# การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* สายพันธุ์ M06

# Specific primer design to α – Amylase of *Aspergillus fumigatus* Isolated M06

พิริยะ ปานอุทัย[1*] และ ณัฏยา ศรีสวัสดิ์[2]

Phiriya Panuthai[1*] and Nattaya Srisawat[2]

[1*]*นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะเทคโนโลยีชีวภาพมหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000*

[2]*อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000*

[1*]*Graduate student in Master of Science (Biotechnology) of Biotechnology Faculty, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000*

[2]*Lecturer in Master of Science (Biotechnology) of Biotechnology Faculty, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000*

[*]*Corresponding author, E mail:*pete.ars01@gmail.com

**บทคัดย่อ**

การผลิตพลังงานชีวภาพยุคใหม่โดยใช้กระบวนการ Consolidated bioprocessing (CBP) แบบ one-step เพื่อลดต้นทุนของกระบวนการผลิต โดยการปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ชนิดเดียวให้มีคุณสมบัติทั้งการย่อยสับสเตรทที่มีองค์ประกอบเป็นแป้งหรือเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลและการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลให้รวมอยู่ด้วยกันโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ในขั้นต้นจำเป็นต้องมีการคัดเลือกและแยกสกัดยีนที่สามารถย่อยแป้งหรือเซลลูโลสเป็นน้ำตาลจากจุลินทรีย์ เพื่อนำไปตัดต่อเข้าสู่ยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งการแยกสกัดยีนที่สร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งเป็นน้ำตาล โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction: PCR) นั้นจำเป็นต้องมีไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการ ดังนั้นในขั้นต้นจึงได้ศึกษาการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลส จากเชื้อรา *Aspergillus fumigates* สายพันธุ์ M06 โดยการค้นหาโปรตีนของเอนไซม์อะไมเลสในเชื้อรา *A. fumigatus* จากฐานข้อมูล National Center Biotechnology Information (NCBI) จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับการแปลรหัสของลำดับอะมิโนแอซิดโดยฟังก์ชัน tBlastN ซึ่งสามารถค้นพบโปรตีนของเอนไซม์อะไมเลสทั้งหมด 25 ชนิด มีความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ใน 7 กลุ่ม ได้เลือกออกแบบไพรเมอร์ใน 2 กลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi70989216 และ Gi70996257 พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถนำไปสังเคราะห์ cDNAได้ โดยให้ผลผลิตมีขนาด 758 คู่เบส และ 1,585 คู่เบส ตามลำดับ

***คำสำคัญ**: แอลฟาอะไมเลส, เชื้อรา Aspergillus fumigatus, ออกแบบไพรเมอร์*

**Abstract**

Consolidated bioprocessing is the recent advance for biofuel production. The strategy requires the expression of starch-hydrolysing enzymes in a fermenting yeast strain to achieve liquefaction, hydrolysis and fermentation by a single organism, which causes cost-effective conversion of raw starch to biofuels. Genetic engineering allocates to use this approach. Screening of *Aspergillus fumigatus* were done as well as isolate M06 was selected for high activity of enzyme α-amylase. Gene cloning of α-amylase is necessary in the first step. So, this study aims to design the primer of α-amylase which permits to use in gene cloning process. Searching protein of α-amylase was done in National Center Biotechnology Information (NCBI) database and were compared to nucleotide coding by tblastn function. Twenty-five protein accessions were found which can be arranging in seven groups following similarity in nucleotide sequence. The Gi70989216 and Gi70996257 accession used to primer design and test in cDNA process of *A. fumigates* isolate M06. The results show the DNA fragment of 758bp and 1585bp.

