

การประยุกต์ใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์เพื่อค้นหาเอนไซม์ทนร้อนจากบ่อน้ำพุร้อน Application of Metagenomics Technique in Gene Encoding Thermostable Enzyme Discovery from Hot Spring

ชลธิชา มามิมิน¹ สมพงษ์ โอทอง² และศุภชัย นิติปันธ^{3*}

Chonticha Mamimin¹, Sompong O-thong² and Supachai Nitipan^{3*}

บทคัดย่อ

เมตาจีโนมิกส์เป็นเทคนิคใช้ค้นหาเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพ โดยอาศัยเทคนิคการโคลนนิ่งที่ต้องการเข้าสู่ดีเอ็นเอพลาสมิด จากนั้นนำเข้าสู่เซลล์ผู้ให้อาศัยเพื่อสร้างโคลนไลบรารีแล้วจึงคัดกรองยีนที่ต้องการด้วยกระบวนการต่าง ๆ โดยอาศัยการแสดงออกของยีน (functional-based screening) ซึ่งแสดงลักษณะเฉพาะอันเกิดจากผลิตภัณฑ์ที่ยีนสร้างขึ้น และอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (sequencing-based screening) เทคนิคเมตาจีโนมิกส์สามารถนำมาค้นหาเอนไซม์ใหม่ ทั้งจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมปกติ ตัวอย่างยีนที่พบ เช่น ยีน *pAMY* ของเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ในดิน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ได้รับการค้นพบจากแหล่งธรรมชาติที่มีอุณหภูมิไม่สูงจึงไม่มีความเสถียรเมื่อถูกนำไปใช้ในสภาวะอุณหภูมิสูง ดังนั้นเทคนิค metagenomics นำมาประยุกต์ใช้ค้นหาเอนไซม์ทนร้อนจากจุลินทรีย์ทนร้อนและชอบร้อนที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เช่น บ่อน้ำพุร้อน โดยพบยีนของเอนไซม์ทนร้อนจากน้ำพุร้อนชนิดใหม่ ได้แก่ ยีน *Env Npu193A* ของเอนไซม์ neopullulanase-like enzyme ยีน *PLP* ของเอนไซม์ patatin-like phospholipase และยีน *Est1* ของเอนไซม์ esterase ซึ่งกิจกรรมสูงและสามารถคงตัวที่อุณหภูมิสูงได้

คำสำคัญ: เมตาจีโนมิกส์ ยีน เอนไซม์ทนร้อน บ่อน้ำพุร้อน

¹ นิสิตปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

² ผศ.ดร., ³ อ.ดร., สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

* Corresponding author e-mail: supachai_nitipan@hotmail.com

Abstract

Metagenomics is the high-throughput approach for gene discovery from environmental microorganism. The clone library was constructed by direct extraction of genomic DNA from environmental microorganisms, cloning into DNA vector and transforming into host cell. The desired genes were examined by using functional-based screening, which is a direct detection of specific phenotypes, and sequences-based screening. The novel enzymes are reported by using metagenomics approach such as amylase (*pAMY* gene) from soil library. However the most enzymes from moderate temperature environment are unstable under high temperature condition. Thus metagenomics approach was applied to find the gene coding thermostable and therophilic enzymes from high temperature environment such as hot spring. Many novel genes were found from organisms in hot springs, for example, *Env Npu193A*, *PLP* and *Est1* genes coding neopullulanase-like enzyme, patatin-like phospholipase and esterase. These enzymes had high activity and stability under high temperature condition.

