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.0% ตามวิธีการในข้อ 3.5 และนำมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 3.6.3

นำเวกเตอร์และผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* (Fermentas, Canada) มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase (Fermentas, Canada) โดยใช้ อัตราส่วนความเข้มข้นของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 10:1 จะได้พลาสมิดลูกผสม (ภาพที่ 3.2) แล้วนำมาโคลนเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock นำเชื้อมาเกลี่ยบนอาหารเหลว LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ 100 μ g/ml ampicillin นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และเก็บโคโลนีมาเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ 100 μ g/ml ampicillin ทำเป็น master plate เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีการทำโคโลนีพีซีอาร์

3.7.5 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์

คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่ โพลีเมอเรส โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วยสารละลาย 1X ViBuffer A (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1 ที่อุณหภูมิ 20°C) 0.01% Triton™X-100 (Vivantis, Malaysia) 2 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP, 10 μ M pKLAC2_F (5'-GAAGAAGCCTTGATTG GA-3') และ 10 μ M pKLAC2_R (5'-TCGGCACTAATAACCGTT-3') ที่จำเพาะสำหรับเวกเตอร์ pKLAC2, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต (Vivantis, Malaysia) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้ไม้อิมพันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อจาก master plate ที่ได้จากข้อ 3.7.4 ใส่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Thermal Cycler; Biometra, Germany) ซึ่งกำหนดอุณหภูมิก่อนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงมาอยู่ในช่วง 55°C เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งสิ้น 35 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.5

3.7.6 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสในพลาสมิดลูกผสม

ทำการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสในพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7.5 มาเลี้ยงและทำการสกัดพลาสมิดเพื่อนำมาตรวจสอบการสอดแทรกของยีน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Nde*I โดยในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ปฏิบัติ ปริมาตรรวม 20 μ l ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม 100 ng, 1X buffer R with BSA (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA) ปริมาตร 2 μ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III 3 ยูนิต (Fermentas, Canada), และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1% ตามวิธีการในข้อ 3.5

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I โดยปฏิกิริยาปริมาตรรวม 20 μ l ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม 100 ng, 1X buffer O with BSA (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA) ปริมาตร 2 μ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I 3 ยูนิต (Fermentas, Canada), และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1% ตามวิธีการในข้อ 3.5 จากนั้นทำการเลือกพลาสมิดที่

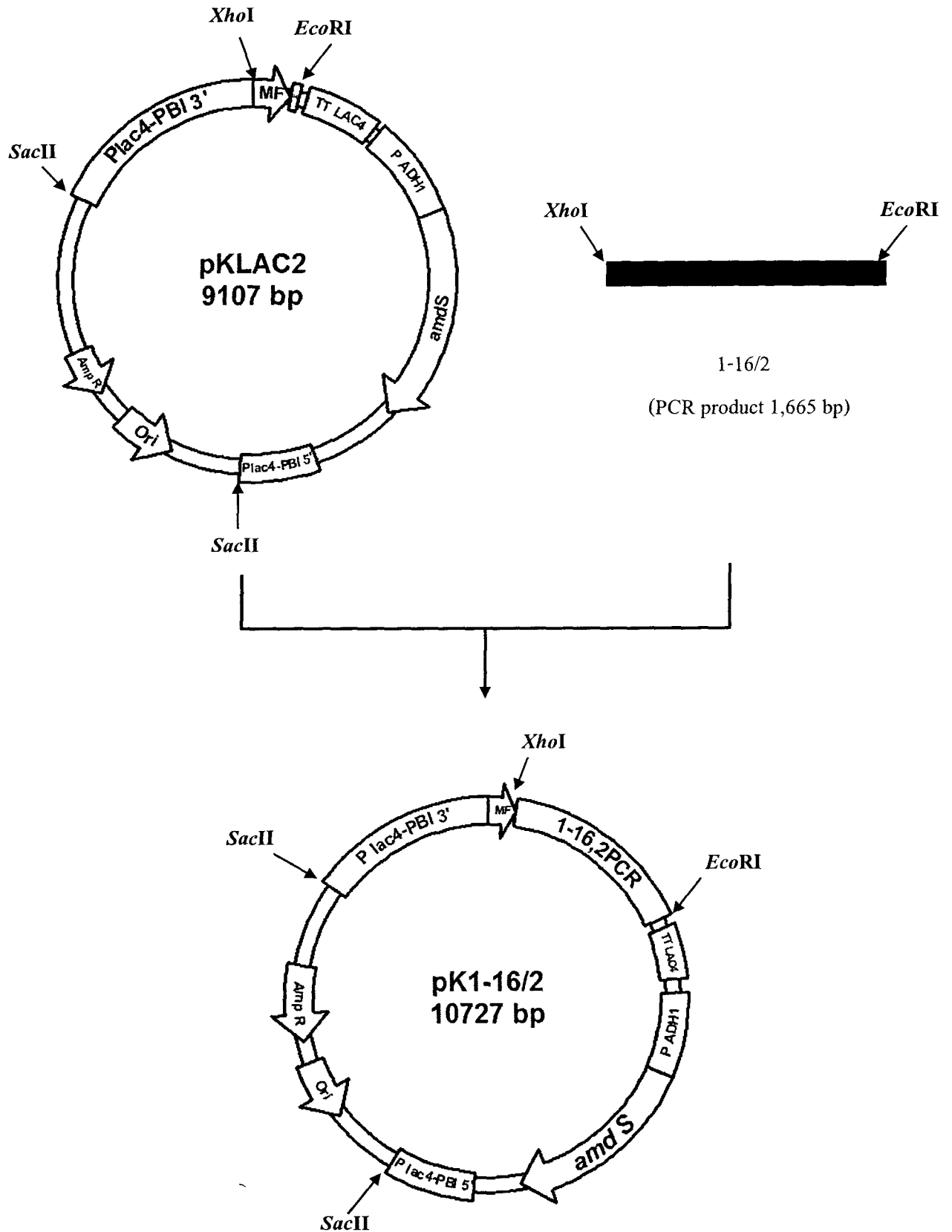
ตรวจสอบแล้วว่ามีสารสกัดด้วยยีนในขนาดที่ต้องการ มาทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (First Base, Malaysia) ด้วยไพรเมอร์ pKLAC2_F (5'-GAAGAAGCCTTGATTGGA-3') เป็นไพรเมอร์ด้าน forward และ ไพรเมอร์ pKLAC2_R (5'-TCGGCACTAATAACCGTT-3') เป็นไพรเมอร์ด้าน reverse เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลส และเลือกโคลนที่มีการถอดเทรคของยีนอะไมเลสไปโคลนเข้ายีสต์ *K. lactis* เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

3.7.7 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านยีสต์ *K. lactis*

ตามวิธีการของ Schiestl and Gietz (1995) โดยทำการเชื้อเชื้อ *K. lactis* สายพันธุ์ GG799 (New England Biolab, USA) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาตร 10 ml เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำเชื้อปริมาตร 500 µl ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มี 3% กลีเซอรอล 100 ml เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C จนสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ได้ประมาณ 0.6-1.0 จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วย TE buffer (pH 7.5) 10 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE-LiAc buffer เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลีเซอรอล 500 µl แบ่ง competent cell ที่ได้ ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บที่อุณหภูมิ -80°C

3.7.8 การโคลนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ยีสต์ *K. lactis*

นำพลาสมิดลูกผสมที่คัดเลือกจากข้อ 3.7.6 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacII* เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอลูกผสมมีลักษณะเป็นเส้นตรง เพื่อที่จะใช้ในการสอดแทรกเข้าไปในจีโนมของยีสต์ *K. lactis* โดยปฏิกิริยาปริมาตรรวม 30 µl ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม 100 ng, 1X NEBuffer4 (20 mM Tris-acetate, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT (pH 7.9)) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacII* 10 ยูนิต (New England Biolab, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำปฏิกิริยามาตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1% ตามวิธีการในข้อ 3.5 เมื่อได้ดีเอ็นเอลูกผสมที่มีลักษณะเส้นตรง (linearized pKLAC2)



ภาพที่ 3.2 โครงสร้างของพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นอะไมเลส 1-16/2 ที่โคลนเข้าเวกเตอร์ pKLAC2 เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI*

การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมที่มีลักษณะเส้นตรงเข้าสู่ยีสต์ด้วยวิธี heat shock โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 μ l ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำดีเอ็นเอสายผสม 1 μ g ปริมาตร 10 μ l ใส่ใน competent cell แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที และเทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGlu 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGlu 1 ml แล้วย้ายใส่หลอด Facon tube เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที และเทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย 1X PBS ปริมาตร 1 ml แล้วนำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YCB ที่มี 5 mM acetamide เลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเลือกส้อมโคโลนีเก็บเป็น mater plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YCB ที่มี 5 mM acetamide เลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2-3 วัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

3.7.9 การคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของยีนอะไมเลสด้วยวิธี activity plate

ทำการสุ่มเลือกโคลนที่ได้จากข้อ 3.7.8 มาเลี้ยงในอาหาร YPS agar สุ่มเลือกเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในเพลท โดยเปรียบเทียบกับ negative control คือ *K. lactis* GG799 (wild type) นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นนำมาทดสอบโดยราดทับด้วยสารละลายไอโอดีน (Lugol's solution) ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเทสารละลายไอโอดีนออก พักไว้ 10 นาที สังเกตวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาอย่างแอ่งที่เป็นสับสเตรท ทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนี จึงเลือกโคลนที่มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.7.10 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์

ทำการสุ่มโคลนที่ได้จากข้อ 3.7.9 มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Cheunjit *et al.* (2004) โดยเขี่ยเชื้อลงในอาหาร YPGlu 10 ml เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำเชื้อใส่ในหลอดเซนติฟิวจ์ 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ละลายตะกอนในสารสกัดดีเอ็นเอ Breaking buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA) 200 μ l และ glass bead 0.3 g หลังจากนั้นปั่นให้เข้ากัน ประมาณ 10-15 นาที จากนั้นเติม Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (50:48:2) 200 μ l แล้วเติม TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6) 200 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวส่วนใส เดิมเอทานอลบริสุทธิ์ 2.5 เท่าของของเหลวใสที่เก็บได้ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ทิ้งไว้จนกระทั่งตะกอนแห้ง จึงละลายตะกอนด้วย TE buffer 40 µl จากนั้นตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1% ตามวิธีการในข้อ 3.5

3.7.11 การตรวจสอบดีเอ็นเอถูกผสมด้วยพีซีอาร์

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.7.10 มาทำการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย สารละลาย 1X ViBuffer A ((50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1 ที่อุณหภูมิ 20°C) 0.01% Triton™X-100 (Vivantis, Malaysia) 2 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP, 10 µM pKLAC2_F และ 10 µM pKLAC2_R, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต (Vivantis, Malaysia) และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Thermal Cycler; Biometra, Germany) ซึ่งกำหนดอุณหภูมิก่อนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงมาอยู่ในช่วง 55°C เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72°C เป็นเวลา 2 นาที โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งสิ้น 35 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 0.8% ตามวิธีการในข้อ 3.5

3.8 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำตัวอย่างโปรตีนผสมกับ 5X SDS dye loading buffer (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วน 1:4 จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ในเจล polyacrylamide ที่มีความเข้มข้นของเจลชั้นล่าง (separating gel) 10% และความเข้มข้นของเจลชั้นบน (stacking gel) 5% โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนแบบ vertical slab gel ขนาด 7x10x0.75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้ไฟฟ้าขนาด 30 mA ต่อเจล เป็นเวลา 75 นาที ใช้ pre-stain protein marker (Fermentas, Canada) เป็นโปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบน้ำหนักของโปรตีน และใช้ running buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเจลไปย้อมด้วย coomassie blue staining buffer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเจลด้วย destaining buffer นาน 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นแถบโปรตีน

3.9 การเตรียมโปรตีนอะไมเลส

3.9.1 การเลี้ยงยีสต์ลูกผสม

เชื้อยีสต์ลูกผสมที่มียีนอะไมเลสที่ได้จากการคัดเลือกโคลนจากข้อ 3.7.11 เลี้ยงในอาหาร YPGal broth ปริมาตร 50 ml เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm. เท่ากับ 0.4 จากนั้นใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% เป็นเชื้อเริ่มต้นเลี้ยงใน flask ขนาด 500 ml โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGal ปริมาตร 250 ml เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2-3 วัน ทำการแยกโปรตีน (crude protein) เพื่อนำไปเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนอะไมเลส โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3.9.2 การทำโปรตีนให้เข้มข้น (protein concentration)

นำโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.9.1 มาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยนำโปรตีนมาผ่าน Vivaspin 20 (GE Healthcare, Sweden) และนำโปรตีนที่ถูกทำให้เข้มข้นแล้ว มาวัดค่าความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford assay kit (Biorad, USA) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 10% SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 3.8

3.9.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

ทำการพามาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายโปรตีน โดยนำ bovine serum albumin: BSA (Fluka, USA) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml จากนั้นนำสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมาอย่างละ 20 μ l ผสมกับน้ำยาคัดโปรตีน Biorad protein assay (Biorad, USA) 1 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้ไปแสดงกราฟมาตรฐาน คำนวณสมการถดถอย $y=ax+b$ โดยค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสง และค่า x เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย BSA

นำโปรตีนที่ต้องการวัด 20 μ l ละลายในน้ำยาโปรตีน 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้น โดยแทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสง เพื่อคำนวณหาค่า x จะได้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA (ภาคผนวก ค)

3.10 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme characterization)

3.10.1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS assay

วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยบ่มเอนไซม์อะไมเลสที่แยกได้จากยีสต์ลูกผสมจากข้อ 3.9.2 ในแป้งมันฝรั่ง (potato starch) ความเข้มข้น 0.1% ซึ่งจะได้ผลผลิตหลังการย่อยสลาย คือน้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นจะวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน 0, 10, 15, 20, 25 และ 50 mM โดยจะใช้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ก) เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมดประมาณ 1 ml โดยมีเอนไซม์อะไมเลส 20 μ l, 0.1% แป้งมันฝรั่ง ในสารละลาย pH 5 ปริมาตร 300 μ l จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม DNS reagent 680 μ l นำปฏิกิริยาไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm (Miller, 1959) เพื่อหาค่า unit of enzyme โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายอะไมโลสให้ได้ น้ำตาลกลูโคส 1 μ mole ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

3.10.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม

3.10.2.1 การทดสอบเวลาการบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimal time)

บ่มเอนไซม์ 20 μ l กับสับสเตรท 0.1% แป้งมันฝรั่งที่ละลายในโซเดียมอะซิเตรต 0.1 M (pH 5) ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 5, 10, 20, 30, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์ตามปฏิกิริยาดังข้อ 3.10.1 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ และเลือกระยะเวลาของการบ่มที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดคือค่าที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

3.10.2.2 การวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (Optimal pH)

บ่มเอนไซม์ 20 μ l กับสับสเตรท 0.1% แป้งมันฝรั่งในสารละลายที่ปรับค่า pH ในช่วง 3-11 โดยค่า pH 3-6 จะใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตรต (sodium acetate buffer) ที่ความเข้มข้น 0.1 M และ pH 7-11 ใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate buffer) ที่ความเข้มข้น 0.1 M จากนั้นจึงทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1 ที่อุณหภูมิ 50°C ตามระยะเวลาที่เหมาะสม

3.10.2.3 การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (Optimal temperature)

หลังจากวิเคราะห์ค่ากรด-ด่างที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ดีที่สุดแล้วจึงทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทจะแตกต่างกัน ซึ่งใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 20-90°C โดยใช้ 0.1% แป้งมันฝรั่งในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ดีที่สุดจากการวิเคราะห์ในข้อ 3.10.2.2 แล้วจึงทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1 ตามระยะเวลาที่เหมาะสม

3.10.2.4 การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ที่ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH stability)

เมื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดแล้ว นำมาวิเคราะห์หาความสามารถในการทนกรด-ด่างของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์มาผสมกับบัฟเฟอร์ที่ pH 3-11 ความเข้มข้น 0.1 M นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ในข้อที่ 3.10.2.2 และ 3.10.2.3 โดยทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1 แล้วเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์กับเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยคิดเป็น 100% แล้วนำมาเปรียบเทียบค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ (relative activity) กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่บ่มในบัฟเฟอร์ pH 3-11

3.10.2.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการทนความร้อนของเอนไซม์ (Thermo stability)

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการทนต่อกรด-ด่างแล้ว จะวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการทนความร้อน โดยนำเอนไซม์มาเจือจางกับบัฟเฟอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 3.10.2.2 ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ จากนั้นนำเอนไซม์ที่เตรียมไว้ไปบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-90°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ในข้อที่ 3.10.2.2 และ 3.10.2.3 โดยทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1 และคำนวณค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลา 0 นาที เป็น 100 %

3.10.3 การวิเคราะห์การย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ (Substrate specificity)

การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายสับสเตรท จะเลือกใช้สับสเตรทแป้งทั่วไปที่หาได้ตามท้องตลาด เพื่อใช้ในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้สับสเตรทความเข้มข้น 0.1% ในการวิเคราะห์ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง (นิวเกรด,

ประเทศไทย), แป้งข้าวโพด (คเนอร์, ประเทศไทย), แป้งมันฝรั่ง (S.D. Fine-Chem, India), แป้งสาลี (บัวแดง, ประเทศไทย), แป้งข้าวเจ้า (นิเวกรด, ประเทศไทย) และแป้งข้าวเหนียว (นิเวกรด, ประเทศไทย) บ่มเอนไซม์ 20 μ l กับ 0.1% สับสเตรท แล้วนำมาทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ ในข้อที่ 3.10.2.2 และ 3.10.2.3 โดยทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1

3.10.4 การวิเคราะห์ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์

ทำการวิเคราะห์โดยบ่มเอนไซม์ 20 μ l กับสับสเตรทแป้งมันฝรั่งที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 mg/ml แล้วนำมาทดสอบในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ในข้อที่ 3.10.2.2 และ 3.10.2.3 แล้วทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์ คือ V_{max} กับ K_m มาจากทฤษฎีของ Michaelis-Menten และการคำนวณจะใช้สูตร จากทฤษฎีของ Lineweaver-Burk ซึ่งจะใช้โปรแกรม Kaleida Graph software package (Synergy Software, US) ในการวิเคราะห์ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ซึ่งค่า V_{max} และ K_m เป็นค่าบ่งชี้ที่สำคัญในการบอกถึงสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยค่า V_{max} คือ ค่าอัตราความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา และค่า K_m คือ ค่าความเข้มข้นคงที่ของสับสเตรท โดยที่ค่า $V_{max}/2$ หมายถึงว่าในปริมาณความเข้มข้นของสับสเตรทที่เอนไซม์สามารถเข้าจับได้

3.10.5 การวิเคราะห์สารยับยั้ง และสารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (Inhibitor-activator enzyme)

โดยใช้ 0.1% แป้งมันฝรั่งในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมของเอนไซม์ในข้อที่ 3.10.2.2 และเติมสารยับยั้งต่างๆดังนี้ 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $SrCl_2$, 10 mM $LiCl$, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $NaCl$, 1% SDS, 5% SDS, 10% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM EDTA และ 50 mM $HgCl_2$ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในข้อที่ 3.10.2.3 แล้วทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1 คำนวณค่าฤทธิ์สัมพันธ์ โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่เติมสารต่างๆ เป็น 100%

3.11 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ *K. lactis*

3.11.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ *K. lactis* (wild type) และเชื้อยีสต์ลูกผสม *K. lactis* เลี้ยงในอาหาร YPGal ปริมาตร 100 ml ใน Flask ขนาด 250 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm. ได้เท่ากับ 0.4 แล้วจึงใช้เชื้อยีสต์ 5% เป็นเชื้อเริ่มต้น

จากนั้นนำเชื้อทั้ง 2 ชนิด มาเลี้ยงต่อในอาหาร YPT (pH 5) (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% ปริมาตร 125 ml ใน flask ขนาด 250 ml นำไปเลี้ยงในสภาวะที่ต่างกัน คือ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30°C และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ อะไมเลส ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ ดังนี้

3.11.2 การนับจำนวนโคโลนีของเซลล์ยีสต์

เก็บตัวอย่างเชื้อยีสต์จากข้อ 3.11.1 นำเชื้อที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ความเข้มข้น 10^6 - 10^{20} แล้วดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 μ l ลงบนอาหาร YPGlu แล้วทำการเกลี่ยไปมาให้ทั่ว (spread plate) ด้วย spreader จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏขึ้นบนอาหารแข็ง

3.11.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่างที่เก็บจากข้อ 3.11.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสด้านบนไปทำการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS โดยผสมตัวอย่าง 50 μ l กับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 300 μ l แล้วเติม DNS reagent 650 μ l นำปฏิกิริยาไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปวัดปริมาณรีดิวซ์ที่ค่าดูดกลืนแสง 540 nm. โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ก)

3.11.4 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.11.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสด้านบน (crude enzyme) ไปวิเคราะห์หาโปรตีนตามขั้นตอนข้อ 3.8.3 จากนั้นนำ crude enzyme 50 μ l มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ในข้อที่ 3.10.2.2 และ 3.10.2.3 แล้วทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1

3.11.5 การวิเคราะห์หาปริมาณแป้งที่เหลืออยู่

การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ตามวิธีการของ Pintado *et al.* (1999) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแป้ง 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1 mg/ml (ภาคผนวก ก) โดยปีเปิดตัวอย่าง 100 μ l แล้วเติมสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ก) 1.2 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 620 nm.

3.11.6 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.11.1 มาวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (Schott, Germany) บันทึกค่าที่วัดได้

3.11.7 การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)

เก็บตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.11.1 ปริมาตร 50 ml นำมาวัดปริมาณแอลกอฮอล์ตามวิธีการของ Zoecklein *et al.* (1995) โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Dujardin-Salleron, France) ซึ่งใช้หลักการหาจุดเดือดของน้ำเปรียบเทียบกับจุดเดือดของตัวอย่างที่ได้ แล้วนำไปอ่านค่าตามแผ่นสเกล สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและ % แอลกอฮอล์ (Dujardin-Salleron scale) (ภาคผนวก ก) ในการหาจุดเดือดของน้ำจะใช้น้ำกลั่นปริมาตร 30 ml ต้มจนปรอทวัดอุณหภูมิคงที่ แล้วใช้อุณหภูมิที่จุดเดือดเป็นตัวตั้งสเกล “0” แล้วจึงทำการหาค่าจุดเดือดของตัวอย่าง แล้วนำค่าอุณหภูมิที่อ่านได้ไปเทียบบนแผ่นสเกล อ่านค่าปริมาณ % แอลกอฮอล์ที่ได้ บันทึกผล

3.12 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์จากยีสต์ลูกผสมเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า

3.12.1 การเตรียมเอนไซม์จากยีสต์

การเตรียมเอนไซม์จากยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสมโดยทำเลี้ยงเชื้อยีสต์ลูกผสม *K. lactis* ตามวิธีการในข้อ 3.11.1 ที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำ crude protein มาเพิ่มความเข้มข้นด้วย Vivaspin 20 (GE Healthcare, Sweden) ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.9.2 จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5 U/mg

3.12.2 การเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์จากยีสต์ลูกผสมกับเอนไซม์ทางการค้า

กำหนดเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบมีค่ากิจกรรมการทำงานเท่ากับ 5 U/mg โดยเอนไซม์ทางการค้า คือ Heat stable amylase, Termamyl 120 LS และ Spezyme 300 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 5 U/mg และเอนไซม์จากยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสมจากข้อ 3.12.1 ใช้เอนไซม์ปริมาตร 100 μ l นำมาทำการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ในการย่อยแป้งชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวโพด, แป้งมันฝรั่ง, แป้งสาลี, แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว ที่ความเข้มข้น 0.1% จากข้อ 3.10.3 ในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ ดังนี้เอนไซม์ Heat stable amylase บ่มในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ที่อุณหภูมิ 95°C เอนไซม์ Termamyl 120 LS บ่มในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ที่อุณหภูมิ 90°C และเอนไซม์ Spezyme 300 บ่มในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 ที่อุณหภูมิ 100°C ส่วนเอนไซม์

จากยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสมใช้สถานะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อที่ 3.10.2.2 และ 3.10.2.3 ทำการทดสอบเอนไซม์จากปฏิกิริยาข้อ 3.10.1 โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

การโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนอะไมเลสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอไรสด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 13 (GHF 13) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T จากนั้นถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มีการสอดแทรกของยีนอะไมเลสเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล นำโคลนที่มียีนอะไมเลสไปศึกษาการแสดงออกในยีสต์ *Kluyveromyces lactis* ต่อไป

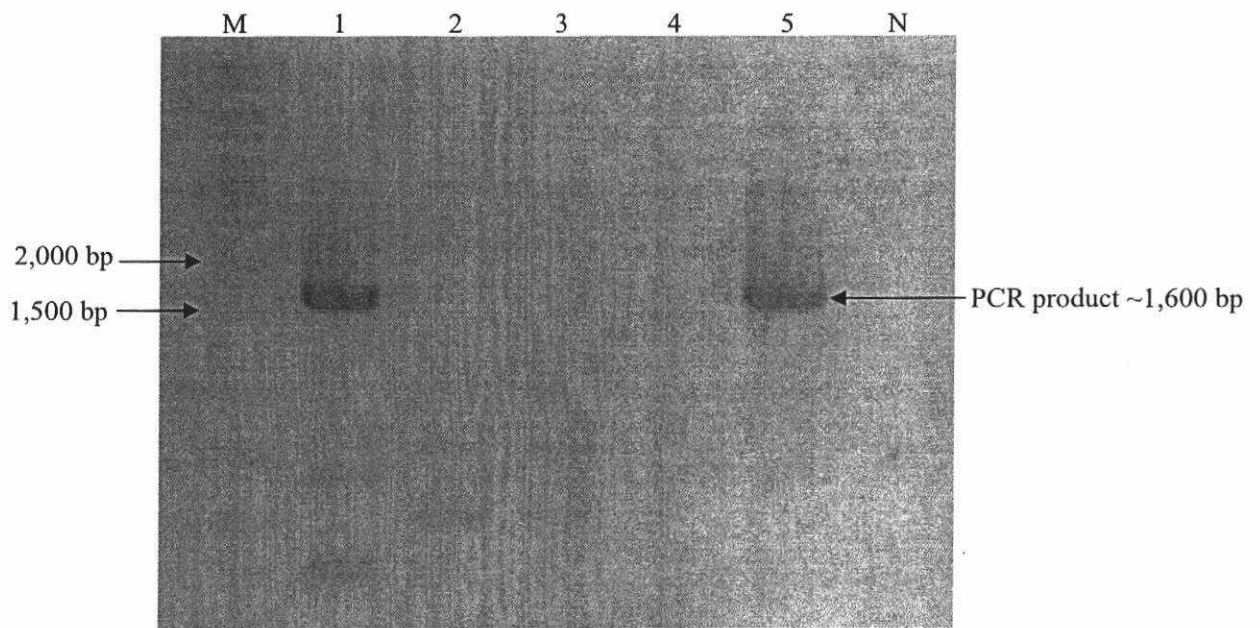
4.1 การโคลนยีนอะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp.

4.1.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อ *Bacillus* sp.

