การศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์บางประการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* DNP0507 ซึ่งแยกได้จากดินในจังหวัดระยอง ประเทศไทย

Study on some enzymatic characteristics of the α-amylase-producing bacteria, *Bacillus licheniformis* DNP0507, isolated from soil in Rayong Province, Thailand

รติมา กลิ่นฟุ้ง[1], สุนิสา บุญมา[2], อัยยะ จันทรศิริ[3]

บทคัดย่อ

การวิจัยศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดระยอง และเพื่อศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์บางประการของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่คัดเลือกได้ งานวิจัยนี้ทำการแยกแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลนปากแม่น้ำระยอง อำเภอเมือง จังหวัดระยอง ได้ทั้งสิ้นจำนวน 123 ไอโซเลท และพบว่าแบคทีเรียรหัสไอโซเลท DNP0507 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เมื่อทำการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียรหัสไอโซเลท DNP0507 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่าแบคทีเรียรหัสไอโซเลท DNP0507 คือ แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* DNP0507 เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้ถูกทำให้กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.310 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ดิบ และมีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เป็น 1.819 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีขนาด 58 กิโลดาลตัน โดยประมาณ การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องต่อไป

คำสำคัญ : เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส, แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*, ดินตะกอนป่าชายเลน, คุณสมบัติของเอนไซม์

[1] นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากระบวนการอุตสาหกรรมเคมีและสิ่งแวดล้อม (M-ICPE) คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

[2] อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

[3] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

Abstract

This research aimed to isolate and screen the α-amylase-producing bacteria collected from mangrove soil in Rayong Province and to study several enzymatic characteristics of the screened α-amylase producing bacteria. One hundred and twenty-three bacterial isolates were isolated from mangrove soil in the Rayong River Estuary, Mueang District, Rayong Province, Bacterium isolate DNP0507 was selected for α-amylase-producing bacteria. The DNP0507 was identified as *Bacillus licheniformis* DNP0507 on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis and phylogenetic tree data. The production of α-amylase was partially purified saturated ammonium sulphate with 30 to 80% of concentration were used for enzyme precipitation. The purified enzyme was increasing to 1.310 fold when compared to crude enzyme. The specific activity of the partially purified enzyme was 1.819 U/mg. SDS-PAGE revealed that the molecular weight of the produced enzyme was approximately 58 kDa. This research demonstrated the feasibility of using α-amylase in related industrial applications.

Keywords: α-Amylase, *Bacillus licheniformis*, Mangrove soil, Enzymatic characteristic

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิล ไฮโดรเลส (Glycosyl hydrolase) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) ชนิด α-1, 4 และชนิด α-1, 6 ในโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตกลุ่มแป้ง (Starch) และไกลโคเจน (Glycogen) ให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เช่น เดกซ์ทริน (Dextrin) น้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharides) และน้ำตาลมอนอแซคคาไรด์ (Monosaccharides) (Mohanan & Satyanarayana, 2018) เอนไซม์อะไมเลส แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเอนโด-อะไมเลส (Endo-amylase) และกลุ่มเอกโซ-อะไมเลส (Exo-amylase) ปัจจุบันเอนไซม์อะไมเลสถูกใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตหลายประเภท เช่น กลูโคส เอทานอล สารซักล้าง สิ่งทอ และกระดาษ (Wu et al., 2018) ส่งผลให้เอนไซม์อะไมเลสมีส่วนแบ่งทางการตลาดของอุตสาหกรรมเอนไซม์ถึงร้อยละ 25 ของตลาดโลก (Suriya et al., 2016)

เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α-Amylase, EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์อะไมเลสในกลุ่มเอนโด-อะไมเลส ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสลายพันธะไกลโคไซด์ชนิด α-1, 4 ที่อยู่ภายในโครงสร้าง (Inner glycosidic bond) ของแป้งให้เป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์หลายชนิดและน้ำตาลกลูโคส (Mohanan & Satyanarayana, 2018) จัดเป็นเอนไซม์ที่ความความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตและการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสผลิตได้จากจุลินทรีย์ทั้งกลุ่มแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. และกลุ่มเชื้อรา เช่น เชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp.

