รายงานโครงการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์
Commercial Utilization of Microorganisms and Microbial Products

หัวหน้าโครงการวิจัย
มัลลิกา แก้ววิเศษ
MALLIKA KAEWWISES

ปี พ.ศ. 2561

รายงานโครงการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์
Commercial Utilization of Microorganisms and Microbial Products

หัวหน้าโครงการวิจัย
มัลลิกา แก้ววิเศษ
MALLIKA KAEWWISES

ปี พ.ศ. 2561

คำปรารภ

โครงการวิจัยการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์ เป็นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งการผลิตไส้เดือนฝอย โดยโครงการนี้ประกอบด้วย 4 การทดลองได้แก่

1. การผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์
2. การผลิตไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง
3. การโคลนยีน 5-aminolevulinate synthase (ALAS) จากจุลินทรีย์
4. เทคโนโลยีต้นแบบการผลิตไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในอาหารเหลวเชิงพาณิชย์

โครงการนี้ได้เริ่มดำเนินการเมื่อเดือนตุลาคม 2559 และสิ้นสุดเมื่อเดือนกันยายน 2561 หวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์กับนักวิจัยผู้สนใจทุกท่าน

มัลลิกา แก้ววิเศษ
หัวหน้าโครงการ
มีนาคม 2562

สารบัญ

สารบัญ หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... 5

ผู้วิจัย 6

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ 7

บทนำ..... 8

บทคัดย่อ..... 9

การทดลองที่ 1 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์ 12

การทดลองที่ 2 การผลิตไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 26

การทดลองที่ 3 การโคลนยีน 5-aminolevulinate synthase (ALAS) จากจุลินทรีย์ 39

การทดลองที่ 4 เทคโนโลยีต้นแบบการผลิตไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในอาหารเหลวเชิงพาณิชย์ 62

บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... 70

บรรณานุกรม..... 72

ภาคผนวก 77

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์ได้รับความร่วมมือจากคณะวิจัย และได้รับความช่วยเหลือจากคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ คณะกรรมการบริหารงานวิจัย สำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการ กรมวิชาการเกษตร คณะกรรมการบริหารงานวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตรและการสนับสนุนงบประมาณการดำเนินการวิจัยจากสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ทั้งในกรมวิชาการเกษตรและนอกกรมวิชาการเกษตร ที่ร่วมดำเนินการในการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอบขอบคุณบุคลากรสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่สนับสนุนโครงการนี้

มัลลิกา แก้ววิเศษ
หัวหน้าโครงการ

ผู้วิจัย

โครงการวิจัย การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์
หัวหน้าโครงการ
นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 1 การผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์
หัวหน้าการทดลอง
นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน
นางสาวภรณี สว่างศรี หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 2 การผลิตไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง
หัวหน้าการทดลอง
นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน
นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
นางสาวจีรภา ปัญญูศิริ หน่วยงาน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง หน่วยงาน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

การทดลองที่ 3 การโคลนยีน 5-aminolevulinate synthase (ALAS) จากจุลินทรีย์
หัวหน้าการทดลอง
นางสาวภรณี สว่างศรี หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน
นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต หน่วยงาน ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

การทดลองที่ 4 เทคโนโลยีต้นแบบการผลิตอีพีเอ็นควบคุมแมลงในอาหารเหลวเชิงพาณิชย์
หัวหน้าการทดลอง
นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน
นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางภรณี สว่างศรี หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALA 5-Aminolevulinic acid

ALAS 5-Aminolevulinate synthase

PCR Polymerase Chain Reaction

NA Nutrient agar

LB Luria-Bertani

บทนำ

ปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในทางการเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร สิ่งแวดล้อม และพลังงาน เช่น ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพ แบคทีเรียบีที รา และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุง ยีสต์ทำไวน์ ยีสต์ทำขนมปัง สาหร่ายเกลียวทองที่ใช้เป็นอาหารเสริม ยีสต์/แบคทีเรียผลิตเอทานอล เป็นต้น ตลอดจนพัฒนาในระดับยีนโดยทำให้เกิด mutation ให้มีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน การตัดต่อยีน และโคลนยีน ได้เป็นเอ็นไซม์ และสารชีวภาพต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ โดยทุกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องผ่านขั้นตอนการพัฒนาตั้งแต่ในระดับห้องปฏิบัติการและทำซ้ำเพื่อได้คุณสมบัติเดิม แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษกับสัตว์ทดลอง-สิ่งแวดล้อม ให้สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัย จึงจะสามารถเข้าสู่กระบวนการผลิตขยายในปริมาณมากจาก pilot scale จนถึงเชิงพาณิชย์ (industrial scale)

กรมวิชาการเกษตร มีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลากหลายชนิดและสายพันธุ์ ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง เช่น ชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช หรือจุลินทรีย์บางชนิดต้องผ่านกระบวนการอื่นๆ เพื่อได้เป็นผลิตภัณฑ์ก่อนนำไปใช้ เช่น เอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช แบคทีเรียสร้างเอ็นไซม์ ALA เพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และยีสต์ผลิตเอ็นไซม์กลูโคอะไมเลสและแอลฟาอะไมเลสสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ ยังต้องมีการศึกษาและทดสอบโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง ให้สามารถนำไปใช้ได้จริง จะช่วยลดต้นทุนการผลิตด้วยเทคโนโลยีการผลิตขยายจุลินทรีย์ปริมาณมากๆ ในระดับถังหมัก ให้ได้จำนวนมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในสภาพไร่-นา รวมทั้งมีเทคนิคหรือกระบวนการในการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ ทั้งในเชิงวิชาการและเชิงพาณิชย์เพื่อการนำผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มประสิทธิภาพในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยเพื่อศึกษาการผลิตเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการการเกษตร รวมทั้งการศึกษากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย

บทคัดย่อ

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ ได้มีการนำเอากระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการพัฒนาจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ต่างๆ รวมทั้งการผลิตไส้เดือนฝอย การผลิตเอ็นไซม์กลูโคอะไมเลส และแอลฟาอะไมเลส โดยนำยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ โดยเพิ่มปริมาณยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sap* I และนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pD1214-AT (ATUM, USA) นำพลาสมิดลูกผสมถ่ายฝากเข้าเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสสามารถ ย่อยแป้งได้ โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน ในการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุของโรคแมลง โดยรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในแหล่งต่างๆ และจากแหล่งที่เก็บรักษาเชื้อราของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เลือกนำเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลีย มาผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยทำการทดสอบการยับยั้งการกินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสในหนอนกระทู้ผักวัยสอง และทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง พบว่าหนอนบางตัวไม่กินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปะปนอยู่ในอาหาร ทำให้หนอนไม่เจริญเติบโตตามปกติ หนอนบางตัวจะตายช่วงที่เข้าดักแด้ หรือตายในช่วงดักแด้ไม่สามารถเจริญเป็นผีเสื้อได้ ในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA พบว่า เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA ได้ดี จึงนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase ตรวจพบชิ้นยีนที่ได้ มีขนาดประมาณ 1,224 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hem* A ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของเปปไทด์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน *hem*A (synthase) ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem* A เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) แล้วถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และทำการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ ALA synthase พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase มีผลทำให้ recombinant *E. coli* สามารถผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) ได้ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ในการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. Thai isolate) :ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด ได้นำมาพัฒนาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตรต่างๆ พบว่า สูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 7: 2 : 1 เลี้ยงในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย

จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารมี pH เท่ากับ 7 ตั้งวางในสภาพอุณหภูมิ 25±2 °ซ เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด ระหว่าง 90,000-104,000 ตัว/มล. โดยการบ่มเพาะในสภาพมีหรือไม่มีแสงพบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ผลผลิตไส้เดือนฝอยสามารถเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด เท่ากับ 32.2 % และมีประสิทธิภาพในการใช้พ่นกำจัดหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ในแปลงผักคะน้า โดยพ่นที่อัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง

Abstrat

The process of biotechnology was taken to develop microorganisms and microbial products for utilization. The objective was to study the production of various enzymes and Thai nematode production. Production of glucamylase and alpha-amylase was using a recombinant strain of Saccharomyces cerevisiae strain INVSc-1 was constructed that contained the genes encoding alpha-amylase and glucoamylase. The alpha-amylase and glucoamylase genes were inserted into yeast expression plasmid pD1214-AT. Recombinant alpha-amylase and glucoamylase were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast expression plasmid under the control of the SS_Alphafactor secretion signal, alpha-amylase and glucoamylase activities were secreted into the culture medium. The results showed that recombinant enzyme of the alpha-amylase and glucoamylase synergistically enhanced starch degradation. The production of chitinase from entomopathogenic was studied by collecting fungi in various sources and from fungal preservation of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Both of Metarhizium and Beaveria were studied to produce enzyme chitinase and to be tested with cutworm. To test the food inhibition from chitinase enzymes with 2 instar cutworm, it was found that some cutworms did not eat foods that contain Chitinase enzymes mixed in food. Insect growth inhibition test by dropping the chitinase enzyme at the back of the chest of the 4 instar of cutworm found that some cutworms that received enzymes died during the pupa period. Some cutworm could not change to pupae or die during the pupa and could not change to be butterflies. The production of 5-Aminolevulinic acid was studied because 5-Aminolevulinic acid (ALA) is a biological substance that can be used for agricultural purposes as a plant growth promoter. In this study, *hem*A gene of *R. sphaeroides* D34 isolate was obtained by PCR gene cloning technique and the full length nucleotide approximately 1,224 bp. The sequenced result was exhibited as *R. sphaeroides* with 100% similarity when compared to *hem*A gene (accession no. CP015210.1) and 99% similarity peptide sequences (accession no. ACM01167.1) in the GenBank database. *Hem* A gene could be overexpression within the protein expression vector pLATE52 and the recombinant was then

transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The production of recombinant protein can be induced by 3 mM IPTG. The recombinant ALAS was analyzed by SDS-PAGE. The size of recombinant ALAS was molecular weight approximately 40 kDa and recombinant enzyme efficient activity could produce ALA in 12 hours. The last study of this project is Thai entomopathogenic nematode (Steinernema sp. Thai isolate) that are biocontrol to many insect pests. The mass production development are increases on the amount of various liquid formula and studying affecting factors to the increasing number of nematodes in order to obtain a prototype of commercial production technology. The results showed that Soy milk formula + lard + water in ratio 7: 2: 1, fed in a stirring vial type bottle monoxenic culture condition with bacterial Xenorhabdus sp. 10^7 cells/ml. The food has a pH equal to 7, incubation at temperature of 25 + 2 oC for 10 days. The nematodes grow and propagate best between 90,000-104,000 nematodes/ml (or equal to 90 and 104 million/liter). The incubation in the presence or absence of light showed that does not affect the growth of nematodes. The nematodes can be stored in the moisture-holding substance for 3 months with the lowest mortality percentage of 32.2%. It has effective to kill the common cutworm and flea beetles In a kale plot. By spraying at a rate of 5 million per plot of 20 square meters, 5 times.

การทดลองที่ 1
การผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์
Production of Recombinant Alpha-amylase and Glucoamylase in Yeast

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ ภรณี สว่างศรี

คำสำคัญ

แอลฟาอะไมเลส, กลูโคอะไมเลส, alpha-amylase, glucoamylase

บทคัดย่อ

เอนไซม์ย่อยแป้งที่เกี่ยวข้องในขบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง มี 2 ชนิดด้วยกัน คือ แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ซึ่งปัจจุบันมีการใช้เทคนิครีคอมบิแนนท์เอนไซม์เข้ามาช่วยในการผลิตเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติหรือปริมาณที่ต้องการได้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์นำยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ เพื่อยีสต์สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส เพื่อใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังในการผลิตเอธานอลได้ในขั้นตอนเดียว และเพื่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป โดยเพิ่มปริมาณยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sap* I และนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pD1214-AT (ATUM, USA) นำพลาสมิดลูกผสมถ่ายฝากเข้าเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสสามารถ ย่อยแป้งได้ โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน

Abstract

Alpha-amylase and glucoamylase is an enzyme that catalyses the breakdown of starch into sugars. Alpha-amylase and glucoamylase has been used for the production ethanol from cassava. In this study, a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc-1 was constructed that contained the genes encoding alpha-amylase and glucoamylase. The alpha-amylase and glucoamylase genes were inserted into yeast expression plasmid pD1214-AT. Recombinant alpha-amylase and glucoamylase were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast expression plasmid under the control of the SS_Alphafactor secretion signal, alpha-amylase and glucoamylase activities were secreted into the culture medium. The results showed that recombinant enzyme of the alpha-amylase and glucoamylase synergistically enhanced starch degradation.

คำนำ

จากวิกฤตการณ์ที่น้ำมันมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เกิดความต้องการพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงประเภทต่างๆ เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ ลม น้ำ ไฮโดรเจนและชีวมวล โดยเฉพาะพลังงานทดแทนจากภาคการเกษตร สามารถนำปาล์มน้ำมันและสบู่ดำ ผลิตเป็นไบโอดีเซล อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่างและมันสำปะหลัง ผลิตเป็นเอทานอล เพื่อนำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน ผลิตเป็นแก๊สโซฮอล์

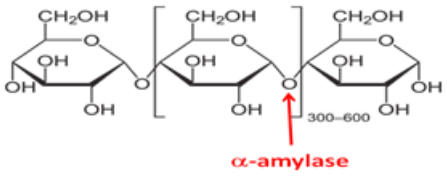
ประเทศไทยเริ่มใช้เอทานอลผสมน้ำมันเบนซินเพื่อการผลิตแก๊สโซฮอล์มานานกว่า 20 ปีแล้ว โดยดำเนินการจากแนวพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวเมื่อปี 2528 ในโครงการส่วนพระองค์ ครั้งนั้นได้ศึกษาการผลิตแก๊สโซฮอล์เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน โดยผลิตเอทานอลจากอ้อย หลังจากนั้นก็เกิดความตื่นตัวทั้งจากภาครัฐและเอกชนเข้ามาร่วมพัฒนาและนำไปทดสอบกับเครื่องยนต์อื่นๆ เป็นต้นมา (อัมพร, 2537)

ประเทศไทยมีวัสดุที่มีศักยภาพผลิตเอทานอลหลายชนิด แต่จากการประเมินขั้นต้นพบว่าตามสภาพที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน ทั้งมันสำปะหลังและอ้อยมีความเหมาะสมมากกว่าพืชชนิดอื่นในการที่มีวัตถุดิบปริมาณมากพอสำหรับการผลิตอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ นอกจากนั้นประเทศไทยมีความพร้อมด้านความรู้ความเข้าใจรายละเอียดและเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง (อัมพร, 2537)

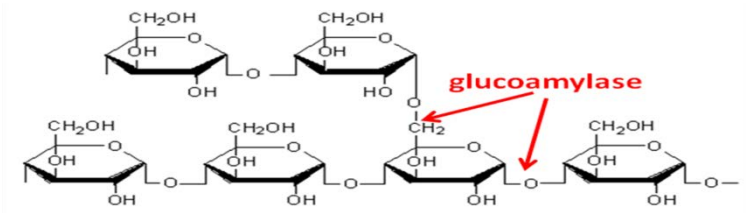
เอนไซม์ย่อยแป้งที่เกี่ยวข้องในขบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง จะเห็นว่ามี 2 ชนิดด้วยกัน คือ แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยแอลฟาอะไมเลสจะตัดพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก ระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ผลผลิตที่ได้คือ oligosaccharide และ α-limit-dextrin (ภาพที่ 1)

ส่วนกลูโคอะไมเลสจะตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก ซึ่งการทำงานจะตัดโมเลกุลที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสอย่างเดียว (ภาพที่ 2)

แหล่งของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีหลายชนิดด้วยกัน ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตัดพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก



ภาพที่ 2 การทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสตัดพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสและคุณสมบัติบางประการ

แหล่งของจุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล(Da)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)
α-Amylase		
Bacillus subtilis	41,000	
B. amyloliquefaciens	49,000	70
B. licheniformis	62,000	90
Glucoamylase		
Aspergillus awamori	83,700-88,000	60
A. niger I	99,000	
A. oryzae I	76,000	60
A. oryzae II	38,000	40
Penicillium oxalicum I	84,000	55-60
Rhizopus delemar	100,000	40

(พักตร์ประไพ และ วิชัย, 2546)

ช่วงแรกของการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์อะไมเลส จะเป็นการศึกษาคุณสมบัติและการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยตรง เช่น การศึกษาการผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อรา *A. niger* H9 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง (อรพิน, 2530) การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มทนร้อนที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเติบโตและสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีแป้ง (อาคม และคณะ, 2553)

ต่อมาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากจุลินทรีย์จะเป็นการโคลนยีนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ให้มากขึ้น เช่น การโคลนยีนแอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ *B. licheniformis* (Shahhoseini *et al*., 2003) จากเชื้อ *Halothermothrix orenii* (Mijts and Patel, 2002) และจากเชื้อ *Streptococcus bovis* 148 (Satoh *et al*.,1993) ถ่ายฝากเข้าสู่ *Escherichia coli.*

Jeang และคณะ (2002) ได้พบแบคทีเรียในดิน *Cytophaga* sp. ซึ่งมีเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ (raw-starch-digesting amylase: RSDA) มีน้ำหนักประมาณ 59 กิโลดาลตัน จากการศึกษาพบว่ายีน RSDA มีความเหมือนกับแอลฟาอะไมเลสในแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 3 สายพันธุ์ จึงได้ทำการโคลนยีน RSDA และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* พบว่ายังคงคุณสมบัติของ RSDA เหมือนกับที่ผลิตจาก *Cytophaga* sp.