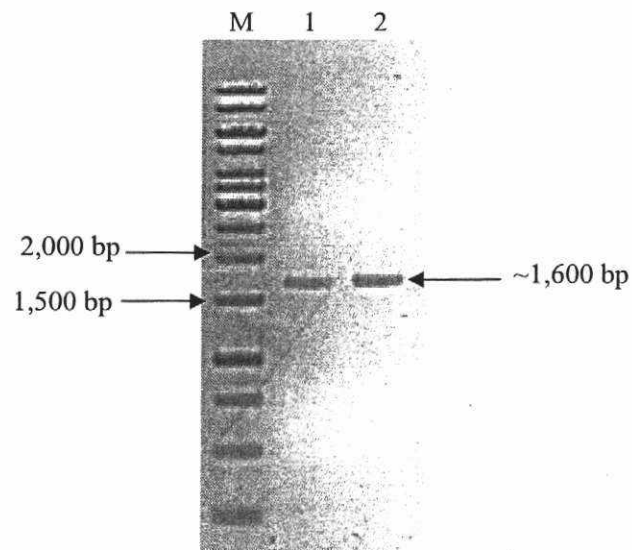
ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เพาะเลี้ยงได้จากถั่วเน่า ทั้งหมด 5 ไอโซเลท (isolate) ได้แก่ 1-16, 5-4, 5-7, 7-13 และ 7-14 นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 521, 537, 1,850, 2,027 และ 2,744 ng/ μ l ตามลำดับ เมื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากการดูคลื่นแสงที่ A_{260}/A_{280} พบว่า อยู่ระหว่าง 1.7-2.0 ตามทฤษฎี (Ganske. 2012)

4.1.2 การเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอไรส

จากการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลส โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอไรส โดยใช้ไพรเมอร์ BCA_amy2 นำผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์บน 0.8% เจลอะกาโรส โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำแผ่นเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับขนาดของผลผลิตที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder พบว่าปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,600 bp จากโคลน 1-16 และ 7-14 (ภาพที่ 4.1) ขณะที่ไอโซเลท 5-4, 5-7 และ 7-13 ไม่พบผลผลิตพีซีอาร์ จึงยุติในการนำไปทดลองในขั้นต่อไป สำหรับไอโซเลทที่ 1-16 และ 7-14 ผลผลิตที่ได้เป็นขนาดที่ประมาณไว้ จึงนำไปทำการเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์เพื่อนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 4.2) ก่อนนำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T ต่อไป



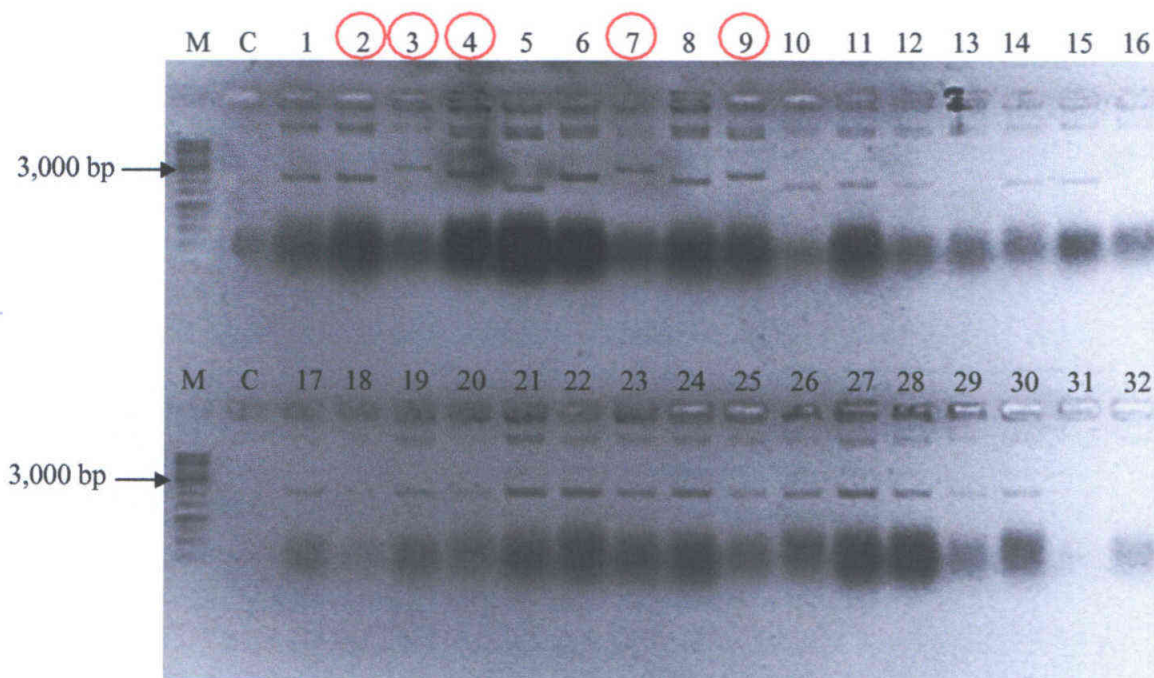
ภาพที่ 4.1 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลส โดยทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8% Lane M คือ 1 kb ladder DNA (100 ng), Lane N คือ negative control และ Lane 1-5 คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1-16, 5-4, 5-7, 7-13 และ 7-14 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 ผลการสกัดแยกยีนอะไมเลสออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ โดยทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8% Lane M คือ 1 kb ladder DNA (100 ng) และ Lane 1-2 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ยีนอะไมเลสจากไอโซเลทที่ 1-16 และ 7-14 ตามลำดับ

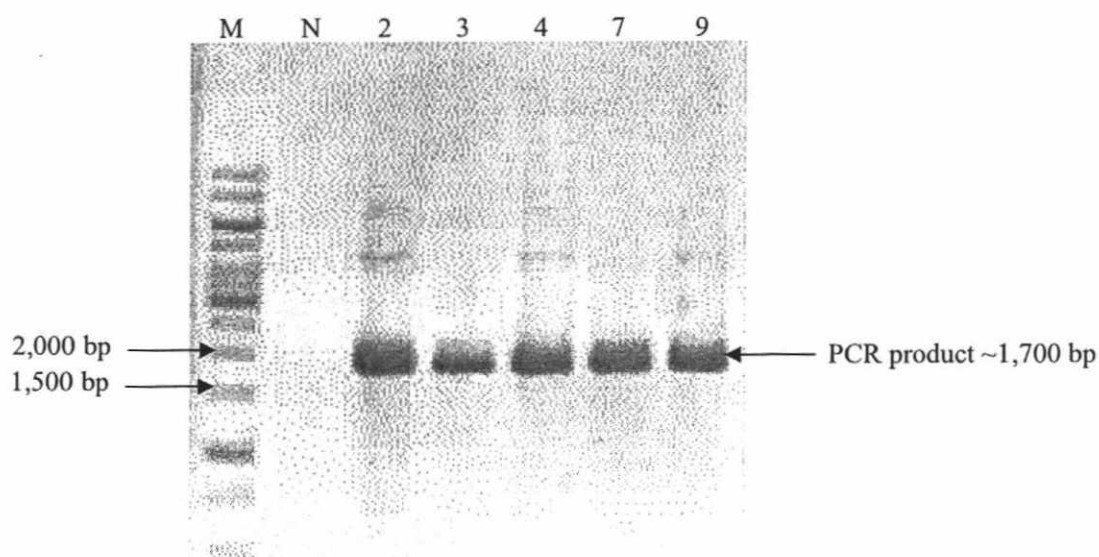
4.1.3 การคัดเลือกพลาสมิดถูกผสมด้วยโคลนฟีซีอาร์

เมื่อนำผลผลิตฟีซีอาร์มาโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของผลผลิตฟีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์ 3:1 ทำการเชื่อมต่อผลผลิตฟีซีอาร์กับพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วนำไปถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน competent cell *E. coli* DH5 α จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดถูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนอะไมเลสด้วยเทคนิค blue/white screening โดยสุ่มเลือกโคลนสีขาวที่คาดว่าจะมีพลาสมิดถูกผสมที่มีชิ้นส่วนยีนอะไมเลสมาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี size screening โดยหากมีการสอดแทรกของยีนอะไมเลสขนาดที่ได้จะใหญ่กว่าเวกเตอร์ pTZ57R/T ซึ่งมีขนาดประมาณ 2,800 bp ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าพบว่ามีเพียง *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1-16 เท่านั้นที่คาดว่าจะมีพลาสมิดถูกผสม (ภาพที่ 4.3) ขณะที่ไอโซเลทที่ 7-14 ไม่พบว่ามี การสอดแทรกของยีนอะไมเลส จึงยุติการทดลองของไอโซเลทที่ 7-14



ภาพที่ 4.3 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสด้วยวิธี size screening ตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8% Lane M คือ 1 kb ladder DNA (100 ng), Lane C คือ เวกเตอร์ pTZ57R/T, Lane 1-16 คือ โคลนที่ได้จากการสุ่มพลาสมิดถูกผสมของยีนอะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท 1-16 และ Lane 17-32 คือ โคลนที่ได้จากการสุ่มพลาสมิดถูกผสมของยีนอะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท 7-14

จากนั้นทำการสุ่มโคลนที่ได้จากไอโซเลทที่ 1-16 มา 5 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 2, 3, 4, 7 และ 9 เพื่อมาทำโคลนพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ M13 ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้น่าจะมีขนาด ~1,700 bp พบว่าทั้ง 5 โคลนที่เลือกมามีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ตามที่คาดไว้ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการทำโคลนพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8% Lane M คือ 1 kb ladder DNA (100 ng), Lane N คือ negative control และ โคลน 2, 3, 4, 7 และ 9 คือผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากโคลนพลาสมิดลูกผสมอะไมเลสของ *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1-16

4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

4.2.1 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำโคลนที่ 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม BlastN พบว่าโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 มีความเหมือนที่ยีนที่กำหนดการสร้าง Exo-alpha-1,4-glucosidase ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* BMB171, *B. cereus* B4264 และ *B. cereus* ATCC 14579 อยู่ที่ 99%, 97% และ 98% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลสเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastN

Clone	Accession	Description	Identity
1-16/2	CP001903.1	Exo-alpha-1,4-glucosidase [<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171]	1657/1665 (99%)
	CP001176.1	Glycosyl hydrolase family protein [<i>Bacillus cereus</i> B4264]	1657/1665 (99%)
	AE016877.1	Exo-alpha-1,4-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579]	1657/1665 (99%)
1-16/4	CP001903.1	Exo-alpha-1,4-glucosidase [<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171]	1608/1666 (97%)
	CP001176.1	Glycosyl hydrolase family protein [<i>Bacillus cereus</i> B4264]	1608/1666 (97%)
	AE016877.1	Exo-alpha-1,4-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579]	1608/1666 (97%)
1-16/7	CP001903.1	Exo-alpha-1,4-glucosidase [<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171]	1632/1665 (98%)
	CP001176.1	Glycosyl hydrolase family protein [<i>Bacillus cereus</i> B4264]	1632/1665 (98%)
	AE016877.1	Exo-alpha-1,4-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579]	1632/1665 (98%)

4.2.2 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลรหัสและนำมาวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 มีความเหมือนกับกรดอะมิโนของเอนไซม์ Alpha-glucosidase จากเชื้อ *B. cereus* โดยมีค่าความเหมือนมากที่สุดอยู่ที่ 99%, 94% และ 96% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของจีนยีน อะไมเลสเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastX

Clone	Accession	Description	Identity
1-16/2	ZP_04190019.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> AH676]	550/554 (99%)
	ZP_04237662.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> Rock1-15]	550/554 (99%)
	ZP_04277017.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> m1550]	549/554 (99%)
1-16/4	ZP_04190019.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> AH676]	523/554 (94%)
	ZP_04237662.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> Rock1-15]	523/554 (94%)
	ZP_04277017.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> m1550]	522/554 (94%)
1-16/7	ZP_04190019.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> AH676]	534/554 (96%)
	ZP_04237662.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> Rock1-15]	534/554 (96%)
	ZP_04277017.1	Alpha-glucosidase [<i>Bacillus cereus</i> m1550]	533/554 (96%)

4.2.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16,7 มาทำการ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) เพื่อเปรียบเทียบกับยีน Exo-alpha-1,4-glucosidase จากเชื้อ *B. thuringiensis* BMB171 (CP001903.1) และ *B. cereus* ATCC 14579 (AE016877.1) และยีน Glycosyl hydrolase family protein จากเชื้อ *B. cereus* B4264 (CP001176.1) จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า โคลนที่ 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 เป็นยีนเดียวกัน โดยโคลนที่ 1-16/2 มีความแตกต่างจากฐานข้อมูล 7 เบส โคลนที่ 1-16/4 มีความแตกต่างจากฐานข้อมูล 59 เบส และ โคลนที่ 1-16/7 มีความแตกต่างจากฐานข้อมูล 32 เบส ซึ่งลำดับเบสที่แตกต่างหรือผิดไปจากเดิมแสดงถึงการกลายพันธุ์ของยีน (ภาพที่ 4.5)

4.2.4 การแปลรหัสยีนอะไมเลส

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 มาแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีน พบว่า โคลนที่ 1-16/2 ไม่พบตำแหน่ง stop codon ภายในยีน ขณะที่โคลนที่ 1-16/4 พบตำแหน่ง stop codon ภายในยีนที่ตำแหน่งที่กรดอะมิโนตัวที่ 410 และโคลนที่ 1-16/7 พบตำแหน่ง stop codon ภายในยีนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 321 (ภาพที่ 4.6)

4.2.5 การคัดเลือกโคลนที่มีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสด้วยวิธี activity plate

ทำการคัดเลือกโคลนที่ 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 เพื่อหาโคลนที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.12 สังเกตวงใสรอบโคโลนีเปรียบเทียบกับเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1-16 (positive control) และเชื้อ *E. coli* DH5 α (negative control) พบว่ามีเพียงโคลน 1-16/2 เท่านั้นที่เกิดวงใสรอบโคโลนี (ภาพที่ 4.7 และ 4.8) ซึ่งมีขนาดวงใสที่เล็กกว่าเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลท 1-16 ขณะที่โคลนที่ 1-16/4 และ 1-16/7 ไม่พบการเกิดวงใส เช่นเดียวกับเชื้อ *E. coli* DH5 α เนื่องจากโคลนที่ 1-16/4 และ 1-16/7 มีตำแหน่ง stop codon ภายในยีน จึงไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ จึงทำการเลือกโคลน 1-16/2 นี้ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.3 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

4.3.1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล

นำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากโคลนที่ 1-16/2 และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากฐานข้อมูลมาทำการ alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการโคลนยีนว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างจากฐานข้อมูล ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโคลนที่ 1-16/2 มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากฐานข้อมูล ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนผิดไปเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 4.9) โคลนที่ 1-16/2 จึงน่าจะมีความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ และยีนที่ได้มีความสมบูรณ์ที่จะนำไปใช้งานต่อไป

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CP001903.1	ATGAATAAGACATGGTGGAAAGAAGCGGTTGCTTATCAAATTTATCCACGAAGCTTTATGGATTCAAATGGTGATGGTATTGGAGATTTACAAGGTATTA									
CP001176.1									
AE016877.1									
1-16/2									
1-16/4									
1-16/7C.....C.....T.....								A...C..
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CP001903.1	TTGCAAAACTGGATTATTTAAAAGATTTAGGTATAGATGTAATTTGGATTTGTCCAATGTATAAGTCGCCTAATGATGATAATGGTTATGATATTAGTGA									
CP001176.1									
AE016877.1									
1-16/2					C.....				
1-16/4					C.....				
1-16/7C.....					C.....	C.....			
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CP001903.1	TTATCAAGATATTATGGATGAGTTTGGTACAATGGCAGACTTTGATGCTTTACTAGATGAAGTTCATAAGCGTGATATGAAGCTTATTATTGATTTAGTT									
CP001176.1									
AE016877.1									
1-16/2					C.....				
1-16/4					C.....				
1-16/7					C.....	C.....			C.....

ภาพที่ 4.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลสจากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 กับยีน Exo-alpha-1,4-glucosidase หมายเลขยีน CP001903.1, CP001176.1 และ AE016877.1 ตามลำดับ

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
CP001903.1										
	ATCAGTCATATTA AAAAAGAAGAAGGCCTCAAGGATATGCCAAATCCAAAAGGGTTAAAATATGTGCCATCTTTTGATAAACATATGAATGTGAAAGGTA										
CP001176.1	T.....									
AE016877.1										
1-16/2										
1-16/4										
1-16/7										
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
CP001903.1										
	TTCAACCTTTATTAGAAGAGCTAAAAGAAAATACATTCTCTAAGTACGATATTATGACTGTTGGTGAAGCAAACGGTGTTAAGATTGAAGATGCTGAGCT										
CP001176.1	T.....									
AE016877.1	T.....									
1-16/2	T.....									
1-16/4	T.....									
1-16/7	CT.....CCG.....C.A.....T.....AA.....									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	
CP001903.1										
	TTGGGTTGGAGAAGAGCAAGGTAAGTTCAATATGGTATTCCAATTTGAACATTTAAGTTTATGGGATGCAGAGAAGAAGAAAGACCTTGATGTTGTAGGA										
CP001176.1										
AE016877.1										
1-16/2										
1-16/4	T.....									
1-16/7										

ภาพที่ 4.5 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลสจากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 กับยีน Exo-alpha-1,4-glucosidase หมายเลขยีน CP001903.1, CP001176.1 และ AE016877.1 ตามลำดับ

```

          910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
CP001903.1  TTGAAAAAAGTATTAACGAAATGGCAAAAAGGATTAGAAAATAAAGGATGGAACGCTTTATATATTGAGAATCACGATAAACACGTATCGTTTCAACAT
CP001176.1  .....
AE016877.1  .....
1-16/2      .....
1-16/4      .....TTT.....G..
1-16/7      .....C.....G.....

          1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
CP001903.1  GGGGAGATGATAAACAATATTGGCGTGAAAGTGCAACAGCTCTAGGGGCGATGTATTTCTTTATGCACGGTACACCTTTTATTTATCAAGGCCAAGAAAT
CP001176.1  .....
AE016877.1  .....
1-16/2      .....
1-16/4      .....T...AA.T.....CG...
1-16/7      .....

          1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
CP001903.1  TGGTATGACAAATGTTTCAGTTACCAAATATTGAAGATTACGATGATGTAGCAATTAATAATTTATATCGCGAGAAAATTGCAGAGGGCGTACCACATCAA
CP001176.1  .....T.....
AE016877.1  .....
1-16/2      .....
1-16/4      .....G...C.....
1-16/7      .....

```

ภาพที่ 4.5 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลสจากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 กับยีน Exo-alpha-1,4-glucosidase หมายเลขยีน CP001903.1, CP001176.1 และ AE016877.1 ตามลำดับ

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
CP001903.1	GATATGATGGAGATTATATGGGCTTCTTGCCGCGATAATTCACGTACACCTATGCAGTGAATGATGAGATGAATGCTGGTTTCACGACAAGTACACCTT									
CP001176.1									
AE016877.1A.....									
1-16/2AG.....									
1-16/4A.C.....C.....G..AAAT.CAG..C...C.....AG.....									
1-16/7A.....									
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
CP001903.1	GGTTTAGCATGAATCCAAATTACAAAGAAATTAATGTTGAAAAGCAAAAAAATGAAGAAAAGTCTATTTCAATTTCTATAAGAAAATGATTGCCCTGAA									
CP001176.1									
AE016877.1G.....									
1-16/2									
1-16/4CT...AG..ACGG.....T									
1-16/7									
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
CP001903.1	AAAAGAGCACGATGTACTGAACTATGGTACGTACGATTTACTTTTAGAAGACGATCCACAAATTTATGCATATACACGTACGTTACAGGATGAAAAAGTC									
CP001176.1T.....									
AE016877.1C.....									
1-16/2T.....									
1-16/4A.C.T.....									
1-16/7T.....									

ภาพที่ 4.5 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลสจากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 กับยีน Exo-alpha-1,4-glucosidase หมายเลขยีน CP001903.1, CP001176.1 และ AE016877.1 ตามลำดับ

```

          1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CP001903.1  ATTGTAATTAGTAATATCTCAAAAGAGGAAGCTGTGTATAATGAGGGTTCATTTGCACTAGAACGCAAACGTTTGCTTTTAAATAACTATGAAGTTGCGG
CP001176.1  .....
AE016877.1  .....
1-16/2      .....G.....
1-16/4      .....A..GA.....CT.CAA.....T.....
1-16/7      .....

          1610      1620      1630      1640      1650      1660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CP001903.1  AACATGAAGAAGTAACAACAATTGCTTTTAAAGCCTTATGAAACAAGGGTTTATCGCATTTCATAA
CP001176.1  .....
AE016877.1  .....
1-16/2      .....
1-16/4      .....AACC.AA.....
1-16/7      .....

```

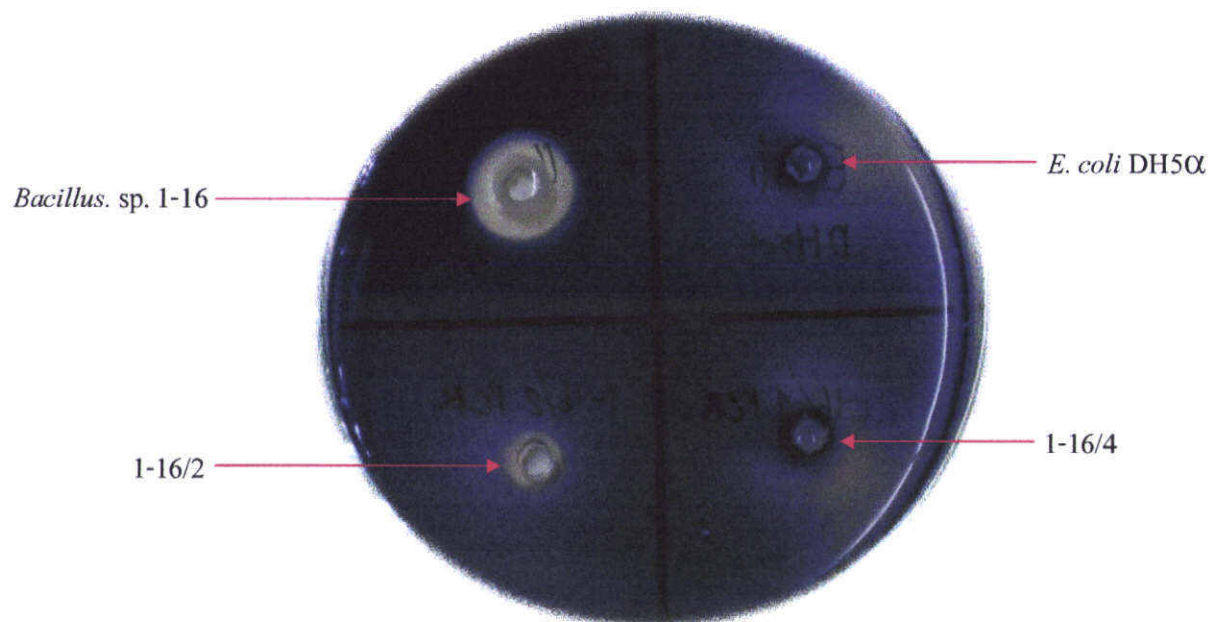
ภาพที่ 4.5 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะไมเลสจากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7 กับยีน Exo-alpha-1,4-glucosidase หมายเลขยีน CP001903.1, CP001176.1 และ AE016877.1 ตามลำดับ

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
1-16/2	MNKTWWKEAVAYQIYPRSFMSNGDGIGDLQGI	IAKLDYKDLGIDVIWTC	PMYKSPNDDNGYDISDYQDIMDEF	FGTMADFDALLDEVH	KRDMKLI	IDLV						
1-16/4		
1-16/7	...PC....F.....	ST.....	T.....	L...		
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200		
1-16/2	INHTSDEHPWFIESR	SSKDSPKRDWYI	IWHGKDGAE	PNNWESIF	NGSAWEYDEETE	QYYLHLFSRKQ	PDNLN	WENKEV	REVL	YDTVNW	WLDKGIDGFRVDA	
1-16/4		
1-16/7	M.....	QG		
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300		
1-16/2	ISHIKKEEGLK	DMPNPKGLKYV	PSFDKHMNV	KGIQPLLEEL	KENTFSKYD	IMTVGEANG	VKIEDAEL	WVGEEQ	GKFN	MVFQFEHLSL	WDAEKKKDL	DVVG
1-16/4	
1-16/7	P.....	TD.....	AT.....	N.....	
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400		
1-16/2	LKKVLTKWQK	GLENKGW	NALYIENHDK	PRIVSTWG	DDKQYWRES	AALGAMYFF	MHGTPFI	YQGQEIG	MNTNV	QLPNIEDY	DDVAIK	NLYREKIAEGVPHQ
1-16/4	.NL.....	R.....	EV.....	R.....	V.....	
1-16/7	C...-	

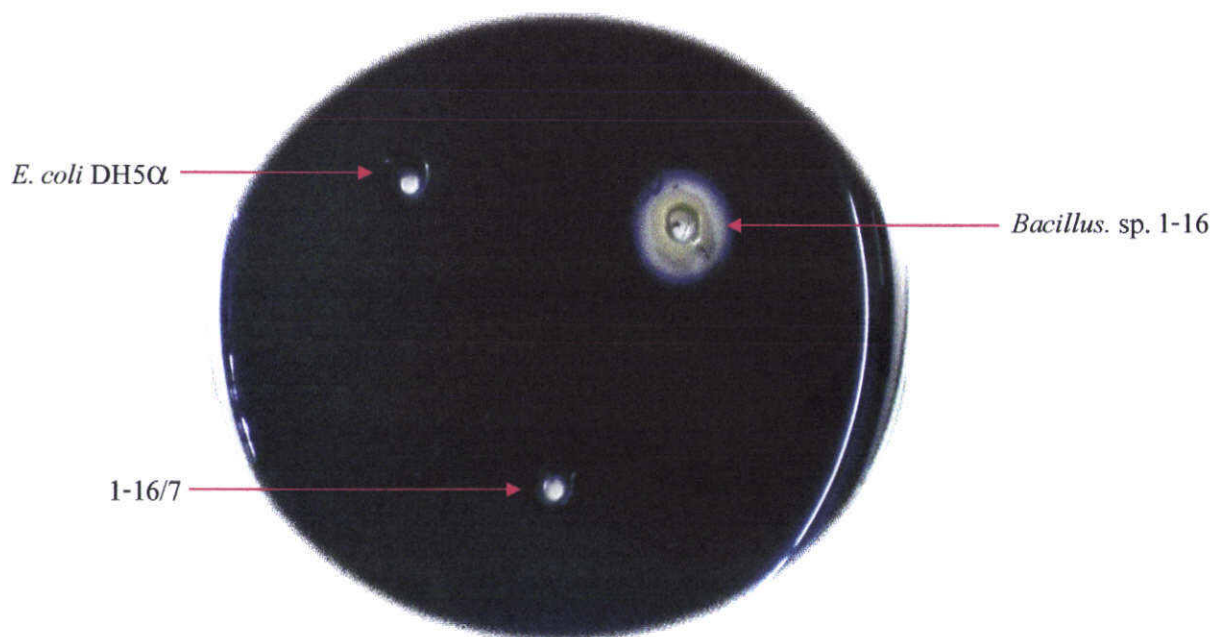
ภาพที่ 4.6 การแปลรหัสยีนอะไมเลสที่ได้จากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
									
1-16/2	DMMEI IWASCRDNSRTPMQWNDEMAGFTASTPWFSMNPNYKEINVEKQKNEEKSI FNFYKKMIALKKEHDVNLNYGTYDLLLEDDPQIYAYTRTLQDEKV									
1-16/4	...N..C..-NADP.....L.RNG.....I.....KH.....									
1-16/7T.....									
	510	520	530	540	550					
									
