# การศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์บางประการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส สายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* DNP0201 ซึ่งแยกได้จากดินป่าชายเลน ในจังหวัดระยอง ประเทศไทย

# Study on several enzymatic characteristics of the amylase-producing bacteria, *Pseudomonas plecoglossicida* DNP0201, isolated from mangrove soil in Rayong Province, Thailand

ชนัญลญา ธรรมเกษร[1], สุนิสา บุญมา[2], อัยยะ จันทรศิริ[3]

**บทคัดย่อ**

การวิจัยศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากดินตะกอนป่าชายเลนปากแม่น้ำระยอง จังหวัดระยอง และเพื่อศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์บางประการของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่คัดเลือกได้ งานวิจัยนี้ทำการแยกแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลนปากแม่น้ำระยองได้ทั้งสิ้นจำนวน 123 ไอโซเลท และพบว่าแบคทีเรียรหัสไอโซเลท DNP0201 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากการวิเคราะห์ด้วยจานอาหารแข็ง Starch Agar เมื่อทำการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียรหัสไอโซเลท DNP0201 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่าแบคทีเรียรหัสไอโซเลท DNP0201 คือ แบคทีเรีย *Pseudomonas plecoglossicida* DNP0201 ซึ่งมีข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์อะไมเลสค่อนข้างน้อย เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้ถูกทำให้กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.33 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ดิบ และมีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เป็น 2.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีขนาด 58 กิโลดาลตันโดยประมาณ การศึกษาวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่พบแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* จากดินตะกอนป่าชายเลนของจังหวัดระยอง ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

**คำสำคัญ :** เอนไซม์อะไมเลส, แบคทีเรีย *Pseudomonas plecoglossicida*, ดินตะกอนป่าชายเลน, คุณสมบัติของเอนไซม์

[1] นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากระบวนการอุตสาหกรรมเคมีและสิ่งแวดล้อม (M-ICPE) คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

[2] อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

[3] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

## Abstract

This research aimed to isolate and screen the amylase-producing bacteria collected from mangrove soil in the Rayong River Estuary, Rayong Province and to study several enzymatic characteristics of the screened amylase-producing bacteria. One hundred and twenty-three bacterial isolates were obtained from mangrove soil in the Rayong River Estuary and the bacterium with isolate number DNP0201 was selected as the amylase-producing candidate by Starch Agar analysis. The DNP0201 was identified as *Pseudomonas plecoglossicida* DNP0201, the narrow formation of the amylase-producing bacterium, by 16S rRNA gene sequence analysis and phylogenetic tree data. The amylase was precipitated by saturated ammonium sulphate at a range from 30 to 80% for purification, It was increasing of 1.33 fold when compared to the crude enzyme. The specific activity of the partially purified enzyme was 2.24 U/mg. SDS-PAGE revealed that the molecular weight of the enzyme was approximately 58 kDa. This research is the first report of *P. plecoglossicida* isolated from mangrove soil in Rayong Province that has been reported to produce amylase.