Özcan และคณะ (2001) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ RSKK 246 ผลิตแอลฟาอะไมเลส ขนาด65 กิโลดาลตัน จึงทำการโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pUB110 และถ่ายฝากเข้าสู่ *B. subtilis* สายพันธุ์ RSKK246, RSKK243, RSKK244, YB886 และ ORBAM โดย recombinant plasmid ที่ใช้ถูกควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ของ *Bacillus* sp. เอง พบว่ามีการแสดงออกสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และยังมีการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลส ให้มีการแสดงออกในยีสต์ *Yarrowia lipolytica* (Park *et al*., 1997) และ *Saccharomyces cerevisiae* (Southgate *et al*., 1993) ด้วย

นอกจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะได้จากจุลินทรีย์แล้ว ยังพบในพืชด้วย เช่น ข้าว มีรายงานการศึกษาลายพิมพ์ของเอนไซม์อะไมเลสในเมล็ดข้าวที่กำลังงอก (Mitsunaga *et al*., 2001) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส และความมีชีวิตของต้นกล้า (Seedling vigor) (Karrer *et al*., 2004)

ดังที่กล่าวข้างต้นแล้วว่า เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถย่อยได้เฉพาะพันธะ α-1,4 กลูโค ซิดิกหรือย่อยแป้งสุกเท่านั้น ส่วนกลูโคอะไมเลสย่อยทั้งพันธะ α-1,4 และ α-1,6 กลูโคซิดิก นั่นคือสามารถย่อยได้ทั้งแป้งสุกและดิบ จึงได้มีการโคลนยีนกลูโคอะไมเลสถ่ายฝากเข้ายังเชื้อรา *A. niger* เพื่อเพิ่มจำนวนชุด (copy number) ของยีนกลูโคอะไมเลส ส่งผลให้เชื้อรา *A. niger* ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้มากขึ้น (Verdoes *et al*., 1994; MacKenziea *et al*., 2000; Yao *et al*., 2001) นอกจากนี้ยังโคลนยีนกลูโคอะไมเลส เพื่อผลิตเอนไซม์ปริมาณมากในยีสต์ *Pichia pastoris* (Liu *et al*., 2005) ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Murai *et al*., 1998; Lin *et al*., 1998; Garc´ıa *et al*., 2005; Kosugi *et al*., 2009) Shigechi และคณะ (2002) ได้ทำการโคลนยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อให้ยีสต์ผลิตเอนไซม์ได้ทั้งสองชนิด ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์นำยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเข้าสู่ยีสต์ เพื่อยีสต์สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส เพื่อใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังในการผลิตเอธานอลได้ในขั้นตอนเดียว และเพื่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีและเอนไซม์
   1.1 สารเคมี
   สารเคมีที่ใช้ในการทดลองซื้อมาจากบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย
   1.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมี
   - สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermantas
   - สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

   1.3 เอนไซม์
   - Fast digest Sap I (Fermantas, USA)
   - T4 ligase (Fermantas, USA)
   - GoTaq polymerase (Promega, USA)

2. จุลินทรีย์ พลาสมิด และอาหารเลี้ยงเชื้อ
   2.1 แบคทีเรียและยีสต์
   - แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α
   - ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc

2.2 พลาสมิด

- พลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (pQAMY) จากงานวิจัยก่อนหน้า
- พลาสมิดลูกผสมของยีนกลูโคอะไมเลส (pJAMY) จากงานวิจัยก่อนหน้า
- พลาสมิด pD1214-AT (ATUM, USA)

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

- อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 2xYT (Himedia, India)
- อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ YPD (Himedia, India)
- อาหารคัดเลือกยีสต์ minimal SD-U (Clontech, USA)

3. เครื่องมือ

3.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems)

3.2 อุปกรณ์การอ่านภาพและบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์

3.3 เครื่อง Spectophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)

3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ควบคุมอุณหภูมิ

3.5 ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร

วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์และเชื่อมต่อยีนแอลฟาอะไมเลส (AAMY) เข้ากับเวคเตอร์

เพิ่มปริมาณยีน AAMY ด้วยเทคนิค PCR ทำโดยใช้พลาสมิดลูกผสม pQAMY (จากงานวิจัยก่อนหน้า) เป็นแม่แบบในส่วนผสมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย pJAMY 1 ไมโครกรัม, 1X PCR buffer with $MgCl_2$, 80 ไมโครโมลร์ dNTPs, ไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์(ประกอบด้วย F-AAMY1214 (5' - TACACGTACTTAGTCGCTGAAGCTCTTCTATGTTTGCAAAACG - 3') 0.2 ไมโครโมลาร์ และ R-AAMY1214 (5' - TAGGTACGAACTCGATTGACGGCTCTTCTACCTCAATGGGGAAG - 3') 0.2 ไมโครโมลาร์), 2.5 ยูนิต *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, USA) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 90 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 300 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส ใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และสกัดบริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Kit (Fermentas, USA)

นำผลผลิตจาก PCR ตัดด้วยเอนไซม์ *Sap* I ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยยีน AAMY 20 นาโนกรัม, 1X Fast Digest buffer และ 1 ไมโครลิตร Fast Digest *Sap* I บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และนำยีน AAMY ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sap* I แล้ว และเวคเตอร์ pD1214-AT (ATUM, USA) มาเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย ยีน AAMY ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sap* I 10 นาโนกรัม,

pD1214-AT 10 นาโนกรัม, 1x Rapid Ligation Buffer, 5 ยูนิต T4 DNA ligase (Thermo Scientific, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำพลาสมิดลูกผสมถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation เริ่มจากการนำแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพพร้อมรับดีเอ็นเอ (competent cell) แช่ในน้ำแข็งจนกระทั่งละลายประมาณ 2 ใน 3 ส่วน เติมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้วจำนวน 5 ไมโครลิตร ผสมลงในสารแขวนลอยแบคทีเรีย บ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหาร LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ปั่นตกตะกอนแล้วทิ้งส่วนน้ำใส 700 ไมโครลิตร ละลายเชื้อแบคทีเรีย นำไปเกลี่ยบนอาหาร LB ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของยีน AAMY ที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดโดยเทคนิค colony PCR ทำโดยใช้โคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร เป็นแม่แบบในส่วนผสมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 2 มิลลิโมล $MgCl_2$, 80 ไมโครโมลาร์ dNTPs, ไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์(ประกอบด้วย F-AAMY1214 0.2 ไมโครโมลาร์ และ R-AAMY1214 0.2 ไมโครโมลาร์), 2.5 ยูนิต *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 90 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)

2. การการสังเคราะห์และเชื่อมต่อยีนกลูโคอะไมเลส (GAMY) เข้ากับเวคเตอร์

เพิ่มปริมาณยีน GAMY ด้วยเทคนิค PCR ทำโดยใช้พลาสมิดลูกผสม pJAMY (จากงานวิจัยก่อนหน้า) และใช้ไพรเมอร์ F-GAMY1214 (5'-TACACGTACTTAGTCGCTGAAGCTCTTCTATGTCGTTCCGATC-3') และ R-GAMY1214 (5'-TAGGTACGAACTCGATTGACGGCTCTTCTACCCTACCGCCAGG-3') ในปฏิกิริยา PCR และนำผลผลิต PCR เชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pD1214-AT วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1

3. การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์โดยวิธี LiAc/single-stranded carrier DNA/PEG method

เลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส เจือจางยีสต์ให้ได้ค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.4 ในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่ออีก 2-4 ชั่วโมง จากนั้นแยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1X TE (10 mM Tris,pH 7.5; 1 mM EDTA) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ละลายเซลล์ด้วย 1XLiAC/0.5XTE (100 mM Lithium Acetate, pH 7.5; 5 mM Tris,pH 7.5; 0.5 mM EDTA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติมพลาสมิดลูกผสม (ข้อ 1, 2) 1 ไมโครกรัม denatured salmon sperm DNA 100 ไมโครกรัม และ 1XLiAC/40% PEG3350/1X TE (100 mM Lithium Acetate, pH 7.5; 40% PEG3350; 10 mM Tris,pH 7.5; 1 mM EDTA) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในสารแขวนลอยยีสต์ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 88 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศา

เซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1X TE ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1X TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำเชื้อไปเกลี่ยบนอาหาร SC-U ที่ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร ตรวจสอบขนาดของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดด้วย colony PCR วิเคราะห์ขนาดด้วย 0.8 % agarose gel

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์

นำยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม เลี้ยงบนอาหารแข็ง YPC (อาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ ของแป้ง) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน หลังจากนั้นนำสารละลายไอโอดีน เทลงบนอาหารแข็ง บ่มที่มืดนาน 15 นาที เทสารละลายไอโอดีนออก สังเกตวงใสรอบโคโลนีของยีสต์

เวลา และสถานที่ทำการทดลอง

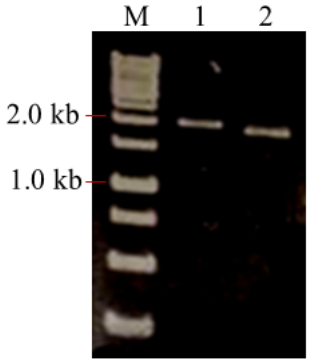
ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 (2 ปี)

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

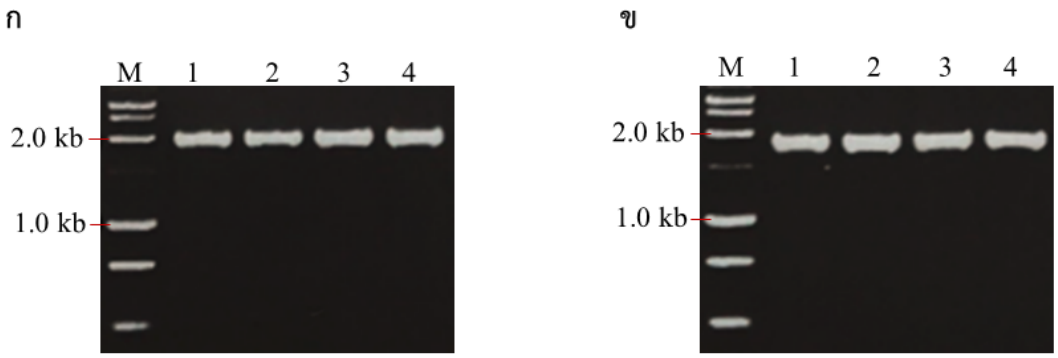
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสังเคราะห์ยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

ผลการทำปฏิกิริยา PCR จะได้ยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส ที่มีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส (ภาพที่ 3) จากนั้นนำยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสทำบริสุทธิ์และย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sap I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำที่ปลาย 3’ และ 5’ ของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส นำยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสที่ย่อยแล้ว แทรกเข้ากับพลาสมิด pD1214-AT ที่มีขนาด 5.1 กิโลเบส ซึ่งพลาสมิดถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sap I เป็นเส้นตรงแล้ว เชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 ligase และนำเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสในพลาสมิด pD1214-AT ด้วย colony PCR พบว่ามี PCR product ของทั้ง 2 ยีน มีขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสในพลาสมิด (ภาพที่ 4)



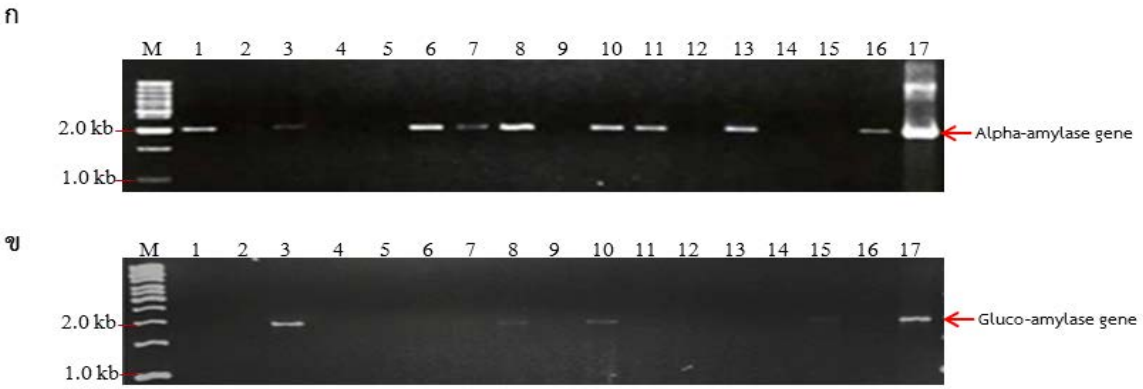
ภาพที่ 3 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสแสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของยีนแอลฟาอะไมเลส (lane 1) และยีนกลูโคอะไมเลส (lane 2)



ภาพที่ 4 การตรวจสอบการแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลส (ก) และ ยีนกลูโคอะไมเลส (ข) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5

2. **การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์และการคัดเลือกโคลน**

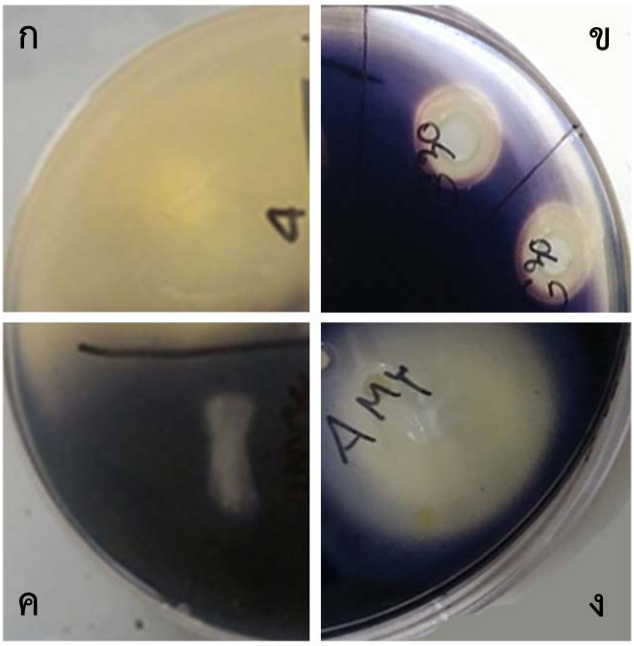
คัดเลือกพลาสมิดลูกผสมที่มีการแทรกของยีนกลูโคอะไมเลสและยีนแอลฟาอะไมเลส นำมาถ่ายฝากเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 ด้วยวิธี LiAc/single-stranded carrier DNA/PEG method จากนั้นนำยีสต์เลี้ยงในอาหารคัดเลือก SC-U ซึ่งเป็นอาหารที่ขาดกรดอะมิโน uracil ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารนี้ ส่วนยีสต์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะเจริญเติบโตได้ เนื่องจากพลาสมิดมียีน URA3 ทำให้สร้างกรดอะมิโน uracil ซึ่งเป็นกรมอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตได้เอง ดังนั้นเซลล์ยีสต์ที่ได้รับการพลาสมิดลูกผสมจึงสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก SC-U ซึ่งขาดกรดอะมิโน uracil ได้ จากนั้นนำโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก SC-U ตรวจสอบขนาดของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลสด้วย colony PCR พบว่าคัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนของแอลฟาอะไมเลส จำนน 16 โคโลนี ตรวจพบยีนของแอลฟาอะไมเลส จำนวน 9 โคลน ส่วนยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนกลูโคอะไมเลส คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก จำนวน 16 โคลน ตรวจพบยีนกลูโคอะไมเลส เพียง 3 โคลน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การตรวจสอบการแทรกของยีนแอลฟาอะไมเลส (ก) และยีนกลูโคอะไมเลส (ข) ในยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก SC-U

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์

นำยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม เลี้ยงบนอาหารแข็ง YPC (อาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้ง) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน หลังจากนั้นนำสารละลายไอโอดีนเทลงบนอาหารแข็งให้ทั่ว บริเวณที่ไม่มีการย่อยแป้งจะเกิดปฏิกิริยาการจับกันของโมเลกุลของแป้งและสารละลายไอโอดีน จะเห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนบริเวณที่มีการย่อยแป้งของเอนไซม์จะเห็นเป็นวงใสๆรอบโคโลนีของยีสต์ จากการทดลองพบว่าเกิดวงใสรอบยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (ภาพที่ 6ก) และยีนกลูโคอะไมเลส (ภาพที่ 6ข) ซึ่งเหมือนกับวงใสบริเวณรอบเอนไซม์อะไมเลสทางการค้า (ภาพที่ 6ง) ในขณะที่ไม่เกิดวงใสบริเวณเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc (ภาพที่ 6ค) ซึ่งไม่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนกลูโคอะไมเลส และจากการทดลองพบว่า เอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม มีขนาดของวงใสกว้างกว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม นั่นแสดงว่าเอนไซม์อะไมเลสจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมากกว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสม และเอนไซม์จากยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมสามารถหลั่งออกมาจากเซลล์ยีสต์ได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้น เนื่องจากพลาสมิด pD1214-AT ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นพลาสมิดที่มี secretion signal ชนิด SS_Alphafactor ที่ช่วยส่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสออกนอกเซลล์ของยีสต์ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Janse และ Pretorius (1995) ใช้ secretion signal ชนิด yeast mating pheromone alpha-factor secretion signal (MF alpha 1S) ซึ่งเป็น secretion signal ที่พบได้ตามธรรมชาติในยีสต์ เพื่อช่วยการหลั่งเอนไซม์จากยีสต์โดยไม่ต้องกระตุ้น และพลาสมิด pD1214-AT นี้ยังมีโปรโมเตอร์ TEF1 ซึ่งเป็น constitutive promoter ที่ทำงานหรือแสดงออกได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นด้วยตัวชักนำใดๆ



ภาพที่ 6 การตรวจสอบการย่อยแป้งของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลส (ก) และยีนกลูโคอะไมเลส (ข) เทียบกับยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc-1 ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสม (ค) และ เอนไซม์อะไมเลสทางการค้า (ง)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้สร้างยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งมีความสามารถในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบได้ และยีสต์ที่สร้างขึ้นมานี้สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดออกมาได้โดยใช้โปรโมเตอร์ TEF1 ซึ่งเป็น constitutive promoter ที่ทำงานหรือแสดงออกได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นด้วยสารชักนำใดๆ นอกจากนี้ยีสต์ที่สร้างขึ้นมานี้ยังสามารถหลั่งเอนไซม์ส่งออกมานอกเซลล์ของยีสต์ได้ จึงทำให้สะดวกในการใช้งานเอนไซม์ สามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้งเพื่อผลิตเอธานอลและยังสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในเชิงพาณิชย์ต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากยีสต์ในเชิงพาณิชย์
2. สามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้ง ทำให้ลดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตเอธานอล

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวัชรินทร์ ศรีประยูร ที่ช่วยงานในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2554. การเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation). (8 มกราคม 2554). http://www.champa.kku.ac.th/thanaset/DNAsyn6.pdf.

พักตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2546. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง. วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 11(4): 28-31.

ภูวดี. 2551. ผลิตเอทานอลเพื่อแก๊สโซฮอล์ (Gasohol). (22 พฤษภาคม 2553). http://www.vcharkarn.com/varticle/38199.

อรพิน ภูมิภมร. 2530. การผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อราที่ทำลายหัวมันสำปะหลังโดยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสาตร์). 21:39-40.

อัมพร ยังโหมด. 2537. สถานการณ์การผลิตมันสำปะหลัง, น.193-205. ใน มันสำปะหลัง (สถาบันวิจัยพืชไร่) กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ ฯ.

อาคม เทศนุ่ม สุภาวดี ฉิมทอง นิษก์นิภา สุนทรกุล คิน เลย์ คู จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ และ กนก รัตนะกนกชัย. 2553. การศึกษาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 และการผลิตน้ำตาลจากแป้งดิบและกากมันสำปะหลัง, น.36-44 ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Dalmia, B. K., Z. L. Nikolov. 1994. Characterization of a β-Galactosidase Fusion Protein Containing the Starch-Binding Domain of *Aspergillus glucoamylase*. Enzyme and Microbial Technology. 16:18-23.

Fritsch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 1989. Preparation and Transformation of Competent *E. coli*. Pages 1.74 -1.84. in : Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Garc´ıa, L. L., A. C. Adam, P. Manzanares and J. Polaina. 2005. Improving the Amylolytic Activity of *Saccharomyces cerevisiae* Glucoamylase by the Addition of a Starch Binding Domain. Journal of Biotechnology. 118:167–176.

Giardina, T., A. P. Gunning, N. Juge, C. B. Faulds, C. S. M. Furniss, B. Svensson, V. J. Morris and G. Williamson. 2001. Both Binding Sites of the Starch-binding Domain of *Aspergillus niger* Glucoamylase are Essential for Inducing a Conformational Change in Amylose. Journal of Molecular Biology. 313: 1149-1159.

Janse, B. J and I. S. Pretorius. 1995. One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of Saccharomyces cerevisiae producing alpha-amylase, glucoamylase and pullulanase. Appl Microbiol Biotechnol. 42(6): 878–883.

Jeang, C. J., L. S. Chen, M-Y. Chen and R. J. Shiau. 2002. Cloning of a Gene Encoding Raw-Starch-Digesting Amylase from a *Cytophaga* sp. and Its Expression in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 68:3651-3654.

Karrer, E.E., J.M. Chandler, M.R. Foolad and R. L. Rodriguez. 2004. Correlation between α-Amylase Gene Expression and Seedling Vigor. Biomedical and Life Sciences. 66:163-169.

Kaufmann, E., N. Geisler and K. Weber. 1984. SDS-PAGE Strongly Overestimates the Molecular Masses of the Neurofilament Proteins. FEBS LETTERS. 170(1):81-84.

Kosugi, A., A. Kondo, M. Ueda, Y. Murata, P. Vaithanomsat, W. Thanapase, T. Arai and Y. Mori. 2009. Production of Ethanol from Cassava Pulp *via* Fermentation with a Surface Engineered Yeast Strain Displaying Glucoamylase. Renewable Energy. 34: 1354–1358.

Legal-Coeffet, M. F., A. J. Jacks, K. Sorimachi, M. P. Williamson, G. Williamson and D. B. Archer. 1995. Expression in *Aspergillus niger* of the Starch-Binding Domain of Glucoamylase Comparison with the Proteolytically Produced Starch-Binding Domain. European Journal of Biochemistry. 233: 561-567.

Lin, L. L., Y. J. Ma, H. R. Chien and W. H. Hsu. 1998. Construction of an Amylolytic Yeast by Multiple Integration of the *Aspergillus awamori* Glucoamylase Gene into a *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome. Enzyme and Microbial Technology. 23:360–365.

Liu, S. H., W. I. Choua, C. C. Sheub and M. D. T. Chang. 2005. Improved Secretory Production of Glucoamylase in *Pichia pastoris* by Combination of Genetic Manipulations. Biochemical and Biophysical Research Communications. 326: 817–824.

