Clostridium sp. สายพันธุ์ CT4 คัดแยกจากตัวอย่างดินบริเวณกองกากมันสำปะหลังเน่าของโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทย เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม mesophile แกรม variable รูปท่อน ที่สามารถเจริญได้ดีมากภายใต้สภาวะไร้อากาศ (เข้าสู่ช่วง log phase ระหว่างชั่วโมงที่ 4 ถึง 12) และสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสเมื่อเพาะเลี้ยงใน basal medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ในรูปแบบของอะไมเลสเชิงซ้อนได้ โดยสามารถตรวจพบกิจกรรมของอะไมเลส กลูโคไมเลส เอลฟ่ากลูโคซิเดส ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส เบต้ากลูโคซิเดส แมนนาเนส และเพ็กติเนสใน crude enzyme โดย crude enzyme มีกิจกรรมของอะไมเลสสูงที่สุด (9,835 U/g protein) อะไมเลสที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพที่ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0–7.0 และอุณหภูมิในช่วง 25–55 องศาเซลเซียส crude enzyme ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วย EDTA 10 mM และต้องการอิออนโลหะ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Fe^{2+} สำหรับคืนกิจกรรมของเอนไซม์ โดย Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Fe^{2+} ทำให้อะไมเลสมีกิจกรรมกลับคืนได้เป็นร้อยละ 116.50, 94.20, 71.10 และ 62.10 ตามลำดับ ขณะที่ Cu^{2+} และ Zn^{2+} ไม่ส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อศึกษารูปแบบโปรตีนของ crude enzyme ด้วยเทคนิค native-PAGE พบว่าประกอบด้วยโปรตีน 7 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 27 ชนิดเมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และเมื่อตรวจสอบด้วย active-PAGE พบว่าประกอบด้วยอะไมเลสอย่างน้อย 8 ชนิด ที่มีขนาด 138, 137, 98, 45, 44, 43, 35 และ 26

กิโลดาลตัน ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CT4 ใน basal medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วย gas chromatography คือ กรดอะซิติก กรดบิวทิริก เอทานอล และ กรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้น 17.86, 15.03, 3.26 และ 0.47 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติยึดเกาะกับแป้งมันสำปะหลังดิบ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการจับกับแป้งมันสำปะหลังดิบ และชะด้วย 1% (v/v) triethylamine พบว่ามีกิจกรรมของอะไมเลสสูงสุดที่ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพต่อพีเอชและอุณหภูมิในช่วงพีเอช 4.0-7.0 และอุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์ที่ยึดเกาะกับแป้งมันสำปะหลังดิบถูกยับยั้งกิจกรรมด้วย EDTA 10 mM และต้องการอิออนโลหะ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Fe^{2+} สำหรับคืนกิจกรรมของเอนไซม์ โดย Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}และ Fe^{2+} ทำให้อะไมเลสมีกิจกรรมกลับคืนมาได้เป็นร้อยละ 113.10, 76.50, 65.50 และ 64.30 ตามลำดับ ขณะที่ Cu^{2+} และ Zn^{2+} ไม่ส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์ เมื่อตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค native-PAGE พบว่าประกอบด้วยโปรตีนขนาดใหญ่เพียงแถบเดียว (600 กิโลดาลตัน) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 12 ชนิด เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE โดยมีขนาด 250, 139, 138, 137, 98, 96, 95, 45, 37, 31, 28 และ 25 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วย zymogram พบว่าแถบโปรตีนดังกล่าวแสดงกิจกรรมของอะไมเลส 4 ชนิด (138, 137, 98 และ 45 กิโลดาลตัน) คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส 4 ชนิด (250, 96, 95 และ 37 กิโลดาลตัน) และไซลาเนส 2 ชนิด (31 และ 25 กิโลดาลตัน) นอกจากนี้เอนไซม์ที่สามารถยึดเกาะกับแป้งมันสำปะหลังดิบ ยังแสดงกิจกรรมของแมนนาเนสและเพ็กติเนส (139 และ 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ) เมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวไปย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ และกากมันสำปะหลัง พบว่าสามารถย่อยแป้งข้าวสาลี แป้งข้าว แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่งและกากมันสำปะหลังได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 338, 281, 182, 166 และ 236 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบและกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคสและโอลิโกแซ็กคาไรด์

Clostridium sp. strain CT4, isolated from soil samples around decomposing cassava pulp at starch industry area, Thailand. This isolated strain was a mesophilic, anaerobic, gram variable and rod shaped bacterium. This isolated strain was grown very well (log phase between 4-12 hours) and produced amylases when cultivated in basal medium containing raw cassava starch as a carbon source at pH 7.0 and 37°C. This bacterium produced multienzyme complex of amylase. Activities of amylase, glucoamylase, α-glucosidase, xylanase, β-xylosidase, carboxymethylcellulase, β-glucosidase, mannanase and pectinase were found in crude enzyme, in which amylase showed the highest activity (9,835 U/g protein). Optimum conditions for amylase activity were pH 7.0 and 55°C, while pH and thermal stability were in wide ranges of pH 4.0-7.0 and 25-55°C, respectively. The enzyme required metal ion Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and Fe^{2+} for its enzyme activity. In additions the enzyme was reactivated by Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and Fe^{2+} at 116.50, 94.20, 71.10 and 62.10%, respectively. However, the enzyme was not reactivated by Cu^{2+} and Zn^{2+}. Native-PAGE of crude enzyme showed 7 protein bands, whereas SDS-PAGE exhibited at least 27 protein bands. Zymogram analysis revealed 8 protein bands with the sizes of 138, 137, 98, 45, 44, 43, 35 and 26 kDa having amylase activities. Gas chromatography revealed that main fermentation products of this bacterium were acetic acid, butyric acid, ethanol and propionic acid with 17.86, 15.03, 3.26 and 0.47 mM, respectively.

Raw cassava starch-binding enzymes were purified by affinity chromatography on raw cassava starch and eluted with 1% (v/v) triethylamine. It was found that the optimum conditions for amylase activity were at pH 7.0 and 60 °C, and pH and thermal stability were in wide ranges of pH 4.0-7.0 and 25-60 °C, respectively. Raw cassava starch-binding enzymes required metal ion Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and Fe^{2+} for its enzyme activity. In additions the enzyme was reactivated by Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and Fe^{2+} at 113.10, 76.50, 65.50 and 64.30%, respectively. However, the enzyme was not reactivated by Cu^{2+} and Zn^{2+}. Native-PAGE analysis indicated that the raw cassava starch-binding enzymes contained only one band of large protein (Molecular weight 600 kDa). It comprised at least twelve major proteins at the molecular weight of 250, 139, 138, 137, 98, 96, 95, 45, 37, 31, 28 and 25 kDa on SDS-PAGE and contained four active bands of amylases with molecular weight of 138, 137, 98 and 45 kDa, four active bands of carboxymethylcelluase with molecular weight of 250, 96, 95 and 37 kDa and two active bands of xylanases with molecular weight of 31 and 25 kDa. Moreover, the purified raw cassava starch-binding enzymes showed one active band of mannanase and pectinase with molecular weight of 139 and 28 kDa, respectively, on zymograms. The raw cassava starch-binding enzymes could degrade various kinds of raw starch and cassava starch. The raw cassava starch-binding enzymes could degrade wheat, rice, cassava, potato starch and cassava pulp to reducing sugars at 338, 281, 182, 166 and 236 μg/ml, respectively. The hydrolysis products of cassava starch and cassava pulp were glucose and oligosaccharides.