**Keywords:** Amylase, *Pseudomonas plecoglossicida*, Mangrove soil, Enzymatic characteristic

**ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย**

เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) ชนิด α-1, 4 และชนิด α-1, 6 ในโครงสร้างของแป้ง (Starch) ไกลโคเจน (Glycogen) และพอลิแซคคาไรด์ที่มีความเกี่ยวข้องกับแป้ง (Starch-related polysaccharide) ให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) ไดแซคคาไรด์ (Disaccharides) และมอนอแซคคาไรด์ (Monosaccharides) เอนไซม์อะไมเลสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการย่อยสลายสายโซ่พอลิแซคคาไรด์ ได้แก่ กลุ่มเอนโด-อะไมเลส (Endo-amylase) และกลุ่มเอกโซ-อะไมเลส (Exo-amylase) เอนไซม์อะไมเลสในกลุ่มเอนโด-อะไมเลส เช่น เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α-Amylase, EC 3.2.1.1) มีสมบัติในการย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์ชนิด α-1, 4 ที่อยู่ภายในโครงสร้าง (Inner glycosidic bond) ของแป้งให้เป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์หลายชนิดและน้ำตาลกลูโคส ส่วนเอนไซม์อะไมเลสในกลุ่มเอกโซ-อะไมเลส เช่น เอนไซม์เบต้า-อะไมเลส (β-Amylase, EC 3.2.1.2) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase, EC 3.2.1.3) มีสมบัติในการย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์ชนิด α-1, 4 ด้านฝั่งปลายที่ไม่รีดิวซ์ (Non-reducing end) ของแป้งให้เป็นน้ำตาลมอลโทสและน้ำตาลกลูโคส (Mohanan & Satyanarayana, 2018) ในปัจจุบันเอนไซม์อะไมเลสถูกใช้ในกลุ่มอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพและเคมีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแป้ง ส่งผลให้เอนไซม์อะไมเลสมีส่วนแบ่งทางการตลาดของอุตสาหกรรมเอนไซม์ถึงร้อยละ 25 ของตลาดเอนไซม์โลก (Suriya et al., 2016)

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* เป็นแบคทีเรียก่อโรค (Pathogen) ที่มีรายงานทางจุลชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการครั้งแรกในปี ค.ศ. 2000 (Nishimori et al., 2000) โดยแยกได้จากปลาอายุ (Ayu, *Plecoglossus altivelis*) สัณฐานของเซลล์แบคทีเรียเป็นรูปท่อน (Rod) ชนิดแกรมลบ (Gram-negative) แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีในบนจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar ที่มีค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 5 ถึง 9 อุณหภูมิ

ระหว่าง 10 ถึง 30 องศาเซลเซียส และมีรายงานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1994 ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. plecoglossicida* ทำให้เกิดภาวะท้องมานเนื่องจากเลือดออก (Haemorrhagic ascites) ในปลาอายุ ปลาเทราต์สายรุ้ง (Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) และปลาจวด (Large yellow croaker, *Larimichthys crocea*) (Mao et al., 2013) แม้ยังไม่ปรากฏรายงานการใช้ประโยชน์แบคทีเรียสายพันธุ์ *P. plecoglossicida* ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพและเคมีชีวภาพ แต่รายงานในปี ค.ศ. 2018 แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. plecoglossicida* สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) ที่นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพและวัสดุเชิงการแพทย์ได้ (Sabarinathan et al., 2018) ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นในสกุล *Pseudomonas* sp. มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพและเคมีชีวภาพ เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Hana et al., 2013) เอนไซม์เบต้า-อะไมเลส (Mohanan & Satyanarayana, 2018) และเอนไซม์ลิเพส (Lipase) (Khannous et al., 2014) เป็นต้น

ปัญหาสำคัญของการนำแบคทีเรียรวมถึงเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพและเคมีชีวภาพ คือ การขาดสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงหรือมีคุณลักษณะที่อุตสาหกรรมต้องการ ดังนั้นการศึกษาวิจัยที่เน้นการเสาะหาสายพันธุ์แบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติจึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่ไม่สามารถละเลยได้ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าระบบนิเวศทางทะเลและชายฝั่งเป็นแหล่งธรรมชาติที่มีศักยภาพในแยก (Isolation) สายพันธุ์แบคทีเรียเพื่ออุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นระบบนิเวศที่มีพลวัตรหรือการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวภาพอยู่เสมอ จึงทำให้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่มักมีคุณลักษณะพิเศษ รวมถึงมีคุณลักษณะทางเอนไซม์ที่เหมาะสมต่ออุตสาหกรรม (Suriya et al., 2016)

จากเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงดำเนินการแยก คัดเลือก และระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากดินตะกอนป่าชายเลน ปากแม่น้ำระยอง จังหวัดระยอง รวมถึงการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์บางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อเป็นข้อมูลให้แก่อุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพและเคมีชีวภาพในการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ท้องถิ่นไปประยุกต์ใช้ต่อไป

