ศิริมา สุขเกษม : การผลิตและพัฒนาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสด้วยเทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ (PRODUCTION AND IMPROVEMENT OF ALPHA-AMYLASE BY DNA SHUFFLING) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ยมาภัย, 139 หน้า

เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำกับวิวัฒนาการเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ในระดับของยีน นอกจากนี้ การกำกับวิวัฒนาการต้องการวิธีการที่มีศักยภาพ เพื่อคัดเลือกคุณสมบัติใหม่ของเอนไซม์ เทคโนโลยีการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอได้ประสบผลสำเร็จในการจัดตั้งในงานวิจัยนี้ โดยใช้เอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสจากแบคทีเรียสองสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ DSM13 และสายพันธุ์ DSM8785 เป็นเอนไซม์ต้นแบบ การแสดงออกและการปลดปล่อยเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสประสบผลสำเร็จภายใต้การชักนำของ IPTG ในระบบการแสดงออกของยีนด้วยแบคทีเรีย การวิเคราะห์คุณลักษณะเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสทั้ง 2 ชนิด จากโคลน rpFL13-10xHis and rpFL8785-10xHis พบว่าแคลเซียมไอออนชักนำความเสถียรของโครงสร้างของเอนไซม์ และพัฒนากิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้น สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสทั้ง 2 ชนิด คือ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และพบว่า ทั้ง 2 เอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิต เป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 การวิเคราะห์จลนศาสตร์ พบว่า คุณสมบัติของเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสจากโคลน rpFL8785-10xHis ดีกว่าเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสจากโคลน rpFL13-10xHis ยิ่งไปกว่านี้ เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้ดีกว่าการย่อยสลายแป้งที่ละลายน้ำ การสร้างห้องสมุดของยีนอัลฟา-อะไมเลสสร้างขึ้นด้วยเทคนิค error prone PCR และเทคนิคการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ ได้ทำการคัดเลือกโคลนทั้งหมด 5,000 โคลน ด้วยวิธีการแสดงผลในปริมาณมากจากทั้งหมด 6 สภาวะ ได้เอนไซม์ 3 ชนิดที่ได้รับการสลับสับเปลี่ยนดีเอ็นเอ คือ เอนไซม์ 2a11h, 2b8b, 4d2d การกลายพันธุ์แบบจุดของเอนไซม์ที่ได้รับการเปลี่ยนแปลง คือ เอนไซม์ 1b9a เกิดขึ้นที่บริเวณอนุรักษ์และที่ตำแหน่งการจับของแคลเซียมซึ่งสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SIRIMA SUKASEM : PRODUCTION AND IMPROVEMENT OF ALPHA-AMYLASE BY DNA SHUFFLING. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph. D., 139 PP.

DIRECTED EVOLUTION/ DNA SHUFFLING/ ALPHA-AMYLASE/ HIGH THROUGHPUT SCREENING/ *Bacillus licheniformis*

DNA shuffling technology is a powerful method of directed evolution to improve the property of enzymes at a gene level. Moreover, directed evolution requires an efficient method for screening new properties of enzymes. DNA shuffling technology was successfully established in this thesis by using two alpha-amylases from *Bacillus licheniformis* DSM13 and DSM8785 as a model. The expression and secretion of alpha-amylases were done under IPTG induction in a bacterial expression system. The characteristics of recombinant alpha-amylases from rpFL13-10xHis and rpFL8785-10xHis were analyzed. The results showed that calcium ion enhanced the stability of enzyme structure and increased the activity of both recombinant alpha-amylases from rpFL13-10xHis and rpFL8785-10xHis. The optimal conditions of both alpha-amylases activity were at the temperature of 70 ^{o}C, at pH 7 and their half life ($t_{1/2}$) lasted 30 mins, at 60^{o}C, at pH 7. The kinetic analysis suggested that the property of rpFL8785-10xHis alpha-amylase was better than rpFL13-10xHis alpha-amylase and both enzymes could hydrolyze cassava starch better than soluble starch. The library construction of mutant alpha-amylase was created by the recombination of error prone PCR, followed by DNA shuffling. The screening by high throughput method was done under six different conditions from 5,000 clones. Three shuffled

alpha-amylases no. 2a11h, no. 2b8b, and no. 4d2d contained shuffled amino acids between two alpha-amylases from *B. licheniformis* DSM13 and DSM 8785. The single point mutation of variant enzyme no. 1b9a occurred in the conserved regions and the calcium binding sites, which were important for the activity and stability of the enzyme.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2007 Advisor's Signature_____