



## รายงานการวิจัย

การหมักแอลกอฮอล์โดยตรงจากแป้งมันสำปะหลังด้วยยีสต์ที่ผ่านการ  
ดัดแปลงพันธุกรรม

The direct alcohol fermentation from cassava starch using  
genetic modified yeast



ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(ผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของคณะผู้วิจัยแต่ผู้เดียว)



## รายงานการวิจัย

การหมักแอลกอฮอล์โดยตรงจากแป้งมันสำปะหลังด้วยยีสต์ที่ผ่านการ  
ดัดแปลงพันธุกรรม

The direct alcohol fermentation from cassava starch using  
genetic modified yeast

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร. พงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา : อาจารย์

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาว รัตติกาล ทองสำฤทธิ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2558

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2554 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิทยาศาสตร์และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่อำนวยความสะดวกสำหรับการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวรัตติกาล ทองสำฤทธิ์ (ผู้ช่วยวิจัย) และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เจ้าหน้าที่สาขาชีววิทยา สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณบิดา มารดา และครูบาอาจารย์ ผู้ประสิทธิ์วิชาความรู้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนขอบคุณบุคคลในครอบครัว ภรรยา ที่เป็นแรงบันดาลใจ และกำลังใจที่อบอุ่น

ดร.พงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา

30 ตุลาคม พ.ศ. 2558

## บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบันนี้เอทานอลได้กลายเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่สำคัญ เนื่องจากการลดลงอย่างต่อเนื่องของเชื้อเพลิงจำพวกฟอสซิลที่มีอย่างจำกัด เอทานอลที่ผลิตด้วยกระบวนการหมักเรียกกันโดยทั่วไปว่าไบโอเอทานอล หรือเอทานอลชีวภาพ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีการแก้ปัญหาบางส่วนสำหรับวิกฤตพลังงานทั่วโลก ประเทศไทยถือว่าเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังที่ใหญ่ที่สุดเป็นอันดับสามของโลก ซึ่งมีมันสำปะหลังเป็นพืชที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงและเป็นสารตั้งต้นที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลในราคาต่ำลงได้ กระบวนการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปประกอบด้วยสองขั้นตอนหลักคือการย่อยสลายแป้งและการหมัก แต่เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สำคัญ เช่น เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่มีการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายแป้ง (amylolytic enzyme) จึงไม่สามารถใช้แป้งโดยตรงสำหรับการเจริญเติบโตและการหมักได้ ดังนั้นกระบวนการหมักจึงต้องใช้พลังงานและเอนไซม์ย่อยสลายแป้งจำนวนมากเพื่อเปลี่ยนแป้งไปเป็นเจล จากนั้นทำให้เป็นของเหลวแล้วเปลี่ยนเป็นเดกซ์ทรินก่อนการหมักของแป้งดิบเพื่อผลิตเอทานอล

ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้ได้มีการแนะนำการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยสลายแป้ง (amylolytic enzyme) ซึ่งอาจจะสามารถย่อยสลายแป้งและเข้าสู่ขั้นตอนการหมักได้ในขั้นตอนเดียว ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์นี้จะสามารถลดต้นทุนและค่าใช้จ่ายด้านพลังงานให้กับโรงงานผลิตเอทานอลในปัจจุบันได้ และทำให้สามารถผลิตเอทานอลเชิงการค้าได้มากขึ้น ในโครงการนี้ การเปลี่ยนแปลงแป้งมันสำปะหลังโดยกระบวนการทางชีวภาพให้เป็นน้ำตาลเพื่อการหมักทดสอบโดยการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์ใหม่ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 (ผลิตกลูโคอะไมเลส) และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 (ผลิตแอลฟาอะไมเลส) ซึ่ง ยีน *GAM1* และยีน *SWA2* แต่ละยีนถูกตัดต่อเข้าพลาสมิดสำหรับแสดงออกภายใต้การควบคุมการทำงานของ GAP โปรโมเตอร์เพื่อสร้างพลาสมิด pGAM1 และ pSWA2 ตามลำดับ โดยพลาสมิด pGAM1 และ pSWA2 นี้ถูกถ่ายเข้าสู่โครโมโซมยีสต์ ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่รับเอาพลาสมิด pGAM1 หรือ pSWA2 เข้าไปนั้น จากการตรวจพบกิจกรรมของการแสดงออกของเอนไซม์ย่อยสลายแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ยีสต์ที่ถูกดัดแปลงนี้มีการแสดงออกของยีน *SWA2* และ *GAM1* ที่สามารถผลิตและหลั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ทำงานได้ ตามลำดับ ในชุดการหมักของการศึกษานี้ได้ใช้แป้งมันสำปะหลัง

ค

เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ความสามารถของ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 และการเลี้ยงร่วมกันของทั้งสองสายพันธุ์คือ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 และ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเพื่อการผลิตเอทานอล พบว่าแต่ละสายพันธุ์ในชุดการหมักนี้สามารถที่จะย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังภายใต้เงื่อนไขการหมักเอทานอลได้ และพบว่าผลผลิตของเอทานอลสูงสุดที่ได้รับเท่ากับ  $0.489 \pm 0.010$   $0.465 \pm 0.012$  และ  $0.516 \pm 0.021$  กรัม เอทานอล ต่อ กรัมของสารตั้งต้นที่ใช้ ที่ 12 วัน ตามลำดับ และได้ปริมาณเอทานอลมากที่สุดเท่ากับ  $1.992 \pm 0.248$   $1.478 \pm 0.267$  และ  $2.977 \pm 0.020$  กรัมต่อลิตรที่ 25 วัน ตามลำดับ โดยที่การเลี้ยงร่วมกันของทั้งสองสายพันธุ์คือ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 กับ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 ได้ผลผลิตเอทานอลที่สูงและอัตราการผลิตมากกว่าการเลี้ยงเพียงสายพันธุ์เดียว ดังนั้นยีสต์ลูกผสมสามารถเปลี่ยนแป้งเป็นเอทานอลด้วยกระบวนการตัดต่อพันธุกรรมได้สำเร็จ ยีนที่ถูกถ่ายโอนครั้งนี้สามารถแสดงออกในสายพันธุ์เจ้าบ้านได้ ซึ่งถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตเอทานอลในอนาคตต่อไป

## Abstract

Recently, ethanol has become an alternative energy because of the continuous reduction of limited fossil fuel stock. Ethanol produced by a fermentation process, generally referred as bioethanol, is considered to be a partial solution to the worldwide energy crisis. Thailand is the world's third largest producer for cassava. Cassava is an efficient carbohydrate crop and cheap substrate for conversion to ethanol. Traditionally, industrial bioethanol fermentation involves two major steps: cassava starch hydrolysis and fermentation. *Saccharomyces cerevisiae*, lacks amylolytic activity and is unable to directly utilize starch for growth and fermentation. It requires intensive amount energy and starch hydrolysis enzyme to gelatinize, liquefy and dextrinize the raw starch before fermentation to produce ethanol.

It has been suggested that genetically engineered yeast which expresses amylolytic enzymes could potentially simultaneous starch hydrolysis and fermentation. This improvement could greatly reduce the capital and energy cost in current bioethanol producing plants and make bioethanol production more economic.

In this project, bioconversion of cassava starch to fermentation sugar was investigated using two genetically modified *S. cerevisiae* strains, *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 (expressing glucoamylase) and *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 (expressing  $\alpha$ -amylase). Each of *GAM1* gene and *SWA2* gene was cloned downstream of a constitutive promoter, GAP, to obtain yeast expression plasmid named pGAM1 and pSWA2,

respectively. These plasmids were introduced into the *S. cerevisiae* chromosome. Each of the pGAM1 and pSWA2 harboring yeast showed detectable amylolytic activity in the culture supernatant. This indicated that the pGAM1 and pSWA2 harboring yeast secreted biologically active glucoamylase and  $\alpha$ -amylase, respectively. In batch fermentation, the ability of *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 and *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 and the co-cultured of *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 and *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 on cassava starch utilization and ethanol production were evaluated. The maximum ethanol yield was obtained at the level of  $0.489 \pm 0.010$ ,  $0.465 \pm 0.012$  and  $0.516 \pm 0.021$  g ethanol/g substrate consumed at 12 days, respectively. The maximum ethanol concentration was obtained at the level of  $1.992 \pm 0.248$ ,  $1.478 \pm 0.267$  and  $2.977 \pm 0.020$  g/l at 25 days, respectively. The co-cultured of *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 and *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 produced ethanol with higher liters and yields than those of single culture. The recombinant yeast that can convert starch to ethanol was successfully engineered. The transgene was expressed in host strain. This is the promising start for future ethanol producing yeast development.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ง
สารบัญเรื่อง .....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	ท
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.3 สมมุติฐานการวิจัย .....	2
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดในการศึกษา .....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 พลังงานทดแทนจากเอทานอล.....	4
2.2 แป้ง .....	5
2.2.1 แป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย .....	7
2.3 กระบวนการหมักแป้งในอุตสาหกรรม .....	10
2.4 เอนไซม์ย่อยแป้ง .....	11



## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
2.4.1 $\alpha$ -amylase.....	11
2.4.2 Glucoamylase .....	12
2.5 จุลินทรีย์สำหรับการผลิตเอทานอล .....	13
2.5.1 ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
2.6 การดัดแปลงพันธุกรรมยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> เพื่อผลิตเอทานอล.....	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 สารเคมี .....	18
3.1.1 สารเคมี.....	18
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมี .....	18
3.1.3 เอนไซม์.....	19
3.2 จุลินทรีย์ พลาสมิด และอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	19
3.2.1 แบคทีเรีย ยีสต์ และพลาสมิด .....	19
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย .....	21
3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์.....	21
3.3 การสร้างพลาสมิดลูกผสม .....	22
3.3.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์.....	22
3.3.2 การสกัดแยกจีโนมโดยใช้ชุดสกัดจีโนม NucleoSpin Extract II Kit .....	23

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

3.3.3 การคัดลอกและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน <i>GAM1</i> จาก <i>D. occidentalis</i> โดยวิธี PCR.....	24
3.3.4 การคัดลอกและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน <i>SWA2</i> จาก <i>D. occidentalis</i> โดยวิธี PCR.....	25
3.3.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีแอลคาไลน์ไลซิส.....	26
3.3.6 วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ DNA.....	27
3.3.7 การตัดพลาสมิด DNA และ ชิ้น DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	27
3.3.8 การทำให้ชิ้น DNA บริสุทธิ์ ด้วยวิธี silica matrix .....	28
3.3.9 การดีฟอสโฟรีเลชันของ พลาสมิด DNA ที่เป็นเส้นตรงด้วย thermo-sensitive alkaline phosphatase (FastAP™).....	29
3.3.10 การเชื่อมต่อชิ้นยีนกับพลาสมิด DNA .....	29
3.4 การนำ DNA เข้าไปสู่เซลล์เจ้าบ้านและการคัดเลือกโคลน .....	30
3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell).....	30
3.4.2 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรียด้วยวิธี heat shock .....	31
3.4.3 การคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีน <i>SWA2</i> และยีน <i>GAM1</i> ด้วยวิธี simplified rapid size screening .....	31
3.4.4 ตรวจสอบและคัดเลือกโคลน.....	32

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

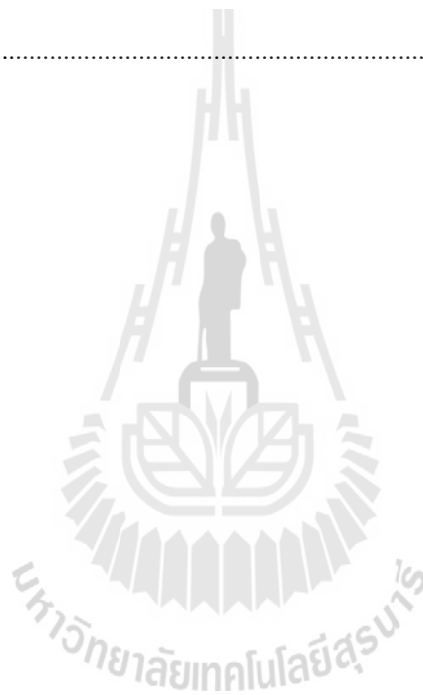
	หน้า
3.5 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์และการคัดเลือกโคลน .....	33
3.5.1 การเตรียมคอมพรีเทนต์ยีสต์ .....	33
3.5.2 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Electroporation.....	34
3.5.3 การประเมินหาความเข้มข้นของ zeocin <sup>TM</sup> ที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกยีสต์ ลูกผสม.....	34
3.6 การตรวจสอบการทำงานได้ของ $\alpha$ -amylase และ glucoamylase.....	35
3.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน SWA2 และ GAM1 ในยีสต์ลูกผสม.....	35
3.6.2 การยืนยันการแทรกของยีน SWA2 หรือ GAM1 ในโครโมโซมของยีสต์ ด้วยวิธี PCR.....	35
3.6.3 การตรวจสอบกิจกรรมของ glucoamylase และ $\alpha$ -amylase ในอาหารเหลว48	
3.6.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บอาหารเหลวสำหรับใช้ทดสอบกิจกรรมของ glucoamylase และ $\alpha$ -amylase .....	35
3.6.3.2 การหากิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase.....	36
3.6.3.3 การหากิจกรรมของเอนไซม์ $\alpha$ -amylase.....	36
3.7 การหมักเอทานอลและการวิเคราะห์ .....	37
3.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการหมัก .....	37
3.7.2 สภาวะที่ใช้ในการหมักเอทานอล.....	38

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
3.7.3 การหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight).....	38
3.7.4 การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของแป้งที่เหลือ .....	39
3.7.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล.....	39
3.8 สถานที่ทำการทดลอง .....	40
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	
4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกของยีน <i>GAM1</i> .....	41
4.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกของยีน <i>SWA 2</i> .....	46
4.3 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่จีโนมของยีสต์.....	50
4.4 ตรวจสอบและคัดเลือกยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน <i>GAM1</i> หรือ <i>SWA2</i> .....	50
4.5 ตรวจสอบการแทรกของยีน <i>GAM1</i> หรือ <i>SWA2</i> ในจีโนมของยีสต์ลูกผสมแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธี PCR.....	53
4.6 การหาปริมาณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase และ $\alpha$ -amylase ของยีสต์ลูกผสมด้วยวิธี DNS และวิธี Iodine.....	56
4.7 ทดสอบความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลของยีสต์ลูกผสม..	58
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย .....	65
เอกสารอ้างอิง .....	69

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก .....	81
ภาคผนวก A ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการทดลอง .....	81
ภาคผนวก B กราฟมาตรฐาน.....	83
ภาคผนวก C การ alignments ลำดับเบสของ DNA.....	85
ประวัตินักวิจัย.....	88



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ปริมาณแป้งในพืช.....	7
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> สายพันธุ์ลูกผสมที่หมักเอทานอลจากแป้งได้โดยตรง. ....	16
3.1 รายการสารเคมีที่ใช้และผู้แทนจำหน่าย.....	18
3.2 รายการเอนไซม์.....	19
3.3 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับทำ PCR.....	22
3.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน <i>GAM1</i> ด้วยคู่ไพรเมอร์ <i>GAM1_2F</i> และ <i>GAM1_2R</i> .....	25
3.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน <i>SWA2</i> ด้วยไพรเมอร์ <i>SWA2_F</i> และ <i>SWA2_R</i> .....	25
3.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบทิศทางของยีน <i>GAM1</i> และ <i>SWA2</i> ด้วยวิธี PCR.....	33
4.1 การตรวจสอบปริมาณหน่วยกิจกรรม glucoamylase ด้วยวิธี DNS และหน่วยกิจกรรม ของ $\alpha$ -amylase ด้วยวิธี iodine.....	56
4.2 การวิเคราะห์ผลผลิตผลของเอทานอลของน้ำหมักของยีสต์ลูกผสมที่หมักร่วมกันของ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> TISTR 5596/p <i>GAM1</i> และ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596/p <i>SWA2</i> หรือ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> TISTR 5596/p <i>GAM1</i> หรือ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596/p <i>SWA2</i> นาน 12 วัน.....	64
4.3 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลด้วยแป้งมันสำปะหลังของยีสต์ลูกผสมโดยใช้แป้งมัน สำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหาร .....	65

## สารบัญภาพ

สารบัญภาพ	หน้า
2.1 การใช้เอนไซม์ของโกลก.....	5
2.2 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน .....	6
2.3 ต้นมันสำปะหลังและหัวมันสำปะหลัง .....	9
2.4 กระบวนการตัดย่อยของแป้งด้วย amylase .....	11
2.5 กระบวนการเมทาบอไลซึมของกลูโคสของยีสต์ในสภาวะการใช้ออกซิเจนและ สภาวะไร้ออกซิเจน.....	14
3.1 โครงสร้างและส่วนประกอบภายในของพลาสมิด pGAPZ $\alpha$ A.....	20
4.1 ขั้นตอนการสร้างพลาสมิดลูกผสม pGAM1.....	43
4.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI เพื่อตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pGAM1 .....	43
4.3 การตรวจสอบทิศทางการแทรกของยีน GAM1 ในพลาสมิด pGAM1 ด้วยวิธี PCR.....	45
4.4 ขั้นตอนการสร้างพลาสมิดลูกผสม pSWA2.....	47
4.5 การย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI เพื่อตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pSWA2.....	48
4.6 การตรวจสอบทิศทางการแทรกของยีน SWA2 เข้าไปในพลาสมิด pGAPZ $\alpha$ ด้วยวิธี PCR.....	49
4.7 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ลูกผสมที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ glucoamylase หรือ $\alpha$ - amylase บนจานอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ.....	52

## สารบัญภาพ (ต่อ)

สารบัญภาพ	หน้า
4.8 การตรวจสอบการแทรกของยีน <i>GAM1</i> หรือ <i>SWA2</i> ในจีโนมของ <i>S. cerevisiae</i> ด้วยวิธี PCR.....	55
4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการสร้างเอทานอลและการลดลงของแป้งเป็นผลจากการย่อยแป้ง ของเชื้อต่างๆที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ glucoamylase และ $\alpha$ -amylase.....	59
4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ผ่านการดัดแปลง พันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ glucoamylase และ $\alpha$ -amylase.....	60
4.11 การเปรียบเทียบผลผลิตของเอทานอลของยีสต์ลูกผสมทั้งสามการทดลอง.....	63



คำอธิบายสัญลักษณ์

Amp	=	Ampicillin
<b><math>\alpha</math></b>	=	Alpha
Arg	=	Arginine
ARS	=	Autonomously replicating sequence
Asp	=	Asparagine
CaCl <sub>2</sub>	=	Calcium chloride
CEN	=	Centromere
cm	=	Centimeter
CO <sub>2</sub>	=	Carbon dioxide
CYC1	=	Cytochrome c-1
°C	=	Degree Celsius
Da	=	Dalton
DNS	=	3, 5-Dinitrosalicylic Acid
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylene diaminetetraacetic acid
et al.	=	Et alia (and others)
GAM1	=	Glucoamylase
GAP	=	Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
GRAS	=	Generally Recognized As Safe
g/l	=	Gram per liter

## คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

g	=	Gram
HBsAg	=	Hepatitis B surface antigen
HCl	=	Hydrogen chloride
HIS3	=	Himidazoleglycerol-phosphate dehydratase
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
hr	=	Hours
I <sub>2</sub>	=	Iodine
Kb	=	Kilobase pair
KCl	=	Potassium chloride
KEX2	=	Kexin-like proteinases
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	=	Potassium Dihydrogen Phosphate
KI	=	Potassium iodide
kv	=	Kilovolte
LB	=	Luria-Bertani
LBZ	=	Luria-Bertani Zeocin™
Lys	=	Lyscine
MCS	=	Multiple Cloning Site
MF $\alpha$	=	Mating factor $\alpha$
mg	=	Milligram
MgCl <sub>2</sub>	=	Magnesium chloride

## คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

min	=	Minute
ml	=	Milliliter
MSG	=	Monosodium glutamate
MTBE	=	Methyl tertiary-butyl ether
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAD <sup>+</sup>	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	=	Disodium Hydrogen Phosphate
NaOAC	=	Sodium acetate
NaOH	=	Sodium hydroxide
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	=	Ammonium Sulphat
NaI	=	Sodium iodide
ng	=	Nano gram
nm	=	Nanometer
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pmol	=	Picomoles
Psi	=	Pounds per square inch
%	=	Percentage
RNase A	=	Ribonuclease A

คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

rpm	=	Revolutions per minute
SWA2	=	$\alpha$ -Amylase
Sec	=	Second
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
TISTR	=	Thailand Institute of Scientific and Technological Research
UV	=	Ultraviolet
U/ml	=	Unit per milliliter
V	=	Volt
w/v	=	Weight by volume
YEp	=	Yeast episomal plasmid
YIp	=	Yeast integration plasmids
YPD	=	Yeast Peptone Dextrose
$\mu$	=	Micron
$\mu$ l	=	Micro liter
$\mu$ M	=	Micromolar

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การผลิตและการใช้เอทานอลทั่วโลกมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสาเหตุมาจากราคาน้ำมันในตลาดโลกที่เพิ่มขึ้นและนอกจากนี้ยังมีความกังวลต่อสถานการณ์ของภาวะโลกร้อนอีกด้วย (Chandel et al., 2007) พืชหลักที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลคือ อ้อยและ พืชที่มีการเก็บสะสมแป้ง ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังเป็นอันดับสามของโลก ซึ่งมันสำปะหลังมีปริมาณแป้งสูงและต้นทุนในการเพาะปลูกต่ำ (Office of Agricultural Economics, 2008) จึงได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล ดังนั้นในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังจะต้องเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ สองชนิดคือ glucoamylase (EC 3.2.1.3) และ  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) แต่ในกระบวนการย่อยแป้งในปัจจุบันโดยทั่วไปพบว่าต้องใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดในปริมาณที่สูงและยังต้องใช้ความร้อนในการต้มแป้งให้เป็นเจลก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ (Eksteen et al., 2003) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้พบว่ามีความใช้ค่าใช้จ่ายสูงทั้งปริมาณเอนไซม์ที่ใช้และพลังงานความร้อนที่ใช้สำหรับการย่อยแป้ง (De-mot et al., 1985)

*Saccharomyces cerevisiae* คือยีสต์สายพันธุ์ที่ได้รับการยอมรับว่าสามารถผลิตเอทานอลจากกลูโคสได้ดี แต่ไม่สามารถผลิตเอทานอลจากแป้งได้โดยตรง เพราะไม่พบการผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยแป้ง ดังนั้นได้มีนักวิจัยหลายคนที่ได้พยายามแก้ไขปัญหานี้ด้วยการประยุกต์ใช้กระบวนการดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ ให้สามารถย่อยแป้งและใช้แป้งในการผลิตเอทานอลได้โดยตรง (Ashikari et al., 1989; Cole et al., 1988; Inlow et al., 1988; Nakamura et al., 1997) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยใดๆ ที่ดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ดังกล่าวนี้เพื่อนำไปใช้ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นเอทานอลได้โดยตรง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังซึ่งมีการเพาะปลูกอยู่มากมายและลดขั้นตอนในการหมักเอทานอล จึงได้ดำเนินการดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ *S. cerevisiae* ให้มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลได้โดยตรง โดยดำเนินการสร้างพลาสมิดลูกผสมและ พัฒนายีสต์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์ glucoamylase (GAM1) และสายพันธุ์ที่ผลิต  $\alpha$ -amylase (SWA2) เพื่อหมักแป้งมันสำปะหลังให้เป็นเอทานอลได้ เพื่อให้งานวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ ได้มีการสร้าง พลาสมิดลูกผสมที่ยีน glucoamylase หรือยีน  $\alpha$ -

amylase แทรกอยู่ภายใต้การควบคุมของ GAP promoter จากนั้นพลาสมิดลูกผสมได้ถูกถ่ายโอนเข้าไปในจีโนมของยีสต์สายพันธุ์ธรรมชาติ จากนั้นยีสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนจะถูกนำไปทดสอบการเจริญเติบโตและการใช้แป้งมันสำปะหลัง พร้อมทั้งนำไปศึกษาการผลิตเอทานอลโดยตรงในระบบการหมักแบบ batch

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 สกัด แยก ยีน glucoamylase (*GAM1*) และ  $\alpha$ -amylase (*SWA2*) จากยีสต์ *Debaryomyces occidentalis*

1.2.2 สร้าง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มียีน glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase แทรกอยู่ในโครโมโซม

1.2.3 ทดสอบความสามารถและการทำงานของยีน *GAM1* หรือ *SWA2* ใน *S. cerevisiae* ที่ผ่านการตัดแปลงพันธุกรรมโดยใช้ แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียวในกระบวนการหมักเอทานอลแบบ batch

## 1.3 สมมุติฐานการวิจัย

ยีสต์ที่ผ่านการตัดแปลงพันธุกรรมด้วยยีน glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังและเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้โดยตรง

