การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

Species identification of cellulase - producing bacteria and temperature optimization for cellulase production

ศิริพรรณ ฉัตรพรมราช
สุพัตรา แหวนทองคำ
อรพรรณ นุกูลคราม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

Species identification of cellulase - producing bacteria and temperature optimization for cellulase production

ศิริพรรณ ฉัตรพรมราช

สุพัตรา แหวนทองคำ

อรพรรณ นุกูลคราม

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 148963
วัน,เดือน,ปี 16 ส.ค. 2560

b.12877669
i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

Species identification of cellulase - producing bacteria and temperature optimization for cellulase production

SIRIPHAN CHATPROMRAT

SUPATRA WANTONGKHAM

ORAPUN NUKOOLKRAM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส Species identification of cellulase - producing bacteria and temperature optimization for cellulase production			
ชื่อนักศึกษา	ศิริพรรณ	ฉัตรพรมราช	รหัสนักศึกษา	55051007
	สุพัตรา	แหวนทองคำ	รหัสนักศึกษา	55051024
	อรพรรณ	นุกูลคราม	รหัสนักศึกษา	55051036
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)			
ภาควิชา	เคมี			
ปีการศึกษา	2558			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์			

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	**ลายมือชื่อ**
ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ ประธานกรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการ	
ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส			
ชื่อนักศึกษา	ศิริพรรณ	ฉัตรพรมราช	รหัสนักศึกษา	55051007
	สุพัตรา	แหวนทองคำ	รหัสนักศึกษา	55051024
	อรพรรณ	นุกูลคราม	รหัสนักศึกษา	55051036
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)			
ภาควิชา	เคมี			
คณะ	วิทยาศาสตร์			
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)			
ปีการศึกษา	2558			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์			

บทคัดย่อ

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น การผลิตแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น จากโครงงานก่อนหน้านี้ได้ตรวจหาเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัวทั้งหมด 4 ตัวคือเชื้อหมายเลข 8, 10, 16 และ 21 ในงานวิจัยจึงได้นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ตัวไปศึกษาหาสายพันธุ์และหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยในการระบุสายพันธุ์สามารถทำโดยวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA ผลที่ได้พบว่าเชื้อทั้งสี่ชนิดเป็นสายพันธุ์ *Bacillus - stratosphericus* ในส่วนของการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อทำโดยการวัดความขุ่น และทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสโดยเทคนิค carboxymethylcellulose (CMC) agar diffusion ผลที่ได้พบว่าอุณหภูมิ 35°C มีการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด และให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุดโดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 18.33, 21.33, 20.67 และ 19.67 mm ตามลำดับ

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอ, *บาซิลลัส สตราโตสเฟียริคัส*, ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

Title	Species identification of cellulase - producing bacteria and temperature optimization for cellulase production			
Students	Siriphan	Chatpromrat	Student ID	55051007
	Supatra	Wantongkham	Student ID	55051024
	Orapun	Nukoolkram	Student ID	55051036
Degree	Bachelor of Science Environmental Chemistry			
Department	Chemistry			
Faculty	Science			
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)			
Academic Year	2015			
Advisor	Dr. Tippachai Vatanavicharn			

Abstract

Cellulase is an enzyme that can digest cellulose to glucose which can be utilized in many ways such as alcohol production and organic acid .The previous project found cellulase producing bacteria from cow manure that named No.8, No.10, No.16 and No.21. In this research, the four bacteria were identified their species and determined their optimum temperature to produce cellulase. Specie identification was done by 16s rRNA nucleotide sequence analysis. DNA alignment (BLASTn) results showed that the species of bacteria No.8, No.10, No.16 and No.21 are the same specie whice named *Bacillus stratosphericus*. To determine the optimum temperature, the growth of bacteria was measured by turbidity and cellulase activity was tested by carboxymethylcellulose (CMC) agar diffusion. The results showed that 35°C give the highest of growth rate and activity with the size of clear zone as 18.33, 21.33, 20.67 and 19.67 mm for No.8, No.10, No.16 and No.21 respectively.

Keywords: DNA, *Bacillus stratosphericus*, Polymerase Chain Reaction (PCR)