1-16/2	IVISNISKEEAVYDEGSFALERKRLLLNNYEVAEHEEVTTIALKPYETRVYRIS-									
1-16/4T..NYN.....I.....NQK.....-									
1-16/7N.....-									

ภาพที่ 4.6 (ต่อ) การแปลรหัสยีนอะไมเลสที่ได้จากโคลน 1-16/2, 1-16/4 และ 1-16/7



ภาพที่ 4.7 ผลการทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของโคลนที่ 1-16/2 และ 1-16/4 เทียบกับ เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลขที่ 1-16 (positive control) และเชื้อ *E. coli* DH5α (negative control)



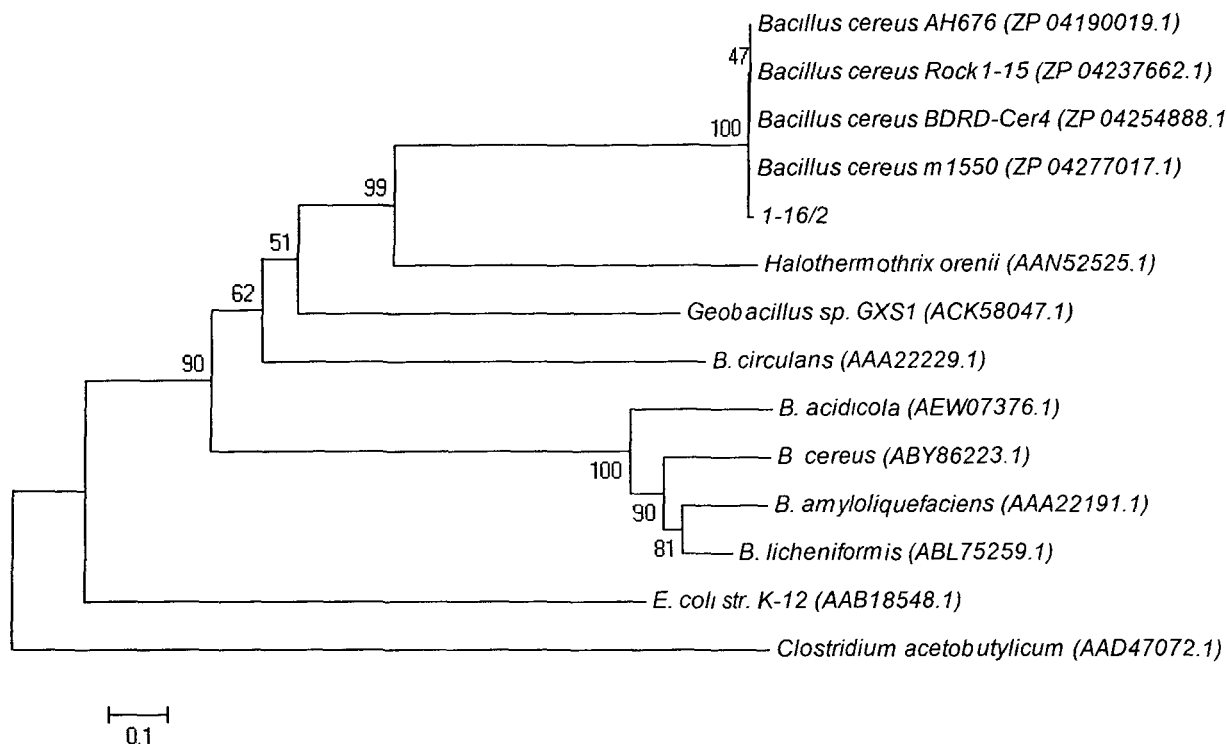
ภาพที่ 4.8 ผลการทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของโคลนที่ 1-16/7 เทียบกับ เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลขที่ 1-16 (positive control) และเชื้อ *E. coli* DH5α (negative control)

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400									
ZP_04190019.1	VGEEQGKFNMFQFEHLSLWDAEKKKDLVVGLKKVLT	QKGL	ENK	GW	NALY	IE	NHDKPR	IVSTW	GDDKQY	WRESAT	ALGAMY	FFMHGT	PF	YQ	QGEIG				
ZP_04237662.1				
ZP_04254888.1				
ZP_04277017.1				
1-16/2				
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500									
ZP_04190019.1	MTNVQLPNIEDYDDVAIKNLYREKIAEGVPHQDM	MEI	IWASCR	DN	SRT	PMQW	NDEM	NAGFTT	STPW	F	SMNP	NYKE	IN	VEKQ	KNEEK	SIFN	FYKK	MIAL	KK
ZP_04237662.1
ZP_04254888.1
ZP_04277017.1
1-16/2
	510	520	530	540	550	560	570	580											
ZP_04190019.1	EHDVLNYGTYDLLLEDDPQIYAYTRTLQDEK	VIVIS	SNISKEE	AVYNE	G	SFALER	KRLL	LNNYE	VAEHEE	VTTIAL	KPYET	RVYRIS-							
ZP_04237662.1							
ZP_04254888.1							
ZP_04277017.1							
1-16/2							

ภาพที่ 4.9 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนอะไมเลสจากโคลนที่ 1-16/2 กับเอนไซม์ Alpha-glucosidase หมายเลขยีน ZP_04190019.1, ZP_04237662.1, ZP_04254888.1 และ ZP_04277017.1 ตามลำดับ

4.3.2 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree)

นำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของโคลน 1-16/2 มาทำแผนภูมิต้นไม้เพื่อดูความสัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากโคลน 1-16/2 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูล Cazy โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) แสดงความสัมพันธ์ของยีน (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงตำแหน่งความสัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากโคลน 1-16/2 กับเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น โดยวิธี Neighbor-Joining method ของการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ด้วยการทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติจำนวน 1,000 รอบ สเกลแสดงระยะห่างทางพันธุกรรมในระดับกรดอะมิโน

จากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ พบว่า เอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากโคลน 1-16/2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟา-อะไมเลสของเชื้อ *B. cereus* AH676, *B. cereus* Rock1-15, *B. cereus* BDRD-Cer4 และ *B. cereus* m1550 โดยมีความน่าเชื่อถือทางสถิติหรือความเป็นไปได้สูงถึง 100%

4.3.3 การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน

นำลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของยีนอะไมเลส 1-16/2 โปรตีนมีขนาด 555 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 65 kDa เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนด้วยโปรแกรม Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) พบว่า โปรตีน 1-16/2 มีโครงสร้างเป็นโปรตีนแอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 28-374 และมีโครงสร้างเป็น Cyclo-malto-dextrinase C-terminal domain ในตำแหน่งที่ 487-518 ซึ่งช่วยให้ active site มีความเสถียรและช่วยในการย่อย cyclodextrans ให้เป็นน้ำตาลมอลโทสและน้ำตาลกลูโคส และช่วยเร่งปฏิกิริยา trans-glycosylation ของ oligosaccharides ที่หมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลกลูโคสที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 3, 4 หรือ 6 (Park *et al.* 2000) มีตำแหน่ง active site ประกอบด้วยกรดอะมิโนตัวที่ 63 (Tyr), 98 (Asp), 103 (His), 199 (Asp) และ 256 (Glu) (ภาพที่ 4.11) และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาบริเวณ signal peptide ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) พบว่า signal peptide คือตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 1-11 (ภาพที่ 4.12) ได้แบบจำลองโครงสร้างโปรตีนอะไมเลส 1-16/2 (ภาพที่ 4.13) และมีลำดับอะมิโนอนุรักษ์ (conserve sequence) ของโปรตีนแอลฟา-อะไมเลส คือ DLVINHTS (Watanabe *et al.* 1990) และ QPDLN (Watanabe *et al.* 1990) (ภาพที่ 4.14)

4.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนอะไมเลสในยีสต์ *Kluyveromyces lactis*

4.4.1 การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนอะไมเลสจากพลาสมิดลูกผสม

การเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนอะไมเลสจากพลาสมิดลูกผสม โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติ proof reading เพื่อความถูกต้องแม่นยำของการสร้างสายนิวคลีโอไทด์ ซึ่งผลิตพีซีอาร์ที่ได้ของ full length gene จากจุดเริ่มต้นจนถึงจุดสิ้นสุดของยีนจะมีขนาด 1,665 bp (ภาพที่ 4.15) แล้วนำผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pKLAC2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

Sequence search results

[Show](#) the detailed description of this results page.

We found **2** Pfam-A matches to your search sequence (**1** significant and **1** insignificant). You did not choose to search for Pfam-B matches.



[Show](#) the search options and sequence that you submitted.

[Return](#) to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
Alpha-amylase	Alpha amylase, catalytic domain	Domain	CL0058	28	379	28	374	1	315	340.0	1.3e-101	256,199,256,199,98,103,63	<input type="button" value="Show"/>

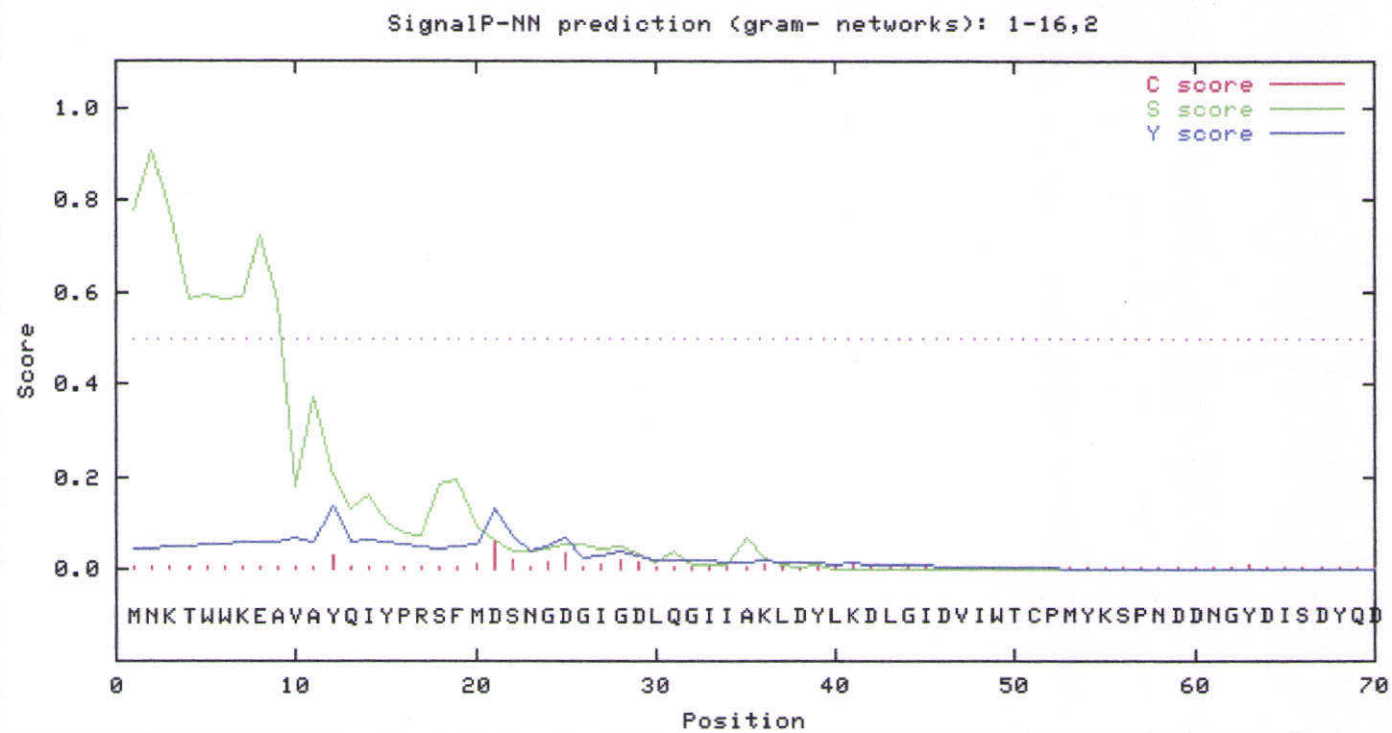
Insignificant Pfam-A Matches

[Show](#) or [hide](#) all alignments.

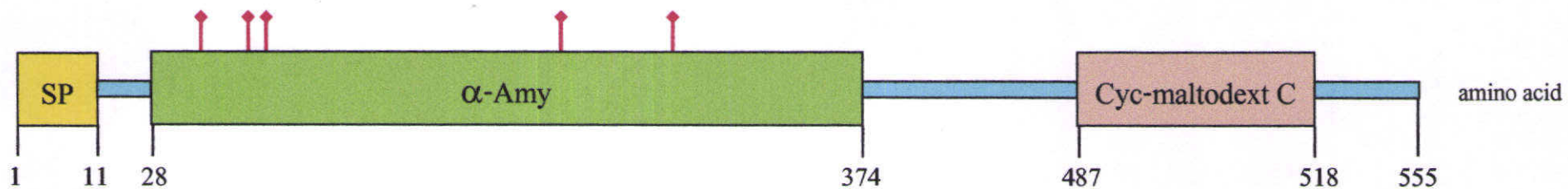
Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To				
Cyc-maltodext_C	Cyclo-malto-dextrinase C-terminal domain	Domain	CL0369	485	524	487	518	10	41	12.5	0.1	n/a	<input type="button" value="Show"/>

Comments or questions on the site? Send a mail to pfam-help@sanger.ac.uk. Our [cookie policy](#).
The Wellcome Trust

ภาพที่ 4.11 การเปรียบเทียบ โครงสร้างของโปรตีนที่แปลรหัสจากยีน 1-16/2 กับโปรตีนจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Pfam



ภาพที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ signal peptide ของยีนอะไมเลส 1-16/2 ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 server โดย signal peptide คือ กรดอะมิโนตั้งแต่ตัวที่ 1-11 และมีตำแหน่ง cleavage site อยู่ระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 11 (AVA) และ 12 (YQ)



ภาพที่ 4.13 โครงสร้างของโปรตีนอะไมเลสที่ได้จากโคลน 1-16/2 โดย SP คือ ตำแหน่ง signal peptide, α -Amy คือ โครงสร้างโปรตีนแอลฟา-อะไมเลส, ตำแหน่ง Cyc-maltodext C คือ โครงสร้าง Cyclo-malto-dextrinase C terminal domain และเครื่องหมายสีแดง คือ ตำแหน่ง active sites ของโปรตีน


```

          1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
1-16/2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GATATGATGGAGATTATATGGGCTTCTTGCCGCGATAATTCACGTACACCTATGCAGTGGGAATGATGAGATGAATGCTGGTTTCACAGCAAGTACACCTT
  D M M E I I W A S C R D N S R T P M Q W N D E M N A G F T A S T P

          1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
1-16/2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGTTTAGCATGAATCCAAATTACAAAGAAATTAATGTTGAAAAGCAAAAAAATGAAGAAAAGTCTATTTTCAATTTCTATAAGAAAATGATTGCCCTGAA
W F S M N P N Y K E I N V E K Q K N E E K S I F N F Y K K M I A L K

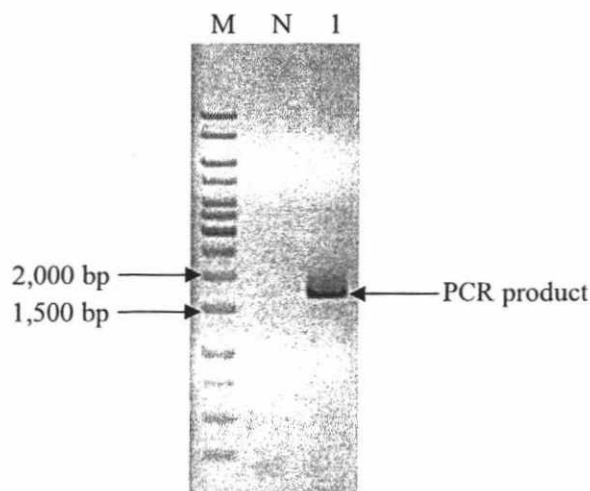
          1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
1-16/2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAAAGAGCAGATGTACTGAACTATGGTACGTATGATTTACTTTTAGAAGACGATCCACAAATTTATGCATATACACGTACGTTACAGGATGAAAAAGTC
  K E H D V L N Y G T Y D L L L E D D P Q I Y A Y T R T L Q D E K V

          1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
1-16/2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATTGTAATTAGTAATATCTCAAAGAGGAAGCTGTGTATGATGAGGGTTCATTTGCACTAGAACGCAAACGTTTGCTTTTAAATAACTATGAAGTTGCGG
  I V I S N I S K E E A V Y D E G S F A L E R K R L L L N N Y E V A

          1610      1620      1630      1640      1650      1660
1-16/2  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AACATGAAGAAGTAACAACAATTGCTTTAAAGCCTTATGAAACAAGGGTTTATCGCATTTTCATAA
  E H E E V T T I A L K P Y E T R V Y R I S *

```

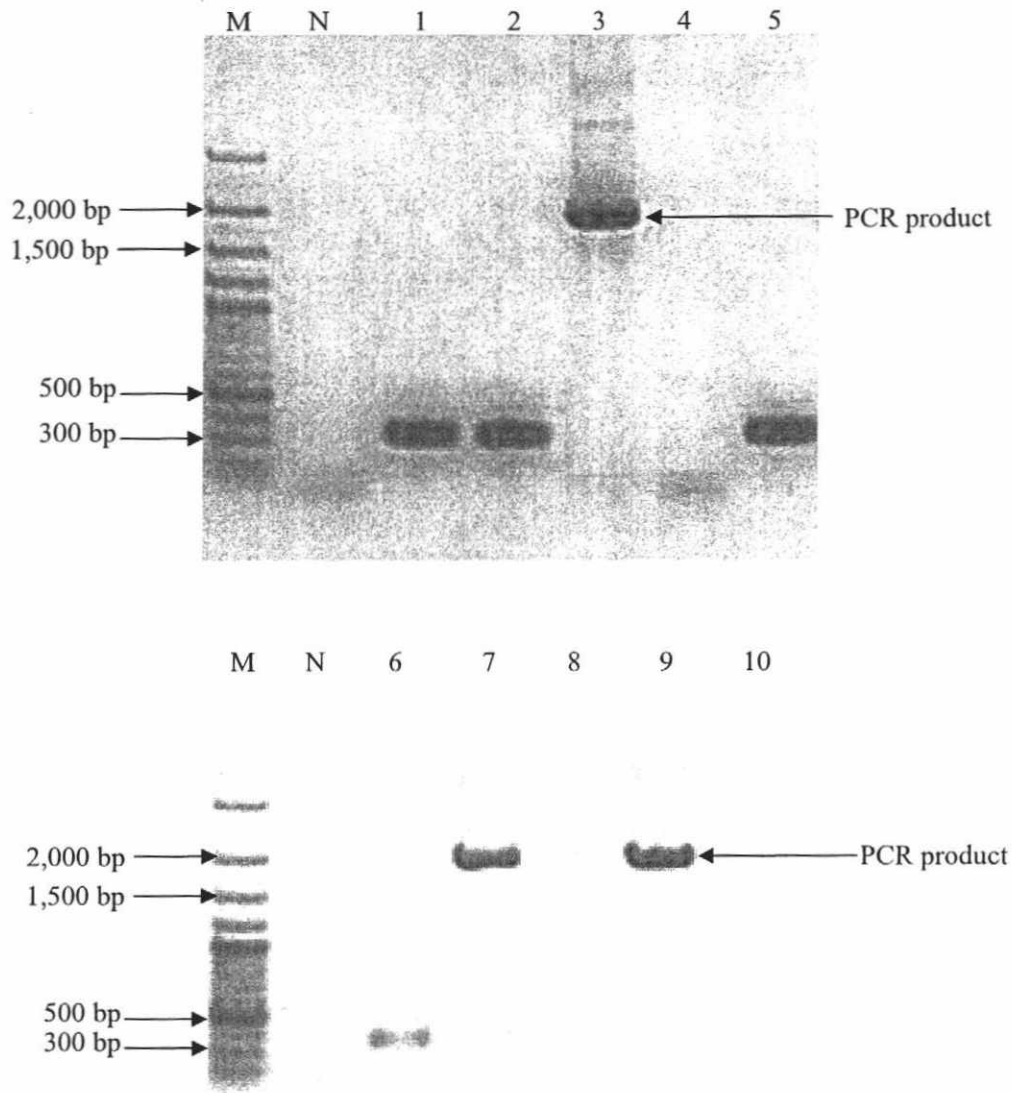
ภาพที่ 4.14 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของยีนอะไมเลส 1-16/2 โดยกรอบสีดำคือตำแหน่ง signal peptide ของยีน ส่วนกรอบสีแดงคือกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserve sequence) ส่วนแถบสีเหลืองคือตำแหน่ง active site



ภาพที่ 4.15 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนอะไมเลส โดยทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8% Lane M คือ 1 kb ladder DNA (100 ng), Lane N คือ negative control และ Lane 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนอะไมเลสจากไพรเมอร์ 1-16/2

4.4.2 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์

เมื่อทำการเชื่อมยีนอะไมเลสที่ได้จากข้อ 4.4.1 เข้ากับเวกเตอร์ pKLAC2 แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α เติงบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ 100 μ g/ml ampicillin เติงที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อมาเติงต่อบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ 100 μ g/ml ampicillin เพื่อทำเป็น master plate แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีนอะไมเลสด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับเวกเตอร์ pKLAC2 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 0.8% พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,900 bp (ผลผลิตพีซีอาร์ยีนอะไมเลสที่ ~1,600 bp รวมกับตำแหน่งของไพรเมอร์ pKLAC2 ~300 bp) จากการทดสอบพบว่ามีเพียง 3 โคลน จากการสุ่มเลือกมา 10 โคลนที่น่าจะมีการสอดแทรกของยีนอะไมเลส ได้แก่ pK1-16/2 โคลนที่ 3, 7 และ 9 (ภาพที่ 4.16) ขณะที่โคลนอื่นๆจะมีขนาด ~300 เบส ซึ่งเป็นขนาดของเวกเตอร์ที่ไพรเมอร์จับได้ จึงนำโคลนที่ได้ไปตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Nde*I ต่อไป

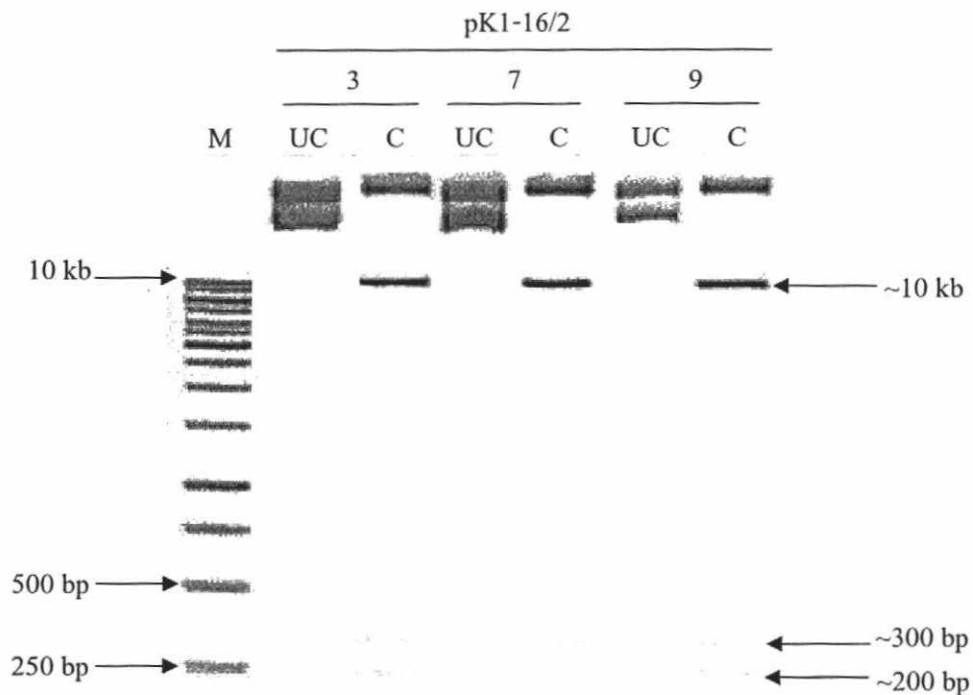


ภาพที่ 4.16 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบบน 0.8% เจลอะกาโรส Lane M คือ 100 bp ladder DNA (100 ng), Lane N คือ negative control และ Lane 1-10 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนอะไมเลส pK1-16/2 จากไพรเมอร์ pKLAC2 โคลนที่ 1-10 ตามลำดับ

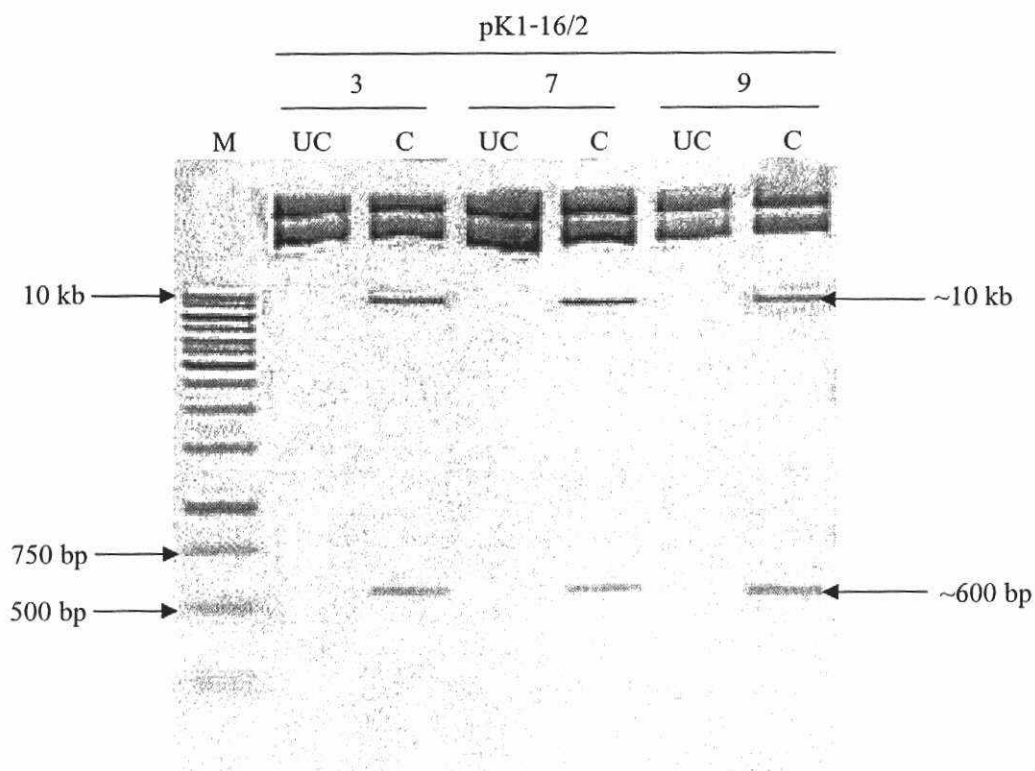
4.4.3 การคัดเลือกพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำโคลนที่ได้คัดเลือกจากข้อที่ 4.4.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *NdeI* ซึ่งเป็นตำแหน่งระหว่างเวกเตอร์ และตำแหน่งที่อยู่ภายในยีนอะไมเลส โดยเฉพาะเอนไซม์ *HindIII* จะมีตำแหน่งที่อยู่ระหว่างจุดเชื่อมต่อระหว่างเวกเตอร์และยีนอะไมเลส และตำแหน่งตัดภายในยีนอะไมเลส ซึ่งเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* แล้วนำมาตรวจสอบด้วย