## 1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดในการศึกษา

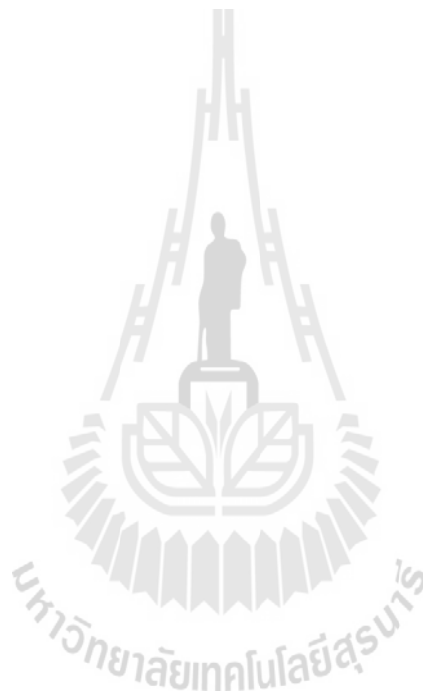
ยีน glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase ถูกสกัดแยกจากยีสต์ *D. occidentalis* และ สร้างยีสต์ที่ผ่านการตัดแปลงพันธุกรรมสองสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase โดยแต่ละยีนถูกแทรกเข้าไปในโครโมโซมของยีสต์โดยวิธี homologous recombination โดยยีสต์ที่ผ่านการตัดแปลงพันธุกรรมถูกทดสอบความสามารถของการสร้าง glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียวเพื่อการเจริญเติบโตและการหมักเอทานอลในขวดเลี้ยง

## 1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถสกัดแยกยีน Glucoamylase (*GAM1*) หรือ  $\alpha$ -amylase (*SWA2*) จากยีสต์ *D. occidentalis* ได้

1.5.2 ได้ยีสต์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมโดยการแทรกยีน glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase เข้าไปในโครโมโซมของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ธรรมชาติ

1.5.3 *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมสามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์ glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase เพื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ และยีสต์สายพันธุ์ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้จะสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลได้ในขั้นตอนเดียว



## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

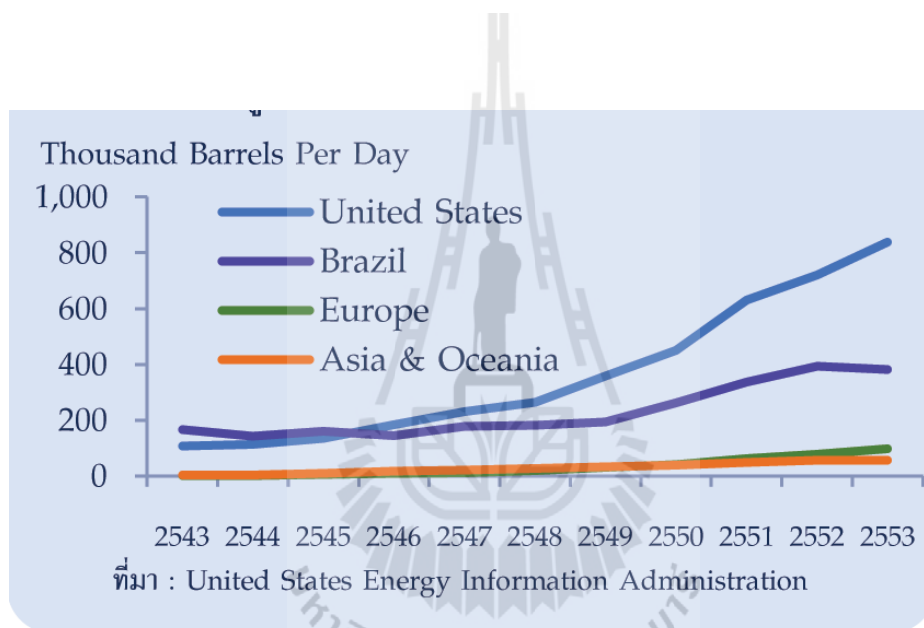
#### 2.1 พลังงานทดแทนจากเอทานอล

ปัจจุบัน ทั่วโลกมีการขยายตัวทางด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และการคมนาคมขนส่งมากขึ้น ทำให้ความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงมีมากขึ้นตามไปด้วย ส่งผลให้ราคาของน้ำมันเชื้อเพลิงสูงขึ้น จนทำให้เกิดภาวะวิกฤตการณ์น้ำมันเชื้อเพลิง ดังนั้นหลายประเทศจึงมีการวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาและการใช้ พลังงานอื่นๆ มาทดแทน เพื่อลดการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Lang et al., 2001; Bothast et al., 2005) ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่ทำให้ ความสำคัญกับพลังงานทดแทน โดยเฉพาะพลังงานจากเอทานอล เพราะพลังงานเอทานอลจัดได้ว่าเป็น พลังงานสะอาดที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงจากซากฟอสซิลได้เป็นอย่างดี ส่งผลดีต่อ เศรษฐกิจภายในประเทศ และยังช่วยลดปัญหามลพิษด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่ ไร้สารมลพิษ เช่น ซัลเฟอร์ และมีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก เมื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์จึงเกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่าเชื้อเพลิงทั่วไป ตัวอย่างเช่น การใช้น้ำมัน แก๊สโซฮอล์ E10 คือน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ที่ได้จากการผสมระหว่างน้ำมันเบนซินกับเอทานอล ที่มีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตรในอัตราส่วน 9:1 หรือ น้ำมันเบนซินร้อยละ 90 และเอทานอลร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นต้น (Papong and Malakul, 2010)

ในปัจจุบัน ประเทศไทยมีการ ผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบหลัก 2 ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อยและกากน้ำตาล และวัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลังและข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบดังกล่าวที่นำมาใช้หมักนี้มีจำนวนมาก ดังนั้นการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักนี้จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี เอทานอลเป็นพลังงานทางเลือก หนึ่งในหลายประเทศได้ให้ความสำคัญ จากข้อมูลสำนักงานสารสนเทศด้านพลังงานของสหรัฐฯ พบว่า ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2553 ความต้องการใช้เอทานอลเพิ่มขึ้น จาก 285.2 พันบาเรลต่อวัน เป็น 1,418.5 พันบาเรลต่อวัน



หรือประมาณปีละ 82,000 ล้านลิตร หรือเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 17.9 ต่อปี สำหรับประเทศที่ใช้ เอทานอลรายใหญ่ 5 อันดับแรกของโลก (มีสัดส่วนรวมกันมากถึงร้อยละ 92.9 ของความต้องการใช้ทั่วโลก) ได้แก่ สหรัฐฯ 838.8 พันบาร์เรลต่อวัน (คิดเป็นร้อยละ 59.1 ของการใช้ทั่วโลก) บราซิล 381.9 พันบาร์เรลต่อวัน จีน 37 พันบาร์เรลต่อวัน แคนาดา 32 พันบาร์เรล ต่อวัน และเยอรมัน 25 พันบาร์เรลต่อวัน สำหรับประเทศไทย เป็นผู้บริโภคน้ำมันอันดับ 9 ของโลก อยู่ที่ 7 พันบาร์เรลต่อวัน (รูปภาพที่ 2.1) (<http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics>, 2013)



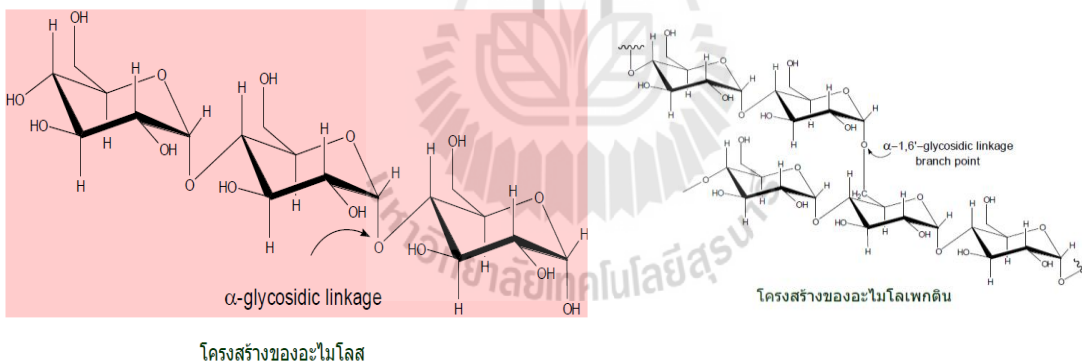
รูปภาพที่ 2.1 การใช้เอทานอลของโลก (ที่มา <http://www.ethanolrfa.org/industry>

/statistics, 2013)

## 2.2 แป้ง

แป้ง เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่เกิดจากกลูโคสจำนวนหลายพันโมเลกุลมาต่อกัน มีโครงสร้างเป็นทั้งแบบสายยาวและแบบกิ่งก้านสาขา แป้งมีมากในพืชประเภทเมล็ดและหัว เมื่อแป้งถูกความร้อนจะกลายเป็นเดกซ์ตริน ซึ่งเป็นสารที่มีรสหวานเล็กน้อยและมีสมบัติเหนียวแบบกาว โครงสร้างของแป้ง

ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคสสองชนิดคือ แอมิโลส ไม่แตกกิ่ง ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ  $\alpha 1 \rightarrow 4$  พบประมาณร้อยละ 15 - 20 กับแอมิโลเพกทิน เป็นสายโพลีแซคคาไรด์ที่แตกกิ่ง โดยส่วนที่เป็นเส้นตรงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ  $\alpha 1 \rightarrow 4$  และส่วนที่แตกกิ่งต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ  $\alpha 1 \rightarrow 6$  พบประมาณร้อยละ 80 - 85 (รูปภาพที่ 2.2) แป้งสามารถผลิตมาจากแหล่งต่างๆ ได้ เช่น ข้าวโพด ข้าวโพดเหนียว ข้าวโพดที่มีอะไมโลสสูง ข้าวสาลี มันสำปะหลังและมันฝรั่ง และสามารถนำไปใช้เป็นสารประกอบอาหารและเพิ่มความข้นหนืดของอาหาร แป้งจะไม่ละลายในน้ำเย็นและพองตัวในอุณหภูมิที่แตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ แป้งจึงมีคุณสมบัติที่ดีในการเพิ่มความข้นหนืด การเกิดเจล การรักษาความชื้น และการป้องกันการเกิดกลิ่นในอาหาร และพืชแต่ละชนิดจะให้เปอร์เซ็นต์แป้งที่ต่างกันดังตาราง ตาราง 2.1



รูปภาพที่ 2.2 โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพกทิน (ที่มา <http://www.auxmailllesgodefroy.com/starch>)

ตาราง 2.1 ปริมาณแป้งในพืช (Krisztina, 2003)

Plant	Average % starch content
Corn	60–70
Potatoes	12–20
Cassava	20–40
Wheat	55–70
Rice	70–75
Sweet Potatoes	19–25

### 2.2.1 แป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย

สถานการณ์พลังงานของโลกมีความเปลี่ยนแปลงสูงมาก เนื่องจากความต้องการพลังงานมีมากขึ้น แต่กำลังการผลิตมีจำกัด ผู้รู้ทางด้านพลังงาน จึงคาดการณ์ว่าโลกข้างหน้าน้ำมันที่ได้จากฟอสซิลจะหมดไป ภายใน 40 ปี ดังนั้น จึงเป็นความจำเป็นสำหรับประเทศไทยที่จะต้องเตรียมพร้อมรับมือด้วยการกำหนดยุทธศาสตร์ของประเทศ ในการนำพลังงานชนิดอื่น โดยเฉพาะพลังงานที่เราสามารถผลิตได้เอง มาใช้ทดแทนน้ำมันที่กำลังจะหมดไป การใช้ น้ำมันเชื้อเพลิงชีวภาพในประเทศ มีประโยชน์อย่างมากมายมหาศาล ช่วยลดการพึ่งพาน้ำมันจากต่างประเทศ ช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมต่างๆ ที่

ส่งผลกระทบต่อภาวะโลกร้อน และยกระดับคุณภาพชีวิตของประชาชน เอทานอลคือ เชื้อเพลิงชีวภาพ ที่เป็นทางออกของประเทศในการลดการนำเข้าของน้ำมันเชื้อเพลิงจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง

มันสำปะหลัง (Cassava or *Manihot esculenta*) (รูปภาพที่ 2.3) คือวัชตฤติบหนึ่งที่มีจำนวนมากที่สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้และส่วนใหญ่ในแถบเอเชียได้เลือกใช้วัชตฤติบดังกล่าวในการผลิตเอทานอล เนื่องจากมันสำปะหลังมีปริมาณแป้งมากเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นแหล่งของน้ำตาลในการหมักเอทานอล และยังมีโรงงานผลิตเอทานอลของประเทศไทยหลายแห่งที่เริ่มมีการนำแป้งมันสำปะหลังมาเป็นวัชตฤติบในการผลิตเอทานอล (Office of Agricultural Economics, 2008) มันสำปะหลัง *Manihot esculenta* Crantz เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเป็นประเทศที่มีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังเป็นอันดับที่ 3 ของโลกรองจากประเทศไนจีเรียและบราซิล นอกจากนั้นแล้วประเทศไทยยังเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเป็นอันดับหนึ่งของโลกมายาวนาน และสร้างรายได้เข้าประเทศมากกว่าปีละ 3 หมื่นกว่าล้านบาท เป็นพืชที่ปลูกง่ายมีปัญหาในการผลิตน้อย ปรับตัวได้ดีในเกือบทุกสภาพพื้นที่ แม้ดินจะไม่ดี ปัญหาโรคแมลงมีน้อย หัวสดมีตลาดรองรับแน่นอน การขุดเก็บเกี่ยวไม่ขึ้นกับฤดูกาลสามารถจะชะลอการเก็บเกี่ยวได้ ทนต่อความแห้งแล้งเมื่อเปรียบเทียบกับพืชไร่ชนิดอื่นและมากไปกว่านั้นการนำมันสำปะหลังมาผลิตเอทานอลยังช่วยเพิ่มมูลค่าของราคามันสำปะหลังอีกด้วย

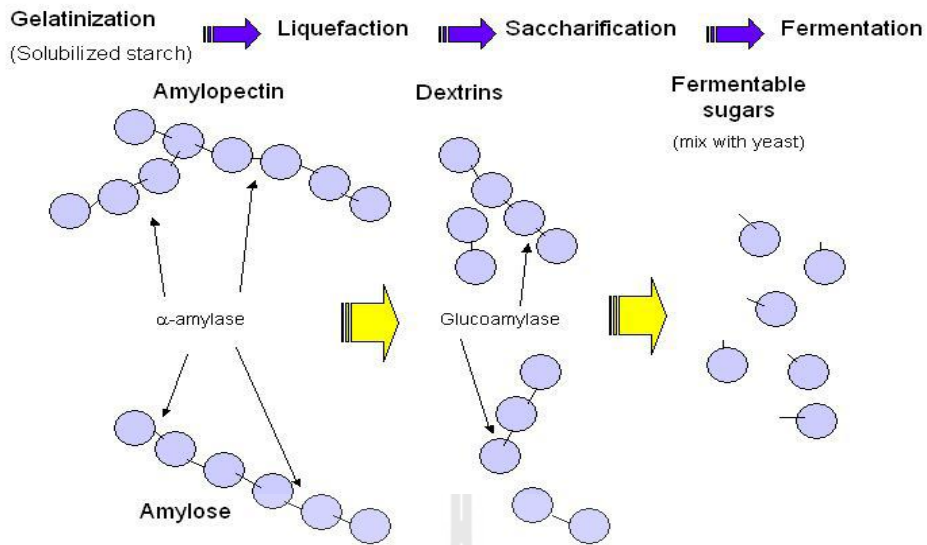


รูปภาพที่ 2.3 ต้นมันสำปะหลังและหัวมันสำปะหลัง (ที่มา <http://seedplannet.blogspot.com/2014/01/evergreen-1-5.html>)

มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ โดยจะให้คาร์โบไฮเดรตประมาณ 40% มากกว่าข้าว 25% และมากกว่าข้าวโพด ส่วนประกอบหลักที่มีอยู่ในหัวมันสำปะหลังได้แก่ ความชื้น (70%) แป้ง (24%) เส้นใย (2%) โปรตีน (1%) และแร่ธาตุอื่น (3%) ในแป้งมันสำปะหลังจะประกอบด้วยแป้งสองชนิดคือส่วนที่ไม่มีกิ่งก้านหรืออะไมโลส (amylose) 17% และประเภทที่มีกิ่งก้านเป็นแขนงและไม่มีกิ่งก้านรวมอยู่ด้วยหรืออะไมโลเพกติน (amylopectin) 83% และแป้งทั้งสองประเภทนี้สามารถตัดย่อยให้ได้น้ำตาลได้โดยใช้เอนไซม์ หรือใช้กรดในการย่อยได้ (www.auxmaillsgodefroy.com/starch, 2012) มันสำปะหลังยังเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ที่มีราคาถูก (Nyerhovwo, 2004) และจากการศึกษาของ Lee et al. (1995) ในการผลิตเอทานอลด้วยการหมักจากมันสำปะหลัง ซึ่งเมื่อย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แล้วพบว่าจะได้น้ำตาลที่เป็นกลูโคสและมอลโตสผสมอยู่ โดยเป็นกลูโคส 92% glucose และมอลโตสอีก 8% ดังนั้นพวกเขาจึงรายงานว่า การหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วจะมีการผสมกันระหว่างกลูโคสและมอลโตส ดังนั้นจึงยืนยันว่าการหมักเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่ดีชนิดหนึ่งสำหรับการผลิตเอทานอล แต่อย่างไรก็ตามการหมักเอทานอลจากอ้อยเป็นวัตถุดิบที่ใช้โดยส่วนใหญ่ เพราะเป็นแหล่งของน้ำตาลโดยตรง ซึ่งไม่ต้องผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์หรือกรด แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณที่นำมาใช้ เพราะอ้อยสามารถปลูกได้น้อยและยังใช้น้ำมากจึงมีพื้นที่ในการปลูกน้อย

### 2.3 กระบวนการหมักแป้งในอุตสาหกรรม

กระบวนการหมักแป้ง มีความสำคัญหลักและมีค่าใช้จ่ายสูงในการผลิตเอทานอล ได้แก่ ราคาของวัตถุดิบ ค่าใช้จ่ายในการซ่อมบำรุงและราคาของการกลั่นให้ได้ผลผลิตของเอทานอล ดังนั้นการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจึงจำเป็นต้องหาวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตลง และวัตถุดิบจากแป้งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกจึงได้พิจารณานำมาใช้ แต่กระบวนการหมักที่ต้องใช้ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่หมักเอทานอลจากกลูโคส แต่เนื่องจากยีสต์ดังกล่าวไม่สามารถย่อยแป้งได้โดยตรงเพราะไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง ดังนั้นในระดับอุตสาหกรรมที่มีการใช้แป้งเป็นวัตถุดิบจึงต้องมีการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคสก่อน ยีสต์จึงจะสามารถนำกลูโคสไปใช้และผลิตเอทานอลได้ เพื่อที่จะย่อยแป้งให้สมบูรณ์จะต้องมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ตัวคือ  $\alpha$ -amylase และ glucoamylase (Tester et al., 2004) และนอกจากนี้ยังอาจใช้กรดในการย่อยได้ เช่น กรด hydrochloric acid และ sulfuric acids แต่วิธีย่อยด้วยกรดจะทำให้เชื้อยีสต์ตายและมีการปนเปื้อนของกรด (Roberson et al., 2006) การย่อยแป้ง (starch hydrolysis) เป็นการย่อยโมเลกุลของสตาร์ช (starch) ให้มีโมเลกุลเล็กลง ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ starch hydrolysate เช่น น้ำเชื่อมกลูโคส (glucose syrup) การย่อยแป้ง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) การเจลาติไนซ์ (gelatinization) เป็นขั้นตอนทำให้เม็ดสตาร์ช (starch granule) พองตัว ดูดน้ำเข้าไปเต็มที่ โดยให้ความร้อนน้ำแป้งจนถึงอุณหภูมิเจลาติไนซ์ (gelatinization temperature) (2) การเกิดลิเควอร์แฟกชัน (Liquefaction) เป็นการลดความหนืดของแป้งหลังการเกิดเจลาติไนซ์ (gelatinization) โมเลกุลแป้งมีสายสั้นลง ด้วยการตัดพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic linkage) ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งปัจจุบัน ทำได้ด้วยการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha amylase) แทนการย่อยโดยใช้กรดที่อุณหภูมิสูงกว่า 160°C (3) การเกิดแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) เป็นการย่อยโมเลกุลของสตาร์ช ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลโมเลกุลคู่ คือ มอลโตส (maltose) ด้วยการใช้อะไมเลส เช่น amylase, glucoamylase (รูปภาพที่ 2.4) (De-Mot et al., 1985).



รูปภาพที่ 2.4 กระบวนการตัดย่อยของแป้งด้วย amylase (Bo Liao, Master's Thesis, University of Saskatchewan, 2008).

## 2.4 เอนไซม์ย่อยแป้ง

### 2.4.1 $\alpha$ -Amylase

$\alpha$ -amylase ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1), แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลสตาร์ช (starch) และไกลโคเจน (glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 แบบสุ่มทำให้โมเลกุลของสตาร์ช และไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้ น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส (maltose) และกลูโคส (glucose) อย่างรวดเร็ว เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลุ่มนี้สกัดจากจุลินทรีย์ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaceus* หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *Bacillus subtilis* เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์เหล่านี้จะทนความร้อนได้ดี ตั้งแต่ อุณหภูมิประมาณ 70-105 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6 เหมาะสำหรับการย่อยโดยการทำให้เหลว นอกจากนี้ยังมีแอลฟาอะไมเลสที่สกัดจากเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* ซึ่งสามารถทำงานที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างประมาณ 3-8 ซึ่งเป็นเอนไซม์

ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำเชื่อมในขั้นตอนของการทำให้หวาน (Lily et al., 2007) กิจกรรมในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อการย่อยซัซเตรต การย่อยอะไมโลส เอนไซม์สามารถสลาย  $\alpha$ -1,4- glucosidic linkage ทั้งทางด้านในและด้านนอกของโมเลกุลได้อย่างรวดเร็ว การสลายพันธะเกิดขึ้นแบบสุ่มมีผลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเดกซ์ทรินมีขนาดเล็กกว่าเดิมและขนาดแตกต่างกัน จึงเกิดกับสีของสารละลายไอโอดีนเป็นสีม่วงแดง โดยที่เอนไซม์ยังคงโมเลกุลของเดกซ์ทรินต่อไปอย่างช้าๆ จนกลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กจนไม่เกิดสีกับสารละลายไอโอดีน และในที่สุดจะได้ผลิตภัณฑ์คือมอลโตสและมอลโตไตรออส การย่อยอะไมโลเพกติน เอนไซม์อะไมโลเพกตินสามารถย่อยโมเลกุลที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -1,4- glucosidic linkage แต่ไม่สามารถย่อย  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage ของอะไมโลเพกตินสำหรับการสลาย  $\alpha$ -1,4- glucosidic linkage ของอะไมโลเพกติน ที่มีแขนงทำให้ขนาดโมเลกุลปานกลางเกิดสีกับไอโอดีนเป็นสีม่วงและสีม่วงแดงตามลำดับ เอนไซม์จะยังคงความสามารถในการย่อยเดกซ์ทรินต่อไปอย่างช้าๆ จนในที่สุดกลายเป็นลิมิตเดกซ์ทริน

#### 2.4.2 Glucoamylase

Glucoamylase หรือชื่อตามระบบ  $\alpha$ -1,4-glucan 4- glucanohydrolase พบทั่วไปในจุลินทรีย์ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus* สามารถย่อยได้หลายพันธะได้แก่  $\alpha$ -1,4  $\alpha$ -1,6  $\alpha$ -1,3 glycosyl ได้ผลผลิตคือ  $\beta$ -D-glucose และ glucan, limit dextrin เป็นเอนไซม์ที่ตัดย่อยโมเลกุลของแป้งจากภายนอกซึ่งสกัดจากเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Rhizopus* สามารถทำงานที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรด-ด่างทั่วไปอยู่ระหว่าง 4-6 (ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 5.5) จำเป็นต้องใช้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมก่อนที่จะดำเนินการกระบวนการผลิตต่อไป สำหรับการทำงานของกลูโคอะไมเลส จะย่อยสลายพันธะที่จับกันของน้ำตาลกลูโคสทั้งพันธะ  $\alpha$ -1,4 และ  $\alpha$ -1,6 จากปลาย non-reducing และจะตัดไปครึ่งละหนึ่งหน่วยกลูโคส โดยการย่อยสลายพันธะกึ่ง  $\alpha$ -1,6 จะเกิดขึ้นช้าๆ ดังนั้นเมื่อเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยแป้ง



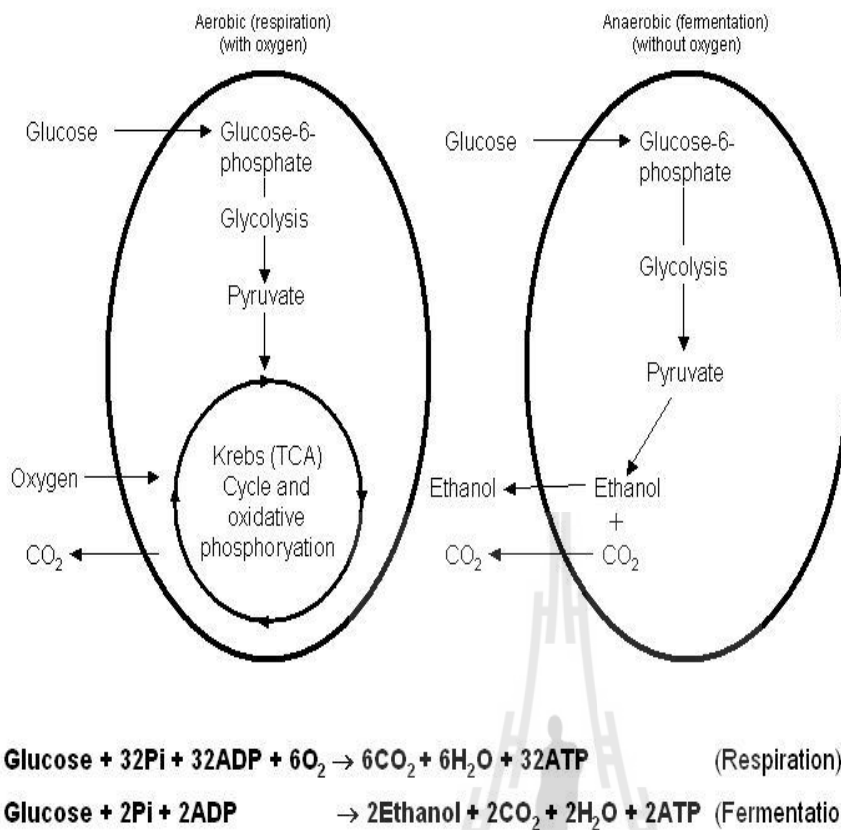
พบว่า สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ จนในที่สุดผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นกลูโคสที่มี configuration ต่างไปจากเดิม