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกๆท่าน ขอขอบพระคุณ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่คอยให้คำปรึกษาดูแลอย่างใกล้ชิด และให้ความช่วยเหลือแนะนำที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำโครงงานพิเศษ และขอขอบพระคุณกรรมการคุมสอบ ผศ.ดร.อุสารัตน์ ถาวรชัยสิทธิ์ และ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำ ช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป และ นักศึกษาปริญญาโทห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ สารเคมี และสถานที่ ในการวิเคราะห์งานต่างๆจนโครงงานพิเศษนี้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) ที่เอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์เครื่องมือในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ให้ได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงเพื่อนๆ และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมา ผู้จัดทำโครงงานขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ศิริพรรณ ฉัตรพรมราช
สุพัตรา แหวนทองคำ
อรพรรณ นุกูลคราม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย/ปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เซลลูโลส (cellulose) 3
2.1.1 การย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose hydrolysis) 4
2.1.2 แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส 5
2.2 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) 6
2.2.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส 7
2.2.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 8
2.2.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 10
2.2.4 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 11
2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 12
2.2.6 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส 16
2.2.7 การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ 19
2.3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย 20
2.4 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียโดยวัดความขุ่น 21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)..... 21
2.6 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดย วิธีการทางโมเลกุล (Molecular techniques)... 23
2.6.1 การตัดด้วยเอนไซม์ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)..... 23
2.6.2 การหาลำดับเบส (Sequence)..... 23
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 25
3.1 เชื้อแบคทีเรีย..... 25
3.2 สารเคมี..... 25
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย..... 25
3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรีย..... 25
3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)..... 25
3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)..... 26
3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (Purification of PCR Products for Sequencing)..... 26
3.2.6 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR ขั้นพื้นฐาน โดยวิธี Gel Electrophoresis..... 26
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ..... 26
3.4 การขีดเชื้อบนอาหารแข็ง (Restreak)..... 27
3.5 การวัดการเจริญเติบโตและการทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรีย..... 28
3.6 การทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีสังเกตวงใส (Clear zone)..... 28
3.7 วิธีการวิเคราะห์โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส..... 29
3.7.1 การสกัด DNA..... 29
3.7.2 ขั้นตอนการทำ PCR..... 30
3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR ขั้นพื้นฐาน โดยวิธี Gel Electrophoresis..... 31

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.7.4 การทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมา ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยวิธีการ PCR product purification 32
3.7.5 การหาความคล้ายคลึงของลำดับเบสบน DNA ด้วยโปรแกรม BLAST 32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 33
4.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ 33
4.1.1 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 33
4.1.2 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10 34
4.1.3 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16 35
4.1.4 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21 36
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง 37
4.3 ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) 40
4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อระบุสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรีย 40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 41
5.1 สรุปผลการทดลอง 41
5.2 วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 41
เอกสารอ้างอิง 42
ภาคผนวก 46
ภาคผนวก ก 47
ภาคผนวก ข 48

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ผลลัพธ์จากการย่อยเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์ 5
2.2 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 6
2.3 การย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส 8
2.4 ปฏิกิริยาการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 8
2.5 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ 17
3.1 ส่วนผสมการทำ PCR 30
3.2 ค่าการทำงานของเครื่อง Thermocycler 31
4.1 ขนาดวงใสเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 38
4.2 ขนาดวงใสเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข10 38
4.3 ขนาดวงใสเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข16 39
4.4 ขนาดวงใสเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข21 39

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของเซลลูโลส	3
2.2	ลักษณะการสานกันเป็นร่างแหของเซลลูโลส	3
2.3	กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	9
2.4	การย่อย และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	11
2.5	การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	21
2.6	กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์	22
3.1	การขีดเชื้อจะเป็นแบบ Four – way cross Streak	28
3.2	การทำ Gel Electrophoresis	31
3.3	แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน	32
4.1	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 ที่อุณหภูมิต่างๆ	33
4.2	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10 ที่อุณหภูมิต่างๆ	34
4.3	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16 ที่อุณหภูมิต่างๆ	35
4.4	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21 ที่อุณหภูมิต่างๆ	36
4.5	รูปแบบการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และการวัดวงใสที่เกิดขึ้นจานเลี้ยงเชื้ออาหารแข็ง	37
4.6	ตัวอย่างเพลทอาหารแข็งที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส	37
4.7	แสดงภาพถ่ายอะกาโรสเจล ลักษณะของ band และ lane ที่เกิด	40

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxynucleoside triphosphate
TBE	Tris - borate – EDTA
CMC	Carboxymethylcellulose
OD	Optical density
Bp	Base pair
pH	กรด-เบส
Nm	นาโนเมตร
Mm	มิลลิเมตร
Ml	มิลลิตร
M	โมลาร์
°C	องศาเซลเซียส
w/v	สัดส่วนน้ำหนักโดยปริมาตร
α	แอลฟา
β	เบต้า
γ	แกมมา