**วัตถุประสงค์การวิจัย**

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดระยอง
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์บางประการของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสสายพันธุ์ *Pseudomonas plecoglossicida* DNP0201 ที่แยกและคัดเลือกได้

**สมมติฐานการวิจัย**

แบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดระยองมีคุณลักษณะทางเอนไซม์อะไมเลส

**วิธีดำเนินการวิจัย**

**สารเคมีและความปลอดภัยทางชีวภาพ**

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยมีคุณภาพอยู่ในระดับวิเคราะห์ (Analytical grade) และระดับจุลชีววิทยา (Microbiological grade) กระบวนการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลชีววิทยาในทุกขั้นตอนควบคุมด้วยมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับ 2 (Biosafety level 2)

**การเก็บตัวอย่างดินตะกอนจากป่าชายเลนและการแยกแบคทีเรีย**

ดินตะกอนที่นำมาใช้แยกแบคทีเรียดำเนินการเก็บมาจากป่าชายเลนพระเจดีย์กลางน้ำ ปากแม่น้ำระยอง ตำบลปากน้ำ อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง (พิกัด ละติจูด 12.6657056 องศาเหนือ ลองจิจูด 101.2499031 องศาตะวันออก) ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 (ปลายฤดูฝน) จำนวน 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างดินตะกอนมีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เฉลี่ย 6.26 และตัวอย่างดินตะกอนมีอุณหภูมิ ณ จุดเก็บตัวอย่างเฉลี่ย 30.01 องศาเซลเซียส เก็บรักษาตัวอย่างดินตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (Autoclaved plastic bag) และนำไปแยกแบคทีเรียทั้งหมดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การแยกแบคทีเรียทั้งหมดในดินตะกอนที่เก็บได้ดำเนินการโดยเจือจางดินตะกอนน้ำหนัก 1 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Autoclaved and distilled water) แบบเป็นลำดับทีละสิบเท่า (Ten-fold serial dilution) จนถึงระดับความเจือจางของสารแขวนลอยดินตะกอน (Soil suspension) ที่ $10^{-5}$ เท่า จากนั้นทำการเกลี่ย (Spread) สารแขวนลอยดินตะกอนที่ทำการเจือจางในแต่ละความเจือจางลงบนผิวหน้าของจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar (HiMedia, India) ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่าง 6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อโคโลนี (Colony) ของแบคทีเรียปรากฏขึ้นบนจานอาหารแข็ง จึงทำการแยกแบคทีเรียที่มีสัณฐานของโคโลนีแตกต่างกันออกเป็นไอโซเลท (Isolate)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทลงในหลอดอาหารเหลว Tryptone Soya Broth (HiMedia, India) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปขีด (Streak) ลงบนผิวหน้าของจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar เพื่อแยกแบคทีเรียให้เป็นไอโซเลทสายพันธุ์บริสุทธิ์ (Pure isolate) เมื่อได้ไอโซเลทของแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จึงทำการตั้งชื่อไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้

**การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส**

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสดำเนินการโดยวิธีคัดเลือกด้วยจานอาหารแข็ง Starch Agar (HiMedia, India) ซึ่งเป็นจานอาหารแข็งที่มีแป้งชนิดละลายน้ำหรืออะไมลัม (Soluble amylum) เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสดัดแปลงจากงานวิจัยของรติมาและชนัญลญา (2560) โดยหยดสารแขวนลอยแบคทีเรีย (Bacterial suspension) ที่มีอายุเชื้อ 24 ชั่วโมง แต่ละไอโซเลทปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของจานอาหารแข็ง Starch Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะสามารถย่อยสลายแป้งชนิดละลายน้ำในจานอาหารแข็งให้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต เมื่อทำการย้อมสีจานอาหารแข็งด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine) จะปรากฏวงใส (Hydrolytic zone) โดยรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสภายในระยะเวลา 1-2 นาที ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรีย เพื่อนำไปคำนวณหาค่า

ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (Hydrolytic capacity, HC) จากอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)

**การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส**

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสใช้วิธีทางอณูชีววิทยาโดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Ferbiyanto และคณะ (2015) วิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในงานวิจัย คือ การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ดำเนินการด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส Mastercycler Nexus gradient (Eppendorf, Germany) ไพรเมอร์ (Primer) ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ ไพรเมอร์ 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) และไพรเมอร์ 1492R (5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′) (Sigma-Aldrich, Singapore) สารเคมีในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ สารปฏิกิริยาสำเร็จรูป One PCR™ (Bio-Helix, Taiwan) เมื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA เสร็จสิ้นจึงทำการวัดปริมาณยีนที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเครื่องวัดสารปริมาณน้อย NanoDrop One (Thermo Scientific, USA) และวิเคราะห์ขนาดของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Cleaver Scientific, UK) บนแผ่นเจลอะกาโรส (1% TBE Agarose gel) (Omnipur, Germany) จากนั้นย้อมแผ่นเจลอะกาโรสด้วยสีย้อม Novel Juice DNA Staining Reagent (Bio-Helix, Taiwan) ในกรณีที่ยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนได้มีความเข้มข้นมากกว่า 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จึงส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) สหรัฐอเมริกา โดยใช้โปรแกรม BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อระบุสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลส แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลส ดำเนินการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Seaview 4.6.4 (Gouy et al., 2010) โดยใช้ Neighbor-Joining algorithm (NJ) และทำการ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

**การทำให้เอนไซม์อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์**

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลส (แบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201) ลงในหลอดอาหารเหลว Tryptone Soya Broth ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว Starch Broth (HiMedia, India) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.3 โดยทำการปลูกเชื้อ (Inoculation) แบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201 ลงในอาหารเหลว Starch Broth ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจึงทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์อะไมเลสดิบ (Crude enzyme) ที่ผลิตได้โดยการปั่นเหวี่ยงอาหารเหลว Starch Broth ที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifugation) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที นำเอนไซม์ดิบที่ผลิตได้ไปสกัดให้กึ่งบริสุทธิ์ (Partial purification) ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้นอิ่มตัว (Saturation concentration) ร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Wu และคณะ (2018) จากนั้นแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากเอนไซม์ด้วยชุดเยื่อกรองสำเร็จรูป Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units ที่มีเยื่อกรองขนาด 30 กิโลดาลตัน (Merck, Germany) เก็บเอนไซม์อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ

ทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อะไมเลสทั้งเอนไซม์ดิบและเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยแยกเอนไซม์บนแผ่นอะคริลาไมด์สำเร็จรูป Mini-PROTEAN® Precast Gels (Bio-Rad, USA) และย้อมสีด้วยวิธี Silver staining (Bollag *et al*., 1996)

**ค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์**

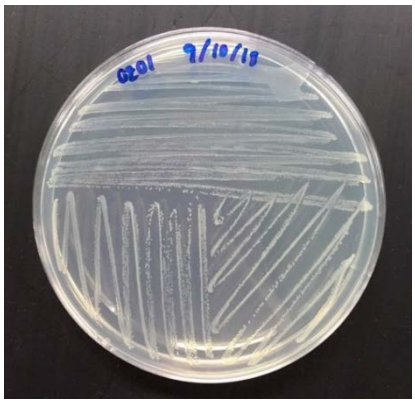
สารละลายปฏิกิริยา (Reaction mixture) และสภาวะที่ใช้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสดัดแปลงจากงานวิจัยของ Mishra และ Behera (2008) โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 (ควบคุมสภาวะความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีแป้งชนิดละลายน้ำ (อะไมลัม) ความเข้มข้นร้อยละ 1.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เป็นสารตั้งต้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยแป้งชนิดละลายน้ำวิเคราะห์โดยใช้วิธี DNS (Miller, 1959) การวัดปริมาณของเอนไซม์อะไมเลสในหน่วยมิลลิกรัมเพื่อใช้คำนวณหาค่ากิจกรรมเฉพาะใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-rad, USA)