## 2.5 จุลินทรีย์สำหรับการผลิตเอทานอล

ฟังไจ แบคทีเรีย และยีสต์ หลายสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัตินำมาใช้หมักเอทานอลได้ แต่ยีสต์หลักที่มีคุณสมบัติในการหมักเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพได้แก่ *S. cerevisiae* (Kang's homepage, 2008) เพราะความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงและเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนและทนต่อสภาวะกดดันต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมได้ดี (Piskur et al., 2006)

### 2.5.1 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* คือ ยีสต์ (yeast) ชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อการหมัก (fermentation) เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ ใช้เป็นสารให้ขึ้นฟู ในขนมปัง และใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ยีสต์ชนิดนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอธิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ *S. cerevisiae* สามารถใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) และไร้ออกซิเจน (anaerobic) ในสภาวะที่มีออกซิเจน จะมีการย่อยสลายสารอาหารเพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตเรียกว่า กระบวนการหายใจ (respiration) แต่การย่อยสลายสารอาหารภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจนจะใช้พลังงานน้อย เรียกว่า กระบวนการหมัก (fermentation) (รูปภาพที่ 2.5) ปกติแล้ว *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงและทนต่อเอทานอลได้ดีถึง 15% โดยจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้มากถึง 95% (Van Dijken et al., 1993)



รูปภาพที่ 2.5 กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสของยีสต์ในสภาวะการใช้ออกซิเจนและสภาวะไร้ออกซิเจน (Bo Liao, Master's Thesis, University of Saskatchewan, 2008)

## 2.6 การดัดแปลงพันธุกรรมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลจากแป้งในระดับอุตสาหกรรม มีการใช้อุณหภูมิสูง (140°C-180°C) ก่อนการใช้เอนไซม์ช่วยย่อย เพื่อที่จะให้เกิดการย่อยแป้งที่สมบูรณ์เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลจำนวนมาก (Shigechi et al., 2004a; Shigechi et al., 2004b) ดังนั้นจึงทำให้มีการใช้พลังงานและเสียค่าใช้จ่ายสำหรับการซื้อเอนไซม์มาย่อยแป้งสูง (Kolusheva และ Marinova, 2007; Majovic et al., 2006; Montesinos และ Navarro, 2000; Paolucci-Jeanjean et al., 2000) กระบวนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* จากแป้งที่ผ่านการย่อยจนเป็นกลูโคสแล้วจะทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีงานวิจัยมากมายเพื่อแก้ปัญหาการใช้พลังงานและการซื้อเอนไซม์ในปริมาณมากด้วยการสร้างสายพันธุ์ยีสต์ลูกผสมให้สามารถมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งได้เช่น เอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ

glucoamylase เพื่อให้สามารถใช้แป้งในการเจริญเติบโตและการหมักเอทานอลได้โดยตรงดังตาราง

## 2.2. การพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ลูกผสมที่มีการสร้างเอนไซม์สำหรับการย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอลแล้ว

อาจจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและลดค่าใช้จ่ายได้ ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ลูกผสมที่สร้างขึ้นจะสามารถใช้แป้งเพื่อการเจริญเติบโตและเพื่อการหมักเอทานอลได้โดยตรง (Bitter et al., 1984;

Ruohonen et al., 1995) จึงมีงานวิจัยมากมายที่ยืนยันว่าการสร้างสายพันธุ์ยีสต์ลูกผสมที่สามารถหมัก

เอทานอลจากแป้งได้และยังเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลได้ เพราะจะ

ช่วยลดขั้นตอนในการผลิตและลดการซื้อเอนไซม์ย่อยแป้ง (Verma et al., 2000; Knox et al., 2004)



ตาราง 2.2 *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ลูกผสมที่หมักเอทานอลจากแป้งได้โดยตรง

Recombinant strains	Source of $\alpha$ -amylase	Source of glucoamylase	Type of starch	Starch concentration (g/l)	Max. ethanol concentration (g/l)	Author
<i>S. cerevisiae</i> Strain YPB-G	<i>B. subtilis</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	Pure starch in 2.5 l fed batch	40	29.7	Altıntaş et al (2002)
<i>S. cerevisiae</i> Strain YPG-AB	<i>B. subtilis</i>	<i>A. awamori</i>	Raw corn starch	5- 80	47.5(fed batch) 15.6 (batch)	Ülgen et al. (2002)
<i>S. cerevisiae</i> Strain stell 6	<i>Lipomyces kononenkoae</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Pure starch (Merck)	55	21	Knox et al. (2004)
<i>S. cerevisiae</i> Strain YF207/pSA11/pAA12 and YF207/pSA11/pSAA1	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	Corn starch cooked at 80°C	50 90	18 30	Shigechi et al. (2004a)

Recombinant strains	Source of $\alpha$ -amylase	Source of glucoamylase	Type of starch	Starch concentration (g/l)	Max. ethanol concentration (g/l)	Author
<i>S. cerevisiae</i> Strain YF207	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>R. oryzae</i>	Raw corn starch in shake flask	200	61.8	Shigechi et al. (2004b)
<i>S. cerevisiae</i> Strain NPB-G	<i>B. subtilis</i>	<i>A. awamori</i>	Raw corn starch	50 g/l starch + 4 g/l (w/v) glucose	6.61	Oner et al. (2005)
<i>S. cerevisiae</i> Strain YF237	Not stated	Not stated	Raw corn starch	100	8	Khaw et al. (2007)
<i>S. cerevisiae</i> Strain GRI-117-UK	Not required	<i>A. awamori</i> , <i>R. oryzae</i>	Corn starch	50	18.5	Kotaka et al. (2008)

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมี

##### 3.1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดซื้อมาจากหลายบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย (Sigma, Merck, BIO-RAD, Amersham Biosciences, Biolabs, Promega, GIBCO BRL and Research Organics)

##### 3.1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมี

#### ตาราง 3.1 รายการสารเคมีที่ใช้และผู้แทนจำหน่าย

สารเคมี	ผู้แทนจำหน่าย
3,5 dinitrosalicylic acid	Sigma-Aldrich
Zeocin™	Invitrogen
<i>Hind</i> III digested $\lambda$ -DNA marker	Promega
ชุดทดสอบ	ผู้แทนจำหน่าย
NucleoSpin Tissue Kit	Machery-Nagel
Plasmid pGAPZ $\alpha$ A	Invitrogen
TopTaq Master Mix Kit	Qiagen

### 3.1.3 เอนไซม์

ตัวแทนจำหน่ายเอนไซม์และชื่อของเอนไซม์ที่ใช้ทั้งหมดแสดงในตาราง 3.2.

ตาราง 3.2 รายการเอนไซม์

เอนไซม์	ผู้แทนจำหน่าย
alkaline phosphatase	Fermentas
restriction endonucleases	Fermentas
RNase A	Fermentas
lyticase enzymes	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -amylase enzyme	Sigma-Aldrich
glycosidases (amyloglucosidase, EC 3.2.1.3)	Sigma-Aldrich
T4 DNA ligase	Biolabs

## 3.2 จุลินทรีย์ พลาสมิด และอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.2.1 แบคทีเรีย ยีสต์ และพลาสมิด

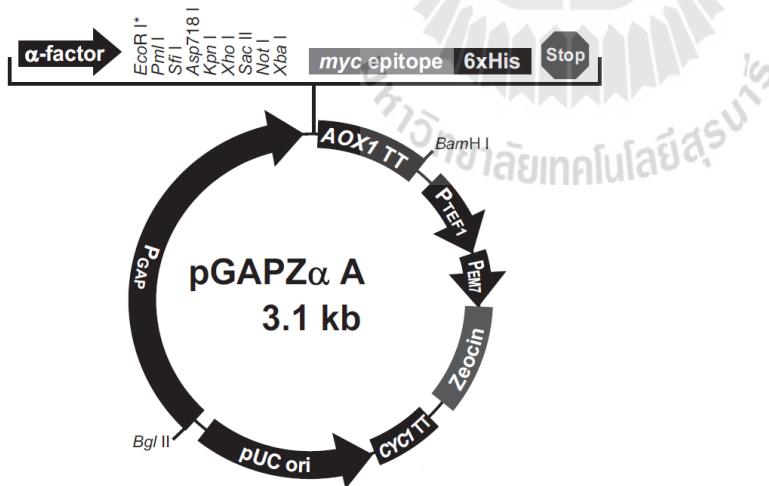
แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (F80dlacZDM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*r\_K*, *m+K*), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$  (*lac-ZYA- argF*) U169) and *E. coli* TOP10 strain (F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara*

*leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG* ) ใช้สำหรับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเพื่อเพิ่มจำนวน

ยีสต์ สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับถ่ายโอนยีนและการแสดงออกของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ glucoamylase

ยีสต์ สายพันธุ์ *D. occidentalis* TISTR 5346 ใช้เป็นแหล่งคัดลอกและเพิ่มจำนวนขึ้นยีน  $\alpha$ -amylase (*SWA2*) และ ยีน glucoamylase (*GAM1*)

พลาสมิด pGAPZ $\alpha$ A (มีส่วนประกอบของ GAP promoter) เพื่อใช้ในการสร้างพลาสมิด ลูกผสมที่มีการแทรกยีน *GAM1* หรือ *SWA2* สำหรับใช้เพื่อการแสดงออกของยีนในยีสต์ต่อไป ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ในพลาสมิดดังกล่าวประกอบด้วยส่วนสำคัญดังนี้ origin of DNA replication ใน *E. coli* และ มี zeocin resistant gene (Zeocin<sup>TM</sup>) ที่ใช้สำหรับคัดเลือกการแสดงออกทั้งใน *E. coli* และยีสต์ (รูปภาพที่ 3.1)



รูปภาพที่ 3.1 โครงสร้างและส่วนประกอบภายในของพลาสมิด pGAPZ $\alpha$  A ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).



### 3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารเหลว Luria-Bertani (LB) และอาหารแข็ง LB agar ใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย มีส่วนประกอบดังนี้ 1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract และ 1% (w/v) sodium chloride, pH 7.0 ส่วนอาหารแข็ง LB agar จะเติม 1.5% (w/v) bacto-agar เข้าไปในอาหารเหลว

อาหารเหลวชนิด Luria-Bertani Zeocin™ (LBZ) และอาหารแข็ง LBZ agar จะใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม ที่ดื้อต่อยา zeocin™ มีส่วนประกอบดังนี้ 1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) sodium chloride เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้ววางไว้ให้อุ่นประมาณ 50-60 °C ก่อนเติมยา zeocin™ ให้ความเข้มข้นเท่ากับ 25 µg/ml และเก็บไว้ในที่มืดและเย็น 4 °C เพื่อไม่ให้ยาสื่อมคุณภาพ ส่วนอาหารแข็ง LBZ agar จะเติม 1.5% (w/v) bacto-agar เข้าไปในอาหารเหลว

### 3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

อาหารเหลวชนิด YPD medium นำมาใช้เพื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์สำหรับการเตรียมคอมพิเทนต์ยีสต์ มีส่วนประกอบของอาหารดังนี้ 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone and 2% (w/v) D-glucose ส่วนการเลี้ยงยีสต์ที่มีการแทรกของพลาสมิดลูกผสมนั้น จะดื้อต่อยา zeocin™ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมยาดังกล่าวลงในปริมาณที่เหมาะสม เท่ากับ 130 µg/ml สำหรับเลี้ยงยีสต์ลูกผสม ซึ่งยีสต์ที่สามารถขึ้นบนจานอาหารที่มียา zeocin™ ได้ จึงคาดการณ์ว่ายีสต์ลูกผสมดังกล่าวมีการแทรกของพลาสมิดลูกผสมอยู่ และมีการแสดงออกของยีนจึงสามารถดื้อต่อยาได้ แล้วจึงเลือกยีสต์ลูกผสมทั้งหมดที่ขึ้นบนจานอาหารที่มียา zeocin™ เพื่อไปทดสอบการย่อยแป้งบนจานอาหารชนิด YPDS2 [YPD เติม 2% (w/v) soluble starch] และบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำไปแช่ที่ 4°C อีก 2 วัน และตรวจสอบผลการย่อยแป้งของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase บนจานอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ (Ghang et al., 2007) ส่วนอาหารเหลว YPC ประกอบด้วย 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 1% (w/v)

cassava starch pH 5.0 เตรียมขึ้นเพื่อใช้สำหรับศึกษาความสามารถในการหมัก โดย YPC เมื่อเตรียม ส่วนประกอบทั้งหมดเสร็จแล้ว ต้องนำไปต้มเพื่อให้แป้งที่ผสมสุกวมเป็นเนื้อเดียวกับอาหารก่อนเทใส่ ขวดหมักในปริมาณที่ต้องการแล้วจึงนำอาหารในขวดหมักที่เตรียมไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็น เวลา 20 นาที

### 3.3 การสร้างพลาสมิดลูกผสม

#### 3.3.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน glucoamylase (*GAM1*) และ  $\alpha$ -amylase (*SWA2*) โดยใช้โปรแกรม Primer premier 5.0 ในการออกแบบใช้ข้อมูลลำดับเบส ของยีน glucoamylase (*GAM1*) ในเชื้อ *D. occidentalis* ที่รายงานอยู่ใน Gene Bank มี Accession No. M60207, M34666 และ ยีน  $\alpha$ -amylase (*SWA2*) ในเชื้อ *D. occidentalis* มี Accession No. X7349 ซึ่งในการออกแบบได้ใส่ลำดับเบสจำเพาะที่แสดงตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) คือ *XhoI* (CTCGAG) เพื่อช่วยในขั้นตอนการโคลนยีนให้มีความ สะดวกและง่ายขึ้นรวมทั้งใส่ลำดับเบสจำเพาะที่แสดงตำแหน่งจดจำของ cleavage signal sequence ของ ยีน *KEX2* ดังนั้นผลจากการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ได้ลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตาราง 3.3 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับทำ PCR

ชื่อ primer	ลำดับเบสของ primer	ความยาว (นิวคลีโอไทด์)
GAM1_2F	5'- CCCCTCGAGAAAAGAGCCCCTGCCTC TTCGATTGG-3'	35

**ตาราง 3.3** ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ สำหรับทำ PCR (ต่อ)

GAM1_2R	5'CCCCTCGAGTTACCAAGTAATGGTGAAAT CCTTAGAAAATG -3'	41
SWA2_F	5'-CCCCTCGAGAAAAGAATGAAATTTGCAAC TATCTTA-3'	36
SWA2_R	5'-CCCCTCGAGTTAGAAGTTGCAAATCCAGA -3'	30
pGAP_F	5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'	22

หมายเหตุ : ลำดับเบสที่ถูกขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

### 3.3.2 การสกัดแยกจีโนม โดยใช้ชุดสกัดจีโนม NucleoSpin Extract II Kit

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ เชี่ยวเชื้อจำนวน 1 โคลนนี้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่า 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเชื้อใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งจะเหลือตะกอนเชื้ออยู่ที่ก้นหลอด เติม Sorbital buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเดิม เพื่อละลายตะกอนเชื้อโดยการปั่นอย่างแรงด้วยเครื่อง Vortex Mixer เติม lyticase จำนวน 50 unit นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Buffer T1 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการดูดสารละลายขึ้นลงเบาๆ จากนั้นเติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตีหลอดเบาๆ ให้ผสมกันดีแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาทีทุกๆ 20 นาที เป็นเวลาหนึ่งคืน เติม RNase A จำนวน 20 mg/ml ตีหลอดเบาๆ ให้ผสมกันดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดตัวอย่างไปปั่นผสมอย่างแรง (vortex) และเติมสารละลาย B3 Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และปั่นอย่างแรง (vortex) อีกครั้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นอย่างแรง (vortex) และปั่นเหวี่ยงที่

13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เต็ม 100% เอทานอล ปริมาตร 210 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยการปั่นอย่างแรงด้วยเครื่อง Vortex Mixer จากนั้นดูดสารละลายในหลอดใส Nucleospin column ที่สวมอยู่กับ collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ไหลลงสู่ collection tube ทิ้ง นำ column กลับมาสวมเข้าด้วยกันใหม่ และเติม BW buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ไหลผ่าน column สู่ correction tube ทิ้งนำกลับมาสวมเข้าด้วยกันใหม่ และเติม B5 buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่ไหลผ่าน column สู่ collection tube ทิ้งนำกลับมาสวมเข้าด้วยกันใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เอาหลอดไมโครพิวจ์สวมแทน collection tube และเติม Elution buffer BE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บริเวณกลาง column วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที วิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีเจลอเล็กโตรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker DNA) และเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3.3.3 การคัดลอกและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *GAM1* จาก *D. occidentalis* โดยวิธี PCR

ยีน *GAM1* ขนาด 2.8 kb ถูกคัดลอกและเพิ่มจำนวนจากจีโนม ของ *D. occidentalis* ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *GAM1\_2F* และ *GAM1\_2R* ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1x PCR buffer (75 mM Tris-HCl (pH 8.7), 50 mM KCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และ 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 20 pmol ของไพรเมอร์แต่ละข้าง, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs mix และ 1.25 unit *Taq* DNA polymerase และ 100 ng ของจีโนมของ *D. occidentalis* TISTR 5346 ซึ่งใช้เป็นแม่แบบ โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาดังตาราง 3.4

**ตาราง 3.4** อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน *GAM1* ด้วยคู่ไพรเมอร์ GAM1\_2F และ GAM1\_2R

Hold	STEP CYCLE (30 cycles)			Hold
95 °C,	Denaturation	Annealing	Extension	72 °C,
3 min	94°C, 30 sec	56°C, 30 sec	72°C, 3 min	5 min

**3.3.4 การคัดลอกและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *SWA2* จาก *D. occidentalis* โดยวิธี PCR**

ยีน *SWA2* ขนาด 1.5 kb ถูกคัดลอกและเพิ่มจำนวนจากจีโนม ของ *D. occidentalis* ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SWA2\_F และ SWA2\_R ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1x PCR buffer (75 mM Tris-HCl (pH 8.7), 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> และ 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 20 pmol ของไพรเมอร์แต่ละข้าง, 200 μM dNTPs mix และ 1.25 unit *Taq* DNA polymerase และ 100 ng ของจีโนมของ *D. occidentalis* TISTR 5346 ซึ่งใช้เป็นแม่แบบ โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาดังตาราง 3.5

**ตาราง 3.5** อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน *SWA2* ด้วยคู่ไพรเมอร์ SWA2\_F และ SWA2\_R

Hold	STEP CYCLE (30 cycles)			Hold
95 °C,	Denaturation	Annealing	Extension	72 °C,
3 min	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 3 min	5 min

### 3.3.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีแอลคาไลน์ไลซิส

ถ่ายเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pGAPZ $\alpha$ A 1 โคโลนีลงในอาหาร LB low salt ที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin<sup>TM</sup> ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์จากอาหารโดยการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนในหลอดไมโครพิวจ์ (microfuge tube) 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่ 4°C เทส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนเชื้อแบคทีเรียติดอยู่ที่ก้นหลอดไมโครพิวจ์ ใช้ปิเปตดูดส่วนใสที่เหลือออกให้หมด ละลายตะกอนโดยเติมสารละลาย I (solution I = 50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) ที่แช่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปปั่น (Vortex) เพื่อให้เซลล์ที่เกาะเป็นก้อนอยู่ที่ก้นหลอดกระจายตัวมากที่สุด จากนั้นเติมสารละลาย II (0.2 N NaOH, 1% SDS) ที่เตรียมใหม่ๆ ก่อนใช้งาน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดกลับไปมาช้าๆ เพื่อให้เข้ากันดี แล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย III (3 M potassium acetate, 5 M glacial acetic acid) ที่แช่เย็น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมโดยกลับหลอดไปมาช้าๆ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C ถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่ เติม RNase A ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงในส่วนใส ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมคลอโรฟอร์ม จำนวน 1 เท่าของสารละลายตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่ 4°C (จะเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างคือเศษเซลล์ สารอินทรีย์และโปรตีนส่วนชั้นบนคือ ดีเอ็นเอ) ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลายตัวอย่าง และผสมให้เข้ากันดีเติม 100% เอทานอลจำนวน 2 เท่าของปริมาตรสารละลายตัวอย่าง กลับหลอดไปมาช้าๆ 10 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ที่ -80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่ 4°C จะได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่ที่ก้นของหลอด เทเอทานอลทิ้งให้หมด เติม 70 % เอทานอล ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา

ซ้ำๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นานเวลา 2 นาที จะได้ตะกอนอยู่ที่ก้นของหลอด เทเอทานอลทิ้งให้หมด (ระวังตะกอนหลุด) ตากตะกอนให้แห้ง แล้วจึงละลายตะกอนโดยการเติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอไปแช่เย็นเพื่อที่จะนำไปใช้ต่อไป วิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยวิธีเจลอิล็กโทรโฟรีซิส

### 3.3.6 วิธีเจลอิล็กโทรโฟรีซิสของ DNA

เพื่อแยกขนาดของชิ้น DNA หรือ PCR product โดยวิธีเจลอิล็กโทรโฟรีซิสใช้ 0.8% agarose ผสมกับ 1xTBE buffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid, 25 mM EDTA, and pH 8.0) ส่วน DNA ตัวอย่างจะผสมกับสีย้อม maestrosafe nucleic acid ที่มีความเข้มข้น 10X ก่อนนำมาแยกขนาดด้วยเจลอิล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้าเท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ถูกแยกขนาดผ่านเครื่อง Ultrabright LED transilluminator (Maestrogen, Taiwan) ดีเอ็นเอที่ถูกย้อมด้วยสี maestrosafe nucleic acid จะเรืองแสงให้เห็นตำแหน่ง และสามารถถ่ายภาพเก็บได้

### 3.3.7 การตัดพลาสมิด DNA และ ชิ้น DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) จะตัด DNA เกลียวคู่ที่พันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ตรงบริเวณซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงตัวเฉพาะ (specific nucleotide sequence) การตัดสาย DNA ของเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะตัด DNA ทั้งสองสาย ในปฏิกิริยาสำหรับการย่อย DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีส่วนประกอบดังนี้ DNA, 1x Restriction endonuclease buffer, restriction enzyme และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยปริมาณและสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของแต่ละเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์

### 3.3.8 การทำให้ชั้น DNA บริสุทธิ์ ด้วยวิธี silica matrix method

วิธีการทำให้ DNA บริสุทธิ์ด้วยวิธี silica matrix method ได้ดำเนินการตาม Vogelestein และ Gillespie (1979) ที่ได้รายงานไว้ โดยสารละลาย silica เตรียมจากผง silica 10 กรัม ละลายในสารละลาย PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 100 ml และตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 x g เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำตะกอน silica ไปละลายกับ 3 M NaI และเก็บไว้ที่ 4 °C ในที่มืด เพื่อรอนำไปใช้งาน เมื่อต้องการทำให้ DNA บริสุทธิ์ สามารถทำได้ดังนี้ นำสารละลาย 6 M NaI เติมลงในสารละลาย DNA เป็นจำนวน 3 เท่าของปริมาตร และเติมสารละลาย silica 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 5 นาที และเพื่อให้ DNA จับกับ silica matrix นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที โดยต้องกลับหลอดไปมาทุกๆ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 5 วินาที ดูดส่วนน้ำใสของสารละลาย NaI ทิ้งให้หมด และล้างตะกอนด้วย wash buffer (50 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7.5, 2.5 mM EDTA, 50% v/v ethanol) 3 ครั้ง โดยครั้งแรกเติม wash buffer ลงไป 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปตเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 5 วินาที แล้วดูดสารละลายทิ้งไป ล้างครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ด้วยการเติม wash buffer ลงไปครั้งละ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปตเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 5 วินาทีแล้วดูดสารละลายทิ้งไป จากนั้นตากตะกอนให้แห้งเพื่อระเหยเอทานอลที่เหลือออกให้หมด จากนั้นละลายตะกอนเพื่อแยกเอา DNA ด้วยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 ไมโครลิตร และบ่มที่ 55 °C เป็นเวลานาน 2 นาทีและปั่นเหวี่ยงเป็นเวลานาน 5 วินาที ดูดสารละลาย DNA ใสหลอดใหม่จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีกครั้งเพื่อแยกเอา DNA ครั้งที่สองใสลงในหลอดเติมเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ใช้งานต่อไป