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประชาชนส่วนใหญ่ในประเทศไทยประกอบอาชีพเกษตรกรรมและในอุตสาหกรรมมีการนำผลผลิตทางการเกษตรไปใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตทำให้เกิดเศษวัสดุอินทรีย์ที่เหลือทั้งจากกระบวนการผลิตและจากทางเกษตรกรรมเกิดเป็นขยะมูลฝอยจำนวนมากโดยคิดเป็นขยะอินทรีย์ถึงร้อยละ 64 ขยะมูลฝอยรีไซเคิล เช่น กระดาษ พลาสติก อลูมิเนียม แก้ว และโลหะ คิดเป็นร้อยละ 30 ขยะมูลฝอยทั่วไป เช่น ผ้า ยาง หนัง และไม้ คิดเป็นร้อยละ 3 และ ขยะอันตราย เช่น ถ่านไฟฉาย หลอดไฟ คิดเป็นร้อยละ 3 (กรมควบคุมมลพิษ, 2555) ซึ่งทำให้เป็นปัญหาทางสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงทำการศึกษาแนวทางเพื่อลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากปริมาณขยะมูลฝอยที่มีแนวโน้มมากขึ้นทุกปี ซึ่งมีหลายวิธีที่สามารถจัดการกับปัญหาดังกล่าวได้ เช่น การย่อยสลายที่มีทั้งทางเคมี และทางชีวภาพ หรืออาจใช้วิธีการรีไซเคิลกับขยะบางประเภท โดยกำจัดขยะอินทรีย์ที่ถือเป็นส่วนใหญ่ของขยะที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเป็นวิธีการทางชีวภาพหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยสลายเศษวัสดุอินทรีย์ที่มีสารประกอบเซลลูโลส โดยผลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสที่สามารถนำไปใช้ในการผลิต แอลกอฮอล์ วิตามิน กรดอินทรีย์ สารปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์ต่างๆ โดยผ่านกระบวนการหมัก และยังสามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมในด้านต่างๆเช่น อุตสาหกรรมการผลิตยาง อาหาร กระดาษ เป็นต้น

การศึกษาครั้งนี้ใช้แบคทีเรียเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และทดลองหาอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อนำไปใช้แปรรูปและเพิ่มมูลค่าให้กับขยะมูลฝอยที่เป็นเศษวัสดุอินทรีย์จากแหล่งต่างๆ โดยในการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และทำการระบุสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกแบคทีเรียไปใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมต่างๆต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรีย
2) ระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคที่เรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) หาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
2) ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย
3) ระบุสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

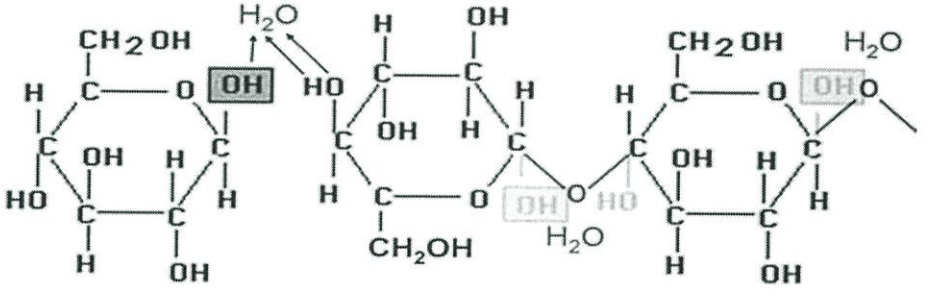
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
2) สามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในอุตสาหกรรมในด้านต่างๆเช่น อุตสาหกรรมการผลิตยาง อาหาร กระดาษ เป็นต้น

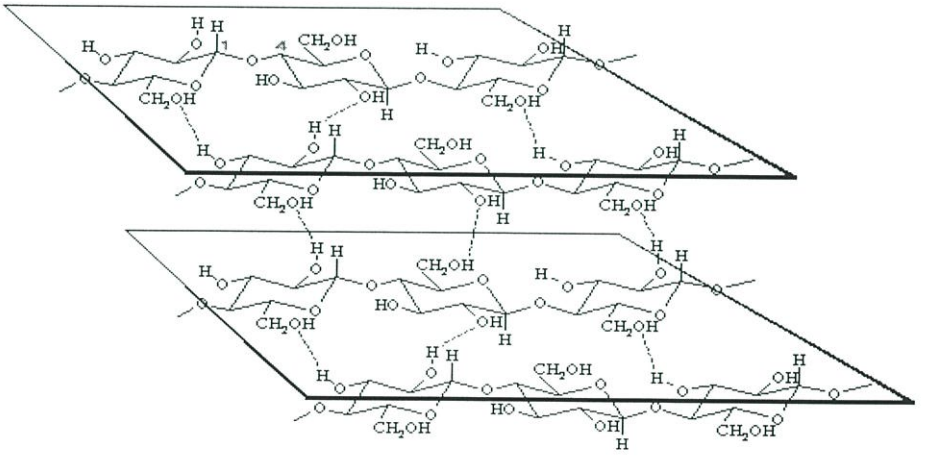
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เซลลูโลส (cellulose)

โครงสร้างทางเคมีเซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (glucose) จำนวน 1,000-10,000 โมเลกุลต่อกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer)เชื่อมกันด้วย β -1,4-glycosidic bond ระหว่าง alcoholic hydroxyl groups โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 2,000-15,000 โมเลกุลและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ20,000-2,400,000 ดาลตัน (Dalton) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อยมีสูตรเคมีทั่วไปคือ (C6H10O5)n เมื่อ n คือจำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง (Fan *et al.*, 1987)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส (Anonymous 1, 2008)



รูปที่ 2.2 ลักษณะการสานกันเป็นร่างแหของเซลลูโลส (Sengbusch, 2003)