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (Gram-positive) ที่สร้างเอนโดสปอร์ (Endospore) และพบได้ทั่วไปในดิน แบคทีเรียสายพันธุ์ *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียที่มีการใช้ประโยชน์ในเชิงการค้า อุตสาหกรรม และเกษตรกรรมอย่างแพร่หลายมามากกว่าทศวรรษ เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เอนไซม์โปรติเอส (Protease) เอนไซม์เบต้า-แมนแนนเนส (β-Mannanase) เป็นต้น (Rey et al., 2004) จึงส่งผลให้มีการวิจัยพัฒนาเกี่ยวกับการแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย การ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย การศึกษาและปรับปรุงคุณลักษณะทางเอนไซม์ รวมถึงการประยุกต์ใช้เอนไซม์อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามการนำเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมยังคงประสบปัญหาบางประการ หนึ่งในปัญหาเหล่านั้น คือ การขาดสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงหรือมีคุณลักษณะที่อุตสาหกรรมต้องการ ดังนั้นการศึกษาวิจัยที่เน้นการเสาะหาสายพันธุ์ของแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติจึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่ไม่สามารถละเลยได้ บทบาทของแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. licheniformis* ในธรรมชาติ คือ การย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน ซึ่งทำให้เกิดวัฏจักรของสารอินทรีย์ในระบบนิเวศ ดินจึงเป็นแหล่งธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. licheniformis* ที่มีคุณลักษณะทางเอนไซม์ที่ดี งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าระบบนิเวศทางทะเลและชายฝั่งเป็นแหล่งธรรมชาติที่ดีในการแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย เนื่องจากระบบนิเวศทางทะเลและชายฝั่งเป็นระบบนิเวศที่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวภาพอยู่ตลอดเวลา ทำให้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่มักมีการผลิตเอนไซม์ที่มีคุณลักษณะเฉพาะและเหมาะสมต่ออุตสาหกรรม (Suriya et al., 2016) จากเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงดำเนินการแยก คัดเลือก และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดระยอง รวมถึงการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์บางประการของแบคทีเรียที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลให้แก่ภาคอุตสาหกรรมในการนำแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสายพันธุ์ท้องถิ่นไปประยุกต์ใช้ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดระยอง
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์บางประการของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส สายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* DNP0507 ที่แยกและคัดเลือกได้

สมมติฐานการวิจัย

แบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดระยองมีคุณลักษณะทางเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและความปลอดภัยทางชีวภาพ

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยมีคุณภาพอยู่ในระดับวิเคราะห์ (Analytical grade) และระดับจุลชีววิทยา (Microbiological grade) กระบวนการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียและอณูชีววิทยา (Molecular biology) ในทุกขั้นตอนควบคุมด้วยมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับ 2 (Biosafety level 2)

การเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากป่าชายเลนและการแยกแบคทีเรีย

ดินตะกอนที่นำมาใช้แยกแบคทีเรียดำเนินการเก็บมาจากป่าชายเลนพระเจดีย์กลางน้ำ ตำบลปากน้ำ อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง (พิกัด ละติจูด 12.6657056 องศาเหนือ ลองจิจูด 101.2499031 องศาตะวันออก) ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 จำนวน 30 ตัวอย่าง มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของดินตะกอนเฉลี่ย 6.26 และอุณหภูมิของจุดเก็บตัวอย่างเฉลี่ย 30.01 องศาเซลเซียส เก็บรักษาตัวอย่างดินตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและนำไปแยกแบคทีเรียทั้งหมดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การแยกแบคทีเรียทั้งหมดในดินตะกอนดำเนินการโดยเจือจางดินตะกอนน้ำหนัก 1 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแบบเป็นลำดับทีละสิบเท่า (Ten-fold serial dilution) จนถึงระดับความเจือจางของสารแขวนลอยดินตะกอนที่ 1 ต่อ