***Keywords:*** *α-amylase, Aspergillus fumigatus, primer design*

## 1. บทนำ

อุตสาหกรรมการผลิตแป้งจากมันสำปะหลังเป็นอุตสาหกรรมที่ใหญ่และสำคัญของประเทศไทย เกษตรกรไทยมีการปลูกมันสำปะหลังกันเป็นจำนวนมากถึง 7.4 ล้านไร่ในหนึ่งปีมีการใช้มันสำปะหลังสดมาผลิตเป็นแป้งจำนวนมากถึง 16.51 ล้านตัน และพบว่ามีกากมันสำปะหลังเหลือที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยปริมาณกากเปียกมีปริมาณมากถึง 3 - 4 ล้านตันต่อปี หรือคิดเป็นกากแห้งประมาณ 1 - 1.5 ล้านตันต่อปี (กล้าณรงค์, 2548) จึงต้องมีการกำจัดกากมันสำปะหลังเหลือทิ้งเพื่อลดของเสียจากโรงงานนี้อย่างถูกวิธี เนื่องจากกากมันสำปะหลังเป็นอินทรีย์วัตถุทำให้มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ ส่งกลิ่นเหม็นแก่ชุมชนในละแวกนั้น หรือหากมีการทิ้งลงสู่แหล่งน้ำก็อาจทำให้น้ำเน่าเสีย ก่อให้เกิดการแพร่โรคเข้าสู่ชุมชนได้ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลังนั้นเป็นคาร์โบไฮเดรตมีปริมาณเฉลี่ย 65-70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง (ชลดา และคณะ, 2547)

เอทิลแอลกอฮอลล์ หรือเอทานอลที่ผลิตโดยวิธีการทางชีวเคมี สามารถผลิตได้จากพืชทุกชนิด และสามารถนำทุกส่วนของพืชนั้นมาผลิตเอทานอลได้ โดยเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิต และวิธีการในการผลิตก็จะแตกต่างกันออกไปตามประเภทของวัตถุดิบที่ใช้ และปริมาณเอทานอลที่ได้ก็จะแตกต่างกันด้วย จากกระบวนการผลิตเอทานอลพบว่ามีการผลิตเอทานอลหลัก ๆ 2 ขั้นตอน คือ การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ และการหมักเพื่อให้เกิดเอทานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Cheng, 2009) ทำให้อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลมีการเสียเงินต้นทุนในการซื้อเอนไซม์ และยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการ Consolidated bioprocessing (CBP) แบบ one-step เพื่อลดขั้นตอนและต้นทุนของกระบวนการผลิต โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae*ให้มีคุณสมบัติทั้งการย่อยสับสเตรทที่มีองค์ประกอบเป็นแป้งหรือเซลลูโลสและเปลี่ยนเป็นเอทานอลให้รวมอยู่ด้วยกัน โดยการโคลนยีนที่สร้าง

เอนไซม์ Cellobiohydrolase (CBH) ของเชื้อรา *Trichoderma reesei (cbh1* และ*cbh2)*, *A. niger (cbhB)* และ *Phanerochaete chrysosporium (cbh1–4)* ให้มีการแสดงออกในยีสต์ (Hahn-Hägerdal *et al*., 2007) และได้มีการศึกษาแบคทีเรีย *Anaerocellum thermophilum* ที่สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นเอทานอลได้โดยตรงโดยขบวนการ CBP (Bolshakova *et al*., 1994) การโคลนยีน β-glucosidase จาก *Thermobifida fusca* เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ MS04 (Muñoz-Gutiérrez *et al*., 2012)

การผลิตเอทานอลในขั้นตอนเดียวโดยขบวนการ CBP นั้น ต้องอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนที่สามารถย่อยแป้งหรือเซลลูโลสเข้าสู่ยีสต์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งขั้นต้นนั้นต้องมีการคัดเลือกและแยกสกัดยีนในกลุ่มที่สามารถย่อยแป้งหรือเซลลูโลสเป็นน้ำตาลก่อน จึงได้ศึกษาการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *A. fumigates* สายพันธุ์ M06 เพื่อใช้สำหรับการแยกสกัดยีนสำหรับตัดต่อเข้ายีสต์เพื่อผลิตเอทานอลในขั้นตอนเดียวต่อไป