ชนิดของเซลลูโลสแบ่งตามความสามารถในการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด (Anonymous 2, 2007) คือ

1. แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) คือเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5%

2. เบต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% ที่อุณหภูมิห้องแต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

3. แกมม่า-เซลลูโลส (γ-cellulose) คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% และสารละลายกรดแต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

2.1.1 การย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose hydrolysis) (Fan *et al.*, 1987)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นผลึกหรือเป็น linear homopolymer ของกลูโคสที่จับกันด้วยβ-1, 4-glucosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลายนอกจากนี้โดยธรรมชาติของเซลลูโลสจะมี lignin จับอยู่ซึ่งเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธีคือ

1. วิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริกซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูงวิธีนี้มีข้อจำกัดคือให้ปริมาณกลูโคสต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการด้วย

2. วิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่นเชื้อราแบคทีเรียโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะทำให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงคือที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสความดันบรรยากาศเพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมากทำให้ไม่สูญเสียกลูโคสระหว่างเกิดปฏิกิริยาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

1. เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำจึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อนทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต

2. ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาถึงภาวะสมดุลได้เร็ว

3. เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มาก

4. ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น

5. เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามที่ต้องการ

6. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น และ สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยเซลลูโลสได้

7. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน

2.1.2 แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสมีดังนี้

1. แบคทีเรียในกระเพาะอาหารของสัตว์กินพืช เช่น วัว ควาย ในดิน เช่น Bacillus sp.และในทะเล เช่น Cytophaga sp.

2. แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาพทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เช่น Cellvibrio sp. และ Cellulomonas sp. เป็นต้น

3. แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เช่น Clostridium thermophilum และ Ruminococcus albus เป็นต้น

4. Myxobacteria เช่น Sporocytophaga sp. (รพีพรรณ, 2530)

5.จุลินทรีย์ที่เป็นปรสิตในพืช มีทั้งพวกย่อยเซลลูโลสอย่างเดียว หรือก่อโรคในพืชด้วยเช่น Pseudomonas solanacearum (ปัจจุบันคือ Ralstonia solanacearum) ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช จุลินทรีย์ย่อยไม้ ได้แก่ แอคติโนไมซีส เป็นต้น

แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนจะย่อยเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์หลัก 2 ชนิด คือ CO_2 และสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ส่วนราและแอคติโนไมซีส จะได้ CO_2 เป็นผลิตภัณฑ์หลักและเกิดกรดอินทรีย์ในปริมาณน้อย อัตราการย่อยเริ่มต้นจะถูกจำกัดด้วยกระบวนการ oxidationของคาร์โบไฮเดรต เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสารตัวกลาง ซึ่งจะเกิดขึ้นขณะมีการใช้น้ำตาล ส่วนmesophilic และ thermophilic anaerobe ไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นอย่างสมบูรณ์ได้ สารอินทรีย์หลายชนิดจึงถูกขับออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดการสะสมของ CO_2, H_2, ethanol และกรดอินทรีย์ เช่น acetic acid, lactic acid และ succinic acid เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 ผลลัพธ์จากการย่อยเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์

แบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์หลัก
Mesophiles	
Clostridium cellobioparum	CO_2, H_2, ethanol, acetic, lactic และformic acids
Bacteroides succinogenes	CO_2, acetic และ succinic acid
Ruminococcus flavefaciens	Acetic, formic และ succinic acid

Thermophiles	
Clostridiumthermocellum	CO_2, H_2, ethanol, acetic, lactic,formic และ succinic acid

2.2 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลสคือเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสผลิตได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืชสัตว์และจุลินทรีย์เช่นข้าวมอลต์ข้าวบาร์เลย์ใบยาสูบไส้เดือนดินปลวกหอยทากแบคทีเรียและราเป็นต้น (ตารางที่ 2.2)(Klysov, 1990) เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาสู่ภายนอกเซลล์(extracellular enzyme) จัดเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ดีที่สุดเนื่องจากสะดวกต่อการสกัดสามารถผลิตได้ในปริมาณมากต้นทุนการผลิตต่ำทั้งนี้พบว่าสภาพการเพาะเลี้ยงมีผลต่อชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นเช่นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ชนิดและปริมาณของเซลลูโลสที่ใช้ปริมาณเกลือของโลหะต่างๆสภาพความเป็นกรด-ด่างอุณหภูมิและออกซิเจนเป็นต้น (Alexander, 1967)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

แบคทีเรีย	แอคติโนไมซีส	รา
Clostridium thermocellum *Ruminococcus albus* *Streptomyces sp.*	*Streptomyces sp.* *Thermoactinomyces sp.* *Thermononospora curvata*	*Acremonium cellulolyticus* *Aspergillus acculeatus* *Aspergillus fumigatus* *Aspergillus niger* *Fusarium solani* *Irpex lacteus* *Myrothecium verrucaria* *Penicillium funiculosum* *Phanerochaete sp.*