เจลอะกาโรส 1% หากมีการเชื่อมต่อกันกับเวกเตอร์จะทำให้ได้ผลผลิตการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น 3 ส่วน คือขนาดประมาณ 200, 300 และ 10,000 bp (ภาพที่ 4.17) ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* จะตัดภายในยีนอะไมเลส 1 ตำแหน่ง และตัดบริเวณเวกเตอร์ 1 ตำแหน่ง ทำให้ได้ผลผลิต 2 ส่วน คือขนาดประมาณ 600 และ 10,000 bp เมื่อตัดแล้วนำมาตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรส 1% (ภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.17 ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสในเวกเตอร์ pKLAC2 โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ทำการตรวจสอบบน 1% เจลอะกาโรส Lane M คือ 1 kb ladder DNA (100 ng), Lane 3, 7 และ 9 คือ หมายเลขโคลนของ pK1-16/2, UC และ C แสดงผลสามมิติที่ไม่ผ่านการตัดและผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ตามลำดับ



ภาพที่ 4.18 ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอะไมเลสในเวกเตอร์ pKLAC2 โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* ทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 1% Lane M คือ 1 kb ladder DNA (100 ng), Lane 3, 7 และ 9 คือ หมายเลขโคลนของ pK1-16/2, UC และ C แสดงพลาสมิดที่ไม่ผ่านการตัดและผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* ตามลำดับ

จากผลการตรวจสอบพบว่าทั้ง 3 โคลนที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *NdeI* เป็นไปตามคาดการณ์ไว้ แต่เนื่องจากว่าขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเล็กจึงเห็นแถบดีเอ็นเอบางๆ ซึ่งทั้ง 3 โคลน มีขนาดแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดใกล้เคียงกันจึงเลือก pK1-16/2 โคลนที่ 3 (pK1-16/2C3) ไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *K. lactis* เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

4.4.4 การคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของยีนอะไมเลส

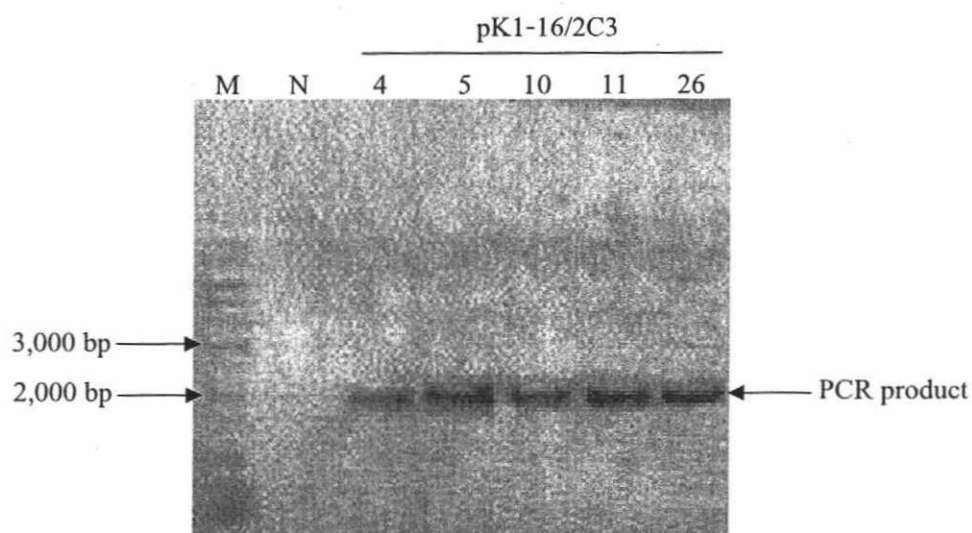
เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมโคลน pK1-16/2C3 ถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *K. lactis* ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีในข้อ 3.7.8 จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหาร YCB ที่มี 5 mM acetamide เลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2-3 วัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ทำการสุ่มโคโลนีของเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร YPS agar โดยเปรียบเทียบกับ negative control คือ *K. lactis* (wild type) นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นนำมาทดสอบราดทับด้วยสารละลายไอโอดีน

(Lugol's solution) ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วทดสอบละลายไอโอดีนออก พักไว้อีก 10 นาที สังเกตวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ ถ้ามีวงใสเกิดขึ้นแสดงว่าโคลนดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลาย starch ทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนี ซึ่งจากการทดสอบจะพบว่า *K. lactis* ที่ใช้เป็น negative control มีวงใสเกิดขึ้น เนื่องจากว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้เอง ดังนั้นในการเลือกวงใสรอบโคโลนี จึงพิจารณาหาวงใสที่มีขนาดใหญ่กว่า negative control ที่แสดงว่าการถ่ายยีนอะไมเลสเพิ่มเข้าไป สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสได้ดีขึ้นกว่ายีสต์ *K. lactis* ที่ไม่ได้ทำการถ่ายยีน จึงเลือกโคลนที่ 4, 5, 10, 11 และ 26 มาใช้ในการศึกษาต่อไป

4.4.5 การตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมด้วยพีซีอาร์

จากการทดสอบในข้อที่ 4.4.4 พบว่ายีสต์ลูกผสมหลายโคลนที่มีวงใสรอบโคโลนีใหญ่กว่า negative control จึงทำการสุ่มมา 5 clone ได้แก่ ยีสต์ลูกผสมโคลนที่ 4, 5, 10, 11 และ 26 มาเลี้ยงในอาหาร YPGal 10 ml เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในข้อที่ 3.7.10 จากนั้นตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1% จากการตรวจสอบพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใหญ่มากกว่า 10 kb เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และเมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) เพื่อดูความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ และดูการปนเปื้อนของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนได้จากค่า A_{260}/A_{280} และ A_{260}/A_{230} ตามลำดับ พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอยีสต์ลูกผสมโคลนที่ 4, 5, 10, 11 และ 26 มีความเข้มข้นเท่ากับ 230, 88, 113, 168 และ 113 ng/ μ l ตามลำดับ เมื่อประเมินความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอ พบว่ายีสต์ลูกผสมโคลนที่ 5 และ 26 มีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.72 และ 1.82 ตามลำดับ มีความบริสุทธิ์มากกว่าโคลนที่ 4, 10 และ 11 ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ที่ได้เพียงพอต่อการนำไปใช้งานต่อ

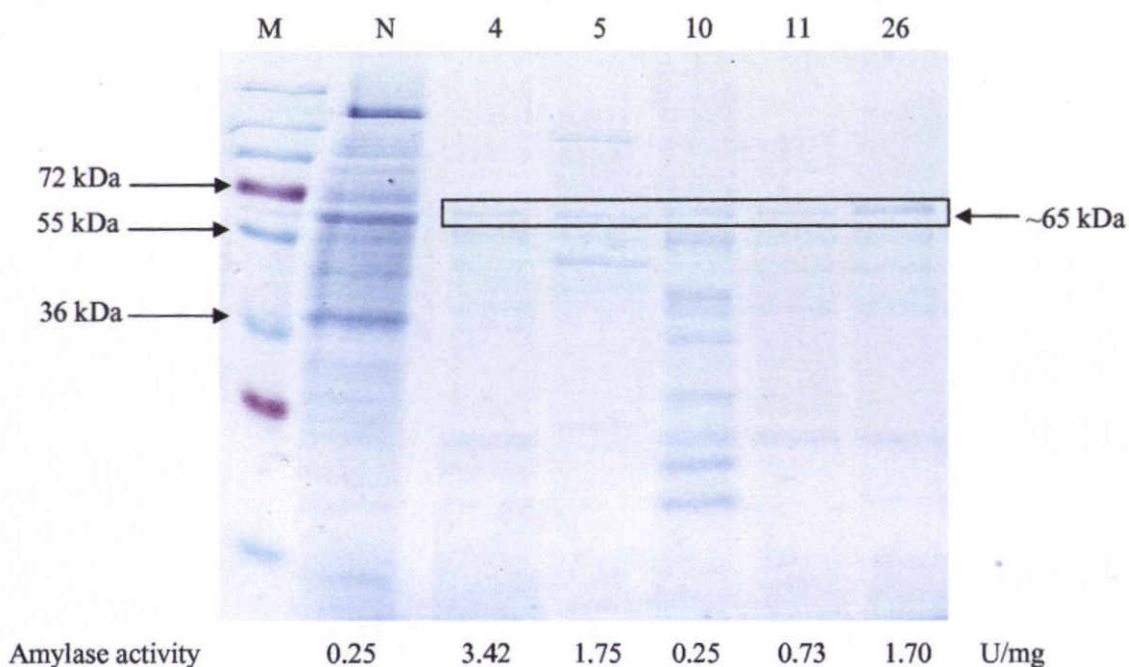
จากนั้นจึงนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ pKLAC2 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.7.11 จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 0.8% เจลอะกาโรส พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3 ทั้ง 5 โคลนนั้น ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,900 bp (ผลผลิตพีซีอาร์ยีนอะไมเลสที่ ~1,600 bp รวมกับส่วนของเวกเตอร์จนถึงตำแหน่งของไพรเมอร์ pKLAC2 ~300 bp) (ภาพที่ 4.19) ซึ่งเป็นขนาดที่คาดหมายไว้ จึงนำโคลนทั้ง 5 มาตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.8 ต่อไป



ภาพที่ 4.19 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ทำการตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 0.8% Lane M คือ 1 kb ladder DNA (100 ng), Lane N คือ negative control และ โคลน 4, 5, 10, 11 และ 26 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของโคลนที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3 โดยใช้ไพรเมอร์ pKLAC2

4.4.6 การตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำ crude enzyme ที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3 โคลนที่ 4, 5, 10, 11 และ 26 ไปตรวจสอบด้วย SDS-PAGE (ภาพที่ 4.20) ที่ความเข้มข้น โปรตีน 10 μg พบว่า ทั้ง 5 โคลนมีแบนที่คาดว่าน่าจะได้จากยีนอะไมเลส ซึ่งมีขนาดประมาณ 65 kDa จึงนำยีสต์ลูกผสมทั้ง 5 โคลน มาคัดเลือก โดยทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS assay เพื่อหาโคลนที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ดีที่สุดตามขั้นตอนที่ 3.10.1 พบว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3 โคลนที่ 4, 5, 10, 11 และ 26 มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ที่ 3.42, 1.75, 0.25, 0.73 และ 1.70 U/mg ตามลำดับ ขณะที่ยีสต์ *K. lactis* มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ที่ 0.25 U/mg ซึ่งยีสต์ลูกผสมโคลนที่ 4 มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่ดีกว่า จึงเลือกยีสต์ลูกผสมโคลนที่ 4 (pK1-16/2C3A4) ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ดีที่สุดมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



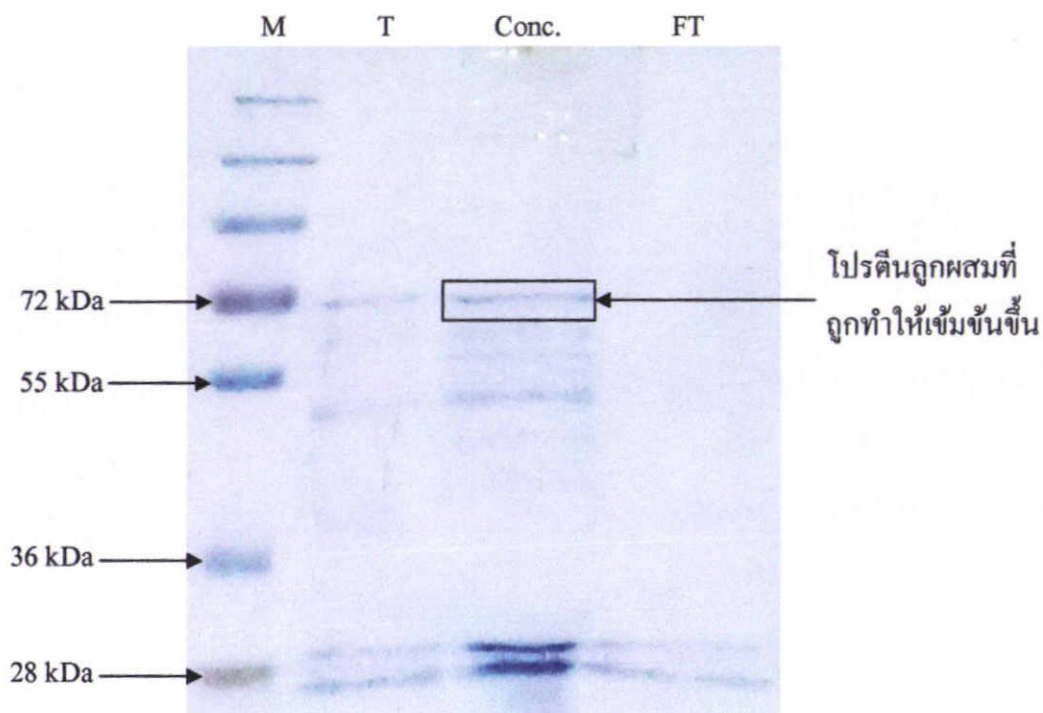
ภาพที่ 4.20 การแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pKI-16/2C3A4 Lane M คือ โปรตีนมาตรฐาน, Lane N คือ *K. lactis* (wild type), Lane 4, 5, 10, 11 และ 26 คือ โคลนที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pKI-16/2C3

4.5 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมในยีสต์ *K. lactis*

นำพลาสมิดลูกผสม โคลน pKI-16/2C3A4 ที่อยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน *K. lactis* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGal ปริมาตร 50 ml เหย้าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ให้ได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 จากนั้นใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% เป็นเชื้อเริ่มต้นเลี้ยงใน flask ขนาด 500 ml โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGal ปริมาตร 250 ml เหย้าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2-3 วัน ทำการแยกโปรตีน (crude protein) โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนต่อ

4.5.1 การทำโปรตีนให้เข้มข้นขึ้น

นำ crude protein ที่ได้มาทำให้เข้มข้นด้วยหลักการ ultrafiltration ผ่านคอลัมน์ Vivaspin 20 (MWCO 30 kDa) เมื่อนำโปรตีนทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วมาตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ โปรตีนรวมก่อนผ่านคอลัมน์ และเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (flow through) จะเห็นได้ว่าไม่มีโปรตีนเป้าหมายหลุดออกมา (ภาพที่ 4.21) ทำให้โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์นี้มีความบริสุทธิ์ขึ้น และเหมาะสำหรับการนำไปใช้วิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์



ภาพที่ 4.21 การทำให้โปรตีน pK1-16/2C3A4 เข้มข้นขึ้นด้วยคอลัมน์ Vivaspin 20 โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน, T คือ โปรตีนรวมทั้งหมด (total protein), Conc. คือ ส่วนของโปรตีนที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นผ่าน Vivaspin 20 column, FT คือ ส่วนที่ผ่านคอลัมน์

เมื่อนำโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์มาวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford พบว่าโปรตีนจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในส่วนโปรตีนรวมทั้งหมด ส่วนของโปรตีนที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้น และส่วนที่ผ่านคอลัมน์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.33, 0.87 และ 0.07 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) แสดงว่าโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์มีความเข้มข้นมากกว่าเดิมประมาณ 3 เท่าของความเข้มข้นโปรตีนเดิม ซึ่งจะช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในการวิเคราะห์หากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford

pK1-16/2C3A4	Protein conc. (mg/ml)	Volume (ml)	Total protein (mg)	Protein (%)
Total cell	0.33	120	39.72	100
Concentrate protein	0.87	20	17.44	43.91
Flow through	0.07	80	5.28	13.29

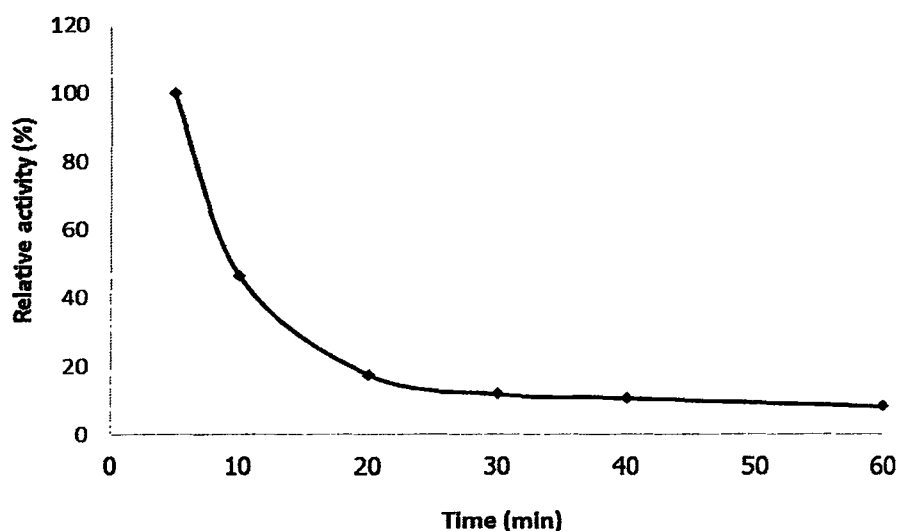
4.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส

4.6.1 เวลาที่เหมาะสมในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์

นำโปรตีนที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในข้อ 4.5.1 มาวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรท 0.1% แป้งมันฝรั่งในสารละลาย 0.1 M โซเดียมอะซิเตรด บัฟเฟอร์ pH 5 บ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50°C หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS ที่เวลา 5, 10, 20, 30, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน เมื่อกำหนดเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์นาน 5 นาที ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด เท่ากับ 15.89±0.01 U/mg (ตารางที่ 4.4) เมื่อบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์นานขึ้นเป็นเวลา 10 นาที ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 7.36±0.03 U/mg ซึ่งลดลงประมาณครึ่งหนึ่งของค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เวลา 5 นาที และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์นานขึ้นพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเรื่อยๆ (ภาพที่ 4.22) ในการทดลองนี้ใช้ระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์นาน 5 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในการทดสอบเอนไซม์ต่อไป

ตารางที่ 4.4 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการบ่ม (นาที)	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
5	15.89±0.01	100
10	7.36±0.03	46
20	2.76±0.04	17
30	1.86±0.02	12
40	1.67±0.03	10
60	1.28±0.06	8



ภาพที่ 4.22 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เวลาต่างๆ

4.6.2 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

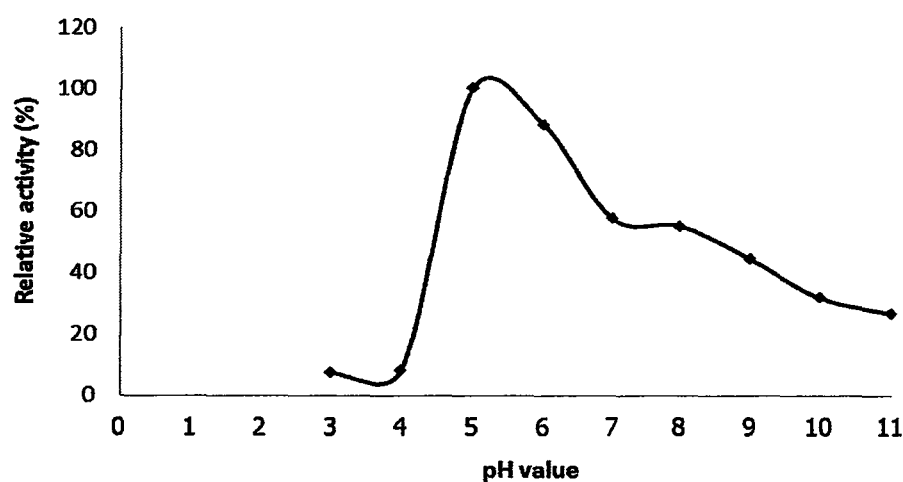
นำเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้สับเตรต 0.1% แป้งมันฝรั่งในสารละลาย 0.1 M โซเดียมอะซิเตรบัพเฟอร์ที่ pH 3-6 และ 0.1 M ฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ pH 7-11 บ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50°C หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS ที่เวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน เมื่อคำนวณเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ค่า pH 5 นาน 5 นาที ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด เท่ากับ 234.79 ± 25.50 U/mg รองลงมา คือที่ค่า pH ที่ 6 มีค่าเท่ากับ 206.72 ± 13.96 U/mg (ตารางที่ 4.5) ซึ่งในการบ่มเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 3-4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด เท่ากับ 17.48 ± 0.77 U/mg และ 19.44 ± 2.39 U/mg ตามลำดับ ขณะที่การบ่มตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6-11 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงมากกว่า 50% (ภาพที่ 4.23) ซึ่งสอดคล้องกับ Anto *et al.* (2006) พบว่า เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากการหมักวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรของเชื้อ *B. cereus* MTCC 1305 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ pH 5 ขณะที่ Al-Zazae *et al.* (2011) รายงานว่า เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. cereus* MS6 ที่พบในน้ำทิ้งของโรงงานผลิตกระดาษในประเทศอินเดีย มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ pH 7 และ Vijayabaskar *et al.* (2012) รายงานว่า เชื้อ *B. cereus* ที่พบในการหมักวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 7

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 แม้จะมีโครงสร้างโปรตีนที่เหมือนกับเชื้อ *B. cereus* แต่พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-

ค่าที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มีค่าที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีแหล่งที่มาของเชื้อที่แตกต่างกัน ทำให้การทำงานของเอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมนั้นๆแตกต่างกันด้วย ดังนั้นการบ่มปฏิริยาเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตรดบัฟเฟอร์ที่ pH 5 จึงเป็นค่าที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิริยาเอนไซม์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆของปฏิริยา

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
3	17.48±0.77	7
4	19.44±2.39	8
5	234.79±25.50	100
6	206.72±13.96	88
7	135.18±22.28	58
8	129.00±25.89	55
9	103.99±13.97	44
10	74.55±8.77	32
11	62.63±4.49	27



ภาพที่ 4.23 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ความเป็นกรด-ด่างต่างๆของปฏิริยา

4.6.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

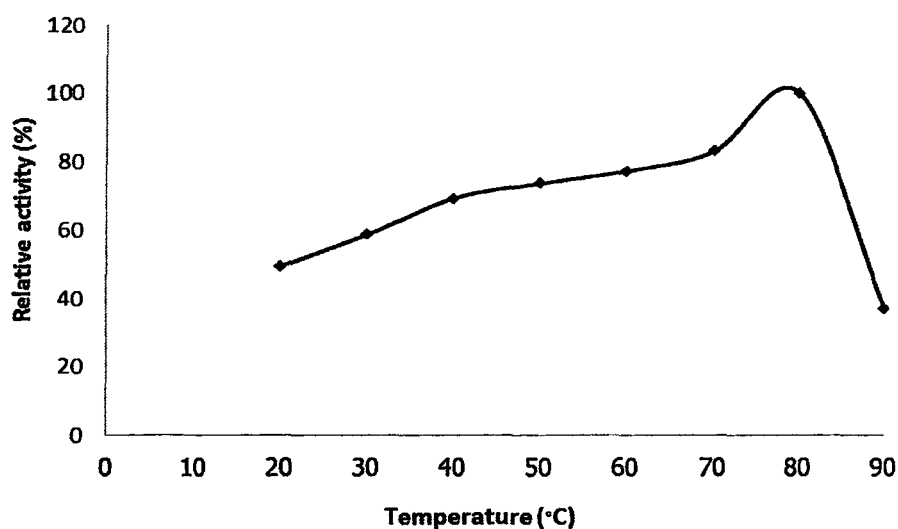
นำเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้สับเตรท 0.1% แป้งมันฝรั่งในสารละลาย 0.1 M โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ ที่ pH 5 บ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 20-90°C หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS ที่เวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน เมื่อคำนวณเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 286 ± 14.96 U/mg (ตารางที่ 4.6) โดยอุณหภูมิบ่มเอนไซม์ในช่วง 20-70°C ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ และดีที่สุดในที่ 80°C แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 90°C พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงต่ำสุด (ภาพที่ 4.24) เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพในการทำงาน

Anto *et al.* (2006) พบว่า เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากการหมักวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรของเชื้อ *B. cereus* MTCC 1305 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55°C ขณะที่ Al-Zazaec *et al.* (2011) รายงานว่า เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. cereus* MS6 ที่พบในน้ำทิ้งของโรงงานผลิตกระดาษในประเทศอินเดีย มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45°C และ Vijayabaskar *et al.* (2012) รายงานว่า เชื้อ *B. cereus* ที่พบในการหมักวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงสุดอุณหภูมิ 40°C

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. cereus* ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พึงประสงค์ของเอนไซม์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม จึงใช้อุณหภูมิ 80°C นี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดสอบปฏิกิริยาเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในการทดสอบขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.6 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
20	141±18.11	49
30	168±15.77	59
40	198±23.10	69
50	210±22.24	74
60	221±33.35	77
70	237±29.92	83
80	286±14.96	100
90	105±3.44	37



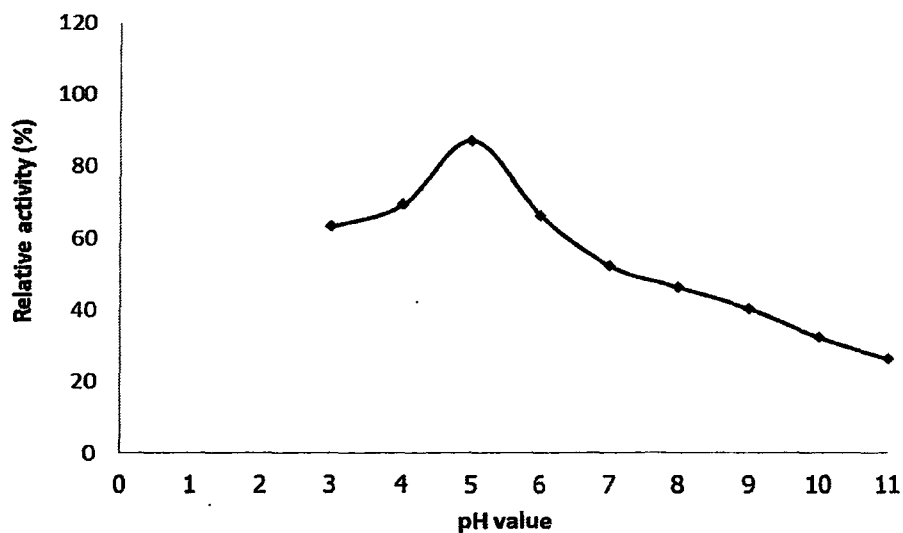
ภาพที่ 4.24 ค่าฤทธิ์สัมพันธ์ของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่อุณหภูมิต่างๆ

4.6.4 การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ที่ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง

นำเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มาทดสอบความสามารถในการทนกรด-ด่างของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์มาผสมกับบัฟเฟอร์ที่ pH 3-11 ความเข้มข้น 0.1 M นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในสถานะที่เหมาะสมที่ 0.1 M โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 5 บ่มที่อุณหภูมิ 80°C เปรียบเทียบกับ

เอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยคิดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 100% แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ (relative activity) กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่บ่มในบัฟเฟอร์ pH 3-11 ผลการทดสอบพบว่าเอนไซม์จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้ในช่วง pH 3-6 มากกว่า 60% (ภาพที่ 4.25) ขณะที่ pH 7-11 พบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพการทำงานลดลงตามลำดับ

Boyer และ Ingle (1972) ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* sp. NRRLB-3881 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้ทนต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH 7.5-10 และ Lin *et al.* (1998) พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. TS-23 สามารถทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้ในช่วง pH 8-11 ขณะที่ Al-Zazaec *et al.* (2011) รายงานว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. cereus* MS6 ที่พบในน้ำทิ้งของโรงงานผลิตกระดาษ สามารถทนต่อความเป็นกรด-ด่างได้ในช่วง pH 7-9 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีความสามารถในการทนต่อความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง pH ที่เป็นกรด ขณะที่เอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* อื่นๆจะทนต่อความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง pH ที่เป็นด่างมากกว่า



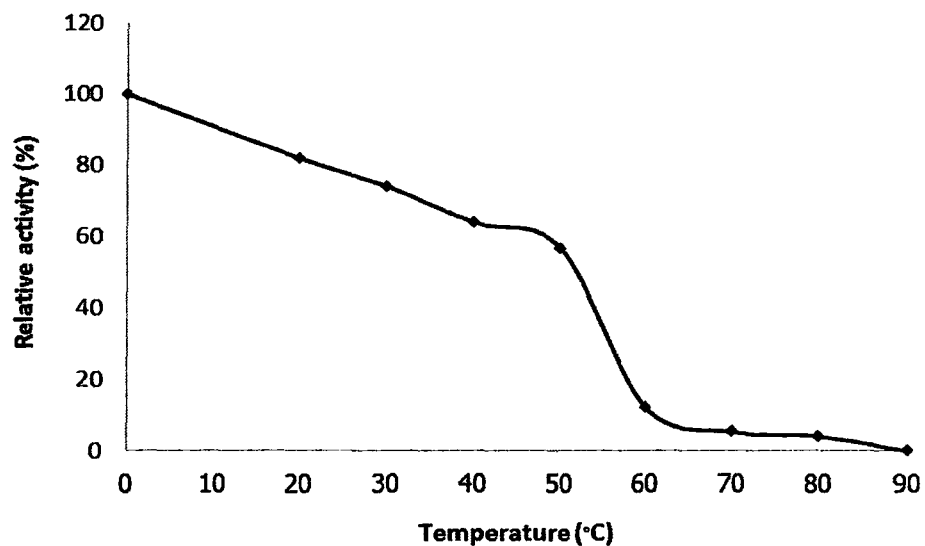
ภาพที่ 4.25 ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง

4.6.5 ความสามารถในการทนต่อความร้อนของเอนไซม์อะไมเลส

เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ได้จากการบ่มเอนไซม์ในสารละลายโซเดียมอะซิเตรบัพเฟอร์ pH 5 ที่อุณหภูมิ

20-90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสม และวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และนำค่ากิจกรรมเอนไซม์มาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่ม โดยให้ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มเท่ากับ 100% เมื่อคำนวณเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์มีค่าลดลงเรื่อยๆตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น โดยในช่วงอุณหภูมิ 20-50°C ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงประมาณ 10% และที่อุณหภูมิ 60°C เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการทำงานลงอย่างรวดเร็ว และยังคงลดลงเรื่อยๆจนสูญเสียความสามารถอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 90°C (ภาพที่ 4.26)

Lin *et al.* (1998) รายงานว่า เชื้อ *Bacillus* sp. TS-23 ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่มีความสามารถทนอุณหภูมิได้ดีที่ 60°C ขณะที่ Al-Zazae *et al.* (2011) รายงานว่า เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. cereus* MS6 ที่พบในน้ำทิ้งของโรงงานผลิตกระดาษในประเทศอินเดีย ทนอุณหภูมิได้ดีที่ 55°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อความร้อนได้พอกับเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4



ภาพที่ 4.26 ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ทนต่อความร้อน

4.6.6 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

นำเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ 0.1% แป้งมันสำปะหลัง (Tapioca flour), 0.1% แป้งข้าวโพด (Corn flour), 0.1% แป้งมันฝรั่ง (Potato starch), 0.1% แป้งสาลี (Wheat flour), 0.1% แป้ง

ข้าวเจ้า (Rice flour) และ 0.1% แป้งข้าวเหนียว (Glutinous rice flour) ในสารละลาย 0.1 M โซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ ที่ pH 5 บ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80°C หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS ที่เวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน และปริมาณสับสเตรทที่ใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสข้างต้นนั้นสามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสได้เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน ซึ่งแป้งแต่ละชนิดจะมีส่วนประกอบที่เป็นของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินแตกต่างกันไปตามชนิดของแป้ง เช่น แป้งข้าวโพดจะมีส่วนประกอบของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินอยู่ที่ 28 และ 72% ตามลำดับ ขณะที่แป้งมันสำปะหลังพบว่ามีส่วนประกอบของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินอยู่ที่ 17 และ 83% ตามลำดับ (Whistler and BeMiller. 1999)

เมื่อคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์อะไมเลสของยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีค่ากิจกรรมของแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งสาลี แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว เท่ากับ 463 ± 34 , 419 ± 33 , 398 ± 14 , 331 ± 22 , 160 ± 11 และ 287 ± 28 U/mg ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ดีที่สุดในเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท รองลงมาคือแป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งสาลี แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้า ตามลำดับ (ภาพที่ 4.27)

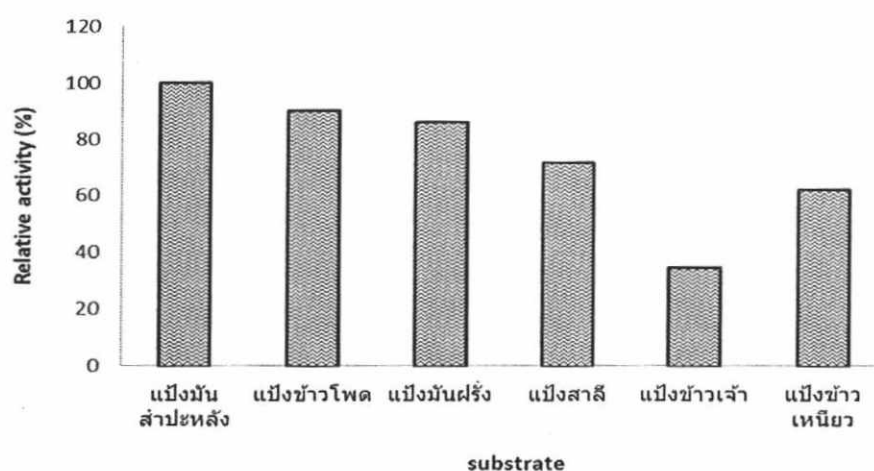
Hayashida *et al.* (1988) รายงานว่า เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* 65 มีความสามารถในการย่อยแป้งข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือแป้งมันฝรั่ง และแป้งสาลี ตามลำดับ และ Lin *et al.* (1998) พบว่า เอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. TS-23 ที่ทดสอบการย่อยด้วยแป้งต่างๆ พบว่า มีความสามารถในการย่อยแป้งข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือแป้งข้าวเจ้า แป้งมันฝรั่ง และแป้งสาลี ตามลำดับ ขณะที่ Liu and Xu (2008) รายงานว่า เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. YX-1 มีความสามารถในการย่อยแป้งข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือแป้งสาลี และแป้งมันฝรั่ง ตามลำดับ

จากการศึกษาพบว่าสัดส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในเมล็ดแป้งมีผลต่อการย่อยของเอนไซม์อะไมเลส เมื่อเปรียบเทียบการย่อยแป้งจากพืชชนิดเดียวกัน เมื่อปริมาณอะไมโลสและปริมาณอะไมโลเพคตินต่างกัน เอนไซม์อะไมเลสจะย่อยแป้งชนิดที่มีอะไมโลเพคตินสูงได้เร็วกว่าและย่อยแป้งที่มีอะไมโลสสูงได้ช้าที่สุด เนื่องจากโมเลกุลอะไมโลสมีส่วนช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่โครงสร้างแป้ง ทำให้เมล็ดแป้งชนิดที่มีอะไมโลสสูงพองตัวได้ช้ากว่าแป้งที่มีอะไมโลสต่ำ ดังนั้นเอนไซม์จึงต้องใช้เวลานานในการเข้าย่อยเมล็ดแป้งชนิดที่มีอะไมโลสสูง (Pomeranz. 1998) ซึ่งจากตารางที่ 2.3 จะเห็นได้ว่าแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวเจ้ามีสัดส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน คือ 17% และ 83% ตามลำดับ แต่เอนไซม์อะไมเลสที่ได้จาก

ยีสต์ลูกผสมมีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีกว่า เนื่องจากแป้งทั้ง 2 เป็นแป้งคนละชนิดกันจึงทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการย่อยได้ต่างกัน

ตารางที่ 4.7 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสับสเตรทต่างๆ

Substrate	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
แป้งมันสำปะหลัง	463±34	100
แป้งข้าวโพด	419±33	90
แป้งมันฝรั่ง	398±14	86
แป้งสาลี	331±22	72
แป้งข้าวเจ้า	160±11	35
แป้งข้าวเหนียว	287±28	62



ภาพที่ 4.27 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสับสเตรทต่างๆ

4.6.7 ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์อะไมเลส

ในการวิเคราะห์ค่าจลนศาสตร์เอนไซม์ต่อสับสเตรทแป้งมันฝรั่ง โดยใช้ทฤษฎีของ Lineweaver-Burk และคำนวณค่า V_{max} และ K_m โดยใช้สมการ Michaelis-Menten การวิเคราะห์ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์จะใช้วิธี DNS เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ด้วยโปรแกรม Kaleida Graph software package (Synergy software, USA) จากผลการ

วิเคราะห์พบว่า ค่า V_{max} และ K_m ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีค่าเท่ากับ 432 U/mg และ 2.92 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) ซึ่งค่า V_{max} บ่งบอกถึงอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา ค่า V_{max} ที่ได้บ่งบอกถึงความสามารถของเอนไซม์ที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้เร็วหรือไม่ ส่วนค่า K_m เป็นค่าที่บ่งบอกถึงค่าคงที่ของความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่ออัตราเร็วเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา ซึ่งค่า K_m ที่ดีควรจะมีค่าน้อยๆ เพราะบ่งบอกถึงความเข้มข้นของสับสเตรทที่เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุด

Qodah *et al.* (2006) ได้ศึกษาหาค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อ *B. sphaericus* พบว่ามีค่า V_{max} และ K_m ของเอนไซม์เท่ากับ 260 U/mg และ 0.96 mg/ml ซึ่งมีอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาดำกว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 แต่มีค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่ดีกว่า ขณะที่ Haq *et al.* (2010) ศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* พบว่ามีค่า V_{max} และ K_m ที่ได้มีค่าเท่ากับ 2,778 U/mg และ 8.3 mg/ml ซึ่งมีอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาสูงกว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 แต่มีค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่ดีน้อยกว่า

ตารางที่ 4.8 ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4

Protein	V_{max} (U/mg)	K_m (mg/ml)
pK1-16/2C3A4	432	2.92

4.6.8 การวิเคราะห์สารยับยั้ง และสารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 โดยใช้ 0.1% แป้งมันฝรั่งในสารละลายโซเดียมอะซิเตรดบัฟเฟอร์ pH 5 และเติมสารละลายต่างๆ ดังนี้ 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $SrCl_2$, 10 mM $LiCl$, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $NaCl$, 1% SDS, 5% SDS, 10% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM EDTA และ 50 mM $HgCl_2$ บ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80°C หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย DNS ที่เวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลรีดิคซ์ที่ได้เปรียบเทียบกับกลูโคสมาตรฐาน และวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และนำค่ากิจกรรมเอนไซม์มาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้เติมสารละลาย โดยให้ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ไม่ได้เติมสารละลายเท่ากับ 100%

จากผลการทดสอบ พบว่า การเติมสารละลาย 10 mM $MgCl_2$, 1% SDS, 5% SDS และ 10% SDS ค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น และเมื่อเติมสารละลาย 10% SDS เอนไซม์ทำงานได้สูงสุด 196% ขณะที่การเติมสารละลาย 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $SrCl_2$, 10 mM $LiCl$, 10 mM $NaCl$, 10 mM EDTA, 50 mM EDTA และ 50 mM $HgCl_2$ ทำให้การทำงานของ

เอนไซม์ลดลง โดยการเติมสารละลาย 50 mM EDTA พบว่าการทำงานของเอนไซม์ลดลงมากที่สุดเหลือ 70% (ตารางที่ 4.9)

จากการศึกษาของ Božic *et al.* (2011) รายงานว่า ปัจจัยภายนอก เช่น cation และ additive มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยพวกที่เป็นโลหะหนักอย่าง Hg^{2+} จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ Mg^{2+} มีผลต่อเอนไซม์เพียงเล็กน้อย และ EDTA จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลงประมาณ 30% ซึ่งจากการศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *B. licheniformis* ATCC 9945a พบว่าเมื่อเติม 2 mM $CaCl_2$ มีค่าเพิ่มขึ้น 111.6% ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เมื่อเติม 10 mM $CaCl_2$ มีค่าลดลงเหลือ 83% และเมื่อเติม 2 mM $HgCl_2$ และ 2 mM EDTA มีค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ลดลงเหลือ 0.1% และ 69.6% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เติม 10 mM EDTA, 50 mM EDTA และ 50 mM $HgCl_2$ มีค่าลดลงเหลือ 74%, 70% และ 78% ตามลำดับ ขณะที่ Burhan *et al.* (2003) รายงานว่า ที่ 5 mM $CaCl_2$ มีค่าฤทธิ์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ดีขึ้น 110% ขณะที่ 10 mM EDTA, 5 mM NaCl และ 0.1% SDS มีค่าลดลงเหลือ 95%, 79% และ 90% ตามลำดับ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงนี้อาจเป็นเพราะสารละลายนั้นเป็นพิษทำให้โครงสร้างของโปรตีนถูกทำลาย จึงเสียความสามารถในการทำงาน (สุนันทา ภิณณาวรรณ. 2547)

Zuo *et al.* (2009) กล่าวว่า ในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมอาหารพวกแป้ง จะใช้การแรงสั่นสะเทือน (sonication) โมเลกุลของแป้งร่วมกับการใช้สารลดแรงตึงผิว อย่างเช่น SDS (sodium dodecyl sulphate) และสารที่เป็นด่างในการแยกโมเลกุลของแป้ง โดยวิธี sonication ที่เป็นวิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมีนั้น มีผลต่อคุณสมบัติของแป้งใช้สำหรับการแยกส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน

Chan *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของแป้งต่างๆ 4 ชนิด คือ แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งถั่วเขียว และแป้งสาเก โดยใช้สารละลาย SDS และการใช้ sonication ร่วมกัน การใช้สารละลาย SDS และ sonication จะส่งผลให้โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบภายในเม็ดแป้งลดลง ซึ่งการใช้ SDS นั้นไม่มีผลต่อการทำลายโครงสร้างของแป้ง แต่การใช้ sonication จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนพื้นผิวของแป้ง เช่น ผิวแป้งหยาบขึ้น และเกิดรอยแตก ซึ่งการใช้ SDS และ sonication ร่วมกันจะส่งผลให้ปริมาณของอะไมโลสภายในแป้งเพิ่มขึ้น โดยสารละลาย SDS จะไปทำลายโปรตีนที่บริเวณผิวของเม็ดแป้ง และใช้การ sonication ทำให้เม็ดแป้งมีโครงสร้างที่อ่อนลง และแตกออก ทำให้อะไมโลสออกมาจากเม็ดแป้งได้มากขึ้น

จากผลการทดสอบเอนไซม์อะไมเลสที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 จะเห็นได้ว่า ในการใส่สารละลาย SDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ดีขึ้น

เนื่องจากว่าสารละลาย SDS เข้าไปช่วยทำลายโปรตีนที่ผิวแบ่ง ส่งผลให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับแบ่งได้ดีขึ้น จึงมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ดีกว่าสารละลายตัวอื่นๆ (Chan *et al.* 2010)

การทดสอบการเติมสารละลายต่างๆเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แต่ละตัวในอุตสาหกรรม เช่น การเติม CaCl_2 , ZnCl_2 และ SDS ในผงซักฟอก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์อะไมเลสในการขจัดคราบต่างๆ (Lo *et al.* 2001)

ตารางที่ 4.9 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เติมสารละลายต่างๆ

Metal ions	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
Non	1,059±2	100
10 mM CaCl_2	877±5	83
10 mM SrCl_2	915±12	86
10 mM LiCl	905±10	85
10 mM MgCl_2	1,181±6	112
10 mM NaCl	1,041±27	98
1% SDS	1,158±17	109
5% SDS	1,343±7	127
10% SDS	2,079±6	196
10 mM EDTA	782±4	74
50 mM EDTA	742±9	70
50 mM HgCl_2	824±14	78

4.7 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์ *K. lactis*

นำเชื้อยีสต์ *K. lactis* และเชื้อยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เลี้ยงตามขั้นตอนในข้อที่ 3.11.1 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารทดสอบ YPT (pH 5) ที่เติมน้ำตาลกาแลคโตส 2% นำไปเลี้ยงในสถานะที่ต่างกัน คือ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30°C (non shake) และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ในสถานะเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm (shake) ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณแบ่งที่เหลืออยู่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์ ได้ผลการทดลองดังนี้

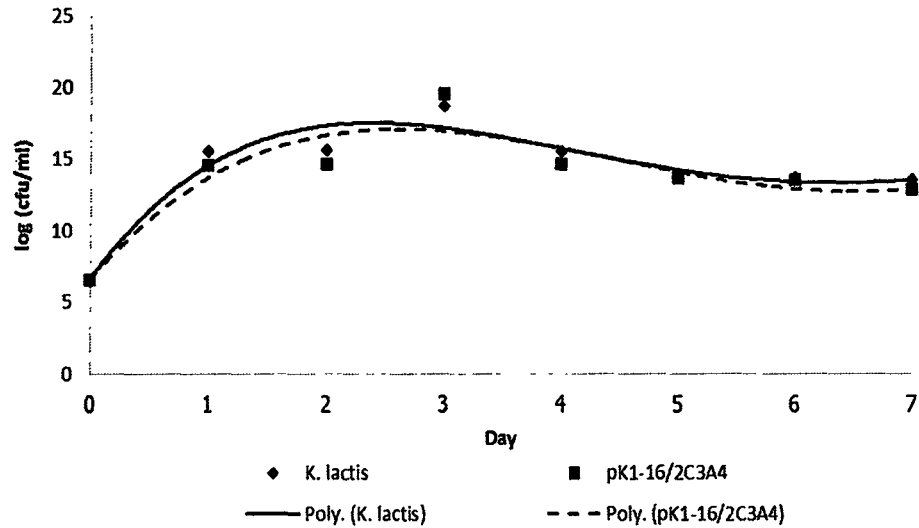
4.7.1 จำนวนโคโลนีของเซลล์ยีสต์

เมื่อทำการนับจำนวนโคโลนีของเซลล์ยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เจริญในอาหารทดสอบ YPT ที่ชั่วโมงต่างๆ บนอาหาร YPGlu ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ผลการทดลอง พบว่า ที่สภาวะนิ่ง (non shake) ยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงวันที่ 0-3 และสูงที่สุดในวันที่ 3 คือ 18.65 log cfu/ml และ 19.54 log cfu/ml (ตารางที่ 4.10) ตามลำดับ โดยที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีการเจริญของเซลล์ได้ดีกว่าประมาณ 0.89 log cfu/ml ภายหลังจากวันที่ 3 พบว่าเซลล์ยีสต์มีการเจริญเติบโตที่ลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 4.28)

ตารางที่ 4.10 การเจริญของเซลล์ยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Yeast growth (log cfu/ml)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	6.50	6.54
1	15.54	14.51
2	15.55	14.58
3	18.65	19.54
4	15.48	14.60
5	13.86	13.63
6	13.61	13.50
7	13.49	12.78

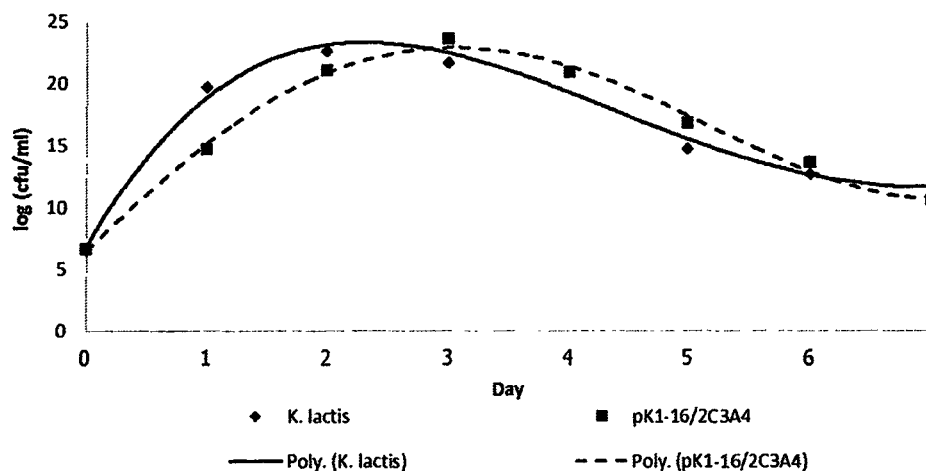


ภาพที่ 4.28 การเจริญเติบโตของเซลล์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

ขณะที่ในการเลี้ยงในสถานะเขย่า (shake) พบว่ายีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เซลล์มีการเจริญสูงขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงวันที่ที่ 0-3 และสูงที่สุดในวันที่ 3 เช่นเดียวกับที่เลี้ยงในสถานะนิ่ง คือ 21.53 log cfu/ml และ 23.51 log cfu/ml (ตารางที่ 4.11) ตามลำดับ โดยที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เจริญเติบโตได้ดีกว่าประมาณ 1.99 log cfu/ml เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เจริญในสถานะนิ่งพบว่าเจริญได้ดีกว่า อยู่ 1.10 log cfu/ml และหลังจากวันที่ 3 เซลล์ยีสต์มีการเจริญเติบโตที่ลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 4.29)

ตารางที่ 4.11 การเจริญของเซลล์ยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Yeast growth (log cfu/ml)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	6.54	6.56
1	19.57	14.58
2	22.49	20.96
3	21.53	23.51
4	20.78	20.81
5	14.61	16.68
6	12.57	13.56
7	11.64	10.49



ภาพที่ 4.29 การเจริญเติบโตของเซลล์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

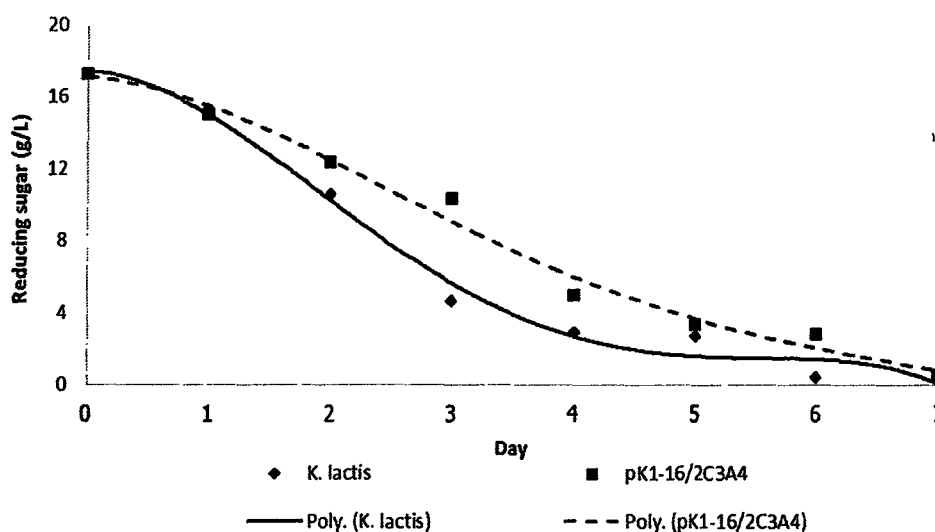
4.7.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เมื่อเก็บตัวอย่างที่ได้ในชั่วโมงต่างๆ นำมาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ตามขั้นตอนข้อ 3.10.3 เพื่อหาค่าปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารในชั่วโมงต่างๆ โดยนำค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับสถานะที่เลี้ยงระหว่างยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4

ผลการทดลอง พบว่า ที่สถานะหนึ่ง ยีสต์ *K. lactis* มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเรื่อยๆ ในวันที่ 0-2 (ภาพที่ 4.30) และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 เหลือ 4.62 ± 0.09 g/L (ตารางที่ 4.12) จากน้ำตาลเริ่มต้น ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเรื่อยๆ ในวันที่ 0-3 และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 เหลือ 4.94 ± 0.21 g/L จากน้ำตาลเริ่มต้น เห็นได้ว่ายีสต์ลูกผสมมีปริมาณการใช้น้ำตาลน้อยกว่ายีสต์ *K. lactis* อยู่ประมาณ 0.32 g/L ทำให้เมื่อเลี้ยงถึงวันที่ 7 พบว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีน้ำตาลเหลืออยู่ในอาหารมากกว่ายีสต์ *K. lactis* อยู่ประมาณ 0.21 g/L ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ โดยในสถานะหนึ่งยีสต์ *K. lactis* มีการเจริญเติบโตตลอดระยะเวลาการทดลองที่สูงกว่ายีสต์ลูกผสม

ตารางที่ 4.12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Reducing sugar (g/L)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	17.25±0.07	17.25±0.07
1	15.19±0.17	14.99±0.10
2	10.52±0.24	12.33±0.24
3	4.62±0.09	10.32±0.65
4	2.88±0.23	4.94±0.21
5	2.66±0.03	3.28±0.02
6	0.38±0.02	2.75±0.22
7	0.33±0.02	0.54±0.02



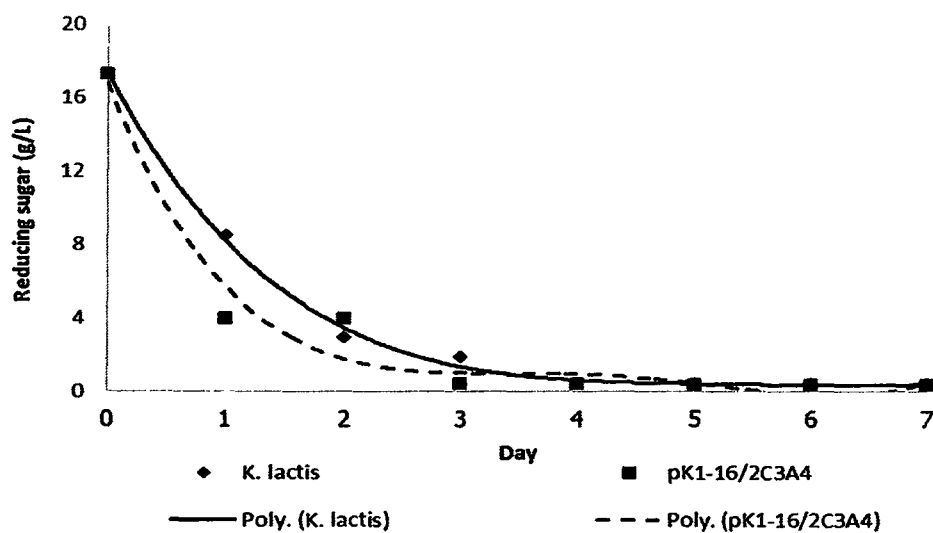
ภาพที่ 4.30 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในการเลี้ยงยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในอาหาร YPT ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