การแยกสกัดยีนที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction: PCR) นั้นต้องใช้ไพรเมอร์ (DNA primer) เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอ แม่แบบ ซึ่งจะเข้าคู่กับด้าน 3' ของดีเอ็นเอแม่แบบ โดยไพรเมอร์ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นในการ สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ก่อนที่จะเริ่มทำพีซีอาร์ได้นั้น เราต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแม่แบบบริเวณช่วงปลายของส่วนที่เราต้องการเพิ่มจำนวนก่อน เพื่อนำมาสังเคราะห์ ไพรเมอร์ ซึ่งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำเป็นต้องมีไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ถือเป็นปัจจัยหนึ่งของความสำเร็จในการทำ PCR คือต้องออกแบบไพรเมอร์ให้เหมาะสม เพื่อทำให้ผลผลิต PCR เกิดประสิทธิภาพสูงสุด (Yuryev, 2007)

**2. วัตถุประสงค์**

เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์ M06 สำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae*

**3. อุปกรณ์และวิธีการ**

3.1 เชื้อราที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้ใช้เชื้อ *A. fumigates* จากการศึกษาของเพชรลดาและกำไล (2546) ที่ได้คัดแยกเชื้อรามาจากกากมันสำปะหลัง และพบว่าเชื้อรา *A. fumigatus* สายพันธุ์ M06 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสสูง

3.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลส

ค้นหาลำดับอะมิโนแอซิดของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *A. fumigates* จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information: NCBI จากนั้นนำไปเปรียบเทียบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันที่ถูกแปลรหัสในทุกเฟรมโดยฟังก์ชัน tBlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของเอนไซม์อะไมเลสในการออกแบบไพรเมอร์ โดยเลือกออกแบบไพรเมอร์ให้มีความยาว 20-22 คู่เบส, มี

ปริมาณ GC 40-60% และ มีค่า Tm 50-60 องศาเซลเซียส

3.3 การสกัด Total RNA

เลี้ยงเชื้อรา *A. fumigatus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าอัตโนมัติความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 42 และบดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นสกัด Total RNA ตามคู่มือของชุดสกัด Isolate II RNA Plant Kit (bioline, UK)

3.4 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

3.4.1 สร้าง cDNA สายแรกจาก Total RNA โดยใช้ RevertAid First Strand cDNA synthesis (Thermo scientific, USA)

3.4.2 การสังเคราะห์ cDNA

3.4.2.1 การสังเคราะห์ cDNAของยีน ITS และß-Tubulin

นำFirst Strand cDNAที่ได้จากข้อ 3.4.1สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วน ITS และ ß-Tubulin ของเชื้อรา *A. fumigates* จากการศึกษาของ Ratnasri et al. (2014) โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ 1st strand 5 µl, Primer forward 0.5 µM, Primer reverse 0. 5 µM, 1X My Taq reaction buffer และ MyTaq™ DNA polymerase (Bioline, UK) 2.5 unit ทำปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 20 µl

โดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้ Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

3.4.2.2 การสังเคราะห์ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลส

นำ First Strand cDNAที่ได้จากข้อ 3.4.1 สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากข้อ 3.2 สำหรับการเพิ่มปริมาณ cDNA ในส่วนของยีนแอลฟาอะไมเลส โดยใช้ปฏิกิริยา และสภาวะของ PCR ดังข้อ 3.4.2.1

3.4.3 ตรวจสอบชิ้น cDNA ที่สังเคราะห์ได้ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

**4. ผลการวิจัย**

4.1 การค้นหาลำดับเบสของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ค้นพบลำดับอะมิโนแอซิดของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *A. fumigatus* จากฐานข้อมูล NCBI ทั้งหมด 25 ลำดับอะมิโนแอซิด เมื่อนำไปหาลำดับเบสที่เหมือนกับการแปลรหัสจากอะมิโนแอซิดทั้ง 25 ลำดับอะมิโนแอซิด โดยใช้ tBlastN พบลำดับเบสที่เหมือนกับอะมิโนแอซิดของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เป็น 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

นิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi146322931 มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีนหมายเลข KEY75354.1 ด้วยความเหมือน 98%

นิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi70996257 มีความเหมือนกับโปรตีนหมายเลข KEY79883.1 และ EDP56751.1 ด้วยความเหมือน 99% โดยมีความ

เหมือนเป็น 100% กับโปรตีนหมายเลข EAL90846.1 และ XP_752884.1

นิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi70988702 มีความเหมือนเป็น 93% กับโปรตีนหมายเลข KEY80426.1, XP_749208.1, EDP53736.1และ EAL87170.1

นิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi70993931มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีนหมายเลข KEY83532. 1, XP_751813. 1, EDP50387. 1และ EAL89775.1 ด้วยความเหมือน 97%

นิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi70989216 มีความเหมือนเป็น 100%กับโปรตีนหมายเลข KEY79706.1, EDP53984.1, XP_749458.1และ EAL87420.1

นิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi70985810มีความเหมือนกับโปรตีนหมายเลข KEY81310.1 ด้วยความเหมือน 100% และมีความเหมือนกับโปรตีนหมายเลข XP_748411.1, EAL86373.1และ KMK58769.1 ด้วยความเหมือน 98% และมีความเหมือนเป็น 95% กับโปรตีนหมายเลข EDP53568.1

นิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi71001995มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับโปรตีนหมายเลข EAL93641.1 และ XP_755679.1 ด้วยความเหมือนเป็น 93% และมีความเหมือนเป็น 96% กับโปรตีนหมายเลข EDP54851.1

**ตารางที่ 1** แสดงนิวคลีโอไทด์ทั้ง7กลุ่มของอะมิโนแอซิดของเอนไซม์อะไมเลสทั้งหมด 25ลำดับอะมิโนแอซิด

| Nucleotide (Gi) | Protein (Genbank) | %Identify |
|---|---|---|
| 146322931 | KEY75354.1 | 98 |
| 70996257 | KEY79883.1 | 99 |
| | EDP56751.1 | 99 |
| | EAL90846.1 | 100 |
| | XP_752884.1 | 100 |
| 70988702 | KEY80426.1 | 93 |
| | XP_749208.1 | 93 |
| | EDP53736.1 | 93 |
| | EAL87170.1 | 93 |
| 70993931 | KEY83532.1 | 97 |
| | XP_751813.1 | 97 |
| | EDP50387.1 | 97 |
| | EAL89775.1 | 97 |
| 70989216 | KEY79706.1 | 100 |
| | EDP53984.1 | 100 |
| | XP_749458.1 | 100 |
| | EAL87420.1 | 100 |
| 70985810 | KEY81310.1 | 100 |
| | XP_748411.1 | 98 |
| | EDP53568.1 | 95 |
| | EAL86373.1 | 98 |
| | KMK58769.1 | 98 |
| 71001995 | EAL93641.1 | 93 |
| | XP_755679.1 | 93 |
| | EDP54851.1 | 96 |

4.2 การออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน แอลฟาอะไมเลส

เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์โดยดูจากค่า % identity ที่สูงสุด 2 ลำดับได้แก่นิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi 70989216 และ Gi70996257 ซึ่งมีความยาวประมาณ 2,000 คู่เบส สำหรับเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้การพิจารณาให้มีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 40-60% และ มีค่า Tm 50-60 องศาเซลเซียส โดยให้ส่วนไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (Primer forward: F) มีตำแหน่งอยู่บริเวณส่วนต้นของลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนไพรเมอร์รีเวิร์ส (Primer reverse: R) ได้ออกแบบเป็น 2 ตำแหน่ง คือที่ตรงกลาง (R1) และส่วนปลาย (R2) ของลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีลำดับเบสเป็นดังนี้

