งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแบคทีเรียทนร้อนที่ไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งน่าจะมีคุณสมบัติเชิงซ้อนที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยแป้งดิบและกากมันสำปะหลังให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อไปประยุกต์ในกระบวนการผลิตน้ำตาลและสารตั้งต้นในการผลิตสารอื่นๆได้พบว่า *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-1 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทยเป็นแบคทีเรียชอบร้อนที่เจริญในสภาวะปราศจากออกซิเจน สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ไซลาเนส อะราบิโนฟูราโนซิเดส เบต้าไซโลซิเดส เบต้ากลูโคซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลส แมนนาเนส และ เดกตราเนส เมื่อเพาะเลี้ยงใน basal medium ที่มีแป้งข้าวเจ้าดิบ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่ง crude enzyme มีกิจกรรมของอะไมเลสสูงที่สุด (46.18 U/g protein) อะไมเลสที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีที่ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ อะไมเลสมีเสถียรภาพที่ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0 - 8.0 และอุณหภูมิในช่วง 30 - 60 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษารูปแบบโปรตีนของ crude enzyme ด้วยเทคนิค native-PAGE พบว่าประกอบด้วยแถบโปรตีน 4 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 17 ชนิดเมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และเมื่อตรวจสอบด้วย zymogram พบว่าประกอบด้วยอะไมเลสอย่างน้อย 2 ชนิด ที่มีขนาด 128 และ 140 กิโลดาลตัน และพบว่า crude enzyme สามารถย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบได้ดีที่สุด รองลงมาคือ แป้งสาลีดิบ แป้งมันฝรั่งดิบ กากมันสำปะหลัง และแป้งมันสำปะหลังดิบตามลำดับ ซึ่งน้ำตาลที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งดิบคือ น้ำตาลมอลโตส และโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ NOI-1 เมื่อตรวจสอบด้วย gas chromatography คือ เอทานอล กรดอะซิติก และ กรดบิวทิริก ความเข้มข้น 16.91, 15.44 และ 1.36 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

เอนไซม์ที่สามารถยึดจับแป้งดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยการจับกับแป้งดิบและชะด้วยมอลโตส 3% พบว่ามีกิจกรรมของอะไมเลสสูงสุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีเสถียรภาพต่อพีเอชและอุณหภูมิในช่วงพีเอช 6.0-7.0 และอุณหภูมิ 30-55 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค native-PAGE พบว่าประกอบด้วยโปรตีนขนาดใหญ่เพียงกลุ่มเดียว ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 5 ชนิด ที่มีขนาด 94, 112, 128, 140 และ 193 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE . และเมื่อตรวจสอบด้วย zymogram พบว่าแถบโปรตีนดังกล่าวแสดงกิจกรรมของอะไมเลส 2 ชนิด ที่มีขนาด 128 และ 140 กิโลดาลตัน กิจกรรมของ ไซลาเนส 3 ชนิด ที่มีขนาด 112, 128 และ 140 กิโลดาลตัน และกิจกรรมของแมนนาเนส 3 ชนิด ที่มีขนาด 94, 128 และ 193 กิโลดาลตัน เมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวไปย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบและกากมันสำปะหลังพบว่าสามารถย่อยได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง 43.33 และ 37.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จากการย่อยทั้งสองชนิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น มอลโตส และโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ

The aim of this research is to study the amylases production from a thermophilic anaerobic bacterium and the application of its complex enzyme in the production of sugars from raw starch and cassava pulp which can be converted to chemicals and liquid fuel. *Thermoanaerobacterium* sp. strain NOI-1, isolated from soil samples in Thailand, was a strictly anaerobic, thermophilic bacterium that produced amylase, xylanase, arabinofuranosidase, β-xylosidase, β-glucosidase, cellobiohydrolase, mannanase and dextrinase when cultivated in basal medium containing raw rice starch as a carbon source under pH 7.0 and 60°C. Amylase activity was dominated (46.18 U/ mg protein). The optimum conditions for amylase activity were pH 7.0 and 60°C, and pH and thermal stability were in a pH range of 6.0-8.0 and 30-60°C, respectively. Native-PAGE of crude enzyme showed 4 protein bands, whereas SDS-PAGE exhibited at least 17 protein bands. Zymogram analysis revealed 2 protein bands with the sizes of 128 and 140 kDa having amylase activity. Crude enzyme could hydrolyze raw rice starch effectively, followed by raw wheat starch, raw potato starch, cassava pulp and raw cassava starch. Hydrolysis products derived from raw starch were maltose and short-chain oligosaccharides. Gas chromatography revealed that main fermentation products were ethanol, acetic acid and butyric acid with 16.91, 15.44, 1.36 mM, respectively.

Raw starch binding enzyme was purified through adsorption-desorption techniques using raw starch as a medium and elution with 3% (w/v) maltose. 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 a pH range of 6.0-7.0 and 30-55°C, respectively. Native-PAGE analysis indicated that the raw starch-binding enzyme contained only one band of large protein. It comprised at least five major proteins at the molecular weight of 94, 112, 128, 140 and 193 kDa on SDS-PAGE and contained two active bands of amylases with molecular weight of 128 and 140 kDa, three active bands of xylanases with molecular weight of 112, 128 and 140 kDa and three active bands of mannanases with molecular weight of 94, 128 and 193 kDa on zymogram. The raw starch-binding enzymes could degrade raw rice starch and cassava pulp to reducing sugar at 43.33 and 37.22 μg/ml, respectively. The hydrolysis products were maltose and short-chain oligosaccharides as major products.