



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้พลาสมาพลังงานต่ำปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรีย
เพื่อผลิตเอทานอล

โดย

กัณตา แสงวิจิตร

กรกฎาคม 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการประยุกต์ใช้พลาสมาพลังงานต่ำปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรีย
เพื่อผลิตเอทานอล

โดย

กันตา แสงวิจิตร
มหาวิทยาลัยพะเยา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	1
บทคัดย่อ	5
วิธีการดำเนินงาน	7
ผลและวิจารณ์	11
สรุป	24
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนเซลล์เลสและไซลานเนส	9
ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขการทดลองย่อยเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	10
ตารางที่ 3 กิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์เซลล์เลสและไซลานเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียลูกผสม reBglC, reBglC_M, reXynA และ reXynA_M	18
ตารางที่ 4 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักสารตั้งต้นในแต่ละเงื่อนไข	24

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะวงใส (halo zone) ที่เกิดจากการย่อยสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหารแข็งที่มี 1% (w/v) ของ CMC เป็นองค์ประกอบ	11
ภาพที่ 2 ลักษณะวงใส (halo zone) ที่เกิดจากการย่อยสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ไซลานเนส บนอาหารแข็งที่มี 1% ของ birchwood xylan เป็นองค์ประกอบ	11
ภาพที่ 3 จุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลของม้า (H28)	12
ภาพที่ 4 จุลินทรีย์ที่แยกได้จากจากปลวก (T7)	12
ภาพที่ 5 แสดงการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพ การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงขึ้น	13
ภาพที่ 6 แสดงการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพ การทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสที่สูงขึ้น	14
ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน endoglucanase จาก reBglC และ reBglC_M โดยโปรแกรม Clustal Omega ลูกศรสีแดงบ่งชี้ถึงลำดับอะมิโนที่เปลี่ยนไปของ reBglC_M (K370E) ซึ่งอยู่ในส่วนบริเวณ CBM	16
ภาพที่ 8 ส่วนประกอบหลักของเอนไซม์ endoglucanase ซึ่งประกอบไปด้วยสองส่วนหลัก คือ active site และ CBM	16
ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน endoxylanase จาก reXynA และ reXynA_M โดยโปรแกรม Clustal Omega ลูกศรสีแดงบ่งชี้ถึงลำดับอะมิโนที่เปลี่ยนไปของ reXynA_M (S162T)	17
ภาพที่ 10 ส่วนประกอบหลักของเอนไซม์ 1,4-beta-xylanase	17
ภาพที่ 11 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ BglC	19
ภาพที่ 12 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ XynA	20
ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ BglC	21
ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ XynA	21
ภาพที่ 15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์ ที่ผลิตแบคทีเรียลูกผสม reBglC, reBglC_M, reXynA และ reXynA_M	22
ภาพที่ 16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์ ที่ผลิตแบคทีเรียลูกผสม reBglC, reBglC_M, reXynA และ reXynA_M	23

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้พลาสมาพลังงานต่ำ (PIII) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าวและต้นข้าวโพด *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลานเนสถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการระดมยิงด้วยพลาสมาของอาร์กอนหรือไนโตรเจน โดยใช้แรงดันไบแอสในช่วงพลังงานที่ 2.5 kV และความหนาแน่นของไอออนในช่วง 1×10^{15} ถึง 1×10^{17} ions/cm² แบคทีเรียพันธุ์กลายที่แสดงความสามารถในการย่อยสลายตั้งต้นมากกว่าแบคทีเรียชุดควบคุมถูกคัดเลือกโดยการย้อมด้วยสี Congo red และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ระหว่างแบคทีเรียพันธุ์กลายและแบคทีเรียชุดควบคุมด้วยการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นผลจากการย่อยสลายตั้งต้นด้วยเอนไซม์ทั้งนี้ได้โคลนยีนเซลลูเลส (*BglC*) และยีนไซลานเนส (*XynA*) ทั้งแบบปกติและที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จากนั้นส่งถ่ายชิ้นส่วนของยีนเซลลูเลสและไซลานเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pETDuet-1 เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli strain* BL21 ทำการตั้งชื่อเซลล์ลูกผสมตามยีนที่ได้รับ ดังนี้ เซลล์ลูกผสมที่ได้รับยีน *BglC* และ *XynA* แบบปกติเรียก re*BglC* และ re*XynA* ส่วนเซลล์ลูกผสมที่ได้รับยีน *BglC* และ *XynA* ที่กลายพันธุ์ คือ re*BglC*_M and re*XynA*_M ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะต่างๆ พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม re*BglC*_M และ re*XynA*_M แสดงประสิทธิภาพการทำงานที่สูงกว่าเอนไซม์แบบปกติตลอดทุกช่วงอุณหภูมิและค่า pH การทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสจากเซลล์ลูกผสม re*BglC*_M และ re*XynA*_M ในการย่อยฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้ผลของน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดโดยให้ค่าถึง 22.16 และ 14.51 mg/ml ตามลำดับ จึงเลือกเงื่อนไขนี้ไปใช้ในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพและใช้ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* V1116 ในกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้ผลเท่ากับ 3.50 % (ปริมาตร/ปริมาตร) และ 3.23 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ

Abstract

In this research, Plasma immersion ion implantation (PIII) was applied to induce mutation on bacteria for enhancing cellulase and xylanase activities for ethanol production from agriculture wastes such as rice straw and corn stover. Cellulase and xylanase producing bacterial cells of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* were treated by argon or nitrogen PIII at a bias voltage of -2.5 kV with various from 1×10^{15} to 1×10^{17} ions/cm² to induce mutation. The bacterial mutants exhibiting clear potentiality of enhanced hydrolysis activity were screened by Congo red assay. Comparison of hydrolysis activity from the bacterial mutants and non-mutants was investigated by measurement of reducing sugars liberate from substrates hydrolysis. In addition, the original and mutated genes of cellulase (*BglC*) and xylanase (*XynA*) were cloned into expression vector (pETDuet-1) and transformed into *E. coli* BL21 for overproduction of enzymes. The recombinant cells which contained the original *BglC* and *XynA* were named reBglC and reXynA, while the recombinant cells which contained the mutated *BglC* and *XynA* were named reBglC_M and reXynA_M, respectively. The hydrolysis activity between the mutants (reBglC_M and reXynA_M) and the control (reBglC and reXynA) was compared under the condition of various pH values and temperatures and the result showed that both of cellulase and xylanase activities of the mutants were clearly higher than the control. The combination of cellulase and xylanase which produced from reBglC_M and reXynA_M showed the highest hydrolysis activity on pretreated rice straw and corn stover by liberated reducing sugar at 22.16 and 14.51 mg/ml, respectively. Then combination of reBglC_M and reXynA_M was chosen for the hydrolysis of the agricultural wastes and then *Saccharomyces cerevisiae* V1116 was used in fermentation. Ethanol produced from pretreated rice straw and pretreated corn stover has yields of 3.50 % v/v and 3.23 % v/v, respectively.

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสจากแหล่งต่างๆ

คัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสจากแหล่งต่างๆ เช่น ช้างตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ เช่น จาวปลวก เส้นกล้วยเตี้ยว กระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง น้ำพุร้อน และดินบริเวณที่มีการทับถมของเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มา 1 กรัม เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10^{-1} ถึง 10^{-5} ดูดสารละลายจากหลอดความเจือจาง 10^{-5} มาเพาะเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง NA ที่มี carboxymethyl Cellulose (CMC) และ brichwood xylan เป็นสารตั้งต้น ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารโดยเลือกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารแข็งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำในขั้นตอนนี้สามครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2. ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์

เลือกเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทที่ได้จากการ streak plate มาเพาะเลี้ยงโดยวิธี agar spot (พิรุฬห์พร, 2552) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารตั้งต้น ได้แก่ CMC และ brichwood xylan เป็นองค์ประกอบ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกขนาดโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิดแล้วทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ โดยเทสารละลาย 0.1% congo red ให้ท่วมผิวหน้าอาหารทดสอบทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นเทสารละลาย congo red ทิ้งและเติมน้ำเกลือ 1 M NaCl ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเทสารละลายทิ้ง นำอาหารทดสอบไปวัดขนาดความกว้างของบริเวณใส (Halo zone) ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนีของเชื้อ (H/C) ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

3. ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผลสัดส่วนของการเกิดบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีสูง มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนส โดยนำเชื้อจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสารตั้งต้นที่เหมาะสมกับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ดังนี้

- การทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส: สารตั้งต้นที่ใช้ คือ CMC
- การทดสอบเอนไซม์ไซลานเนส: สารตั้งต้นที่ใช้ คือ xylan

โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว NA ที่เติมน้ำเกลือ 1 % ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสารตั้งต้นโดยใช้ DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959) และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951) เพื่อคำนวณหาค่าการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity)

4. บ่งบอกชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและการหาลำดับเบสของ 16S rDNA

4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกมาศึกษาลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวโดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (compound microscope)

4.2 การหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือก

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีค่า H/C และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสสูง พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากจาวปลวกและลำไส้ของม้า มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสูง จึงนำแบคทีเรียทั้งสองไปเชื้อเลี้ยง มาสกัด Genomic DNA ตามวิธีของ Ifakut (2005) เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โพรเมอร์ที่ใช้ คือ 16SF: 5'-AGT TTG ATC CTG GCT C-3' และ 16SR: 5'-GGC TAC CTT GTT ACG A-3' จากนั้นตรวจสอบผลลัพธ์จากกระบวนการ PCR โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis แล้วเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์จากเจล (DNA purification) ตามขั้นตอน DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, USA) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T โดยใช้ InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas, USA) และส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* strain DH5 α โดยใช้วิธี Electroporation จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม และนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA โดยวิธี dideoxynucleotide chain termination method (Sanger *et al.*, 1997) โดยบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd, Selangor DarulEhsan, Malaysia ทำเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

5. การชักนำการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกโดยพลาสมาพลังงานต่ำ PIII (Plasma immersion ion implantation หรือ PIII)

ระดมยิงแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกด้วยพลาสมาพลังงานต่ำด้วยแก๊สอาร์กอนและไนโตรเจนโดยใช้แรงดันไบแอสในช่วงพลังงานที่ 2.5 kV และความหนาแน่นของไอออนในช่วง 1×10^{15} ถึง 1×10^{17} ions/cm² จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสที่ดีกว่าแบคทีเรียชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการระดมยิง ทำการตรวจสอบและวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนสจากแบคทีเรียพันธุ์กลายเทียบกับแบคทีเรียชุดควบคุม (แบคทีเรียที่ไม่ผ่านการระดมยิง) จากการเปรียบเทียบค่า H/C และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Cloning) และชักนำให้เกิดการแสดงออกที่มากขึ้นของยีนเซลลูเลส และไซลาลเนส โดยการส่งถ่ายยีนเพื่อแสดงออกใน *E. Coli* สายพันธุ์ BL21

เมื่อคัดเลือกได้แบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงกว่าแบคทีเรียชุดควบคุมแล้วทำการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จากแบคทีเรียพันธุ์กลายด้วยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ โดยการโคลนยีนเซลลูเลสและไซลาลเนสโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นส่งถ่ายชิ้นส่วนของยีนเซลลูเลสและไซลาลเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pETDuet-1 เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* strain BL21 ทั้งนี้ได้นำเวกเตอร์ลูกผสมของยีนเซลลูเลส (reBglC) และไซลาลเนส (reXynA) ทั้งของแบคทีเรียพันธุ์กลายและ

แบบที่เรียกชุดควบคุมส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน โดยวิธี dideoxynucleotide chain termination method (Sanger *et al.*, 1997) โดยบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd, Selangor DarulEhsan, Malaysia ทำเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลสและไซลานเนส

Primer name	5' to 3' Sequence
BglC_1F	Ccggcacatatggcagggacaaaaacgccag
BglC_1R	Ctaatgctcgaggcctaaagcttaactaatt
XynA_1F	Aggaggggatccatgtttaagttaaaaag
XynA_1R	Aaagataagctttaccacactgttacatt
BglC_2F	Catatggcagggacaaaaacgccagtagcc
BglC_2R	Aaactcgagctaatttggttctgttcccca
XynA_2F	Ggatccgctggcagagattactggcaaat
XynA_2R	Aaagataagctttaccacactgttacatt

* ไพรเมอร์ BglC_1F /R และ XynA_1F/R ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลสและไซลานเนสของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลของม้าตามลำดับ

* ไพรเมอร์ BglC_2F /R และ XynA_2F/R ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณยีนเซลลูเลสและไซลานเนสของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากจาวปลวกตามลำดับ

7. ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) จากแบคทีเรียลูกผสม

นำแบคทีเรียลูกผสมทั้ง 4 ชนิดได้แก่ แบคทีเรียลูกผสมที่มียีนเซลลูเลส (reBglC) แบคทีเรียลูกผสมที่มียีนเซลลูเลสที่กลายพันธุ์ (reBglC_M) แบคทีเรียลูกผสมที่มียีนไซลานเนส (reXynA) และแบคทีเรียลูกผสมที่มียีนไซลานเนสที่กลายพันธุ์ (reXynA_M) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB และวัดความขุ่นของอาหารที่ความยาวคลื่น = 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เมื่อ OD_{600} = 0.6 เติม 1 mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) จากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อไปอีก 16 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ที่เตรียมได้นี้ไปหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสารตั้งต้นโดยใช้ DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959) และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951) เพื่อกำหนดค่าการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity)

8. การศึกษาค่าพีเอช (pH) และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนส

นำเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ที่เตรียมได้จากเชื้อลูกผสมทั้ง 4 ชนิดมาบ่มร่วมกับสารตั้งต้น ได้แก่ CMC หรือ brichwood xylan (1% w/v) ที่ pH 3.0 –10.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น วัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller (1959) เมื่อทราบค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดนั้นจึงนำเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) บ่มร่วมกับสารตั้งต้นที่อุณหภูมิ 20 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดการทำงานของเอนไซม์ตามวิธีของ Miller (1959)

9. ทดสอบความสามารถในการย่อยเศษวัสดุทางการเกษตรในระดับห้องปฏิบัติการของแบคทีเรียลูกผสม

นำเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ที่เตรียมได้จากเชื้อลูกผสมทั้ง 4 ชนิดไปทดสอบความสามารถในการย่อยฟางข้าว และต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% (w/v) NaOH และระเบิดไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยบ่มเอนไซม์หยาบร่วมกับ 1% สารตั้งต้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยเงื่อนไขการทดสอบแสดงในตารางที่ 2 ทดสอบความสามารถในการย่อยโดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเศษวัสดุด้วยเอนไซม์ โดยใช้ DNS reagent (Miller, 1959) วัด ในวันที่ 0, 1, 3 และ 5

ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขการทดลองย่อยเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

เอนไซม์ที่ใช้ย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (w/v)	
BglC จาก reBglC	1 % ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	1 % ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ
BglC จาก reBglC_M	1 % ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	1 % ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ
XynA จาก reXynA	1 % ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	1 % ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ
XynA จาก reXynA_M	1 % ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	1 % ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ
BglC ร่วมกับ XynA จาก reBglC และ reXynA	1 % ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	1 % ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ
BglC ร่วมกับ XynA จาก reBglC_M และ reXynA_M	1 % ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	1 % ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ

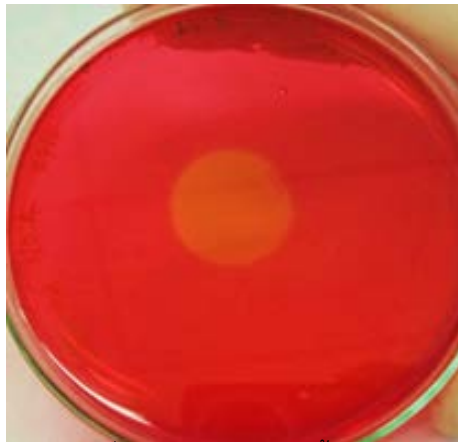
10. การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