Keywords: Metagenomics, Genes, Thermostable Enzyme, Hot Springs

บทนำ

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต แต่เนื่องจากเอนไซม์ทั่วไปไม่สามารถทำงานได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง จึงมีการค้นหาเอนไซม์ชนิดใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ทนร้อน (thermostable enzyme) จากจุลินทรีย์ที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงอย่างเช่น บ่อน้ำพุร้อน ซึ่งสามารถปรับตัวให้เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 60 องศาเซลเซียส [1] แต่อย่างไรก็ตามมากกว่าร้อยละ 99 ของจุลินทรีย์ชอบร้อนจากธรรมชาติ ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้โดยเทคนิคในห้องปฏิบัติการ (uncultured Microbial) [2] นักวิทยาศาสตร์จึงพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อค้นหาเอนไซม์ชอบร้อนโดยตรงจากตัวอย่างในธรรมชาติ เทคนิคเมตาจีโนมิกส์ (metagenomics) ถูกนำมาใช้ เพื่อค้นหายีนที่ต้องการจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม โดยการโคลนชิ้นส่วน DNA ของจุลินทรีย์ เข้าสู่ดีเอ็นเอเวกเตอร์ (DNA vector) เพื่อสร้างโคลนไลบรารี (clone library) จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนหรือสารประกอบทางชีวภาพเพื่อค้นหายีนที่ต้องการ [3]

เมตาจีโนมิกส์ (metagenomics)

เมตาจีโนมิกส์คือการศึกษาดีเอ็นเอจากจีโนม (genomic DNA; gDNA) ทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ส่วนใหญ่จุลินทรีย์เหล่านี้เพาะเลี้ยงไม่ได้ [4] เมตาจีโนมิกส์มีรายงานครั้งแรกในงานตีพิมพ์ของ Handelsman ปี ค.ศ 1998 [5] โดยการสร้างโคลนไลบรารีจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม แล้วตัด

แบบสุมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากนั้นโคลนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดเข้าสู่ดีเอ็นเอเวกเตอร์ (DNA vector) แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อสร้างโคลนไลบรารีขนาดใหญ่ และคัดเลือกหาชิ้นยีนที่ต้องการจากไลบรารี [6] รายละเอียดขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างจากสิ่งแวดลอม และการสกัดจีโนมิตีเอ็นเอ

จีโนมิตีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมสามารถเตรียมได้จาก 2 วิธี คือ สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยตรงไม่ผ่านการเพาะเลี้ยง (direct extraction) [3] และนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (enrichment) ก่อนแล้วสกัดดีเอ็นเอซึ่งเป็นวิธีแบบอ้อม (indirect extraction) แต่ข้อมูลที่ได้ไม่ครอบคลุมจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง โดยเฉพาะเชื้อที่ไม่ชอบอาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยง ส่วนการสกัดจีโนมิตีเอ็นเอทำได้หลายวิธีทั้งแบบดั้งเดิม (conventional method) และชุดสกัดสำเร็จรูป (kits) โดยการสกัดดีเอ็นเอต้องคำนึงถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีองค์ประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ต้องใช้วิธีการและสารเคมีสำหรับทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เหล่านั้นแตกต่างกันด้วย ขั้นตอนการสกัดจีโนมิตีเอ็นเอมี 3 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ การทำให้เซลล์แตก (cell lysis) ส่วนใหญ่ใช้สารดีเทอร์เจนต์ (detergent) และเอนไซม์ช่วยในการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ การกำจัดโปรตีน (protein elimination) ด้วยฟีนอลและคลอโรฟอร์ม และการตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) ด้วยเอทานอล [3]

2. การคัดเลือกเวกเตอร์ดีเอ็นเอ

เวกเตอร์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับชิ้นยีนและชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ช่วยเพิ่มโอกาสประสบความสำเร็จในการค้นหายีน พิจารณาจากขนาดของยีนที่ต้องการศึกษา จำนวนเวกเตอร์ดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น ชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน และวิธีการตรวจสอบผล โดยเวกเตอร์ดีเอ็นเอที่นิยมใช้ เช่น พลาสมิด (plasmid) คอสมิด (cosmid) ฟอสมิด (fosmid) และโครโมโซมแบคทีเรียสังเคราะห์ (bacterial artificial chromosomes; BAC) เป็นต้น พลาสมิดเป็นเวกเตอร์เหมาะสำหรับชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กไม่เกิน 15 kb [7] ส่วนชิ้นยีนขนาดใหญ่ขนาด 35-45 kb [7] นิยมใช้คอสมิด และโครโมโซมแบคทีเรียสังเคราะห์ใช้สำหรับชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 200 kb เช่น P1-derived artificial chromosome (PAC) yeast artificial chromosomes (YAC) [8] และ mammalian artificial chromosomes (MAC) [9]

3. การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์เจ้าบ้าน (host cell)