		Trichoderma harzianum *Trichoderma pseudokonigii*

2.2.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan et al., 1987)

เซลลูเลส ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzyme) ที่ทำงานร่วมกัน คือ

1. เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง เพื่อเป็นสารตั้งต้นของเซลลูเลส

2. เอนไซม์ C_xหรือ β-1, 4 glucanase เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้กลุ่มนี้มี 3 ชนิด คือ

- Endo-β-glucanase (β-D-glucan glucanohydrolase, EC.3.2.1.4) จะทำหน้าที่ย่อย β-1, 4-glycosidic linkage แบบสุ่ม ผลจากการย่อยทำให้สายโมเลกุลของเซลลูโลสสั้นลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่หมู่รีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ได้ผลผลิต คือ กลูโคส และ cellotriose เอนไซม์นี้ไม่ย่อย cellobiose แต่การย่อย cellodextrin, เซลลูโลสที่เกิดจากการพองตัว(swollencellulose), carboxymethylcellulose (CMC) และ hydroxyl-ethyl cellulose (HEC) ได้ และปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อสายโมเลกุลเซลลูโลสสั้นลง ในการตรวจสอบเอนไซม์นี้จะใช้ CMC และ HEC เป็นสารตั้งต้น
- Exo-β-glucanase(1,4-β-D-glucancellobiohydrolaseEC.3.2.3.9)

หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end เอนไซม์นี้สามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึก (crystalline cellulose) หรือเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble cellulose) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น cellodextrin และ cellobiose สามารถตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยการใช้ฝ้าย อวิเซล (avicel) และamorphous cellulose เป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อขนาดของสารตั้งต้นสั้นลง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อย crystalline cellobiose ได้และจะเกิดปฏิกิริยาต้านการทำงานเมื่อมี endoglucanase ผสมอยู่

- β-glucosidase (β-D-glucohydrolase EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย cellobioseและ cello-oligosaccharide ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสหรือ cellodextrin ได้ทดสอบเอนไซม์นี้โดยใช้ cellobiose, p-nitrophynyl-β-d-glucoside หรือ salicin เป็นสารตั้งต้น

ตารางที่ 2.3 การย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส (สมรักษ์, 2535)

ชนิดของเอนไซม์	ชนิดของสารตั้งต้น				
	Crystalline cellulose	CMC	Amorphous cellulose	Cellotetraose	Cellobiose
Endo-β-glucanase	-	+	+	+	-
Exo-β-glucanase	+	-	+	+	-
β-glucosidase	-	-	-	+	+

+, ย่อยสลายได้; -, ย่อยสลายไม่ได้

2.2.2 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan et al., 1987)

กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็น prohydrolytic step คือสายโซ่ anhydroglucose จะถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นที่สองเกิด hydrolyticcleavage ของสายโพลีเมอร์

ตารางที่ 2.4 ปฏิกิริยาการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Mandels and Reese, 1957)

ขั้นตอนที่	ปฏิกิริยา
1	Native cellulose $\xrightarrow{\text{Endo- β-glucanase}}$ cellulose
2	Cellulose $\xrightarrow{\text{Exo - β-glucanase}}$ cellobiose
3	Cellobiose $\xrightarrow{\text{Cellobiase}}$ 2 glucose

กลไกการทำงานเริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดบวมตัว (swelling) พร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระ ส่วน exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลายซึ่งถูกย่อยสลายต่อไปโดย β-glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ(ดังรูปที่ 2.3)

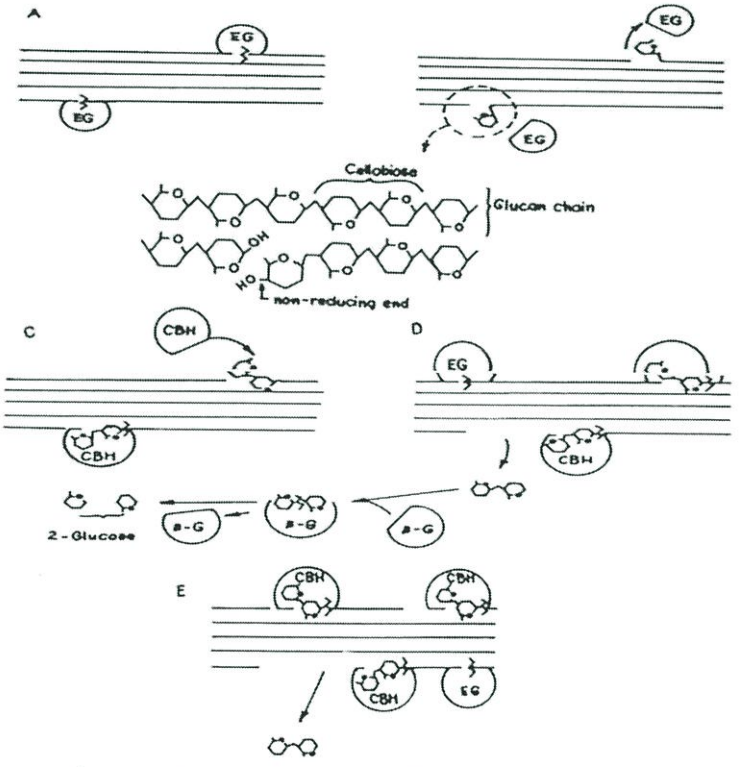
A) Endoglucanase (EG) จะจับแบบสุ่มบนพื้นผิวของ microfibril ของเซลลูโลส EG จะทำลายพันธะ glycosyl ใน glucan chain