ส่วนในการเลี้ยงแบบเขย่า พบว่ายีสต์ *K. lactis* มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และ 2 เหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 8.45±0.19 g/L และ 2.92±0.08 g/L ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13) และเริ่มคงที่หลังจากวันที่ 3 (ภาพที่ 4.31) ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 เหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.97±0.02 g/L ซึ่งมีการปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงสูงกว่า *K. lactis* ในวันที่ 1 อยู่ประมาณ 4.48 g/L และหลังจากวันที่ 2

พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ครั้งที่ จากการทดลองทั้ง 2 สภาวะจะเห็น ได้ว่าการเลี้ยงในสภาวะเขย่า มี การใช้น้ำตาลในอาหารสูงและมีการใช้น้ำตาลได้เร็วกว่าการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ซึ่งเซลล์ยีสต์น่าจะ นำไปใช้ในการเจริญเติบโต

ตารางที่ 4.13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Reducing sugar (g/L)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	17.25±0.070	17.25±0.070
1	8.45±0.192	3.97±0.019
2	2.92±0.080	3.96±0.025
3	1.84±0.007	0.39±0.013
4	0.40±0.006	0.37±0.007
5	0.38±0.006	0.34±0.009
6	0.39±0.005	0.33±0.002
7	0.39±0.001	0.32±0.003



ภาพที่ 4.31 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในการเลี้ยงยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในอาหาร YPT ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

4.7.3 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

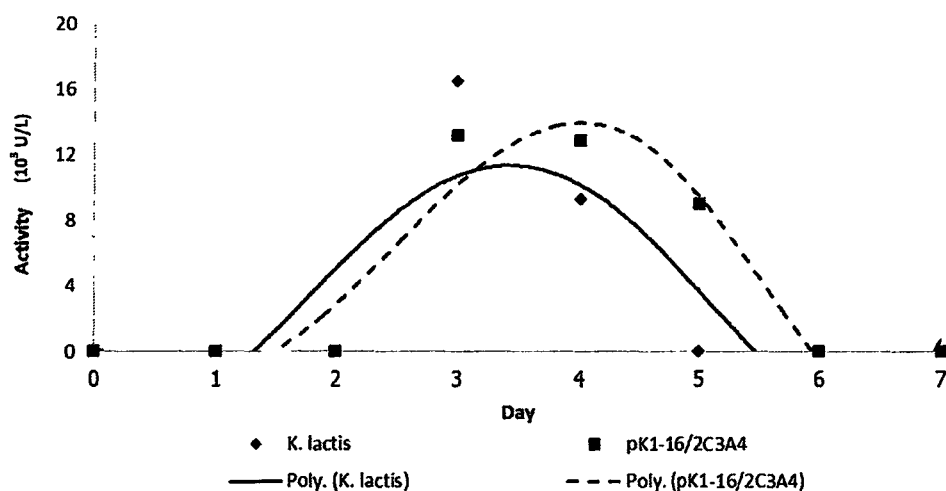
เมื่อเก็บตัวอย่างที่ได้ในชั่วโมงต่างๆ นำมาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ตามขั้นตอนข้อ 3.10.4 วิเคราะห์หากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ของยีสต์ที่เลี้ยงในชั่วโมงต่างๆ เพื่อหาค่า unit of enzyme ที่ได้มาเปรียบเทียบสถานะที่เลี้ยงระหว่างยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4

จากผลการทดลอง พบว่า ที่สถานะนิ่ง ยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เริ่มมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในช่วงวันที่ 3-4 และช่วงวันที่ 3-5 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.32) โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดของยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในวันที่ 3 เท่ากับ $16.46 \pm 0.22 \times 10^3$ U/L และ $13.14 \pm 0.34 \times 10^3$ U/L ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14) โดยที่ *K. lactis* มีค่าสูงกว่าประมาณ 3.32×10^3 U/L ขณะที่ในวันที่ 4 พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ *K. lactis* มีค่าลดลงเท่ากับ $9.27 \pm 0.28 \times 10^3$ U/L มีค่าน้อยกว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 อยู่ประมาณ 3.56×10^3 U/L ซึ่งยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ยังคงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สุดท้ายในวันที่ 5 เท่ากับ $8.97 \pm 0.14 \times 10^3$ U/L

ขณะที่วันที่ 0-2 ไม่พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ของยีสต์อาจเนื่องมาจากว่าในช่วงแรกเซลล์ยีสต์มีการปรับตัว อาจมีการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยแป้งบ้างในช่วงแรก ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้นน่าจะถูกใช้หมดไปกับการย่อยแป้งในอาหารเพื่อให้ได้น้ำตาลใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ และเมื่อน้ำตาลพอจึงมีค่าเอนไซม์เหลือในการวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในวันที่ 3-4 (*K. lactis*) และวันที่ 3-5 (ยีสต์ลูกผสม) ซึ่งหลังจากช่วงดังกล่าวแล้ว ก็ไม่พบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการที่เซลล์เริ่มตายลงเรื่อยๆ ตามผลการทดลองข้อ 4.7.1

ตารางที่ 4.14 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Activity (10^3 U/L)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	0.00	0.00
1	0.00	0.00
2	0.00	0.00
3	16.46±0.22	13.14±0.34
4	9.27±0.28	12.83±0.20
5	0.00	8.97±0.14
6	0.00	0.00
7	0.00	0.00



ภาพที่ 4.32 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

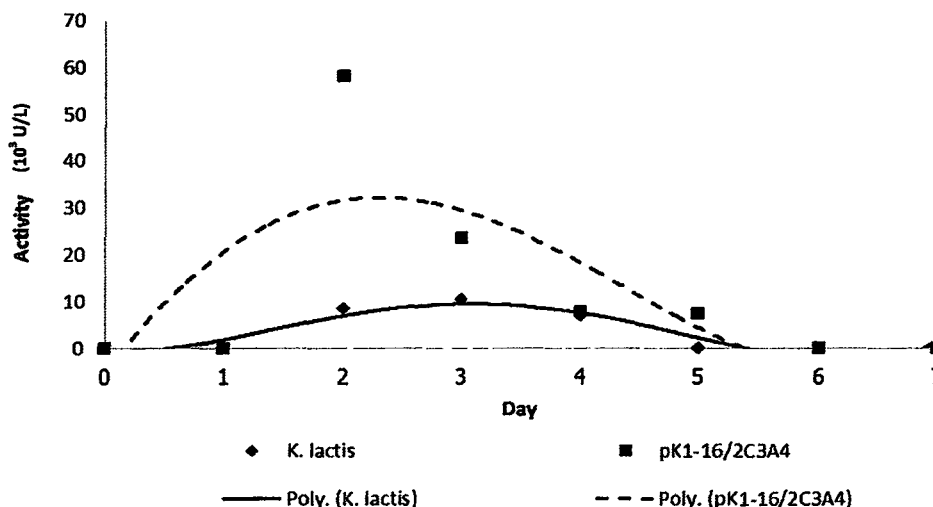
ส่วนในการเลี้ยงแบบเขย่า พบว่า ยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เริ่มมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในช่วงวันที่ 2-4 และช่วงวันที่ 2-5 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.33) โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดของยีสต์ *K. lactis* ในวันที่ 3 เท่ากับ $10.63 \pm 0.19 \times 10^3$ U/L ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีค่าสูงสุดในวันที่ 2 เท่ากับ $58.04 \pm 2.23 \times 10^3$ U/L (ตารางที่ 4.15) มากกว่ายีสต์

K. lactis อยู่ประมาณ 47.41×10^3 U/L ซึ่งการทดลองในสภาวะเขย่าให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงกว่า และช่วงของการผลิตเอนไซม์ที่มากกว่าการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง

ในการเลี้ยงสภาวะเขย่านั้นมีการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์สูงกว่าในการเลี้ยงสภาวะนิ่ง ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี สามารถผลิตเอนไซม์ได้เร็วในปริมาณที่สูง ซึ่งในช่วงแรกของการเลี้ยงเซลล์จะไม่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เหลือเช่นเดียวกับในสภาวะนิ่ง เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้จะถูกนำไปใช้ในการย่อยแป้งในอาหาร YPT ให้ได้น้ำตาล เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และในช่วงท้ายของการเลี้ยงไม่พบค่ากิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง เนื่องจากอาหารเริ่มหมดทำให้เซลล์ยีสต์มีการเจริญเติบโตที่ลดลง และเริ่มตายลงเรื่อยๆนั่นเอง

ตารางที่ 4.15 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Activity (10^3 U/L)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	0.00	0.00
1	0.00	0.00
2	8.51 ± 0.09	58.04 ± 2.23
3	10.63 ± 0.19	23.58 ± 0.54
4	7.11 ± 0.05	7.92 ± 0.06
5	0.00	7.58 ± 0.28
6	0.00	0.00
7	0.00	0.00



ภาพที่ 4.33 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับ ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็น เวลา 7 วัน

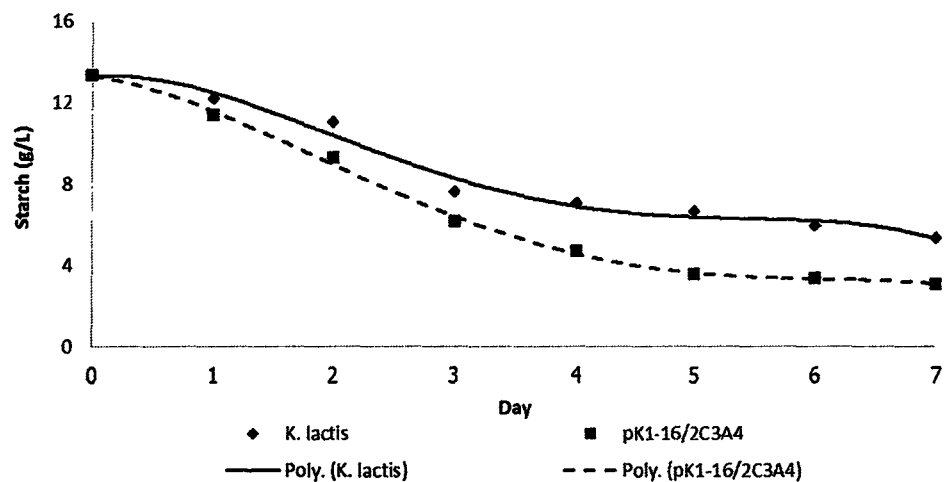
4.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่

เมื่อเก็บตัวอย่างที่ได้ในชั่วโมงต่างๆ นำมาวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ตามวิธีการของ Pintado *et al.* (1999) ในขั้นตอนที่ 3.10.5 โดยนำตัวอย่าง 100 μ l มาเติมสารละลาย ไอโอดีน 1.2 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 620 nm. เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแป้ง จากนั้นนำค่าที่ได้มา เปรียบเทียบสภาวะที่เลี้ยงระหว่างยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4

จากผลการทดลองที่สภาวะนี้ พบว่า ยีสต์ *K. lactis* มีปริมาณแป้งลดลงอย่างช้าๆ ในวันที่ 0-2 (ภาพที่ 4.34) โดยมีปริมาณแป้งลดลงสูงสุดในวันที่ 3 เหลือแป้ง 7.59 ± 0.25 g/L และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 ซึ่งมีปริมาณแป้งที่ลดลงตลอดระยะเวลาทดลองเท่ากับ 8.03 g/L (ตารางที่ 4.16) ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีปริมาณแป้งที่ลดลงเรื่อยๆ ในช่วงวันที่ 0-3 โดยมีปริมาณแป้งลดลงสูงสุดในวันที่ 3 พบว่ามีปริมาณแป้งเหลืออยู่ 6.15 ± 0.16 g/L ซึ่งมีปริมาณแป้งลดลงต่ำกว่ายีสต์ *K. lactis* แต่เมื่อพิจารณาปริมาณแป้งที่ลดลงทั้งหมดตลอดระยะเวลาทดลอง พบว่ายีสต์ลูกผสมมีการใช้แป้งเท่ากับ 10.28 g/L แสดงว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ได้รับการถ่ายยีนอะไมเลสมีความสามารถในการย่อยแป้งตลอดระยะเวลาการทดลองได้ดีกว่ายีสต์ *K. lactis* อยู่ 2.25 g/L

ตารางที่ 4.16 ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Starch (g/L)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	13.34±0.05	13.34±0.05
1	12.18±0.11	11.38±0.38
2	11.05±0.12	9.25±0.06
3	7.59±0.25	6.15±0.16
4	7.03±0.32	4.64±0.20
5	6.61±0.14	3.57±0.20
6	5.95±0.04	3.36±0.04
7	5.31±0.08	3.06±0.06



ภาพที่ 4.34 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งที่เหลือในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

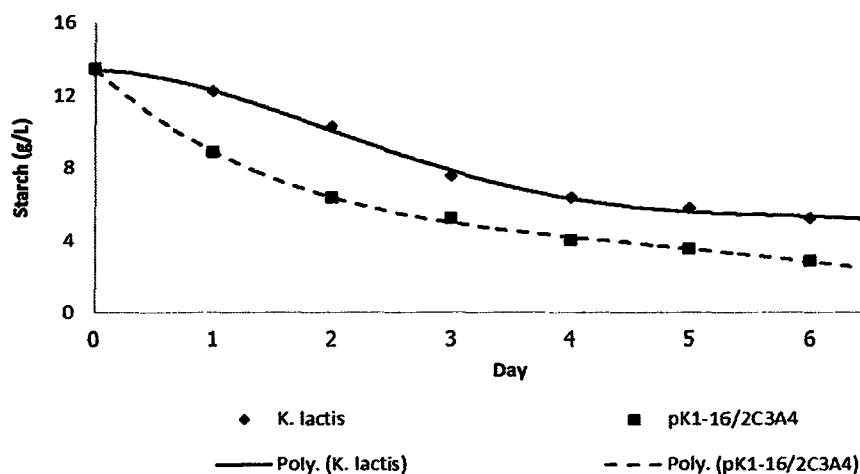
ส่วนในการเลี้ยงแบบเขย่า พบว่ายีสต์ *K. lactis* มีปริมาณแป้งลดลงอย่างช้าๆ ในช่วงวันที่ 0-2 (ภาพที่ 4.35) และลดลงสูงสุดในวันที่ 3 ซึ่งมีปริมาณแป้งเหลืออยู่ 7.50 ± 0.02 g/L (ตารางที่ 4.17) และลดลงเรื่อยๆจนถึงวันที่ 7 มีปริมาณแป้งที่ลดลงตลอดระยะเวลาทดลองเท่ากับ 8.64 g/L ซึ่งมากกว่ายีสต์ *K. lactis* ที่เลี้ยงในสภาวะนิ่งอยู่ 0.61 g/L ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีปริมาณแป้งที่ลดลงสูงสุดในวันที่ 1 มีปริมาณแป้งเหลืออยู่ 8.81 ± 0.15 g/L และ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีปริมาณแป้งลดลงตลอดการทดลองเท่ากับ 11.49 g/L ซึ่งสูงกว่ายีสต์ *K. lactis* ที่เลี้ยงในสภาวะนิ่งและเขย่า และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เลี้ยงในสภาวะนิ่งอยู่ 3.47 g/L, 1.22 g/L และ 2.86 g/L ตามลำดับ แสดงว่า ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีความสามารถในการย่อยแป้งตลอดระยะเวลาการทดลองได้ดีที่สุด

จากผลแสดงให้เห็นว่าในการเลี้ยงแบบสภาวะเขย่า เซลล์ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดี มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาได้ในปริมาณที่สูง มีผลทำให้ย่อยสลายแป้งได้ดีกว่าการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง โดยที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่ทำการโคลนยีนอะไมเลสมีค่าการย่อยแป้งที่สูงกว่ายีสต์ *K. lactis*

ตารางที่ 4.17 ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Starch (g/L)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	13.34±0.05	13.43±0.05
1	12.15±0.15	8.81±0.15
2	10.23±0.20	6.28±0.16
3	7.50±0.02	5.14±0.08
4	6.32±0.07	3.94±0.04
5	5.67±0.11	3.49±0.06
6	5.13±0.13	2.83±0.02
7	4.70±0.05	1.94±0.02



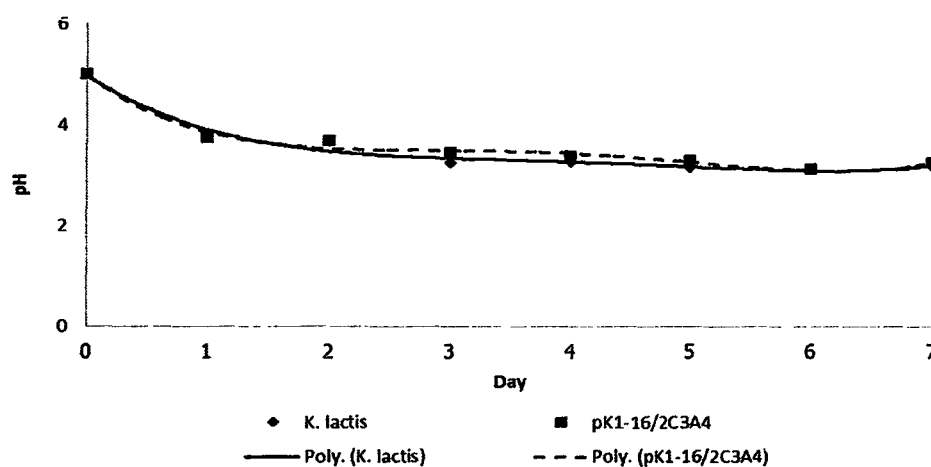
ภาพที่ 4.35 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งที่เหลือในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

4.7.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อยีสต์

เมื่อเก็บตัวอย่างที่ได้ในชั่วโมงต่างๆ นำมาวัดหาค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter (Schott, Germany) บันทึกค่าที่วัดได้ แล้วนำมาเปรียบเทียบสถานะที่เลี้ยงระหว่างยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 จากผลการทดลองในสถานะการเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่าอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ pH 5 จนถึงสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 มีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH 3 โดยในวันที่ 1 มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ pH 3.77 ± 0.04 และ 3.73 ± 0.01 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.18) และลดลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการทดลอง (ภาพที่ 4.36) ซึ่งพบว่าอาหาร YPT ในยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจากเริ่มต้นเท่ากับ 1.83 และ 1.77 ตามลำดับ แสดงว่าเซลล์ยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ใน pH ที่ต่ำ

ตารางที่ 4.18 ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	pH	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	5.00±0.05	5.00±0.05
1	3.77±0.04	3.73±0.01
2	3.66±0.05	3.68±0.06
3	3.23±0.03	3.44±0.05
4	3.25±0.08	3.36±0.07
5	3.15±0.02	3.28±0.05
6	3.12±0.07	3.10±0.04
7	3.17±0.09	3.23±0.01



ภาพที่ 4.36 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

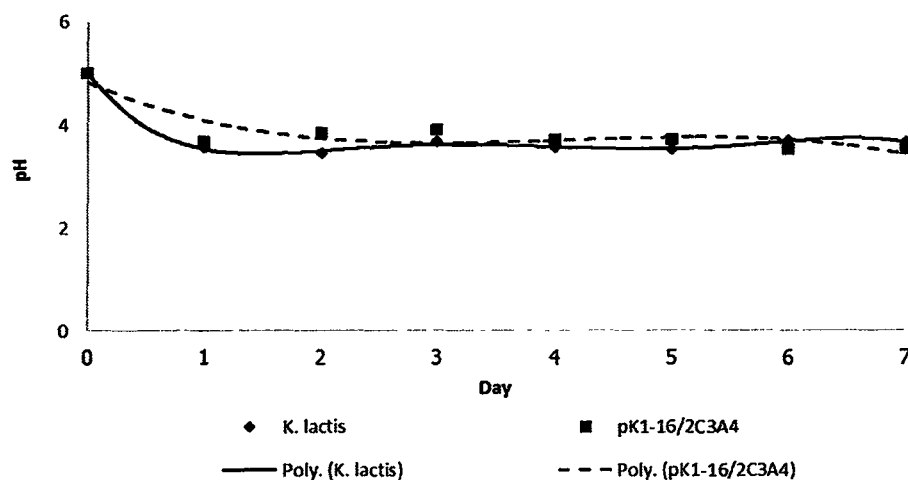
สำหรับการเลี้ยงแบบเขย่า พบว่ายีสต์ *K. lactis* ตั้งแต่ช่วงวันที่ 0-1 มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเท่ากับ 3.55 (ตารางที่ 4.19) และในช่วงวันที่ 1-7 ค่าความเป็นกรด-ด่างมีความแปรปรวนขึ้นลงอยู่ในช่วงกรด-ด่างประมาณ 3.45-3.65 (ภาพที่ 4.37) ซึ่งแตกต่างจากยีสต์ *K. lactis* ที่เลี้ยงในสถานะแบบนิ่ง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 3.65 ซึ่งลดลงจากค่าเริ่มต้น 1.35 ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่วัดได้ในช่วงวันที่ 0-1

เท่ากับ 3.67 ซึ่งมากกว่ายีสต์ *K. lactis* และในช่วงวันที่ 1-7 ค่าความเป็นกรด-ด่างมีความแปรปรวนมากกว่า *K. lactis* ที่เลี้ยงในสภาวะเดียวกัน คืออยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่างประมาณ 3.5-3.8

โดยปกติเชื้อยีสต์จะเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรด คือในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0-6.5 ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 3.0 การเจริญของเชื้อจะลดลง (ไกรยศ แซ่ลิ้ม, 2550) ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างอาจเนื่องมาจากผลผลิตที่เชื้อยีสต์สร้างขึ้นมาในระหว่างกระบวนการเจริญเติบโต สอดคล้องกับ Choi *et al.* (1997) รายงานว่า เชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ที่ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงมีค่าลดลงจากค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 มีค่าลดลงอยู่ที่ 4

ตารางที่ 4.19 ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	pH	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	5.00±0.05	5.00±0.05
1	3.55±0.03	3.67±0.06
2	3.45±0.04	3.83±0.14
3	3.66±0.14	3.89±0.10
4	3.56±0.05	3.71±0.12
5	3.52±0.08	3.71±0.09
6	3.68±0.06	3.52±0.02
7	3.65±0.05	3.53±0.03



ภาพที่ 4.37 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร YPT ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

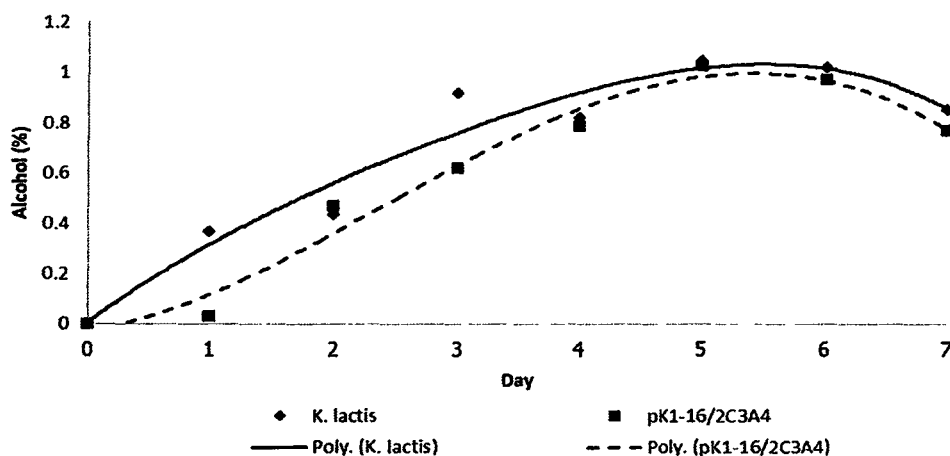
4.7.6 ปริมาณแอลกอฮอล์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อยีสต์

เก็บตัวอย่างที่ได้ในชั่วโมงต่างๆ ปริมาตร 50 ml นำมาวัดแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer โดยการหาจุดเดือดแล้วเปรียบเทียบกับแผ่นสเกล สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและ % แอลกอฮอล์ โดยใช้จุดเดือนของน้ำเป็นตัวตั้งสเกล ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.11.7 จากนั้นนำค่า % แอลกอฮอล์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับสภาวะที่เลี้ยงระหว่างยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4

จากผลการทดลองในสภาวะการเลี้ยงแบบนิ่ง พบว่ายีสต์ *K. lactis* เริ่มมีการผลิตแอลกอฮอล์ในวันที่ 1 เท่ากับ $0.37 \pm 0.21\%$ (ตารางที่ 4.20) และเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 เท่ากับ $0.43 \pm 0.06\%$ และ $0.92 \pm 0.03\%$ และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 4 ก่อนที่จะเพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และลดลงเรื่อยๆจนถึงวันที่ 7 (ภาพที่ 4.38) ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เริ่มมีการผลิตแอลกอฮอล์ในวันที่ 1 เท่ากับ $0.03 \pm 0.01\%$ ซึ่งมีผลผลิตแอลกอฮอล์น้อยกว่ายีสต์ *K. lactis* อยู่ 0.34% หลังจากวันที่ 1 พบว่ายีสต์ลูกผสมมีผลผลิตแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆในวันที่ 2-5 โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ $1.02 \pm 0.010\%$ ซึ่งตลอดระยะเวลาทดลองพบว่ายีสต์ *K. lactis* สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 5.47% ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 4.66% แสดงว่าในสภาวะการเลี้ยงแบบนิ่ง ยีสต์ *K. lactis* มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์สูงกว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 อยู่ 0.81%

ตารางที่ 4.20 ปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Alcohol (%)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	0.00	0.00
1	0.37±0.21	0.03±0.01
2	0.43±0.06	0.47±0.06
3	0.92±0.03	0.62±0.03
4	0.82±0.10	0.78±0.13
5	1.04±0.05	1.02±0.01
6	1.02±0.13	0.97±0.08
7	0.87±0.01	0.77±0.03



ภาพที่ 4.38 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสถานะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับการเลี้ยงแบบเขย่า พบว่ายีสต์ *K. lactis* เริ่มมีการผลิตแอลกอฮอล์ได้ในวันที่ 1 เท่ากับ 0.90±0.05% (ตารางที่ 4.21) เป็นค่าสูงสุดที่วัดได้ ซึ่งมีค่าต่ำกว่ายีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เลี้ยงแบบนิ่งอยู่ 0.14% และ 0.13% ตามลำดับ ในวันที่ 2-4 พบว่าการผลิตแอลกอฮอล์ลดลงเรื่อยๆ คือ 0.72±0.15%, 0.68±0.03% และ 0.57±0.03% ตามลำดับ แต่ในวันที่ 5 มีการผลิตแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 6-7 (ภาพที่ 4.39) ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เริ่มมีการผลิตแอลกอฮอล์ได้ในวันที่ 1 และสูงสุดในวันที่ 2

เท่ากับ $0.95 \pm 0.10\%$ และ $0.97 \pm 0.16\%$ ตามลำดับ ในวันที่ 3-5 มีการผลิตแอลกอฮอล์ลดลงเรื่อยๆ และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 6-7