เซลล์แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพของการเพิ่มจำนวนของคอมปีแนนท์ดีเอ็นเอ การแสดงออกของยีน การคงตัวของพลาสมิดในเซลล์เจ้าบ้าน และการคัดเลือกลักษณะยีนเป้าหมายที่แตกต่างกัน ปัจจุบันเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้คือ *E. coli* มีหลายสายพันธุ์ เช่น DH5 α JM109 TOP10 และ BL21 เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Streptomyces* และ *Pseudomonas* [10-11] หลังจากทำการนำรีคอมปีแนนท์ดีเอ็นเอ เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้แล้ว เซลล์เจ้าบ้านแต่ละเซลล์จะมีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปแตกต่างกัน เรียกว่า โคลนไลบรารี

4. การคัดเลือกโคลนที่ต้องการจากเมตาจีโนมิกส์ไลบรารี

การคัดเลือกโคลนที่ต้องการจากโคลนไลบรารีมีอยู่ 4 วิธี ได้แก่ อาศัยการทำงานของโปรตีนที่แสดงออกจากยีนนั้นๆ (functional-based screening) อาศัยการหาลำดับเบสจากยีนนั้นๆ โดยตรง (sequencing-based screening) การกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ต้องการด้วยซับสเตรตจำเพาะ (substrate-induced gene expression screening; SIGEX) และการวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบที่เกิดจากยีนที่ต้องการ (compound configuration screening)

4.1 Functional-based screening

การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแต่ละโคลนจากไลบรารี เพื่อค้นหาโคลนที่ต้องการเมื่อโคลนได้รับยีน ทำให้สามารถตรวจสอบกิจกรรมของยีนที่ต้องการทำได้ 2 แบบ คือ ตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นแต่ละประเภท เช่น อะไมเลส (amylase) [12] เอสเทอเรส (esterase) [13] และเซลลูเลส (cellulase) [14] เป็นต้น และตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารอาหารจำเป็นอย่างเซลล์เจ้าบ้านที่แตกต่างไปจากเดิม เช่น การค้นหาโคลนสร้างเอนไซม์ไลซีนราซีเมส (lysine racemase; *lyr*) จากจุลินทรีย์ในดินโดยใช้เซลล์เจ้าบ้าน คือ *E. coli* สายพันธุ์ BCRC 51734 ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารที่เติม D-lysine [15]

4.2 Substrate-induced gene expression screening (SIGEX)

ในปี ค.ศ. 2005 Uchiyama [16] ได้นำเสนอวิธีคัดเลือกใหม่ขึ้นโดยอาศัยหลักการแสดงออกที่จำเพาะของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมของสารตั้งต้นหรือยีนของเอนไซม์กับสารตั้งต้นที่จำเพาะโดยการทำงานร่วมกันระหว่างโพรโมเตอร์ (promoter) และยีนรายงานผล (reporter gene) ซึ่งถูกใส่ไว้บนเวกเตอร์ เช่น operon-trap vector (p18GFP) ประกอบด้วย *Lac* promoter และยีน *gfp* สร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescence protein) มีตำแหน่งใส่ชิ้นดีเอ็นเอ (cloning site) อยู่ระหว่างโพรโมเตอร์ และยีน *gfp* สามารถแยกโคลนที่เป็น self-ligation โดยการกระตุ้นด้วย IPTG โคลนชนิดนี้จะไม่ขึ้น inserted DNA ทำให้ *Lac* promoter ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ได้ แต่โคลนที่มียีนที่ต้องการต้องกระตุ้นด้วยซับสเตรตของยีนนั้นและเมื่อยีนแสดงออกทำให้ยีน *gfp* ซึ่งอยู่ในตำแหน่งถัดไป (downstream) สร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียวขึ้น สามารถแยกโคลนนั้น เพื่อเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนและศึกษาคุณสมบัติต่อไป

4.3 Sequencing-based screening

อาศัยลำดับเบสที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (conserved sequence) ของยีนที่ต้องการค้นหา ใช้เป็นต้นแบบเพื่อสร้างโพรบ (probe) สำหรับติดตามด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization) หรือออกแบบไพรเมอร์ (primer) สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนโดยวิธี PCR จากโคลนในไลบรารี [3] หลังจากติดตามหาโคลนที่ต้องการได้แล้ว ศึกษาลำดับของเบสทั้งยีน (full length) ปัจจุบันการหาลำดับเบสถูกพัฒนาวิธีการอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถหาลำดับเบสของยีนได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว ตั้งแต่การหาลำดับเบสของยีนแบบวิธีของ Sanger biochemistry จนถึง