70989216_F: GCATGGAAGTCCAGGTCTATC

70989216_R1: CGTCAGAGAGCTTGTGTTGC

70989216_R2: TCGCCCTTATCCATGCTGAC

70996257_F: GGAATGGCGGAAATGGAATG

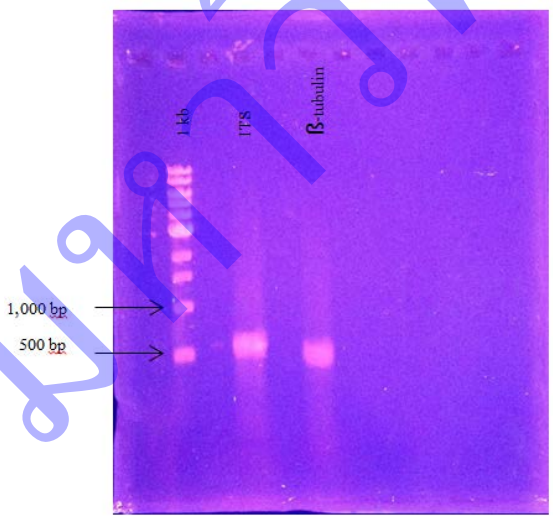
70996257_R1: GGTCCCTGAGTCTTCCGAAC

70996257_R2: ATCCTCGACGGTCAATCGTG

4.3 การสังเคราะห์ cDNA

4.3.1 การสังเคราะห์ cDNAของยีน ITS และß-Tubulin

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยีน ITS และ ß-Tubulin เป็นตัวควบคุม (Control) การสังเคราะห์ cDNA เนื่องจากยีนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (Constitutive gene) และมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อรา *A. fumigates* ที่ได้จากการศึกษาของ Ratnasri et al. (2014) จากการศึกษาพบว่าสามารถสังเคราะห์ cDNAของเชื้อรา *A. fumigates* สายพันธุ์ M06 ได้ โดยปรากฏแถบ DNA 604 bp และ 520 bp ตามลำดับ (รูปที่ 1)

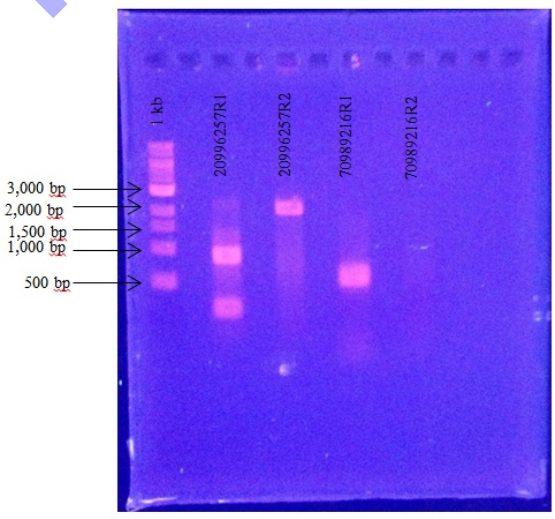



**รูปที่ 1** แสดงผลการสังเคราะห์ cDNAโดยใช้ไพรเมอร์ของยีน ITS และ ß-tubulin ซึ่งแสดงแถบ DNA ที่ 604 bp และ 520 bp ตามลำดับ

4.3.2 การสังเคราะห์ cDNAของยีนแอลฟาอะไมเลส

การสังเคราะห์ cDNAที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสด้วยไพรเมอร์70996257_F กับ 70996257_R1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 758 pb ส่วนการสังเคราะห์ cDNA ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลส ด้วยไพรเมอร์70996257_F กับ70996257_R2 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1585 bp (รูปที่ 2 )

การสังเคราะห์ cDNAที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสด้วยไพรเมอร์70989216_F กับ 70989216_R1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 600 bp ส่วนการสังเคราะห์ cDNA ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลส ด้วยไพรเมอร์70989216_F กับ70989216_R2 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (รูปที่ 2) ซึ่งอาจเป็นเพราะไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ยังไม่มีความเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR




**รูปที่ 2** แสดงผลการสังเคราะห์ cDNAโดยใช้ไพรเมอร์ของยีน α-อะไมเลส โดย 70996257_F กับ70996257_R1ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 758pb, 70996257_F กับ70996257_R2ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1585bpและ 70989216_F กับ 70989216_R1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 600bpตามลำดับส่วน 70989216_F กับ70989216_R2ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