MacKenziea, D. A., D. J. Jeenesa, X. Goub and D. B. Archer. 2000. Molecular Basis of Glucoamylase Overproduction by a Mutagenised Industrial Strain of *Aspergillus niger.* Enzyme and Microbial Technology. 26:193–200.

Matagne, A., B. Joris and J.-M. Frere. 1991. Anomalous Behaviour of a Protein During SDS/PAGE Corrected by Chemical Modification of Carboxylic Groups. Biochemical Journal. 280:553-556.

Mertens, J. A., C. D. Skory. 2007. Isolation and Characterization of a Second Glucoamylase Gene without a Starch Binding Domain from *Rhizopus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology. 40:874–880.

Mijts, B.N. and B.K.C. Patel. 2002. Cloning, Sequencing and Expression of an α–Amylase Gene, *amy*A, from the Thermophilic Halophile *Halothermothrix orenii* and Purification and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. Microbiology. 148:2343-2349.

Mitsunaga, S.I., O. Kawakami, T. Numata, J.Yamaguchi, K. Fukui and T. Mitsui. 2001. Polymorphism in Rice Amylase at an Early Stage of Seed Germination. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 65:662-665.

Murai, T., T. Yoshino, M. Ueda, I. Haranoya, T. Ashikari, H. Yoshizumi and A. Tanaka. 1998. Evaluation of the Function of Arming Yeast Displaying Glucoamylase on Its Cell Surface by Direct Fermentation of Corn to Ethanol. Journal of fermentation and Bioengineering. 86(6):569-572.

Özcan, n., A. Altinalan and M. S. Ekinci. 2001. Molecular Cloning of an α-amylase Gene from *Bacillus subtilis* RSKK246 and Its Expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtillis.* Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 25:197-201.

Park, C.S., C.C. Chang, J.Y. Kim, D.M. Ogrydziak and D.D.Y. Ryu. 1997. Expression, Secretion, and Processing of Rice-Amylase in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 272:6876-6881.

Satoh, E., Y. Niimura, T. Uchimura, M. Kozaki and K. Komagata. 1993. Molecular Cloning and Expression of Two α–Amylase Gene from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli.* Applied and Environmental Microbiology. 59:3669-3673.

Shahhoseini, M., A.A. Ziaee and N. Ghaemi. 2003. Expression and Secretion of an Alpha-Amylase Gene from a Native Strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 Promoter and Putative Signal Peptide of the Gene. Journal of Applied Microbiology. 95:1250-1254.

Shigechi, H., K. Uyamaa, Y. Fujita, T. Matsumoto, M. Uedac, A. Tanaka, H. Fukuda and A. Kondo. 2002. Efficient Ethanol Production from Starch through Development of Novel Flocculent Yeast Strains Displaying Glucoamylase and co-Displaying or Secreting α-Amylase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17:179–187.

Southgate, V.J., A.J.C. Steyn, I.S. Pretorius and H.J.J. V. Vuren. 1993. Expression and Secretion *Bacillus amyloliquefaciens* α-Amylase by Using the Yeast Pheromone α-Factor Promoter and Leader Sequence in *Saccharomyces cerevisiae.* Applied and Environmental Microbiology. 59:1253-1258.

Verdoes, J. C., P. J. Punt, A. H. Stouthamer and C. A.M.J.J. van den Hondel. 1994. The Effect of Multiple Copies of the Upstream Region on Expression of the *Aspergillus niger* Glucoamylase-Encoding Gene. Gene. 145: 179-187.

Wallis, G.L.F., R.J. Swift, F.W. Hemming, A.P.J. Trinci and J.F. Peberdy. 1999. Glucoamylase Overexpression and Secretion in *Aspergillus niger*: Analysis of Glycosylation. Biochimica et Biophysica Acta 1472 (1999) 576-586.

Williamson, G. and N. J. Belshaw. 1993. Properties of the Binding Domain of Glucoamylase. Carbohydrate Polymers. 21:147-149.

Yao, T. T., Y. M. Wang, J. L. Gu and Z. X. Wang. 2006. Overproduction of Glucoamylase by Recombinant *Aspergillus niger* Harboring Multiple Copies of *glaA*. Chinese Journal of Biotechnology. 22: 567-571.

การทดลองที่ 2
การผลิตไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง
Chitinase production from Entomopathogenic Fungi

มัลลิกา แก้ววิเศษ
เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ จีรภา ปัญญูศิริ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง

คำสำคัญ

ไคติเนส , เมตาไรเซียม, บิววาเลีย, chitinase, Metarhizium, Beauveria

บทคัดย่อ

รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในแหล่งต่างๆ และจากแหล่งที่เก็บรักษาเชื้อราของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เก็บรวบรวมในสภาพธรรมชาติที่เป็นสาเหตุโรคของแมลงและสามารถผลิตไคติเนส ได้แก่ เชื้อ เมตาไรเซียม และเชื้อ *Isaria spp* ส่วนเชื้อราที่นำมาศึกษาจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ได้แก่เชื้อเมตาไรเซียม บิววาเลีย เลือกนำเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลีย มาผลิตเอนไซม์ไคติเนส เพื่อเตรียมไปทดสอบกับหนอนผีเสื้อ ผลิตไคติเนสเพื่อที่จะนำไปทดสอบกับหนอนผีเสื้อ โดยนำเชื้อราเลี้ยงบนอาหารเหลว PDB ที่เติม chitin ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C โดยใช้ระยะเวลา 5 วัน โดยใช้เชื้อราในการเริ่มต้น 10^{7} สปอร์/มิลลิลิตร แล้วน้ำใสไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dye ในการทดสอบการยับยั้งอาหารจากเอ็นไซม์ไคติเนสพบว่า หนอนบางตัวไม่กินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปะปนอยู่ในอาหาร ทำให้หนอนไม่เจริญเติบโตตามปกติ ขนาดตัวจะเล็กกว่าหนอนจากกรรมวิธีควบคุม หนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะเริ่มตายหลังจากกินอาหารไป 24 ชั่วโมง แต่จะเริ่มตายมากขึ้นหลังจากกินอาหารไป 5 วัน บางตัวจะสามารถอยู่ได้ถึง 30 วัน หลังจากการทดลอง และตายไปโดยที่ไม่สามารถเข้าดักแด้ได้ ในขณะที่วิธีการควบคุมหนอนจะกินอาหารเทียมไปเรื่อยๆ และมีการเจริญเติบโตตามปกติ สามารถเข้าดักแด้และเปลี่ยนเป็นผีเสื้อได้ การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง โดยทำการหยดเอนไซม์ไคติเนสที่ที่ส่วนอกด้านหลัง หนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 พบว่าหนอนบางตัวที่ได้รับเอ็นไซม์จะตายช่วงที่เข้าดักแด้ โดยหนอนจะเข้าดักแด้ไม่ได้ หรือตายในช่วงเข้าดักแด้ไม่สามารถเจริญเป็นผีเสื้อได้

Abstract

Entomopathogenic Fungi were collected in various sources and from fungal preservation of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology . It was found that the fungal pathogens collected in natural conditions that caused the disease of insects and could produce chitinase were *Metarhizium* spp and *Isaria* spp.. Entomopathogenic Fungi from the National Center for Genetic Engineering and

Biotechnology were Metarhizium and Beuveria. Both of Metarhizium and Beaveria were studied to produce enzyme chitinase and to be tested with cutworm. The fungus was fed on PDB that added chitin at 30 $^{\circ}$ for 5 days and using the fungus starting at 10^{7} spores / ml. Sfupernatant that contained chitinase was dried with the freeze dye . To test the food inhibition from chitinase enzymes, it was found that some cutworms did not eat foods that contain Chitinase enzymes mixed in food. The cutworms that ate contaminate food with chitinase did not grow normally and the body size was smaller than the cutworm from the control treatment. The cutworms that received chitinase enzymes died after eating for 24 hours and the dead number increased after eating food for 5 days. Some cutworms could be able to stay up to 30 days after got chitinse and died without being able to change to pupae. The control treatment found that the cutworm could continue to eat artificial food and have normal growth. The cutworms can changed to pupae and butterflies Insect growth inhibition test by dropping the chitinase enzyme at the back of the chest of the 4 instar of cutworm found that some cutworms that received enzymes died during the pupa period. Some cutworm could not change to pupae or die during the pupa and could not change to be butterflies.

คำนำ

ราสาเหตุโรคแมลงมีประโยชน์ในการนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารชีวภาพในการกำจัดแมลงกันอย่างกว้างขวาง ราที่ใช้กำจัดแมลงที่เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือราเขียว (*Metarhizium* spp.) และราขาว *(Beavaria* spp.) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสาเหตุโรคแมลงชนิดอื่นอีก เช่น *Verticilium* spp. *Ascesersonia spp. Paecilomyces spp. ,Isaria* spp. เชื้อราดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์ทำลายผนังแมลง เช่น ไคติเนส (chitinase) โปรติเอส (protiease) ไลเปส (lipase)

การศึกษาเอ็นไซน์ไคติเนสได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์ได้กว้างขวาง เอนไซม์ไคติเนสสามารถย่อยไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างแมลง โดยมากพบที่เปลือกหุ้ม (cuticle) และ peritrophic membrane ในสำไส้แมลง โดยปกติแมลงจะสร้างเอนไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการลอกคราบ โดยจะสร้างในปริมาณที่พอดีกับความต้องการในขณะนั้น ดังนั้นหากแมลงได้รับเอนไซม์นี้ในปริมาณมากเกินความต้องการในช่วงที่ไม่ต้องการเอนไซม์ไคติเนสอาจมีผลต่อการเจริญของแมลงและอาจทำให้แมลงตายได้ ไคติเนสเป็นยีนที่พบได้ทั้งในเชื้อรา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย และไวรัสของแมลง (Muzzarelli, 1977) ยีนนี้เป็นยีนที่มีประสิทธิภาพในด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืชทั้งแมลง ไส้เดือนฝอยและเชื้อรา (Carr and Klessig, 1989; Linthorst, 1991; Sasai and Manocha, 1993) ในด้านแมลงจะมีผลต่อขบวนการลอกคราบโดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเอนไซม์ไคติเนสเกิดขึ้นเมื่อ

แมลงกินชิ้นส่วนของพืชที่มีไคติเนสเข้าไปในทางเดินอาหาร เอนไซม์ทำลายเยื่อบุผนังทางเดินอาหาร เนื่องจากผนังทางเดินอาหารมีไคติเนสเป็นส่วนประกอบ (ทิพย์วดี, 2549)

ในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส จะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง เช่น pH อุณหภูมิ ไคติน อายุของเชื้อ แล้วยังมีแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น glucosamine N-acetylglucosamine Chitobiose Chitooligosaccaride การสังเคราะห์ extracellular chitinase ใน Metarhizium จะมีกลไกซักนำที่ขึ้นกับ N-acetylglucosamine เชื้อ Metarhizium จะผลิตไคติเนส ช่วงที่เข้าทำลายผนังของแมลง ช่วงนั้นเอนไซม์จะมีผลผลิตของไคตินเป็นจำนวนมาก เชื้อราจะเจริญในช่วง pH กว้างๆตั้งแต่ 2.5-10.5 การผลิตเอนไซม์จะใช้เวลา 20-40 ชั่วโมง (Rustiguel et al., 2012)

ในการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสต่อแมลง Wu et al., (2010) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ในรูปสารกำจัดแมลงกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) พบว่าหนอนจะลดการกินลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้ Binod et al., (2007) ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *Trichoderma harianum* ต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) พบว่าอัตราการกินของหนอนจะน้อยลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้ แมลงที่มีรายงานการใช้ยีนไคติเนส ในการป้องกันกำจัดเป็นพวกหนอนกระทู้ เช่น Spodoptera frugiperda, S. littoralis, S. exigua, หนอนเจาะสมอฝ้าย Heliothis virescens และหนอนกินใบยาสูบ Manduca sexta นอกจากนั้นยังมีผลกับเพลี้ยอ่อน (Myzus pericae) โดยลดการเจริญเติบโตและลดประชากรรุ่นลูกของเพลี้ยอ่อน (Kramer and Muthukrishnan, 1997)ได้มีการใช้เชื้อราในการกำจัดแมลงเนื่องจากเชื้อราสามารถทำให้แมลงเป็นโรค โดยแมลงรับเชื้อราเข้าไปโดยตรงจากการกินหรือทางอ้อมจากเส้นใยที่ผ่านผนังลำตัวแมลง เอ็นไซม์ไคติเนสสามารถสกัดได้จากหลายแหล่งด้วยกัน ซึ่งราสาเหตุโรคแมลงก็เป็นแหล่งที่สำคัญ ทั้งเชื้อราเขียว Metarhizium ราขาว Beavaria และราอื่นๆ

ดังนั้นการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดแมลง จึงทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานถึงปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ตลอดจนทราบผลของเอนไซม์ที่มีต่อแมลง ซึ่งสามารถขยายผลในการนำเอนไซม์ไปผสมกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ดีขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

-ตู้ควบคุมระดับความเย็นที่ 4, –20 และ -80 องศาเซลเซียส
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- เครื่อง electrophoresis
- เครื่อง centrifuge
- vortex mixer

- water bath
- หม้อนึ่งความดัน
- ไมโครปิเปต ขนาด 2 μl, 20 μl, 200 μl และ 1000 μl
- เครื่อง incubate shaker
- ตู้ laminar flow
- เครื่องกวนสาร
-. ตู้ไมโครเวฟ
- เครื่อง spectrophotometer
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด
- ตู้อบ

วิธีการ

<u>การเก็บตัวอย่างเชื้อรา</u>

1.ทำการเก็บตัวอย่างราสาเหตุโรคแมลง โดยเก็บตัวอย่างแมลงที่ตายที่คาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากเชื้อรา ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มล. สำหรับแมลงที่มีขนาดเล็ก เก็บใส่หลอดขนาด 5 มล. สำหรับแมลงที่มีขนาดใหญ่ ส่วนแมลงที่มีขนาดใหญ่มากๆ เช่นผีเสื้อ เก็บตัวอย่างในถุงพลาสติก โดยทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆ ดังนี้ นครราชสีมา ปราจีนบุรี ปทุมธานี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ จันทบุรี เชียงใหม่

2.แยกเชื้อราออกจากตัวแมลง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน จนเกิดโคโลนีของเชื้อรา

3. แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยแยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยดูลักษณะสีของโคโลนี และนำเส้นใยไปส่องดูจากกล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพไว้

<u>การศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์ไคติเนส</u>

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสม colloidal chitin 2% (colloidal chitin agar (CCA))
2. ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm เจาะลงในอาหารที่มีเส้นใยของเชื้อราที่ต้องการตรวจสอบ
3. นำไปวางตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCA
4. บ่มที่ 27 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 3-7 วัน
5. วัดกิจกรรมเอ็นไซม์โดยเท 0.01 % Congo red บนอาหาร ทิ้งไว้ 30 นาที
6. ล้างออกด้วยน้ำประปา
7. เท 1 N NaCl ลงบนอาหาร ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเทออก
8. สังเกตแถบใสที่เกิดขึ้น

<u>จำแนกเชื้อราแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล</u>

1.ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา โดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ® ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ได้ เก็บไว้ที่ -20 ℃

2.ทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4

ทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วน ITS ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ forward primer ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') และ reverse primer ITS 4 (AGGCATCCACTTGGACGCC)

ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย โดยมีส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอต้นแบบ (100 ng/μl)	1 μl
forward primer (10 pmol/μl)	1 μl
reverse primer (10 pmol/μl)	1 μl
10 x buffer	5 μl
2.5 mM dNTPs	2 μl
Taq Polymerase	1 μl
น้ำ	39 μl
รวมปริมาตร	50 μl

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 ml หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในเครื่อง DNA thermal cycler (GeneAmp® PCR System 9700, USA). โดยมีรอบการทำ PCR และอุณหภูมิที่ใช้ดังนี้

	95°C	3 นาที	จำนวน 1 รอบ
Denaturing	94°C	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
annealing	60°C	30 วินาที	
extension	72°C	1 นาที	
	72°C	5 นาที	
	4°C	hold	

3.ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดย 1% agarose gel ใน 1x TAE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 60 นาที ย้อม gel ด้วย ethidium bromide 15 นาที และตรวจแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต

4. การหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ยีน ITS โดยทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด kit Wizard ®SV Gel and PCR clean-up System (Promega) แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับเบสที่บริษัทที่รับวิเคราะห์ลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้จากยีน ITS มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

<u>การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส</u>

โดยใช้เชื้อราตั้งต้นที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มล. และ 10^6 สปอร์/มล. ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C ที่ระยะเวลา 1- 7 วัน เก็บตัวอย่างของเอ็นไซม์ที่ผลิตได้ทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน

การผลิตเอนไซม์ไคติเนส

1. การเตรียมสปอร์เชื้อรา โดยนำตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคแมลง มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มไว้ที่ 27 °C เป็นเวลา 10 วัน เก็บสปอร์ไว้ในน้ำกลั่น นับสปอร์ด้วย heamocytometer ให้มีความเข้มข้น $1x10^7$ สปอร์/มล.
2. การเตรียมเอนไซม์ไคติเนส นำเชื้อราเขียวเลี้ยงบนอาหารเหลว PDB ที่เติม 1% chitin นำไปบ่มที่ 30 °C ที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 5 วัน เก็บตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงที่ 1000 g ที่ 4°C 10 นาที
3. น้ำใสจะถูกทำให้แห้งโดยการเอาเข้าเครื่อง freeze dye

การทดสอบ Bioassay กับหนอนผีเสื้อ

1. การเตรียมหนอนกระทู้ผัก

ได้รับความอนุเคราะห์หนอนกระทู้ผักและอาหารเทียมเลี้ยงหนอนจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การทดสอบการไม่อยากกินอาหาร (antifeedant)

ทดสอบหนอนกระทู้ผักวัยที่ 2 โดยให้อดอาหารก่อน 1 วัน แล้วให้กินอาหารเทียมขนาด 0.5x0.5x0.5 cm แล้วนำไปจุ่มในเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อต่างๆ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นวิธีควบคุม ให้หนอนกินอาหารเทียมที่มีไคติเนสจนหมด จึงเปลี่ยนอาหารเทียมใหม่ บันทึกผลการทดลองทุกวันจนกว่าหนอนจะเข้าดักแด้และเปลี่ยนเป็นผีเสื้อ

3.การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition)

โดยใช้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 ทำการหยดเอนไซม์ไคติเนส 5 ul ติดต่อกัน 3 วัน ที่ส่วนอกด้านหลัง โดยใช้น้ำกลั่นเป็นวิธีควบคุม ให้หนอนกินอาหารปกติ บันทึกระยะเวลาการเข้าดักแด้ จำนวนหนอนที่ตาย

4.วิเคราะห์ผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

เวลา : ตุลาคม 2559 -กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

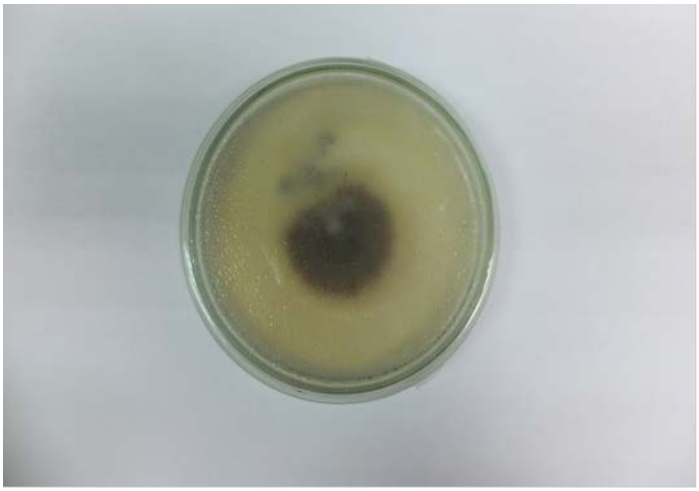
ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างเชื้อรา

ทำการรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงจากจังหวัด นครราชสีมา ปราจีนบุรี ปทุมธานี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ จันทบุรี เชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างจากแมลงที่ตายโดยมีลักษณะการตายที่น่าจะมาจากเชื้อรา ทั้งระยะตัวหนอน ตัวเต็มวัย แล้วทำการเพิ่มปริมาณของเชื้อราที่อยู่ในตัวแมลงโดยการใช้เข็มเขี่ยชิ้นส่วนแมลงที่มีเชื้อรานำมาเลี้ยงในอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน

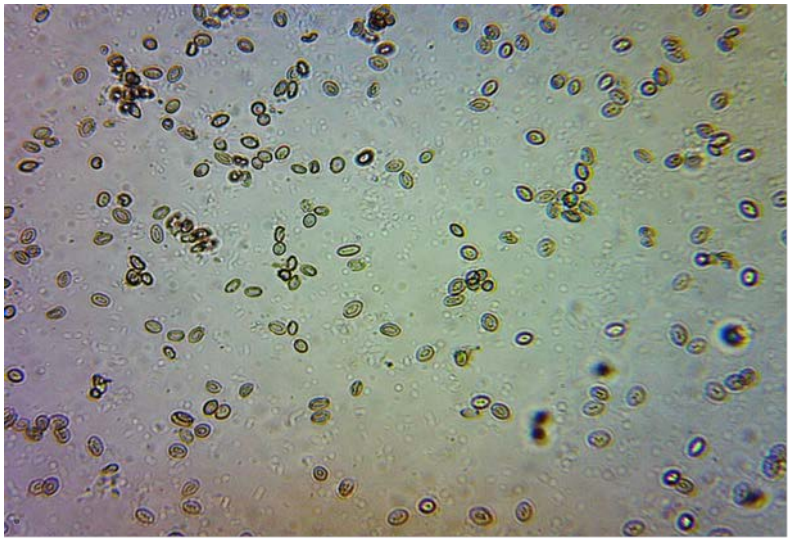
ภาพที่ 1 ตัวอย่างของแมลงที่ตายจากเชื้อรา

คัดเลือกเชื้อราที่คาดว่าจะเป็นเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง สามารถคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงที่ผลิตไดติเนสได้โดยคัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin agar ไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่าง



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง

จากการจำแนกลักษณะของเชื้อราทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าเชื้อราในบางตัวอย่าง มีลักษณะคล้ายสปอร์ของเชื้อ *Metarhizium* spp.