วิธี Next-generation sequencing การหาลำดับเบสของยีนด้วยวิธี Pyrosequencing ด้วยเครื่องมือจำเพาะได้แก่ 454 sequencer Illumina genome analyzer และ Solexa technology ในปัจจุบัน

4.4 Compound configuration screening

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบชนิดใหม่ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนที่ต้องการจากโคลนไลบรารี ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) อย่างเช่น HPLC-ESIMS นำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล จากนั้นจึงศึกษารายละเอียดของยีนที่สร้างสารประกอบดังกล่าว วิธีนี้สามารถค้นพบสารประกอบใหม่จากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ

การค้นพบเอนไซม์โดยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์

รายงานการค้นพบยีนด้วยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์ ตัวอย่างเช่น Sharma และคณะ [17] ใช้เทคนิคเมตาจีโนมิกส์ ค้นหาจากดินบริเวณภูเขาหิมลัยในประเทศอินเดียคัดเลือกยีนที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากทั้งหมด 90,700 โคลน ตรวจพบยีน *pAMY* ของเอนไซม์อะไมเลสที่มีขนาด 909 คู่เบส สร้างโปรตีนขนาด 38 kDa ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส เจริญบนอาหารที่เติม แป้ง อะไมโลส ไกลโคเจน และมอลโทส พบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 2.46 U/mg ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อนำลำดับเบสของยีน *pAMY* พบความคล้ายคลึงมากกว่าร้อยละ 80 กับยีนของแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้จากดิน (uncultured soil bacterium)

เอนไซม์ทนร้อนจากจุลินทรีย์ในบ่อน้ำพุร้อน

1. ความหลากหลายของจุลินทรีย์จากแหล่งน้ำพุร้อน

จุลินทรีย์ที่เจริญได้บริเวณน้ำพุร้อนซึ่งมีอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส คือ จุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophiles) และจุลินทรีย์กลุ่มทนความร้อนสูง (hyper-thermophiles) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป พบว่าจีโนมของจุลินทรีย์เหล่านี้มีปริมาณเบส G และเบส C สูง หรือสร้างโปรตีนเหมือนฮิสโตน (histone-like proteins) ได้มากขึ้นโดยพบในอาร์เคีย [18] นับตั้งแต่รายงานการค้นพบเอนไซม์จาก *Thermus aquaticus* บริเวณน้ำพุร้อนในปี ค.ศ. 1976 เป็นต้นมา 10 ปีหลังจากนั้นจึงได้มีการคิดค้นเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ทำให้การศึกษาทางชีวโมเลกุลก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันมูลค่าของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase สูงกว่า 100 ล้านดอลลาร์ต่อปี และจากการค้นพบจุลินทรีย์ขอบร้อนใหม่ ๆ นำไปสู่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมมากขึ้น (ตารางที่ 1) ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในบ่อน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เช่น [19] จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและอาร์เคียในน้ำพุร้อนบริเวณภาคกลางของประเทศไทย มีอุณหภูมิ 50-57 องศาเซลเซียส และมีปริมาณซัลไฟด์สูง ศึกษาจุลินทรีย์ในตะกอนดินจากน้ำพุร้อนโดยใช้ข้อมูลยีน *16S rRNA* และเทคนิค RFLP (restriction fragment length polymorphism) พบโคลนจากไลบรารีทั้งหมด 200 โคลน จำแนกความแตกต่างได้ 36 รูปแบบ และเป็นแบคทีเรีย 11 กลุ่มหลัก หนึ่งในสี่ของทั้งหมด (ร้อยละ 23) คือ *Acidobacteria* ส่วนที่เหลือ ถูกระบุว่าเป็น *Bacteroidetes Nitrospirae*