ค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์หาได้จากอัตราส่วนของค่ากิจกรรมทั้งหมด (Total activity) ของเอนไซม์ต่อปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิกรัม ค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อะไมเลสคำนวณได้จากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งชนิดละลายน้ำเป็นน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 1 ไมโครโมลในระยะเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนดต่อปริมาตรเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร

**สรุปผลการวิจัย**

การแยกแบคทีเรียจากดินตะกอนของป่าชายเลนพระเจดีย์กลางน้ำ ปากแม่น้ำระยอง จังหวัดระยอง จำนวน 30 ตัวอย่างด้วยจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar พบแบคทีเรียที่มีสัณฐานของโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 123 ไอโซเลท เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสด้วยจานอาหารแข็ง Starch Agar จากแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้ พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส จำนวน 25 ไอโซเลท หรือคิดเป็นร้อยละ 20.33 ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 เป็นไอโซเลทที่มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยต่อ เนื่องจากแสดงค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (HC) บนจานอาหารแข็ง Starch Agar ที่ค่อนข้างสูง

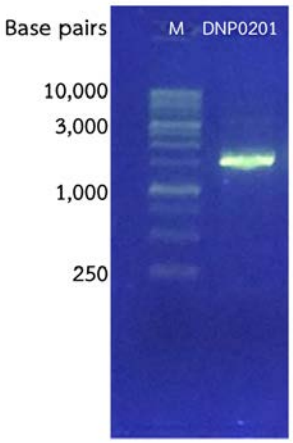
แบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 มีลักษณะสัณฐานโคโลนี ได้แก่ โคโลนีสีครีม โปร่งแสง (Transparent) รูปร่างไม่แน่นอน (Irregular) ขอบโคโลนีเป็นคลื่น (Undulate) โคโลนีแบนราบไปกับจานอาหารแข็ง (Flat) และเจริญเติบโตได้ดีในจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar ดังแสดงในภาพที่ 1 แบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 มีค่าประสิทธิภาพในการย่อยสลายจานอาหารแข็ง Starch Agar เท่ากับ 1.81 ± 0.01 ดังแสดงในภาพที่ 2