เมื่อย่อยฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ (crude enzyme) เป็นเวลา 5 วัน ทำการเติม *Saccharomyces cerevisiae* V1116 และทำการบ่มหมักตลอดทดลองที่ใช้ในการหมักเอทานอลในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 5 วัน ทำการกรองของเหลวที่ได้จากการหมักผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 μ m เก็บของเหลวที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยวิธีเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีพร้อมตัวตรวจวัดชนิดฟเลมไอออไนเซชัน (Gas chromatography-flame ionization detector, GC-FID)

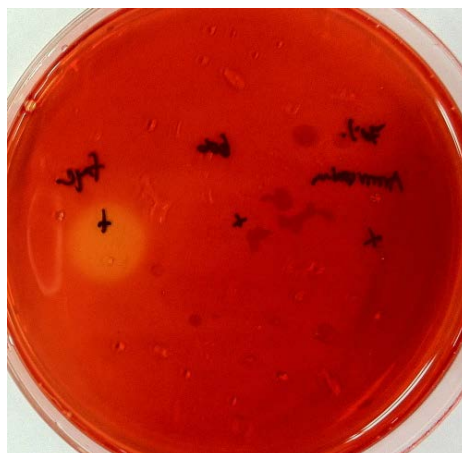
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสจากแหล่งต่างๆและการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์

จากการคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ จาวปลวก เส้นก๋วยเตี๋ยว กระเพาะหมักของวัว มูลของม้า ดินจากแปลงปลูกมันสำปะหลังและแปลงข้าวโพด โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 71 ไอโซเลท เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์เบื้องต้นด้วยวิธี Congo red plate assay พบเชื้อจำนวน 20 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้งสองชนิดโดยการสร้างเอนไซม์สามารถทดสอบได้จากการสร้างโซนใส (halo zone) ดังภาพที่ 1 จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีค่า H/C สูง (ความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นต่อขนาดของโคโลนีของเชื้อ) ไปทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยการวัด reducing sugar ซึ่งเป็นผลผลิตที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการย่อยสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียที่แยกจากจาวปลวกมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุด คือ 13.99 U/mg protein และแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลของม้ามีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด คือ 24.47 U/mg protein



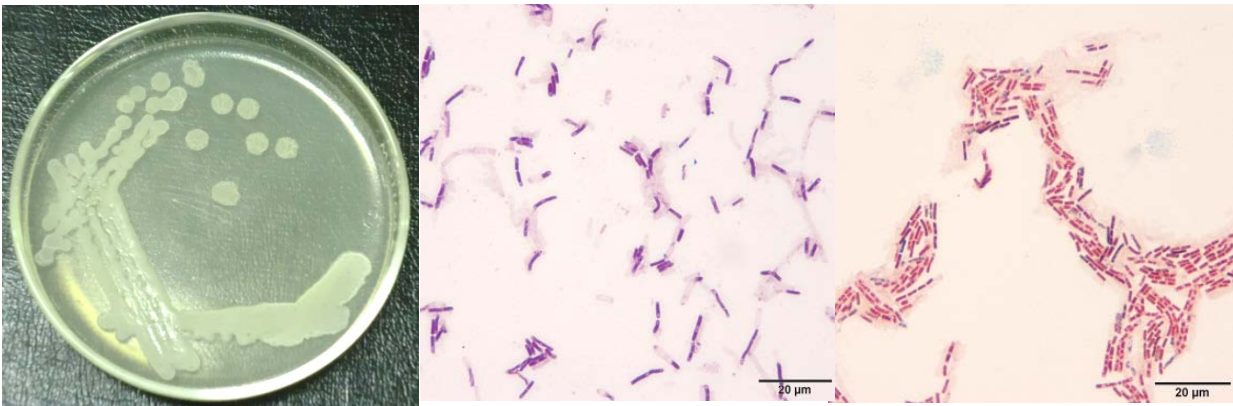
ภาพที่ 1 ลักษณะวงใส (halo zone) ที่เกิดจากการย่อยสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งที่มี 1% (w/v) ของ CMC เป็นองค์ประกอบ



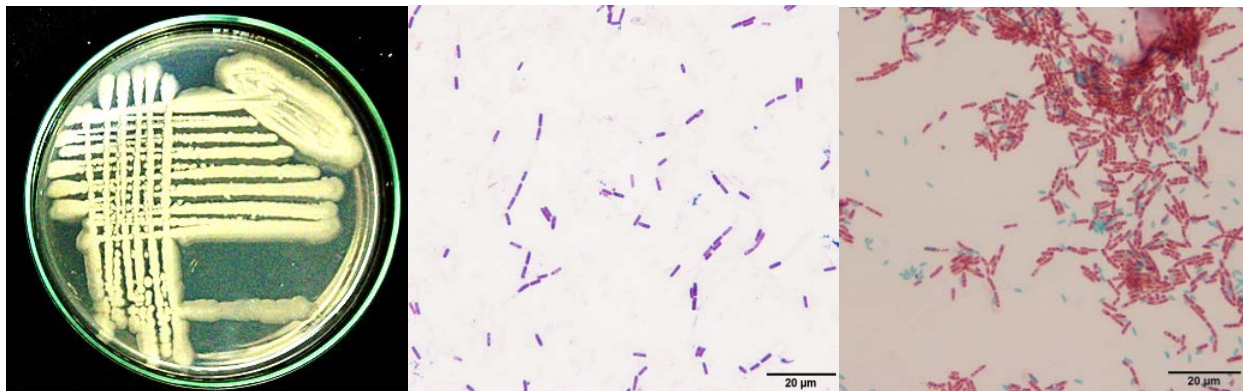
ภาพที่ 2 ลักษณะวงใส (halo zone) ที่เกิดจากการย่อยสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ไซลานเนสบนอาหารแข็งที่มี 1% ของ brichwood xylan เป็นองค์ประกอบ

2. บ่งบอกชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและการหาลำดับเบสของ 16S rDNA

นำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากจาวปลวกและมูลของม้าซึ่งมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสสูงที่สุดมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์ การติดสีแกรม และการสร้างสปอร์ พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากมูลของม้า หรือ ไอโซเลท H28 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ลักษณะการเรียงตัวอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ๆ สร้างสปอร์ โคโลนีสีขาวขุ่นค่อนข้างกลม ดังภาพที่ 3 จำแนกอยู่ในสกุล *Bacillus* ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากจาวปลวก หรือ ไอโซเลท T7 มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นทึบ ผิวขรุขระ ลักษณะเซลล์แบบท่อน ติดสีม่วง แกรมบวก สร้างสปอร์ ดังภาพที่4



ภาพที่ 3 จุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลของม้า (H28) ลักษณะโคโลนีกลม ขอบหยัก ผิวขรุขระ สีขาวขุ่นเข้ม ลักษณะเซลล์แบบท่อนสั้น ติดสีม่วง แกรมบวก สร้างสปอร์



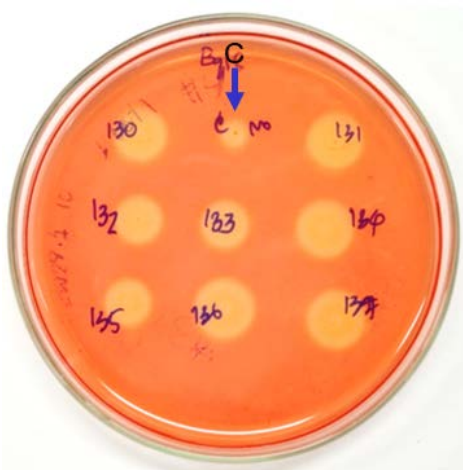
ภาพที่ 4 จุลินทรีย์ที่แยกได้จากจาวปลวก (T7) ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นทึบแสง ผิวขรุขระ ลักษณะเซลล์แบบท่อนสั้น ติดสีม่วง แกรมบวก สร้างสปอร์

จากผลการการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ ไอโซเลท H28 และ T7 พบว่าทั้งสองไอโซเลทอยู่ในสกุล *Bacillus* จึงทำการบ่งบอกชนิดของทั้งสองไอโซเลทโดยใช้การสกัด Genomic DNA ตามวิธีของ Ifakut (2005) เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการ

เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ไพร์เมอร์ที่ใช้ คือ universal primers; 16SF: 5'-AGT TTG ATC CTG GCT C-3' และ 16SR: 5'-GGC TAC CTT GTT ACG A-3' จากนั้นเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์จากเจล และเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์กับพลาสมิด pTZ57R/T เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA โดยวิธี dideoxynucleotide chain termination method (Sanger *et al.*, 1997) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลพบว่า ไอโซเลท H28 มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* ถึงร้อยละ 99 (accession no. NR_075005.1) และ ไอโซเลท T7 มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (accession no. NR_102783.1)

3. การชักนำการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกโดยพลาสมาพลังงานต่ำ PIII (Plasma immersion ion implantation หรือ PIII)

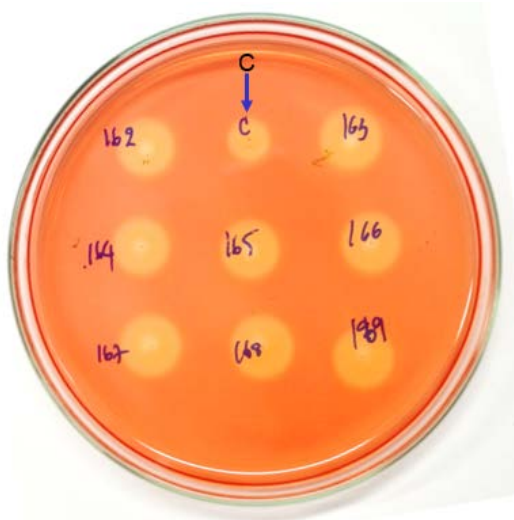
เมื่อระดมยิงเชื้อไอโซเลท H28 และ T7 ด้วยอาร์กอนหรือไนโตรเจนพลาสมาโดยใช้แรงดันไบแอสในช่วงพลังงานที่ 2.5 kV และความหนาแน่นของไอออนในช่วง 1×10^{15} to 1×10^{17} ions/cm² จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและไฮลาเนสที่ดีกว่าแบคทีเรียชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการระดมยิงจากการเปรียบเทียบค่า H/C และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ แบคทีเรียพันธุ์กลายส่วนมากพบเมื่อระดมยิงเชื้อทั้งสองไอโซเลทด้วยพลาสมาของอาร์กอน (Ar-PIII) ที่ช่วงความหนาแน่นไอออน 1×10^{16} ions/cm² โดยในการทดลองนี้จะทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียพันธุ์กลายของยีนเซลลูเลสจากไอโซเลท H28 เนื่องจากเป็นไอโซเลทที่ให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) ของเซลลูเลสสูงที่สุดจากผลการทดลองพบว่าค่า H/C ของแบคทีเรียที่ผ่านการระดมยิงด้วยพลาสมามีความผันแปรโดยมีทั้งไอโซเลทที่มีค่า H/C ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (H/C = 1.05 ± 0.09) และไอโซเลทที่ให้ค่า H/C สูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 5 โดยค่า H/C ของแบคทีเรียชุดควบคุมหรือไอโซเลท H28 คือ 1.43 ± 0.08 ส่วนไอโซเลทที่ให้ค่า H/C สูงที่สุดนั้นมีค่ามากกว่าชุดควบคุมถึงสองเท่า คือ 3.12 ± 0.24 จึงตั้งชื่อแบคทีเรียพันธุ์กลายที่คัดเลือกไปใช้ต่อไปว่า H28_M



ภาพที่ 5 แสดงการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงขึ้น โดยผ่านการระดมยิงด้วยอาร์กอนพลาสมา (Ar-PIII) ที่ช่วงความหนาแน่นไอออน 1×10^{16} ions/cm² ทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยการย้อมเพลทอาหารแข็งด้วย 0.1% congo red โดยที่ C (ลูกศรสีน้ำเงิน) คือ แบคทีเรียไอโซเลท H28 ชุดควบคุม (ไม่ผ่านการระดมยิง) ส่วนหมายเลขอื่นคือแบคทีเรียที่ผ่านการระดมยิง บริเวณใส (halo zone) แสดงถึงประสิทธิภาพการย่อย

สารตั้งต้น (CMC) ขนาดของบริเวณใสที่มีค่ามากเมื่อเทียบกับขนาดของโคโลนีแบคทีเรีย แสดงถึงเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานที่สูงขึ้น

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไซลานเนสนั้นได้ทำโดยการระดมยิง ไอโซเลท T7 เนื่องจากเป็นไอโซเลทที่ให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) ของไซลานเนสสูงที่สุด จากผลการทดลองพบว่าค่า H/C ของแบคทีเรียที่ผ่านการระดมยิงด้วยพลาสมามีความผันแปรเช่นเดียวกับการทดลองการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของไอโซเลท H28 ในการทดลองนี้พบไอโซเลทที่มีค่า H/C ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม โดยค่า $H/C = 1.13 \pm 0.11$ และไอโซเลทที่ให้ค่า H/C สูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 6 โดยค่า H/C ของแบคทีเรียชุดควบคุมหรือไอโซเลท T7 คือ 1.29 ± 0.09 ส่วนไอโซเลทที่ให้ค่า H/C สูงที่สุดนั้นมีค่า H/C คือ 2.80 ± 0.17 จึงตั้งชื่อแบคทีเรียพันธุ์กลายที่คัดเลือกไปใช้ต่อไปว่า T7_M



ภาพที่ 6 แสดงการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไซลานเนสที่สูงขึ้น โดยผ่านการระดมยิงด้วยอาร์กอนพลาสมา (Ar-PIII) ที่ช่วงความหนาแน่นไอออน 1×10^{16} ions/cm² ทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ด้วยการย้อมเพลทอาหารแข็งด้วย 0.1% congo red โดยที่ C (ลูกศรสีน้ำเงิน) คือ แบคทีเรียไอโซเลท T7 ชุดควบคุม (ไม่ผ่านการระดมยิง) ส่วนหมายเลขอื่นๆคือแบคทีเรียที่ผ่านการระดมยิง บริเวณใส (halo zone) แสดงถึงประสิทธิภาพการย่อยสารตั้งต้น (brichwood xylan) ขนาดของบริเวณใสที่มีค่ามากเมื่อเทียบกับขนาดของโคโลนีแบคทีเรีย แสดงถึงเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานที่สูงขึ้น

เมื่อนำแบคทีเรียชุดควบคุม (H28 และ T7) และแบคทีเรียพันธุ์กลาย (H28_M และ T7_M) มาทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยการวัด reducing sugar ที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยสารตั้งต้นพบว่า H28_M มี specific activity ของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 36.13 U/mg protein สูงกว่าไอโซเลท H28 ถึง 1.5 เท่า ส่วน ไอโซเลท T7_M มี specific activity ของไซลานเนสเท่ากับ 38.81 U/mg protein ซึ่งสูงกว่าไอโซเลท T7 ถึง 2.8 เท่า

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Cloning) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างโปรตีนเซลลูเลส (BglC) และไซลานเนส (XynA)

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียไฮโซเลท T7 และ H28 พบว่า มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* ตามลำดับ จึงทำการเพิ่มปริมาณของยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส หรือ endoglucanases (BglC) และไซลานเนส (endoxylanase) เนื่องจากเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้ในการย่อยเศษวัสดุทางการเกษตร โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการจากลำดับเบสของยีนในฐานข้อมูล GenBank (รายละเอียดของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1) และแทรกยีนเข้าไปใน expression vector คือ pETDuet-1 และส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมนี้เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E. Coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่ต้องการในปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่อไป ซึ่งเซลล์ที่ได้รับการส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าไปแล้วจะเรียกว่าเซลล์ลูกผสม โดย