Proteobacteria *Deinococcus-Thermus* *Planctomycetes* *Verrucomicrobia* *Actinobacteria* *Chloroflexi* และ *Cyanobacteria* นอกจากนี้ยังพบกลุ่มอาศัย เช่น *Crenarhachaeota* และ *Euryarchaeota* และรายงานการศึกษาโครงสร้างชุมชนของจุลินทรีย์ชอบร้อนในตะกอนดินและน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนในเขตภาคใต้ของประเทศไทย [20] ด้วยเทคนิค 16S rDNA-PCR และ denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) พบว่าตะกอนดินและน้ำจากน้ำพุร้อนในเขตภาคใต้ของประเทศไทยจำนวน 8 แหล่ง ที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วงระหว่าง 53-75 องศาเซลเซียส และมีพีเอช ระหว่าง 6.5-8.3 กลุ่มประชากรแบคทีเรียที่พบเป็นจำนวนมากในตะกอนดินและน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนประกอบด้วย *Clostridium* *Bacillus* และ *Pseudomonas* อาศัยประกอบด้วย *Thermoprotei* *Methanothermobacter* เห็นได้ว่าในบ่อน้ำพุร้อนมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ทนร้อนหลายชนิด เช่น *Bacillus* sp. [21, 23, 25] ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ทนร้อนได้

ตารางที่ 1 เอนไซม์ทนร้อนที่ได้จากจุลินทรีย์ที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง

แหล่งของจุลินทรีย์	จุลินทรีย์	เอนไซม์	อ้างอิง
น้ำพุร้อน	<i>Bacillus</i> sp. WN.11	α -Amylase	[21]
ปล่องภูเขาไฟใต้ทะเลลึก	<i>Staphylothermus marinus</i>	α -Amylase	[22]
น้ำพุร้อน	<i>Bacillus thermoleovocans</i> ID-1	Lipase	[23]
ปล่องภูเขาไฟใต้ทะเลลึก	<i>Pyrococcus abyssi</i>	Alkaline phosphatase	[24]
ปุ๋ยหมัก	<i>Bacillus</i> sp.	Inulinase	[25]

2. การคัดเลือกเอนไซม์ทนร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนโดยเทคนิคเมตาจีโนมิกส์

ในประเทศไทยได้นำเทคนิคนี้สำหรับค้นหาเอนไซม์ทนร้อนจากน้ำพุร้อนหลายชนิด เช่น ยีน *Env Npu193A* ของเอนไซม์ neopullulanase-like จากตะกอนดินบ่อน้ำพุร้อนบ่อคลึง จังหวัดราชบุรี [26] โดยใช้เทคนิคการสร้างเมตาจีโนมิกส์ไลบรารี โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ ของจุลินทรีย์ทั้งหมด แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* จากนั้นเชื่อมต่อชิ้นส่วนทั้งหมดกับ genome-walker adaptor เพื่อเป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ สำหรับเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดังกล่าวด้วยวิธี nested PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ คือไพรเมอร์สำหรับ adaptor และไพรเมอร์จำเพาะสำหรับยีน *Env Npu193A* จากนั้นเชื่อมผลผลิต PCR เข้าสู่พลาสมิด pTZ57R/T เคลื่อนย้ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ตรวจสอบโคลนที่ต้องการโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนกับฐานข้อมูล ตรวจสอบกิจกรรมของ

เอนไซม์ สร้างเอนไซม์ neopullulanase-like ในยีสต์สายพันธุ์ *Pichia pasatoris* เปลี่ยนสับเปลี่ยนยีน *Env Npu193A* เข้าสู่พลาสมิด pPICZαA พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส เท่ากับ 23.24 ± 1.7 U/mg

นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบ *PLP* และ *Est1* ชนิดใหม่จากตะกอนดินบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ในจังหวัด ลำปาง [27] มีอุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส โดยการสร้างเมตาจีโนมิกส์ไลบรารีจากจีโนมดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ ทั้งหมดที่สกัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* คัดแยกชิ้นที่มีขนาดตั้งแต่ 1-10 Kb เชื่อมต่อกับพลาสมิด pZER0-2 และ ย้ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 ด้วยวิธี electroporation คัดเลือกโคลนที่มียีน *PLP* และ *Est1* ซึ่งมีกิจกรรม ของเอนไซม์ patatin-like phospholipase และ esterase ตามลำดับ สามารถย่อยไขมันอาหารเลี้ยงเชื้อ เกิดเป็นวงใส กิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิที่ 50-70 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มากกว่า 120 นาที ซึ่งมีศักยภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลากหลาย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ที่พบในระดับอุตสาหกรรม