100,000 เท่า จากนั้นเกลี่ย (Spread) สารแขวนลอยดินตะกอนที่ทำการเจือจางในแต่ละความเจือจางลงบนผิวหน้าของจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar (HiMedia, India) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อโคโลนี (Colony) ของแบคทีเรียปรากฏขึ้นบนจานอาหารแข็ง จึงทำการแยกแบคทีเรีย (Bacterial isolation) ที่มีสัณฐานของโคโลนีแตกต่างกันออกเป็นไอโซเลท (Isolate)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทลงในหลอดอาหารเหลว Tryptone Soya Broth (HiMedia, India) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปขีด (Streak) ลงบนผิวหน้าของจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar เพื่อแยกแบคทีเรียให้เป็นไอโซเลทสายพันธุ์บริสุทธิ์ (Pure isolate) เมื่อได้ไอโซเลทของแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จึงทำการตั้งชื่อไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสใช้วิธีคัดเลือกด้วยจานอาหารแข็ง Starch Agar (HiMedia, India) ซึ่งมีแป้งชนิดละลายน้ำ (Soluble amylum) เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวในอาหารแข็ง การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสดัดแปลงจากงานวิจัยของรติมาและชนัญลญา (2560) โดยหยดสารแขวนลอยแบคทีเรีย (Bacterial suspension) แต่ละไอโซเลท อายุเชื้อ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของจานอาหารแข็ง Starch Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจะสามารถย่อยสลายแป้งชนิดละลายน้ำในจานอาหารแข็งให้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เมื่อทำการย้อมจานอาหารแข็งด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine) จะปรากฏวงใส (Hydrolytic zone) โดยรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสภายในระยะเวลา 1-2 นาที ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรีย เพื่อนำไปคำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Hydrolytic capacity, HC) จากอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสใช้วิธีทางอณูชีววิทยาโดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Ferbiyanto และคณะ (2015) วิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในงานวิจัย คือ การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ดำเนินการด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส Mastercycler Nexus gradient (Eppendorf, Germany) ไพรเมอร์ (Primer) ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ ไพรเมอร์ 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) และไพรเมอร์ 1492R (5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′) (Sigma-Aldrich, Singapore) สารเคมีในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ สารปฏิกิริยาสำเร็จรูป One PCR™ (Bio-Helix, Taiwan) เมื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA เสร็จสิ้นจึงทำการวัดปริมาณยีนที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเครื่องวัดสารปริมาณน้อย NanoDrop One (Thermo Scientific, USA) และวิเคราะห์ขนาดของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Cleaver Scientific, UK) บนแผ่นเจลอะกาโรส (1% TBE Agarose gel) (Omnipur, Germany) จากนั้นย้อมแผ่นเจลอะกาโรสด้วยสีย้อม Novel Juice DNA Staining Reagent (Bio-Helix, Taiwan) ในกรณีที่ยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนได้มีความเข้มข้นมากกว่า 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จึงส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

โดยใช้โปรแกรม BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อระบุสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสดำเนินการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Seaview 4.6.4 (Gouy et al., 2010) โดยใช้ Neighbor-Joining algorithm (NJ) และทำการ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

การทำให้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (แบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507) ลงในหลอดอาหารเหลว Tryptone Soya Broth ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในอาหารเหลว Starch Broth (HiMedia, India) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.3 โดยทำการปลูกเชื้อ (Inoculation) แบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507 ลงในอาหารเหลว Starch Broth ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจึงทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสดิบ (Crude enzyme) ที่ผลิตได้โดยการปั่นเหวี่ยงอาหารเหลว Starch Broth ที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifugation) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที นำเอนไซม์ดิบที่ผลิตได้ไปสกัดให้กึ่งบริสุทธิ์ (Partial purification) ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นอิ่มตัว (Saturation concentration) ร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Wu และคณะ (2018) จากนั้นแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากเอนไซม์ด้วยชุดเยื่อกรองสำเร็จรูป Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units ที่มีเยื่อกรองขนาด 30 กิโลดาลตัน (Merck, Germany) เก็บเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทั้งเอนไซม์ดิบและเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยแยกเอนไซม์บนแผ่นอะคริลาไมด์สำเร็จรูป Mini-PROTEAN® Precast Gels (Bio-Rad, USA) และย้อมสีด้วยวิธี Silver staining (Bollag *et al*., 1996)