เซลล์ลูกผสมที่มียีน endoglucanase จากไฮโซเลท H28 เรียกว่า reBglC

เซลล์ลูกผสมที่มียีน endoglucanase จากไฮโซเลท H28_M เรียกว่า reBglC_M

เซลล์ลูกผสมที่มียีน endoxylanase จากไฮโซเลท T7 เรียกว่า reXynA

เซลล์ลูกผสมที่มียีน endoxylanase จากไฮโซเลท T7_M เรียกว่า reXynA_M

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน BglC จาก reBglC และ reBglC_M พบว่ายีน endoglucanase จากเซลล์ลูกผสมทั้ง 2 ชนิด มี open reading frame ยาว 1,416 คู่เบส และมีการเปลี่ยนแปลง (กลายพันธุ์) ของลำดับเบสเพียง 1 ตำแหน่ง จากเบส A เปลี่ยนเป็นเบส G ที่บริเวณด้านปลาย 3' เมื่อทำการแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงไป 1 ตำแหน่งจาก lysine เป็น glutamic acid ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 370 (K370E) ดังภาพที่ 7 เมื่อทำการวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) ของ endoglucanase จากเซลล์ลูกผสมทั้ง 2 ชนิด โดยโปรแกรม CAZY (CAZY classification (<http://www.cazy.org/>) และทำเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่าเอนไซม์ endoglucanase ประกอบไปด้วยสองส่วนหลักคือ active site และ cellulose binding module (CBM) ตามภาพที่ 8

reBglC	MAGTKTPAAKNGQLSIKGTQLVNRDGGKAVQLKGISSHGLQWYGDFVNKDSLKWLRDDWGI 60
reBglC_M	MAGTKTPAAKNGQLSIKGTQLVNRDGGKAVQLKGISSHGLQWYGDFVNKDSLKWLRDDWGI 60

```

*****
reBglC      TVFRAAMYTADGGYIDNPSVKNKVKEAVEAAKELGIYVIIDWHILNDGNPNQHKEKAKEF 120
reBglC_M    TVFRAAMYTADGGYIDNPSVKNKVKEAVEAAKELGIYVIIDWHILNDGNPNQHKEKAKEF 120
*****

reBglC      FKEMSSLYGNTPNVIYEIANEPNGDVNWKRDIKPYAEEVISVIRKNDPDNIIIVGTGTWS 180
reBglC_M    FKEMSSLYGNTPNVIYEIANEPNGDVNWKRDIKPYAEEVISVIRKNDPDNIIIVGTGTWS 180
*****

reBglC      QDVNDAADDQLKDANVMYALHFYAGTHGQSLRDKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASGNGG 240
reBglC_M    QDVNDAADDQLKDANVMYALHFYAGTHGQSLRDKANYALSKGAPIFVTEWGTSDASGNGG 240
*****

reBglC      VFLDQSREWLNYLDSKNISWVNWNLSDKQEASSALKPGASKTGGWPLDLTASGTFVREN 300
reBglC_M    VFLDQSREWLNYLDSKNISWVNWNLSDKQEASSALKPGASKTGGWPLDLTASGTFVREN 300
*****

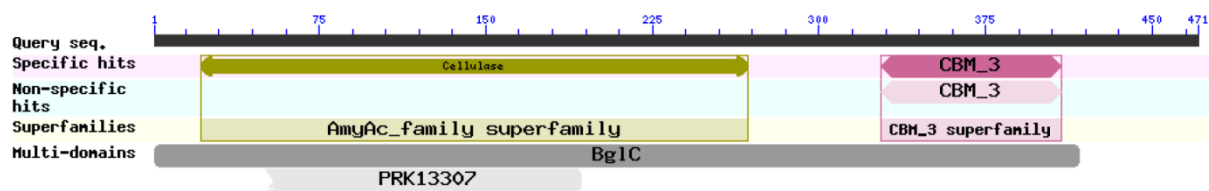
reBglC      ILGSKDSTKERPETPAQDNPAQENGISVQYKAGDGGVNSNQIRPQLHIKNNGNTTVDLKD 360
reBglC_M    ILGSKDSTKERPETPAQDNPAQENGISVQYKAGDGGVNSNQIRPQLHIKNNGNTTVDLKD 360
*****

reBglC      VTARYWYNAENKKGQNYDCDYAQIGCGNLIHKFAALHKPKQGADTYLELGFKTGTLSPGAS 420
reBglC_M    VTARYWYNAENKKGQNYDCDYAQIGCGNLIHKFAALHKPKQGADTYLELGFKTGTLSPGAS 420
*****

reBglC      TGNIQRLRLHNDWSNYAQSGDYFFQSNTFKTTKKITLYHQGLIWGTEPH- 471
reBglC_M    TGNIQRLRLHNDWSNYAQSGDYFFQSNTFKTTKKITLYHQGLIWGTEPH- 471
*****

```

ภาพ 7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน endoglucanase จาก reBglC และ reBglC_M โดยโปรแกรม Clustal Omega ลูกศรสีแดงบ่งชี้ถึงลำดับอะมิโนที่เปลี่ยนไปของ reBglC_M (K370E) ซึ่งอยู่ในส่วนบริเวณ CBM



ภาพ 8 ส่วนประกอบหลักของเอนไซม์ endoglucanase ซึ่งประกอบไปด้วยสองส่วนหลัก คือ active site และ CBM

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *XynA* จาก reXynA และ reXynA_M พบว่ายีน endoxylanase จากเซลล์ลูกผสมทั้ง 2 ชนิด มี open reading frame ยาว 462 คู่เบส เมื่อทำการแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงไป 1 ตำแหน่งจาก threonine เป็น serine ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 162 (S162T) ดังภาพที่ 9 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า มีความคล้ายคลึงกับยีน 1, 4-beta-xylanase A ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ถึงร้อยละ 99 (accession no. WP_014477026.1) โดยเอนไซม์ 1,4-beta-xylanase A อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ glycol hydro 11 superfamily ดังภาพที่ 10

```

reXynA      MFKFKKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60

```

```

reXynA_M      MFKFKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASTDYWNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN  60
*****

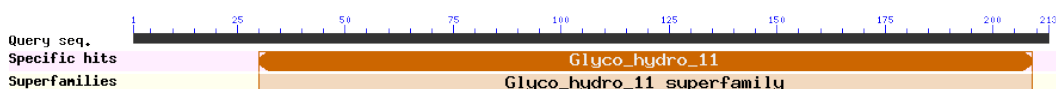
reXynA      TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVDSWGTYPRTG  120
reXynA_M    TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVDSWGTYPRTG  120
*****

reXynA      TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRITFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA  180
reXynA_M    TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRITFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNA  180
*****

reXynA      WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW  213
reXynA_M    WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW  213
*****

```

ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน endoxylanase จาก reXynA และ reXynA_M โดยโปรแกรม Clustal Omega ลูกศรสีแดงบ่งชี้ถึงลำดับอะมิโนที่เปลี่ยนไปของ reXynA_M (S162T)



ภาพที่ 10 ส่วนประกอบหลักของเอนไซม์ 1,4-beta-xylanase

5. การชักนำให้เกิดการแสดงออกที่มากขึ้นของยีนเซลลูเลส (*BglC*) และไซลานเนส (*XynA*) โดยการส่งถ่ายยีนเพื่อแสดงออกใน *E. Coli* สายพันธุ์ BL21

5.1 ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) จากแบคทีเรียลูกผสม

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลูกผสมทั้ง 4 ชนิดได้แก่ แบคทีเรียลูกผสมที่มียีนเซลลูเลส (*reBglC*) แบคทีเรียลูกผสมที่มียีนเซลลูเลสที่กลายพันธุ์ (*reBglC_M*) แบคทีเรียลูกผสมที่มียีนไซลานเนส (*reXynA*) และแบคทีเรียลูกผสมที่มียีนไซลานเนสที่กลายพันธุ์ (*reXynA_M*) ในอาหารเหลว LB และชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโดยการเติม IPTG จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเกี่ยวเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) และทดสอบความสามารถในการย่อยสารตั้งต้น CMC และ birchwood xylan เมื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นและปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ แล้วคำนวณค่า specific activity ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียลูกผสม *reBglC* มีความสามารถในการย่อยสารตั้งต้นได้แก่ CMC มีค่า specific activity เป็น 30.92 U/mg protein และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสารตั้งต้น CMC กับ *B. amyloliquefaciens* (wild type) พบว่ามีค่า specific activity มากกว่าถึง 1.3 เท่า นอกจากนั้นการทดสอบความสามารถในการย่อยสารตั้งต้น birchwood xylan พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียลูกผสม *reXynA* มีความสามารถในการย่อยสารตั้งต้น birchwood xylan ได้ โดยมีค่า specific activity เท่ากับ 53.60 U/mg protein ซึ่งมีความมากกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* ถึง 3.8 เท่า แต่เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสารตั้งต้น ระหว่างเอนไซม์ *BglC* ที่ผลิตจาก *reBglC_M* แล้วพบว่า specific activity เท่ากับ 161.78 U/mg protein ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *reBglC* ถึง 5.2 เท่า ในขณะที่ เอนไซม์ *XynA* ที่ผลิตจาก *reXynA_M* มีค่า specific activity เท่ากับ 674.24 U/mg protein ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *reXynA* ถึง 12.6 เท่า จากผลการทดลองข้างต้นนั้นแสดงถึงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ *BglC* และ *XynA* ด้วยเทคนิคการโคลนยีน โดยนำยีนที่ต้องการให้ทำงานภายใต้ strong promoter แสดงออกในเซลล์แบคทีเรียใหม่เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่เป็น wild type แบคทีเรียตัว

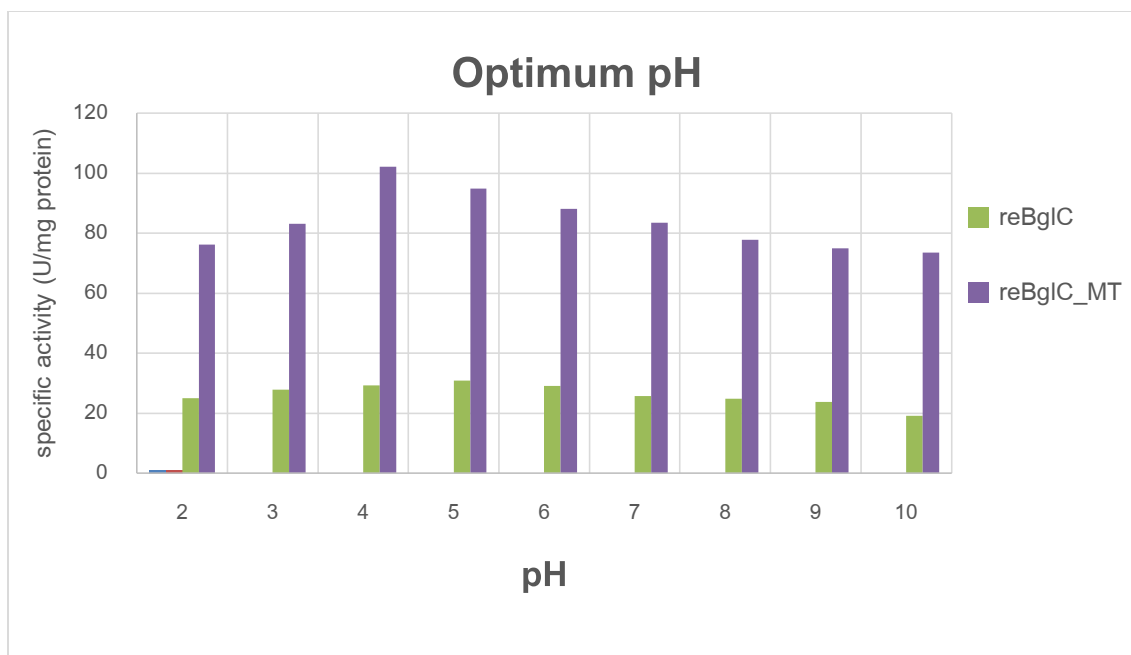
ใหม่หรือแบคทีเรียลูกผสมนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมรวมถึงการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการต่างๆ เช่น การผลิตไบโอเอทานอล การผลิตกระดาษ การผลิตอาหารหมักสำหรับสัตว์ เป็นต้น

ตารางที่ 3 กิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียลูกผสม reBglC, reBglC_M, reXynA และ reXynA_M

แบคทีเรียลูกผสม	Specific activity (Unit/mg protein)
reBglC	30.92
reBglC_M	161.78
reXyn	53.60
reXynA_M	674.24

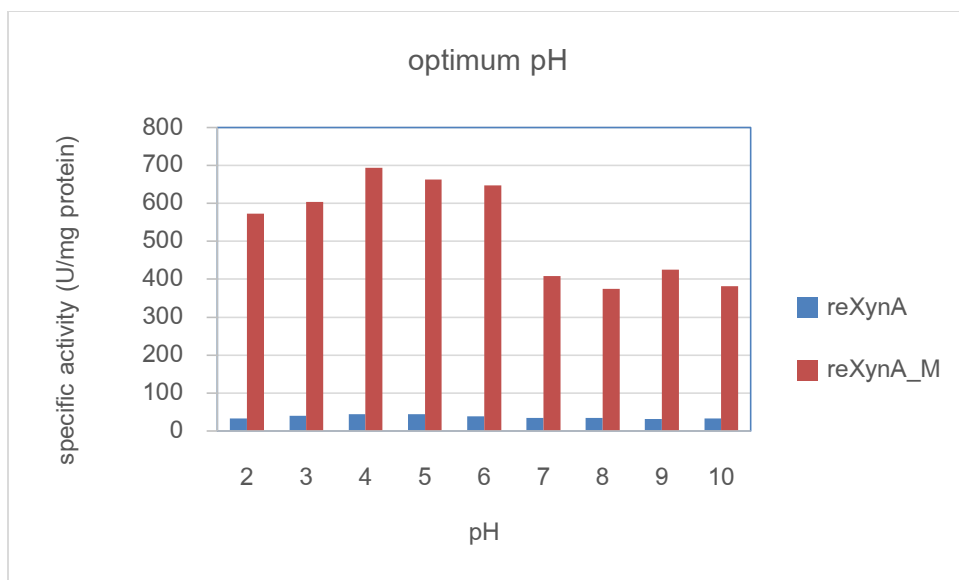
5.2 การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ BglC และ XynA

การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ BglC และ XynA จากแบคทีเรียลูกผสมทั้ง 4 ชนิด ทำโดยการนำเอนไซม์ที่เตรียมได้บ่มรวม กับ 1 % CMC และ 1 % brichwood xylan พีเอช 3.0 –10.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยในปฏิกิริยาโดยวิธี DNS method (Miller, 1959) จากนั้นคำนวณค่า enzyme activity และ specific activity ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11 พบว่า เอนไซม์ BglC จาก reBglC_M ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.0 ซึ่งมีและมี specific activity สูงกว่าเอนไซม์ BglC จาก reBglC ทั้งนี้ pH ที่เหมาะสมแก่การทำงานของ reBglC_M เปลี่ยนจาก pH 5 เป็น pH 4 การเปลี่ยนแปลงนี้น่าจะเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* โดยการระดมยิงด้วยพลาสมาพลังงานต่ำส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก lysine เป็น glutamic acid ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 370 (K370E) จากการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนพบว่าบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงนั้นอยู่ในส่วนของ CBM ที่ทำหน้าที่ยึดเอนไซม์กับสารตั้งต้นที่ต้องการย่อย การที่เอนไซม์ที่เกิดการกลายพันธุ์นั้นมีประสิทธิภาพในการทำงานที่ดีกว่าเดิมอาจเกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงค่า electrostatic เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนจากหมู่ที่เป็นขั้วบวก (Lysine) เป็นหมู่ที่มีขั้วลบ (Glutamic acid) ซึ่งน่าจะส่งผลให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมการทำงานที่สูงขึ้น (Santos *et al.*, 2012) จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ BglC จากเซลล์ลูกผสมทั้งสองชนิดสามารถทำงานได้ดีในช่วงกว้าง (pH 2- 10) จึงเป็นเอนไซม์ที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งานต่อไปในหลายด้าน