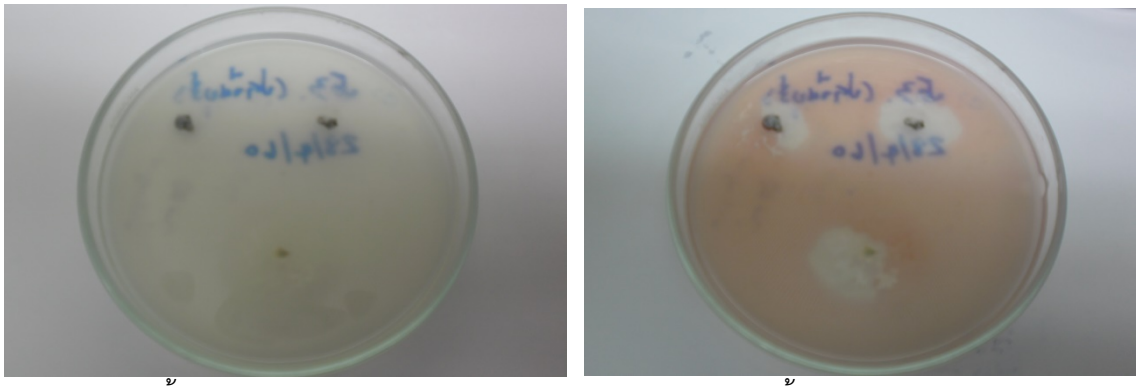


ภาพที่ 4 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราที่ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

<u>การตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนส</u>

นำเชื้อราที่ได้จากแมลง มาเลี้ยงบน Chitin selective agar ซึ่งมี colloidal chitin ผสมอยู่ เป็นเวลา 3-7 วัน สังเกตวงใสที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหาร หลังย้อมด้วย congo red

พบว่าราที่ผลิตไคติเนสได้จะให้วงใสหลังย้อมด้วย congo red



A= เชื้อราก่อนย้อมด้วย congo red B=เชื้อราหลังย้อมด้วย congo red

ภาพที่ 5 ลักษณะวงใสที่เกิดจากเอ็นไซม์ไคติเนสจะปรากฏในภาพ B

<u>จำแนกเชื้อราแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล</u>

นำเชื้อราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนราสาเหตุโรคของแมลง เช่น เชื้อราเขียว เชื้อราขาว โดยดูจากลักษณะสีเส้นใย และลักษณะของสปอร์ รวมไปถึงการย่อยไคติน ในการเกิด clear zone เมื่อนำเชื้อราจากแมลงไปสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณขนาดของชิ้นส่วน ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1 และ 4 ไปหาลำดับเบสแล้วพบว่าในส่วนที่เชื้อราสีเขียนเมื่อนำไปหาลำดับเบส มีทั้งเชื้อ ราเขียว *Metharhizium* *Aspergillus* ส่วนเชื้อราสาเหตุแมลงอื่นที่พบคือ *Isaria* ที่พบในจักจั่น

จากการจำแนกเชื้อที่ได้พบว่ามีเชื้อที่เป็นสาเหตุของแมลงที่ตาย และเชื้อราที่ไม่ใช่สาเหตุของโรคแมลง ซึ่งคาดว่าเชื้อราดังกล่าว เช่น Aspergillus น่าจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่แมลงตายแล้ว แต่ทั้งนี้เนื่องจาก เชื้อ

Aspergillus สามารถผลิตไคติเนสได้ด้วย (Krishnaveni and Ragunathan, 2014) จึงทำเกิดปฏิกริยาเมื่อทำ clear zone ด้วย

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส

ใช้ตัวอย่างเชื้อ Metarhizium มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไคติเนส เมื่อนำเชื้อราเขียวเลี้ยงบนอาหารเหลว PDB ที่เติม1% chitin นำไปบ่มที่ 30 $^{\circ}$C ที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 1-7 วัน จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อใส่เชื้อราตั้งต้น ที่ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จะให้ผลผลิตมากกว่าที่ 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ผลผลิตของ ไคติเนส จากเชื้อรา ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C จะแตกต่างกันในช่วงเวลาต่างกัน โดยจะค่อยๆเพิ่มขึ้น ในแต่ละวัน โดยจะให้ผลผลิตสูงสุด ในวันที่ 5 วัน และจะค่อยๆ ลดลง

การผลิตเอนไซม์ไคติเนส

ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส โดยใช้เชื้อราที่คัดเลือกได้ โดยมีเชื้อเมตาไรเซียม 4 ไอโซเลต และเชื้อบิวาเลีย 2 ไอโซเลต โดยแยกเป็นส่วนน้ำ และส่วนที่นำไปทำให้แห้งโดยเข้าเครื่อง freeze dye

การทดสอบ Bioassay ของเอ็นไซม์ไคติเนสกับหนอนผีเสื้อ

1. ทำการทดสอบ anti feedant การยับยั้งการกินอาหารของหนอนกระทู้ผัก โดยทำการทดสอบกับหนอนวัยที่สอง ให้หนอนอดอาหารหนึ่งวัน หลังจากนั้นจึงนำอาหารเทียม ไปจุ่มกับเอนไซม์ ซึ่งมี 2 รูปแบบ รูปแบบที่เป็นผง ละลายน้ำ 100 ul และรูปแบบที่เป็นน้ำ บันทึกการเจริญเติบโตทุกวัน

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักเมื่อได้รับไคติเนสในรูปแบบผงและรูปแบบน้ำจากการทดสอบการยับยั้งการกินอาหาร

กรรมวิธีในการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตาย		
	ไคติเนสผง	ไคติเนสน้ำ	เฉลี่ย
T1	50	40	45
T2	15	50	32.5
T3	10	55	32.5
T4	15	30	22.5
T5	35	35	35
T6	35	30	32.5
T7 control	0	0	0

T1 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 1
T2 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 2
T3 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 3
T4 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 4
T5 เชื้อราบิววาเรีย ไอโซเลตที่ 1
T6 เชื้อราบิววาเรีย ไอโซเลตที่ 2
T7 น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)

ในการทดสอบการยับยั้งอาหารจากเอ็นไซม์ไคติเนสพบว่า หนอนบางตัวไม่กินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปะปนอยู่ในอาหาร ทำให้หนอนไม่เจริญเติบโตตามปกติ ขนาดตัวจะเล็กกว่าหนอนจากกรรมวิธีควบคุม หนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะเริ่มตายหลังจากกินอาหารไป 24 ชั่วโมง แต่จะเริ่มตายมากขึ้นหลังจากกินอาหารไป 5 วัน บางตัวจะสามารถอยู่ได้ถึง 30 วัน หลังจากการทดลอง และตายไปโดยที่ไม่สามารถเข้าดักแด้ได้ ในขณะที่วิธีการควบคุมหนอนจะกินอาหารเทียมไปเรื่อยๆ และมีการเจริญเติบโตตามปกติ สามารถเข้าดักแด้และเปลี่ยนเป็นผีเสื้อได้

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าไคติเนสที่ได้จากเมตาไรเซียมไอโซเลตที่ 1 จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักได้ดีกว่าไคติเนสที่ได้จากเชื้อราอื่นๆ และในการทดลองนี้พบว่าไคติเนสที่ผลิตได้จากเชื้อเมตาไรเซียมจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้สูงกว่าไคติเนสที่ได้จากบิววาเลีย

2. ทำการทดสอบ การยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก โดยทำการทดสอบกับหนอนวัยที่ 4 ให้หนอนอดอาหารหนึ่งวัน หลังจากนั้นจึงนำเอ็นไซม์หยดตรงด้านหลังอก 5 ul ซึ่งมี 2 รูปแบบ รูปแบบที่เป็นผงละลายน้ำ 100 ul และรูปแบบที่เป็นน้ำ หยดติดต่อกัน 3 วัน บันทึกการเจริญเติบโตทุกวัน

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักเมื่อได้รับไคติเนสในรูปแบบผงและรูปแบบน้ำจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต

กรรมวิธีในการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตาย		
	ไคติเนสผง	ไคติเนสน้ำ	เฉลี่ย
T1	10	0	5
T2	5	10	7.5
T3	0	5	2.5
T4	10	15	12.5
T5	15	10	12.5
T6	0	10	5
T7 control	0	0	0

T1 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 1
T2 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 2
T3 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 3
T4 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 4
T5 เชื้อราบิววาเรีย ไอโซเลตที่ 1
T6 เชื้อราบิววาเรีย ไอโซเลตที่ 2
T7 น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)

การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง โดยทำการหยดเอนไซม์ไคติเนสที่ที่ส่วนอกด้านหลังหนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 พบว่าหนอนบางตัวที่ได้รับเอ็นไซม์จะตายช่วงที่เข้าดักแด้ โดยหนอนจะเข้าดักแด้ไม่ได้หรือตายในช่วงเข้าดักแด้ไม่สามารถเจริญเป็นผีเสื้อได้

ในการทดสอบครั้งนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อที่จะทดสอบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงหรือไม่ ซึ่งจากผลการทดสอบจะพบว่าประสิทธิภาพในการทำให้หนอนตายยังไม่ดีนัก จำนวนหนอนที่ตายไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่จะเห็นได้ว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการกินอาหาร เพราะในหนอนบางตัวจะไม่กินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปนอยู่เลย ในขณะที่บางตัวยังสามารถกินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปนอยู่ ซึ่งอาจจะมาจากความแข็งแรงของหนอนแต่ละตัวที่ต่างกันออกไป และในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตจะพบว่าหนอนจะตายในช่วงดักแด้ ก่อนที่จะเจริญเติบโตเป็นผีเสื้อ หากนำเอ็นไซม์ไคติเนสไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืช อาจต้องนำไปผสมกับสารกำจัดแมลงตัวอื่น เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ให้เพิ่มประสิทธิภาพ และควรมีการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ไคติเนสที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการเก็บรวบรวมเชื้อราตามแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และ จากตัวอย่างเชื้อราจากศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ ได้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ ซึ่งมีทั้งเชื้อเมตาไรเซียม บิววา

เลีย เมื่อทำการผลิตไคติเนสแล้วนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสสามารถทำให้แมลงตายได้ทั้งในช่วงที่เป็นหนอน ดักแด้และผีเสื้อ มีผลในการยับยั้งการกินอาหารโดยหนอนกระทู้ผักจะไม่กินอาหารที่มีไคติเนสปะปน นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตจะทำให้หนอนยืดอายุในการลอกคราบทำให้มีอายุนานกว่าหนอนปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ เปอร์เซ็นต์การตายในช่วงดักแด้และผีเสื้อจะสูงกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงรูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ในการนำไปใช้ในการกำจัดแมลง ตลอดจนอายุการเก็บรักษาที่จะรักษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง นอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาการนำไคติเนสไปผสมกับสารกำจัดแมมลงชนิดอื่นเพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ดียิ่งขึ้น

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เอ็นไซม์ไคติเนสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืช อาจต้องนำไปผสมกับสารกำจัดแมลงตัวอื่น เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ให้เพิ่มประสิทธิภาพ และควรมีการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ไคติเนสที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณ อิศเรส เทียนทัด นักกีฏวิทยาชำนาญการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์หนอนกระทู้ผักและอาหารเทียม คุณชนินทร์ นาคขำ คุณศรีจิตรา กลันทกานนท์ ที่ช่วยดำเนินการทดลอง คุณชมัยภร-คุณดลสิทธิ์ บางคมบาง คุณลาภิสรา วงศ์แก้ว ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างแมลง

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง: นิวคลีโอโดลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Binod, P., R.K. Sukamaran, S.V. Shirke, J.C. Rajput and A. Pandey. 2007. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against Helicoverpa armigera. J. of Applied Micrology. 103:1845-1852

Carr, J. P. and D. P. Klessig. 1989. Genetic Engineering-Principles and Methods, Vol 11 ed. J.K. Sellow, p 65 Plenum Press, New York.

Kramer, K. L. and S. Muthikrishnan, 1997. Insect Chitinases: Molecular biology and potential use as pesticides. Insect Biochem. Molec. 27: 887-900.

Linthorst H. J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 123-150.

Sahai A. S. and M. S. Manocha. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite intereaction: FEMS Microbial. Rev. 11: 317-338.

Wu J.H., S. Ali and S. X. Ren. 2010. Evaluation of Chitinase from Metarhizium anisopliae as Biopesticide Against Plutella xylostella. Pakistan. J. Zool. 42: 521-528.

การทดลองที่ 3
การโคลนยีน 5-aminolevulinate synthase (ALAS) จากจุลินทรีย์
Cloning of 5-aminolevulinate synthase (ALAS) gene from microorganisms.

ภรณี สว่างศรี
รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สุภาวดี ง้อเหรียญ ศุภลักษ์ สัตยสมิท

คำสำคัญ

เอนไซม์ 5-Aminolevulinate synthase, กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค, แบคทีเรียสังเคราะห์แสง,
5-Aminolevulinate synthase (ALAS), 5-Aminolevulinic acid (ALA), photosynthetic bacteria

บทคัดย่อ

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA) เป็นสารชีวภาพสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรเพื่อเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิต ALA ได้ในปริมาณที่สูงกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ งานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA พบว่า เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA ได้ดี จึงนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) ตรวจพบชิ้นยีนที่ได้ มีขนาดประมาณ 1,224 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hem* A ของเชื้อ *R. sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของเปปไทด์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน *hem*A (synthase) ของ *R. sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem* A เข้ากับ protein expression vector (pLATE52) แล้วถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และทำการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ ALAS พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase มีผลทำให้ recombinant *E. coli* สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค ได้ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสาร ALA เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป

Abstract

5-Aminolevulinic acid (ALA) is a biological substance that can be used for agricultural purposes as a plant growth promoter. Photosynthetic bacteria can produce high amounts of ALA. The photosynthetic bacteria, such as *Rhodobacter sphaeroides* have the ability to produce 5-aminolevulinic acid (ALA). The *hem*A gene encoding 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) was cloned from *R. sphaeroides* D34. In this study, *hem*A gene of *R. sphaeroides* D34 isolate was obtained by PCR gene cloning technique and the full length nucleotide approximately 1,224 bp. The sequenced result was exhibited as *R. sphaeroides* with 100% similarity when compared to

*hem*A gene (accession no. CP015210.1) and 99% similarity peptide sequences (accession no. ACM01167.1) in the GenBank database. *Hem* A gene could be overexpression within the protein expression vector pLATE52 and the recombinant was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The production of recombinant protein can be induced by 3 mM IPTG. The recombinant ALAS was analyzed by SDS-PAGE. The size of recombinant ALAS was molecular weight approximately 40 kDa and recombinant enzyme efficient activity could produce ALA in 12 hours.

คำนำ

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA) เป็นสารชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยในหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่มี 5 คาร์บอน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เตตราไพโรล เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิริน ฮีม และวิตามินบี 12 ในสิ่งมีชีวิต และมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช สัตว์ สาหร่าย และแบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถสร้าง ALA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์พอร์ไฟริน เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิลลิน ฮีม และวิตามินบี12 (Sasikala *et al.,* 1994) แบคทีเรียที่สังเคราะห์ ALA ได้มีหลายชนิด เช่น สาหร่าย *Chlorella regularis, C. vugaris* เชื้อแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides, Rhodopseudomonas* sp., *Clostridium thermoaceticum, Escherichia coli, Pseudomonas riboflavin* เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิต ALA ได้ในปริมาณที่สูงกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ แต่มีข้อจำกัดในด้านการเพาะเลี้ยงที่ยุ่งยากซับซ้อน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตช้า อาศัยแสงในการเจริญเติบโต แต่ไม่อาศัยออกซิเจน

สาร ALA สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรได้หลากหลาย เช่น เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth stimulator) เพื่อทดแทนการใช้สารกลุ่มฮอร์โมนพืช โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและการสร้างรงควัตถุ นอกจากนี้หากใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูงยังสามารถใช้ทดแทนสารกำจัดวัชพืช (Photodynamic herbicides) และสารกำจัดแมลง (Porphyric insecticides) ได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สาร ALA จึงเป็นสารชีวภาพทางเลือกเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรของเกษตรกรในระบบการผลิตเกษตรอินทรีย์ (Organic Agriculture) หรือเกษตรปลอดสารพิษ เป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนากระบวนการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแบบยั่งยืน เพื่อลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกร ลดปัญหาการใช้สารเคมีเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อการผลิตอาหารที่ปลอดภัยให้สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคและช่วยฟื้นฟู บำรุง รักษาสิ่งแวดล้อมให้คงอยู่ในสภาพที่สมดุลตลอดไป

เอนไซม์ 5-Aminolevulinate synthase (ALAS) มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรวมของไกลซีนและซัคซินิลโคเอ ได้เป็น CoA, คาร์บอนไดออกไซด์ และ ALA (Jordan, 1991) โดย ALA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เตตราไพโรลในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เอนไซม์ ALAS ที่ได้มาจาก *Rhodobacter sphaeroides* ซึ่งมีคาเท่ากับ 57,000 ดาลตัน (Warnick and Burnham, 1971) ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ALAS ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* มี 2 ยีน คือ *hemA* และ *hemT* โดยมีรายงานการศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีน *hemA* และ *hemT* เพื่อการผลิต ALA (Neidle and Kaplan, 1993) เทคโนโลยีชีวภาพสามารถเข้ามาช่วยในการพัฒนาวิธีการผลิตสาร ALA ให้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยวิธีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อแบคทีเรีย และให้มีการ over expression แล้วนำไปผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ซึ่งจะช่วยร่นระยะเวลาให้กระบวนการสังเคราะห์ ALA จาก succinyl CoA และ glycine ใน Shemin pathway (C_4 pathway) เกิดได้เร็วยิ่งขึ้น ซึ่งผลผลิตที่ได้ คือ ALA

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ aminolevulinic acid (ALA) synthase จากเชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์แสง และศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ ALA synthase และรีคอมบิแนนท์โปรตีน เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาร ALA ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
2. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
7. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation
8. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
10. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
12. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน T&A Cloninng Kit ® (RBC Bioscience)
13. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
16. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α, BL21(DE3)
17. Expression Vector : aLICator LIC Cloning and Expression system (Thermo Scientific)
18. HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific)
19. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
20. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่
    - ไพรเมอร์ 16S rDNA : 27F (forward), 1492R (reverse)
    - ไพรเมอร์ยีน *hem* A (synthase) : HemA-F, HemA-R
    - ไพรเมอร์ T&A Cloninng vector : M13-F (forward), M13-R (reverse)
    - ไพรเมอร์ aLICator LIC Cloning and Expression system : LIC Forward, LIC Reverse
21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
    - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จาก http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
    - โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
    - โปรแกรม CromasPro version 1.33 จาก http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html

- โปรแกรม NEBcutter2 จาก http://tools.neb.com/NEBcutter2/

22. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ได้แก่ YA medium, Nutrient agar (NA), Luria-Bertani (LB), LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal

วิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสาร 5-Aminolevulinic acid (ALA)

เก็บตัวอย่างและรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำในนาข้าว และแหล่งน้ำตามธรรมชาติต่างๆ ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร NA แล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร YA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่มีแสงสว่าง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Sodium acetate buffer (ประกอบด้วย Sodium acetate trihydrate 27.2 กรัม ละลายใน Glacial acetic acid และปรับปริมาตรด้วย Glacial acetic acid ให้ได้ 200 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ Acetone 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที วางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมสารละลาย Modified Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลาย ALA มาตรฐาน บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

2. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

2.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในข้อ 1 โดยการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) (เตรียม 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วย ddH_2O) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว160 รอบ/นาที นาน 16 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE Buffer 2 ครั้ง เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันทุก 15 นาที เติม 2 เท่า CTAB (บ่ม 65 องศาเซลเซียสก่อนใช้) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่ม 65 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ผสมทุก 5 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ปั่นหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ 0 องศาเซลเซียส ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 700 ไมโครลิตร) เติม 0.6 เท่า ของ isoproponol และ 0.1 volume ของ 3 M NaOAC ผสมเบาๆ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ล้างตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ระเหยแอลกอฮอล์ที่ตกค้างในหลอดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เติม TE + RNase 15 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ $OD_{260/280}$ และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกบน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ใน 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แช่แผ่นเจลในเอธิเดียมโบร

ไมด์ (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร) นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (BIORAD) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนบริเวณ 16s rDNA โดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

โดยใช้ universal primer (Lane, 1991; Alm *et al*., 1996)

Forward 27F 5’ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3’

Reverse 1492R 5’ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด PCR ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ 27F (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ 1492R (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร,Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกริยา PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	**จำนวน 30 รอบ**
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยวิธี Electrophoresis โดยผสมผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร แยกผลผลิต PCR ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

2.3 การเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ผล

เตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดย นำผลผลิต PCR ที่เหลือจากจากข้อ 2.2 ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยพลิกกลับหลอดไปมาทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน PCR ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH_2O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel (ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร)

2.4 การหาลำดับเบสในส่วนของบริเวณ 16s rDNA

2.4.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer 27F (5 ไมโครโมลาร์)	1.6	ไมโครลิตร
dH_2O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) อุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (α)	

2.4.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 2.4.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

2.4.3 การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที

2.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI ต่อไป

3. การโคลนยีน *hem* A ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อ *Rhodobacter* sp.