B) EG จะหลุดออกจากพื้นผิวของ microfibril glucan chain ทำให้เกิด reducing end และ non-reducing end

C) Exo-β-glucanase (CBH) สามารถจะเข้าทำปฏิกิริยาบน free non-reducing end ของ glucan chain

D)Cellobioseถูกปล่อยเข้าสู่สารละลาย และถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสโดย β-glucosidase (β-G)

E) EG จะจับอย่างต่อเนื่องบน glucan chains สร้างตำแหน่งที่ CBH สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้



รูปที่ 2.3 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (White, 1982)

2.2.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan et al., 1987)

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้งเมื่อ

1. β-glucosidase จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีการสะสมของ cellobioseซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด จากการศึกษาของ Selby and Maitland (1967) พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3ชนิดนี้ ต้องทำงานร่วมกัน จึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดี แต่เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง

2. สารที่มี configuration คล้ายสารตั้งต้นจะยับยั้งการรวมตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้เช่น methyl cellulose และ gluconolactones เป็นต้น โดยจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์β-glucosidase ทำให้การย่อยเซลลูโลสเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

3. สารพวก polyols และ erythritol จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glucosidase และ galactosidase โดย erythritol จะรวมตัวกับเอนไซม์ตรงจุด C_3-C_6 ของ D-glucose

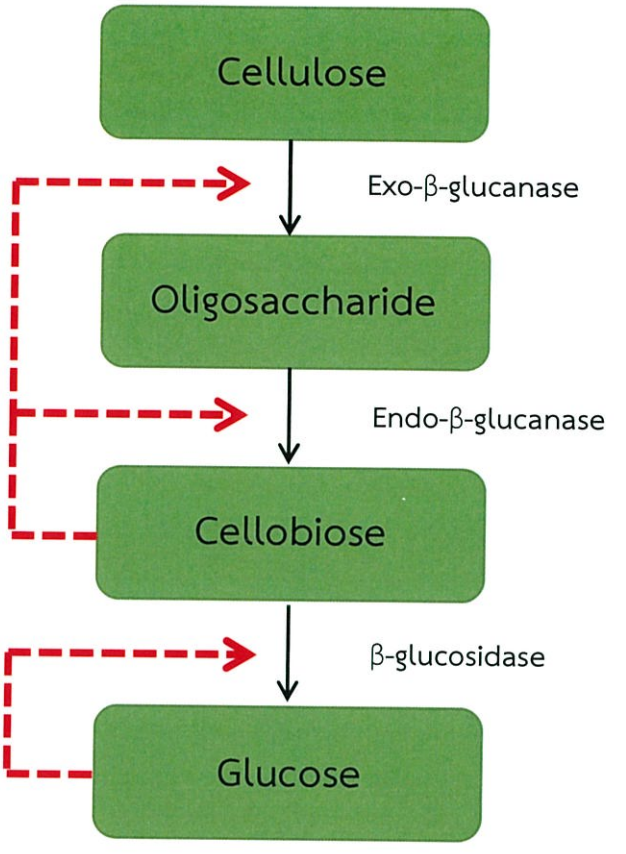
4. โปรตีนของเอนไซม์ ถูกทำให้เสียสภาพโดยสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับ SH-group เช่น mercuric ions แต่อาจแก้ไขโดยใช้ cysteine และ chloride ions

5. เอนไซม์ endopeptidase สามารถลดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่เอนไซม์exopeptidase ไม่สามารถย่อยเอนไซม์ exocellulase ที่อยู่ในสภาพปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลลูเลสสามารถคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป

6. การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์ ซึ่งแล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์

7. เอนไซม์เซลลูเลส อาจถูกยับยั้งโดย melanin ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด และอาจถูกยับยั้งโดยสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน หรือ คอลลอยด์ต่างๆในดิน

8. Clay minerals อาจเป็นอุปสรรคต่อการย่อยเซลลูโลสในดินได้ เพราะสามารถดูดซับเซลลูโลสและ สารผลิตภัณฑ์บางชนิดได้ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ไม่สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ



รูปที่ 2.4 การย่อย และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (ฉัตรชัย, 2548)