ภาพที่ 11 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ BgIC

จากการทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ XynA จากเซลล์ลูกผสม reXynA และ reXynA_M ให้ผลการทดลองดังภาพที่ 12 เอนไซม์ XynA จาก reXynA_M ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.0 ซึ่งมี specific activity สูงกว่าเอนไซม์จาก reXynA การเปลี่ยนแปลงนี้น่าจะเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อ *B. subtilis* โดยการระดมยิงด้วยพลาสมาพลังงานต่ำส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก threonine เป็น serine ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 162 (S162T) จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ XynA จากเซลล์ลูกผสมสามารถทำงานได้ดีในช่วงกว้าง (pH 2- 6) อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จาก reXynA_M จะลดลงไปประมาณ 40 % เมื่อ pH สูงกว่า 7 แต่ยังสามารถทำงานได้จนถึง pH 10 ในช่วงพีเอชที่สูงหรือต่ำมากกิจกรรมเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์จะลดลงอาจเป็นผลมาจากการที่โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพโดยเฉพาะบริเวณตัวเร่งหรืออาจมีประจุบนโปรตีนเปลี่ยนแปลงจนไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ (Li et al., 2008)

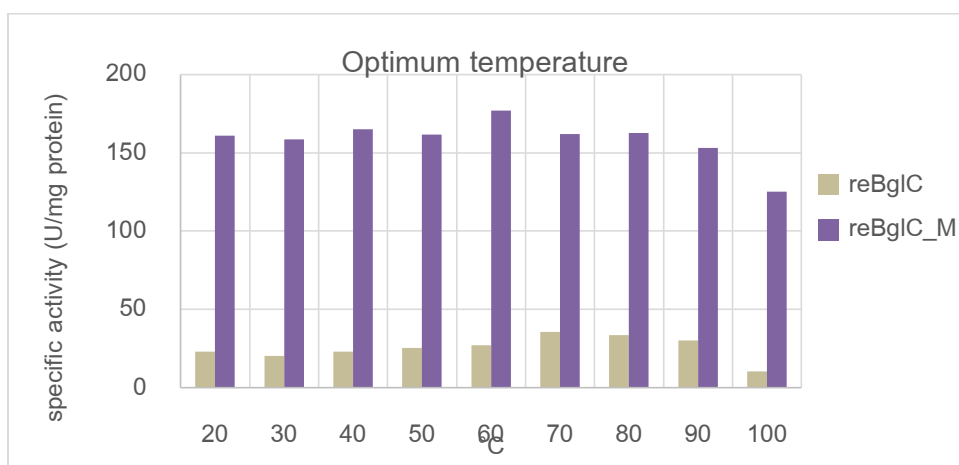


ภาพที่12 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ XynA

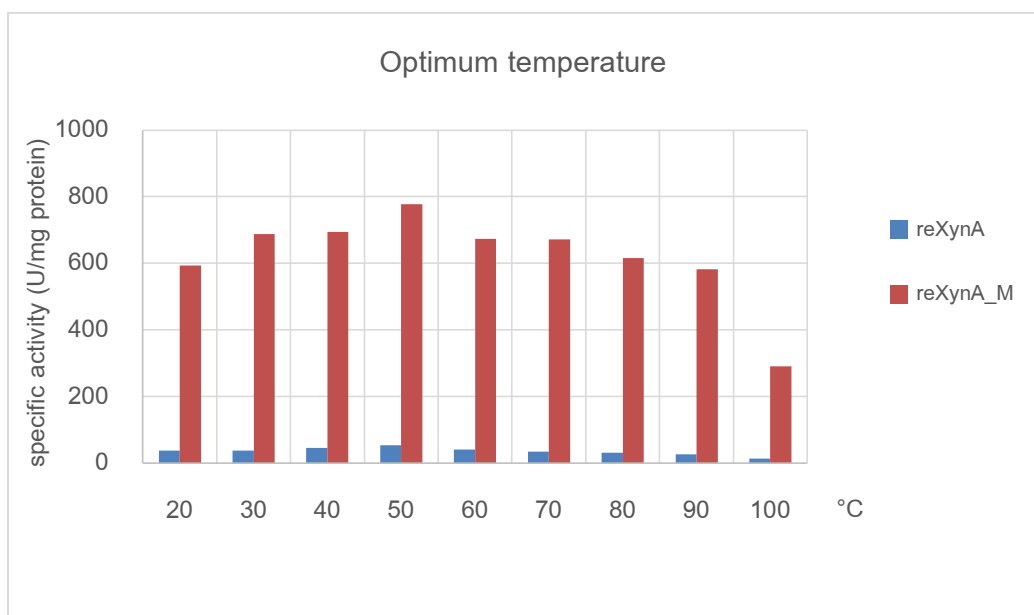
5.3 การศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ BglC และ XynA

การศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ BglC และ XynA จากแบคทีเรียลูกผสมทั้ง 4 ชนิด ทำโดยการนำเอนไซม์ที่เตรียมได้บ่มรวม กับ 1 % CMC และ 1 % brichwood xylan ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อวัดการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ BglC จาก reBglC_M มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีค่า specific activity เท่ากับ 167.94 U/ mg protein และสามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิสูงโดยมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงถึง 70 % ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 13 ซึ่งเอนไซม์ BglC นี้มีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์จากเชื้อ *Mucor circinelloides* (55 องศาเซลเซียส) (Saha, 2004) , *B. amyloliquefaciens* DL-3 (50 องศาเซลเซียส) (Lee *et al.*, 2008), *B. subtilis* DR (40 องศาเซลเซียส) (Wang Li *et al.*, 2008), *B. subtilis* CEL PTK1 (30 องศาเซลเซียส) (Sarawati *et al.*, 2012), แต่มีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* strains RH68 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส (Mawadza *et al.*, 2000) และ จากเชื้อ *B. subtilis* ที่แยกได้จาก *Archachatina marginata* ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Oyeleke *et al.*, 2012) การศึกษาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ XynA พบว่าเอนไซม์ทำงานดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ไซลเนสที่ผลิตจาก *B. subtilis* ASH (Ashwani *et al.*, 2009), *B. licheniformis* A99 (Archana *et al.*, 2003), *Bacillus* sp. strain SPS-O (Blanco *et al.*, 1995), *Bacillus* sp. CCM1966 (Sa-Pereira *et al.*, 2000) และ *Bacillus* sp. Strain K-1 (Virupakshi *et al.*, 2005)

ทั้งนี้ XynA สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 20 - 90 องศาเซลเซียส โดยมีประสิทธิภาพในการทำงานมากกว่า 75 % ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ดังแสดงภาพที่ 14 จากการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์ที่เกิดการกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดที่ผลิตจากแบคทีเรียลูกผสมมีคุณสมบัติที่จะสามารถนำไปประโยชน์ในด้านต่างๆได้ โดยเฉพาะกระบวนการย่อยที่ต้องทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง หรือในสภาวะแวดล้อมที่อุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลง เช่น การผลิตไบโอเอทานอล การผลิตกระดาษ สิ่งทอต่างๆ และการย่อยเศษวัสดุเหลือใช้จากห้องปฏิบัติการ



ภาพที่13 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ BglC

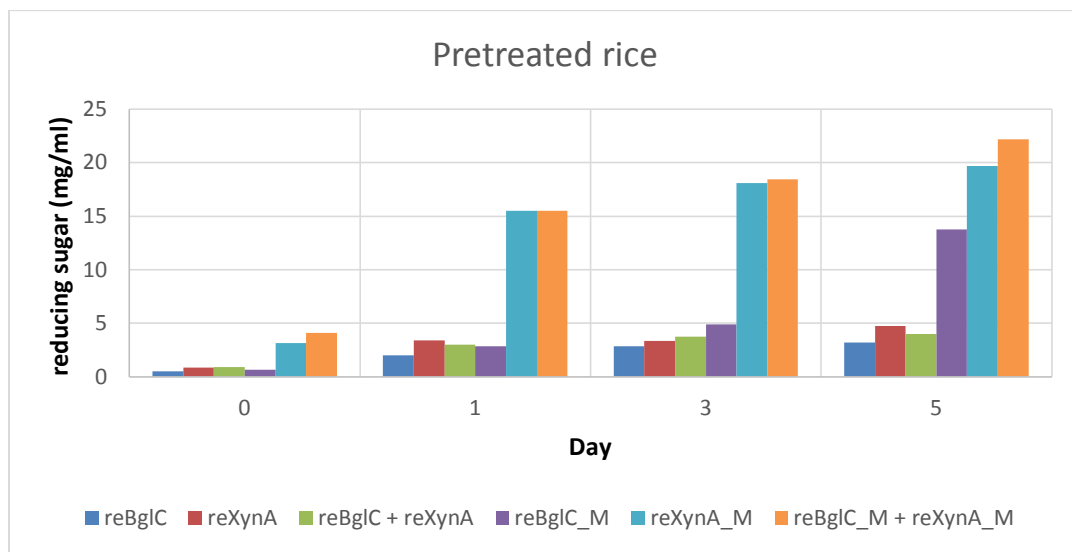


ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ XynA

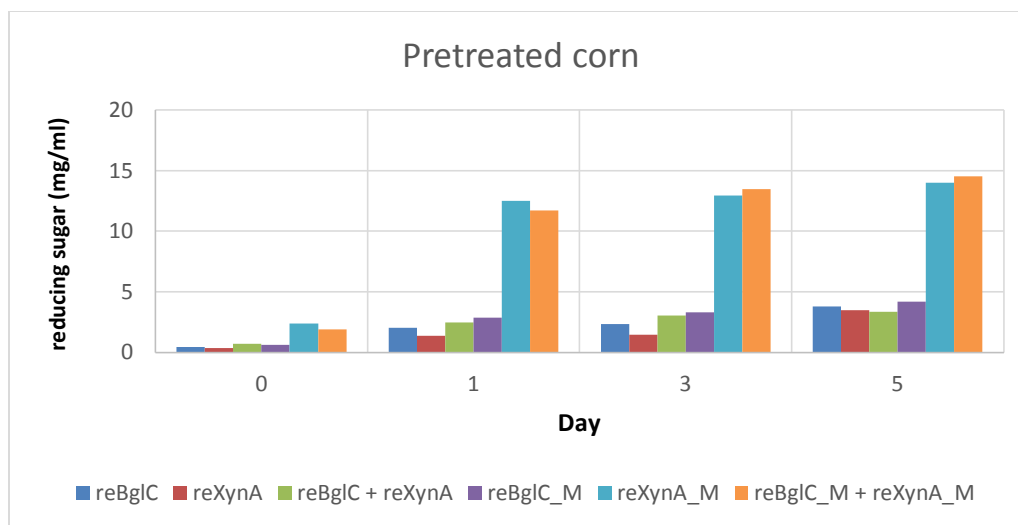
6. การทดสอบความสามารถในการย่อยเศษวัสดุทางการเกษตรของเอนไซม์ BglC และ XynA

ทำการทดลองย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เอนไซม์ BglC และ XynA จากแบคทีเรียลูกผสมทั้ง 4 ชนิด และทำการทดลองใช้เอนไซม์ BglC และ XynA ร่วมกันเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (เงื่อนไขการทดลองแสดงในตารางที่ 2) โดยได้บ่มวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 2% (w/v) NaOH และระเบิดไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยบ่มเอนไซม์ร่วมกับ 1% สารตั้งต้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทดสอบความสามารถในการย่อยโดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเศษวัสดุด้วยเอนไซม์ โดยใช้ DNS reagent (Miller,1959) เมื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 0, 1, 3 และ 5 พบว่าฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในวันที่ 5 ดังภาพที่ 15 โดยเงื่อนไขที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ ใช้เอนไซม์ BglC ร่วมกับ XynA ที่

เตรียมจาก reBglC_M และ reXynA_M โดยค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในวันที่ 5 มีค่า 22.16 mg/ml รองลงมาคือ การย่อยฟางข้าวด้วย XynA จาก reXynA_M และ BglC จาก reBglC_M โดยวัดน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 19.67 mg/ml และ 13.76 mg/ml ตามลำดับ การย่อยต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วนั้นพบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ BglC ร่วมกับ XynA จาก reBglC_M และ reXynA_M ให้ผลดีที่สุดโดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในวันที่ 5 คือ 14.51 mg/ml และการย่อยด้วย XynA จาก reXynA_M ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 13.98 mg/ml ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์ที่ผลิตแบบที่เรียกลูกผสม reBglC, reBglC_M, reXynA และ reXynA_M



ภาพที่ 16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์ที่ผลิตแบคทีเรียลูกผสม reBglC, reBglC_M, reXynA และ reXynA_M

จากผลการทดลองพบว่าทั้งเอนไซม์ BglC และ XynA สามารถย่อยสารตั้งต้นลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไอน้ำและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้ อาจเป็นผลมาจากการที่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ถูกปรับสภาพแล้วทำให้โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลงไป โดยมีรายงานการวิจัยที่พบว่าหลังกระบวนการปรับสภาพลิกนินที่อยู่ในโครงสร้างจะถูกกำจัดออกไป และลักษณะพื้นผิวของตัวอย่างหลังจากการปรับสภาพแล้วมีการแยกออกและเกิดโพรงช่องว่างขึ้น ทำให้เอนไซม์จากแบคทีเรียสามารถเข้าไปย่อยโครงสร้างภายในได้ดีขึ้น (ธีระ, 2556) และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ BglC และ XynA มีความสามารถในการย่อยฟางข้าวและต้นข้าวโพด ซึ่งเป็นของเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่มากในประเทศไทย และสามารถนำเอนไซม์นี้ไปต่อยอดการใช้ประโยชน์ เช่น การผลิตไบโอเอทานอล ที่ต้องการเปลี่ยนสารตั้งต้นลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลก่อนที่จะอาศัยจุลินทรีย์กลุ่มอื่น เช่น ยีสต์ ในการเปลี่ยนน้ำตาลนั้นเป็นเอทานอลต่อไป

7. การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

เมื่อย่อยฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์หยาบ(crude enzyme) พบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมกันสองชนิด คือ BglC และ XynA จากแบคทีเรียลูกผสม reBglC_M และ reXynA_M ให้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดในวันที่ 5 จากนั้นทำการเติมยีสต์ *S.cerevisiae* V1116 เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์นี้เป็นเอทานอล และทำการบ่มหมักทดลองที่ใช้ในการหมักเอทานอลในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 5 วัน ทำการกรองของเหลวที่ได้จากการหมักผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 μ M เก็บของเหลวที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีพร้อมตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออนเซชัน (Gas chromatography-flame ionization detector, GC-FID) ผลของปริมาณเอทานอลที่ตรวจวัดได้พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการหมักสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดถึง 9.62 % v/v ในขณะที่การใช้ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นสารตั้งต้นสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด 3.5% v/v เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ BglC และ XynA ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว ซึ่งให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์แบบเดิมประมาณ 1.7 เท่า ในส่วนของการผลิตเอทานอลจากต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพนั้น เมื่อย่อยต้นข้าวโพดด้วยเอนไซม์ BglC และ XynA ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วสามารถผลิตเอ

นอลได้สูงที่สุด 3.23% v/v เมื่อหมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* V1116 การผลิตเอทานอลโดยใช้เงื่อนไขต่างๆ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักสารตั้งต้นในแต่ละเงื่อนไข

เงื่อนไขที่ใช้ในการหมัก	ปริมาณเอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร)		
	น้ำตาลกลูโคส	ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	ต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ
เอนไซม์จาก reBglC + reXynA + <i>S.cerevisiae</i> V1116	8.87±0.27	2.09±0.15	2.25±0.15
เอนไซม์จาก reBglC_M + reXynA_M + <i>S.cerevisiae</i> V1116	9.62±0.42	3.5±0.21	3.23±0.06

สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้ PIII ในการชักนำให้แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ *B.subtilis* ให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (BglC) และไซลานเนส (XynA) จากนั้นได้ใช้เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนทั้งสองโดยแทรกยีนเข้าไปใน expression vector (pETDuet-1) และส่งถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมนี้เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน *E. Coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่ต้องการในปริมาณมากและทำการศึกษพบว่าเซลล์ลูกผสมที่ได้รับยีน BglC และ XynA ที่กลายพันธุ์มีประสิทธิภาพการทำงานที่สูงกว่าเอนไซม์แบบปกติตลอดช่วงอุณหภูมิและค่า pH โดย BglC จาก reBglC_M มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีค่า specific activity เท่ากับ 167.94 U/ mg protein และสามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิสูงโดยยังคงประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์มากกว่า 70 % ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส XynA จาก reXynA_M สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 20 - 90 องศาเซลเซียส โดยมีประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์มากกว่า 75 % ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส การศึกษาการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้แก่ ฟางข้าวและต้นข้าวโพดนั้นพบว่าการใช้เอนไซม์สองชนิดทำงานร่วมกันมีประสิทธิภาพในการย่อยสูงที่สุด โดยเอนไซม์ BglC และ XynA จากเซลล์ลูกผสม reBglC_M และ reXynA_M ย่อยฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้ผลของน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 22.16 และ 14.51 mg/ml ตามลำดับเมื่อผลิตเอทานอลจากฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพโดยใช้ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* V1116 ในกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากฟางข้าวและต้นข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้ผลเท่ากับ 3.50 % (ปริมาตร/ปริมาตร) และ 3.23 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ถึงสาเหตุที่ทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงขึ้นโดยการเปรียบเทียบลำดับของเบสอะคริโดมีโนพบว่าลำดับของกรดอะมิโนของ BglC ที่กลายพันธุ์ได้มีการเปลี่ยนแปลงไป 1 ตำแหน่ง

จาก lysine เป็น glutamic acid ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 370 (K370E) ซึ่งเป็นส่วนของ cellulose binding module (CBM) และ XynA จากที่กลายพันธุ์จากโอโซเลท T7 มีลำดับกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงไป 1 ตำแหน่งจาก threonine เป็น serine ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 162 (S162T) ซึ่งกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนั้นอยู่นอก active site ทั้งคู่ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในครั้งนี้เป็นการค้นพบใหม่เกี่ยวกับการกลายพันธุ์หรือเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนอกบริเวณ active site แล้วทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูงขึ้น

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้การศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

1. ควรมีการทดสอบเปรียบเทียบชนิดหรือปริมาณยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอล
2. เปรียบเทียบปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ใช้ในการผลิตเอทานอล
3. ศึกษาโครงสร้างของโปรตีนที่เปลี่ยนไปจากการกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ต้องการศึกษาจาก lysine และ threonine เป็น alanine จากนั้นทำการวิเคราะห์โครงสร้างและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อีกครั้ง เพื่อความรู้ในเชิงลึกเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนนอกบริเวณ active site
4. เนื่องจากปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารตั้งต้นมีปริมาณน้อยและกระบวนการผลิตค่อนข้างซับซ้อนอาจทำให้ไม่คุ้มทุน จึงเสนอให้นำเชื้อแบคทีเรียหรือเอนไซม์พันธุ์กลายไปประยุกต์ใช้เกี่ยวกับการเกษตรทางด้านอื่น เช่นการทำอาหารหมักคุณภาพสูงสำหรับสัตว์ หรือผลิต prebiotics เช่น xylooligosaccharides (XOS), fructooligosaccharide (FOS) และ galactooligosaccharide (GOS) จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่นข้าวโพด

เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล 2545.

ธีระ ต๊ะคำ. การผลิตเอทานอลจากชีวมวลหลายชนิดที่ปรับสภาพด้วยไอน้ำและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ วิทยาศาสตร์
มหบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม) มหาวิทยาลัย เชียงใหม่.2557.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพมหานคร.

Archana, A. Satyanarayana, T. 2003. Purification and characterization of cellulase-free xylanase of a moderate
thermophile *Bacillus licheniformis* A99. World Journal of Microbiology and Biotechnology.19: 53-57.

Ashwani, S. Neelam, G. V.K. Gupta, A.M. Kuhad, A.C. 2009. One-step purification and characterization of
cellulase-free xylanase produced by alkalophilic *Bacillus subtilis* ash. Brazilian Journal of
Microbiology.41: 467-476.

Blanco, A. Vidal, T. Colom, J. Pastor, F.I.J. 1995. Purification and properties of xylanase A from alkali-
Bacillus sp. strain BP-23. Applied of Environment and Microbiology. 61: 4468-4470.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein
utilizing the principle of protein-dye binding. [Analytical Biochemistry](#) . 72: 248-254.

Immanuel, G. Bhagavath, C. M. A. Raj, P. I. Esakiraj, P. and Palavesam, A. 2007. Production and partial
purification of cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* fermented in coir waste and sawdust.
The Internet Journal of Microbiology. 3(1):1-12.

Lee, C.C. Kibblewhite-Accinelli, R.E. Smith, M.R. Wagschal, K. Orts, W.J. Wong, D.W.S. 2008. Cloning of *Bacillus*
licheniformis xylanase gene and characterization of recombinant enzyme. [Current Microbiology](#). 57:
301-305.

Mawadza, C. Rahni, H. Zvauya, R. and Bo, M. 2000. Purification and characterization of cellulases produced
by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnology. 83:177-187.

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

Oyeleke, S. B. Oyewole, O. A. Egwim, E. C. Dauda, B.E.N. and Ibeh, E. N. 2012. cellulase and pectinase
production potentials of *aspergillus niger* isolated from corn cob. Bayero Journal of Pure and Applied
Sciences. 5(1): 78 – 83.

Saha, B.C. 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of
Mucor circinelloides. *Process Biochemistry*: 39 (12): 1871-1876.

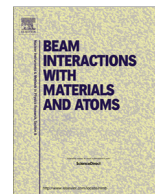
Sa-Pereira, P. Duarte, J. Costa-Ferreira, M. 2000. Electroelution as a simple and fast protein purification
method: isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCMI 966. *Enzyme Microbiology
and Technology*. 27: 95- 99.

- Santos CR, Paiva JH, Sforça ML, Neves JL, Navarro RZ, Cota J, Akao PK, Hoffmam ZB, Meza AN, Smetana JH, Nogueira ML, Polikarpov I, Xavier-Neto J, Squina FM, Ward RJ, Ruller R, Zeri AC, and Murakami MT.2012. Dissecting structure-function-stability relationships of a thermostable GH5-CBM3 cellulase from *Bacillus subtilis* 168. *Biochem. J.*, 441(1): 95-104.
- Saraswati, B. Ravi, K .Mukesh, K. Balashanmugam,M. Bala, K. Kalaichelvan, K. 2012. Cellulase Production by *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung. [Archives of Applied Science Research](#). 4 (1): 269-279.
- Virupakshi, K. Kyu, K.L. Tanticharoen, M. 2005. Purification and properties of a xylan- binding endoxylanase from alkalophilic *Bacillus* sp.strain K-1. *Applied Environment and Microbiology*. 65: 694-697.
- Wang, L. Xiajuan, H. Ying, Zhou. Qingyi, M. and Yulin, C. 2009. Simultaneous cloning and expression of two cellulase genes from *Bacillus subtilis* newly isolated from golden takin (*Budorcas taxicolor*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 383: 397– 400.

ภาคผนวก

การเผยแพร่ผลงาน

1. K. Sangwijit, J. Jitonnorn, S. Pitakrattananukool, L.D. Yu, S. Anuntalabhochai. Low-energy plasma immersion ion implantation modification of bacteria to enhance hydrolysis of biomass materials. Surface and Coatings Technology. 2016 ;306: 336-340. [IF : 2.589] (ISI)
2. K. Sangwijit, L.D. Yu, S. Sarapirom, S. Pitakrattananukool, S. Anuntalabhochai. Low-energy plasma immersion ion implantation to induce DNA transfer into bacterial E. coli. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms,. 2015 ;365: 389-393.[IF : 1.113] (ISI)



Low-energy plasma immersion ion implantation to induce DNA transfer into bacterial *E. coli*



K. Sangwijit^a, L.D. Yu^{b,c,*}, S. Sarapirom^{b,d}, S. Pitakrattananukool^e, S. Anuntalabhochai^{a,*}

^a Biotechnology Unit, University of Phayao, Muang, Phayao 56000, Thailand

^b Plasma and Beam Physics Research Facility, Department of Physics and Materials Science, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^c Thailand Center of Excellence in Physics, Commission on Higher Education, 328 Si Ayutthaya Road, Bangkok 10400, Thailand

^d Faculty of Science, Maejo University, Bang Khen, Chiang Mai 50290, Thailand

^e School of Science, University of Phayao, Muang, Phayao 56000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2014

Received in revised form 27 April 2015

Accepted 8 July 2015

Available online 27 July 2015

Keywords:

Plasma immersion ion implantation (PIII)

DNA transfer

Plasmid

Escherichia coli (*E. coli*)

Cell envelope

ABSTRACT

Plasma immersion ion implantation (PIII) at low energy was for the first time applied as a novel biotechnology to induce DNA transfer into bacterial cells. Argon or nitrogen PIII at low bias voltages of 2.5, 5 and 10 kV and fluences ranging from 1×10^{12} to 1×10^{17} ions/cm² treated cells of *Escherichia coli* (*E. coli*). Subsequently, DNA transfer was operated by mixing the PIII-treated cells with DNA. Successes in PIII-induced DNA transfer were demonstrated by marker gene expressions. The induction of DNA transfer was ion-energy, fluence and DNA-size dependent. The DNA transferred in the cells was confirmed functioning. Mechanisms of the PIII-induced DNA transfer were investigated and discussed in terms of the *E. coli* cell envelope anatomy. Compared with conventional ion-beam-induced DNA transfer, PIII-induced DNA transfer was simpler with lower cost but higher efficiency.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Low-energy (10–100 keV) ion beam technology has been applied not only in the field of material surface modification but also successfully in the biological field such as mutation breeding and gene transfer [1]. Plasma immersion ion implantation (PIII) has been developed as a non-line-of-sight plasma-based ion implantation technique for surface modification and deposition of various materials including biomaterials (e.g. [2]). However, low-energy PIII has never been applied to inductions of mutation and gene transfer because of hesitations on short ion ranges of low-energy ions of PIII so that the biological tissues cannot be treated sufficiently to induce desired modifications. In this study, we explored application of the PIII technique to bombard bacterial cells with low-energy ions for induction of transferring plasmid DNA into bacterial cells and tried to understand mechanisms involved as the result could not be interpreted by currently understood mechanisms. The traditionally accepted mechanism of ion-beam-induced DNA transfer is generally that energetic ion

bombardment modifies and tailors the cell envelope in ways of ion-radiation-induced chain scission of the envelope polymers, sputtering-induced thinning of the envelope, and ion-charge-induced decrease of the electrical impedance of the envelope to eventually enhance the material permeability and thus the passive diffusion of DNA across the cell envelope [1,3,4]. This mechanism is based on the ion range to be appropriately within the cell envelope and an assumption that the cell envelope is a uniform material. The bacterial cell envelope thickness is about several tens of nanometers. The cell envelope material is in principle polymeric. To have a tens-nm projectile range in polymer, the ion energy should be about 20–30 keV for argon or 15–20 keV for nitrogen [5,6]. In normal low-energy PIII, the ion energy is several keV, which is thought to be too low to appropriately modify the cell envelope for subsequent DNA transfer. This is why low-energy PIII has not yet been applied for DNA transfer induction while ion beam induced DNA transfer has been successfully developed for two decades. However, the simplicity and low-cost features of the PIII technique still attract interests in trying this method for the biological application purpose. As the bacterial cell envelope is not very thick, bacteria were then used for trials. Moreover, the bacterial cell envelope is composed of typical and basic biological layers and components which may play some roles in favor of low-energy ion bombardment induction of DNA transfer.

* Corresponding authors at: Thailand Center of Excellence in Physics, Commission on Higher Education, 328 Si Ayutthaya Road, Bangkok 10400, Thailand (L.D. Yu), Biotechnology Unit, University of Phayao, Muang, Phayao 56000, Thailand (S. Anuntalabhochai).

E-mail address: yuld@thep-center.org (L.D. Yu).

2. Experiment

Escherichia coli (*E. coli*) strains DH5 α and BL21(DE3) were prepared at 37 °C in Lysogeny broth (LB) medium and used as hosts for transferring various DNA plasmids. Three DNA plasmids, pTZ57R, pBI121 and pETDuet™-1, purchased from the Fermentas and Invitrogen (USA), carrying different marker genes, as described in Table 1, were selected for transferring. A special gene was used to confirm functioning of the DNA-transferred cells. The complete open reading frame (ORF) of endoglucanase (*bglC*) was amplified from *Bacillus amyloliquefaciens*. The fragment was cloned into the pETDuet™-1, which was then denoted as pBgl.

PIII treatment of the bacterial samples was carried out using our in-house developed PIII facility [7]. The experiment had three parts. First, to investigate the ion species and ion fluence dependences, argon (Ar) or nitrogen (N) PIII was used with a bias of –2.5 kV and fluences of 1×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} , 5×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} and 1×10^{17} ion/cm², respectively. *E. coli* strain DH5 α was the target and plasmids pTZ57R and pBI121 were for DNA transfer. The plasma was generated with 50-W radiofrequency (RF) power and operated at a frequency of 50 Hz and a pulse length of 10 μ s. *E. coli* cells were deposited in holes of a stainless steel sample holder, which was about 5 cm in diameter and had nine holes on it with each in a size of 5 mm in diameter and 5 mm in depth. A vacuum control was placed in one of the holes covered by carbon tape. After PIII, bombarded cells were separately mixed with 1 μ g of various DNA plasmids respectively in sterile Eppendorf tubes, and incubated for 15 min in an ice box. Then 3-ml LB medium was added to each sample and incubated at 37 °C for 2 h. Then, 100 μ l of each sample were spread on selective medium [100 mg/L Ampicillin/X-Gal/IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) for pTZ57R, and Kanamycin 50 mg/L for pBI121], and incubated at 37 °C overnight. Gel electrophoresis with 1.5% agarose was used to measure the molecular size. Second, to investigate the bias voltage dependence, N-PIII was operated using negative bias voltages of 2.5, 5 and 10 kV and fluences of 1×10^{15} and 5×10^{15} ions/cm². The following steps were the same as those in the first part. Third, to confirm expression and functioning of the gene in the host cells after PIII, *E. coli* strain BL21(DE3) was treated by N-PIII at a bias of –2.5 kV and a fluence of 1×10^{15} ions/cm² and then recombinant plasmid, pBgl, was added for transfer. The recombinant cells harboring pBgl were spotted onto agar plate consisting of 1% Carboxymethyl Cellulose (CMC), incubated at 37°C for 24 h, and the Congo red method was used for enzymes activity test [8]. Moreover, SDS–PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) was performed following the method of Leamlmi [9] to measure the protein molecular weight.

Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe morphology of the bacterial cell envelope subjected to PIII treatment.

3. Results and discussion

Under certain conditions of PIII, plasmid DNA could successfully be transferred into the bacterial cells, as demonstrated in Fig. 1.

Table 1
DNA plasmids used in the experiment and their properties.