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1

3.2 การสังเคราะห์ยีน *hem* A โดยวิธี PCR Amplification และการตรวจวิเคราะห์ผล

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *hem* A ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ HemA-F, HemA-R

HemA-F 5'-ATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTG-3'

HemA-R 5'-TCAGGCAACGACCTCGGCGCGATTCAGCGCACAGTG-3'

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ HemA-F (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ HemA-R Bamy401R (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบ ของการทำ PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	**จำนวน 40 รอบ**
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร โดยการแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis

3.3 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลนยีน

ทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยนำผลผลิต PCR ที่เหลือจาก 3.2 มาแยกใน 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting gel ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex) หลังจากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการประมาณ 2 กิโลเบส บนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมสารละลาย QG Buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 15 นาที จนเจลละลายหมด (สีของสารละลายควรมีสีเหลือง ถ้ามีสีม่วงให้เติม 3M NaOAC 10 ไมโครลิตร) เติม Isopropanol (แช่เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (บ่มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส) 15 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15–30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel

electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem* A เข้ากับ Cloning vector

นำชิ้นยีน *hem* A ซึ่งผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์จากข้อ 3.3 มาทำการเชื่อมต่อเข้ากับ T&A Cloning vector โดยใช้ชุด T&A Cloning Kit (RBC Bioscience)

Ligation Buffer A	1	ไมโครลิตร
Ligation Buffer B	1	ไมโครลิตร
T&A Cloning vector	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร
PCR product	2	ไมโครลิตร
ddH_2O	3	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้ทันที นำ ligation ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

เตรียมอาหารแข็ง LB - Ampicillin/IPTG/X-Gal โดยเตรียมอาหาร LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) ที่มีสารปฏิชีวนะ amplicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 - 15 มิลลิลิตร หลังจากอาหารแข็งแล้วเติม 100 mM IPTG 100 ไมโครลิตร และ X-Gal (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร แล้วเกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat - shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB - Amplicilin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีชิ้น insert ของยีน *hem* A ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม amplicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 14 - 16 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

3.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เก็บตะกอนเซลล์ที่เลี้ยงไว้ จากข้อ 2.5 โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 25 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดี

เอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.7 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem* A ใน Cloning vector โดยเทคนิค PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6 ไปตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์

M13-F 5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'

M13-R 5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3'

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ M13-R (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยรอบของการทำ PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	**จำนวน 25 รอบ**
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (**α**)		

ตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ดำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

3.8 การตรวจสอบความถูกต้องของยีน *hem* A โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์

จากการตรวจพบการปรากฏของชิ้นยีน *hem* A (ขนาด~ 1,224 bp) ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม แล้วจึงนำมาตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer ไพร์เมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1.6	ไมโครลิตร
dH_2O	4.4	ไมโครลิตร

รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (α)	

- การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้างต้นมาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (dH_2O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้งปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

- การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วย้ายลงน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้ก็พร้อมที่จะเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3.9 การเชื่อมต่อชิ้นยีนที่ได้เข้าสู่ protein expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

นำผลผลิต PCR ของยีน *hem* A และเวคเตอร์ (aLICator LIC Cloning and Expression system) (Thermo Scientific) (ขนาดประมาณ 4,500 คู่เบส) ซึ่งมีตำแหน่งของ T7 promoter ทำหน้าที่ถอดรหัสและแปลรหัสของยีนให้เป็นโปรตีน ทำการสร้าง recombinant protein โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Expression vector เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *hem* A (100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
5X LIC Buffer	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Polymerase, 1U/ul	1	ไมโครลิตร
ddH_2O	6	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม LIC Vector (60 นาโนกรัม, 0.02 pmol DNA) ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เตรียมถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* ทันที

การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (Ligation) ที่ได้สู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณใน competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงในอาหารแข็ง LB-ampicillin (ความเข้มข้น

50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมต่อไป

3.10 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem* A ใน aLICator LIC Cloning and Expression system

ตรวจสอบการปรากฏของยีนในพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์

LIC Forward 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

LIC Reverse 5' GAGCGGATAACAATTTCACACAGG 3'

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Forward (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	**จำนวน 25 รอบ**
58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *hem* A

การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน (fusion protein) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยเตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3

มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.5 จากนั้นเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาละลายด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที วิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ SDS–PAGE ใน Tris-glycine buffer (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนมองเห็นแถบโปรตีนชัดเจน บันทึกผลการการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง

5. การทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase โดยการผลิต 5-Aminolevulinic acid (ALA)

นำสารละลายจากข้อ 4 ที่เลี้ยงต่อจนครบเวลา 12 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อทำการแยกตะกอนเซลล์ออก ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย Sodium acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (pH 4.6) และสารละลาย Acetone ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM

เวลาและสถานที่

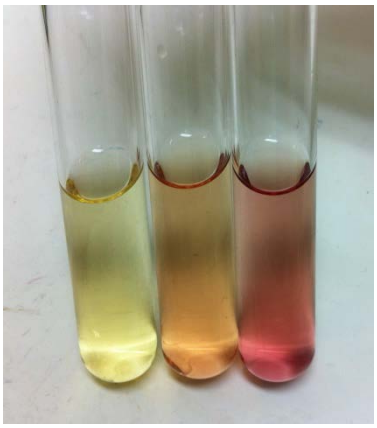
ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 **สิ้นสุด** กันยายน 2561 **รวม 3 ปี**

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสาร 5-Aminolevulinic acid (ALA)

จากการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่างๆ โดยคัดแยกและเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงให้บริสุทธิ์ในอาหารสูตร NA พบว่า ได้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง จำนวน 36 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่รวบรวมได้ ไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร YA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่มีแสง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใส มาทดสอบศักยภาพในการผลิตสาร 5-Aminolevulinic acid (ALA) โดยการเติมสารละลาย Modified Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู พบว่า ไอโซเลท D34 มีการผลิตสาร ALA สูงที่สุด 64.10 uM ดังภาพที่ 1 ตารางที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการทดสอบการสร้างสาร ALA โดยเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง สังเกตปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีชมพู

2. จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

จากการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณ 16S ribosomal RNA gene ด้วยวิธีการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพเมอร์ 27F และ 1,492R ได้ผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (ดังภาพที่ 2) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม GenBank พบว่าสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* และ *Rhodopseudomonas palustris* ดังตารางที่ 1

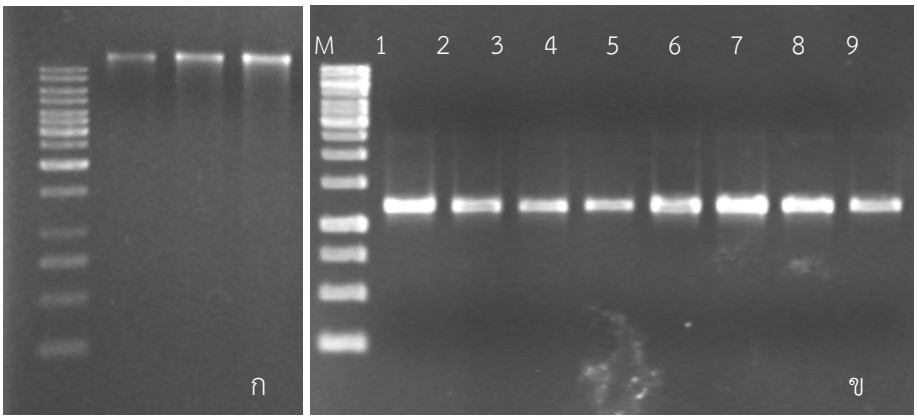
ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบการสร้างสาร ALA และผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

ไอโซเลท	ชนิด	ปริมาณ ALA (uM)	% identity	Accession no.
D1	*Rhodobacter sphaeroides*	30.73	99	KJ955374.1
D2	*Rhodobacter sphaeroides*	29.25	100	KJ955374.1
D3	*Rhodobacter sphaeroides*	6.78	100	KJ955374.1
D4	*Rhodobacter sphaeroides*	2.96	99	KJ955374.1
D5	*Rhodobacter sphaeroides*	6.14	99	KJ955374.1
D6	*Rhodobacter sphaeroides*	3.17	100	KP979543.1
D7	*Rhodobacter sphaeroides*	5.29	100	KJ955374.1
D8	*Rhodobacter sphaeroides*	4.87	100	KJ955374.1
D9	*Rhodobacter sphaeroides*	25.5	99	KJ955374.1
D10	*Rhodobacter sphaeroides*	21.5	99	KJ955374.1
D11	*Rhodobacter sphaeroides*	5.27	100	KJ955374.1
D12	*Rhodobacter sphaeroides*	3.16	100	KJ955374.1
D13	*Rhodobacter sphaeroides*	5.89	100	KJ955374.1
D14	*Rhodobacter sphaeroides*	4.83	99	KJ955374.1
D15	*Rhodobacter sphaeroides*	3.80	100	KJ955374.1

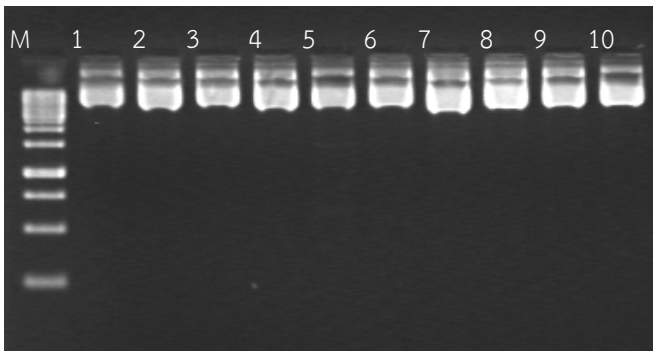
D16	*Rhodobacter sphaeroides*	4.43	100	KJ955374.1
D17	*Rhodobacter sphaeroides*	3.81	100	KJ955374.1
D18	*Rhodobacter sphaeroides*	11.22	100	KJ955374.1
D19	*Rhodobacter sphaeroides*	8.89	100	KJ955374.1
D20	*Rhodobacter sphaeroides*	2.95	100	KJ955374.1
D21	*Rhodopseudomonas palustris*	21.10	99	FN543496.1
D22	*Rhodobacter sphaeroides*	11.86	100	KJ955374.1
D23	*Rhodobacter sphaeroides*	14.60	100	KJ955374.1
D24	*Rhodobacter sphaeroides*	46.42	100	KJ955374.1
D25	*Rhodobacter sphaeroides*	8.69	100	KJ955374.1
D26	*Rhodobacter sphaeroides*	11.02	100	KJ955374.1
D27	*Rhodobacter sphaeroides*	13.14	99	KJ955374.1
D28	*Rhodobacter sphaeroides*	11.45	100	KJ955374.1
D29	*Rhodobacter sphaeroides*	31.58	100	KJ955374.1
D30	*Rhodobacter sphaeroides*	47.69	100	KJ955374.1
D31	*Rhodobacter sphaeroides*	20.90	100	KJ955374.1
D32	*Rhodobacter sphaeroides*	34.55	100	KJ955374.1
D33	*Rhodobacter sphaeroides*	23.8	99	KJ955374.1
D34	*Rhodobacter sphaeroides*	64.1	99	KJ955374.1
D35	*Rhodobacter sphaeroides*	25.7	100	KP979543.1
D36	*Rhodobacter sphaeroides*	30.6	100	KJ955374.1

3. การโคลนยีน *hem* A ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อ *Rhodobacter* sp.

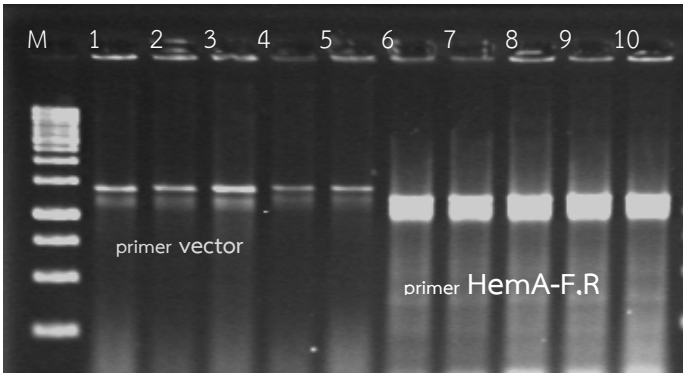
การสังเคราะห์ยีน *hem* A ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase จาก genomic DNA ด้วยวิธี PCR Amplification โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน *hem* A มาทดสอบกับกรดนิวคลีอิกของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR ได้ชิ้นส่วนของยีน ALA synthase ที่มีขนาดประมาณ 1,224 bp ดังภาพที่ 2 จากนั้นทำการโคลนชิ้นยีน *hem* A เข้าสู่เวคเตอร์พาหะ (T&A cloning vector)) และถ่ายชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* (DH5α) คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นยีน และเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin 50 ug/ml เพื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 3 ตรวจสอบการปรากฏของชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) สามารถตรวจพบชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 1,224 bp ดังภาพที่ 4 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *hem* A ที่โคลนได้ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hem* A (synthase) ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 5 และเมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน *hem*A (synthase) ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 2 แสดง genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Rhodobacter* sp. (ก) และ ผลผลิต PCR ของยีน *hem* A ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,224 bp (ข)



ภาพที่ 3 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ cloning vector (T&A Cloning vector) และยีน *hem* A ซึ่งถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α



ภาพที่ 4 แสดงการตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem* A ในพลาสมิดลูกผสมของ T&A Cloning vector โดยใช้เทคนิค PCR Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-5; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (M13-F, M13-R) Lane 6-10; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีน *hem* A (HemA-F, HemA-R)

```
Rhodobacter sphaeroides strain MBTLJ-13 chromosome 1, complete sequence
Sequence ID: CP015210.1Length: 3188543Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 1674685 to 1675908GenBankGraphics Next Match Previous Match First Match
                Alignment statistics for match #1
     Score      Expect    Identities      Gaps      Strand   Frame
2261 bits(1224) 0.0()  1224/1224(100%) 0/1224(0%) Plus/Minus
Features:
Query  1        ATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTGAACCGGCTCCATACCGAGGGCCGGTAC  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675908  ATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTGAACCGGCTCCATACCGAGGGCCGGTAC  1675849

Query  61       CGGACCTTCATCGACATCGAGCGGCGCAAGGGTGCCTTCCCGAAAGCCATGTGGCGCAAG  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675848  CGGACCTTCATCGACATCGAGCGGCGCAAGGGTGCCTTCCCGAAAGCCATGTGGCGCAAG  1675789

Query  121      CCCGACGGGAGCGAGAAGGAAATCACCGTCTGGTGCGGCAACGACTATCTCGGCATGGGC  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675788  CCCGACGGGAGCGAGAAGGAAATCACCGTCTGGTGCGGCAACGACTATCTCGGCATGGGC  1675729

Query  181      CAGCATCCGGTGGTGCTGGGGGCCATGCACGAGGCGCTGGATTCGACCGGCGCCGGGTCG  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675728  CAGCATCCGGTGGTGCTGGGGGCCATGCACGAGGCGCTGGATTCGACCGGCGCCGGGTCG  1675669

Query  241      GGCGGCACGCGCAACATCTCGGGCACCACGCTCTATCACAAGCGCCTCGAGGCCGAGCTC  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675668  GGCGGCACGCGCAACATCTCGGGCACCACGCTCTATCACAAGCGCCTCGAGGCCGAGCTC  1675609

Query  301      GCCGACCTGCACGGCAAGGAAGCGGCGCTGGTCTTCTCGTCGGCCTATATCGCCAACGAC  360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675608  GCCGACCTGCACGGCAAGGAAGCGGCGCTGGTCTTCTCGTCGGCCTATATCGCCAACGAC  1675549

Query  361      GCGACCCTCTCGACGCTGCCGCAGCTGATCCCGGGCCTCGTCATCGTCTCGGACAAGTTG  420
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675548  GCGACCCTCTCGACGCTGCCGCAGCTGATCCCGGGCCTCGTCATCGTCTCGGACAAGTTG  1675489

Query  421      AACCACGCTTCGATGATCGAGGGCATCCGCCGCTCGGGCACCGAGAAGCACATCTTCAAG  480
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675488  AACCACGCTTCGATGATCGAGGGCATCCGCCGCTCGGGCACCGAGAAGCACATCTTCAAG  1675429

Query  481      CACAATGACCTCGACGACCTGCGCCGGATCCTGACCTCGATCGGCAAGGACCGTCCGATC  540
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675428  CACAATGACCTCGACGACCTGCGCCGGATCCTGACCTCGATCGGCAAGGACCGTCCGATC  1675369

Query  541      CTCGTGGCCTTCGAATCCGTCTATTCGATGGATGGCGACTTCGGCCGCATCGAGGAGATC  600
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675368  CTCGTGGCCTTCGAATCCGTCTATTCGATGGATGGCGACTTCGGCCGCATCGAGGAGATC  1675309

Query  601      TGCGACATCGCCGACGAGTTCGGCGCGCTGAAATACATCGACGAGGTCCATGCCGTCGGC  660
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675308  TGCGACATCGCCGACGAGTTCGGCGCGCTGAAATACATCGACGAGGTCCATGCCGTCGGC  1675249

Query  661      ATGTACGGCCCCCGCGGCGGCGGCGTGGCCGAGCGGGACGGGCTGATGGACCGGATCGAC  720
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675248  ATGTACGGCCCCCGCGGCGGCGGCGTGGCCGAGCGGGACGGGCTGATGGACCGGATCGAC  1675189

Query  721      ATCATCAACGGGACGCTGGGCAAGGCCTATGGCGTGTTCGGCGGCTATATCGCGGCCTCG  780
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675188  ATCATCAACGGGACGCTGGGCAAGGCCTATGGCGTGTTCGGCGGCTATATCGCGGCCTCG  1675129

Query  781      TCAAAGATGTGCGACGCGGTGCGCTCCTACGCGCCGGGCTTCATCTTCTCGACCTCGCTG  840
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675128  TCAAAGATGTGCGACGCGGTGCGCTCCTACGCGCCGGGCTTCATCTTCTCGACCTCGCTG  1675069
```