เอนไซม์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ	การประยุกต์ใช้
α-Amylase ^a	90-100	Starch → dextrose syrups	ย่อยแป้ง ผลิตเบียร์ อบขนม ผงซักฟอก
α-Amylase ^b	50-60	Starch → dextrose syrups	ผลิตมอลโตส
Pullulanase	50-60	Starch → dextrose syrups	ผลิต glucose syrups
Xylanase	45-65	Craft pulp → xylan+lignin	อุตสาหกรรมกระดาษ
Cellulase	45-55, 95 ^a	Cellulose → glucose	ย่อยเซลลูโลส ผงซักฟอก
Protease	65-85	Protein → amino acids and peptides	อุตสาหกรรมฟอกหนัง ผลิตเบียร์
Lipase	30-70	Fat removal, hydrolysis interesterification, alcoholysis, aminolysis	ผงซักฟอก เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์ ยา นม
DNA polymerase	90-95	DNA amplification	พันธุวิศวกรรม/PCR

^a Amylase จากแบคทีเรีย ^b Amylase จากเชื้อรา.

ที่มา: Haki and Rakshit [28]

สรุป

เทคนิคเมตาจีโนมิกส์สามารถใช้ค้นหาเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถค้นพบเอนไซม์ชนิดใหม่ได้มากขึ้น และเป็นเอนไซม์ที่ทนร้อนซึ่งสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง เป็นที่ต้องการของกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก จุลินทรีย์ที่อาศัยในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เช่น บ่อน้ำพุร้อนซึ่งมีความหลากหลาย ดังนั้นการใช้วิธีเมตาจีโนมิกส์ เพื่อค้นหาเอนไซม์สำหรับเอนไซม์ทนร้อนชนิดใหม่ จึงมีศักยภาพในการค้นพบโดยสร้างไลบรารีโคลนจากตัวอย่างดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นมาก่อน แล้วทำการตัดและเชื่อมต่อดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าสู่เวกเตอร์ [6] จากนั้นค้นหาเอนไซม์ที่ต้องการจากไลบรารีโคลน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์จากยีนนั้น ๆ หรือใช้วิธีเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของยีนกับฐานข้อมูล ซึ่งมีรายงานการค้นพบเอนไซม์ทนร้อนจากน้ำพุร้อนชนิดใหม่ เช่น ยีน *Env Npu193A* สำหรับเอนไซม์ neopullulanase-like ยีน *PLP* สำหรับเอนไซม์ patatin-like phospholipase และยีน *Est1* สำหรับเอนไซม์ esterase มีกิจกรรมของเอนไซม์และมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Kumar, M.N., Muthukumaran, C. and Jayaraman, G. (2013). “Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: statistical optimization, purification and Characterization”, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2, 38-44.
- [2] Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M. and Nasu, M. (2000). “Monitoring impact of *in situ* biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE”, **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**. 38, 267-276.
- [3] Xing, M.N., Zhang, X.Z. and Huang, H. (2012). “Application of metagenomic techniques in mining Enzyme from microbial communities for biofuel synthesis”, **Biotechnology Advances**. 30, 920-929.
- [4] อัจฉา บุญมี. (2556). “เมตาจีโนมิกส์ : เปิดโลกแห่งจีโนมจุลินทรีย์ในธรรมชาติ”, **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 21(1), 71-82.
- [5] Handelsman, J. (2004). “Metagenomics : Application of genomics to uncultured microorganisms”, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 68(4), 669-685.
- [6] Steele, L.H. and Streit, R.W. (2005). “Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology”, **FEMS Microbiology Letters**. 247, 105-111.
- [7] Henne, A., Danief, R., Schmita, A.R. and Gottschalk, G. (1999). “Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate”, **Applied and Environmental Microbiology**. 65(9), 3901-3907.