### 3.3.9 การดีฟอสฟอรีเลชันของ พลาสมิด DNA ที่เป็นเส้นตรงด้วย thermo-sensitive alkaline phosphatase (FastAP™)

Thermo-sensitive Alkaline Phosphatase (FastAP™) คือเอนไซม์ที่นำมาใช้เพื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากปลายดีเอ็นเอเพื่อป้องกันการกลับมาจับกันเองของพลาสมิดที่ถูกตัดให้เป็นเส้นตรง เพื่อเตรียมพลาสมิดสำหรับเชื่อมต่อกับชิ้นของ DNA ที่ต้องการจะแทรกเข้าไปในพลาสมิด โดยการทำงานของ FastAP™ เอนไซม์จะไปตัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลายด้าน 5' ของพลาสมิดที่ผ่านการตัดให้เป็นเส้นตรงแล้ว ในปฏิกิริยาประกอบด้วย FastAP™ เอนไซม์ 1 U, 1X FastAP buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M KCl, 2 mg/ml Triton X-100 และ 1 mg/ml BSA), พลาสมิด DNA ที่ตัดเป็นเส้นตรง 1 ไมโครกรัม และบ่มที่ 37°C เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่ 75°C เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นทำพลาสมิด DNA ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี silica matrix method เพื่อนำไปสร้างพลาสมิดลูกผสมในขั้นตอนต่อไป

### 3.3.10 การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์กับพลาสมิด DNA

การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการกับพลาสมิด DNA โดยการเชื่อมต่อกันนี้ ชิ้น DNA สองชิ้นที่มีปลายเหนียว (sticky end) ซึ่งมีเบสคู่สมกันก็จะสามารถมาจับกันได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน จากนั้นอาศัยเอนไซม์ DNA ligase เพื่อเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะ 5', 3'-phosphodiester linkage เพื่อเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอสองโมเลกุลในปฏิกิริยาประกอบด้วย ชิ้นยีนที่ต้องการแทรกเข้าพลาสมิดและชิ้นของพลาสมิดที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในอัตราส่วนของชิ้นยีนต่อพลาสมิดเท่ากับ 3:1 molar ratio, 1x reaction buffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP) T4 DNA ligase (1-5 units) โดยปฏิกิริยาทั้งหมดจะถูกบ่มที่ 4°C เป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง

### 3.4 การนำ DNA เข้าไปสู่เซลล์เจ้าบ้านและการคัดเลือกโคลน

#### 3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell)

ในการทดลองนี้จะใช้เชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  เป็นเซลล์เจ้าบ้าน วิธีเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์สำหรับการ transformation โดยใช้วิธี heat shock จะเตรียมโดยใช้ CaCl<sub>2</sub> ซึ่งมีกระบวนการดังนี้

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar โดยวิธีการ streak plate บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลานาน 1 คืน นำเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar จำนวน 1 โคลนี ใส่ในหลอดอาหารเหลว LB ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะบ่มที่ 37°C เป็นเวลานาน 12-16 ชั่วโมง ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จากนั้นดูดเชื้อที่เจริญแล้วมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดอาหารเหลว LB 200 มิลลิลิตร (คิดเป็นความเข้มข้นของเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์) นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลานาน 2-3 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที วัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุกๆ 20-30 นาที โดยให้ค่า OD อยู่ในช่วง 0.4-0.5 จากนั้นแบ่งใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร 2 หลอดเท่าๆ กัน โดยการชั่งน้ำหนัก ด้วยเทคนิคที่ปลอดเชื้อ นำไปตั้งแช่ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่ 4 °C เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน (ไม่ควรใช้เวลานานเกินไป เพราะจะทำให้เซลล์จับแน่นและทำให้เซลล์ตายเมื่อครบเวลา) เทส่วนใสออกเบาๆ และคว่ำบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นละลายตะกอนด้วยวิธีปั่นขึ้นลงด้วยสารละลาย 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ที่เย็นจัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาทีที่ 4 °C จากนั้นเทสารละลายออก คว่ำบนกระดาษทิชชูจนแห้งดีแล้วเติม 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ที่เย็นลงไปหลอดละ 2 มิลลิลิตรเพื่อละลายตะกอนเชื้อ แล้วนำสารละลายเชื้อทั้งสองหลอดมารวมกัน แบ่งใส่ eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 75 ไมโครลิตรและเติมกลีเซอรอล 25 ไมโครลิตร (สุดท้ายได้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลคือ 15 %) ผสมให้

เข้ากันโดยการปั่นอย่างรุนแรง (vortex) จากนั้นทำให้ตัวอย่างแข็งอย่างรวดเร็วโดยแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บใน ตู้เย็น  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อรอใช้งานต่อไป

### 3.4.2 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรียด้วยวิธี heat shock

การนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pGAPZ $\alpha$ A เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เช่น *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่เซลล์ผู้รับ อยู่ในสภาพเซลล์คอมพีเทนต์ ที่พร้อมรับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิดหลังจากการถ่ายดีเอ็นเอแล้ว โดยมีวิธีการดังนี้ นำเซลล์คอมพีเทนต์ 100 ไมโครลิตรจากอุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จำนวน 1 หลอด ทำให้ละลายโดยการใช้น้ำอุ่นจากมือ แล้วพักไว้ในน้ำแข็ง เติม pGAPZ $\alpha$ A plasmid DNA จำนวน 50 นาโนกรัมและผสมเบาๆ ให้เชื่อมกับพลาสมิดผสมกันจากนั้นวางในน้ำแข็ง เป็นเวลานาน 30 นาที นำไปบ่มในอ่างน้ำที่  $42^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นในน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวปริมาณ 900 ไมโครลิตรนำไปบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาแล้วนำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB low salt ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม (ในการทดลองใช้ Zeocin<sup>TM</sup> ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวนเชื้อละ 1 จานเก็บในกล่องที่บ่มแสงและบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตรวจผล จะเห็นโคโลนีขึ้นบนอาหารและหลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มียีนแทรกอยู่ด้วยการเปรียบเทียบขนาดพลาสมิดและทำการเก็บรักษาเชื้อที่มีพลาสมิดลูกผสมในอาหารเหลว LB ผสมกับกลีเซอรอล 60 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$

### 3.4.3 การคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีน SWA2 และยีน GAM1 ด้วยวิธี simplified rapid size screening

การคัดเลือกโคโลนีด้วยวิธี rapid size screening เป็นเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดในโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ zeocin<sup>TM</sup> ซึ่งคาดคะเนว่าเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมอยู่โดยเทียบกับขนาดของพลาสมิดที่ไม่มียีนอยู่ โคโลนีของพลาสมิดที่มียีน จะมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อนำมาแยกด้วย

วิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิสจะวิ่งในเจลได้ช้ากว่าโคลนของพลาสมิดที่ไม่มียีน ซึ่งมีวิธีการดังนี้ ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อป้ายโคลนจาก master plate ครั้งละ 1 โคลน แล้วผสมลงในสารละลาย size screening buffer (5 mM EDTA, 10% (W/V) sucrose, 0.25% (W/V) SDS , 100 mM NaOH, 60 mM KCl) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จนสังเกตเห็นสารละลายหนืดมากขึ้นเนื่องจากเซลล์แตก นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาทีแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูส่วนใสปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ขนาดของพลาสมิดด้วยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับตัวอย่างโคลนที่มีพลาสมิดแต่ไม่มียีนแทรกอยู่ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์นาน 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) นาน 5 นาที และ ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง Gel Documentator และถ่ายรูปเจล

#### 3.4.4 ตรวจสอบและคัดเลือกโคลน

จากการคัดเลือกโคลนด้วยวิธี simplified rapid size screening เป็นการคัดเลือกเบื้องต้นเพื่อหาโคลนที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มียีนแทรกอยู่ ดังนั้นเพื่อให้แน่ใจว่ามียีนแทรกอยู่จริง ต้องทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบขนาดของยีนที่ถูกต้อง และเนื่องจากตำแหน่งในการเชื่อมต่อระหว่างพลาสมิดกับชิ้นของยีน SWA2 หรือยีน GAM1 ใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว ดังนั้นทิศทางของยีนที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดอาจเข้าได้ทั้งสองทิศทางจึงต้องมีการตรวจสอบทิศทางการแทรกของยีนด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pGAP\_F (5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3') ซึ่งจับที่ตำแหน่ง promoter ของพลาสมิด ด้าน 5' และใช้ไพรเมอร์ SWA2\_R หรือ GAM1\_R สำหรับยีน SWA2 หรือยีน GAM1 ตามลำดับ ซึ่งจับที่ตำแหน่งของยีน ด้าน 3' โดยในปฏิกิริยาของวิธี PCR ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมดังแสดงในตาราง 3.6 และผลของ PCR ที่คาดว่าจะได้สำหรับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน SWA2 แทรกในทิศทางที่ถูกต้อง (pSWA2) จะมีขนาดประมาณ 1.8 kb และสำหรับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน GAM1 แทรกในทิศทางที่ถูกต้อง (pGAM1) จะมีขนาดประมาณ 3.1 kb

ตาราง 3.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบทิศทางของยีน *GAM1* และ *SWA2* ด้วยวิธี PCR

Hold	STEP CYCLE (30 cycles)			Hold
95 °C,	Denaturation	Annealing	Extension	72 °C,
3 min	94°C, 30 sec	50°C, 30 sec	72°C, 3 min	5 min

### 3.5 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์และการคัดเลือกโคลน

#### 3.5.1 การเตรียมคอมพีเทนต์ยีสต์

วิธีการเตรียมคอมพีเทนต์ยีสต์ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Suga และ Hatakeyama (2003) นำ 1 โคลนินของยีสต์ที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง YPD ใส่ในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อ จากนั้นถ่ายเชื้อ 1% ใส่ในอาหารใหม่และเลี้ยงให้ยีสต์โตจนมีค่าความขุ่นของเซลล์ถึง 0.4 ( $OD_{600} = 0.4$ ) ซึ่งจะมีเซลล์ประมาณ  $1 \times 10^7$  cell/ml (ประมาณ 6 ซม) นำอาหารที่มีเชื้อยีสต์ไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นเก็บเซลล์ยีสต์ด้วยการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว  $1,600 \times g$  นาน 5 นาที และล้างเซลล์ยีสต์ด้วยน้ำกลั่นที่เย็นจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นละลายเซลล์ด้วยสารละลายที่เย็น freezing buffer (0.6 M sorbitol, 10 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Hepes and pH 7.5) จากนั้นแบ่งคอมพีเทนต์ยีสต์ใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร และแช่ที่อุณหภูมิ  $-80^\circ C$  เพื่อรอใช้งานต่อไป

### 3.5.2 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Electroporation

วิธีการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์ด้วยวิธีการ electroporation ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Suga and Hatakeyama (2003) กระบวนการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าในเซลล์ ทำได้ดังนี้ นำคอมพิเทนต์ยีสต์ที่แช่แข็งมาละลายด้วยอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 30 °C อย่างรวดเร็ว จากนั้นเติมสารละลาย 1.0 M sorbitol ที่เย็น 1 มิลลิลิตรและปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 x g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นดูดสารละลายทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลาย 1.0 M sorbitol ที่เย็นปริมาตร 80 ไมโครลิตร และผสมกับพลาสมิดลูกผสมที่ถูกตัดให้เป็นเส้นตรงแล้วความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม นำหลอดส่วนผสมทั้งหมดวางไว้บนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ cuvette (ขนาดความกว้าง 0.2 cm) ที่เย็น และใส่เครื่องปล่อยกระแสไฟฟ้า (Bio-Rad Gene Pulser) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 3 kv (Sc4 mode) หลังจากให้กระแสไฟฟ้าแล้ว เติมสารละลาย 1.0 M sorbitol ลงใน cuvette อย่างรวดเร็ว แล้วดูดสารละลายทั้งหมดไปใส่หลอด microfuge ใหม่แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 1 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเขย่า จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปแล้วเลี้ยงเชื้อต่อโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลานำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 x g นาน 10 นาที แล้วย้ายเซลล์ทั้งหมดไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มียา zeocin™ และ pH ที่เหมาะสม บ่มที่ 30 °C นาน 3-4 วันหรือจนกระทั่งเห็นโคโลนียีสต์เกิดขึ้น

### 3.5.3 การประเมินหาความเข้มข้นของ zeocin™ ที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกยีสต์

#### ลูกผสม

นำสายพันธุ์ยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา zeocin™ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ค่า pH ต่างๆ ดังนี้ 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 ในระหว่างที่นำยีสต์เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นต่างๆ ของยา zeocin™ และค่า pH ต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในที่มีดเป็นเวลานาน 2 วัน จากนั้นตรวจสอบผลการดื้อยาของยีสต์ที่ความเข้มข้นของยาและที่

ค่า pH ที่น้อยที่สุดที่ยีสต์ไม่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นและค่า pH ที่เหมาะสมในการคัดเลือกโคลน

### 3.6 การตรวจสอบการทำงานได้ของ $\alpha$ -amylase และ glucoamylase

#### 3.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *SWA2* และ *GAM1* ในยีสต์ลูกผสม

การตรวจสอบการสร้างและการหลั่งเอนไซม์  $\alpha$ -amylase หรือ glucoamylase ได้ดัดแปลงวิธีการมาจาก Eksteen et al. (2003) และ Kang et al. (2003) ซึ่งนำยีสต์ที่ผ่านการแทรกของยีนมาทดสอบการสร้างและการหลั่งเอนไซม์บนอาหารแข็งที่มีแบ่งเป็นส่วนผสม (YPDS2) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 10 วัน และบ่มต่อที่ 4°C นาน 2 วัน จากนั้นรดด้วยสารละลายไอโอดีน [1.5% (w/v) I<sub>2</sub> และ potassium iodide 5% (w/v) KI] ลงบนจานอาหาร สังเกตวงใสรอบๆ โคลินี่ที่เกิดขึ้นบันทึกผล

#### 3.6.2 การยืนยันการแทรกของยีน *SWA2* หรือ *GAM1* ในโครโมโซมของยีสต์ ด้วยวิธี PCR

การยืนยันการแทรกของยีน *SWA2* หรือ *GAM1* ในโครโมโซมของยีสต์ตรวจสอบได้ด้วยวิธี PCR โดยใช้จีโนม ของยีสต์ลูกผสมเป็นแม่แบบปริมาณ 100 ng และ 1 x PCR buffer (75 mM HCl, pH 8.7), 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> และ 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol ของไพรเมอร์แต่ละคู่ เอนไซม์และสารต่างๆ (200  $\mu$ M dNTPs และ 1.25 unit *Taq* DNA polymerase) ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังตาราง 3.3.3 และ 3.3.4

#### 3.6.3 การตรวจสอบกิจกรรมของ glucoamylase และ $\alpha$ -amylase ในอาหารเหลว

3.6.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บอาหารเหลวสำหรับใช้ทดสอบกิจกรรมของ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase

วิธีการในการเลี้ยงยีสต์ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ได้ดัดแปลงวิธีการมาจาก Liao et al. (2012) และ Wong et al. (2002) โดยเลือกยีสต์ลูกผสมที่มีขนาดของวงใสที่ใหญ่ที่สุดจากการ

ทดสอบด้วยวิธี 3.6.1 ของสองสายพันธุ์นำไปเลี้ยงในขวดอาหารเหลว YPD ปริมาตร 5 ml และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว YPG (คล้าย YPD แต่ใช้กลีเซอรอลแทนกลูโคส) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน หรือจนกระทั่งเซลล์มีค่า OD<sub>600</sub> ≥ 11 จากนั้นเก็บหลอดละ 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,500 × g นาน 1 นาที จากนั้นนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ของแต่ละสายพันธุ์ไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองภายในเวลา 48 ชั่วโมง โดยรายงานกิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วย ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร

### 3.6.3.2 การหากิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase

กิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase จากเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ดังกล่าวสามารถหาได้จากอัตราการย่อยแป้งซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา โดยเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วจะได้น้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลรีดิทซ์ และสามารถวัดน้ำตาลที่เกิดขึ้นได้ด้วย DNS method ดังนี้ นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์อยู่มา 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายแป้งในปริมาณที่เท่ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย DNS จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดอีก 15 นาทีและเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตรและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งภายในเวลาที่กำหนด โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (ใช้สารละลายกลูโคส 0.1-1.0 mg/ml) (APPENDIX B) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase 1 ยูนิต์ หาได้จากปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตน้ำตาล 1 μmol ได้ภายในเวลา 1 นาที

### 3.6.3.3 การหากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase

การหากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ด้วยวิธี iodine assay ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้แม่นยำกว่าวิธีอื่น (Fuwa, 1954; Xiao et al. 2006) เพราะเนื่องจาก α-amylase จะย่อยโมเลกุลของแป้งและได้ผลผลิตที่ไม่ใช่น้ำตาลทั้งหมดซึ่ง ได้แก่ กลูโคสและเด็คทรีน ซึ่งสารละลายดังกล่าวไม่สามารถจับกับโมเลกุลของไอโอดีนได้จึงทำให้เกิดสีที่จาง



ลงทำให้สามารถทราบปริมาณแป้งที่ลดลงในสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาการย่อยแป้งแล้ว (Priest, 1977)

การเตรียมสารละลายแป้งสำหรับเป็นสารตั้งต้นสำหรับทำปฏิกิริยาทำได้โดย เตรียมสารละลายแป้ง 1% โดยนำไปต้มใน 0.4 M sodium acetate buffer (pH 5.0) เป็นเวลา 15 นาทีทิ้งให้เย็น ก่อนนำไปใช้ นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์ผสมอยู่มา 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายแป้งในปริมาณที่เท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลา เติม 1.0 M HCl จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์และเติมสารละลายไอโอดีน [0.2% (w/v) I<sub>2</sub> and 2% (w/v) KI] 1 มิลลิลิตร และเจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร (1 ยูนิทของเอนไซม์ คือ  $U/ml = (A_{580} \text{ control} - A_{580} \text{ sample}) \div A_{580}/mg \text{ starch} \div 30 \text{ min} \div 1 \text{ ml}$ ) เปรียบเทียบกับค่ากราฟมาตรฐาน (APPENDIX B) ซึ่งยูนิทของเอนไซม์หาได้จากการลดลงของสีของแป้งที่เหลือจากการย่อยที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน

### 3.7 การหมักเอทานอลและการวิเคราะห์

#### 3.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการหมัก

การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นของยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรม 2 สายพันธุ์ ได้ทำตามวิธีของ Souza et al. (2007) และ Yamada et al. (2011) โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์จาก 1 โคลนียของยีสต์ที่อยู่บนจานอาหาร YPDS2 ที่มีขนาดวงใสที่เกิดจากการย่อยแป้งได้มากที่สุด มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยการบ่มที่ 30 °C และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 คืน จากนั้นย้ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวชนิด YPC medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยการบ่มที่ 30 °C และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10-12 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้ค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 1.0 จากนั้นเก็บเชื้อปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ใส่หลอดอาหารขนาด 50 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 × g ที่ 4 °C เป็นเวลานาน 5 นาที เพื่อจะเก็บเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ไปล้างด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่เย็น ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้งและละลาย

เซลล์ในอาหารเหลว YPC medium ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร เพื่อเติมใส่ในขวดหมักที่มีอาหารเหลว YPC medium ปริมาตร 85.5 มิลลิลิตร [10 % (v/v) inoculums]

### 3.7.2 สภาพที่ใช้ในการหมักเอทานอล

ขนาดของขวดที่ใช้ในการศึกษาการหมักครั้งนี้ใช้ขวดที่มีขนาด 120 มิลลิลิตร โดยปากขวดจะปิดให้แน่นด้วยจุกยางแล้วครอบอัดให้แน่นด้วย aluminum vial seals cap อาหารเหลว YPC medium คืออาหารที่ใช้ในการศึกษาการหมัก จะมีส่วนประกอบของ แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร และมีค่า pH เท่ากับ 5.0 สภาพที่ใช้ในการหมัก คือที่อุณหภูมิ 30 °C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที (การเขย่ามีวัตถุประสงค์เพื่อให้อาหารและเชื้อไม่ตกตะกอนที่ก้นขวด และทำให้อาหารได้สัมผัสกับเชื้อมากขึ้น) จากงานวิจัยของ Sukairi et al. (2008) ได้ศึกษาความแรงในการเขย่าที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพการหมักที่ดีที่สุดและมีการสร้างเอทานอลที่มากที่สุดในการหมักเอทานอลด้วย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ดัดแปลงให้สามารถย่อยแป้งได้ และใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองที่ได้พบว่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำให้เซลล์สัมผัสกับอาหารมากขึ้นและทำให้มีเปลี่ยนโมเลกุลของแป้งไปเป็นน้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้น ตลอดระยะเวลาการหมักจะดำเนินการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมัก ได้แก่ ปริมาณเอทานอล ปริมาณแป้งที่เหลือจากการย่อย ปริมาณเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งพลังงาน เพียงอย่างเดียว (cell dry weight) ตลอดระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการหมัก 24 วัน

### 3.7.3 การหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight)

น้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ cell dry weight (กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อ 1 มิลลิลิตรของน้ำหมัก) เนื่องจากในอาหารที่ใช้หมักมีแป้งเป็นส่วนประกอบดังนั้นต้องมีการกำจัดแป้งออกจากน้ำหมักที่มีเซลล์ ตามวิธีของ Soni et al. (1992) ดังนี้ ตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บจากขวดหมักทุกๆ 3 วัน นำเอนไซม์  $\alpha$ -amylase (sigma) 20 ไมโครลิตร เติมใส่น้ำหมัก 1 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยแป้งให้เป็นเป็นสารละลายเด็คทรีนจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

ด้วยความเร็วรอบสูงสุดที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 10 นาที ดูดสารละลายเดรีกตรินออก จะเหลือเพียงตะกอนเซลล์ยีสต์ จากนั้นละลายเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำไปอบให้แห้งที่ 105 °C เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้งและชั่งน้ำหนักเซลล์ที่ได้ และบันทึกผล

#### 3.7.4 การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของแป้งที่เหลือ

การหาปริมาณแป้งที่เหลือจากการย่อยด้วยยีสต์ที่ผ่านการตัดแปลงพันธุกรรมใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Liao et al. (2012) โดยนำน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร ที่เก็บมาจากการหมักและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นำมาละลายในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้องและจากนั้นนำไปต้มนาน 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมัก 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร [iodine solution (0.2% (w/v) I<sub>2</sub>, 2% (w/v) KI<sub>2</sub>)] และเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เพื่อวัดค่า OD สุดท้ายของสารละลายที่มีความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร คำนวณปริมาณแป้งที่เหลือจากกราฟมาตรฐานที่ใช้แป้งมัน ความเข้มข้น 0-1 กรัมต่อลิตร (APPENDIX B)

#### 3.7.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเอทานอลโดยใช้เครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography; Model 1200 series, Agilent Technology) จากตัวอย่างน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร ที่เก็บจากขวดหมักเตรียมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดของเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนสารละลายออกจากตะกอน จากนั้นเอาส่วนสารละลายทั้งหมดไปกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC โดยเครื่องจะฉีดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ครั้งละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นคำนวณหาเอทานอลที่ได้ตามค่าทางทฤษฎีผลผลิตสูงสุดของเอทานอลจากกลูโคส 100 กรัม เปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 51.1 กรัม (Ingledew, 1993)

### 3.8 สถานที่ทำการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัด

นครราชสีมา 30000



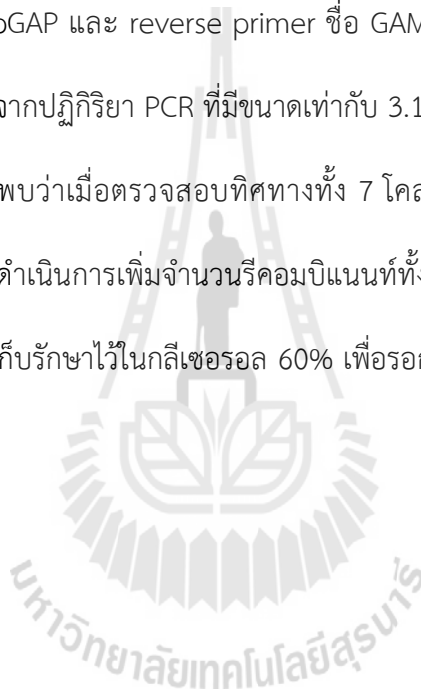
## บทที่ 4

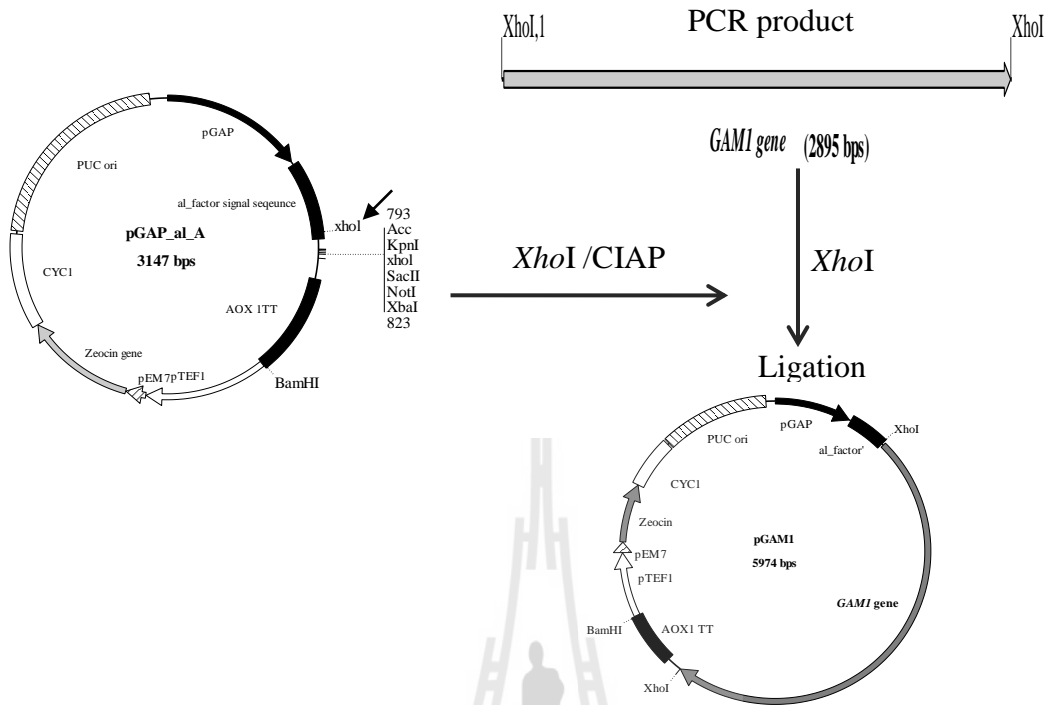
### ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