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน *hem* A (synthase) ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

```
Query  841      CCGCCCGTCGTGGCGGCCGGTGCGGCGGCCTCGGTGCGCCACCTCAAGGGCGATGTGGAG  900
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675068  CCGCCCGTCGTGGCGGCCGGTGCGGCGGCCTCGGTGCGCCACCTCAAGGGCGATGTGGAG  1675009

Query  901      CTGCGCGAGAAGCACCAGACCCAGGCCCGCATCCTGAAGATGCGCCTCAAGGGGCTCGGC  960
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1675008  CTGCGCGAGAAGCACCAGACCCAGGCCCGCATCCTGAAGATGCGCCTCAAGGGGCTCGGC  1674949

Query  961      CTGCCGATCATCGACCACGGCTCGCACATCGTGCCGGTCCATGTGGGCGACCCCGTGCAC  1020
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1674948  CTGCCGATCATCGACCACGGCTCGCACATCGTGCCGGTCCATGTGGGCGACCCCGTGCAC  1674889

Query  1021     TGCAAGATGATCTCGGACATGCTGCTCGAGCATTTCGGCATCTATGTCCAGCCGATCAAC  1080
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1674888  TGCAAGATGATCTCGGACATGCTGCTCGAGCATTTCGGCATCTATGTCCAGCCGATCAAC  1674829

Query  1081     TTCCCGACCGTGCCGCGCGGGACCGAGCGGCTGCGCTTCACCCCGTCGCCCGTGCATGAT  1140
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1674828  TTCCCGACCGTGCCGCGCGGGACCGAGCGGCTGCGCTTCACCCCGTCGCCCGTGCATGAT  1674769

Query  1141     TCCGGCATGATCGATCACCTCGTGAAGGCCATGGACGTGCTCTGGCAGCACTGTGCGCTG  1200
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1674768  TCCGGCATGATCGATCACCTCGTGAAGGCCATGGACGTGCTCTGGCAGCACTGTGCGCTG  1674709

Query  1201     AATCGCGCCGAGGTCGTTGCCTGA  1224
                ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1674708  AATCGCGCCGAGGTCGTTGCCTGA  1674685
```

ภาพที่ 5 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน *hem* A (synthase) ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

5-aminolevulinate synthase 1 [Rhodobacter sphaeroides KD131]
Sequence ID: ACM01167.1Length: 435Number of Matches: 2
Related Information
Range 1: 29 to 394GenPeptGraphics Next Match Previous Match First Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
724 bits(1868)	0.0()	Compositional matrix adjust.	363/366(99%)	364/366(99%)	0/366(0%)	+3

Features:

```
Query  42    MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG  221
            MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG
Sbjct  29    MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG  88

Query  222   QHPAVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND  401
            QHPAVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND
Sbjct  89    QHPAVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND  148

Query  402   ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI  581
            ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI
Sbjct  149   ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI  208

Query  582   LVAFESVYSMDGDFGRIKEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID  761
            LVAFESVYSMDGDFGRIKEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID
Sbjct  209   LVAFESVYSMDGDFGRIKEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID  268

Query  762   IIDGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPvvaagaaasvRHLKGDVE  941
            II+GTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPVVAAGAAASVRHLKGDVE
Sbjct  269   IINGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPVVAAGAAASVRHLKGDVE  328

Query  942   LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPVRCKMISDMLLEHFGIYVQPIN  1121
            LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPV CKMISDMLLEHFGIYVQPIN
Sbjct  329   LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPVHCKMISDMLLEHFGIYVQPIN  388

Query  1122  FPTVAR  1139
            FPTV R
Sbjct  389   FPTVPR  394
```

ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับของอะมิโนแอซิดของยีน *hem*A (synthase) ที่ได้จากการโคลนเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีนไซลาเนส ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์

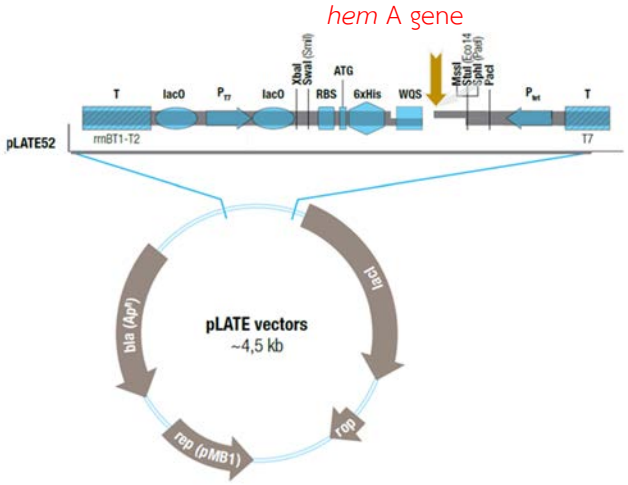
การเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem* A เข้าสู่ protein expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem* A เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ซึ่งมีแผนที่แสดงตำแหน่งของยีน *hem* A ดังภาพที่ 7 โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งของปลาย 5’ ที่สามารถเชื่อมต่อกับส่วนของเวคเตอร์ ดังนี้

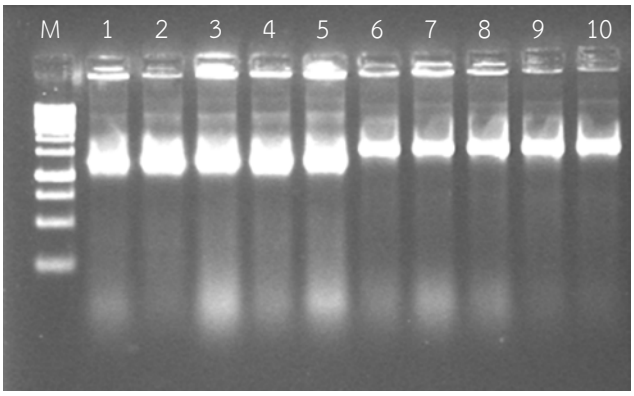
Ex_HemA-Fatg 5’GGT TGG GAA TTG CAA GAC TAC AAT CTG GCA CTC GAT ACC 3’

Ex_HemA-Rtaa 5’ GGA GAT GGG AAG TCA TTA GGC AAC GAC CTC GGC GCG ATT C 3’

แล้วจึงถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.7 กิโลเบส และสามารถตรวจพบการปรากฏของยีน *hem* A ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค PCR ดังภาพที่ 8



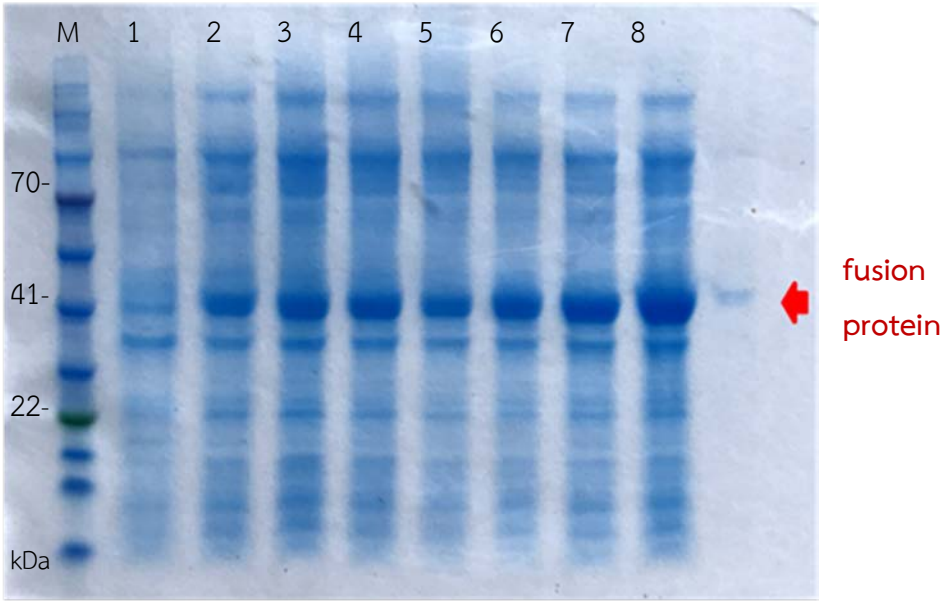
ภาพที่ 7 แผนที่ตำแหน่งของยีน *hem* A ที่สอดแทรกอยู่ภายใน Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system)



ภาพที่ 8 การตรวจสอบการเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem* A ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้เทคนิค PCR Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-5; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีน *hem* A (Ex_HemA-Fatg, Ex_HemA-Rtaa), Lane 6-10; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (LIC Forward, LIC Reverse)

4. การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *hem* A

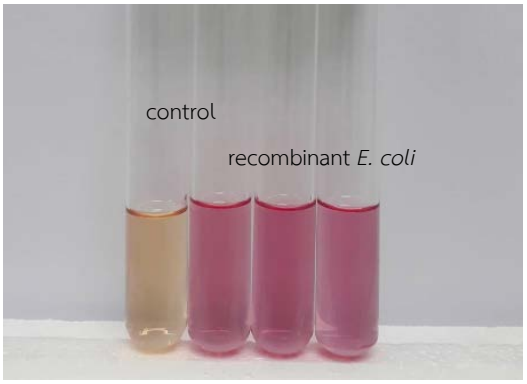
การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 3 mM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การแสดงออกของโปรตีน fusion protein (ลูกศรชี้) ที่ได้รับการชักนำการแสดงออกของยีน *hem* A โดย 3mM IPTG Lane M; protein marker Lane 1; *E. coli* BL21 (DE3) Lane 2-8; *E. coli* BL21 (DE3) ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A ที่ได้รับการกระตุ้นนาน 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ

5. การทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase โดยการผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA)

จากการชักนำการทำงานของยีน *hem* A ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthase ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ เมื่อเวลาผ่านไปนาน 6 ชั่วโมง โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย Ehrlich's reagent ดังภาพที่ 10 เมื่อนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM พบว่ามีสามารถผลิตสาร ALA ได้เท่ากับ 56.011 uM



ภาพที่ 10 การผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) จาก recombinant *E. coli* ที่ได้รับการชักนำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthase นาน 12 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำแหล่งต่างๆ สามารถคัดเลือกได้เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 ที่มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA ได้ดี เมื่อนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *hem*A (synthase) ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 พบว่าชิ้นยีน *hem*A (synthase) ที่ได้ มีขนาด~ 1,224 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hem* A ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของเปปไทด์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน *hem*A (synthase) ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์

การโคลนยีนจากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem* A เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) สามารถถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ ALA synthase พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase มีผลทำให้ recombinant *E. coli* สามารถผลิตสาร aminolevulinic acid

(ALA) ได้ จึงเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสาร ALA เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 สามารถนำไปเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต ALA ได้ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อจุลินทรีย์

2. ได้รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ผลิตเอนไซม์ ALA synthase ได้ดี สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาร ALA ให้มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น ซึ่งสามารถใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มผลผลิต เป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้สารเคมี ฮอร์โมน และสารเสริมที่สังเคราะห์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

เอกสารอ้างอิง

Jordan, P.M. 1991. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid andits transformation into uroporphyrinogen Ill in animals and bacteria. In *Biosynthesis of Tetrapyrroles* (Jordan, P.M., Ed.), pp. 1-66. Elsevier, Amsterdam.

Neidle, E. L., and S. Kaplan. 1993. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. J. Bacteriol. 175:2292–2303.

Sasikala, Ch., Ramana, Ch.V. and Rao, P.R. 1994. 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganisms. Biotechnol. Prog. 10: 451-459.

Warnick GR, Burnham BF. Regulation of prophyrin biosynthesis. Purification and characterization of -aminolevulinic acid synthase. J Biol Chem. 1971 Nov 25; 246(22):6880–6885.

การทดลองที่ 4

เทคโนโลยีต้นแบบการผลิตไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในอาหารเหลวเชิงพาณิชย์

Pilot Production Technology of Entomopathogenic Nematode in Liquid Medium for Commercial

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด
บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ ภรณี สว่างศรี

คำสำคัญ

เทคโนโลยีต้นแบบ ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. Thai isolate)

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. Thai isolate) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด การนำมาพัฒนาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตรต่างๆ และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไส้เดือนฝอยเพื่อได้ต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตเชิงพาณิชย์ ผลการทดลองพบว่าสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 7: 2 : 1 เลี้ยงในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารมี pH เท่ากับ 7 ตั้งวางในสภาพอุณหภูมิ 25$\pm$2 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด ระหว่าง 90,000-104,000 ตัว/มล. (หรือเท่ากับ 90-104 ล้านตัว/ลิตร) โดยการบ่มเพาะในสภาพมีหรือไม่มีแสงพบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ผลผลิตไส้เดือนฝอยสามารถเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด เท่ากับ 32.2 % และมีประสิทธิภาพในการใช้พ่นกำจัดหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ในแปลงผักคะน้า โดยพ่นที่อัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) เกษตรกรสามารถคัดผักส่งขายตลาดได้ คิดเป็น 92.5 %

ABSTRACT

Thai entomopathogenic nematode (*Steinernema* sp. Thai isolate) are biocontrol to many insect pests. The mass production development are increases on the amount of various liquid formula and studying affecting factors to the increasing number of nematodes in order to obtain a prototype of commercial production technology. The results showed that Soy milk formula + lard + water in ratio 7: 2: 1, fed in a stirring vial type bottle monoxenic culture condition with bacterial *Xenorhabdus* sp. 10^7 cells/ml. The food has a pH equal to 7, incubation at temperature of 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$C for 10 days. The nematodes grow and propagate best between 90,000-104,000 nematodes/ml (or equal to 90 and 104 million/liter). The incubation in the presence or absence of light showed that does not affect the growth of nematodes. The nematodes can be stored in the moisture-holding

substance for 3 months with the lowest mortality percentage of 32.2%. It has effective to kill the common cutworm and flea beetles In a kale plot. By spraying at a rate of 5 million per plot of 20 square meters, 5 times (with planting after planting at 10, 20, 30 and 40 days). The farmers can select vegetables to sell to the market for 92.5 %

คำนำ

ไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีศักยภาพในการเป็น bio-pesticide ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ได้มีการศึกษาวิจัยในด้านการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเทียมตั้งแต่ปี 1931 โดย Glaser ได้เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* และ *S. carpocapsae* เป็นผลสำเร็จในอาหารชนิดวุ้น 1 % ที่ประกอบด้วย 1% rabbit kidney ในสภาพ axenic culture ต่อมาในปี 1953 Stoll พัฒนาการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี raw liver extract (RLE) เป็นองค์ประกอบ โดยเลี้ยงในหลอดทดสอบที่มีการเขย่า 100 ครั้งต่อนาที สามารถเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวได้ แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงยังเป็นงานวิจัยในห้องทดลอง ผลิตผลที่ได้ต่ำต้นทุนสูง จึงได้มีการค้นคว้าและการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านเทคนิคและสูตรอาหาร เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงที่สุดและต้นทุนการผลิตต่ำ (Friedman, 1990)

ในปี 1964-1967 Dutky *et al.* พบว่าสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย ทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงขึ้น โดยพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีผลต่อกระบวนการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม

ในปี 1981 Bedding ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ในสภาพ monoxenic culture ที่มีองค์ประกอบของ 70% pigs kidney, 10% beef fat และ 20% tap water ของการเลี้ยง *Steinernema* sp. และ 60% pigs kidney, 20% beef fat และ 20% tap water ของการเลี้ยง *Heterorhabditis* sp. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงเฉลี่ย 40 ล้านตัวต่อ flask ขนาด 500 มล.ต่ออาหาร 70 กรัม ต้นทุนการผลิตเท่ากับ $0.50/flask เทคนิคการผลิตนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ต่อมา Bedding (1984) ได้ศึกษาเทคนิคการผลิตเพื่อขยายปริมาณในระดับการค้า โดยเพาะเลี้ยงในถุง polypropylene ขนาด 1.0x0.5 เมตร ได้ผลผลิตสูงถึง 2,000 ล้านตัวต่อถุง

มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบของอาหารที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยใน 2 สกุล ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ซึ่งมีความแตกต่างกันของสารอาหารที่ไส้เดือนฝอยต้องการ จากรายงานของ Dunphy and Webster (1989) ได้ศึกษาแหล่งอาหารต่างๆ เพื่อการขยายปริมาณ *S. carpocapsae* DD 136 strain และ *H. heliothidis* พบว่าสารอาหารชนิดต่างๆ มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดย culture ที่มี stearic acid พวก sunflower oil (0.1% V/V) เพิ่มผลผลิต *S. carpocapsae* และ cod liver oil (0.5% V/V) เพิ่มผลผลิต *H. heliothidis*

ในปัจจุบันไส้เดือนฝอยสามารถผลิตในอาหารเหลวได้สูงถึง 190,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระดับ shake flask และ 90,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในถังหมัก (fermenter) (Friedman, 1990) มีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเป็นการค้าในต่างประเทศ เช่น บริษัท MicroBio ผลิต *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และ *H. megidis* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys H บริษัท Biosys ผลิต *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิต *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil) (นุชนารถ, 2547)

งานทางด้านไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในประเทศไทยเริ่มมีการศึกษาวิจัยเมื่อประมาณปี 2530 โดยกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โดยงานวิจัยมุ่งเน้นทางด้านการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์ที่นำมาจากสหรัฐอเมริกา โดยใช้เทคนิคการผลิตในอาหารแข็งกึ่งเหลวสภาพ monoxenic culture ดัดแปลงสูตรอาหารและเทคนิคจาก Bedding (1981) นำไปใช้ในสภาพไร่ประสบผลสำเร็จ ได้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์บรรจุซองจำหน่ายในประเทศไทย (วัชรี, 2534)

ในปี 2549-2553 มีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในประเทศไทย สามารถแยกไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงได้ในหลายพื้นที่ โดยไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. (KP strain) ที่แยกจาก จ. กำแพงเพชร เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืช มีคุณสมบัติทนทานต่ออุณหภูมิสูง จัดเป็นสายพันธุ์ที่เรียกว่า heat tolerant isolate เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่พบในรัฐ Taxas สหรัฐอเมริกา และ *S. abbasi* สายพันธุ์ที่พบในประเทศ Oman โดยไส้เดือนฝอย KP strain มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงตายภายในเวลาสั้นที่สุด 10-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30-35°ซ รวมทั้งเพาะเลี้ยงขยายปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียมราคาถูก (นุชนารถ และ ณัฏฐิมา, 2552) คุณสมบัติดังกล่าวจึงถูกพิจารณาและคัดเลือกมาผลิตเพื่อนำไปใช้ลดหรือทดแทนสารเคมีกำจัดแมลงในผักปลอดภัย GAP และผักอินทรีย์ (นุชนารถ และ มัลลิกา, 2560) ดังนั้น ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย KP strain จึงควรนำมาพัฒนาการผลิตให้ได้ปริมาณมากในระดับเชิงพาณิชย์ โดยศึกษากระบวนการผลิตในอาหารเหลว ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณในอาหารระดับถังหมักดัดแปลง และนำไปทดสอบประสิทธิภาพควบคุมแมลงในสภาพแปลงปลูกต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. (KP strain)

2. อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย ได้แก่ โปรตีนผง ไข่ผง นมผง นมถั่วเหลือง tryptic soy broth, nutrient broth, yeast extract, NaCl และ น้ำมันหมู

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง ชุดผลิตไส้เดือนฝอยพร้อมใช้ และภาชนะบรรจุอาหารเพาะเลี้ยง

4. สารเคมีและวัสดุเพาะเลี้ยง ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70% สารฆ่าเชื้อ และ Hyamine 0.1%

- วิธีการ

1. การขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. สายพันธุ์ไทย (KP strain) ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ในสภาพ monoxenic culture

- กรรมวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD 11 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ประกอบด้วยกรรมวิธีสูตรอาหาร 11 สูตร คือ