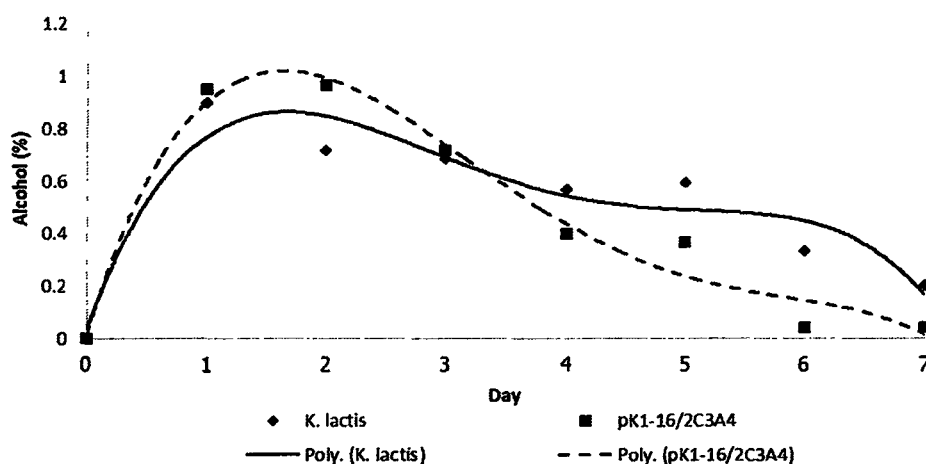
โดยตลอดระยะเวลาทดลองพบว่ายีสต์ *K. lactis* สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 3.99% ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 3.49% ซึ่งยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เลี้ยงในสภาวะเขย่ามีค่าการผลิตแอลกอฮอล์ต่ำกว่ายีสต์ *K. lactis* ที่เลี้ยงในสภาวะนิ่งอยู่ 1.48% และ 1.98% ตามลำดับ และผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อยกว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ที่เลี้ยงในสภาวะนิ่งอยู่ 0.67% และ 1.17% จากผลการทดลองของการเลี้ยง ทั้ง 2 แบบ จะเห็นได้ว่าการผลิตแอลกอฮอล์ในสภาวะเขย่าจะมีการผลิตแอลกอฮอล์ได้เร็วกว่า ขณะที่ในสภาวะนิ่งจะมีผลผลิตแอลกอฮอล์สูงกว่า ซึ่งเป็นสภาวะที่ยีสต์ทั่วไปใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ โดยที่ยีสต์ *K. lactis* นั้นสามารถผลิตได้มากกว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เนื่องจากการผลิตแอลกอฮอล์นั้นจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งยีสต์จะมีการเจริญช้ากว่าการเจริญในสภาพที่ใช้ออกซิเจน และต้องอาศัยน้ำตาลกลูโคสในการผลิต (สาวิตรี ลิมทอง, 2549) ทำให้ยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะนิ่งมีการผลิตแอลกอฮอล์ที่สูงกว่าสภาวะเขย่า โดยในสภาวะเขย่าเซลล์จะโตเร็วและใช้น้ำตาลไปอย่างรวดเร็วทำให้มีน้ำตาลสำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ต่ำกว่า

ไกรยศ แซ่ลิ่ม (2550) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ *P. anomala* YTB3 ที่ได้จากลูกแป้งที่อุณหภูมิการเลี้ยงต่างๆ คือ 25°C , 30°C และ 37°C พบว่าการเจริญและการผลิตเอทานอลมีการแปรผันตรงกับอุณหภูมิของการเลี้ยง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อัตราการเจริญและการผลิตเอทานอลก็จะสูงตาม ที่อุณหภูมิ 37°C สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 3.12% ที่ 30°C ผลิตได้ 2.42% และที่ 25°C ผลิตได้ 2.16% ซึ่งที่อุณหภูมิการเลี้ยง 30°C พบว่า *P. anomala* YTB3 มีการผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงกว่า *K. lactis* ที่เลี้ยงในสภาวะนิ่ง อยู่ 1.38%

จากการศึกษาของ Torija et al. (2003) ทำการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าเชื้อมีการผลิตปริมาณเอทานอลเท่ากับ 89.60 g/L ขณะที่ Bandaru et al. (2006) ทำการศึกษากการผลิตเอทานอลจากแป้งสาธู โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* MTCC 92 ที่อุณหภูมิ 32.4°C พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 55.30 g/L

ตารางที่ 4.21 ปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

Incubation time (day)	Alcohol (%)	
	<i>K. lactis</i>	pK1-16/2C3A4
0	0.00	0.00
1	0.90±0.05	0.95±0.10
2	0.72±0.15	0.97±0.16
3	0.68±0.03	0.72±0.12
4	0.57±0.03	0.40±0.09
5	0.59±0.06	0.37±0.03
6	0.33±0.08	0.04±0.04
7	0.20±0.09	0.04±0.05



ภาพที่ 4.39 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ *K. lactis* เปรียบเทียบกับยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีสต์ลูกผสมในสภาวะนี้สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ โดยการใช้น้ำตาลจากอาหาร YPT และการย่อยแป้งในอาหารด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ในระยะแรกของการทดลองจะเห็นได้ว่ายีสต์ลูกผสมมีการผลิตแอลกอฮอล์เพียงเล็กน้อย เพราะต้องนำน้ำตาลที่มีอยู่ไปใช้ในการเจริญเติบโตและจึงเริ่มผลิตแอลกอฮอล์มากขึ้นในวันที่ 2 และผลิตได้สูงสุดในวันที่ 5 ซึ่งภายหลังจากวันที่ 5 พบว่ายีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีปริมาณเซลล์ยีสต์ลดลง รวมถึงการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และการย่อยแป้งในเวลาดังกล่าวเริ่มลดลง และจากการศึกษา

ยีสต์ลูกผสมในสถานะเขย่า พบว่าสามารถแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกับในสถานะนิ่ง โดยเริ่มมีการผลิตสูงตั้งแต่วันที่ 1 ของการเลี้ยงและสามารถผลิตได้สูงสุดในวันที่ 2 ซึ่งในสถานะเขย่านี้เซลล์ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าในสถานะนิ่ง ทำให้สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้เร็วกว่า โดยในวันที่ 1 ของการเลี้ยงพบว่า มีการย่อยแป้งสูงสุด และสามารถผลิตเอโนไซม์ได้สูงสุดในวันที่ 2 ทำให้ในช่วงวันที่ 1-2 มีน้ำตาลในอาหารพอที่เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งภายหลังจากวันที่ 2 มีการผลิตแอลกอฮอล์ลดลง เอโนไซม์ และการย่อยแป้งที่ลดลง ขณะที่เซลล์ยีสต์ลูกผสมเริ่มมีปริมาณเซลล์ลดลงในวันที่ 4

จากการศึกษาการเลี้ยงยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ทั้ง 2 สถานะจะเห็นได้ว่า หากต้องการผลิตเอโนไซม์อะไมเลสให้ได้ปริมาณสูง ควรจะเลี้ยงในสถานะเขย่า ซึ่งจะให้ผลผลิตเอโนไซม์สูง แต่หากต้องการผลิตแอลกอฮอล์ควรเลี้ยงในสถานะนิ่ง จะทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงกว่า

4.8 การวิเคราะห์การทำงานของเอโนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสมเปรียบเทียบกับเอโนไซม์ทางการค้า

ในการทดลองนี้ได้กำหนดเอโนไซม์เริ่มต้นให้มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอโนไซม์ที่เท่ากันคือ 5 U/mg โดยเอโนไซม์ทางการค้าที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ได้แก่ Heat stable amylase (Suntaq, China), Termamyl 120 LS (Novozyme, Denmark) และ Spezyme 300 (Enzyme solution, Australia) นำมาเจือจางให้มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอโนไซม์เท่ากับ 5 U/mg แล้วจึงนำไปทำการทดสอบตามขั้นตอนในข้อที่ 3.9.1 โดยใช้สับสเตรตต่างๆ คือ แป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวโพด, แป้งมันฝรั่ง, แป้งสาลี, แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว ที่ความเข้มข้น 0.1% เปรียบเทียบกับการทำงานของเอโนไซม์ที่ได้จากยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4

4.8.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมการทำงานของเอโนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสมกับเอโนไซม์ทางการค้า ในสถานะที่เหมาะสมต่อเอโนไซม์นั้นๆ

เตรียมเอโนไซม์ที่ได้จากยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.12.1 และนำ crude enzyme ที่ได้มาเพิ่มความเข้มข้นโปรตีน โดยนำโปรตีนมาผ่าน Vivaspin 20 ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.9.2 จากนั้นนำเอโนไซม์ที่ได้มาเจือจางให้ได้กิจกรรมการทำงานของเอโนไซม์เท่ากับ 5 U/mg และทดสอบในสารละลาย 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5) ที่อุณหภูมิ 80°C ขณะที่เอโนไซม์ Heat stable amylase ทดสอบในสารละลาย 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7) ที่อุณหภูมิ 95°C, เอโนไซม์ Termamyl 120 LS ทดสอบในสารละลาย 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7) ที่อุณหภูมิ 90°C และเอโนไซม์ Spezyme 300 ทดสอบในสาร

ละลาย 0.1 M sodium acetate buffer (pH 6) ที่อุณหภูมิ 100°C โดยทั้งหมดจะทำการบ่มเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการย่อยแป้งเป็น mM น้ำตาลกลูโคส เปรียบเทียบค่าการย่อยแป้งของเอนไซม์ที่ได้จาก ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 กับเอนไซม์ทางการค้า

จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (Tapioca) และแป้งข้าวโพด (Corn) พบว่า เอนไซม์ Termamyl 120 LS มีค่าการย่อยแป้งได้ดีที่สุดเท่ากับ 15.35 mM และ 10.42 mM ตามลำดับ รองลงมาคือเอนไซม์ Heat stable amylase เอนไซม์ Spezyme 300 ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 และยีสต์ *K. lactis* ตามลำดับ (ตารางที่ 4.22) และการย่อยแป้งมันฝรั่ง (Potato) พบว่าเอนไซม์ Termamyl 120 LS มีค่าการย่อยแป้งได้ดีที่สุดเท่ากับ 17.77 mM ซึ่งเป็นค่าการย่อยแป้งที่มากที่สุดของเอนไซม์ รองลงมาคือเอนไซม์ Spezyme 300 เอนไซม์ Heat stable amylase ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 และยีสต์ *K. lactis* ตามลำดับ ส่วนแป้งสาลีและแป้งข้าวเจ้า พบว่าเอนไซม์ Heat stable amylase มีค่าการย่อยแป้งได้ดีที่สุดเท่ากับ 6.79 mM และ 5.06 mM ตามลำดับ รองลงมาคือเอนไซม์ Termamyl 120 LS เอนไซม์ Spezyme 300 ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 และยีสต์ *K. lactis* ขณะที่การย่อยแป้งข้าวเหนียวกลับพบว่าเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีค่าการย่อยได้ดีกว่าเอนไซม์อื่นๆ เท่ากับ 2.51 mM รองลงมาคือยีสต์ *K. lactis* และเอนไซม์ Heat stable amylase ส่วนเอนไซม์ Termamyl 120 LS และเอนไซม์ Spezyme 300 ไม่พบค่าการย่อยได้ในแป้งชนิดนี้

ตารางที่ 4.22 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสของยีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าในสภาวะที่เหมาะสมต่อเอนไซม์นั้นๆ

Enzyme	Glucose (mM)					
	Tapioca	Corn	Potato	Wheat	Rice	Glutinous
Heat stable amylase	7.67	6.05	9.57	6.79	5.06	1.88
Termamyl 120 LS	15.35	10.42	17.77	5.91	3.98	0.00
Spezyme 300	7.13	2.64	11.43	3.14	3.03	0.00
Amylase pK1-16/2C3A4	2.44	2.39	3.12	2.88	2.64	2.51
Amylase <i>K. lactis</i>	1.94	2.00	2.17	1.92	1.94	1.90

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีความสามารถของเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีกว่าเอนไซม์ทางการค้า ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแป้งข้าวเจ้า-แป้งข้าวเหนียวได้ โดยในการผลิตแป้งข้าว

เจ้านั้นจะมีน้ำทิ้งจากระบวนการผลิต เช่น น้ำทิ้งจากการชาวข้าว การแช่ข้าว การกรองอัด คิดเป็น ปริมาณแป้งประมาณ 893, 113 และ 892 ml ต่อน้ำเหลือทิ้ง 1 ลิตร (ดำรง ยุทธยงค์ และคณะ. 2541) รวมถึงแป้งที่คุณภาพไม่ได้มาตรฐาน เช่น ขนาดแป้งที่หยาบเกินไป หรือแป้งที่ผ่านกระบวนการ แล้วไม่สามารถนำกลับมาในกระบวนการผลิตได้ใหม่ ซึ่งหากสามารถนำเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งเหลือทิ้งเหล่านี้ได้จะทำให้เกิดผลผลิตต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ หรือน้ำส้มสายชู ซึ่ง ช่วยเพิ่มมูลค่าผลผลิตและลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ศึกษาการโคลนยีนอะไมเลสในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสแฟมิลี่ที่ 13 (GHF13) จากเชื้อ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 5 ไอโซเลท (1-16, 5-4, 5-7, 7-13 and 7-14) ที่แยกได้จากถั่วเน่าที่เป็นอาหารทางภาคเหนือ ซึ่งมีการสร้างโชนาเอนไซม์โคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี soluble starch เป็นสับสเตรท เมื่อทำการโคลนยีนอะไมเลสที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,665 bp และแปลรหัสได้ 555 กรดอะมิโน เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลพบว่ามีความเหมือนกับยีน Alpha-glucosidase ของเชื้อ *B. cereus* 99% และศึกษาการแสดงออกของยีนอะไมเลสในเซลล์เจ้าบ้านยีสต์ *K. lactis* เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 สามารถทำงานได้ดีที่ pH 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 80°C มีคุณสมบัติทนกรด-ด่างได้ในช่วงที่ pH 3-6 สามารถทนความร้อนได้ที่ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุดเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท รองลงมาคือแป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งสาลี แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้า ตามลำดับ กิจกรรมเอนไซม์ต่อสับสเตรทแป้งมันฝรั่งมีค่า V_{max} และ K_m เท่ากับ 431.93 U/mg และ 2.92 mg/ml ตามลำดับ และเมื่อเติมสารละลาย $MgCl_2$ และ SDS เอนไซม์มีประสิทธิภาพการทำงานที่ดีขึ้น แต่เมื่อเติมสารละลาย $CaCl_2$, $SrCl_2$, $LiCl$, $NaCl$, EDTA และ $HgCl_2$ ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง

การศึกษการผลิตเอทานอล พบว่าที่สภาวะการเลี้ยงแบบเขย่ายีสต์ *K. lactis* และยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีเซลล์ยีสต์การเจริญเติบโตได้ดีกว่า มีการใช้น้ำตาลในอาหารมาก โดยเฉพาะยีสต์ลูกผสมมีการใช้น้ำตาลสูงที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ และใช้ในการผลิตเอนไซม์ ทำให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากยีสต์ลูกผสมในสภาวะเขย่า พบว่ามีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $58.04 \pm 2.229 \times 10^3$ U/L ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการย่อยแป้งดีกว่าตัวอื่นๆ คือมีค่าการย่อยแป้งตลอดระยะเวลาทดลองเท่ากับ 11.49 g/L ซึ่งในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าเซลล์มีการเจริญดีกว่าการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ทำให้เซลล์มีการสร้างผลผลิตต่างๆ ออกมามากกว่า มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร YPT ที่ใช้เลี้ยง โดยในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ต่ำเหมือนกับการเลี้ยงแบบนิ่ง ซึ่งในสภาวะการเลี้ยงแบบนิ่งเซลล์จะเกิดความเครียด เนื่องจากมีออกซิเจนน้อยกว่าการเลี้ยงในสภาวะเขย่า ทำให้เกิดของเสียภายในเซลล์มากกว่าที่เซลล์จะสร้างขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างจึงต่ำกว่า และด้วยเหตุนี้ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์ พบว่าการเลี้ยงในสภาวะนิ่งสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีกว่าการเลี้ยงใน

สภาวะเขย่า โดยยีสต์ *K. lactis* มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ตลอดระยะเวลาทดลองสูงที่สุดเท่ากับ 5.47% ขณะที่ยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 ผลิตได้ 4.66%

การทดสอบเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 กับเอนไซม์ทางการค้าในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์นั้นๆ พบว่า ความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งสาลี และแป้งข้าวเจ้า ยีสต์ลูกผสมมีความสามารถในการย่อยต่ำกว่าเอนไซม์ทางการค้า แต่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ *K. lactis* อย่างไรก็ตามยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีความสามารถในการย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีกว่าเอนไซม์ทางการค้าบางตัวที่ไม่สามารถย่อยได้

จากการศึกษาครั้งนี้เอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ลูกผสม pK1-16/2C3A4 มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในอุณหภูมิที่สูง ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่อยู่ในไกลโคซิลไฮโดรเลสแฟมิลี่ที่ 13 และยังสามารถในการย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ ดังนั้นเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากยีสต์ลูกผสมนี้น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการนำยีสต์ลูกผสมไปพัฒนาใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543. “เทคโนโลยีแป้ง”. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ไกรยศ แซ่ลี้ม. 2550. “การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อยีสต์จากลูกแป้ง”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เต็มศิริ ศรีทาถုံ, ปริญญา เสนานอก และอุมาพร เมืองสอน. 2543. “การคัดเลือกเชื้อราจากลูกแป้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสไมเลสได้สูง”. โครงการพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2550. “เอกสารประกอบการเรียนวิชาจุลชีววิทยาอาหาร”. สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2553. “เอกสารประกอบการเรียนวิชาเทคโนโลยีเอนไซม์”. สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- บุญยพัทธ์ สุภานิช, รัตนา จิระรัตนานนท์, สุวิทย์ เตีย, วิทยา เทพไพฑูรย์, อนวิษ สังข์เพชร, จิระเดช ฮายุกต์ และปณิตดา ภูอากาศ. 2546. “การบูรณาการกระบวนการผลิตเอทานอลกับโรงงานน้ำตาลและโรงงานแป้งมันสำปะหลังเชิงเทคโนโลยีในการทำเอทานอลบริสุทธิ์”. รายงานวิจัยสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ.
- ประดิษฐ์ สุกนธวารินทร์. 2551. “ตำราชีวเคมี: เอนไซม์”. พิมพ์ครั้งที่ 5. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- ปราณี อานเป็ร้อง. 2547. “เอนไซม์ทางอาหาร”. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- พจน์ ศรีบุญลือ, โสพิศ วงศ์คำ และพัชรี บุญศิริ. 2543. “ตำราชีวเคมี”. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- เพลงพิน ศิวาพรรักษ์. 2541. “ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะไมโลส คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ.

- ภิญโญ พานิชพันธ์, พิณทิพย์ รื่นวงษา, วัชรวิทย์ เกษพิชัยณรงค์ และกานต์ยุพา จิตติวัฒนา. 2555. “Enzyme นารู้”. [Online]. Available : <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/enzyme>. [cited 1/8/2555; 8:06 EST]
- สมพร ศรีสุข. 2545. “ผลของสารเคลือบต่อคุณภาพข้าวกล้องหุงสุกแช่เยือกแข็ง”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สาวิตรี ลีมหทอง. 2549. “ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ”. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ
- สุนันทา ภิณณาวัชรน์. 2547. “ชีวเคมี 2”. พิมพ์ครั้งที่ 7. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.
- สุนีย์ แวมะ. 2552. “การคัดแยกและสมบัติของคิลเลอร์ยีสต์จากอาหารหมักดอง”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ. บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อรวรรณ เกตุสุขเจริญ. 2529. “คุณสมบัติบางประการในการนำไปใช้ประโยชน์ของแป้งต่างๆ”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- อรอุมา สวัสดิ์กิจ. 2546. “การศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้เมล็ดทุเรียนเป็นสับสเตรท”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- Agu, R.C., Amadife, A.E., Ude, C.M., Onyia, A., Ogu, E.O., Okafor, M. and Ezejiofor, E. 1997. “Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production”. **Waste Management**. 17 : 91-96.
- Al-Zazae, M.M.A., Neelgund, S., Gurumurthy, D.M. and Rajeshwara, A.N. 2011. “Identification, characterization of novel halophilic *Bacillus cereus* Ms6 : a source for extra cellular α -amylase”. **Advances in Environment Biology**. 5(5) : 992-999.
- Anto, H., Trivedi, U. and Patel, K. 2006. “Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation”. **Food Technology and Biotechnology**. 44(2) : 241-245.

- Banat, I.M. and Marchant, R. 1995. "Characterization and potential industrial application of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains". **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 11 : 304-306.
- Banat, I.M., Nigam, P. and Marchant, R. 1992. "Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C". **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 8 : 259-263.
- Bandaru, V.V.R., Somalanka, S.R., Mendu, D.R., Madicherla, N.R. and Chityala, A. 2006. "Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology". **Enzyme and Microbial Technology**. 38 : 209-214.
- Barnett, I.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. 2000. "Yeasts characteristics and identification". Cambridge University Press. UK.
- Bornet, F. 1993. "Technological treatments of cereals. Repercussions on the physiological properties of starch". **Carbohydrate polymers**. 21 : 195-203.
- Boyer, E.W. and Ingle, M.B. 1972. "Extracellular alkaline amylase from a *Bacillus* species" **Journal of Bacteriology**. 110 : 992-1000.
- Božić, N., Ruiz, J., López-Santín, J. and Vujčić, Z. 2011. "Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a". **Biochemical Engineering Journal**. 53 : 203-209.
- Bozzi, A., Saliola, M., Falcone, C., Bossa, F. and Martini, F. 1997. "Structural and biochemical studies of alcohol dehydrogenase isozymes from *Kluyveromyces lactis*." **Biochimica et Biophysica Acta**. 1339 : 133-142.
- Brady, D., Marchant, R., McHale, L. and McHale, A.P. 1994. "Production of ethanol by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media". **Biotechnology Letters**. 16 : 737-740.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A. and Osman, G. 2003. "Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6". **Process Biochemistry**. 38 : 1397-1403.
- Çalik E. and Çalik P. 2011. "Production of recombinant proteins by yeast cells". **Biotechnology Advances**. 30 : 1108-1118.

- Chan, H.T., Bhat, R. and Karim, A.A. 2010. "Effect of sodium dodecyl sulphate and sonication treatment on physicochemical properties of starch". **Food Chemistry**. 120 : 703-709.
- Choi, S.H., Sung, C., Oh, M.J. and Kim, C.J. 1997. "Intergeneric protoplast fusion in *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*". **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 84 : 158-161.
- Colussi, P. and Toron, C.H. 2005. "*Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*". **Applied and Environment Microbiology**. 71 : 7092-7098.
- Coronado, M., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A. and Nieto, J.J. 2000. "Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*". **FEMS Microbiology Letters**. 183 : 67-71.
- D'Amore, T., Celotto, G., Russell, I. and Stewart, G.G. 1989. "Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C". **Enzyme and Microbial Technology**. 11 : 411-416.
- Deuth, C.E. 2002. "Characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*". **Letters in Applied Microbiology**. 35 : 78-84.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., de Montigny J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisramé, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., de Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wésolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker and Souciet, J.L. 2004. "Genome evolution in yeasts". **Nature**. 430 : 35-44.
- Fogarty, W.M. 1983. "**Microbial enzymes and biotechnology**". Applied Science Publishers, London.

- Ganske, F. 2012. "Absorbance DNA quantitation using BMG LABTECH's POLARstar Omega microplate reader". [Online]. Available : <http://www.bmglabtech.com/application-notes/absorbance/absorbance-dna-quantitation-168.cfm>. [cited 23/9/2012; 11:31 EST]
- Gordon, J. and Davis, E.A. 1998. "**Food storage stability**". CRC Press. USA.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. and Chauhan, B. 2003. "Microbial α -amylase : a biotechnological perspective". **Process Biochemistry**. 38 : 1599-1616.
- Hacking, A. J., Taylor, I.W.F. and Hanas, C.M. 1984. "Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C". **Applied Microbiology and Biotechnology**. 19 : 361-363.
- Hall, T.A. 1999. "BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT". **Nucleic Acids Symposium Series**. 41 : 95-98.
- Haq, I.U., Javed, M.M., Hameed, U. and Adnan, F. 2010. "Kinetics and thermodynamic studies of alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* mutant". **Pakistan Journal of Botany**. 42(5) : 3507-3516.
- Hayashida, S., Teramoto, Y. and Inoue, T. 1988. "Production and characteristics of raw-potato-starch-digesting α -amylase from *Bacillus subtilis* 65". **Applied and Environmental Microbiology**. 54(6) : 1516-1522.
- Henrissat, B., Coutinho, P.M., Rancurel, C. and Lombard, V. 2011. "**Glycoside hydrolase family classification**". [Online]. Available : <http://www.cazy.org>. [cited 21/3/2011; 10:25 EST]
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin J.G., Kanoun, S., Juge, N. and Nasri, M. 2008. "Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1-cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*". **Process Biochemistry**. 43 : 499-510.
- Horváthová, V., Godány, A., Šturdík, E. and Janecek, Š. 2006. " α -Amylase from *Thermococcus hydrothermalis*: Re-cloning aimed at the improved expression and hydrolysis of corn starch". **Enzyme and Microbial Technology**. 39 : 1300-1305.
- Ivanova, V.N., Dobрева, E.P. and Emanuilova. 1993. "Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*" **Journal of Biotechnology**. 28 : 277-289.

- Junior, A.V., Oliveira do Nascimento, J.R. and Lajolo, F.M. 2006. "Molecular cloning and characterization of an α -amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris*". **Journal Agricultural Food Chemistry**. 54 : 8222-8228.
- Kerr, R.W. 1950. "**Chemistry and industry of starch**". Academic Press. New York.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. "**The yeasts, a taxonomic study**". 4th edn. Elsevier Science Public. Amsterdam.
- Leach, H.W., McCowen, L.D. and Schoch, T.J. 1959. "Structure of the starch granule I : Swelling and solubility patterns of various starches". **Cereal Chemistry**. 36 : 534-544.
- Li, S., Shen, W., Chen, X., Shi, G. and Wang, Z. 2011. "Secretory expression of *Rhizopus oryzae* α -amylase in *Kluyveromyces lactis*". **African Journal of Biotechnology**. 10(20) : 4190-4196.
- Lin, L.L., Chyau, C.C. and Hsu, W.H. 1998. "Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS23". **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 28 : 61-68.
- Liu, X.D. and Xu, Y. 2008. "A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization". **Bioresource Technology**. 99 : 4315-4320.
- Lo, H.F., Lin, L.L., Chen, H.L., Hsu, H.H. and Chang, C.T. 2001. "Enzymatic properties of a SDS-resistant *Bacillus* sp. TS-23 α -amylase produced by recombinant *Escherichia coli*". **Process Biochemistry**. 36 : 743-750.
- Mazzoni, C., Santori, F., Saliola, M. and Falcone, C. 2000. "Molecular analysis of UAS_E, a *cis* element containing stress response elements responsible for ethanol induction of the KIADH IV gene of *Kluyveromyces lactis*". **Research in Microbiology**. 151 : 19-28.
- Merico, A., Galafassi, S., Piškur, J. and Compagno, C. 2009. "The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*". **FEMS Yeast Research**. 9 : 749-756.
- Metin, K., Koç, Ö., Ateşlier, Z.B.B. and Biyik, H.H. 2010. "Purification and characterization of α -amylase produced by *Penicillium citrinum* HBF62". **African Journal of Biotechnology**. 9(45) : 7692-7701.
- Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." **Analytical Chemistry**. 31(42) :6-8.