ค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์

สารละลายปฏิกิริยา (Reaction mixture) และสภาวะที่ใช้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสดัดแปลงจากงานวิจัยของ Mishra และ Behera (2008) โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 (ควบคุมสภาวะความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีแป้งชนิดละลายน้ำความเข้มข้นร้อยละ 1.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นสารตั้งต้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยแป้งชนิดละลายน้ำวิเคราะห์โดยใช้วิธี DNS (Miller, 1959) การวัดปริมาณของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในหน่วยมิลลิกรัมเพื่อใช้คำนวณหาค่ากิจกรรมเฉพาะใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-rad, USA)

ค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์หาได้จากอัตราส่วนของค่ากิจกรรมทั้งหมด (Total activity) ของเอนไซม์ต่อปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิกรัม ค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสคำนวณได้จากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งชนิดละลายน้ำเป็นน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 1 ไมโครโมลในระยะเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนดต่อปริมาตรเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร

สรุปผลการวิจัย

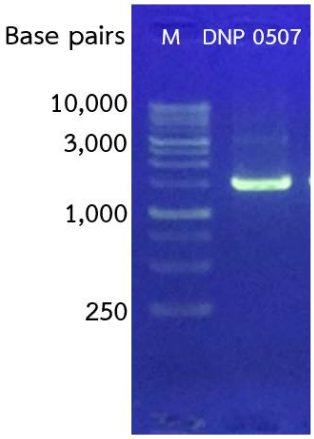
การแยกแบคทีเรียจากดินตะกอนตัวอย่างของป่าชายเลนพระเจดีย์กลางน้ำ จังหวัดระยอง ด้วยจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar พบแบคทีเรียที่มีสัณฐานของโคโลนีแตกต่างกัน ได้แก่ สีของโคโลนี รูปร่างโคโลนี ขอบโคโลนี การยกตัวของโคโลนี และขนาดโคโลนี จำนวน 123 ไอโซเลท เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสด้วยจานอาหารแข็ง Starch Agar จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จำนวน 25 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 20.33 จากไอโซเลททั้งหมด) ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 เป็นไอโซเลทที่มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยต่อ เนื่องจากแสดงค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (HC) ค่อนข้างสูง

แบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 มีลักษณะสัณฐานโคโลนี ได้แก่ โคโลนีสีขาวจนถึงสีครีม รูปร่างกลมขนาดเล็ก ขอบโคโลนีหยักมาก (Erose) โคโลนีนูนแบบกระดุม (Umbonate) และเจริญเติบโตได้ดีในจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar ดังแสดงในภาพที่ 1 แบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 มีค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายจานอาหารแข็ง Starch Agar เท่ากับ 2.25 ± 0.21 ดังแสดงในภาพที่ 2