DNA plasmid [size (kbp)]	Marker genes	Gene property	<i>E. coli</i> host strain
pTZ57R [2.8]	<i>bla</i> <i>lacZ</i>	Resistance to ampicillin Expressing blue in LB	DH5 α
pBI121 [14.7]	<i>nptII</i>	Resistance to Kanamycin	DH5 α
pETDuet™-1 [6.3]	<i>bla</i>	Resistance to ampicillin	BL21(DE3)
↓	<i>bglC</i>	Encode cellulase protein	
Recombinant pBgl [6.9]			

Blue colonies of *E. coli* were observed (Fig. 1a), indicating that pTZ57R plasmid was certainly transformed in the cells pre-treated by N-PIII. As the pTZ57R plasmid contained the *lacZ* gene which would be seen in blue color on medium containing X-Gal/IPTG, the blue color was the indicator of the presence of the functioning pTZ57R plasmid. Similarly, living colonies observed on medium containing kanamycin demonstrated the presence of pBI121 plasmid which contained the kanamycin-resistance gene in the bacterial cells. Therefore, the observed living cells should possess the antibiotic-resistance property provided by the transferred plasmids and this was another indicator of successful DNA transfer into the cells. The observation on the development of a clear cellulose zone (Fig. 1b) showed the expression of *bglC* gene in pETDuet™-1 from the bacterial transformant. Table 2 summarizes the DNA transformation into *E. coli* cells using pTZ57R and pBI121 plasmids after N- or Ar-PIII at a bias voltage of –2.5 kV to various fluences. Without PIII treatment of the cells, the plasmid DNA was unable to transfer into the cells of the vacuum control. With either N- or Ar-PIII treatment of the cells, the DNA plasmids could be transferred into the cells in most cases except high fluences. This demonstrated that PIII of the cells certainly played a role in inducing DNA transfer. N-PIII could induce DNA transfer at higher ion fluences than Ar-PIII, indicating N-PIII able to induce DNA transfer more easily and effectively than Ar-PIII. Bigger plasmid (pBI121) was slightly more difficult in transferring than smaller one (pTZ57R). Table 3 shows the ion energy dependence of the PIII-induced DNA transfer. DNA transfer normally succeeded at lower ion energy and also bigger pBI121 was more difficult to transfer than smaller pTZ57R.

To verify that the transferred plasmid DNA indeed came from the original DNA, the electrophoresis-measured molecular size of the transferred plasmid DNA was compared with that of the original, as shown in Fig. 2. The bands appearing in the lanes for the DNAs extracted from the transferred bacterial cells were seen at the exactly same molecular size positions as those of the original DNAs, demonstrating the identity of the transferred plasmid to

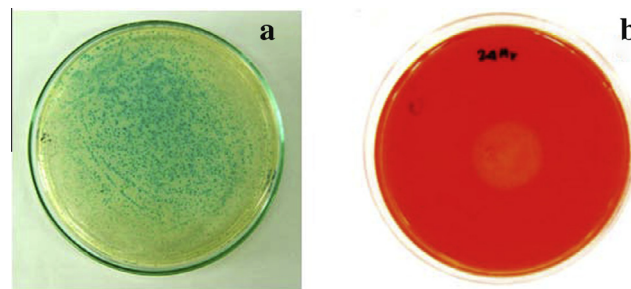


Fig. 1. Demonstrations of successful DNA transfer into PIII-treated *E. coli* cells. (a) Blue colonies of *E. coli* observed on selective medium, indicating that pTZ57R plasmid was transformed into the cells after N-PIII at a bias voltage of –2.5 kV and a fluence of 1×10^{13} ion/cm². (b) Expression of *bglC* gene of transformant using the Congo red method by a clear zone appearing around transformant. The petri dish size: 9 cm in diameter.

Table 2

Summary of ion-fluence dependence of DNA transformation into *E. coli* cells using pTZ57R (A) and pBI121 (B) plasmids after PIII with either nitrogen or argon ions at a bias voltage of -2.5 kV. +: DNA transfer succeeded; -: not observed. The experiment under each condition was done in 3 replicates.

Treatment condition	Vacuum control		Argon PIII		Nitrogen PIII	
	A	B	A	B	A	B
Fluence (ions/cm ²)						
1×10^{12}	—	—	+	—	+	+
5×10^{12}	—	—	+	+	+	+
1×10^{13}	—	—	+	+	+	+
5×10^{13}	—	—	+	+	+	+
1×10^{14}	—	—	+	—	+	+
1×10^{15}	—	—	—	—	+	+
1×10^{16}	—	—	—	—	+	—
1×10^{17}	—	—	—	—	—	—

the original DNA. To reconfirm the functioning of the transformant, the recombinant vector pBgl containing *bglC* gene was transformed to N-PIII-treated *E. coli* BL21(DE3). Fig. 3 shows the SDS-PAGE result. For the controls of original bacteria (Lane 1) and original even with IPTG induction (Lane 2), no band representing the specific protein size of 53 kDa (estimated) was shown, indicating no the specific protein present. However, after PIII treatment, the bacteria with the transferred gene *bglC* showed a band of the specific protein size (Lane 3) and after the IPTG induction the band was significantly intensified (Lane 4), demonstrating the protein functioning.

The SEM-observed surface morphology of the PIII treated bacteria *E. coli* cells is shown in Fig. 4. The cell surfaces of the natural and vacuum controls are clear, but with increasing of the ion fluence the cell surface is increasingly roughened and up to the highest fluence, 10^{17} ions/cm², the cells are completely destroyed, collapsed and thus died. The cell damage rate under various treatment conditions as summarized in Fig. 5 is clearly increasing as increasing of the fluence. At the same fluence argon appears more effective in the surface roughening and damaging the cells than nitrogen. These phenomena should be related to the ion sputtering effect. To a fluence of 10^{15} ions/cm², the sputtering-caused surface losses of cellulose (the main material type of the cell envelope) are about 2 nm and 4 nm for N-ion and Ar-ion bombardments, respectively [6]. The *E. coli* cell envelope in the dense part is about 20 nm [10]. This means that at the fluence of 10^{16} ions/cm², the cell envelope would start to be removed thoroughly. Due to a higher sputtering loss for the Ar case, at this fluence Ar-PIII already causes severe damage to the cells, while N-PIII starts to damage the cells as the 20-nm sputtering loss is just about the cell envelope thickness. The effect of ion sputtering is thinning the cell envelope and consequently increasing the envelope permeability to favor the DNA transfer [1]. The permeability also depends on the DNA size. The larger plasmid pBI121 is more difficult to be transferred than the smaller pTZ57R. However, the sputtering-caused thinning of the cell envelope is not the whole mechanism of PIII induced DNA transfer. As seen from the result shown in Table 2, at very low fluences such as 10^{12} – 10^{14} ions/cm², DNA transfer still succeeded. At these low fluences, the ion sputtering-caused cell envelope surface

Table 3

Summary of the bias dependence of DNA transformation into *E. coli* cells using pTZ57R and pBI121 plasmid after N-PIII with fluences of 1×10^{15} and 5×10^{15} ions/cm². +: DNA transfer succeeded; -: not observed.

Plasmid	pTZ57R			pBI121		
	Bias voltage (kV)					
	2.5	5	10	2.5	5	10
Fluence (ions/cm ²)						
1×10^{15}	+	+	—	+	—	—
5×10^{15}	+	+	—	—	—	—

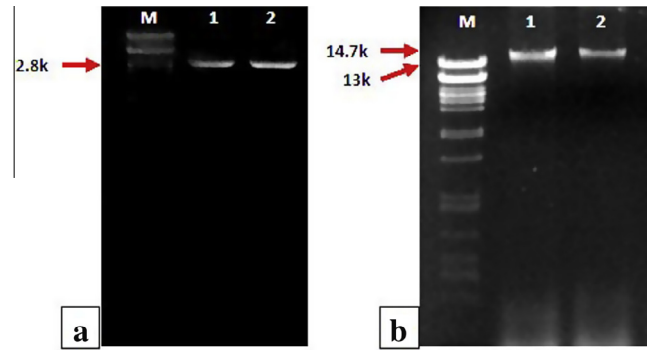


Fig. 2. The electrophoresis-measured molecular size of the transferred DNA plasmids of (a) pTZ57R and (b) pBI121. Lane M: molecular marker. Lane 1: original plasmid. Lane 2: plasmid DNA extracted from the transferred *E. coli* cells treated by PIII. The arrows point the bands with their noted molecular weights in bp (base pair). PIII conditions: nitrogen, -2.5 kV bias, and 1×10^{15} ion/cm² fluence.

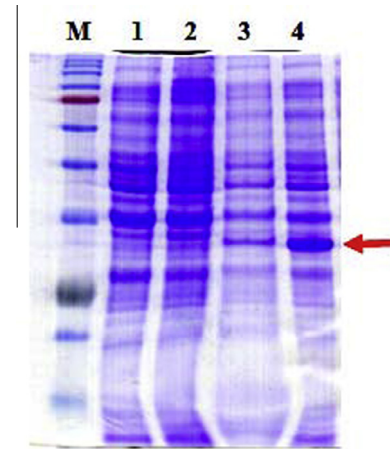


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of recombinant *cpx1* expressed in N-PIII-treated *E. coli* BL21(DE3) harboring pBgl (PIII at -2.5 kV and 1×10^{15} ions/cm²). Lane M: protein marker. Lane 1: cell of *E. coli* BL21(DE3). Lane 2: IPTG-induced cell of *E. coli* BL21(DE3). Lane 3: cell of *E. coli* BL21(DE3) harboring pBgl. Lane 4: IPTG-induced cell of *E. coli* BL21(DE3) harboring pBgl. The arrow points the BglC protein size at 53 kDa.

loss is negligible. The low-energy ion range in the cell envelope materials was also considerably short, compared with the total thickness, about 50 nm, of the bacterial cell envelope [10]. Therefore, some mechanisms else must be involved.

The *E. coli* cell envelope consists of four layers: a cytoplasmic membrane, a thin layer of periplasm containing peptidoglycan, an outer membrane composed by phospholipids and lipopolysaccharides, and a polysaccharide surface layer [11]. While the outermost polysaccharide surface layer is in a fiber- or fur-like morphology, the inner three layers are fairly denser. There exist trimer barrel-shape porins in the inner layers responsible for transporting molecules across the cell envelope to maintain the cell living. Each monomeric porin channel is partially blocked by a loop, called the eyelet. In general, the eyelet defines the size of solute that can traverse the channel and hence it acts like a lock of the porin [12]. At low ion energy (e.g. a few keV) and fluences (e.g. 10^{12} – 10^{15} ions/cm²), ion bombardment is not powerful enough to modify the cell envelope structure but able to sputter out the outermost polysaccharide layer and injure or damage the eyelet to open the porin. Simultaneously the linkage of the monomeric units of the trimer is scissored by the ions to open the entire trimer. Now that the porins have lost the control and the trimer becomes a big channel, they are freely available to transport

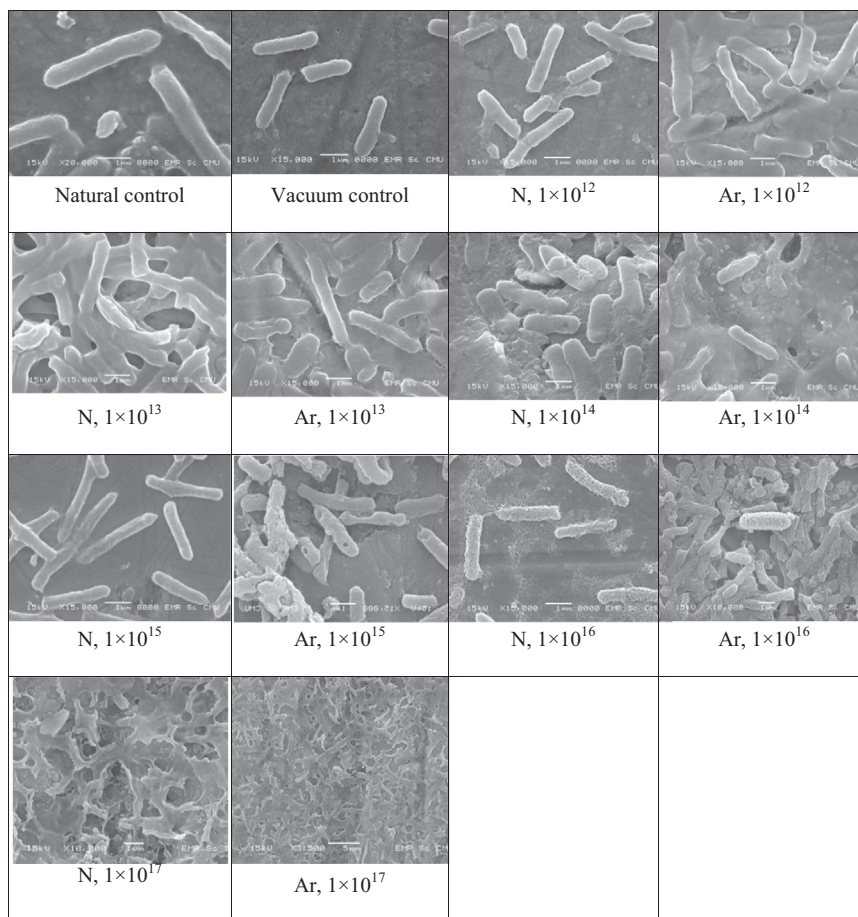


Fig. 4. SEM images of various types of *E. coli* cell samples including the natural control, vacuum control, and those PIII-treated with either nitrogen (N) or argon (Ar) ions to varied fluences at the bias of 2.5 kV. The scale bar in each image is 1 μm , except one in last image that is 5 μm .

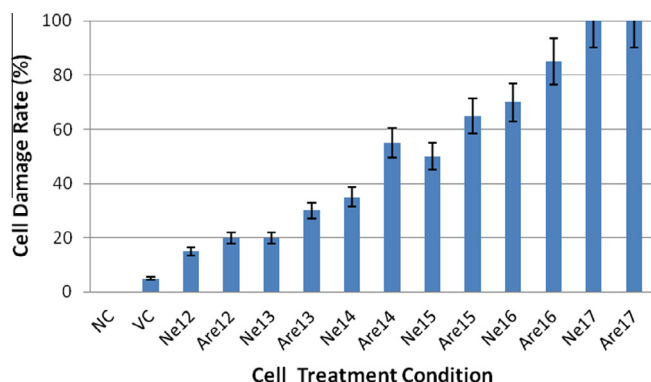


Fig. 5. *E. coli* cell damage rate under various treatment conditions for the bias of 2.5 kV. NC: natural control, VC: vacuum control, N: nitrogen PIII, Ar: argon PIII, and e12–e17: 10^{12} – 10^{17} ions/cm² for ion fluence. The damage rate in each case was estimated from a large-area (low magnification) SEM image in the case by counting the number of surface-damaged or collapsed cells over the total number of the cells.

exogenous DNA into the cells. At medium ion energy (e.g. about 10 keV) or fluences (e.g. about 10^{16} ions/cm²), PIII can greatly damage and collapse the porins so that the porins cannot work, but on the other hand PIII cannot modify the denser layers of the cell envelope sufficiently to enhance the permeability, so that the DNA transfer cannot be induced. At very high ion fluence (e.g. 10^{17} ions/cm²), PIII completely destroys and sputters the cell envelope to cause death of the cells and DNA transfer is impossible.

Due to a higher sputtering coefficient of argon ions than nitrogen ions to polymers, Ar-PIII could destroy the porins more easily than N-PIII and so at medium fluences such as 10^{15} and 10^{16} ions/cm² Ar-PIII stopped inducing DNA transfer but N-PIII could still work.

There were two steps in the whole process: plasma treatment and transfer of DNA. From the first step a certain number of the cells were surviving and these cells were ready for subsequent DNA transfer. From Fig. 5, for the successful DNA transfer, the plasma conditions gave the cell survival rates higher than 30% and the highest rate at about 85% for the lowest fluence case. In the second step, the efficiencies of ion-beam and PIII induced DNA transfers were nearly the same. The *E. coli* cell survival rate due to ion beam bombardment was about 30–50% [13], and therefore the DNA transfer efficiency using PIII was higher than using ion beam by 70% in maximum.

4. Conclusion

Although ion-beam-induced DNA transfer had succeeded, low-energy PIII was for the first time applied to bombard *E. coli* cells to induce plasmid DNA transformation and this success led to revision of our ideas on mechanisms of the ion-bombardment-induced DNA transfer. Success in inducing DNA transfer was achieved mainly at low ion energy (a few kV) and low to medium ion fluences (around 10^{12} – 10^{16} ions/cm²). The PIII-induced DNA transfer was plasma ion species and plasmid size dependent. Instead of a single mechanism governing the process, complex ion-energy and fluence dependent mechanisms should be involved in the DNA transfer

induction owing to complexity of the *E. coli* cell envelope structure. As a new ion and plasma based biotechnology, the PIII-induced DNA transfer had a series of advantages compared with the ion-beam-induced DNA, including the simplicity, low cost and high transferring efficiency.