#### 4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกของยีน *GAM1* (รูปภาพที่ 4.1)

ยีน *GAM1* สามารถตัดลอกเพิ่มจำนวนมาจากจีโนมของยีสต์สายพันธุ์ *D. occidentaris* โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะ forward primer ชื่อ *GAM1\_2F* และ reverse primer ชื่อ *GAM1\_2R* โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (รายละเอียดแสดงไว้ในบทที่ 3 หัวข้อ 3.3.3) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จะได้ยีนที่มีขนาดประมาณ 2.8 กิโลเบส (kb) จากนั้นนำผลผลิตจาก PCR ของยีน *GAM1* ไปทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่แสดงในบทที่ 3 หัวข้อ 3.3.8 และย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำอยู่ที่ปลาย 5' และ 3' ของยีน *GAM1* เพื่อนำชิ้นยีนแทรกเข้าไปในพลาสมิด *pGAPZ $\alpha$ A* ที่มีขนาด 3.1 kb โดยพลาสมิด *pGAPZ $\alpha$ A* มีตำแหน่ง *XhoI* อยู่ที่ multiple cloning size ของพลาสมิด หลังจากตัดพลาสมิดเป็นเส้นตรงแล้ว ต้องนำหมู่ฟอสเฟตออกจากปลาย 5' ด้วยการดีฟอสฟอรีเลชันด้วยเอนไซม์ FastAP (รายละเอียดแสดงไว้บทที่ 3 หัวข้อ 3.3.9) เพื่อป้องกันการกลับมาจับกันเองของพลาสมิดอีกครั้ง เมื่อเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอและชิ้นของ *GAM1* เรียบร้อยแล้ว ลำดับต่อไปคือการเชื่อมทั้งสองชิ้นส่วนเข้าด้วยกันและนำเข้าสู่คอมพริเทนท์แบคทีเรีย *E. coli* TOP10 ที่มีความพร้อมสำหรับรับเอาพลาสมิดลูกผสมเข้าไปได้ (รายละเอียดแสดงไว้บทที่ 3 หัวข้อ 3.4.1) พบว่าหลังจากสร้าง พลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกของยีน *GAM1* แล้ว พลาสมิดลูกผสมจะต้องมีขนาดเท่ากับ 5.9 kb โดยจะต้องมีการตรวจสอบโคลนที่สามารถขึ้นบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin™ ได้ โดยใช้หลักการเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดที่คาดคะเนว่าเป็นพลาสมิดลูกผสมโดยเทียบกับขนาดของพลาสมิดที่ไม่มียีน *GAM1* อยู่ ด้วยวิธี rapid size screening method (รายละเอียดแสดงไว้บทที่ 3 หัวข้อ 3.4.3) พบว่า มี 7 โคลนที่มีขนาดพลาสมิดใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิดลูกผสม จากนั้นนำทั้ง

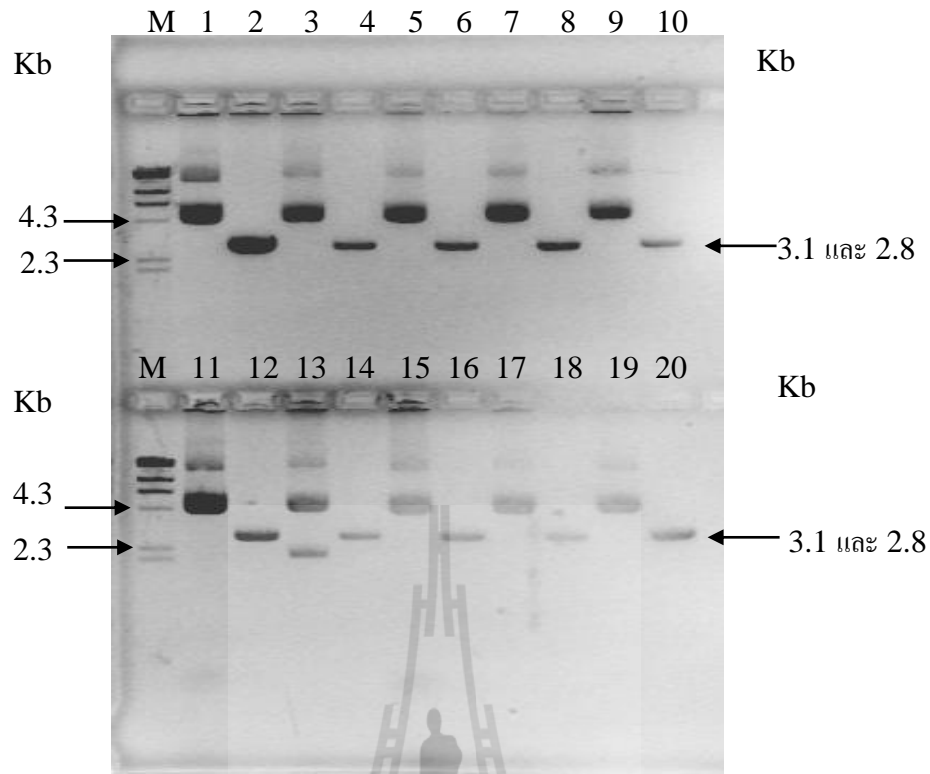
7 โคลนมาตรวจสอบหาการแทรกของยีน *GAM1* ด้วยวิธีการย่อยด้วยรีสทริกชันเอนไซม์ *XhoI* ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pGAPZ $\alpha$ A มีขนาด 3.1 kb และยีน *GAM1* ที่มีขนาด 2.8 kb โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟรีซิส (รูปภาพที่ 4.2) แต่การแทรกของยีน *GAM1* ใน พลาสมิดสามารถเข้าได้ทั้งสองทิศทาง เนื่องจากใช้ตำแหน่งการเข้าที่ตำแหน่งของ *XhoI* เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น ดังนั้นจำเป็นต้องดำเนินการตรวจสอบทิศทาง การเข้าของยีนซึ่งใช้วิธีการตรวจสอบด้วยวิธี PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพเมอร์คู่ pGAP\_F และ GAM1\_2R โดยใช้ forward primer ชื่อ pGAP\_F เพื่อเข้าจับที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ pGAP และ reverse primer ชื่อ GAM1\_2R หากมีการเข้าของยีนในทิศทางที่ถูกต้องจึงจะได้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่มีขนาดเท่ากับ 3.1 kb (รายละเอียดแสดงไว้บทที่ 3 หัวข้อ 3.4.4) จากการทดสอบพบว่าเมื่อตรวจสอบทิศทางทั้ง 7 โคลน มีการเข้าของยีนในทิศทางที่ถูกต้อง (รูปภาพที่ 4.3) จากนั้นดำเนินการเพิ่มจำนวนรีคอมบิแนนท์ทั้งหมดโดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin™ อยู่แล้วเก็บรักษาไว้ในกลีเซอรอล 60% เพื่อรอการใช้งานต่อไป





รูปภาพที่ 4.1 ขั้นตอนการสร้างพลาสมิดลูกผสม pGAM1

ยีน *GAM1* ที่ตัดลอกและเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR ขนาด 2.8 kb ถูกย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และเชื่อมต่อเข้าไปที่ตำแหน่ง *XhoI* ของพลาสมิด pGAPZ $\alpha$  ที่มี ขนาด 3.1 kb ซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และดีฟอสฟอริเลชัน ได้เป็นพลาสมิดลูกผสมชื่อ pGAM1 ที่มีขนาดเท่ากับ 5.9 kb



รูปภาพที่ 4.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I เพื่อตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pGAM1

จากรูปแสดงผลของ 0.8 % เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของพลาสมิดลูกผสมหมายเลขที่คัดเลือกไว้จากวิธี rapid size screening method นำไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I เพื่อตรวจสอบการแทรกของยีน *GAM1* พบว่า มีดีเอ็นเอขนาดต่างกันสองขนาด ได้แก่ ยีน *GAM1* ขนาด 2.8 kb และ pGAPZ $\alpha$ A ที่มีขนาด 3.1 kb

ช่อง M: DNA marker

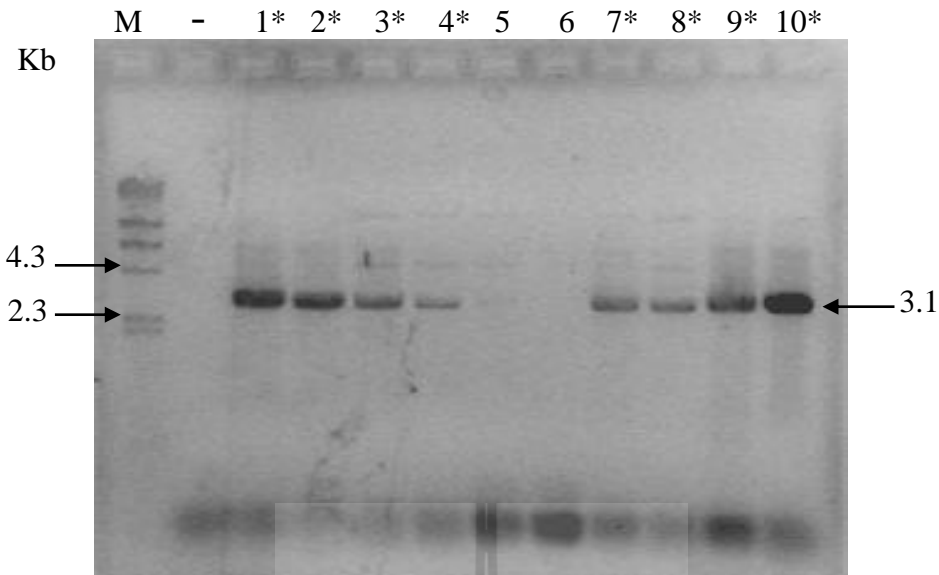
ช่อง 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 และ 19: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ยังไม่ย่อยด้วย

*Xho*I

ช่อง 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ถูกย่อยด้วย

*Xho*I





รูปภาพที่ 4.3 การตรวจสอบทิศทางการแทรกของยีน *GAM1* ในพลาสมิด pGAM1 ด้วยวิธี PCR

จากรูปแสดงผลของ 0.8 % เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของโคลนที่คัดเลือกไว้ (7 8 33 35 41 45 57 58 63 65) ใช้เป็นแม่แบบ นำมาการตรวจสอบทิศทางการเข้าของยีน *GAM1* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ forward primer ชื่อ pGAP\_F เพื่อเข้าจับที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ pGAP และ reverse primer ชื่อ *GAM1\_2R* เครื่องหมาย \* คือโคลนที่มีทิศทางในการแทรกของยีนที่ถูกต้องซึ่งจะได้ผลผลิตจาก PCR เท่ากับ 3.1 kb

ช่อง M: DNA marker

ช่อง - : Negative control ใช้พลาสมิด pGAPZ $\alpha$ A เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR

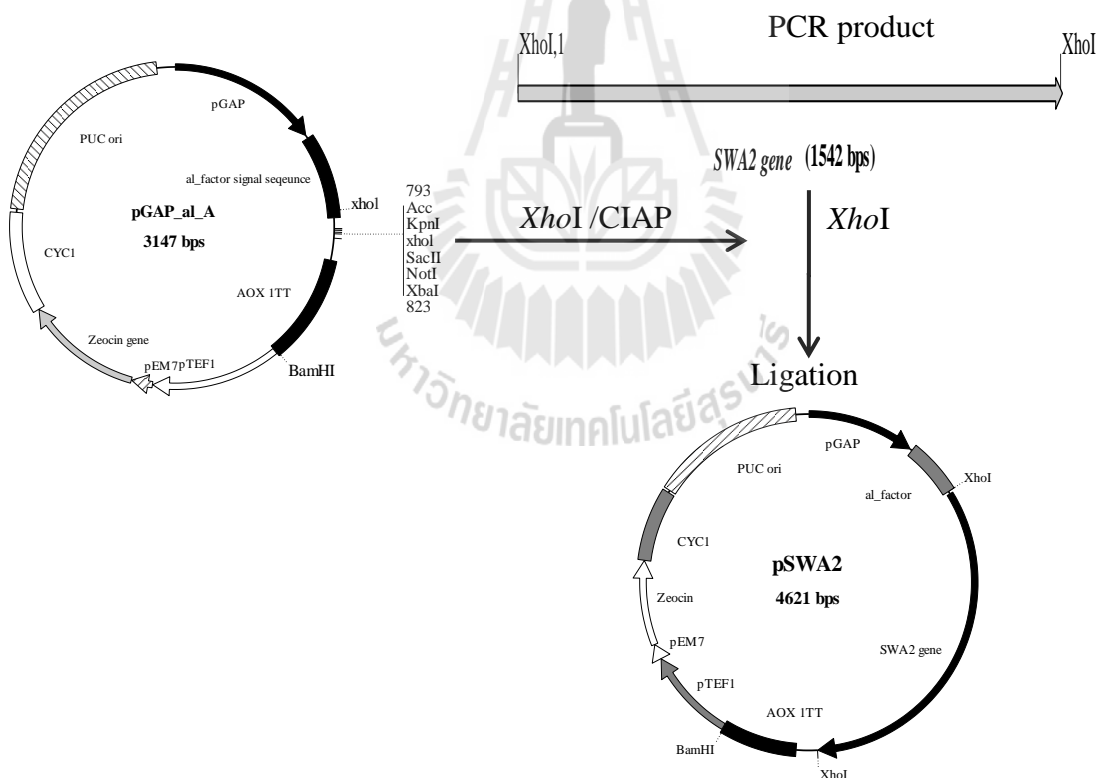
ช่องที่ 1-10: ผลผลิต PCR จากโคลนที่ 7, 8, 33, 35, 41, 45, 57, 58, 63 และ 65

ตามลำดับ

#### 4.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกของยีน SWA 2 (รูปภาพที่ 4.4)

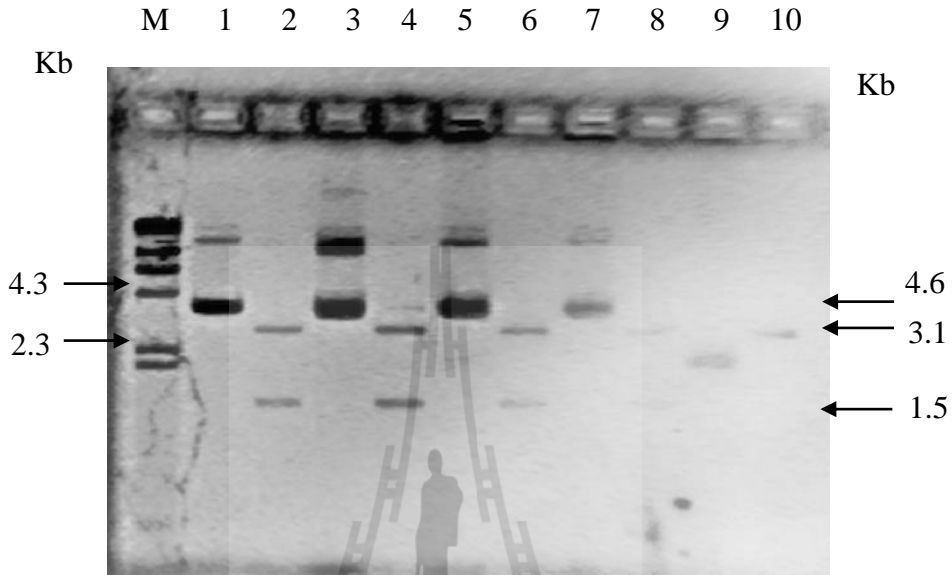
ยีน SWA 2 สามารถคัดลอกเพิ่มจำนวนมาจากจีโนมของยีสต์สายพันธุ์ *D. occidentaris* โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะ forward primer ชื่อ SWA2\_F และ reverse primer ชื่อ SWA2\_R โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (รายละเอียดแสดงไว้ในบทที่ 3 หัวข้อ 3.3.4) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR จะได้ยีนที่มีขนาด 1.5 kb จากนั้นนำผลผลิตจาก PCR ของยีน SWA2 ไปทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีที่แสดงในบทที่ 3 หัวข้อ 3.3.8 และย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำอยู่ที่ปลาย 5' และ 3' ของยีน SWA2 เพื่อนำชิ้นยีนที่ได้แทรกเข้าไปในพลาสมิด pGAPZ $\alpha$  ที่ตำแหน่ง *XhoI* โดยพลาสมิด pGAPZ $\alpha$  ซึ่งมีขนาด 3.1 kb ต้องย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* ด้วยเช่นกัน พร้อมทั้งกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจากปลายด้าน 5' พลาสมิดด้วยการดีฟอสฟอรีเลชันด้วยเอนไซม์ FastAP (รายละเอียดแสดงไว้ในบทที่ 3 หัวข้อ 3.3.9) เพื่อป้องกันการกลับมาจับกันเองของพลาสมิดอีกครั้ง เมื่อเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอและชิ้นของ SWA2 เรียบร้อยแล้ว ลำดับต่อไปคือการเชื่อมทั้งสองชิ้นส่วนเข้าด้วยกันและนำเข้าสู่คอมพริเทนท์แบคทีเรีย *E. coli* TOP10 ที่มีความพร้อมสำหรับรับพลาสมิดลูกผสมเข้าไป (รายละเอียดแสดงไว้ในบทที่ 3 หัวข้อ 3.4.1) จากการทดลองพบว่าหลังจากสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกของยีน SWA 2 แล้ว พลาสมิดลูกผสมต้องมีขนาดประมาณ 4.6 kb โดยจะต้องมีการตรวจสอบโคลนที่สามารถขึ้นบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin ได้ โดยใช้หลักการเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดที่คาดว่าจะจะเป็นพลาสมิดลูกผสมกับขนาดของพลาสมิดที่ไม่มียีน SWA2 อยู่ ด้วยวิธี rapid size screening method (รายละเอียดแสดงไว้ในบทที่ 2 หัวข้อ 9.1) ผลการทดลองพบว่า มี 5 โคลนที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของพลาสมิดลูกผสม จากนั้นนำทั้ง 5 โคลนมาตรวจสอบหาการแทรกของยีน SWA2 ด้วยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pGAPZ $\alpha$  มีขนาด 3.1 kb และยีน SWA2 ที่มีขนาด 1.5 kb โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการตรวจสอบการแทรกของยีน SWA2 ของทั้ง 5 โคลนพบขนาด 1.5 kb ของยีนแทรกอยู่ทุกโคลน (รูปภาพที่ 4.5) แต่การแทรกของยีน SWA2 ในพลาสมิดสามารถเข้า

ได้ทั้งสองทิศทางเนื่องจากใช้ตำแหน่งการเข้าที่ตำแหน่งของ *XhoI* เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น ดังนั้นจำเป็นต้องดำเนินการตรวจสอบทิศทางของการเข้าของยีนซึ่งใช้วิธีการตรวจสอบด้วยวิธี PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์คู่ pGAP\_F และ SWA2\_R โดยใช้ forward primer ชื่อ pGAP\_F เพื่อเข้าจับที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ pGAP และ reverse primer ชื่อ SWA2\_R จับที่ปลาย 3' ของยีน หากมีการแทรกของยีนในทิศทางที่ถูกต้องจะได้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่มีขนาดเท่ากับ 1.8 kb (รายละเอียดแสดงไว้บทที่ 3 หัวข้อ 3.4.4) จากผลการตรวจสอบทิศทางแทรกของยีนพบว่าเมื่อตรวจสอบทิศทางทั้ง 5 โคลน คือ โคลนที่ 1 2 3 4 และ 5 มีการเข้าของยีนในทิศทางที่ถูกต้อง โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (รูปภาพที่ 4.6) จากนั้นดำเนินการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียลูกผสมทั้งหมดโดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin™ อยู่แล้วเก็บรักษาไว้ในกลีเซอรอล 60% เพื่อรอการใช้งานต่อไป



รูปภาพที่ 4.4 ขั้นตอนการสร้างพลาสมิดลูกผสม pSWA2

นำยีน *SWA2* ที่คัดลอกและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ขนาด 1.5 kb ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และเชื่อมต่อเข้าไปที่ตำแหน่ง *XhoI* ของพลาสมิด *pGAPZ $\alpha$ A* ขนาด 3.1 kb ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และดีฟอสฟอริเลชัน ได้พลาสมิดลูกผสมชื่อ *pSWA2* ที่มีขนาด 4.6 kb



**รูปภาพที่ 4.5** การย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* เพื่อตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม *pSWA2*

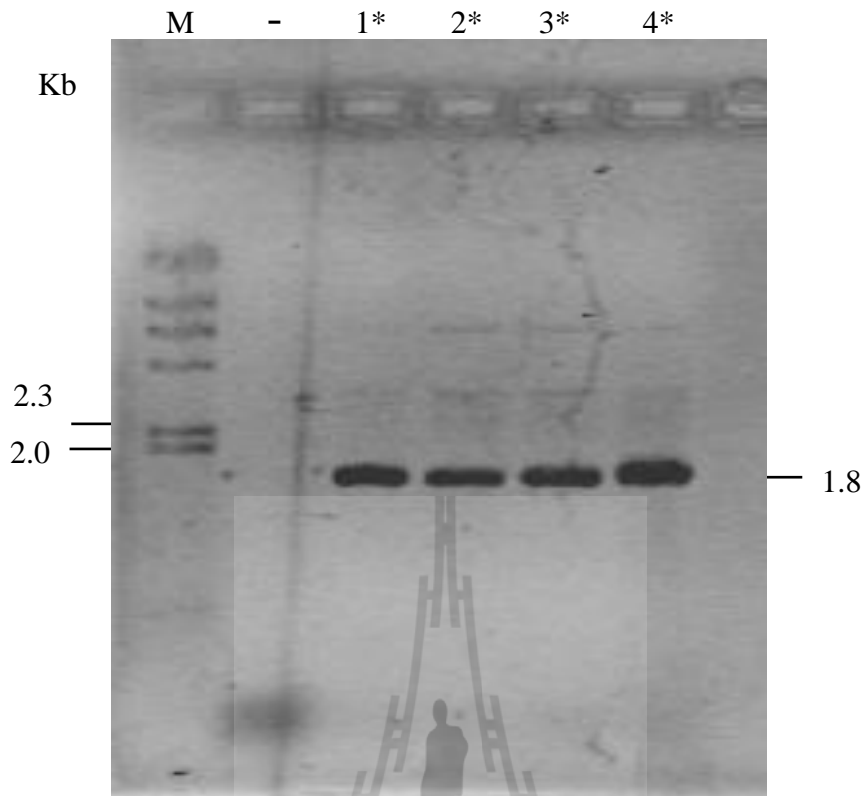
จากรูปแสดงผลของ 0.8 % เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของพลาสมิดลูกผสม หมายเลขที่คัดเลือกได้จากวิธี rapid size screening method นำไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* เพื่อตรวจสอบการแทรกของยีน *SWA2* พบว่ามีดีเอ็นเอขนาดต่างกันสองขนาด ได้แก่ ยีน *SWA2* ขนาด 1.5 kb และ *pGAPZ $\alpha$ A* ที่มีขนาด 3.1 kb

ช่อง M: DNA marker

ช่องที่ 1, 3, 5, 7, 9: พลาสมิดลูกผสมที่ยังไม่ย่อยด้วย *XhoI* ซึ่งขนาดประมาณ 4.6 kb

ช่องที่ 2, 4, 6, 8, 10: พลาสมิดลูกผสมที่ถูกย่อยด้วย *XhoI* แล้ว พบว่ามีดีเอ็นเอขนาด

ต่างกันสองขนาดที่มีขนาด ได้แก่ ยีน *SWA2* ขนาด 1.5 kb และ *pGAPZ $\alpha$ A* ที่มีขนาด 3.1 kb



รูปภาพที่ 4.6 การตรวจสอบทิศทางการแทรกของยีน SWA2 เข้าไปในพลาสมิด pGAPZ $\alpha$  ด้วยวิธี PCR