2.2.4 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส อาจทำได้โดยศึกษาการย่อยสลายในอาหารวุ้น Hankin และ Anagostakis (1977) วัดความสามารถการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี solid media containing carboxymethycellulose โดยเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร CMC agar วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี จากนั้นเทราดผิวหน้าอาหารด้วย 1% (w/v) aqueous hexadecyltrimethyl ammonium bromide ซึ่ง reagent นี้จะทำให้เกิดการตกตะกอนของ CMC ที่ไม่ถูกย่อยสลาย ทำให้เกิดวงใสของ CMC จากนั้นจึงวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสแล้วหาอัตราส่วนกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

นอกจากนี้ Apun (1995) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei*บนอาหารCMC agar บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย 0.1% congo red เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย1 M NaCl ก่อนตรวจสอบบริเวณใสที่ไม่ติดสีของ congo red ที่เกิดจากการย่อยสลาย CMC โดยเอนไซม์เซลลูเลส วิธีนี้

เป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบการวัดการทำงานของเซลลูเลสเบื้องต้น เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก และเห็นผลรวดเร็ว

2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันมีรายงานจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบครบทั้งสามส่วน คือ endoglucanase, exoglucanase และ β-glucosidase ในปริมาณที่พอเหมาะ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีผู้นิยมนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp.,*Penicillum*sp., *Bacillus* sp.*และ Clostridium* sp. เป็นต้น

2. ส่วนประกอบทางอาหารส่วน

ประกอบของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่สำคัญบางชนิด ได้แก่

2.1 แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากการทดลองของจิตตเสน (2529) ซึ่งนำเชื้อ *Homicola nigrescens* CM33 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ cellulose powder, cellulose acetate, CMC และ cellobiose พบว่าอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณเซลลูเลสสูงสุด แต่ ระพีพรรณ (2530) ที่ทำการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากกระเพาะหมักของโคพื้นเมือง พบว่า Ruminococcus albus21Aa มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ Whatman No.1 filter paperpulp นอกจากนั้นยังมีการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากธรรมชาติ เช่น การเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 พบว่ามีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ rice hull และ rice bran โดยวัดการทำงานของ CMCase ได้เท่ากับ 153.0 และ112 Unit/mlตามลำดับ (Lee et al., 2008) นอกจากนั้น ภัทรา และคณะ (2551) ได้เพาะเลี้ยง *Clostridium thermocellum* พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกข้าวโพดชานอ้อย ซังข้าวโพด และแกลบได้ดี ส่วน Haq et al. (2006) นำ *Trichoderma harzianum*มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติแตกต่างกัน คือ wheat bran, wheat straw, ricebran, rice husk และ soybean meal พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดในอาหารที่มี wheatbran เป็นแหล่งคาร์บอน

2.2 แหล่งและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนKeskar (1992) ได้เพาะเลี้ยง *Penicillium janthinellum*ในอาหารเหลว พบว่าในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน เชื้อเจริญได้ไม่ดีและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสน้อย เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนให้เชื้อ พบว่า ammonium sulphate ช่วยให้เชื้อ

สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดีกว่าnitrate และ Ali et al. (1991) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Aspergillus terreus*พบว่า ammonium nitrate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า enzyme และspecific activity สูงที่สุด นอกจากนี้นฤมล (2544) ได้ทำการศึกษา *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ*Bacillus coagulans* TI-5 โดยเพาะเลี้ยงใน cellulose broth ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน คือtryptone, ammonim nitrate, soytone, ammonium sulphate และ peptone พบว่า *Bacillus subtilis*CMU4-4 ใช้ tryptone และ Bacillus coagulans TI-5 ใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด นอกจากนั้น Oikawa et al. (1994) ได้ทดลองเพาะเลี้ยง*Acetobacter xylinum* KU-1 โดยใช้ polypeptone, peptone และ tryptone พบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้ง3 ชนิดสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ และจากรายงานของ Moussa and Tharwat (2007) เพาะเลี้ยง *Sclerotium rolfsii*โดยมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ potassium nitrate, ammonium sulfate และ DL-asparagine พบว่า *Sclerotium rolfsii*ใช้ DL-asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด

3. เทคนิคในการเพาะเลี้ยง (Goksoyr and Eriksen, 1980)

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีวิธีที่นิยมนำมาใช้ 2 วิธี ดังนี้

3.1 Submerge culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมอาหารแข็งลงไปและมีการให้อากาศหมุนเวียนตลอดเวลาหรือใช้เครื่องพ่นอากาศ เช่น Milala et al. (2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger*ในสภาวะ submerge culture พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี maize straw เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด คือ 102 U/ml นอกจากนี้ชริดา และคณะ (2549) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lentinus* sp. ในสภาวะ solid state และ submerge cultureที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแกลบข้าวเจ้าปน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ submerge culture และ Fungsin et al. (2008) พบว่า *Aspergillus niger*เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ submerge culture สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เท่ากับ 56.2 g/L