กรรมวิธีที่ 1 สูตรโปรตีนผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3
กรรมวิธีที่ 2 สูตรโปรตีนผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3
กรรมวิธีที่ 3 สูตรไข่ผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3
กรรมวิธีที่ 4 สูตรไข่ผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3
กรรมวิธีที่ 5 สูตรนมถั่วเหลืองผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3
กรรมวิธีที่ 6 สูตรนมถั่วเหลืองผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3
กรรมวิธีที่ 7 สูตรนมถั่วเหลืองไวตามิล+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3

กรรมวิธีที่ 8 สูตรนมถั่วเหลืองไวตามิล+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3

กรรมวิธีที่ 9 สูตรนมผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3

กรรมวิธีที่ 10 สูตรนมผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3

กรรมวิธีที่ 11 สูตร Pace *et al.* (1986) (สูตรเปรียบเทียบ) (tryptic soy broth+ yeast extract+ NaCl+น้ำมันหมู)

1) เตรียมไส้เดือนฝอย ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในหนอนกินไขผึ้ง ตามวิธีการของ Kaya and Stock (1988) ได้ไส้เดือนฝอยระยะที่ 3 หรือระยะเข้าทำลาย (Infective Juvenile, IJ) นำมาล้างด้วย 0.1 % hyamine เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เก็บไว้ในขวดเก็บเชื้อ (culture flask) ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้

2) เตรียม symbiotic bacteria แยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง ปฏิบัติโดย inoculate ไส้เดือนฝอยระยะ IJ ในหนอน เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำหนอนที่ตายมาล้างฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 95% และล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัดส่วนหัวของหนอนและใช้ลูปแตะน้ำเลือด นำมา streak บน อาหาร NBTA ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 25°ซ ได้โคโลนีเดี่ยวนำไป subculture บน NA ได้โคโลนีระยะ primary from ของแบคทีเรียเก็บเป็น stock culture ใน glycerol medium ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

3) เตรียมอาหารเหลว ผสมอาหารสูตรดัดแปลง 10 สูตร และอาหารสูตรของ Pace *et al.* (1990) (เป็น control) ปริมาตร 1 ลิตร ในขวดกวนขนาดปริมาตร 3 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4) ย้ายโคโลนีของแบคทีเรียจาก stock culture ลงในขวดขนาด 125 มล. ที่มีอาหารชนิด YS broth ปริมาตร 15 มล. นำไปตั้งบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปหยดลงบนอาหารแต่ละสูตร จำนวน 10^7 เซลล์ ตั้งไว้บนเครื่องกวน เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 1 ล้านตัวต่อสูตรอาหารชนิดต่างๆ ทุกขั้นตอนทำให้สภาพปลอดเชื้อ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 26+2 °ซ เป็นเวลา 7 วัน

บันทึกข้อมูล ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 3 ซ้ำต่อสูตรอาหาร คำนวณค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ข้อมูลตามแผนการทดลอง เปรียบเทียบคู่เฉลี่ยโดยวิธี DMRT เลือกอาหารสูตรที่ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุดจำนวน 5 สูตร นำมาทดสอบอีกครั้งโดยปฏิบัติการทดลองเหมือนเดิม และเลือกสูตรอาหารที่ให้ไส้เดือนฝอยสูงสุด 3 สูตรอาหาร

2. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเพาะเลี้ยง เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงสุด (ผลจากข้อ 1) บรรจุในขวดกวนใบพัดขนาด 3 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร/ขวด นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็น ทำการหยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์/ขวด ลงในอาหารแต่ละสูตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 1 ล้านตัว/ขวด ทุกขั้นตอนทำให้สภาพปลอดเชื้อ นำไปตั้งวางบ่มเพาะเลี้ยงบนเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ ที่ 29$\pm$2 °ซ และ 25$\pm$2 °ซ เป็นเวลา 10 วัน

3 ศึกษาผลของระดับ pH ของอาหารเหลวต่อการเพาะเลี้ยง เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงสุด (ผลจากข้อ 1) บรรจุในขวดกวนใบพัดขนาด 3 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร/ขวด ปรับระดับ pH ของอาหารเป็น 5 6 7 8 และ 9 นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็น ทำการหยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์/ขวด ลงในอาหารแต่ละระดับ pH บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 1 ล้านตัว/ขวด ทุกขั้นตอนทำให้สภาพปลอดเชื้อ นำไปตั้งวางบ่มเพาะเลี้ยงบนเครื่องกวนเป็นเวลา 10 วัน

4. ศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเพาะเลี้ยง

- วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ กรรมวิธีประกอบด้วย การให้แสง ไม่ให้แสง และ ให้แสง-ไม่ให้แสงสลับทุก 12 ชม. โดยใช้แสงจากหลอด ไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอดการเพาะเลี้ยง

- เตรียมอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง บรรจุในขวดกวนใบพัดขนาด 3 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร/ขวด ปรับระดับ pH ของอาหารเท่ากับ 7 นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็น ทำการหยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์/ขวด บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 1 ล้านตัว/ขวด ทุกขั้นตอนทำให้สภาพปลอดเชื้อ นำไปตั้งวางบ่มเพาะเลี้ยงบนเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 $^{\circ}$ซ ตามกรรมวิธีการให้แสง ไม่ให้แสง และ ให้แสง-ไม่ให้แสงสลับทุก 12 ชม. เป็นเวลา 10 วัน ตามกรรมวิธีในสภาพ

5. ทดสอบเก็บรักษาเป็นผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยที่ผลิตจากอาหารเหลวในวัสดุต่างๆ ให้คงความมีชีวิตอย่างน้อย 3 เดือน และยังคงศักยภาพในการเป็น bio-pesticide

6. นำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงจากอาหารเหลวพ่นกำจัดแมลงศัตรูผักที่อัตรา 3 ล้านตัว/น้ำ 5 ลิตร/พื้นที่แปลงผักของเกษตรกร ขนาด 2x10 ตร.ม. ทุก 10 วัน เปรียบเทียบกับพ่นสายพันธุ์ต่างประเทศ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

การขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. สายพันธุ์ไทย (KP strain) ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ในสภาพ monoxenic culture ทำการทดสอบ 11 สูตรอาหารเหลว เพาะขยายไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย {*Steinernema* sp. Thai (KP) isolate} ใส่หัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน 1 ล้านตัว ในปริมาตรอาหาร 1 ลิตร สภาพขวดชนิดใบพัดกวนปริมาตร 3 ลิตร ที่มีสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic (มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง ได้สูตรอาหารเหลว 3 สูตร อัตราส่วนโปรตีน : ไขมัน : น้ำ เท่ากับ 5 : 2 : 3 ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุด ได้แก่ สูตร 1 นมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 76,000 ตัว/มล. (76 ล้านตัวต่อลิตร) สูตร 2 ไข่ผง+น้ำมันหมู+น้ำ ได้ผลผลิต 38,000 ตัว/มล. (38 ล้านตัวต่อลิตร) และสูตร 3 โปรตีนผง+น้ำมันหมู+น้ำ ได้ผลผลิต 31,000 ตัว/มล. (31 ล้านตัวต่อลิตร) โดยสูตร Pace *et al.* (1986) ได้ผลผลิต 37,000 ตัว/มล. ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับสูตรที่ 2 และ 3

จากผลการทดลองที่ได้จากการเพาะขยายในอาหารเหลว ซึ่งมีต้นทุนต่ำโดยเฉพาะสูตร 1 ใช้นมถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่หาซื้อได้ง่าย และใช้น้ำมันหมูเป็นแหล่งไขมัน มีต้นทุนค่าอาหารต่ำกว่า 50 บาทต่ออาหาร 1 ลิตร ตลอดจนมีขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยในระดับปานกลาง อย่างไรก็ตาม ยังสามารถปรับสูตรอาหารโดยเพิ่มอัตราส่วนของโปรตีนจาก 5 ส่วน เป็น 6-7 ส่วนได้

ภาพที่ 1 การเลี้ยงไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. KP isolate) ในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ monoxenic culture

ผลของอุณหภูมิต่อการเพาะเลี้ยง จากการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว 3 สูตร พบว่า สูตรที่ 1 นมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ (7 : 2 : 1) ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 42,000 ตัว/มล. (42 ล้านตัวต่อลิตร) และ 86,000 ตัว/มล. (86 ล้านตัวต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 29±2 °ซ และ 25±2 °ซ ตามลำดับ ในขณะที่สูตร 2 ไข่ผง+น้ำมันหมู+น้ำ และสูตรที่ 3 โปรตีนผง+น้ำมันหมู+น้ำ ให้ผลผลิตต่ำไม่คุ้มทุน เฉลี่ยเท่ากับ 27,000 ตัว/มล. (27 ล้านตัวต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29±2 °ซ เกิดการปนเปื้อน ในอาหารสูตร 2 และ 3 อย่างไรก็ตาม มีการทดสอบซ้ำในอาหารสูตรที่ 1 ตั้งวางเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ พบว่าให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยจำนวน 97,000 ตัว/มล. (97 ล้านตัว/ลิตร)

ผลของระดับ pH ในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ (7 : 2 : 1) ต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย พบว่าผลผลิตไส้เดือนฝอยจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีระดับ pH ต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุดที่ pH ของอาหารที่ระดับ 6 และ 7 มีจำนวนไส้เดือนฝอย 88,000 และ 104,000 ตัว/มล. (88 และ 104 ล้านตัว/ลิตร) ตามลำดับ โดยอาหารเหลวที่ pH 6 และ 7 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ระดับ pH ของอาหารที่ 5 8 และ 9 ให้ผลผลิตเพียง 45,000 52,000 และ 55,000 ตัว (45 52 และ 55 ล้านตัว/ลิตร) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้น การใช้สูตรอาหารนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ ในอัตรา 7: 2 : 1 ในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ monoxenic culture โดยปรับระดับอาหาร pH 7 ตั้งวางที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด

ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ (7 : 2 : 1) พบว่าการให้แสง ไม่ให้แสง และให้แสง-ไม่ให้แสงสลับทุก 12 ชม. โดยใช้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอดการเพาะเลี้ยง 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 89 88 และ 90 ล้านตัวต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว และนำไปเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้น ขี้เลื่อย และดินผสม ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายหลังเก็บ 3 เดือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย เท่ากับ 32.2 56.8 และ 49.3 % ของสารอุ้มความชื้น ขี้เลื่อย และดินผสม ตามลำดับ

ผลของทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เพาะขยายจากอาหารเหลว โดยนำไปทดสอบในแปลงคะน้า ของเกษตรกร พื้นที่ จ.นนทบุรี ขนาดแปลงเท่ากับ 2x10 เมตร ปลูกคะน้าได้เท่ากับ 320 ต้น จำนวน 2 แปลง พ่นด้วยไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่เลี้ยงจากอาหารเหลว ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์ต่างประเทศ โดยพ่นในอัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) พบการเข้าทำลายของแมลง 2 ชนิด คือหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก สุ่มนับจำนวนแมลงหลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน พบแมลงจำนวน 4 16 56 และ 36 ตัวต่อ 20 ต้น ตามลำดับ ของแปลงที่พ่นด้วยไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย และเท่ากับ 1 18 62 และ 68 ตัวต่อ 20 ต้น ตามลำดับ ของแปลงที่พ่นด้วยไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่างประเทศ สามารถคัดผักส่งตลาดได้ คิดเป็นร้อยละ 92.50 และ 84.38 ต้น ของสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์ต่างประเทศ ตามลำดับ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. KP isolate) สามารถเลี้ยงได้ในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 7: 2 : 1 มีต้นทุนค่าอาหารต่ำกว่า 50 บาทต่อลิตร เลี้ยงในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารมี pH เท่ากับ 7 ตั้งวางในสภาพอุณหภูมิ 25 ± 2 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด ระหว่าง 90,000-104,000 ตัว/มล. (หรือเท่ากับ 90 และ 104 ล้านตัว/ลิตร) ซึ่งแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยขณะเพาะเลี้ยง ผลผลิตไส้เดือนฝอยสามารถเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด เท่ากับ 32.2 % และมีประสิทธิภาพในการใช้พ่นกำจัดหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ในแปลงผักคะน้า โดยพ่นในอัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) สามารถคัดผักส่งตลาดได้ คิดเป็นร้อยละ 92.50

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ภาคเอกชนหรือหน่วยงาน นำเทคโนโลยีไปผลิตในเชิงพาณิชย์
2. มีสารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชเพื่อใช้ลดหรือทดแทนสารป้องกันกำจัดแมลง

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2547. การพัฒนากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. ใน ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ มัลลิกา แก้ววิเศษ. 2560. การเก็บรวบรวม อนุรักษ์และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2560 กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 10 หน้า.

วัชรี สมสุข. 2534. ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช, หน้า 182-197. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Bedding, R.A. 1981. Low cost in vitro mass production of Neoaplectana and Heterorhabditis species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27 : 109-114.

Bedding, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes Neoaplectana spp. and Heterorhabditis spp. Annals of Applied Biology 104 : 117-120.

Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1989. The monoxenic culture of Neoaplectana carpocapsae DD 136 and Heterorhabditis heliothidis. Revue de Nematologie 12 : 113-123.

Dutky, S.R., J.V. Thompson, G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. J. Insect Pathol. 6 : 417-422.

Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-172. In R. Gaugler and H.K.Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science : 614. Pathol. 62 : 22-28.

Pace, G.W., W. Grote, D.E. Pitt and J.M. Pitt. 1986. Liquid culture of Nematodes. International Patent Publication WO 86/01074.

Stoll, N. 1953. Axenic cultivation of the parasitic nematode, Neoaplectana glaseri, in a fluid medium containing raw liver extract. J. Parasitol. 39 : 422.

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ โดยศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ต่างๆ พบว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ยีสต์ผลิตขึ้น มีความสามารถในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบได้ และยีสต์ที่สร้างขึ้นมานี้สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดออกมาได้โดยใช้โปรโมเตอร์ TEF1 ซึ่งเป็น constitutive promoter ที่ทำงานหรือแสดงออกได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นด้วยสารชักนำใดๆ นอกจากนี้ยีสต์ที่สร้างขึ้นมานี้ยังสามารถหลั่งเอนไซม์ส่งออกมานอกเซลล์ของยีสต์ได้ จึงทำให้สะดวกในการใช้งานเอนไซม์ สามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้งเพื่อผลิตเอธานอลและยังสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในเชิงพาณิชย์ต่อไป ซึ่งสามารถใช้ยีสต์ที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีนแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสร่วมกันในการหมักแป้ง ทำให้ลดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตเอธานอล

การผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง พบว่ามีทั้งมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ ชนิดที่สำคัญคือเชื้อเมตาไรเซียมและบิววาเลีย เมื่อทำการผลิตไคติเนสแล้วนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสสามารถทำให้แมลงตายได้ทั้งในช่วงที่เป็นหนอน ดักแด้และผีเสื้อ มีผลในการยับยั้งการกินอาหารโดยหนอนกระทู้ผักจะไม่กินอาหารที่มีไคติเนสปะปน นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตจะทำให้หนอนยืดอายุในการลอกคราบทำให้มีอายุนานกว่าหนอนปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ เปอร์เซ็นต์การตายในช่วงดักแด้และผีเสื้อจะสูงกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงรูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ในการนำไปใช้ในการกำจัดแมลง ตลอดจนอายุการเก็บรักษาที่จะรักษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง นอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาการนำไคติเนสไปผสมกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่นเพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ ช่วยเสริมประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ดียิ่งขึ้น และควรมีการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ไคติเนสที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำแหล่งต่างๆ สามารถคัดเลือกได้เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 ที่มีศักยภาพในการผลิตสาร ALA ได้ดี เมื่อนำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *hem*A (synthase) ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase เชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 พบว่าชิ้นยีน *hem*A (synthase) ที่ได้ มีขนาด~ 1,224 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hem* A ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. CP015210.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของเปปไทด์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับอะมิโนแอซิดของยีน *hem*A (synthase) ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. ACM01167.1) ที่ identity 99 เปอร์เซ็นต์ การโคลนยีนจากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *hem* A เข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) สามารถถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของเอนไซม์ ALA

synthase พบว่า รีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase มีผลทำให้ recombinant *E. coli* สามารถผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) ได้ จึงเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตสาร ALA เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรต่อไป โดยเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ไอโซเลท D34 สามารถนำไปเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต ALA ได้ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ ALA synthase จากเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ผลิตเอนไซม์ ALA synthase ได้ดี สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาร ALA ให้มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น ซึ่งสามารถใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มผลผลิต เป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้สารเคมี ฮอร์โมน และสารเสริมที่สังเคราะห์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

การผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. KP isolate) สามารถเลี้ยงได้ในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 7: 2 : 1 มีต้นทุนค่าอาหารต่ำกว่า 50 บาทต่อลิตร เลี้ยงในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารมี pH เท่ากับ 7 ตั้งวางในสภาพอุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด ระหว่าง 90,000-104,000 ตัว/มล. (หรือเท่ากับ 90 และ 104 ล้านตัว/ลิตร) ซึ่งแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยขณะเพาะเลี้ยง ผลผลิตไส้เดือนฝอยสามารถเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด เท่ากับ 32.2 % และมีประสิทธิภาพในการใช้พ่นกำจัดหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ในแปลงผักคะน้า โดยพ่นในอัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) สามารถคัดผักส่งตลาดได้ คิดเป็นร้อยละ 92.50 ซึ่งภาคเอกชนหรือหน่วยงานต่างๆ สามารถนำเทคโนโลยีไปผลิตในเชิงพาณิชย์ เพื่อให้มีสารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชเพื่อใช้ลดหรือทดแทนสารป้องกันกำจัดแมลง

บรรณานุกรม

การผลิตรีคอมบิแนนท์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์

นิรนาม. 2554. การเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation). (8 มกราคม 2554). http://www.champa.kku.ac.th/thanaset/DNAsyn6.pdf.

พักตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2546. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง. วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 11(4): 28-31.

ภูวดี. 2551. ผลิตเอทานอลเพื่อแก๊สโซฮอล์ (Gasohol). (22 พฤษภาคม 2553). http://www.vcharkarn.com/varticle/38199.

อรพิน ภูมิภมร. 2530. การผลิตกลูโคอะไมเลสจากเชื้อราที่ทำลายหัวมันสำปะหลังโดยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็ง. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสาตร์). 21:39-40.

อัมพร ยังโหมด. 2537. สถานการณ์การผลิตมันสำปะหลัง, น.193-205. ใน มันสำปะหลัง (สถาบันวิจัยพืชไร่) กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ ฯ.

อาคม เทศนุ่ม สุภาวดี ฉิมทอง นิษก์นิภา สุนทรกุล คิน เลย์ คู จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ และ กนก รัตนะกนกชัย. 2553. การศึกษาอะไมเลสจากแบคทีเรีย *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 และการผลิตน้ำตาลจากแป้งดิบและกากมันสำปะหลัง, น.36-44 ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Dalmia, B. K., Z. L. Nikolov. 1994. Characterization of a β-Galactosidase Fusion Protein Containing the Starch-Binding Domain of *Aspergillus glucoamylase*. Enzyme and Microbial Technology. 16:18-23.

Fritsch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 1989. Preparation and Transformation of Competent *E. coli*. Pages 1.74 -1.84. in : Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Garc´ıa, L. L., A. C. Adam, P. Manzanares and J. Polaina. 2005. Improving the Amylolytic Activity of *Saccharomyces cerevisiae* Glucoamylase by the Addition of a Starch Binding Domain. Journal of Biotechnology. 118:167–176.

Giardina, T., A. P. Gunning, N. Juge, C. B. Faulds, C. S. M. Furniss, B. Svensson, V. J. Morris and G. Williamson. 2001. Both Binding Sites of the Starch-binding Domain of *Aspergillus niger* Glucoamylase are Essential for Inducing a Conformational Change in Amylose. Journal of Molecular Biology. 313: 1149-1159.

Janse, B. J and I. S. Pretorius. 1995. One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of Saccharomyces cerevisiae producing alpha-amylase, glucoamylase and pullulanase. Appl Microbiol Biotechnol. 42(6): 878–883.