**5. การอภิปรายผล**

5.1 การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกยีน ITS และ β-tubulin เป็นตัวควบคุม (Positive control) กระบวนการสังเคราะห์ cDNA เนื่องจากยีนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (Constitutive gene) และมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อรา *A. fumigates* ซึ่งผลที่ได้สามารถสังเคราะห์ cDNA ได้ขนาดที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Ratnasri *et al*. (2014) จึงแสดงให้เห็นว่าวิธีการสังเคราะห์ cDNA ที่ใช้สามารถใช้ได้ นอกจากนี้ยีนทั้ง 2 ชนิดนี้ยังมีความจำเพาะต่อเชื้อรา *A. fumigatus* จึงเป็นการยืนยันว่าเชื้อราหมายเลข M06 ที่แยกได้จากกากมันสำปะหลังเป็นเชื้อรา *A. fumigates* จริง ซึ่งตรงกับที่ได้จัดจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

5.2 cDNAที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสทั้ง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น ต้องมีการนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อตรวจสอบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกับยีนแอลฟาอะไมเลสที่มีในฐานข้อมูล NCBI หรือไม่ ต่อไป

5.3 cDNA ที่สังเคราะห์ได้นี้ต้องมีการนำไปโคลนและถ่ายเข้าสู่ยีสต์ (*S. cerevisiae*) เพื่อศึกษาการแสดงออก เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลแบบขั้นตอนเดียวต่อไป

**6. บทสรุป**

ออกแบบไพรเมอร์ใน 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 70989216 และ 70996257 โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถนำไปสังเคราะห์ cDNAได้ โดยให้ผลผลิตมีขนาด 758 คู่เบส และ 1,585 คู่เบส ตามลำดับ

**7. กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบพระคุณผศ.ดร.พรพิมล เกียรติภาพันธ์ และดร. กำไล เลาหพัฒนาเลิศ สำหรับแนวคิดวิจัย และคำแนะนำ และขอขอบพระคุณอาจารย์ธนัชยา เกณฑ์ขุนทด สำหรับไนโตรเจนเหลวที่นำมาใช้บดตัวอย่าง

**8. เอกสารอ้างอิง**

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2548. การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อลดต้นทุนการผลิต และปลอดจากผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม.ทำเนียบผลการวิจัย. 13: 33-35

ชลดา ซื่อสัตย์, บงกชรัตน์ ปิติยนต์, ธีรภัทร ศรีนคร คุตร และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2547. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล.เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 42 : 450-458.

เพชรลดา ปั้นหยา และกำไล เลาหพัฒนาเลิศ. 2556. การคัดกรองและคัดแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสอะไมเลส และเพคติเนสจากกากมันสำปะหลังสด.การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยรังสิต. 175-180

Bolshakova, E. , Ponomariev, A. , Novikov, A. , Svetlichnyi, V. A. , Velikodvorskaya, G. A. 1994. Cloning and expression of genes coding for carbohydrate degrading enzymes of *Anaerocellum thermophilum*in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202: 1076-1080.

Cheng, J. 2009. Biomass to Renewable Energy Processes, Taylor and Francis Group, New York.

Hahn-Hägerdal, B. , Karhumaa, K. , Fonseca, C. , Spencer-Martins, I. andGorwa-Grauslund, M. F. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 74( 5) : 937-953.

Muñoz-Gutiérrez, I. , Oropeza, R. , Gosset, G. , Martinez, A. 2012. Cell surface display of a β-glucosidaseemploying the type V secretion system on ethanologenic Escherichia coli for the fermentation of cellobiose to ethanol. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39(8): 1141-1152.

Ratnasri P.V, Lakshmi B.K.M, Ambika Devi K., and HemalathaK. P. J. 2014. Isolation characterization of *Aspergillus fumigattus* and optimization of cultural conditions for amylase production. International journal of research in engineering and technology 3(2): 457-463.

Yuryev, A. 2007. Methods in Molecular Biology: PCR Primer Design. Humana press: Totowa, New Jersey.