คัดเลือกพลาสมิดลูกผสมทั้งหมดที่มีการแทรกของยีน SWA 2 อยู่แล้ว นำมาการตรวจสอบทิศทางการเข้าของยีน SWA2 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ forward primer ชื่อ pGAP\_F เพื่อเข้าจับที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ pGAP และ reverse primer ชื่อ SWA2\_R เครื่องหมาย \* คือหมายเลขโคลนที่มีทิศทางการแทรกของยีนที่ถูกต้องโดยจะได้ผลผลิต PCR เท่ากับ 1.8 kb

ช่อง M: DNA marker

ช่อง -: Negative control ใช้พลาสมิด pGAPZ $\alpha$  เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR

ช่องที่ 1-4: ผลผลิต PCR ของโคลนที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับได้ขนาดเท่ากับ

1.8 kb

### 4.3 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่จีโนมของยีสต์

เพื่อที่จะสร้าง ยีสต์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ ที่มีการแทรกและการแสดงออกของแต่ละยีนแยกกัน ดังนั้น พลาสมิดลูกผสม pGAM1 และ pSWA2 จึงถูกนำเข้าสู่จีโนมยีสต์ด้วยวิธี electroporation (รายละเอียดแสดงไว้บทที่ 3 หัวข้อ 3.5.2) โดยการแทรกยีนเข้าสู่จีโนมของยีสต์ด้วย พลาสมิดลูกผสมแต่ละพลาสมิด ผลที่ได้ หลังจากได้ทำการถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าไปในยีสต์แต่ละพลาสมิดแล้ว พบว่า ได้สายพันธุ์ยีสต์ใหม่สำหรับยีน *GAM1* ทั้งหมด 8 โคลน และได้สายพันธุ์ยีสต์ใหม่สำหรับยีน *SWA2* ทั้งหมด 5 โคลนที่สามารถขึ้นบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin™ ปริมาณ 25 µg/ml ได้ ดังนั้นจึงคาดการณ์ว่า โคลนทั้งหมดที่สามารถโตบนอาหารนี้ได้มีกิจกรรมการแสดงออกของยีนที่ต่ออายุ Zeocin™ ได้

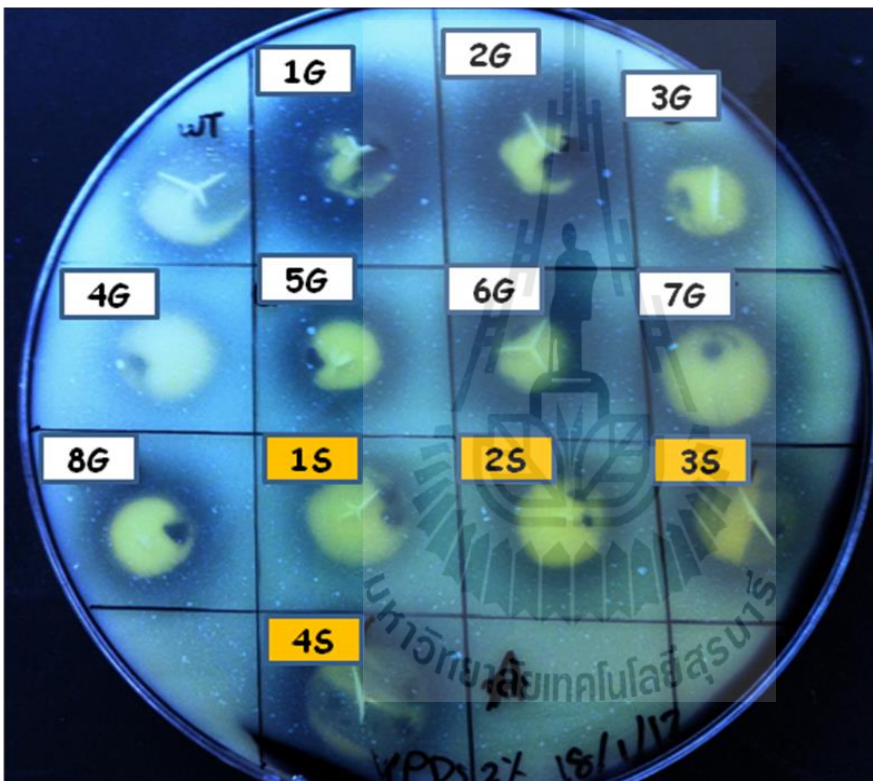
### 4.4 การตรวจสอบและคัดเลือกยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *GAM1* และ *SWA2*

โคลนของยีสต์ทั้งหมดที่สามารถโตได้บนอาหารที่มียา Zeocin™ (130 µg/ml) ถูกคัดแยกออกมาเพื่อตรวจสอบกิจกรรมการแสดงออกของเอนไซม์ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase บนอาหารแข็งที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ โคลนของยีสต์ลูกผสมทั้งหมดจากยีน *GAM1* และ *SWA2* ถูกเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบเป็นเวลา 10 วัน และแช่ที่ 4°C เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เห็นลักษณะของบริเวณสีที่มีการย่อยแป้งรอบๆ โคลนที่ชัดเจนขึ้น จากนั้นเทสารละลายไอโอดีนบนจานอาหารแข็งให้ทั่วจาน บริเวณที่ยังไม่มีการย่อยแป้งจะเกิดปฏิกิริยาการจับกันของโมเลกุลแป้งกับสารละลายไอโอดีนเห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนบริเวณที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ยีสต์ได้หลั่งออกมาบนจานอาหารจะเกิดการย่อยแป้ง จะเห็นเป็นวงใสๆ รอบ โคลนนี้ จากผลการทดลองพบว่า ยีสต์ลูกผสมมีการแสดงออกของยีน *GAM1* (*S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1) ทั้งหมด 8 โคลน โดยให้ชื่อดังนี้ TISTR 5596/pGAM1#1G, #2G, #3G, #4G, #5G, #6G, #7G และ #8G ตามลำดับและยีสต์ลูกผสมที่มีการแสดงออกของยีน *SWA2* (*S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2) ทั้งหมด 4 โคลนโดยให้ชื่อดังนี้ TISTR 5596/pSWA2#1S, #2S, #3S และ #4S ตามลำดับ(รูปภาพที่ 4.7) และได้คัดเลือกโคลน TISTR

5596/pGAM1#1G สำหรับสายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์ glucoamylase และ โคลน TISTR 5596/pSWA2#1S สำหรับสายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ที่มีขนาดวงเสี้ยวมากที่สุดในการศึกษาความสามารถในการหมักและหาปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยแป้งต่อไป

ดังนั้นการสร้างยีสต์สองสายพันธุ์ให้มีการสร้างเอนไซม์ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase และสามารถย่อยแป้งได้ประสบความสำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของเอนไซม์ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase ทั้งสองสายพันธุ์ยังคงมีปริมาณน้อยและต้องใช้ระยะเวลาานาน ผลที่เกิดขึ้นดังกล่าวอาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพของ Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase promoter (GAP promoter) จาก *P. pastoris* ได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในยีสต์ *S. cerevisiae* ยังคงไม่เหมาะสม แม้ว่ามีงานวิจัยของ Vellanki et al., 2007 ที่รายงานการใช้ GAP promoter จาก *P. pastoris* นำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน HBsAg ใน *S. cerevisiae* ได้เป็นอย่างดีก็ตาม ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว promoter ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านส่วนใหญ่มักจะเป็น promoter ที่พบในเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจากในกระบวนการแสดงออกของโปรตีนภายใต้การทำงานชุด promoter ต้องอาศัยกลไกในการจับของเอนไซม์ RNA polymerase ที่ตำแหน่งของ promoter เพื่อเรียกเอนไซม์หรือแฟกเตอร์ต่างๆเข้ามาช่วยเริ่มต้นในการสังเคราะห์ RNA จากสายของ DNA ของยีนที่ศึกษา บริเวณลำดับเบสของ promoter รวมทั้งความสามารถในการจับของเอนไซม์ RNA polymerase ที่ดีจะช่วยให้มีการแสดงออกของยีนได้ดี (Porro et al., 2005) ดังนั้น promoter ที่เหมาะสมกับเซลล์เจ้าบ้านจึงมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการศึกษา และหากบริเวณจำเพาะของลำดับเบสบน promoter มีการเปลี่ยนแปลงไปอาจจะมีการเลื่อนตำแหน่งหรือลำดับเบสบางตัวขาดหายไป (การกลายหรือเกิด mismatch กับลำดับเบสของดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะ) จะมีผลทำให้ความสามารถในการทำหน้าที่ของ promoter ลดต่ำลงหรืออาจไม่สามารถทำงานได้เลย (David และ Michael 1982) แต่อย่างไรก็ตาม เหตุผลของการใช้ GAP promoter ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจาก GAP promoter เป็น

constitutive promoter ที่ทำงานหรือแสดงออกได้เองตลอดเวลาโดยไม่ต้องมีตัวชักนำให้มีการแสดงออก เพราะการที่มีตัวชักนำหรือการมีสารบางอย่างที่ช่วยชักนำให้มีการแสดงออกนั้นจะทำให้มีการปนเปื้อนกับโปรตีนตัวอย่างที่เราศึกษาการแสดงออกได้และต้องเสียเวลาในการสกัดแยกอีกครั้ง แต่อย่างไรก็ตาม ยังงานวิจัยอื่นที่เลือกใช้ constitutive promoter ที่เป็นของเซลล์เจ้าบ้านเองมาใช้เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ (Ghang et al., 2007; Kim et al., 2010; Kim et al., 2011)



รูปภาพที่ 4.7 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ลูกผสมที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase บนจานอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ

การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ลูกผสมที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ glucoamylase ได้แก่ สายพันธุ์ 1G, 2G, 3G, 4G, 5G, 6G, 7G และ 8G และการแสดงออกของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้แก่ สายพันธุ์ 1S, 2S, 3S และ 4S ด้วยวิธีการตรวจสอบบริเวณที่แป้งถูกย่อยโดยการทำปฏิกิริยาของสารละลายไอโอดีน ส่วนยีสต์ wild type (WT) ไม่มีการย่อยแป้งเกิดขึ้นหรือไม่มีการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสอง

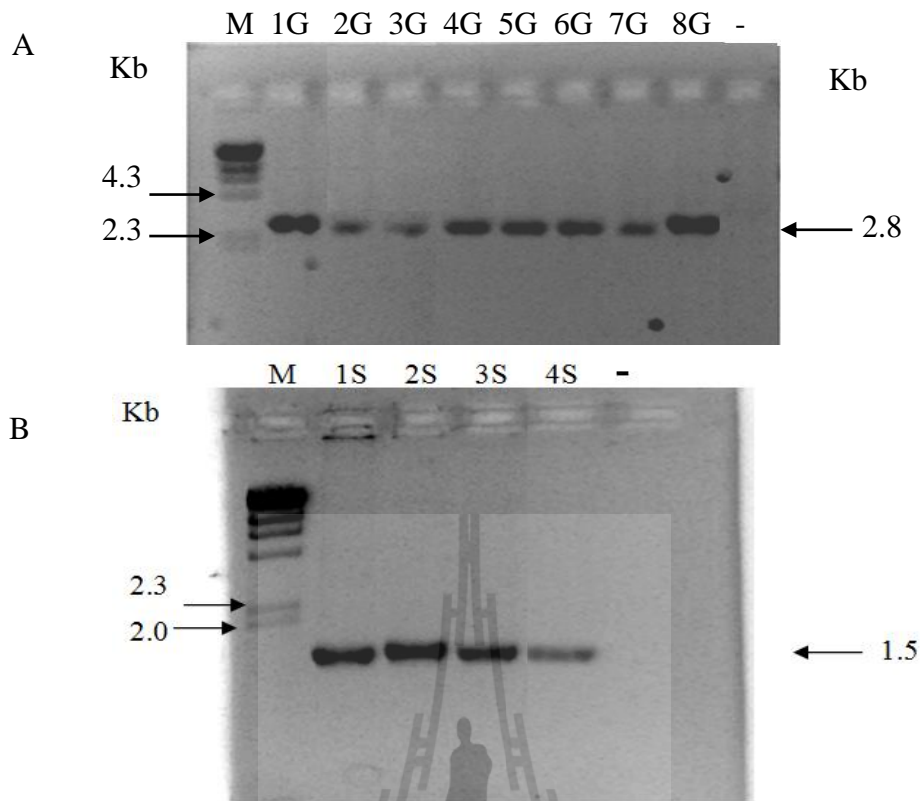


#### 4.5 ตรวจสอบการแทรกของยีน *GAM1* หรือ *SWA2* ในจีโนมของยีสต์ลูกผสมแต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธี PCR

โคลนของยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสอง ถูกนำมาเพื่อตรวจสอบการแทรกของยีน *GAM1* และ *SWA2* ในจีโนมยีสต์ด้วยวิธี PCR โดยสกัดจีโนมของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ออกมาเพื่อทำการวิเคราะห์หา ยีนทั้งสองด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีน *GAM1* ชื่อ *GAM1\_2F* และ *GAM1\_2R* จากผลการทดสอบพบว่าโคลนหมายเลข 1G, 2G, 3G, 4G, 5G, 6G, 7G และ 8G ได้ผลิต PCR ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 2.8 กิโลเบส เท่ากับขนาดของยีน *GAM1* ส่วนยีน *SWA2* ใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีนชื่อ *SWA2\_F* และ *SWA2\_R* จากผลการทดสอบพบว่าโคลนหมายเลข 1S, 2S, 3S และ 4S ได้ผลิต PCR เท่ากับ 1.5 กิโลเบส ซึ่งเท่ากับขนาดของยีน *SWA2* ดังนั้นผลการตรวจสอบที่ได้ ยืนยันว่ามีการแทรกของยีนแต่ละยีนอยู่ในจีโนมของยีสต์ทุกสายพันธุ์ (รูปภาพที่ 4.8) และทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลของการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการแทรกของยีนดังกล่าว นั้นยังคงน้อยอยู่ ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มจำนวนของชุดยีนให้มีการแสดงออกในปริมาณที่มากอาจทำได้โดยการเพิ่มจำนวนชุดของยีนและเลือกตำแหน่งของการแทรกเข้าไปในจีโนม (Susan et al., 1985) ได้แก่ rDNA (reiterated DNA) หรือ  $\delta$  sequences จะสามารถเพิ่มจำนวนชุดของยีนได้มากถึง 100-150 ชุด (Lopes et al., 1991; Wang et al., 1996; Lee et al., 1997; Nieto et al., 1999) และ Kang et al. 2003 ได้ทำวิจัยโดยสร้าง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ลูกผสมที่ทำให้มีการแสดงออกของยีน  $\alpha$ -amylase จาก *D. occidentalis* โดยใช้  $\delta$  sequences เป็นตำแหน่งที่ใช้ในการแทรกยีนในจีโนมของยีสต์ผลที่ได้คือสามารถแทรกยีนและมีความเสถียรของยีนได้ 100% เนื่องจากสามารถแสดงออกได้มากกว่า 100 รุ่นในอาหารปกติที่ไม่ต้องมียาปฏิชีวนะในการคัดเลือก ดังนั้นเพื่อที่จะสร้างยีสต์ดังกล่าวที่สามารถย่อยแป้งได้นั้น Ghang et al. 2007 ได้สร้างยีสต์ลูกผสมให้มีการแสดงออกร่วมกันของเอนไซม์ glucoamylase

จาก *D. occidentalis* และ  $\alpha$ -amylase จาก *D. occidentalis* ได้สำเร็จและสามารถนำไปใช้ในการย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอลได้โดยตรง แต่อย่างไรก็ตามขนาดของยีนที่แทรกเข้าไปในนั้นอาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการแสดงออกได้ต่ำลง เนื่องจากขนาดยีนที่ใหญ่เกินไปนั้นทำให้ยีนที่แทรกเข้าไปมีความเสถียรต่ำลง (Yamada et al., 2009) แต่พบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการแสดงออกแยกกันแต่ละเอนไซม์ และมีงานวิจัยสนับสนุน โดย Wong et al. 2010 แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ลูกผสมที่มีการแทรกของยีน glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase ร่วมกันมีการแสดงออกของเอนไซม์ได้ต่ำกว่าแยกกันแต่ละยีน





**รูปภาพที่ 4.8** การตรวจสอบการแทรกของยีน *GAM1* หรือ *SWA2* ในจีโนมของ *S. cerevisiae* ด้วยวิธี PCR

จากรูป A และ B แสดงผลของ 0.8 % เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลผลิต PCR โดยใช้จีโนมที่สกัดจากยีสต์ลูกผสมที่เกิดจากการแทรกยีน *GAM1* (A) โคลน 1G 2G 3G 4G 5G 6G 7G และ 8G และยีสต์ลูกผสมที่เกิดจากการแทรกยีน *SWA2* (B) โคลน 1S 2S 3S และ 4S ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะแต่ละยีน forward primer ชื่อ *GAM1\_2F* และ reverse primer ชื่อ *GAM1\_2R* สำหรับ ยีน *GAM1* และใช้ forward primer *SWA2\_F* และ reverse primer *SWA2\_R* สำหรับ ยีน *SWA2* ตามลำดับ

ภาพแสดง A สำหรับ ยีสต์ลูกผสมที่เกิดจากการแทรกยีน *GAM1*

ช่อง M: DNA marker

ช่อง 1G-8G: ผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมของ 1G, 2G, 3G, 4G, 5G, 6G, 7G, 8G ตามลำดับ

ช่อง -: ผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมของ *S. cerevisiae* wild type

ภาพแสดง B สำหรับ ยีสต์ลูกผสมที่เกิดจากการแทรกยีน *SWA2*

ช่อง M: DNA marker

ช่อง 1S-4S: ผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมของ 1S, 2S, 3S, 4S ตามลำดับ

ช่อง -: ผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมของ *S. cerevisiae* wild type

#### 4.6 การหาปริมาณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase และ $\alpha$ -amylase ของยีสต์ ลูกผสมด้วยวิธี DNS และวิธี Iodine

ยีสต์ลูกผสมที่สร้างขึ้นได้แก่ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 ที่มีการแสดงออกและการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ของเอนไซม์ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase ตามลำดับ สามารถตรวจสอบปริมาณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase ได้ด้วยวิธี DNS และ ตรวจสอบปริมาณหน่วยกิจกรรมของ  $\alpha$ -amylase ได้ด้วยวิธี iodine การที่ต้องใช้วิธีในการหาหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่างกันเนื่องจากการหาปริมาณหน่วยกิจกรรมของ  $\alpha$ -amylase ด้วยวิธี iodine จะทำให้ได้ปริมาณที่แม่นยำกว่าการวัดด้วยวิธี DNS ถึง 5 เท่า แต่วิธี DNS สามารถวัดปริมาณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase ได้แม่นยำกว่าวิธี iodine (Xiao et al. 2006) *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G คือยีสต์ลูกผสมที่ถูกสร้างขึ้นซึ่งมีการแสดงออกของยีน *GAM1* ได้มากที่สุดโดยการสังเกตขนาดวงใสซึ่งใหญ่ที่สุด จึงถูกคัดเลือกมาเพื่อหาหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS ส่วน *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 #1S มีการแสดงออกของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ที่ดีที่สุด ก็ถูกคัดเลือกมาเพื่อหาปริมาณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี iodine โดยพบว่าหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองสายพันธุ์ ได้ผลดังตารางที่ 4.1

**ตาราง 4.1** การตรวจสอบปริมาณหน่วยกิจกรรม glucoamylase ด้วยวิธี DNS และหน่วยกิจกรรมของ  $\alpha$ -amylase ด้วยวิธี iodine

Strains	Glucoamylase activity (U/ml)	$\alpha$ -amylase activity (U/ml)
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596/pGAM1#1G	1.20 $\pm$ 0.12	-
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596/pSWA2 #4S	-	0.43 $\pm$ 0.01

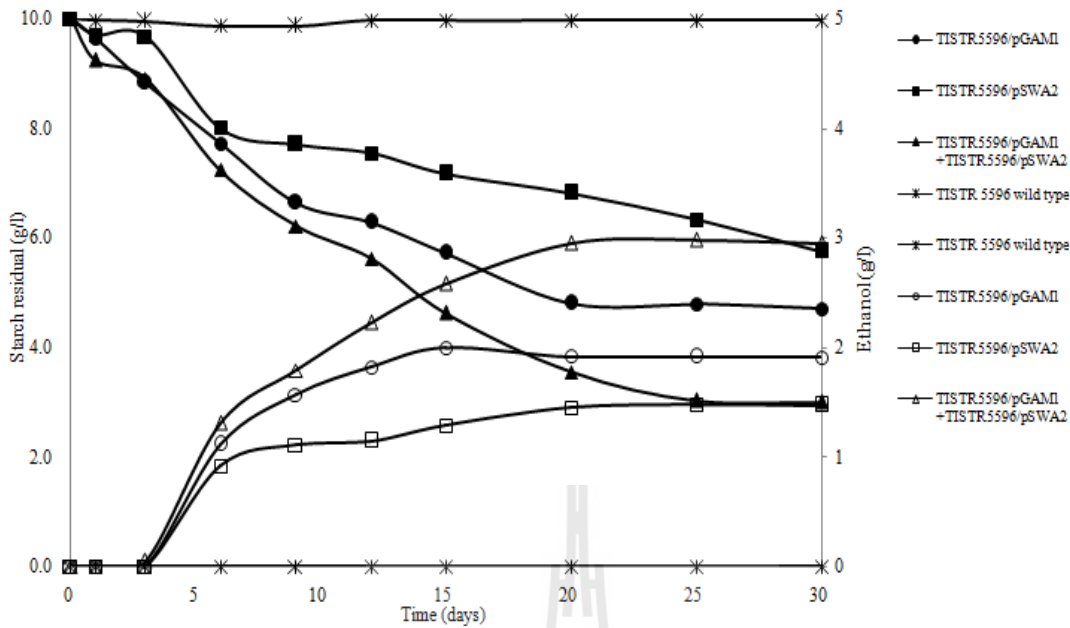
Values represent the mean of duplicate experiment  $\pm$ SD between samples.

จากผลการตรวจสอบหาปริมาณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์จากยีสต์ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณที่น้อย สามารถบ่งชี้ได้ว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2#1S สามารถย่อยแป้งเพื่อเปลี่ยนเป็นกลูโคส, มอลโตส และ reducing sugar ได้น้อยเพื่อผลิตเอทานอล ซึ่งผลที่ได้ อาจเกิดจากการแสดงออกของเอนไซม์ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ GAP จากยีสต์ต่างสายพันธุ์ (*Pichia pastoris*) ซึ่งอาจไม่เหมาะสมที่จะใช้เพื่อการแสดงออกของเอนไซม์ใน ยีสต์ *S. cerevisiae* แต่อย่างไรก็ตามหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้สามารถที่จะย่อยแป้งได้ และสามารถย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอลได้ เนื่องจากเอนไซม์ glucoamylase จาก *D. occidentalis* สามารถตัดย่อยปลายโมเลกุลแป้งที่  $\alpha$ -1, 4 และ  $\alpha$ -1,6 และเปลี่ยนเป็น reducing sugar, dextrin และ glucose ได้ (Lancashire et al. 1989) ซึ่งแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยอะไมโลส 20 % และ อะไมโลเพกติน 80 % ดังนั้นการที่ glucoamylase จาก *S. occidentalis* สามารถตัดย่อยปลายโมเลกุลแป้งที่  $\alpha$ -1, 4 และ  $\alpha$ -1,6 ได้นั้นจึงเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยกิ่งก้านของแป้งเป็น glucose และ malto-oligosaccharide ได้ดี และโมเลกุลน้ำตาลที่ได้ *S. cerevisiae* สามารถนำไปใช้ในสร้างพลังงานและการเจริญเติบโตได้ (Garccia et al. 2007) ถึงแม้ว่าปริมาณเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ยีสต์ที่ถูกตัดแปลงทั้งสองสายพันธุ์จะมีปริมาณน้อย แต่ยังคงสามารถย่อยแป้งเพื่อเป็นสารตั้งต้นที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสามารถหมักได้เอทานอลโดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการเติมเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งแล้วจึงค่อยเติมยีสต์เพื่อหมักเอทานอล ดังตัวอย่างงานวิจัยศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase จาก *S. occidentalis* ของยีสต์ลูกผสม *Hansenula polymorpha* ซึ่งมีปริมาณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.6 U/ml และ 0.27 U/ml ตามลำดับ และสามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุด 4 กรัม/ลิตร จากแป้ง 3 % ภายใน 3 วัน ที่ 48 °C (Voronovskiy et al. 2009) ส่วน Yang และคณะ 2011 ได้รายงานผลการย่อยแป้งและการผลิตเอทานอลจากยีสต์ *S. cerevisiae* ลูกผสม ซึ่งพบว่าปริมาณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase ที่

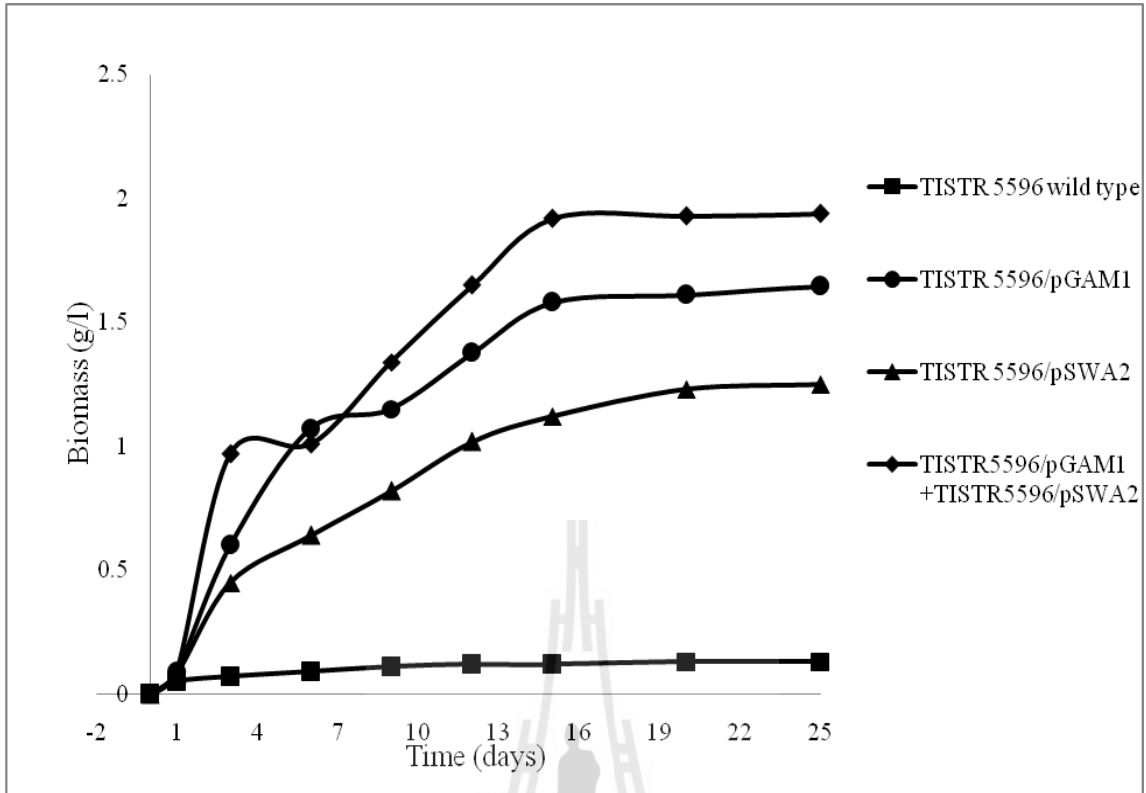
ผลิตได้ คือ 2.4 U/ml สามารถย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอลได้ในขั้นตอนเดียวโดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ช่วยย่อยแป้งจากแหล่งอื่น

#### 4.7 ทดสอบความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลของยีสต์ลูกผสม

ความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังและหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 wild type และยีสต์ลูกผสมได้แก่สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2#1S ได้ศึกษาทดสอบประสิทธิภาพในขวดหมักแบบไม่ใช้อากาศ ขนาด 120 มิลลิลิตร หรือแบบการหมักแบบ batch ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวเท่านั้น จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยตรงจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของยีน glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase ได้แก่ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G, *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2#1S และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G หมักร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2#1S (รูปภาพที่ 4.9) ได้ผลดังนี้ ผลผลิตของเอทานอลสูงสุดที่ได้ ใช้ระยะเวลาหมัก 12 วัน เท่ากับ  $0.489 \pm 0.010$ ,  $0.465 \pm 0.012$  และ  $0.516 \pm 0.021$  กรัม เอทานอลต่อกรัมของสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.11) และผลที่ได้พบว่าปริมาณเอทานอลของ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 แตกต่างจากกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ แต่ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 4.2) นอกจากนี้ในระหว่างการหมักมีปริมาณแป้งลดลงเรื่อยๆ และเปลี่ยนเป็นเอทานอลสูงสุดดังตารางที่ 4.3 และยังคงมีแป้งเหลือที่ยังไม่ผ่านการย่อยด้วยยีสต์ลูกผสม จากปริมาณแป้งเริ่มต้นที่ 10 กรัมต่อลิตรของแป้งมันสำปะหลัง เมื่อผ่านการหมักไปแล้ว 20 วัน ดังตารางที่ 4.3



รูปภาพที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการสร้างเอทานอลและการลดลงของแป้งเป็นผลจากการย่อยแป้งของเชื้อต่างๆ ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase ได้แก่ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G (วงกลม), *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2(สี่เหลี่ยมจัตุรัส), เชื้อที่หมักร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G กับ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2#1S (สามเหลี่ยม) และ ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 wild type (ดาว) ในเวลาต่างๆ ระหว่างกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPC-1% (W/V) แป้งมันสำปะหลัง สัญญาณลักษณะโปร่งและทึบแสดงความเข้มข้นเอทานอลและแป้งมันสำปะหลังตามลำดับ ข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยที่มาจากการทำการทดลองซ้ำสามครั้ง



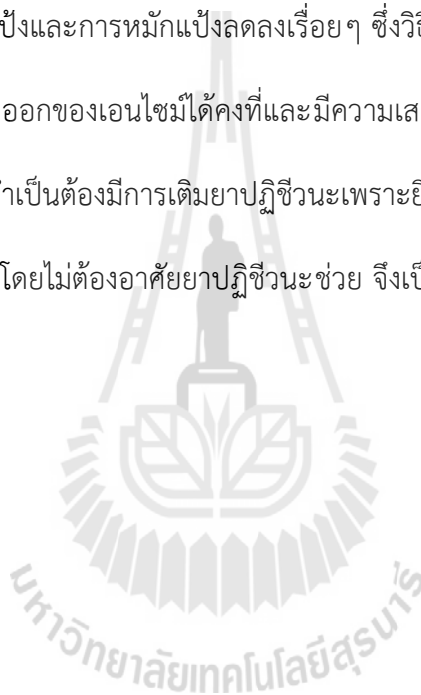
รูปภาพที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase (ได้แก่ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2#1S) และยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 wild type ในเวลาต่างๆ ระหว่างกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPC+1% (W/V) แป้งมันสำปะหลัง

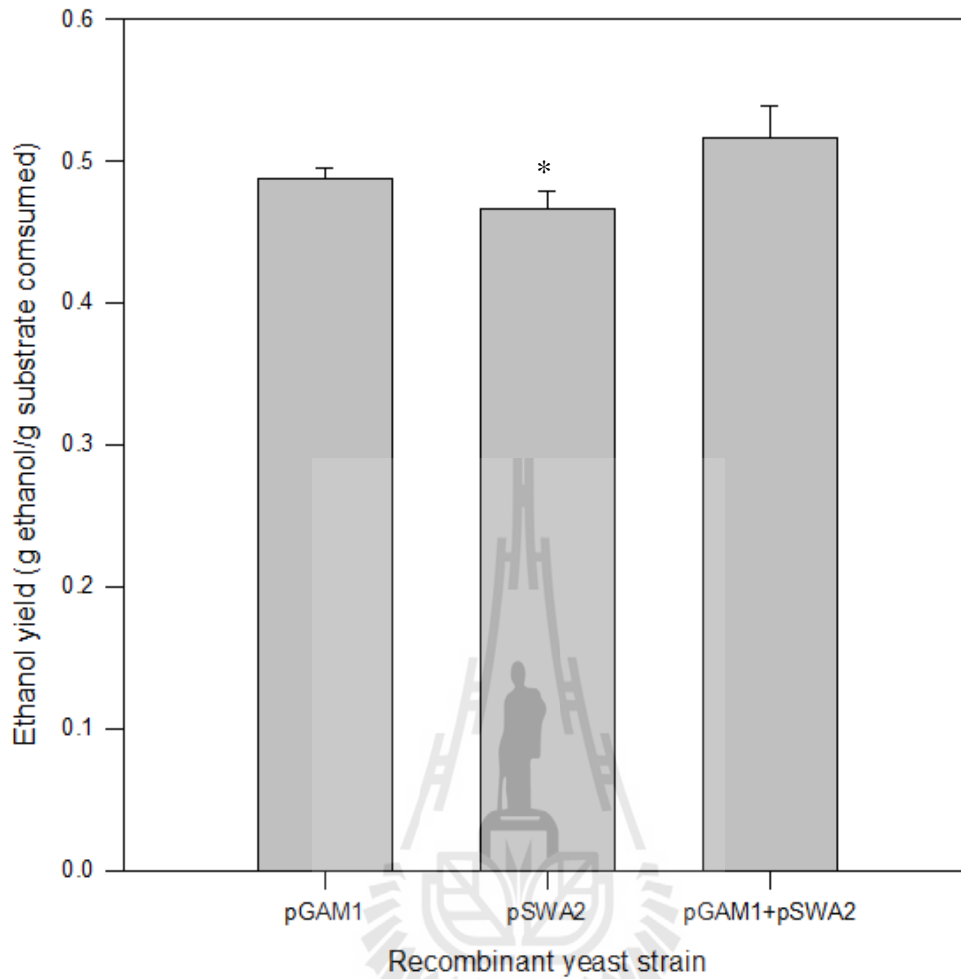


จากรูปภาพที่ 4.10 ปริมาณเซลล์แห้งที่สะสมของแต่ละช่วงเวลาของยีสต์ลูกผสมที่เจริญเติบโตในระหว่างการหมักในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1% เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นการยืนยันผลการแสดงออกของเอนไซม์ของยีสต์ลูกผสมว่าสามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือมอลโตสเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญภายในเซลล์และช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ได้

ดังนั้นจากผลการหมักพบว่า ยีสต์สายพันธุ์ที่ไม่ผ่านการตัดแปลงพันธุกรรมหรือ *S. cerevisiae* TISTR 5596 wild type ไม่สามารถเจริญเติบโตและย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอลได้ ส่วนยีสต์สายพันธุ์ที่ผ่านการตัดแปลงพันธุกรรมทั้งสองสายพันธุ์ (*S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2#1S) ซึ่งมีการแสดงออกของ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase ตามลำดับ สามารถใช้แป้งและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ โดยสายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1#1G ที่มีการแสดงออกของ glucoamylase จะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์และผลิตเอทานอลได้มากกว่าและย่อยแป้งได้เร็วกว่าสายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2#1S ที่มีการแสดงออกของ  $\alpha$ -amylase (รูปภาพที่ 4.11) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตัดแปลงทั้งสองสายพันธุ์มาหมักร่วมกัน โดยพบว่าสามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณเซลล์และย่อยแป้งและผลิตเอทานอลได้มากที่สุด เนื่องจากทั้งสองสายพันธุ์มีการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองเพื่อช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการย่อยแป้งสมบูรณ์และได้ดีกว่าการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว (Yamada et al. 2009) จากปริมาณแป้งที่ลดลงและปริมาณเอทานอลที่ได้จำเป็นต้องใช้เวลานานเป็นเดือนเพื่อที่จะย่อยแป้งจนหมด เนื่องจากประสิทธิภาพการย่อยแป้งของสายพันธุ์ยีสต์ที่ตัดแปลงพันธุกรรมไม่สูง ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการแสดงออกของเอนไซม์ที่ค่อนข้างต่ำ อาจมีสาเหตุมาจาก GAP promoter (glycerol dehydrogenase promoter) ซึ่งเป็นส่วนควบคุมยีนที่ได้มาจาก *Pichia pastoris* ที่นำมาใช้ในการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสอง ซึ่งอาจไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ใน *S. cerevisiae* ที่ได้กล่าวไปแล้วในตอนต้น

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ได้พิสูจน์ผลการแสดงออกของ glucoamylase และ  $\alpha$ -amylase ใน ยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วย promoter ดั้งเดิม (native constitutive promoter) ของยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าสามารถมีการแสดงออกของเอนไซม์และผลิตเอทานอลได้ประสิทธิภาพสูง (Ghang et al. 2007; Kim et al. 2010; Kim et al. 2011) แต่อย่างไรก็ตาม การสร้างยีสต์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีความสามารถของเอนไซม์ย่อยแป้งได้โดยตรง ด้วยวิธีการแทรกยีนเข้าไปในจีโนมของยีสต์โดยตรงจะช่วยตัดปัญหาความไม่เสถียรของการแสดงออกแบบใช้ พลาสมิดที่เป็นแบบ episomal ซึ่งจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการใช้แป้งและการหมักแป้งลดลงเรื่อยๆ ซึ่งวิธีการแทรกยีนเข้าไปในจีโนมของยีสต์โดยตรงจะช่วยให้การแสดงออกของเอนไซม์ได้คงที่และมีความเสถียรในระหว่างกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมได้และไม่จำเป็นต้องมีการเติมยาปฏิชีวนะเพราะยีนถูกแทรกเข้าไปในจีโนมยีสต์จะทำให้ยีสต์สามารถเติบโตได้ปกติโดยไม่ต้องอาศัยยาปฏิชีวนะช่วย จึงเป็นผลดีทำให้ไม่ต้องมีค่าใช้จ่ายในส่วนของการเติมยาปฏิชีวนะเกิดขึ้น





รูปภาพที่ 4.11 การเปรียบเทียบผลผลิตของเอทานอลของยีสต์ลูกผสมทั้งสามการทดลอง ได้แก่ การหมักแยกกันของ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 หรือ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1+*S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 ที่เวลา 12 วันของการหมัก ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\* = Significant at 0.05 probability level ( $P < 0.05$ ).

**ตาราง 4.2** การวิเคราะห์ผลผลิตของเอทานอลจากน้ำหมักของยีสต์ลูกผสมที่หมักร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 และ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 หรือการหมักเดี่ยวของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pGAM1 หรือ *S. cerevisiae* TISTR 5596/pSWA2 นาน 12 วัน

Strains	The yield of ethanol (g of ethanol/g of substrate consumed) (Mean±SEM)
TISTR 5596/pSWA2	0.466±0.007*
TISTR 5596/pGAM1	0.487±0.004
TISTR 5596/pSWA2+ TISTR 5596/pGAM1	0.517±0.012

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05. \* = Significant at 0.05 probability level (P<0.05).

**ตาราง 4.3** การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลด้วยแป้งมันสำปะหลังของยีสต์ลูกผสมโดยใช้แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหาร

	Strains			
	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596 Wild type	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596/pGAM1	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596/pSWA2	<i>S. cerevisiae</i> 5596/pGAM1 <i>S. cerevisiae</i> 5596/pSWA2
Kinetic parameters				TISTR + TISTR
Initial substrate conc. (g/l)	10.000	10.000	10.000	10.000
Final substrate conc. (g/l)	10.000	4.255±0.340	5.923±0.732	2.288±0.488
Max. cell dry weight conc. (g/l)	0.130±0.003	1.648±0.010	1.250±0.001	1.940±0.002
Max. ethanol conc. (g/l)	-	1.992±0.248	1.478±0.267	2.977±0.020
Other organic acid (acetic acid, succinic acid, lactic acid, formic acid) conc. (g/l)	-	0.6817±0.537	1.341±0.464	2.795±0.503
Fermentation time (days)*	-	15	25	20
Ethanol productivity (g ethanol/l-hr) <sup>a</sup>	-	0.008±0.001	0.006±0.000	0.009±0.000
Ethanol yield (g ethanol/g glucose) <sup>b</sup>	-	0.489±0.010	0.465±0.012	0.516±0.021

<sup>a</sup>Maximum volumetric productivity calculated on the basis of the most productive 144-hr period.

<sup>b</sup> Ethanol yield calculated base on the potential glucose in medium with assumption that 1 g starch was converted to 1.1 g glucose and calculated on a basis of g ethanol produced per g glucose metabolized at 12 days.

\*Fermentation time was the taken to reach maximum ethanol concentration. Values represent the mean of duplicate experiment ±SD between samples.

## บทที่ 5

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

การทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างยีสต์สายพันธุ์ลูกผสมที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง 2 ชนิด คือ glucoamylase หรือ  $\alpha$ -amylase โดยการสร้างยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ลูกผสมที่มีการแทรกของยีน glucoamylase และ ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ลูกผสมที่มีการแทรกของยีน  $\alpha$ -amylase ได้สำเร็จ และยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ลูกผสมทั้งสองชนิดสามารถมีการแสดงออกของเอนไซม์ได้โดยใช้โปรโมเตอร์ GAP จากพลาสมิด pGAPZ $\alpha$ A ที่ใช้สำหรับการแสดงออกในยีสต์ *P. pastoris* จากนั้นได้ทำการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งและการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยทำการทดลองเป็นสามส่วนคือการหมักยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ลูกผสมที่มีการแทรกของยีน glucoamylase และ ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ลูกผสมที่มีการแทรกของยีน  $\alpha$ -amylase และการหมักร่วมกันของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์

ในการศึกษาชุดการหมักนี้ได้ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวความสามารถของ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1, *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 และการเลี้ยงร่วมกันของทั้งสองสายพันธุ์คือ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 และ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 พบว่าแต่ละสายพันธุ์ในชุดการหมักนี้สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังภายใต้เงื่อนไขการหมักเอทานอลได้ และพบว่าผลผลิตของเอทานอลสูงสุดที่ได้เท่ากับ  $0.489 \pm 0.010$ ,  $0.465 \pm 0.012$  และ  $0.516 \pm 0.021$  กรัมเอทานอล ต่อ กรัมของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ที่ 12 วัน ตามลำดับ และ

ได้ปริมาณเอทานอลมากที่สุดเท่ากับ  $1.992 \pm 0.248$ ,  $1.478 \pm 0.267$  และ  $2.977 \pm 0.020$  กรัมต่อลิตร ที่ 25 วัน ตามลำดับ

ระยะเวลาการหมัก ณ วันที่ 25 ของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 พบปริมาณเซลล์แห้งที่มากที่สุดเท่ากับ  $1.648 \pm 0.010$  g/l และได้เอทานอลที่มากที่สุดเท่ากับ  $1.992 \pm 0.248$  g/l และสารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ acetic acid, succinic acid, lactic acid และ formic acid เท่ากับ  $0.6817 \pm 0.537$  g/l และค่าความสามารถในการผลิตเอทานอล (productivity) ที่เวลาการหมัก 144 ชั่วโมง ได้เอทานอลเท่ากับ  $1.127 \pm 0.110$  กรัมต่อลิตร หรือ  $0.008 \pm 0.001$  กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง ส่วนปริมาณแป้งลดลงเหลือเพียง  $4.255 \pm 0.340$  กรัมต่อลิตร จากแป้งเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

ระยะเวลาการหมัก ณ วันที่ 25 ของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 พบปริมาณเซลล์แห้งที่มากที่สุดเท่ากับ  $1.250 \pm 0.001$  กรัมต่อลิตร และได้เอทานอลที่มากที่สุดเท่ากับ  $1.478 \pm 0.267$  กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ acetic acid, succinic acid, lactic acid และ formic acid เท่ากับ  $1.341 \pm 0.464$  กรัมต่อลิตร และค่าความสามารถในการผลิตเอทานอล (productivity) ที่เวลาการหมัก 144 ชั่วโมง ได้เอทานอลเท่ากับ  $0.929 \pm 0.071$  กรัมต่อลิตร หรือ  $0.006 \pm 0.000$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนปริมาณแป้งลดลงเหลือเพียง  $5.923 \pm 0.732$  กรัมต่อลิตร จากแป้งเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

ระยะเวลาการหมัก ณ วันที่ 25 ของการหมักร่วมกันของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 และ *S. cerevisiae* TISTR5596/pGAM1 พบปริมาณเซลล์แห้งที่มากที่สุดเท่ากับ  $1.940 \pm 0.002$  กรัมต่อลิตร และได้เอทานอลที่มากที่สุดเท่ากับ  $2.977 \pm 0.020$  กรัมต่อลิตร และสารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ acetic acid, succinic acid, lactic acid และ formic acid เท่ากับ  $2.795 \pm 0.503$  กรัมต่อลิตร และค่าความสามารถในการผลิตเอทานอล (productivity) ที่เวลาการหมัก

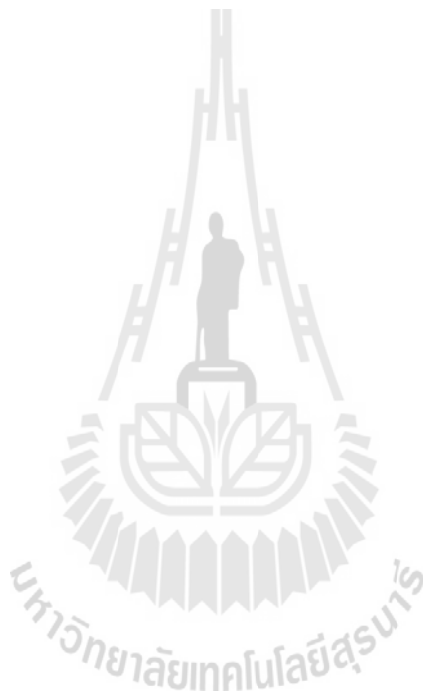
144 ชั่วโมง ได้เอทานอลเท่ากับ  $1.315 \pm 0.024$  กรัมต่อลิตร หรือ  $0.009 \pm 0.000$  กรัมต่อลิตรต่อ

ชั่วโมง ส่วนปริมาณแป้งลดลงเหลือเพียง  $2.288 \pm 0.488$  กรัมต่อลิตร จากแป้งเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นจากผลทดลองพบว่าการเลี้ยงร่วมกันของยีสต์สองสายพันธุ์คือ *S. cerevisiae*

TISTR5596/pGAM1 และ *S. cerevisiae* TISTR5596/pSWA2 ได้ผลผลิตเอทานอลที่สูงและอัตราการ

ผลิตมากกว่าการเลี้ยงแยกแต่ละสายพันธุ์





## เอกสารอ้างอิง

- Abarca, D., Fernandez-Lobato, M., Del Pozo, L., and Jimenez, A. (1991). Isolation of  $\alpha$ -amylase gene (SWA2) encoding an  $\alpha$ -amylase from *Schwanniomyces occidentalis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**. 279: 41-44..
- Altıntaş, M.M., Ulgen, K.U., Kirdar, B., Unsan, Z.I., and Oliver, S.G. (2002). Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. **Enzyme and Microbial Technology**. 31: 640-647.
- Ashikari, T., Kunisaki, S., Matsumoto, N., Amachi, T., and Yoshizumi, H. (1989). Direct fermentation of raw corn to ethanol by yeast transformants containing a modified *Rhizopus* glucoamylase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 32: 129-133.
- Beggs, J.D., Guerineau, M., and Atkins, J.F. (1976). A map of the restriction targets in, yeast 2 micron plasmid DNA cloned on bacteriophage lambda. **Molecular and General Genetics**. 148: 287-294.
- Bitter, G.A., and Egan, K.M. (1984). Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. **Gene**. 32: 263-274.
- Bothast, R.J., and Schlicher, M.A. (2005). Biotechnological process for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 67: 19-25.

- Chandel, A.K., Chan, E.C., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V., and Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. 2: 14-32.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1980). Genomic substitutions of centromeres in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**. 287: 504-509.
- Cole, G.E., McCabe, P.C., Inlow, D., Gelfand, D.H., Basaat, A., and Innis, A. (1988). Stable expression of *Aspergillus awamori* glucoamylase in distiller's yeast. **Biotechnology**. 6: 417-421.
- David, L.N., and Michael, M.C. (1982). **Lehninger principles of biochemistry** (4<sup>th</sup> ed., pp. 50-150). San Diego.
- De-Mot, R., Van, D.K., Donkers, A., and Verachtert, H. (1985). Potentialities and limitations of direct alcohol fermentation of starchy material with amyolytic yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 22: 222-226.
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Dahlems, U.M., and Hollenberg, C.P. (1990). Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (*GAM1*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**. 95: 111-121.
- Eksteen, J.M., van, R.P., Cordero, O.R.R., and Pretorius, I.S. (2003). Starch fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the  $\alpha$ -amylase and glucoamylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. **Biotechnology and Bioengineering**. 84: 639-646.
- Fogarty, W.M., and Kelly, C.J. (1979). Developments in microbial extracellular enzymes. In: Alan Wiseman ed. **Enzyme and Fermentation Biotechnology**. 3: 289

- Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **The Journal of Biochemistry: Tokyo**. 41: 583-603.
- Hollo, J., and Szeitli, J. (1968). The reaction of starch with iodine: **Starch and Its Derivatives** (4<sup>th</sup> ed., pp. 203-246). London: Chapman and Hall.
- Garccia, L.L., Adam, A.C., Manzanares, P., and Julio P.L. (2005). Improving the amyolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* glucoamylase by the addition of a starch binding domain. **Journal of Biotechnology**. 118: 167-176.
- Ghang, D.M., Yu, L., Lim, M.Y., Ko, H.M., Im, S.Y., Lee, H.B., and Bai, S. (2007). Efficient one-step starch utilization by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucoamylase and  $\alpha$ -amylase genes from *Debaryomyces occidentalis*. **Biotechnology Letters**. 29: 1203-1208.
- Guthrie, C., and Fink, G.R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. **Methods in Enzymology** (Vol. 169). San Diego: Academic Press.
- Ingladew, W.M. (1987). *Schwanliomyces*: a potential super yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**. 5:159-176.
- Ingladew, W.M. (1993). Yeasts for production of fuel ethanol. In: A.H. Rose, J.S Harrison (eds.). **The Yeasts** (2<sup>nd</sup> ed., pp. 245-291). New York: Academic Press.
- Inlow, D., McRae, J., and Ben-Bassat, A. (1988). Fermentation of corn starch to ethanol with genetically engineered yeast. **Biotechnology and Bioengineering**. 32: 227-234.
- Janse, B.J., Steyn, A.J., and Pretorius, I.S. (1993). Regional sequence homologies in starch-degrading enzymes. **Current Genetics**. 24: 400-407.

