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

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

ภรณี สว่างศรี อัจฉราพรรณ ใจเจริญ รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สุภาวดี ง้อเหรียญ
บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ พยุงศักดิ์ รวยอารี หทัยรัตน์ อุไรรงค์
Paranee Sawangsri Adcharapan Chaicharoen Rungnapa Pitaktansakul Supawadee Ngorrian
Boonreunrat Ruengwised Payungsak Rauyaree Hathairat Urairong

Abstract

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

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

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร รังสิต ธัญบุรี ปทุมธานี 12110 ประเทศไทย
Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Patumthani, 12110, Thailand

บทคัดย่อ

เอนไซม์แอลฟา อะไมเลส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสลายเม็ดแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาล ซึ่ง เป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ซึ่งเชื้อ *Bacillus* sp. บางสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยแป้งและทนอุณหภูมิสูง งานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส จากแหล่งต่างๆ ได้ *Bacillus* spp. ทั้งสิ้น 476 ไอโซเลท นำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งโดยวิธีวัดการสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารที่มีแป้ง 1% (w/v) ทดสอบการทำให้น้ำแป้งเหลว และการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า ไอโซเลท D1-1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส ได้ดีที่สุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 2.39 U/มิลลิลิตร การจำแนกชนิดของ ไอโซเลท D1-1 โดยการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณ 16s rDNA เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเหมือน 99% การโคลนยีนแอลฟา อะไมเลส พบขนาดชิ้นส่วนของยีน เท่ากับ 1,980 คู่เบส (GenBank accession no. EU195860.1) และมีลำดับของเปปไทด์ เท่ากับ 659 อะมิโนแอซิด เมื่อเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ expression vector pQE-80L แล้วถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบว่า สามารถ ชักนำการแสดงออกของยีนด้วย สาร 3 mM IPTG และ 3 mM Lactose เมื่อนำ crude enzyme ที่ผลิตได้ มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน HisTALON™ Gravity Column แล้วตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์แอลฟา อะ ไมเลส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73 กิโลดาลตัน และ crude enzyme ที่ผลิตได้มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 70 °C ซึ่งเทียบเท่ากับเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้า

คำหลัก: แอลฟา อะไมเลส การแสดงออกของโปรตีน *Bacillus subtilis Escherichia coli*