- Monteiro de Souza, P. and Magalhães, P.O. 2010. "Application of microbial α -amylase in industry – A review". **Brazilian Journal of Microbiology**. 41 : 850-861.
- Narang, S. and Satyanarayana, T. 2001. "Thermostable α -amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans*". **Letters in Applied Microbiology**. 32 : 31-35.
- Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabó, J.M., Claeysens, M., Stals, I. and Hoschke, Á. 2002. "Purification and characterization of amylolytic enzyme from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626". **Enzyme and Microbial Technology**. 31 : 345-352.
- Oates, C.G. 1997. "Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis". **Food Science and Technology**. 8 : 375-382.
- Panchal, C.J. 1990. "**Yeast strains selection**". Mareel Dekker. New York.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R. 2000. "Advances in microbial amylases". **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 31 : 135-152.
- Park, K.H., Kim, T.J., Cheong, T.K., Kim, J.W., Oh, B.H. and Svensson, B. 2000. "Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the alpha-amylase family". **Biochimica et Biophysica Acta**. 1478 : 165-185.
- Phaff, H.J., Miller, M.W. and Mrak, E.M. 1968. **The life of yeasts**. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Pintado, J., Guyot, J.P. and Raimbault, M. 1999. "Lactic acid production from mussel processing wastes with an amylolytic bacterial strain". **Enzyme and Microbial Technology**. 24 : 590-598.
- Pomeranz, Y. 1998. "The association of official analytical chemists incorporated". **Advances in cereal science and technology**. St. Paul. Minnesota.
- Qodah, Z.A., Daghestani, H., Geopel, P. and Lafi, W. 2006. "Determination of kinetic parameters of α -amylase producing thermophile *Bacillus sphaericus*". **African Journal of Biotechnology**. 6(6) : 699-706.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Cold Spring Harbor**, New York: Cold Spring Harbor Press.
- Saunders, J., Izydorczyk, M. and Levin, D.B. 2011. "Limitations and challenges for wheat-based bioethanol production". **Economic Effects of Biofuel Production**. 8 : 429-452.

- Schaffrath, R. and Breunig, K.D. 2000. "Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*". **Fungal Genetics and Biology**. 30 : 173-190.
- Schenck, F.W. and Hebeda, R.E. 1992. **Starch hydrolysis products : technology, production and application**. VCH publisher. New York.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. 1989. "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acid as carrier". **Current Genetics**. 16 : 339-346.
- Steinbüchel, A. and Rhee, S.K. 2005. "**Polysaccharides and polyamides in the food industry : properties, production and patents**". Wiley-VCH Verlag. Germany.
- Szczodrak, J. and Targonski, Z. 1988. "Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose". **Biotechnology and Bioengineering**. 31 : 300-303.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. "Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0". **Molecular Biology and Evolution**. 24 : 1596-1599.
- Tanaka, R., Ishibashi, M., Tokunaga, H. and Tokunaga, M. 2000. "Secretion of hen egg white lysozyme from *Kluyveromyces lactis*". **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 64(12) : 2716-2718.
- Tao, X., Jang, M.S., Kim, K.S., Yu, Z. and Lee, Y.C. 2008. "Molecular cloning, expression and characterization of α -amylase gene from a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. MY-1". **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. 45 : 305-309.
- Tokunaga, M., Ishibashi, M., Tatsuda, D. and Tokunaga, H. 1997. "Secretion of mouse α -amylase from *Kluyveromyces lactis*". **Yeast**. 13 : 699-706.
- Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillanon, J.M. and Mas, A. 2003. "Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*". **International Journal of Food Microbiology**. 80 : 47-53.
- Totoro, G.T., Funke, B.R. and Case, C.L. 1991. "**Microbiology an Introduction**". Benjamin/Cummings publishing company. California.
- van Beynum, G.M.A. and Roels, J.A. 1985. "**Starch conversion technology**". Marcel Dekker. New York.
- van der Maarel, M. J.E.C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C.M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. "Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family". **Journal of Biotechnology**. 94 : 137-155.

- van den Berg, J.A., van der Laken, K.J., van Ooyen, A.J.J., Renniers, T.C.H.M., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A.J., Bishop, R.J., Schultz, K., Moyer, D., Richman, M. and Shuster, J.R. 1990. "Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin". *Nature Biotechnology*. 8 : 135-139.
- van Ooyen, A. J.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M. M.A., Jacobs, D., Colussi, P.A. and Taron, C.H. 2006. "Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*". **FEMS Yeast Research**. 6 : 381-392.
- Vijayabaskar, P., Jayalakshmi, D. and Shankar, T. 2012. "Amylase production by moderately halophilic *Bacillus cereus* in solid state fermentation". **African Journal of Microbiology Research**. 6(23) : 4918-4926.
- Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P. and Ulhoa, C.J. 2004. "Biochemical characterization of α -amylase from yeast *Cryptococcus flaus*". **Microbiology Letters**. 231 : 165-169.
- Watanabe, K., Kitamura, K., Iha, H. and Suzuki, Y. 1990. "Primary structure of the oligo-1,6-glucosidase of *Bacillus cereus* ATCC7064 deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene". *European Journal of Biochemistry*. 192 : 609-620.
- Wésolowski-Louvel, M., Breuning, K.D. and Fukuhara, H. 1996. "**Nonconventional yeasts in biotechnology : a handbook**". Springer-Verlag. Heidelberg.
- Whistler, R.L. and BeMiller, J.N. 1999. "**Carbohydrate chemistry for food scientists**". 2nd edn. American Association of Cereal Chemists. USA.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. 1995. "**Wine analysis and production**". The Chapman and Hall enology library. New York.
- Zuo, J.Y., Knoerzer, K., Mawson, R., Kentish, S. and Ashokkumar, M. 2009. "The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions". **Ultrasonics Sonochemistry**. 16 : 462-468

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย อากาศเลี้ยงเชื้อและแผ่นที่วอคเตอร์

1. การเตรียมสารละลาย

1) 50X TAE buffer (Tris-acetate)

242 g	Tris-borate
57.1 ml	Acetic acid
100 ml	EDTA (pH8.0)

ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบ 1 ลิตร

2) 6X loading buffer

0.25%	Bromopheno blue
30%	Glycerol

3) Ethidium bromide 0.5 mg/ml

ละลาย 0.5 mg Ethidium bromide ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ml เก็บในขวดสีชา (เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือในการเตรียมสารละลาย)

4) TB buffer ที่ใช้สำหรับการเตรียม competent cell

10 mM	PIPES
55 mM	MnCl ₂
15 mM	CaCl ₂
250 mM	KCl

5) Iodine solution (Lugol's solution)

1 g	Iodine
2 g	KI

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

6) Iodine solution (Pintade *et al.* 1999)

3 g	Iodine
30 g	KI

ละลาย KI ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 ml ผสมให้เข้ากัน เติม Iodine ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 ลิตร เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 4 : 100 ก่อนใช้

7) 1M Isopropyl-B-D- thiogalactoside (IPTG)

เตรียม Stock IPTG โดยละลาย 2 g IPTG ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 8 ml เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 10 ml กรองด้วย filter ขนาด 0.22 μm เก็บที่ -20°C

8) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal)

ละลาย 20 mg X-gal ใน Dimethylformamide 400 μl แล้วเก็บในหลอดที่กันแสง เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

9) Lysis buffer

140 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na_2HPO_4

1.8 mM KH_2PO_4

pH 7.3 เติม 1 mM PMSF ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

10) 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

10.6 g 3,5-dinitrosalicylic acid

19.8 g NaOH

306 g Potassium sodium tartate

8.3 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

7.6 ml Phenol

1,416 ml น้ำกลั่นอุ่น

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Luria-Bertani broth (LB Broth)

10 g	Tryptone
5 g	Yeast extract
10 g	NaCl

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2) Luria-Bertani agar (LB agar)

10 g	Tryptone
5 g	Yeast extract
10 g	NaCl
15 g	Agar

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำ
กลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3) Starch agar

10 g	Soluble starch
23 g	NA

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4) SOB media

2%	Tryptone
0.5%	Yeast extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5) 40% Glucos/Galactose

Glucose/Galactose	40 g
-------------------	------

ละลาย Glucose/Galactose ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 ml และคนตลอดจน
ละลายหมด นำละลายสารที่ได้กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 μm

6) YPGlu/YPGal broth

10 g	Yeast extract
20 g	Peptone
50 ml	40% Glucose/Galactose

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 950 ml
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว
เติม 40% Glucose/Galactose 50 ml

7) YPGlu/YPGal agar

10 g	Yeast extract
20 g	Peptone
20 g	Agar
50 ml	40% Glucose/Galactose

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำ
กลั่นให้ได้ 950 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
ทิ้งไว้ให้อุ่นแล้วเติม 40% Glucose/Galactose 50 ml

8) 100x Acetamide

0.75 g	acetamide
--------	-----------

ละลาย acetamide ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 25 ml และคนตลอดจนละลาย
หมด นำละลายสารที่ได้กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 μm เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

9) YCB agar

12 ml	1 M Tris-HCl
4.68 g	YCB medium powder
8 g	Agar

ละลาย YCB medium powder ในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติม 1 M Tris-HCl ผสมให้เข้ากัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 400 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10) YPS agar

4 g	Yeast extract
8 g	Peptone
4 g	Potato starch
8 g	Agar

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยเติม Agar ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 400 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11) YPT broth

0.5 g	Yeast extract
0.5 g	Peptone
30 g	Tapioca flour

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

1) Ampiclin 100 mg/ml

ละลายยาปฏิชีวนะด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กรองด้วย filter ขนาด 0.2 μm เก็บที่ -20°C

4. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

1) 5x SDS dye loading buffer

1.9 ml	น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
0.5 ml	0.5M Tris-HCl pH 6.8
0.4 ml	Glycerol
0.8 ml	10% SDS
0.2 ml	2 Mercaptoneethanol
0.2 ml	1% Bromophenol blue

2) 10x protein running buffer (1 ลิตร)

30 g	Tris-base
144 g	Glycine
10 g	SDS

3) Destaining buffer (1 ลิตร)

100 ml	Methanol
100 ml	Acetic acid
800 ml	น้ำกลั่น

4) Coomassie Brilliant Blue stain (2 ลิตร)

2 g	Coomassie Brilliant Blue R-250
1L	Methanol
200 ml	Acetic acid
800 ml	น้ำกลั่น

5) 10% Ammonium persulfate

ละลาย 100 mg Ammonium persulfate ในน้ำกลั่น 1 ml

6) การเตรียมเจลเพื่อทำ SDS-PAGE

เจลมี 2 แบบ คือ 10% separating และ 5% stacking ในการเตรียมเจลทั้ง 2 แบบ แสดงในตารางภาคผนวก ก1

ตารางภาคผนวก ก1 การเตรียม polyacrylamide gel

ส่วนประกอบ	10% Separating gel	5% Stacking gel
น้ำกลั่น	3.4 ml	5.7 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	2.5 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l
30% Acrylamide	4 ml	1.7 ml
10% Ammonium persulfate	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

5. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์

1) การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตรคบัฟเฟอร์ pH 3-6

- 0.2M acetic acid
- 0.2M sodium acetate (tri-hydrate) (27.2 g / l)
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางภาคผนวก ก2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium acetate

pH	vol. of 0.2M acetic acid	vol. of 0.2M sodium acetate
3	982.3 ml	17.7 ml
4	847.0 ml	153.0 ml
5	357.0 ml	643.0 ml
6	52.2 ml	947.8 ml

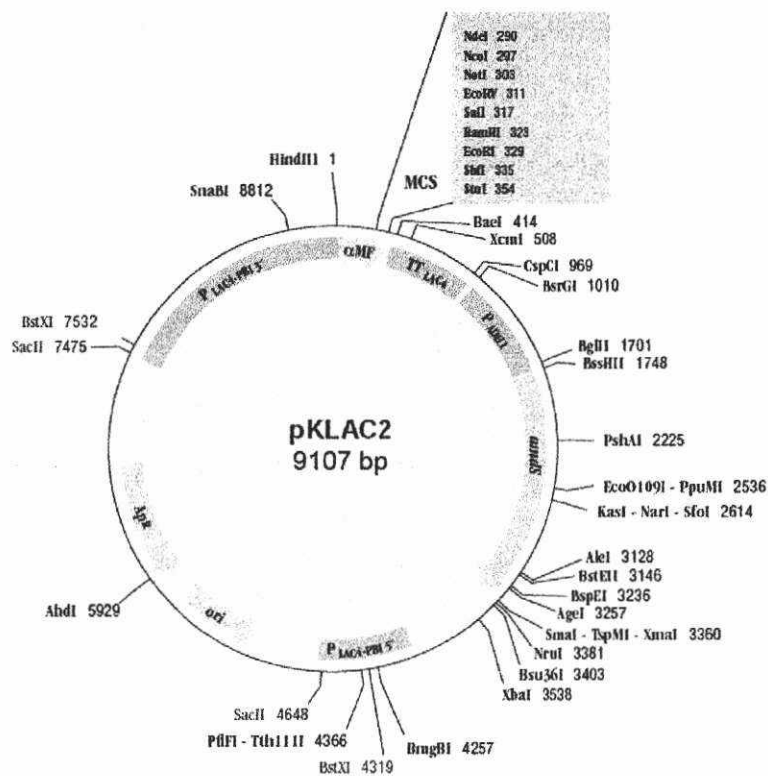
2) การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซเตรคบัฟเฟอร์ pH 7-11

- 0.2M disodium hydrogen phosphate (28.4 g / l)
- 0.2M HCl
- 0.2M NaOH
- เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ตาม pH ที่ต้องการ

ตารางภาคผนวก ก3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ sodium phosphate

pH	vol. of 0.2M disodium phosphate	vol. of 0.2M HCl	vol. of 0.2M NaOH
7	756.0 ml	244 ml	
8	955.1 ml	44.9 ml	
9	955.0 ml	45.0 ml	
10	966.4 ml		33.6 ml
11	965.3 ml		34.7 ml

2) pKLAC2 vector



```

#S1274 LAC4mt
Promoter Sequencing Primer
9009 GAATTGTGAGCGGATAACAAGCTCAACACTTGAATTTAGGAAAGAGCAGAATTTGGCAA 9068
9069 AAAAAATAAAAAAAAAATAACACACATACTATCGAGAAGCTTGAATAATGAAATTC 22
TCTACTATATTAGCCGCATCTACTGCTTAATTTCCGTTGTTATGGCTGCTCCAGTTCT 82
S T I E A A S T A L I S V V H A A P V S
#S1275 α-Mating Factor
Sequencing Primer
83 ACCGAACTGACATCGACGATCTTCCAATATCGGTTCCAGAAAGCCTTGATTGGATTC 142
T E T D I O D L P I S V P E E A L I G F
143 ATTGACTTAACGGGGGATGAAGTTTCTTGTTCCTGTTAATAACGGAACCCACACTGGT 202
I D L T G D E V S C L L P V N N G T H I G
203 ATTCTATTCTAAACACCACCATCGCTGAAGCTGCTTTCGTCGACAGGATGATCGGAG 262
L F L N Y T I A E A A F A D K D D L E
263 AAAAGAGAGGCTGAAGCTAGAAGACTCATATGCCATGGCGGCCGCGATATCGTCGAC 322
K R E A E A R R A H M S M G G R D I V D
BamHI EcoRI SbfI StuI
323 GGATCCGAATTCCTGCAGGTAATTAATAAAGGCCTTGAATCGAGAATTTACTTAGA 382
G S E E P A G N *
383 TAAGTATGACTTACAGGTATATTTCTATGAGATACTGATGTATACATGATGATAATAT 442
443 TTAACGGTTATTAGTCCCATTGCTTGTGCGATAATGACGTTCTATCAAAGCAATAC 502
#S1276 pKLAC1 Reverse
Sequencing Primer
    
```

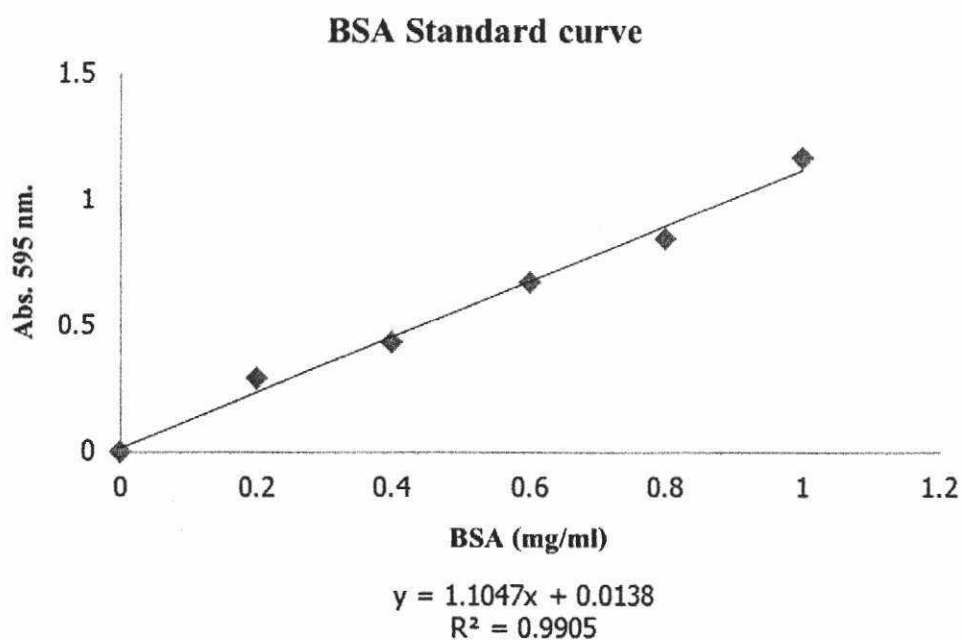
ภาพผนวกที่ ก2 แผนที่ยีนและตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ของเวกเตอร์ pKLAC2

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

1. โปรตีนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก ข1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm. ของโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

BSA concentration (mg/ml)	OD at 595 nm
0.000	0.000
0.200	0.286
0.400	0.430
0.600	0.672
0.800	0.846
1.000	1.163
2.000	1.200

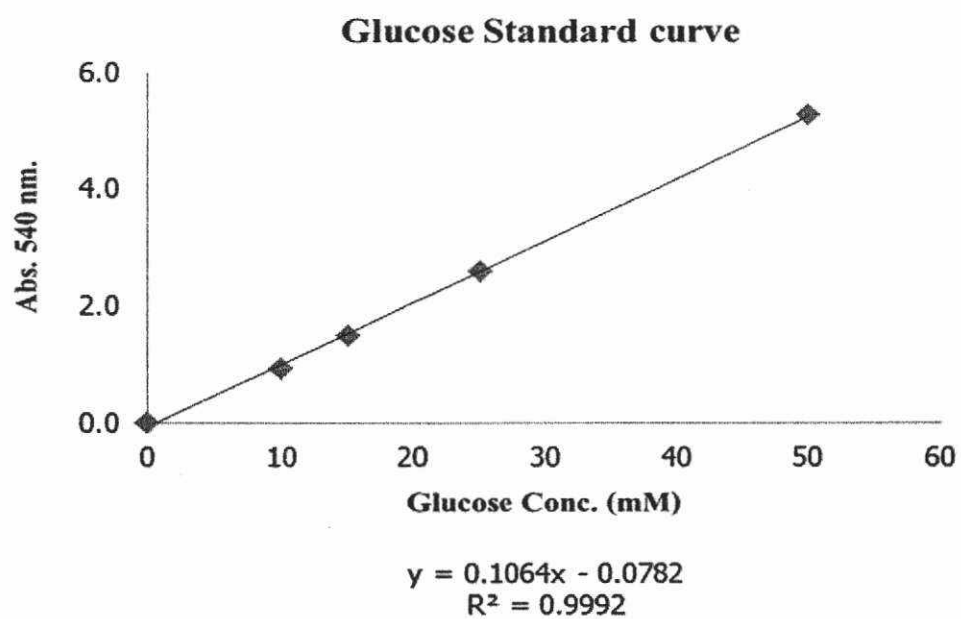


ภาพภาคผนวกที่ ข1 กราฟโปรตีนมาตรฐาน

2. น้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก ข2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm. ของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

Glucose concentration (mM)	OD at 540 nm
0	0.000
10	0.916
15	1.488
25	2.582
50	5.268
25	1.056

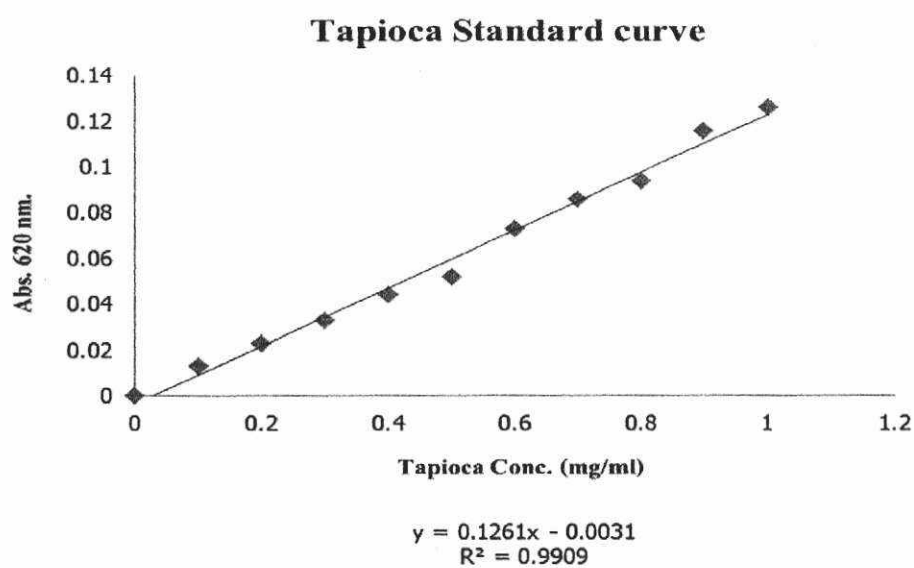


ภาพภาคผนวกที่ ข2 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

3. แป้งมันสำปะหลัง

ตารางภาคผนวกที่ ข3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm. ของแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆ

Tapioca (mg/ml)	OD at 620 nm.
0.1	0.013
0.2	0.023
0.3	0.033
0.4	0.044
0.5	0.052
0.6	0.073
0.7	0.086
0.8	0.093
0.9	0.116
1.0	0.126



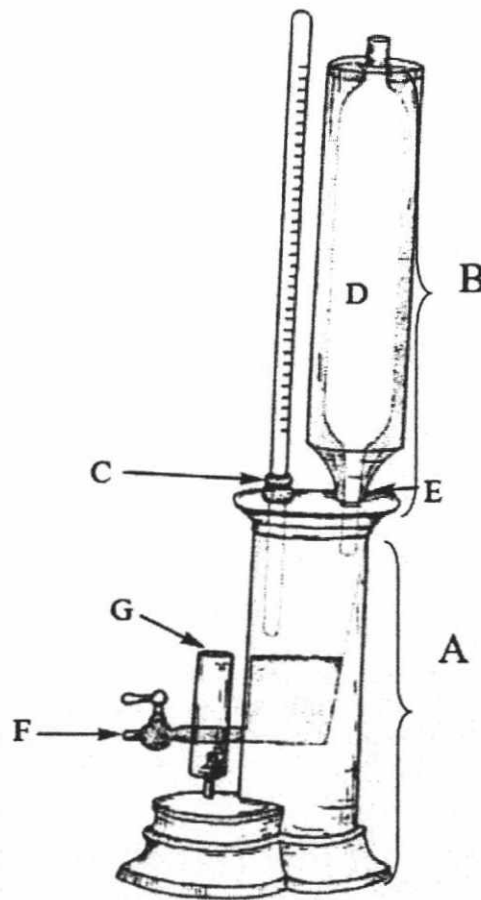
ภาพภาคผนวกที่ ข3 กราฟแป้งมันสำปะหลังมาตรฐาน

ภาคผนวก ค

เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)

1. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)

ตามวิธีของ Zoecklein *et al.* (1995) กล่าวว่า Ebulliometer เป็นเครื่องมือที่ใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยการหาจุดเดือดแล้วเปรียบเทียบกับแผนสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและ % แอลกอฮอล์ (Dujardin-Salleron scale) เครื่องมือประกอบด้วยโลหะทรงกระบอก 2 ส่วน คือ ส่วน A และ B ต่อกัน ทรงกระบอกส่วน A จะเป็นที่ยับบรรจุสารละลายที่ต้องการหาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยบรรจุสารละลายที่ต้องการวัดในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ ใส่น้ำสำหรับหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E ส่วน F เป็นที่ใช้สำหรับเปิดถ่ายสารละลายออก และท่อ G เป็นตำแหน่งสำหรับรวมเปลวไฟจากตะเกียง (ภาพผนวกที่ ค1)



ภาพผนวกที่ ค1 เครื่อง Ebulliometer (Dujardin-Salleron, France)

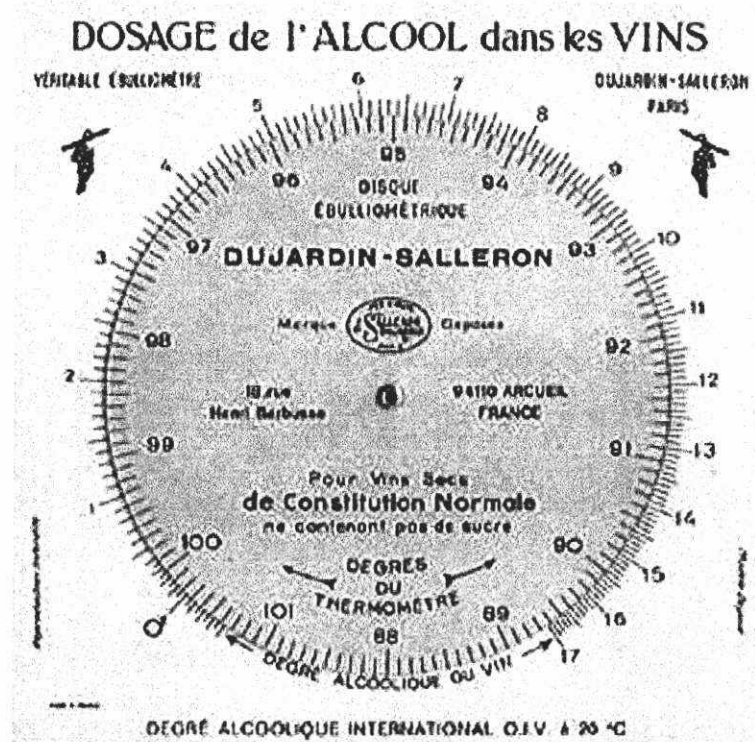
2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 การหาจุดเดือดของน้ำกลั่น

- เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 ml ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้
- เติมน้ำหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E
- จุดตะเกียงแล้ววางไว้ใต้ท่อ G
- เมื่อน้ำเดือดแล้วอ่านค่าอุณหภูมิที่คงที่ (คงที่ประมาณ 15-30 วินาที)
- นำค่าอุณหภูมิที่ได้ไปปรับสเกล โดยให้จุดศูนย์ของสเกลนอกตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำกลั่น

2.2 การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

เติมน้ำกลั่นตัวอย่างปริมาตร 50 ml ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ จากนั้นนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 การอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์ โดยอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์จากสเกลวงนอกที่ตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของสารละลายตัวอย่างที่ได้ หน่วยของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้คือ % (v/v)



ภาพผนวกที่ ค2 แผ่นสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและ %แอลกอฮอล์ ((Dujardin-Salleron scale)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวปริญันท์ ศิระประภาภัสส์
วัน/เดือน/ ปีเกิด	28 มกราคม 2530
ที่อยู่	1184/9 วัด ไร่เงิน26 จันทน์43 บางคอแหลม กทม.
ประวัติการศึกษา	2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ P. Siraprapapat, A. Jindaprasert and K. Jirajaroenrat. 2011. "Expression and Secretion of Heterologous Alpha-amylase in Yeast <i>Kluyveromyces lactis</i> ". In Proceeding of 4 th International FerVAAP Conference. February. 29-31 Khon Kaen. Thailand.
ทุนวิจัยที่ได้รับ	สนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)