- Kang, N.Y., Park, J.N., Chin, J.E., Lee, H.B., Im, S.Y., and Bai, S. (2003). Construction of an amylolytic industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* containing the *Schwanniomyces occidentalis*  $\alpha$ -amylase gene. **Biotechnology Letters**. 25: 1847-1851.
- Kang, J. (2008). Fermentation of Ethanol. [Online]. Available: <http://www.andrew.cmu.edu/user/jitkangl/Fermentation%20of%20Ethanol/Fermentation%20of%20Ethanol.htm>. Accessed date: June 10, 2008.
- Khaw, T.S., Katakura, Y., Ninomiya, K., Maoukamnerd, C., Kondo, A., Ueda, M., and Shioya, S. (2007). Enhancement of ethanol production by promoting surface contact between starch granules and arming yeast in direct ethanol fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 103(1): 95-97.
- Kim, T.G., and Kim, K. (1996). The construction of a stable starch fermenting yeast strain using genetic engineering and rare-mating. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 59:39-51.
- Kim, J.H., Kim, H.R., Lim, M.H., Ko, H.M., Chin, J.E., Lee, H.B., Kim, I.C., and Bai, S. (2010). Construction of a direct starch-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase, alpha-amylase and debranching enzyme. **Biotechnology Letter**. 32(5): 713-719.
- Kim, H.R., Im, Y.K., Ko, H.M., Chin, J.E., Kim, I.C., Lee, H.B., and Bai, S. (2011). Raw starch fermentation to ethanol by an industrial distiller's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* expressing glucoamylase and  $\alpha$ -amylase genes **Biotechnology Lette**. 33(8): 1643-1648.

- Knox, A.M., du Preez, J.C., and Kilian, S. (2004). Starch fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains transformed with amylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Sacchamycopsis fibuligera*. **Enzyme and Microbial Technology**. 34: 453-460.
- Krisztina, R.V. (2003). Starch bearing crops as food sources. **Cultivated Plants Primarily as Food Sources**. Vol. 1.
- Kolusheva, T., and Marinova, A., (2007). A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable  $\alpha$ -amylase. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**. 42(1): 93-96.
- Kondo, A., Shigechi, H., Abe, M., Uyama, K., Matsumoto, T., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Kishimoto, M., and Fukuda, H. (2002). High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 58: 291-296.
- Kotaka, A., Sahara, H., Hata, Y., Abe, Y., Kondo, A., Kato-Murai, M., Kuroda, K., and Ueda, M. (2008). Efficient and direct fermentation of starch to ethanol by sake yeast strains displaying fungal glucoamylases. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 72 (5): 1376-1379.
- Lang, X., Hill, G.A., and Macdonald, D.G. (2001). Recycle bioreactor for bioethanol production from wheat starch I: cold enzyme hydrolysis. **Energy Sources**. 23: 417-425.

- Lee, Y., Lee, W.G., Chang, Y.K., and Chang, H.N. (1995). Modelling of Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* from a Glucose and Maltose Mixture. **Biotechnology Letters**. 17: 791-796.
- Lee, F.W.F., and Da Silva, N.A. (1997). Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the  $\delta$  sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 48: 339-345.
- Liao, B. (2008). Use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* to convert soluble starch directly to bioethanol. M.S. Thesis, Saskatchewan University, Canada.
- Lily, N.M. (2007). Effect of immobilization method on activity of alpha-amylase. M.S. Thesis, The Ohio State University, Columbus.
- Lopes, T.S., Hakaart, G.J., A.J., Koerts, B.L., Raue, H.A., and Planta, R.J. (1990). Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**. 105: 83-90.
- Majovic, L., Nikolic, S., Rakin, M., and Vukasinovic, M., (2006). Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. **Fuel**. 85: 1750-1755.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31: 426-429.
- Montesinos, T., and Navarro, J.M. (2000). Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. 27: 362-370.

- Nakamura, Y., Kobayashi, F., Ohnaga, M., and Sawada, T. (1997). Alcohol fermentation of starch by a genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. **Biotechnology and Bioengineering**. 53: 21-25.
- Nieto, A., Prieto, J.A., and Sanz, P. (1999). Stable high-copy number integration of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase cDNA in an industrial baker's yeast strain. **Biotechnology Progress**. 15: 459-466.
- Nyerhovwo, J.T. (2004). Cassava and future of starch. **Electronic Journal of Biotechnology**. 7: 5-8.
- Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture and Cooperatives (2008). Raw materials for biofuel/biomass production in Thailand. [Online]. Available: [http://www.oae.go.th/oae\\_website/oae\\_area.php.pdf](http://www.oae.go.th/oae_website/oae_area.php.pdf).
- Oner, E.T., Oliver, S.G., and Kirdar, B. (2005). Production of ethanol from starch by respiration-deficient recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. 71(10): 6443-6445.
- Papong, S. and Malakul, P. (2010). Life-cycle energy and environmental analysis of bioethanol production from cassava in Thailand. **Bioresource Technology**. 101: 112-118.
- 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.

- Paolucci, J.D., Belleville, M.P., Zakhia, N., and Rios, G.M. (2000). Kinetics of Cassava Starch Hydrolysis with Termamyl® Enzyme. **Biotechnology and Bioengineering**. 68 (1).
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., and Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. **Trends in Genetics**. 2(4): 183-186.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., and Mattanovich, D., (2005). Recombinant protein production in yeasts. **Molecular Biotechnology**. 31: 245-259.
- Ramachandran, N., Joubert, L., Gundlapalli, S.B., Cordero- Otero, R.R., and Pretorius, I.S. (2008). The effect of flocculation on the efficiency of raw-starch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* producing the *Lipomyces kononenkoae* LKA1-encoded  $\alpha$ -amylase. **Annals of Microbiology**. 58(1): 99-108.
- Renewable Fuels Association. (2013). Production of ethanol. [Online]. Available: <http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics>.
- Roberson, G.H., Wong, D.W.S., Lee, C.C., Wagschal, K., Smith, M.R., and Orts, W.J. (2006). Native or raw starch digestion; a key step in energy efficient benefiting of grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54: 353-365.
- Rothstein, S.J., Lazarus, C.M., Smith, W.E., Baulcombe, D.C., and Gatenby, A.A. (1984). Secretion of a wheat  $\alpha$ -amylase expressed in yeast. **Nature**. 308: 662-665.
- Ruohonen, L., Aalto, M.K., and Keranen, S. (1995). Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. **Journal of Biotechnology**. 39: 193-203.



- Sah, T. (2012). Amount of amylose and Amylopectin in starches. [Online]. Available: <http://www.auxmailllesgodefroy.com/starch>.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual**, 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Shigechi, H., Fujita, Y., Koh, J., Ueda, M., Fukuda, H., and Kondo, A. (2004a). Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. **Biochemical Engineering Journal**. 18: 149-153.
- Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, Y., Ueda, M., Satoh, E., Fukuda, H., and Kondo, A. (2004b). Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. **Applied and Environmental Microbiology**. 70(8): 5037-5040.
- Smith, R.A., Duncan, M.J., and Moir, D.T. (1985). Heterologous protein secretion from yeast. **Science**. 230: 1219-1224.
- Soni, B.K., Kapp, C., Soucaille, P., and Goma, G. (1992). Solvent production from starch: effect of pH on  $\alpha$ -amylase and glucoamylase localization and synthesis in synthetic medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37: 539-543.
- Suga, M. and Hatakeyama, T. (2003). High-efficiency electroporation by freezing Intact yeast cells with addition of calcium. **Current Genetics**. 43: 206-211.

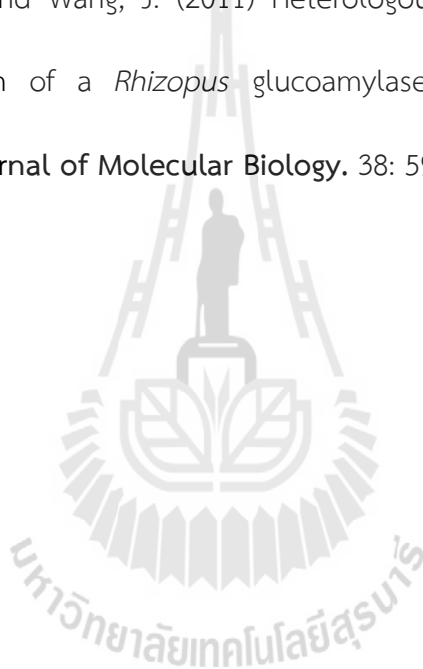
- Sukairi, M.B.M.H. (2008). Batch ethanol fermentation using glucose derived from tapioca flour starch by *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of inoculum age and agitation speed. **Thesis of Master degree**, Pahang university, Malaysia.
- Tester, R.F., Karkalas, J., and Oi, X. (2004). Starch and digestibility enzyme-substrate relationship. **World's Poultry Science Journal**. 60: 186-195.
- Ulgen, K.U., Saygili, B., Unsan, Z.I., and Kirdar, B. (2002). Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB. **Process Biochemistry**. 37: 1157-1168.
- Vander-Kleij, I.I., Faber, K.N., Keizer G.I. Gietl, C., Harder, W., and Veenhuis, M. (1993). Watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase is sorted to peroxisomes of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEBS Letters**. 334: 128-132.
- Vellanki, R.N., Komaravelli, N., Tatineni, R. and Mangamoori, L.N. (2007) Expression of hepatitis B surface antigen in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter of *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**. 29: 313-318.
- Verma, G., Nigam, P., Singh, D., and Chaudhary, K. (2000). Bioconversion of starch to ethanol in a single step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. **Bioresource Technology**. 72: 261-266.
- Voronovsky, A.Y., Rohulya, O.V., Abbas, C.A., and Sibirny, A.A. (2009). Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. **Metabolic Engineering**. 11: 234-242.

- Wang, M.Q., Saricks, C., and Santini, D. (1999). Effects of fuel ethanol use on fuel-cycle energy and greenhouse gas emissions. **The Argonne National Laboratory's GREET model**. Center for Transportation Research, Argonne National Laboratory.
- Wang, T.T., Lee, C.F., and Lee, B.H. (1996). The molecularbiology of *Schwanniomyces occidentalis* Klocker. **Critical Reviews in Biotechnology**. 19(2): 113-143.
- Wong, D.W.S., Batt, S.B., Lee, C.C., and Robertson, G.H. (2002). Increased expression and secretion of recombinant  $\alpha$ -amylase in *Saccharomyces cerevisiae* by using glycerol as the Carbon Source. **Journal of Protein Chemistry**. 21(6): 419-425.
- Wong, D.W.S., Batt, S., Robertson, G., Lee, C., and Wagschal, K. (2010). Chromosomal integration of both an  $\alpha$ -amylase and a glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* for starch conversion. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 6: 112-118.
- Xiao, Z., Storms, R., and Tsang, A. (2006). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. **Analytical Biochemistry**. 351(1): 146-148.
- Yamada, R., Bito, Y., Adachi, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, C., and Kondo, A. (2009). Efficient production of ethanol from raw starch by a mated diploid *Saccharomyces cerevisiae* with integrated  $\alpha$ -amylase and glucoamylase genes. **Enzyme and Microbial Technology**. 44: 344-349
- Yamada, R., Yamakawa, S., Tanaka, T., Ogino, O., Fukuda, H., Kondo, A. (2011). Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces*

*cerevisiae* strain that express amylases. **Enzyme and Microbial Technology**. 48: 393-396.

Yanez, E., Carmona, T.A., Tiemblo, F., Jimenez, A., and Fernandez L.M. (1998). Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. **Biochemical Journal**. 329: 65-71.

Yang, S., Jia, N., Li, M., and Wang, J. (2011) Heterologous expression and efficient ethanol production of a *Rhizopus* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Molecular Biology**. 38: 59-64.



## ภาคผนวก A

### ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการทดลอง

#### A.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารที่ใช้คัดเลือกเชื้อ

อาหารทุกชนิดทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที

##### 1. Low salt LB-zeocin medium

Yeast extract	5 g/l
Tryptone	10 g/l
Sodium chloride	5 g/l
pH	7.5

เติม Zeocin™ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วรอให้อุณหภูมิลดลงอยู่ที่ประมาณ 55 °C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Zeocin™ ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร หากต้องการเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้นลงไปในการเหลว 15 กรัมต่อลิตรก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ

##### 2. Yeast peptone dextrose (YPD) zeocin™ broth

Yeast extract	10 g/l
Peptone	20 g/l
Dextrose	20 g/l

เติม Zeocin™ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 20 นาที แล้วรอให้อุณหภูมิลดลงอยู่ที่ประมาณ 55 °C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Zeocin™ ที่ 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร หากต้องการเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้นลงไปในการเหลว 15 กรัมต่อลิตรก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ

### 3. Yeast extract peptone cassava medium (YPC)

Yeast extract	10 g/l
Peptone	20 g/l
Cassava starch	10g/l
pH	5.0

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที

### 4. Yeast peptone dextrose medium (YPDS)

Yeast extract	10 g/l
Peptone	20 g/l
Dextrose	20 g/l
Soluble starch	20 g/l

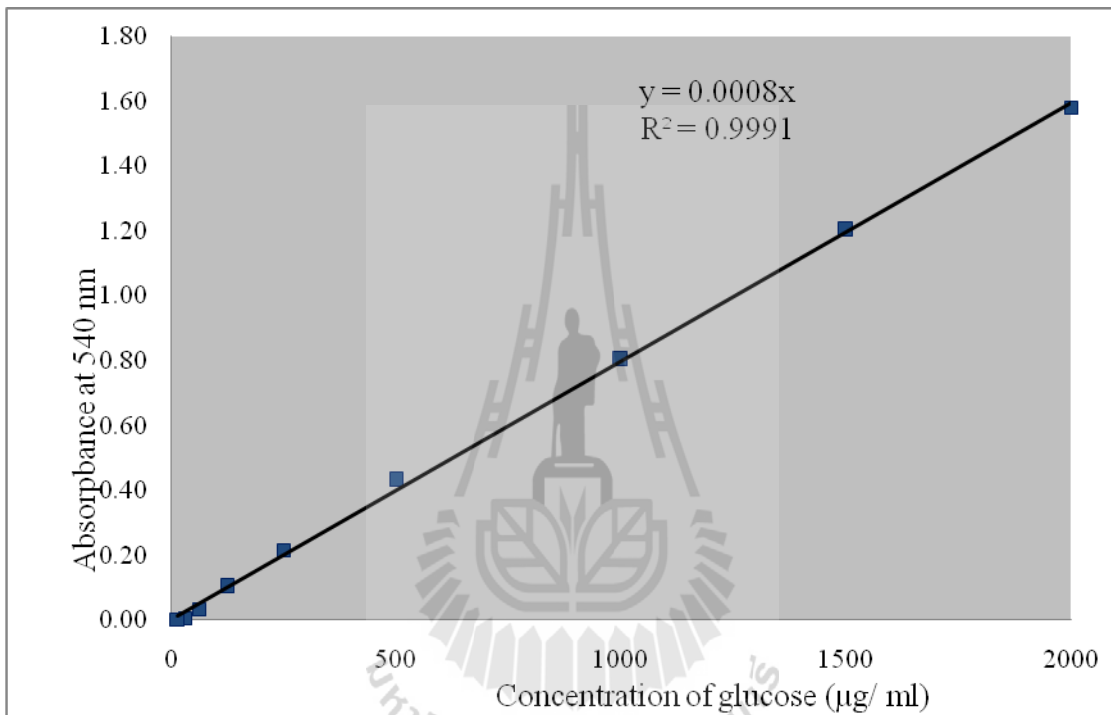
นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 20 นาที หากต้องการเป็น

อาหารแข็งให้เติมวุ้นลงไปในการเหลว 15 กรัมต่อลิตรก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ

## ภาคผนวก B

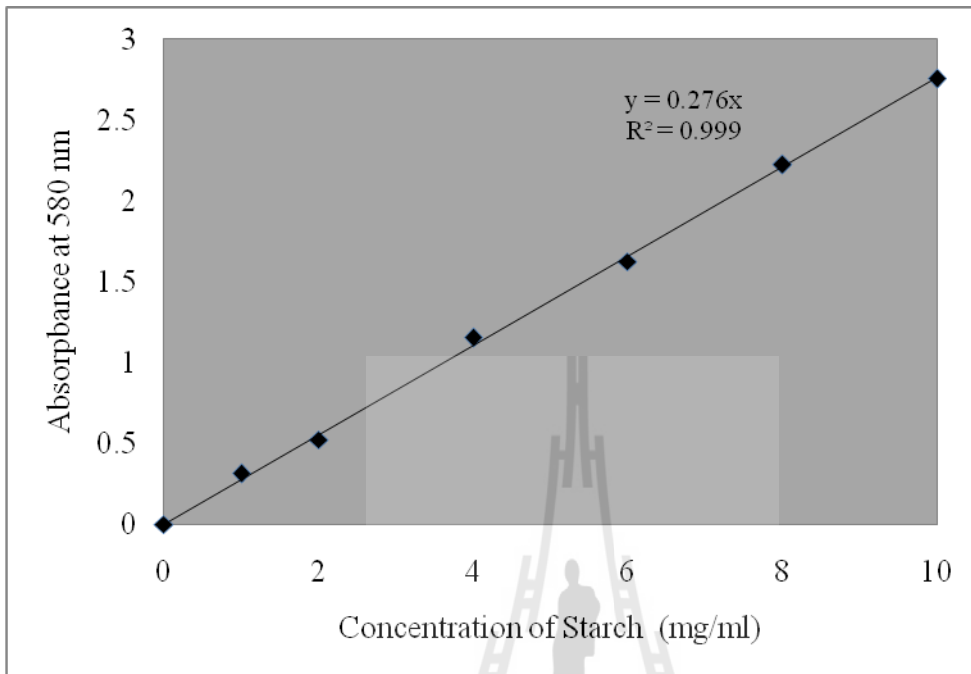
## กราฟมาตรฐาน

## B.1 Standard curve of sugar concentration



**Figure B.1** Standard curve of sugar concentration by measurement density using a spectrophotometer at 540 nm by DNS method.

## B.2 Standard curve of sugar concentration



**Figure B.2** Standard curve of starch concentration by measurement density using a spectrophotometer at 580 nm by iodine method.



## ภาคผนวก C

## การ alignments ลำดับเบสของ DNA

C.1 The multiple sequence alignments of nucleotide sequence of GAP promoter from *P. pastoris* with GAPDH promoter from *S. cerevisiae*

```

          *           20           *           40
GAP   : ----- : -
GAPDH : TCGAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATA : 40

          *           60           *           80
GAP   : ----AGATCTTTTTT GTAGAAATGT---CTTGGTGTCTCG : 34
GAPDH : CGTAAATAATTAAATAGTAGTGATTTTCTAACTTTATTTA : 80
          A   TT   T   GTAG   AT   T   CT   T   T   T

          *           100          *           120
GAP   : TCCAATCAGGTAGCCAT-----CT-CTG----- : 56
GAPDH : GTCAAAAATTAGCCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACA : 120
          CAA   A   TAGCC   T           CT   CTG

          *           140          *           160
GAP   : -----AAATATCTGGCTCC : 70
GAPDH : TGCCAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAACACT : 160
          AATAT   T   C   C

          *           180          *           200
GAP   : GTTGCAACTCCGAACGACCTG-----CTGGCAACGTAA : 103
GAPDH : GATGGTGCTTGGGTGAACAGGTTTATTCTGGCATCCACT : 200
          G   TG   CT   G   AC   G           CTGGCA   C

          *           220          *           240
GAP   : AATTCCTCCGGGGTAAAACCTTAAATG---TGGAGTAAATGGAA : 141
GAPDH : AAATATAATGGAGCCCGCTTTTAAAGCTGGCATCCAGAAA : 240
          AA   T   T   GG           CTT           TGG   T   G   AA

```

\* 260 \* 280  
 GAP : CCAGAAACGTCCTTCCCTTCTCTCTCCTT-----CCACCG : 177  
 GAPDH : AAAAAAGAATCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCA : 280  
 A AA TC C C C T T TT CACC

\* 300 \* 320  
 GAP : CCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACT-----CTGC : 209  
 GAPDH : ACCAT---CAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTAC : 318  
 CC T C GT C TAGG TT CT CT C

\* 340 \* 360  
 GAP : TGG-----AGAGCTTCT TCT-----ACGG-----CCCCCT : 234  
 GAPDH : AGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCT : 358  
 G AG GC C ACGG C CCT

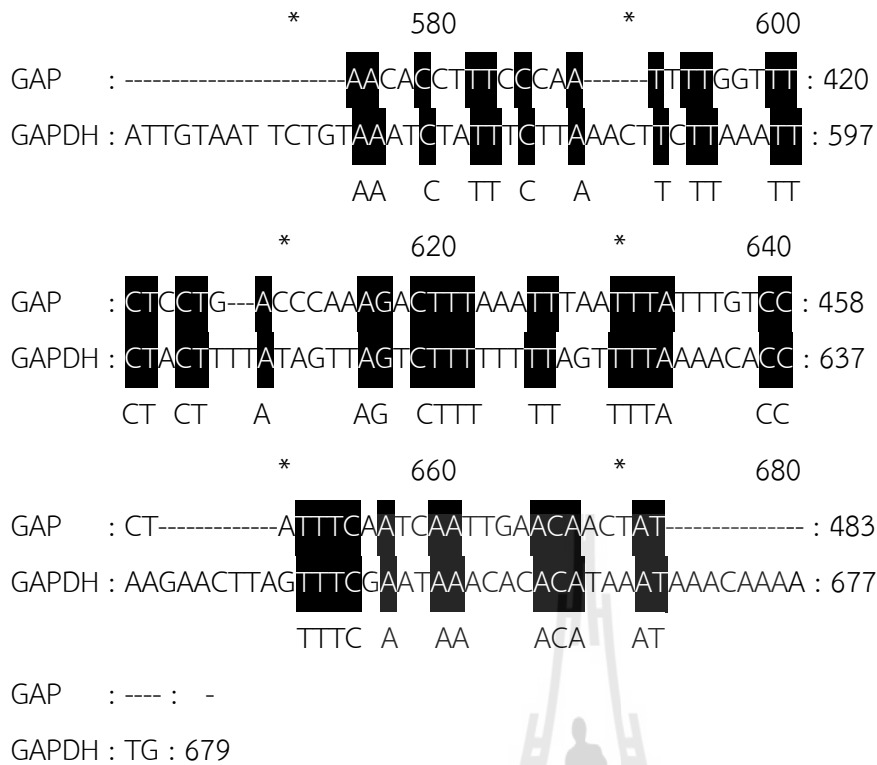
\* 380 \* 400  
 GAP : TGCAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAAAC : 274  
 GAPDH : CAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACAC : 398  
 G A TG T CC GC T GT G T A AC

\* 420 \* 440  
 GAP : GGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAA : 314  
 GAPDH : A--AGGCAATTGACCCACGCATGTATCTA TCTCATT T TCTT : 437  
 AGG T ACCC C G A C AT

\* 460 \* 480  
 GAP : GTCCCG-----GCCGTGCTG----- : 330  
 GAPDH : ACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAA : 477  
 CC GC TC CTG

\* 500 \* 520  
 GAP : GCAATAATAGCGGGCGGACGCATGT--CATGAGATTATTG : 368  
 GAPDH : GCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTATT : 517  
 GC AA A GG GA C GT C TGA ATTATT

\* 540 \* 560  
 GAP : GAAACCACCAGAATCGAATATA--AAAGGCG----- : 397  
 GAPDH : CCCTACTTGAC TAATAAGTATAATAAAGACGGTAGGTATTG : 557  
 C A A A TATA AAAG CG



**Figure C.1** The multiple sequence alignments of GAP promoter from PGAPZ $\alpha$ A with the sequence of GAPDH promoter from *S. cerevisiae* reported in Genebank (A15895.1). The alignment was conducted by ClustalX 2.0.11 program.

## ประวัตินักวิจัย

1. Name and Rank: Dr. Pongrit Krubphachaya

2. Department/School: School of Biology, Institute of Science

3. University: Suranaree University of Technology, Thailand  
111 University Avenue, Muang District,  
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand  
Tel. 044-224295, 044-224190  
Fax. 044-224185, 044-224633  
Emails: pongrit@sut.ac.th, pongrit@gmail.com

4. Degrees:	Field	Date Awarded	Institute/Country
Ph.D.	Molecular Genetics-Genetic Engineering	2008	Mahidol University, Thailand
M.Sc.	Molecular Genetics-Genetic Engineering	2001	Mahidol University, Thailand
B.Sc.	Biology	1989	Khon Kaen University, Thailand

### 5. Experience:

Period	Position	Institute/Firm
2010-present	Associate Dean of Institute of Science	Suranaree University of Technology, Thailand
2006-present	Lecturer	Suranaree University of Technology, Thailand

### 6. Current Professional Field Registration:

Molecular Genetics

### 7. Member:

-No-

### 8. Research Grants Awarded:

2009-2011: National Research Council of Thailand/Institute of Research and Development,  
Suranaree University of Technology, Thailand

### 9. Awards and Honors:

-No-

### 10. Scientific Publications:

#### Referred Articles:

1. **Krubphachaya P**, Juricek M, Kertbundit S. Induction of RNA-mediated resistance to papaya ringspot virus type W. 2007. **J Biochem Mol Biol.** May 31;40(3):404-11.
2. Chudapongse, N., **Krubphachaya, P.**, Leelayuwat, C. and Kermode, J. C. Expression and Purification of a Soluble Recombinant A1 Domain of Human von Willebrand Factor in Bacteria. 2011. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**

#### Conference Abstracts:

1. Tongsumrit, R, **Krubphachaya, P** (2011). Construction of recombinant plasmid for displaying  $\alpha$ -amylase or glucoamylase genes from *Debaryomyces occidentalis* in yeast.  
**The 4<sup>th</sup> SUT Graduate Conference** . Suranaree University of Technology 7-8 July 2011.