Acknowledgements

The work was supported by the National Research Council of Thailand, the Thailand Center of Excellence in Physics, the Thailand Research Fund, the Chiang Mai University, and the International Atomic Energy Agency (IAEA).

References

- [1] Z.L. Yu, (original Chinese ed.), L.D. Yu, T. Vilaithong, I. Brown (English translators), Introduction to Ion Beam Biotechnology, Springer Science+Business Media, New York, 2006.
- [2] R. Wei, Development of new technologies and practical applications of plasma immersion ion deposition (PIID), *Surf. Coat. Technol.* 204 (2010) 2869–2874.
- [3] K. Prakrajang, P. Wanichapichart, S. Anuntalabhochai, S. Pitakrattanukool, L.D. Yu, Ion beam modification of chitosan and cellulose membranes for simulation of ion bombardment of plant cell envelope, *Nucl. Instrum. Methods B* 267 (2009) 1645–1649.
- [4] K. Prakrajang, K. Sangwijit, S. Anuntalabhochai, P. Wanichapichart, L.D. Yu, Low-energy ion beam bombardment effect on the plant-cell-envelope mimetic membrane for DNA transfer, *Nucl. Instrum. Methods B* 286 (2012) 329–333.
- [5] J.F. Ziegler, J.P. Biersack, Stopping and Ranges of Ions in Matter, SRIM Program Code, 2012.
- [6] PROFILE Code, Version 3.20, 1995. Implant Sciences, Wakefield, MA.
- [7] P. Chaivan, N. Pasaja, D. Boonyawan, P. Suanpoot, T. Vilaithong, Low-temperature plasma treatment for hydrophobicity improvement of silk, *Surf. Coat. Technol.* 193 (2005) 356–360.
- [8] M.T. Ronald, J.W. Peter, Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in enumeration and characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen, *Appl. Environ. Microbiol.* 34 (4) (1982) 777–780.
- [9] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [10] B. Phanchaisri, L.D. Yu, S. Anuntalabhochai, R. Chandej, P. Apavatjirut, T. Vilaithong, I.G. Brown, Characteristics of heavy ion beam-bombarded bacteria *E. coli* and induced direct DNA transfer, *Surf. Coat. Technol.* 158–159 (2002) 624–629.
- [11] C. Alexander, E.T. Rietschel, Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, *J. Endotoxin Res./Innate Immun.* 7 (3) (2001) 167–202.
- [12] J. Sekiguchi, H. Yamamoto, Cell wall structure of *E. coli* and *B. subtilis*, in: Y. Sadaie, K. Matsumoto (Eds.), *Escherichia coli and Bacillus subtilis: The Frontiers of Molecular Microbiology Revisited*, Research Signpost, Kerala, India, 2012, pp. 115–148.
- [13] P. Thongkumkoon, K. Prakrajang, P. Thopan, C. Yaopromsiri, D. Suwannakachorn, L.D. Yu, Is low-energy-ion bombardment generated X-ray emission a secondary mutational source to ion-beam-induced genetic mutation?, *Nucl. Instrum. Methods B* 307 (2013) 592–597.



Low-energy plasma immersion ion implantation modification of bacteria to enhance hydrolysis of biomass materials



K. Sangwijit^a, J. Jitonnorn^b, S. Pitakrattananukool^c, L.D. Yu^{d,e,*}, S. Anuntalabhochai^{a,c,**}

^a Biotechnology Unit, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

^b Division of Chemistry, School of Science, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

^c Division of Biology, School of Science, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

^d Plasma and Beam Physics Research Facility, Department of Physics and Materials Science, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^e Thailand Center of Excellence in Physics, Commission on Higher Education, 328 Si Ayutthaya Road, Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2016

Revised 15 July 2016

Accepted in revised form 23 July 2016

Available online 26 July 2016

Keywords:

Plasma immersion ion implantation (PIII)

Hydrolysis

Cellulase activity

Bacillus amyloliquefaciens (*B. amyloliquefaciens*)

Mutation

Biomass

ABSTRACT

This report is on exploring low-energy plasma immersion ion implantation (PIII) as a novel bio-technique and an improved alternative to ion beams to induce bacterial mutation for enhancing the hydrolysis of biomass materials, eventually benefiting environmental protection and biofuel production. Cellulase-producing bacterial cells of *Bacillus amyloliquefaciens* were treated by argon or nitrogen PIII at a bias voltage of -2.5 kV with various fluences from 1×10^{15} to 1×10^{17} ions/cm² to induce mutation. The bacterial mutants exhibiting clear potentiality of enhanced cellulase activity which indicated improved hydrolysis capability were screened. Comparisons in the cellulase activity between the wild type as the control and the mutant under various buffer pH values and temperatures showed that the cellulase activities of the mutant were clearly higher than that of the control, particularly for neutral pH and lower and higher temperatures. The cellulase hydrolysis ability tests against various biomass materials including rice straw, corn stover and corn husk demonstrated the mutant possessing the higher hydrolysis activity, particularly for the corn husk. Physical and biological mechanisms involved in the bacterial cell modification induced by the low-energy PIII were investigated and discussed in terms of the ion stopping in the specific bacterial cell envelope and the modification of the DNA sequence.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ion beam modification of biological living materials has been developed as ion beam biotechnology for three decades [1]. The technology utilizes ion beams, particularly in a lower energy region, some tens keV, instead of the MeV higher energy region, to bombard biological cells to induce mutation or gene transfer. The technology has been demonstrated to be novel and very effective, but, on the other hand, not very convenient in operation and not cost effective either. Compared with accelerator-based ion beams, plasma-based ion implantation at relatively lower ion energy has been considered more convenient and cost effective as well and widely applied in various material surface modifications. However, it has not yet been well addressed by experiments in treating living materials for biotechnology applications due to the hesitation of its low energy character which might not be able to cause

sufficient changes in the critical biological structures. Recently a few studies have emerged on applying plasma-based ion implantation to induce plant mutation [2] and DNA transfer [3]. This work was an attempt to explore low-energy plasma immersion ion implantation (PIII) for inducing bacterial mutation, aiming at enhancing the cellulase activity and thus the biomass processing capability.

Several chemical agents such as methylmethanesulfonate (MMS), ethylmethanesulfonate (EMS), diepoxybutane (DEB) and sodium azide are powerful carcinogens used to induce mutation in various living organisms including crop plants, fungi and bacteria, as well as physical irradiations including Gamma rays, X-rays, ultraviolet (UV) and fast neutrons. [4–6]. Furthermore, a combination of both chemical (EMS) and physical (UV) mutagenesis has been also applied to increase cellulase enzyme activity in bacterial cells [7]. All of the chemical agents and the radiations are powerful mutagens. In comparison with other physical mutagens, low-energy PIII technique is safer, more reliable and sustainable. On the other hand, evidence for induction of mutation in bacteria using the PIII technique has not yet been reported. Experimental evidences have shown energetic ion beam bombardment which is an environment-friendly technique capable of inducing broad-spectrum mutations of crops with high efficiencies owing to multiple physical agents involved compared with other mutation induction methods

* Correspondence to: L.D. Yu, Plasma and Beam Physics Research Facility, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

** Correspondence to: S. Anuntalabhochai, Biotechnology Unit, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand.

E-mail addresses: yuld@thep-center.org (L.D. Yu), soanu.1@gmail.com (S. Anuntalabhochai).

[1]. With many successes achieved in ion-beam-induced crop mutation breeding, PIII which is a non-line-of-sight ion bombardment process has rarely been tested in this application. This motivated us to carry out this study.

Lignocelluloses are the most abundant biomass providing carbon resources with a worldwide production of 1×10^{10} MT per year [8]. Agricultural cellulosic wastes are enzymatically hydrolyzed into reduced sugar that can be converted to several chemical products such as alcohol, fatty acid, etc. [9]. One of the factors in limiting the converting process is inefficient hydrolysis of the enzymes. Cellulases are a group of hydrolytic enzymes capable of hydrolyzing cellulose to glucose and they can be produced by a large number of microorganisms. One of the approaches to develop higher cellulase activity is discovering new cellulolytic microorganisms and constructing mutants with higher expression [10]. In this work, an integration of PIII technology and biotechnology was conducted for enhancing the hydrolysis activity of the cellulase enzyme and eventually benefiting the biomass treatment.

2. Materials and methods

The target material was the cellulase producing bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens*), which were isolated from horse's feces. The bacterial strains were grown at 37 °C in Lysogeny broth (LB) with vigorous shaking at 120 rpm. *B. amyloliquefaciens* cells were harvested after overnight incubation by centrifugation at 6000 rpm for 5 min then resuspended with sterile distilled water. Bacterial suspensions were deposited in wells of a stainless steel sample holder and then placed in the PIII chamber [11]. A vacuum control was placed in one of the wells covered by carbon tape. The bacterial samples were treated by argon (Ar) or nitrogen (N) PIII with a bias voltage of -2.5 kV and to fluences of 1×10^{15} , 5×10^{15} , 1×10^{16} , 5×10^{16} and 1×10^{17} ions/cm², respectively, in a vacuum condition of 10^{-3} Pa at room temperature. The plasma was generated with 100-watt radiofrequency (RF) power and operated with a frequency of 50 Hz and a pulse length of 20 μ s. After PIII, LB medium was added to each treated sample and incubated at 37 °C on a rotating shaker for 1 h. Then, 100 μ l of each sample were spread on LB agar containing 1% of carboxymethyl cellulose (CMC) and incubated at 37 °C for 24 h. Both wild type control (without PIII treatment) and vacuum control were cultivated on the same agar media.

Mutants were screened based on the size of the hydrolysis halos detected by Congo red staining [12]. In the test, the bacterial colonies placed at the central area of the CMC-smear plate would gradually digest the CMC to increase the central circle or halo size which could be detected by the dye staining so that the bigger the halo, the higher the activity. The qualitative cellulase activity of each bacterial colony was evaluated by the ratio between the hydrolysis halo diameter and the colony diameter (*H/C*). The isolate that showed a higher *H/C* ratio than that of the control was screened and selected for further analysis and tests. Genetic stability of the mutant with higher cellulase activity was confirmed by Congo red staining for 9 generations. All the experiments were carried out in triplicate repeats and calculated with statistical analysis at $p < 0.01$ (Duncan's multiple range test).

Tests of the cellulase activity of all bacterial samples were carried out against various pH and temperatures. All samples were inoculated in 50 ml of LB medium and incubated at 37 °C with vigorous shaking (120 rpm). To investigate the cellulase activity, the cured enzyme of all bacterial samples was harvested by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C. The optimum pH of the cellulase activity was determined by incubation of the mixture containing 1% (w/v) CMC in various buffers of pH 2.0–10.0 with suitable amounts of enzyme at 50 °C for 30 min. To determine optimal temperature, cellulase activities were measured at different temperatures ranging from 20 to 100 °C. For investigation of the hydrolysis activity, releasing of reducing sugars was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method [13]. As cellulose is an unbranched glucose polymer and cellulase degrades cellulose by

cleaving a glycosidic bond of glucose polymer into reducing sugar [14], the more cellulase activity, the more the reducing sugar is released. The unit of hydrolysis activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 mmol of reducing sugar/min. The protein concentrations of all samples were determined using Lowry's method with bovine serum albumin as the protein standard [15]. Cellulase hydrolysis activities of all bacterial samples against biomass materials were determined using lignocellulosic substrates including rice straw, corn stover and corn husk. The hydrolysis activities were investigated by separately incubating the crude enzyme in 5% (w/v) substrates in 50 mM citrate buffer (pH 5.0) at 50 °C for 7 days. Then the reaction mixtures were collected on day 0, 1, 3, 5 and 7. All measurements in the experiment were carried out in triplicate determinations with standard error.

3. Results and discussion

From the mutant screening, among 1000 colonies, mutants displaying the *H/C* ratio higher than that of the wild type were observed. The mutants showed various *H/C* ratios from 1.05 to 3 while the *H/C* ratio of the wild type was approximately only 1.45 (Table 1). The ratio data in Table 1 were obtained from Ar-PIII. Mutants under N-PIII were not detected. This was supposed to be due to the physical fact that Ar was nearly three times heavier than N and thus, to a cell-envelope mimetic target material, cellulose ($C_6H_{10}O_5$, 1.5 g/cm³), the stopping power of 2.5-keV Ar was about 3.4 MeV/(mg/cm²) while that of 2.5-keV N was about 1.6 MeV/(mg/cm²), calculated from SRIM [16], namely, the linear energy transfer (LET) of Ar was about twice that of N. Therefore, at the same energy Ar should be more effective in inducing mutation than N. The mutant with the highest *H/C* ratio in the CMC plate was selected, as shown in Fig. 1, where the diameter of the halo of the mutant was seen more than two times that of the wild type, indicating the highest cellulose digestion capability. It was noted that most of the selected mutants were observed from the Ar-PIII treatment with the ion fluence of 1×10^{16} ions/cm².

The qualified result on the enhancement of cellulose digestion capability was quantified. Figs. 2 and 3 display the results of the measured hydrolyzed enzyme which represented the cellulase activity of the bacterial samples as functions of the pH value and the temperature of the buffer, respectively. As shown in Fig. 2, an example of the cellulase activity with varied pH, the mutant obviously exhibited higher cellulase activity than the wild type with the highest enhancement around the neutral pH 4–6 by an increase of about 25–30%. Fig. 3, an example of the cellulase activity with various temperatures, shows that the mutant generally enhanced the cellulase activity over the tested temperature range compared to the wild type. Particularly in the low and high temperature ranges the enhancement was more pronounced, about 30–40% increase.

The hydrolysis activities of the cellulase produced from the bacteria on real cellulosic materials of rice straw, corn stover and corn husk showed continuous increasing with the time in the activity from the

Table 1
H/C ratios of the wild type (W) and the mutants (M1–M9).

Bacterial sample	<i>H/C</i> ratio
W	1.43 ± 0.08^b
M1	1.68 ± 0.14^{bc}
M2	1.05 ± 0.09^a
M3	2.71 ± 0.18^d
M4	2.50 ± 0.10^d
M5	3.12 ± 0.24^e
M6	2.53 ± 0.15^d
M7	2.34 ± 0.17^d
M8	1.81 ± 0.11^c
M9	1.33 ± 0.18^{ab}

Values are means $\pm$ standard error. The letters indicate a significant difference ($p < 0.01$) as determined (examined) by Duncan's multiple range test.

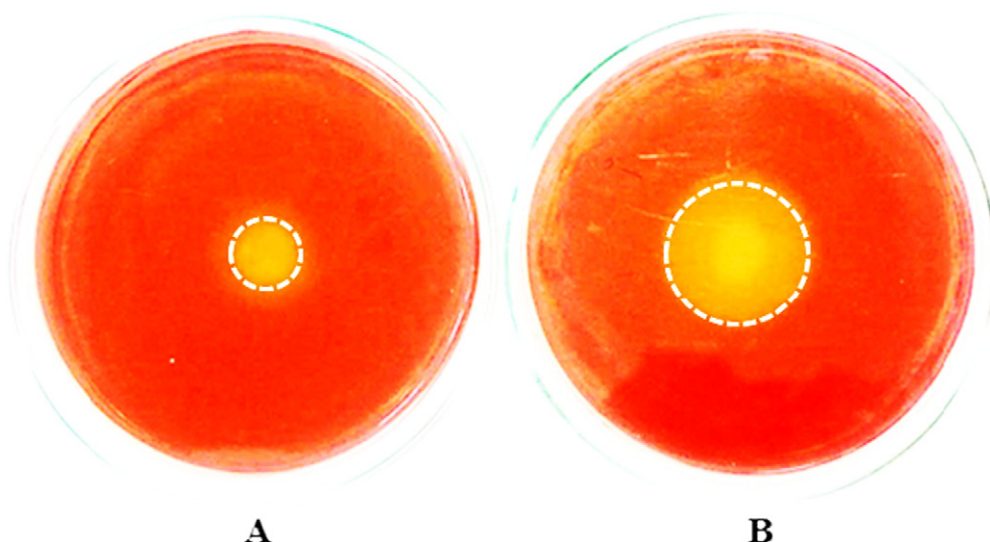


Fig. 1. Plate screening using the Congo red method to display the hydrolysis halo zone. (A) Wild type *B. amyloliquefaciens*. (B) Selected mutants. The hydrolysis halo zones at the central area are marked by white dash circles. The halo diameter H is the diameter of the circle. The halo zone size indicates the hydrolysis activity. The diameter of the bacterial colony (both the control and the mutant), C , is approximately 0.9 cm (not seen in this figure). The diameter of the plate is 9 cm.

measured reducing sugar liberated from substrates since the first day of incubation, as shown in Fig. 4. Naturally the hydrolysis increased with the time, but the mutant showed more significant increases in hydrolyzing the biomass materials, especially on the 7th day, the last testing day. Among the tested biomass materials, the mutant hydrolyzed the corn husk in the highest enhancement of the capability, about 250% of an average increase compared with about 30% increase for the corn stover and 180% increase for the rice straw. This demonstrated that the mutant could be most effective in hydrolysis of corn husk.