- [8] Weier HU, Greulich-Bode KM, Wu J, Duell T. (2005). "Delineating rearrangements in single yeast artificial chromosomes by quantitative DNA fiber mapping", **Open Genomics Journal**. 2, 15–23.
- [9] Katona RL, Vanderbyl SL, Perez CF. (2011). "Mammalian artificial chromosomes and clinical applications for genetic modification of stem cells: an overview", **Methods Molecular Biology**. 738, 199–216.
- [10] Courtois, S., Cappellano, C.M., Ball, M., Francou, F.X., Normand, P. and Helynck, G. (2003). "Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products", **Applied Environmental Microbiology**. 69, 49–55.
- [11] Wilkinson, D.E., Jeanicke, T. and Cowan, D.A. (2002). "Efficient molecular cloning of environmental DNA from geothermal sediments", **Biotechnology Letter**. 24, 155–161.
- [12] Yun, J., Kang, S., Park, S., Yoon, H., Kim, M.J., Heu, S. and Ryu, S. (2004). "Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library", **Applied and Environmental Microbiology**. 70(12), 7229–7235.
- [13] Kim, Y.H., Kwon, E.J., Kim, S.K., Jeong, Y.S., Kim, J., Yun, H.D. and Kim, H. (2010). "Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library", **Biochem Biophys Res Commun**. 393, 45–49.
- [14] Pang, H., Zhang, P., Duan, C.J., Mo, X.C., Tang, J.L. and Feng, J.X. (2009). "Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase", **Current Microbiology**. 58, 404–408.
- [15] Chen, I.C., Lin, W.D., Hsu, S.K., Thiruvengadam, V. and Hsu, W.H. (2009). "Isolation and characterization of a novel lysine racemase from a soil metagenomic library", **Applied Environmental Microbiology**. 75, 5161–5166.
- [16] Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T. and Watanabe, T. (2005). "Substrate-induced gene expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes", **Nature Biotechnology**. 23(1), 88–93.
- [17] Sharma, S., Khan, G.F. and Qazi, N.G. (2010). "Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from northwestern Himalayas", **Applied Microbiology and Biotechnology**. 86, 1821–1828.
- [18] Lewin, A., Wentzel, A. and Valla, S. (2012). "Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments", **Current Opinion in Biotechnology**. 24, 1–10.

- [19] Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L. (2004). "Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand", **Journal of Basic Microbiology**. 44(6), 430-444.
- [20] สมพงศ์ โอทอง และพูนสุข ประเสริฐสรรพ. (2554). รายงานวิจัย เรื่อง ศักยภาพทางชีวภาพของจุลินทรีย์ชอบร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนในเขตภาคใต้สำหรับการผลิตไบโอฟิวเอล. โครงการวิจัย รหัส MRG5280236. มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- [21] Mamo, G. and Gessese, A. (1999). "A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11", **Journal of Applied Microbiology**. 86, 557-560.
- [22] Canganella, F., Andrade, C. and Antranikian, G. (1994). "Characterization of amylolytic and pullulytic enzymes from thermophilic archaea and from a new *Feravidobacterium* species", **Applied Microbiology and Biotechnology**. 42, 239-245.
- [23] Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J., Kim, D.S., Suhartono, M.T. and Pyun, Y.R. (1999). "Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1", **FEMS Microbiology Letters**. 179, 393-400.
- [24] Zappa, S., Rolland, J.L., Flament, D., Gueguen, Y., Boudrant, J. and Dietrich, J. (2001). "Characterization of a highly thermostable alkaline phosphatase from the euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*", **Applied and Environmental Microbiology**. 67, 4504-4511.
- [25] Allais, J.J., Lopez, G.H., Kammoun, S. and Baratti, J.C. (1987). "Isolation and Characterization of thermophilic bacterial strains with inulinase Activity", **Applied and Environmental Microbiology**. 53(5), 942-945.
- [26] Tang, K., Kobayashi, R.S., Champreda, V., Eurwilaichitr, L. and Tanapongpipat, S. (2008). "Isolation and characterization of a novel thermostable neopullulanase-like enzyme from a hot spring in Thailand", **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 72(6), 1448-1456.
- [27] Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongarama, T., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L. (2008). "Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library", **Journal of Biotechnology**. 133, 42-49.
- [28] Haki, D.G. and Rakshit, K.S. (2003). "Developments in industrially important thermostable enzymes: A review", **Bioresource Technology**. 89, 17-34.