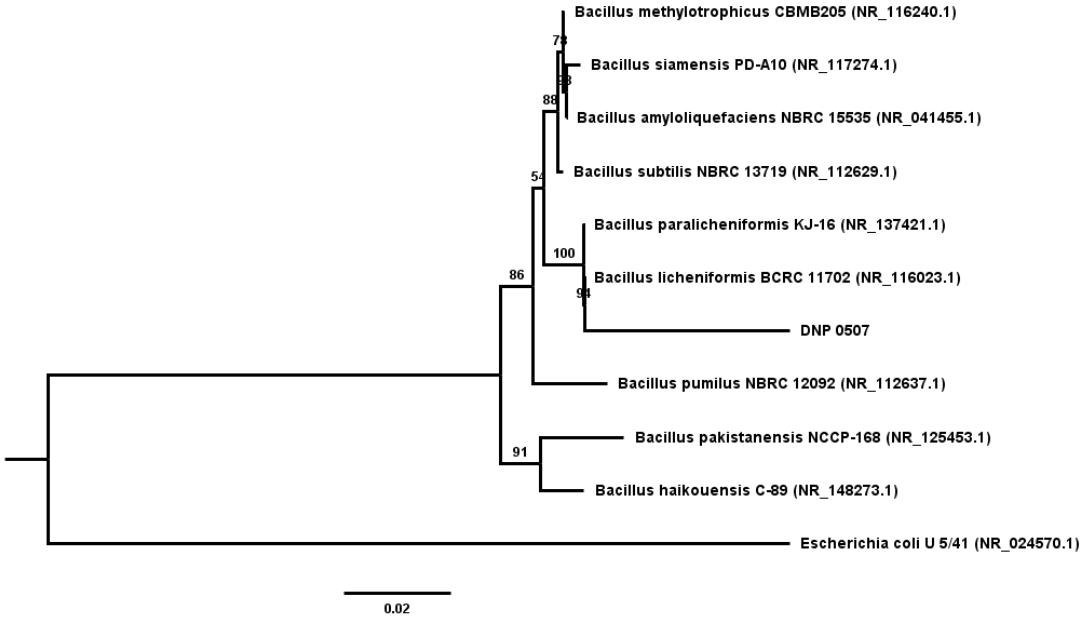
ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 บนจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar ที่อายุเชื้อ 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 2 การย่อยสลายแป้งชนิดละลายน้ำบนจานอาหารแข็ง Starch Agar โดยแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 หลังจากทำการย้อมจานอาหารแข็งด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 โดยวิธีทางอณูชีววิทยา ดำเนินการโดยการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับการศึกษาแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 พบว่ายีนมีขนาด 1,436 bp (Base pairs) แสดงในภาพที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* BCRC 11702 (Accession number : NR_116023.1) ที่ร้อยละ 96 การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 ด้วยโปรแกรม Seaview 4.6.4 โดยใช้ Neighbor-Joining algorithm และการ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง เป็นดังภาพที่ 4 ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ที่สนับสนุนผลการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกับฐานข้อมูล ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 คือ แบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507

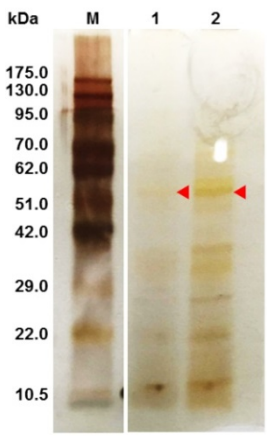


ภาพที่ 3 แผ่นเจลอะกาโรส (1% TBE Agarose gel) ย้อมด้วยสีย้อม Novel Juice DNA Staining Reagent
M คือ สารพันธุกรรมมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder RTU (Bio-Helix, Taiwan)
DNP0507 คือ ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส



ภาพที่ 4 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Seaview 4.6.4 โดยใช้ Neighbor-Joining algorithm และการ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 สามารถทำให้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสดิบที่ผลิตได้กลายเป็นเอนไซม์แบบกึ่งบริสุทธิ์ การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทั้งเอนไซม์ดิบและเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีด้วยวิธี Silver staining พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507 มีขนาด 58 กิโลดาลตันโดยประมาณ ดังภาพที่ 5 ส่วนความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสหลังจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.310 เท่าจากเอนไซม์ดิบ (ตารางที่ 1) เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เป็น 1.819 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 5 แผ่นอะคริลาไมด์สำเร็จรูป Mini-PROTEAN® Precast Gels ย้อมสีด้วยวิธี Silver staining M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pink Plus Prestained Protein Ladder (GeneDireX, Taiwan)

1 คือ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสดิบที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507

2 คือ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507

◀ แสดงเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507

ตารางที่ 1 ค่ากิจกรรมเฉพาะและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์	ปริมาณของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสทั้งหมด (มิลลิกรัม)	ค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสดิบ	25.785 ± 1.347	1.388 ± 0.233	1.000
เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสหลังจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว	3.513 ± 0.113	1.819 ± 0.349	1.310

อภิปรายผล

1. แบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนของป่าชายเลนพระเจดีย์กลางน้ำ จังหวัดระยองด้วยจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar และมีความสามารถในการย่อยสลายแป้งชนิดละลายน้ำในจานอาหารแข็ง Starch Agar ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เมื่อทำการระบุสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท DNP0507 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *B. licheniformis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าพบทั่วไปในดินและสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรีย *B. licheniformis* มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA และยีน 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) กับแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* (Rey et al., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ (ภาพที่ 4)

2. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507 ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีด้วยวิธี Silver staining พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 58 กิโลดาลตันโดยประมาณ ซึ่งสอดคล้องกับกับงานวิจัยของ Wu และคณะ (2018) รวมถึงงานวิจัยของ Hmidet และคณะ (2008) ที่พบว่าเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* B4-423 และแบคทีเรีย *B. licheniformis* NH1 ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 58 กิโลดาลตันโดยประมาณเช่นกัน

3. การทำให้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิเพิ่มขึ้นเป็น 1.310 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ดิบ และมีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์เป็น 1.819 ± 0.349 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Raul และคณะ (2014) ซึ่งทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MTCC 121 ให้กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 70 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิเพิ่มขึ้น 3 เท่า และมีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เป็น 7.72 ยูนิตต่อมิลลิกรัม งานวิจัยของ Wu และคณะ (2018) รายงานการทำเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรีย *B. licheniformis* B4-423 ให้กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 พบว่าเอนไซม์

มีความบริสุทธิเพิ่มขึ้น 1.61 เท่า และมีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เป็น 559.47 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จะเห็นได้ว่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสหลังจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้ในงานวิจัยนี้ มีความใกล้เคียงกับความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้จากงานวิจัยของ Wu และคณะ (2018) เนื่องมาจากเป็นเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันและใช้กรรมวิธีในการทำให้เอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ในสภาวะเดียวกัน อย่างไรก็ตามเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. licheniformis* DNP0507 ในการวิจัยนี้ยังมีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ที่ยังต่ำกว่างานวิจัยที่ผ่านมา อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสดัดแปลงจากงานวิจัยของ Mishra และ Behera (2008) ยังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลสำคัญแก่ภาคอุตสาหกรรมในการนำแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสายพันธุ์ท้องถิ่นไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเบื้องต้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยต่อยอดในเชิงลึก เช่น การทำให้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น การศึกษาค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ในสภาวะที่เหมาะสม เป็นต้น รวมถึงการศึกษาวิจัยเชิงประยุกต์เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคอุตสาหกรรม เช่น การเพิ่มอัตราการผลิตเอนไซม์ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

รติมา กลิ่นฟุ้งและชนัญลญา ธรรมเกษร. (2560). **การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากดินป่าชายเลนและการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เบื้องต้น**. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชากระบวนการอุตสาหกรรมเคมีและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, J.E. (1996). **Protein Methods.** USA: Wiley-Liss Publisher.

Ferbiyanto, A., Rusmana, I., Raffiudin, R. (2015). Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut of worker *Macrotermes gilvus*. **HAYATI Journal of Biosciences.** 22: 197-200.

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution.** 27(2): 221-224.

Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, F.G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M. (2008). Purification and biochemical characterization of a novel a-amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 Cloning, nucleotide sequence and expression of *amyN* gene in *Escherichia coli*. **Process Biochemistry.** 43: 499–510.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry.** 31(4): 426-428.

Mishra, S. and Behera, N. (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. **African Journal of Biotechnology.** 7(18): 3326-3331.

Mohanan, N. and Satyanarayana, T. (2018). **Reference Module in Life Sciences**. Netherlands: Elsevier.

Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Das, S.K., Gupta, S., (2014). Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation. **Biochemistry Research International.** 2014: Article ID 568141. http://dx.doi.org/10.1155/2014/568141.

Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D.B., Zaretsky, E.J., Tang, M., Leon, A.L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. **Genome Biology**. 5: R77. http://genomebiology.com/2004/5/10/R77.

Suriya, J., Bharathiraja, S., Krishnan, M., Manivasagan, P., Kim, S.K. (2016). Marine microbial amylases: Properties and applications. **Advances in Food and Nutrition Research.** 79: 161-177.

Wu, X., Wang, Y., Tong, B., Chen, X., Chen, J. (2018). Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. **International Journal of Biological Macromolecules.** 109: 329-337.