Jeang, C. J., L. S. Chen, M-Y. Chen and R. J. Shiau. 2002. Cloning of a Gene Encoding Raw-Starch-Digesting Amylase from a *Cytophaga* sp. and Its Expression in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 68:3651-3654.

Karrer, E.E., J.M. Chandler, M.R. Foolad and R. L. Rodriguez. 2004. Correlation between α-Amylase Gene Expression and Seedling Vigor. Biomedical and Life Sciences. 66:163-169.

Kaufmann, E., N. Geisler and K. Weber. 1984. SDS-PAGE Strongly Overestimates the Molecular Masses of the Neurofilament Proteins. FEBS LETTERS. 170(1):81-84.

Kosugi, A., A. Kondo, M. Ueda, Y. Murata, P. Vaithanomsat, W. Thanapase, T. Arai and Y. Mori. 2009. Production of Ethanol from Cassava Pulp *via* Fermentation with a Surface Engineered Yeast Strain Displaying Glucoamylase. Renewable Energy. 34: 1354–1358.

Legal-Coeffet, M. F., A. J. Jacks, K. Sorimachi, M. P. Williamson, G. Williamson and D. B. Archer. 1995. Expression in *Aspergillus niger* of the Starch-Binding Domain of Glucoamylase Comparison with the Proteolytically Produced Starch-Binding Domain. European Journal of Biochemistry. 233: 561-567.

Lin, L. L., Y. J. Ma, H. R. Chien and W. H. Hsu. 1998. Construction of an Amylolytic Yeast by Multiple Integration of the *Aspergillus awamori* Glucoamylase Gene into a *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome. Enzyme and Microbial Technology. 23:360–365.

Liu, S. H., W. I. Choua, C. C. Sheub and M. D. T. Chang. 2005. Improved Secretory Production of Glucoamylase in *Pichia pastoris* by Combination of Genetic Manipulations. Biochemical and Biophysical Research Communications. 326: 817–824.

MacKenziea, D. A., D. J. Jeenesa, X. Goub and D. B. Archer. 2000. Molecular Basis of Glucoamylase Overproduction by a Mutagenised Industrial Strain of *Aspergillus niger.* Enzyme and Microbial Technology. 26:193–200.

Matagne, A., B. Joris and J.-M. Frere. 1991. Anomalous Behaviour of a Protein During SDS/PAGE Corrected by Chemical Modification of Carboxylic Groups. Biochemical Journal. 280:553-556.

Mertens, J. A., C. D. Skory. 2007. Isolation and Characterization of a Second Glucoamylase Gene without a Starch Binding Domain from *Rhizopus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology. 40:874–880.

Mijts, B.N. and B.K.C. Patel. 2002. Cloning, Sequencing and Expression of an α–Amylase Gene, *amy*A, from the Thermophilic Halophile *Halothermothrix orenii* and Purification

and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. Microbiology. 148:2343-2349.

Mitsunaga, S.I., O. Kawakami, T. Numata, J.Yamaguchi, K. Fukui and T. Mitsui. 2001. Polymorphism in Rice Amylase at an Early Stage of Seed Germination. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 65:662-665.

Murai, T., T. Yoshino, M. Ueda, I. Haranoya, T. Ashikari, H. Yoshizumi and A. Tanaka. 1998. Evaluation of the Function of Arming Yeast Displaying Glucoamylase on Its Cell Surface by Direct Fermentation of Corn to Ethanol. Journal of fermentation and Bioengineering. 86(6):569-572.

Özcan, n., A. Altinalan and M. S. Ekinci. 2001. Molecular Cloning of an **α**-amylase Gene from *Bacillus subtilis* RSKK246 and Its Expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtillis.* Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 25:197-201.

Park, C.S., C.C. Chang, J.Y. Kim, D.M. Ogrydziak and D.D.Y. Ryu. 1997. Expression, Secretion, and Processing of Rice-Amylase in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 272:6876-6881.

Satoh, E., Y. Niimura, T. Uchimura, M. Kozaki and K. Komagata. 1993. Molecular Cloning and Expression of Two α–Amylase Gene from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli.* Applied and Environmental Microbiology. 59:3669-3673.

Shahhoseini, M., A.A. Ziaee and N. Ghaemi. 2003. Expression and Secretion of an Alpha-Amylase Gene from a Native Strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 Promoter and Putative Signal Peptide of the Gene. Journal of Applied Microbiology. 95:1250-1254.

Shigechi, H., K. Uyamaa, Y. Fujita, T. Matsumoto, M. Uedac, A. Tanaka, H. Fukuda and A. Kondo. 2002. Efficient Ethanol Production from Starch through Development of Novel Flocculent Yeast Strains Displaying Glucoamylase and co-Displaying or Secreting α-Amylase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17:179–187.

Southgate, V.J., A.J.C. Steyn, I.S. Pretorius and H.J.J. V. Vuren. 1993. Expression and Secretion *Bacillus amyloliquefaciens* **α**-Amylase by Using the Yeast Pheromone **α**-Factor Promoter and Leader Sequence in *Saccharomyces cerevisiae.* Applied and Environmental Microbiology. 59:1253-1258.

Verdoes, J. C., P. J. Punt, A. H. Stouthamer and C. A.M.J.J. van den Hondel. 1994. The Effect of Multiple Copies of the Upstream Region on Expression of the *Aspergillus niger* Glucoamylase-Encoding Gene. Gene. 145: 179-187.

Wallis, G.L.F., R.J. Swift, F.W. Hemming, A.P.J. Trinci and J.F. Peberdy. 1999. Glucoamylase Overexpression and Secretion in *Aspergillus niger*: Analysis of Glycosylation. Biochimica et Biophysica Acta 1472 (1999) 576-586.

Williamson, G. and N. J. Belshaw. 1993. Properties of the Binding Domain of Glucoamylase. Carbohydrate Polymers. 21:147-149.

Yao, T. T., Y. M. Wang, J. L. Gu and Z. X. Wang. 2006. Overproduction of Glucoamylase by Recombinant *Aspergillus niger* Harboring Multiple Copies of *glaA*. Chinese Journal of Biotechnology. 22: 567-571.

การผลิตไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง: นิวคลีโอโดลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Binod, P., R.K. Sukamaran, S.V. Shirke, J.C. Rajput and A. Pandey. 2007. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against Helicoverpa armigera. J. of Applied Micrology. 103:1845-1852

Carr, J. P. and D. P. Klessig. 1989. Genetic Engineering-Principles and Methods, Vol 11 ed. J.K. Sellow, p 65 Plenum Press, New York.

Kramer, K. L. and S. Muthikrishnan, 1997. Insect Chitinases: Molecular biology and potential use as pesticides. Insect Biochem. Molec. 27: 887-900.

Linthorst H. J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 123-150.

Sahai A. S. and M. S. Manocha. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite intereaction: FEMS Microbial. Rev. 11: 317-338.

Wu J.H., S. Ali and S. X. Ren. 2010. Evaluation of Chitinase from Metarhizium anisopliae as Biopesticide Against Plutella xylostella. Pakistan. J. Zool. 42: 521-528.

การโคลนยีน 5-aminolevulinate synthase (ALAS) จากจุลินทรีย์

Jordan, P.M. 1991. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid andits transformation into uroporphyrinogen Ill in animals and bacteria. In *Biosynthesis of Tetrapyrroles* (Jordan, P.M., Ed.), pp. 1-66. Elsevier, Amsterdam.

Neidle, E. L., and S. Kaplan. 1993. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. J. Bacteriol.

175:2292–2303.

Sasikala, Ch., Ramana, Ch.V. and Rao, P.R. 1994. 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganisms. Biotechnol. Prog. 10: 451-459.

Warnick GR, Burnham BF. Regulation of prophyrin biosynthesis. Purification and characterization of -aminolevulinic acid synthase. J Biol Chem. 1971 Nov 25; 246(22):6880–6885.

เทคโนโลยีต้นแบบการผลิตไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในอาหารเหลวเชิงพาณิชย์

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2547. การพัฒนากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. ใน ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ มัลลิกา แก้ววิเศษ. 2560. การเก็บรวบรวม อนุรักษ์และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2560 กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 10 หน้า.

วัชรี สมสุข. 2534. ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช, หน้า 182-197. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Bedding, R.A. 1981. Low cost in vitro mass production of Neoaplectana and Heterorhabditis species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27 : 109-114.

Bedding, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes Neoaplectana spp. and Heterorhabditis spp. Annals of Applied Biology 104 : 117-120.

Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1989. The monoxenic culture of Neoaplectana carpocapsae DD 136 and Heterorhabditis heliothidis. Revue de Nematologie 12 : 113-123.

Dutky, S.R., J.V. Thompson, G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. J. Insect Pathol. 6 : 417-422.

Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-172. In R. Gaugler and H.K.Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science : 614. Pathol. 62 : 22-28.

Pace, G.W., W. Grote, D.E. Pitt and J.M. Pitt. 1986. Liquid culture of Nematodes. International Patent Publication WO 86/01074.

Stoll, N. 1953. Axenic cultivation of the parasitic nematode, Neoaplectana glaseri, in a fluid medium containing raw liver extract. J. Parasitol. 39 : 422.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การสกัดพลาสมิด
โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะตามที่ระบุสำหรับพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปสกัดพลาสมิดตามวิธีการดังต่อไปนี้

1. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
2. เติม Lysis Solution ลงในสารละลายข้อ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดเบาๆ 4-6 ครั้ง เพื่อผสมให้เข้ากัน
3. เติม Neutralization Solution ลงในสารละลายข้อ 2 ปริมาตร 350 ไมโครลิตรแล้วกลับ หลอดเบาๆทันที 4-6 ครั้ง
4. นำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ใช้ไมโครไปเปตดูดสารละลายใสในข้อ 4 ใส่ลงใน GeneJET™ spin column
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง
7. ล้าง GeneJET™ spin column ด้วย Wash Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่น เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง
8. ล้าง GeneJET™ spin column ด้วย Wash Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้ว นำไปปั่น เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
9. เทของเหลวในข้อ 8 ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำ ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ออกจาก Column
10. นำ GeneJET™ spin column ไปวางในหลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ GeneJET™ spin column เพื่อละลาย ดีเอ็นเอออกมา บ่ม 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

ภาคผนวก ข

การตรวจขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

1. เตรียม agarose gel 0.8 % ใน 1X TBE buffer
2. อุ่นให้เจลละลาย รอให้เย็นพอที่มือจับได้
3. เทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล แล้ววาง comb รอให้เจลแข็งประมาณครึ่งชั่วโมง วางถาดเจลลงใน chamber เท 1xTBE ให้ท่วมเจล แล้วจึงดึง comb ออก
4. load ดีเอ็นเอตัวอย่างเปรียบเทียบกับ DNA/*Hind* III marker
5. แยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ ตั้งเวลา 30 นาที
6. แกะเจลออกจากถาดนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide 0.5 M เป็นเวลา 5 นาที เพื่อย้อมสีแถบดีเอ็นเอ
7. นำเจลลงแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างสีส่วนเกินออก เป็นเวลา 10 นาที
8. ตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยใช้เครื่อง Gel Document

ภาคผนวก ค

การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis : SDS-PAGE)

การเตรียมเจล

1. ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้าด้วยกันคั่นด้วย spacers ล็อคให้แนบติดกันด้วย clamp แล้วขัน สกรูให้แน่น วางลงใน casting stand
2. เตรียมสารละลายเจล 8% โดยผสมสารต่อไปนี้ ตามลำดับ คนเบาๆให้เข้ากัน แต่ยังไม่ต้องเติม TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) กับ ammonium persulfate

น้ำปราศจากไอออน	4.6	มิลลิลิตร
30% acrylamide monomer solution	2.7	มิลลิลิตร
1.5 M Tris buffer pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	6	ไมโครลิตร

3. เติม TEMED กับ ammonium persulfate แล้วเขย่าวนเบาๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
4. ใช้ไปเปตดูดสารละลายเจลใส่ลงที่มุมแผ่นแก้ว จากนั้นค่อยๆหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
5. เตรียม stacking gel monomer โดยผสมสารต่อไปนี้

น้ำปราศจากไอออน	2.7	มิลลิลิตร
30% acrylamide monomer solution	0.67	มิลลิลิตร
1.0 M Tris buffer pH 6.8	0.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.04	มิลลิลิตร

TEMED	4	ไมโครลิตร

6. เทน้ำที่ปิดหน้าเจลออก ซับให้แห้งด้วยกระดาษ
7. ดูดสารละลายเจลใส่ลงระหว่างแผ่นแก้ว เสียบ comb เพื่อให้เกิดช่อง (well)
8. ทิ้งไว้จนกว่าเจลจะแข็ง ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
9. เอา comb ออก ระวังอย่าให้เจลขาด เติม Tank buffer ลงใน chamber

การทำอิเลคโตรโฟรีซิส

1. ใส่สารตัวอย่างที่ผสมกับ 2x sample buffer แล้วหยอดลงในแต่ละช่องของเจล
2. ต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เสียบปลั๊กต่อกับเครื่องจ่าย กระแสไฟฟ้า
3. ตั้งกระแสไฟฟ้าไว้ที่ 120 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง สำหรับเจล 1 แผ่น
4. ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อ tracking dye ลงมาถึงด้านล่าง
5. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber เอา spacers ออก แล้วใช้ spatula งัดแผ่นแก้วเบาๆ เจลจะติดอยู่ที่แผ่นแก้วข้างหนึ่ง ค่อยๆเทเจลลงในถาดย้อม

การเตรียมสีย้อม PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas, USA)

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในเจล นำไปเข้า microwave ด้วยไฟแรง นาน 1 นาที เขย่าต่อ 5 นาที เทน้ำทิ้ง
2. ทำซ้ำข้อ 1 จำนวน 3 ครั้ง
3. เติม PageBlue™ Protein Staining Solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเข้า microwave ด้วยไฟแรง นาน 30 วินาที เขย่าต่อ 20 นาที เทสารละลายทิ้ง
4. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง

ภาคผนวก ง

การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง (Conventional Process)

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมวัตถุดิบ มันสำปะหลังที่ผ่านการแยกเหง้าจะถูกล้างให้สะอาดแล้วบดให้ละเอียดเป็นแป้ง ได้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลัง

ขั้นตอนที่ 2 การย่อยแป้ง เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (น้ำตาลกลูโคส) เพื่อให้มีสภาพเหมาะกับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ในขั้นต่อไป โดยวิธีการย่อยแป้งอาจใช้กรดย่อยแป้ง (Acid Hydrolysis) หรือใช้เอนไซน์ (Enzymatic Hydrolysis) ซึ่งวิธีการที่ใช้เอนไซน์เพื่อย่อยแป้งนั้นจะได้รับความนิยมมากกว่า เนื่องจากสะดวกและประหยัดต้นทุน ขั้นตอนนี้จะทำการย่อย 2 ครั้งด้วยกัน

ครั้งที่ 1 ย่อยแป้งเพื่อทำให้แป้งมีโมเลกุลเล็กหรือทำให้เหลว (Liquefaction) เป็นการเตรียมแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้วิธีการต้มเคี่ยวน้ำแป้งสำปะหลังด้วยเอนไซม์ตัวที่ 1 คือ เอนไซน์แอลฟา อะไมเลส (α-amylase) โดยใช้เคี่ยวรักษาอุณหภูมิที่ประมาณ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 ชั่วโมง

ครั้งที่ 2 ย่อยแป้งทำให้ได้กลูโคสหรือย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification)โดยทำให้ น้ำแป้งสุก ก่อนผสมเอนไซม์ตัวที่ 2 คือ กลูโค-อะไมเลส (Glucoamylase หรือ เบต้า-อะไมเลส (beta-amylase) เพื่อย่อยแป้งสุกให้เป็นน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก

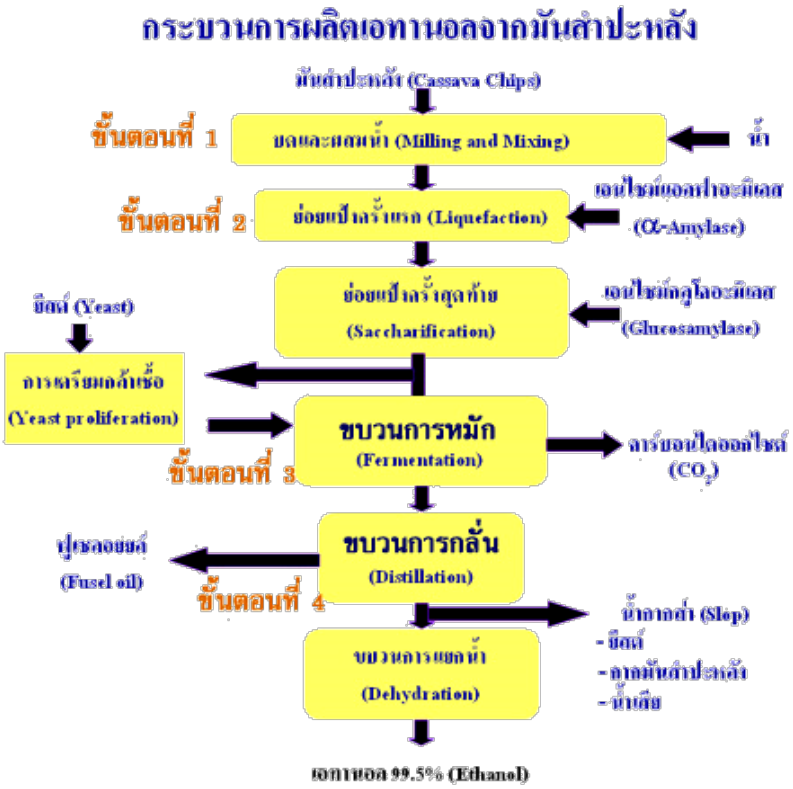
ขั้นตอนที่ 3 กระบวนเตรียมหัวเชื้อและการหมัก (fermentation)

การเตรียมหัวเชื้อ(inoculum) เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการหมัก เมื่อเตรียมหัวเชื้อพร้อมแล้ว ก็เข้าสู่ขั้นตอนการหมัก โดยใช้เชื้อยีสต์ Saccaromyces cerevisiae จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมักเช่น อัตราการให้อากาศ อัตรา การกวน ค่าพีเอชและอุณหภูมิ ใช้ระยะเวลาการหมัก ประมาณ 48 ชม. ที่ pH 4-5 โดยทำการหมักในถังหมักที่ได้เตรียมไว้ และใช้เครื่องควบคุมการหมัก (Biostat B) ยีสต์สายพันธุ์นี้ สามารถผลิตเอทานอลได้สูงและสามารถทนสภาพแวดล้อมที่มีเอทานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น

ขั้นตอนที่ 4 การกลั่นเอทานอล (Ethanol) ขั้นตอนนี้เป็นการกลั่นเพื่อผลิตเอทานอลและทำให้บริสุทธิ์ เป็นการแยกเอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร ออกจากน้ำหมักและน้ำส่า โดยการกลั่นลำดับส่วนซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้บริสุทธิ์ร้อยละ 95.6 โดยปริมาตร แต่การนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอล์) นั้นจะต้องทำให้เอทานอลมีความบริสุทธ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิค หรือ เทคโนโลยีในการกลั่นเพื่อแยกน้ำให้ได้เอทานอลที่บริสุทธิ์ ที่นิยมใช้กันอยู่มี 3 วิธี คือ

1. การดูดซับด้วย (Molecular sieve)
2. การกลั่นอะซีโอโทรป (Azeotropic distillation)
3. เทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง (Membrane technology)

(ภูวดี, http://www.vcharkarn.com/varticle/38199)



ภาคผนวก จ

การเตรียม colloidal chitinและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียม colloidal chitin (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Roberts and Selitrenikoff, 1988)

1. เติม 100 g ของผงไคตินช้าๆ ใน HCl 1.75 ลิตร แล้วเขย่าช้า 3 ชั่วโมง ด้วย magnetic stirrer
2. เติมน้ำกลั่นให้ได้เป็น 20 ลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. จะเห็นตะกอนสีขาว นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 $^{\circ}$C
4. ล้างตะกอนด้วยน้ำเย็นช้าๆ หลายๆครั้ง จนกระทั่ง pH ลดเหลือ 5.5
5. น้ำใสจะถูกทิ้งและ Colloidal chitin จะถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 $^{\circ}$C

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ colloidal chitin agar (CCA)

1. Colloidal chitin 2 g
2. Agar 16 g
3. Distilled water 1000 ml