To understand the biological nature involved in the PIII-induced mutation responsible for the enhanced cellulase activity, gene sequencing of the mutant was carried out. The result (not shown) demonstrated a single point mutation occurring in CBM (Carbohydrate-binding module) of the cellulase gene after PIII resulting in the lysine residue being mutated into the glutamic acid residue. Since the glutamic acid residue was a charged residue, the increased catalytic activity of the mutant was probably due to an electrostatic change around the cellulose binding domain, caused by altering the positive charge side chain to the negative charge side chain to provide higher cellulose recognition and binding by the conformational change of the gene [17].

Mechanisms of ion-bombardment-induced mutation of biological cells have been studied and understood as energetic ions thinning and penetrating the cell envelope with abnormally high sputtering yields and great projectile ranges so that they can finally interact with DNA inside the cell nucleus even with very low energy after energy loss in their travel in the envelope materials to cause changes in the DNA structure

[1]. From this point of view, the induction of DNA changes should basically depend on the ion energy, as only higher energy is possible to realize the induction, and the ion fluence as well, as the higher the fluence, the more the sputtering caused thinning of the envelope. In our case, although the ion energy of the PIII was in the order of keV, about an order lower than conventionally used tens keV energy, the fluence of Ar ions to induce mutation was in the order of 10^{16} ions/cm². Ar ions with this fluence at ion energy of 2.5 keV could cause about 40-nm sputtering loss of cellulose which is the main material type of the plant cell envelope [18]. *B. amyloliquefaciens* is Gram positive bacteria. The dominant material of the cell envelope of the Gram positive microorganisms is peptidoglycan, a polymer consisting of amino acids (peptido-) and sugars (-glycans) [19], which is 30–100 nm thick and contains many layers [20]. It is hence seen that the 2.5-keV Ar ions with the 10^{16} ions/cm² fluence might remove a portion of the *B. amyloliquefaciens* cell envelope and a thinned envelope possibly remained but the cell still survived and thereby the low-energy ions could penetrate through the thin envelope to enter the cell and further interact with DNA. The range of 2.5-keV Ar-ions was about 11 nm and the maximum penetration depth could be up to >20 nm in peptidoglycan (with the chemical formula of C₄₀H₆₇N₉O₂₁ [21] and a program-estimated mass density around 1 g/cm³) calculated by using SRIM code [16] (though the program did not predict any sputtering), as shown in Fig. 5. If the correction factor for abnormal penetration depth of ions in real biological cell wall materials was taken into account [22], the maximum penetration depth of 2.5-keV Ar ions could be possibly up to about 50 nm. The biological cell envelope is never uniform in thickness and density over its entire structure and cells could never all die from the ion sputtering and implantation. Moreover, even in normal biological environments, particles of approximately 2 nm can pass through the peptidoglycan [23]. Therefore, penetration of Ar ions through the bacterial cell envelope and interaction with DNA could practically be possible. Our study has shown that ultra-low-energy ions with energy as low as orders of 10–10² eV are still able to damage DNA for potential mutation induction [24]. Also note that mutation is always a low-probability event and hence once a cell is mutated, no matter other cells are intact or dead, mutation occurs anyway. Therefore, when the ions interact with DNA at very low energy after they lose the energy to the envelope, they can possibly change DNA to induce mutation. Ar ions appeared more effective than N ions on inducing mutation. As argon is heavier than nitrogen and inert, this indicated that the mutation induction was more dominated by direct interaction

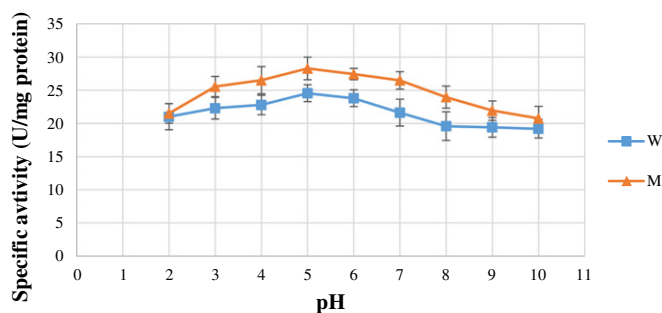


Fig. 2. A comparison of the cellulase activities between the wild type (W) and the mutant (M) of *B. amyloliquefaciens* as a function of the pH value ranging from pH 2–10 at the buffer temperature of 50 °C.

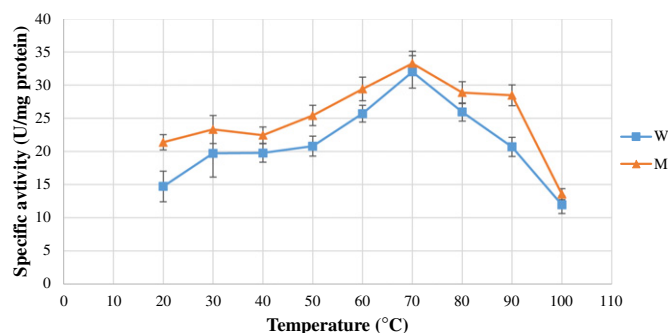


Fig. 3. A comparison of the cellulase activities between the wild type (W) and the mutant (M) of *B. amyloliquefaciens* as a function of the buffer temperature ranging from 20 to 100 °C at pH 5.0.

between the ions and DNA. Certainly, in PIII, different from ion beams, not only energetic ions exist but also other active physical agents are present, such as radicals, electrons, X-ray and ultraviolet (UV), which

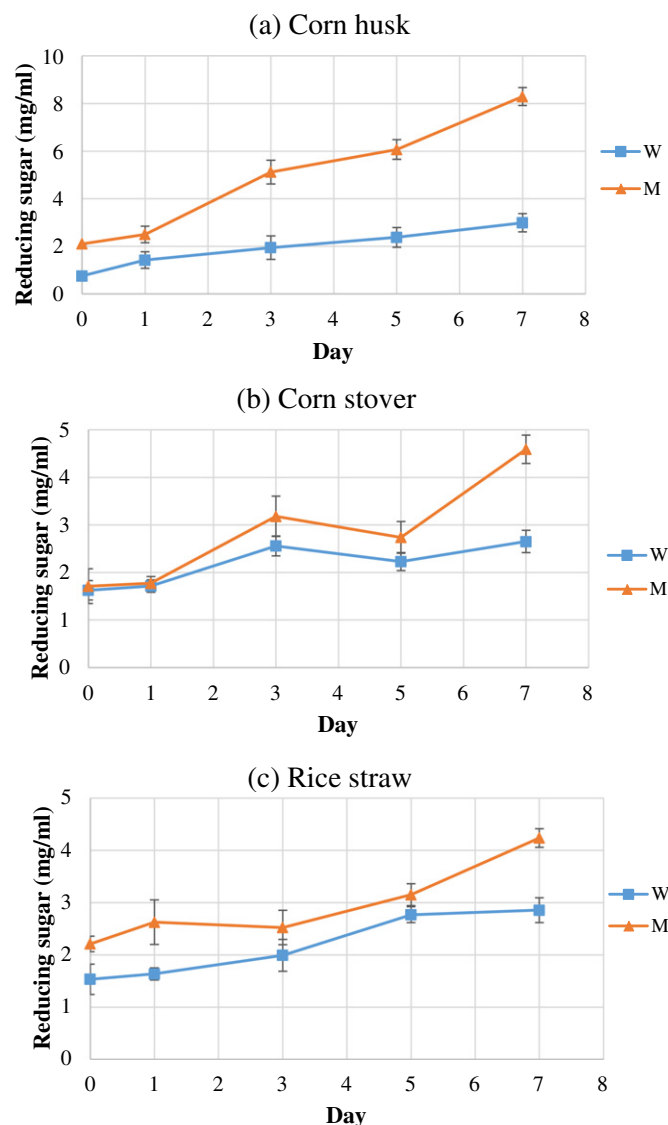


Fig. 4. Comparisons of the hydrolysis activities, represented by the reducing sugar collected on day 0, 1, 3, 5 and 7, between the wild type (W) and the mutant (M) of *B. amyloliquefaciens* on various agricultural residuals of (a) corn husk, (b) corn stover, and (c) rice straw.

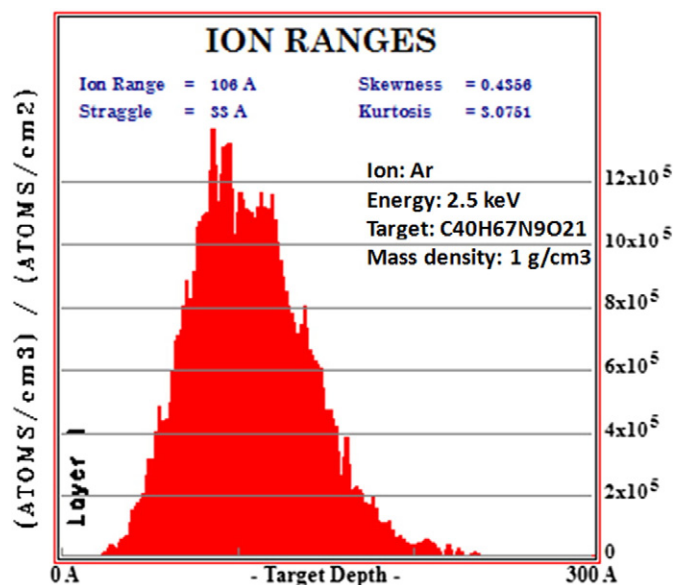


Fig. 5. SRIM-calculated 2.5-keV Ar ion range and depth profile in peptidoglycan.

(some even have more penetration capabilities than ions) may also play some roles in causing changes in DNA. But, from our result their effects seemed negligible.

4. Conclusion

PIII was successfully explored as a novel biotechnology applied to bombard bacterial *B. amyloliquefaciens* cells to induce mutation for enhancement of the cellulase activity or hydrolysis of biomass materials. The selected mutant showed significant increases in the cellulase activity over broad ranges of the buffer pH and temperatures and the cellulase hydrolysis ability against various agricultural wastes including rice straw, corn stover and corn husk. The highest relevant enhancements were achieved around the neutral pH, lower and higher temperatures of buffer and for corn husk. The biological mechanism was attributed to a point mutation of the base substitution in the gene to cause the amino acid change in cellulose binding module (CBM). The physical mechanism was related to low-energy but relatively higher fluence ions sputtering of the cell envelope to make the ions penetrating through the envelope to interact with DNA possible.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mamoru Wakayama and Wasana Suyotha for their technical assistance. The work was supported by the Thailand Research Fund (grant TRG5880044 and TRG5880241), the Thailand Center of Excellence in Physics, the National e-Science Infrastructure Consortium of Thailand, and the International Atomic Energy Agency (IAEA).

References

- [1] Z.L. Yu, Introduction to Ion Beam Biotechnology (Chinese original), L.D. Yu, T. Vilaithong, I. Brown (Eng. translators) Springer, New York, 2006.
- [2] L.F. Du, Z.L. Gu, H. Zhong, Y. Dong, M.P. Wu, C.G. Pan, Mutation effect of plasma immersion N⁺ ion implantation on plumule cells of M1 in pea seeds, *Hereditas* 22 (6) (2000) 398–400.
- [3] K. Sangwijit, L.D. Yu, S. Sarapirom, S. Pitakrattanakool, S. Anuntalabhochai, Low-energy plasma immersion ion implantation to induce DNA transfer into bacterial *E. coli*. *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. Sec. B* 365 (2015) 389–393.
- [4] K. Naito, M. Kusaba, N. Shikazono, T. Toshiya, T. Atsushi, T. Takatoshi, N. Minoru, Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with ³¹P rays and carbon ions, *Genetics* 169 (2005) 881–889.

- [5] S. Radha, R. Himakiran Babu, A. Sridevi, N.B.L. Prasad, G. Narasimha, Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation, *Eur. J. Exp. Biol.* 2 (2012) 1517–1528.
- [6] K.P. Gopinath, S. Murugesan, J. Abraham, K. Muthukumar, *Bacillus* sp. mutant for improved biodegradation of Congo red: random mutagenesis approach, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 6295–6300.
- [7] R. Agrawal, A. Satlewal, A.K. Verma, Development of a β -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis, *3 Biotech*, 3 (2013) 381–388.
- [8] O.J. Sánchez, C.A. Cardona, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 5270–5295.
- [9] H. Tomohisa, O. Fumiyoshi, O. Naoko, H.Y. Kiyotaka, I. Jun, K. Akihiko, A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 513–522.
- [10] L. Lin, X. Meng, P. Liu, Y. Hong, G. Wu, X. Huang, C. Li, J. Dong, L. Xiao, Z. Liu, Improved catalytic efficiency of Endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (2009) 671–679.
- [11] P. Chaivan, N. Pasaja, D. Boonyawan, P. Suanpoot, T. Vilaithong, Low-temperature plasma treatment for hydrophobicity improvement of silk, *Surf. Coat. Technol.* 193 (2005) 356–360.
- [12] M.T. Ronald, J.W. Peter, Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen, *Appl. Environ. Microbiol.* 34 (1982) 777–780.
- [13] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [14] H.S. Jun, Y.Y. Je, K.H. Sam, Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene the *cel* gene of *Bacillus* sp. D04 has exo and endoglucanase activity, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 26012–26019.
- [15] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [16] J.F. Ziegler, SRIM – The Stopping and Range of Ions in Matter, <http://www.srim.org/> 2013.
- [17] C.R. Santos, J.H. Paiva, M.L. Sforça, J.L. Neves, R.Z. Navarro, J. Cota, P.K. Akao, Z.B. Hoffmam, A.N. Meza, J.H. Smetana, M.L. Nogueira, I. Polikarpov, J. Xavier-Neto, F.M. Squina, R.J. Ward, R. Ruller, A.C. Zeri, M.T. Murakami, Dissecting structure-function-stability relationships of a thermostable GH5-CBM3 cellulase from *Bacillus subtilis* 168, *Biochem. J.* 441 (2012) 95–104.
- [18] PROFILE Code, Version 3.20, Implant Sciences, Wakefield, MA, 1995.
- [19] L.M. Prescott, J.P. Harley, D.A. Klein, *Microbiology*, sixth ed. McGraw-Hill Publishing, New York, 2005.
- [20] T.J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, The bacterial cell envelope, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a000414.
- [21] National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health, (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3035036>).
- [22] L.D. Yu, T. Vilaithong, B. Phanchaisri, P. Apavatjirut, S. Anuntalabhochai, P. Evans, I.G. Brown, Ion penetration depth in the plant cell wall, *Nucl. Instr. Meth. B* 206 (2003) 586–590.
- [23] P.H. Demchick, A.L. Koch, The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 178 (3) (1996) 768–773.
- [24] P. Thopan, P. Thongkumkoon, K. Prakrajang, D. Suwannakachorn, L.D. Yu, Ultra-low-energy (<10 eV/u) ion beam bombardment effect on naked DNA, *Nucl. Instr. Meth. B* 326 (2014) 200–203.