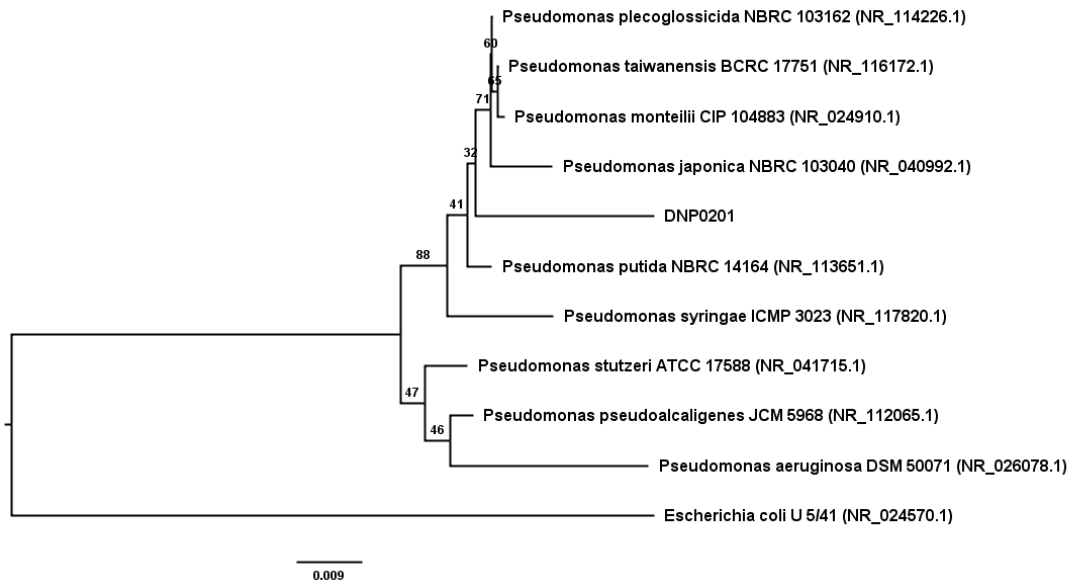

**ภาพที่ 1** ลักษณะสัณฐานโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 บนจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar ที่อายุเชื้อ 24 ชั่วโมง

**ภาพที่ 2** การย่อยสลายแป้งชนิดละลายน้ำ (อะไมลัม) บนจานอาหารแข็ง Starch Agar โดยแบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 หลังจากทำการย้อมจานอาหารแข็งด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 โดยวิธีทางอณูชีววิทยา ดำเนินการโดยการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของไอโซเลท DNP0201 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับการศึกษาแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของไอโซเลท DNP0201 พบว่ายีนมีขนาด 1,462 bp (Base pairs) แสดงในภาพที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท DNP0201 กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าไอโซเลท DNP0201 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Pseudomonas plecoglossicida* NBRC 103162 (Accession number : NR_114226.1) ที่ร้อยละ 97 และที่ความครอบคลุมยีน (Query coverage) ร้อยละ 99 การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของไอโซเลท DNP0201 ด้วยโปรแกรม Seaview 4.6.4 โดยใช้ Neighbor-Joining algorithm และการ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง เป็นดังภาพที่ 4 ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ที่สนับสนุนผลการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกับฐานข้อมูล NCBI ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลท DNP0201 คือ แบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201

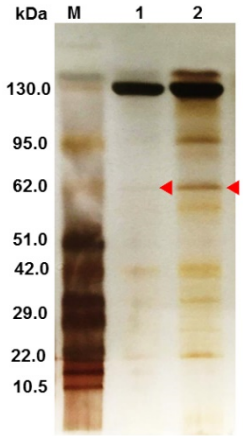



**ภาพที่ 3** แผ่นเจลอะกาโรส (1% TBE Agarose gel) ย้อมด้วยสีย้อม Novel Juice DNA Staining Reagent
M คือ สารพันธุกรรมมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder RTU (Bio-Helix, Taiwan)
DNP0201 คือ ยีน 16S rRNA ของไอโซเลท DNP0201 จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส




**ภาพที่ 4** แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของไอโซเลท DNP0201 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Seaview 4.6.4 โดยใช้ Neighbor-Joining algorithm และการ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 สามารถทำให้เอนไซม์อะไมเลสดิบที่ผลิตได้กลายเป็นเอนไซม์แบบกึ่งบริสุทธิ์ การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อะไมเลสทั้งเอนไซม์ดิบและเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีด้วยวิธี Silver staining พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201 มีขนาด 58 กิโลดาลตันโดยประมาณ ดังภาพที่ 5 ส่วนความบริสุทธิ์ของเอนไซม์อะไมเลสหลังจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.33 เท่าจากเอนไซม์ดิบ (ตารางที่ 1) เอนไซม์อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เป็น 2.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 1)




**ภาพที่ 5** แผ่นอะคริลาไมด์สำเร็จรูป Mini-PROTEAN® Precast Gels ย้อมสีด้วยวิธี Silver staining
M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pink Plus Prestained Protein Ladder (GeneDireX, Taiwan)
1 คือ เอนไซม์อะไมเลสดิบที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201
2 คือ เอนไซม์อะไมเลสกึ่งบริสุทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201
◀ แสดงเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201

**ตารางที่ 1** ค่ากิจกรรมเฉพาะและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์อะไมเลส

| ขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ | ปริมาณของเอนไซม์อะไมเลสทั้งหมด (มิลลิกรัม) | ค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์อะไมเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม) | ความบริสุทธิ์ (เท่า) |
|---|---|---|---|
| เอนไซม์อะไมเลสดิบ | 23.92 ± 0.00 | 1.69 ± 0.03 | 1.00 |
| เอนไซม์อะไมเลสหลังจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว | 2.78 ± 0.00 | 2.24 ± 0.01 | 1.33 |

**อภิปรายผล**

1. แบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินตะกอนของป่าชายเลนพระเจดีย์กลางน้ำ ปากแม่น้ำระยอง จังหวัดระยอง ด้วยจานอาหารแข็ง Tryptone Soya Agar และมีความสามารถในการย่อยสลายแป้งชนิดละลายน้ำในจานอาหารแข็ง Starch Agar ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เมื่อทำการระบุสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท DNP0201 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาทะเลบางชนิด งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA กับแบคทีเรีย *P. putida* มากกว่าร้อยละ 99 (Nishimori et al., 2000) สอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ (ภาพที่ 4) เมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* พบว่าเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 5 ถึง 9 และอุณหภูมิ

ระหว่าง 10 ถึง 30 องศาเซลเซียส (Nishimori et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิของตัวอย่างดินตะกอนที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียในงานวิจัยนี้เช่นกัน

2. รายงานของ Nishimori และคณะ (2000) พบว่าแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* FPC 941 และ FPC 951 ที่แยกได้จากปลาอายุไม่สามารถใช้แป้ง (Starch) เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต หรือสรุปได้ในทางอ้อมว่าแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* FPC 941 และ FPC 951 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์ในโครงสร้างของแป้ง รายงานข้างต้นมีความแตกต่างกับผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยสลายพันธะไกลโคไซด์ในโครงสร้างของแป้งได้ ความแตกต่างทางข้อมูลดังกล่าวอาจเนื่องมาจากเหตุผลที่สำคัญสองประการ คือ แบคทีเรีย *P. plecoglossicida* FPC 941 และ FPC 951 เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากปลาอายุ ดังนั้นแบคทีเรียจึงไม่มีความจำเป็นในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เนื่องจากสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่อยู่ภายในเซลล์ของเจ้าบ้าน (ปลาอายุ) ได้โดยตรง แตกต่างกับแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201 ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน ซึ่งมีความจำเป็นต้องย่อยสลายสารอินทรีย์ในดินตะกอนให้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เหตุผลอีกประการหนึ่ง คือ การขาดข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* การสืบค้นจากฐานข้อมูลงานวิจัย Scopus ปรากฏรายงานวิจัยเพียง 1 รายงานที่รายงานว่าแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* มีความเป็นไปได้ในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสทางพันธุกรรมของยีน amyA ด้วยการวิเคราะห์จีโนม (Genome) ทั้งหมดของแบคทีเรียโดยใช้ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) (Huang et al., 2019)

3. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201 ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีด้วยวิธี Silver staining พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 58 กิโลดาลตันโดยประมาณ ซึ่งสอดคล้องกับกับงานวิจัยของ Liu และคณะ (2011) รวมถึงงานวิจัยของ Hana และคณะ (2013) ที่พบว่าเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. K6-28-040 และแบคทีเรีย *P. stutzeri* AS22 มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 58 กิโลดาลตัน และ 57 กิโลดาลตันโดยประมาณ ตามลำดับ

4. การทำให้เอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้กึ่งบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 80 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิเพิ่มขึ้นเป็น 1.33 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ดิบ และมีค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์เป็น 2.24 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Dutta และคณะ (2016) ที่ทำการศึกษาเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. stutzeri* ISL B5 และทำการวัดค่ากิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ในสภาวะที่ใกล้เคียงกับการศึกษาวิจัยนี้ พบว่าเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมทั้งหมดเป็น 2.59 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* DNP0201 ที่มีค่ากิจกรรมทั้งหมดเป็น 1.04 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ค่ากิจกรรมเฉพาะเป็น 2.24 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์อะไมเลสที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Mishra และ Behera (2008) ยังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้

**ข้อเสนอแนะ**

1. การศึกษาวิจัยนี้มีการรายงานผลการศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์ของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *P. plecoglossicida* ซึ่งยังมีข้อมูลการวิจัยค่อนข้างน้อย จึงควรวิจัยคุณลักษณะทางเอนไซม์ในเชิงลึกเพื่อเป็นข้อมูลให้กับงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงศึกษาค่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ที่สภาวะที่มีความเหมาะสมมากขึ้น

2. การศึกษาวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเบื้องต้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยต่อยอดในเชิงประยุกต์ เช่น การผลิตเอนไซม์อะไมเลสในระดับต้นแบบ (Pilot scale) เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคอุตสาหกรรม

**เอกสารอ้างอิง**

รติมา กลิ่นฟุ้งและชนัญลญา ธรรมเกษร. (2560). **การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากดินป่าชายเลนและการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เบื้องต้น**. ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชากระบวนการอุตสาหกรรมเคมีและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, J.E. (1996). **Protein Methods.** USA: Wiley-Liss Publisher.

Dutta, P., Deb, A., Majumdar, S. (2016). Optimization of the medium for the production of extracellular amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 isolated from municipal solid waste. **International Journal of Microbiology.** 2016: Article ID 4950743. http://dx.doi.org/10.1155/2016/4950743.

Ferbiyanto, A., Rusmana, I., Raffiudin, R. (2015). Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut of worker *Macrotermes gilvus*. **HAYATI Journal of Biosciences.** 22: 197-200.

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution.** 27(2): 221-224.

Hana, M., Noomen, H., Olfa, G-B., Moncef, N. (2013). Purification and biochemical characterization of a detergent stable $\alpha$-amylase from *Pseudomonas stutzeri* AS22. **Biotechnology and Bioprocess Engineering.** 18: 878-887.

Huang, L., Zuo, Y., Jiang, Q., Su, Y., Qin, Y., Xu, X., Zhao, L., Yan, Q. (2019). A metabolomic investigation into the temperature-dependent virulence of *Pseudomonas plecoglossicida* from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Journal of Fish Diseases.** 42: 431-446.

Khannous, L., Jrad, M., Dammak, M., Miladi, R., Chaaben, N., Khemakhem, B., Gharsallah, N., Fendri, I. 2014. Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteolastrain*: study of amylase production conditions. **Lipids in Health and Disease.** 9: 13. doi: 10.1186/1476-511X-13-9.

Liu, J., Zhang, Z., Zhu, H., Dang, H., Lu, J., Cui, Z. (2011). Isolation and characterization of α-amylase from marine *Pseudomonas* sp. K6-28-040. **African Journal of Biotechnology.** 10(14): 2733-2740.

Mao, Z., Li, M., Chen, J. (2013). Draft genome sequence of *Pseudomonas plecoglossicida* strain NB2011, the causative agent of white nodules in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). **Genome Announcements.** 1(4): e00586-13. doi:10.1128/genomeA.00586-13.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry.** 31(4): 426-428.

Mishra, S. and Behera, N. (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. **African Journal of Biotechnology.** 7(18): 3326-3331.

Mohanan, N. and Satyanarayana, T. (2018). **Reference Module in Life Sciences**. Netherlands: Elsevier.

Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H. (2000). *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 50: 83-89.

Sabarinathan, D., Chandrika, S.P., Venkatraman, P., Easwaran, M., Sureka, C.S., Preethi, K. (2018). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection. **Informatics in Medicine Unlocked.** 11: 61-67.

Suriya, J., Bharathiraja, S., Krishnan, M., Manivasagan, P., Kim, S.K. (2016). Marine microbial amylases: Properties and applications. **Advances in Food and Nutrition Research.** 79: 161-177.

Wu, X., Wang, Y., Tong, B., Chen, X., Chen, J. (2018). Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. **International Journal of Biological Macromolecules.** 109: 329-337.