3.1.1 Shake culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามปกติที่มีการเขย่าตลอดเวลา เช่น Singh and Kumar (1998) นำเชื้อ *Bacillus brevis* VS-1 มาเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงใน shake-flask culture ที่ความเร็ว 175 rpm สอดคล้องกับรายงานของ Barron et al. (1995) ซึ่งเลี้ยงเชื้อ *Kluyvermyces marxianus* IMB3สามารถผลิต ethanol เมื่อเจริญในอาหารที่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส และพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน shake-flask culture ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น 21% และ Desal et al. (1988) ใช้การเพาะเลี้ยงแบบshake culture ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และ β-glucosidase ของ*Scytalidium lignicola* CD-48

3.1.2 Static culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบสภาวะนิ่ง ไม่มีการเขย่าเช่น การทดลองของ Kalra and Sandhu (2004) นำเชื้อ *Trichoderma pseudokonigii*มาเพาะเลี้ยงในสภาวะ shake culture และ static culture พบว่า การเพาะเลี้ยงทั้งสองแบบให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน แต่การทดลองของ Moussa and Tharwat (2007) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Sclerotium rolfsii*ในอาหารเหลว พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะ shake culture เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีว่าเลี้ยงในสภาวะ static culture 5% และในการทดลองของ Ray et al. (2007)ได้ใช้การเพาะเลี้ยงแบบ static culture เป็นมาตรฐานในการเตรียมเชื้อตั้งต้น (inoculum)เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Bacillus subtilis* CY5 และ*Bacillus circulans* TP3

3.2 Solid state หรือ koji-type process การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวอาหารแข็งที่ชื้น ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้เลี้ยงเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย ส่วนผสมของอาหารแข็งประกอบด้วยวัสดุที่เป็นของแข็งแห้ง และน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งส่วนใหญ่ใช้รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า ฟางข้าว และเสริมอาหารพวกโปรตีน และเกลือที่จำเป็น ดังเช่นรายงานของ Haq et al. (2006) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum*ในอาหารที่มีรำข้าว ฟางข้าว เมล็ดข้าว แกลบ และ ถั่วเหลืองป่น พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดในอาหารที่มี รำข้าวเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ Yusoff et al. (1991) ทำการเพาะเลี้ยง A. *terreus* SUK-1 ในสภาวะ solid state และ submerge culture โดยมี sugar cane bagasseเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state เชื้อสามารถผลิต reducing sugar และเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ submerge culture เช่นเดียวกันกับการทดลองของGrajek (1987) ซึ่งนำ *Thermoascus aurantiacus* และ *Sporotrichum thermophile*มาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state และ submerge culture พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state เชื้อสามารถผลิต เอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ submerge culture

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.1ความเป็นกรด-ด่าง

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญและมีกระบวนการชีวเคมีในสภาพที่เป็นกลางอย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์หลายชนิดมีการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดหรือด่าง มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น เช่น Immanuel et al. (2007) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* และ A. *fumigatus*ในอาหารที่มีกาบมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดที่ pH 5มีรายงานของ Oikawa et al. (1994) ที่เพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 ใน cellulose brothพบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ pH 5.5 เช่นเดียวกันกับ Singh

andKumar (1998) ที่เพาะเลี้ยง *Bacillus* brevis VS-1 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ pH 5.5 แต่ Desal et al. (1988) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Scytalidium lignicola* CD-48ใน pH 6 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Haq et al. (2005)ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* UM-11 และพบว่าที่ pH 6 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด ส่วน ระพีพรรณ (2530) ใช้ cellulose broth ที่ pH แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยง *Ruminococcus albus* 21Aa พบว่า pH 6.8 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด ในทำนองเดียวกัน Lee et al. (2008) ได้ทำการเพาะเลี้ยง*Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 พบว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในอาหารที่มี pH 7 โดยให้ค่า enzyme activity สูงที่สุด เช่นเดียวกันกับ ภัทรา และคณะ (2551) ที่พบว่า Clostridium thermocellum สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดที่ pH 7

4.2 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง เช่น Haq et al. (2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* UM-11 ใน CMCbroth ที่อุณหภูมิ 20-40°C พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 28°C และจากรายงานของ Kathiresan and Manivannan (2006) ทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium fellutanum*ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40°C พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด รองลงมา คือ 20 และ 40°C ตามลำดับ และการทดลองของImmanuel et al. (2007) พบว่า*Aspergillus niger*และ A. *fumigates* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40°C ในอาหารที่มีกาบมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่า enzyme activity สูงที่สุด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี sawdust เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อให้ค่า enzyme activity สูงที่สุด ที่อุณหภูมิ 50°Cเช่นเดียวกันกับ Ray et al. (2007) ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CY5 และ *Bacillus circulans*TP3 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25, 30, 35, 40 และ 45°C พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40°C และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45°C นอกจากนั้นนฤมล (2544) พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ*Bacillus coagulans* TI-5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญแตกต่างกัน คือ 45 และ 37°C ตามลำดับสอดคล้องกับ Singh and Kumar (1998) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus brevis* VS-1 และพบว่าที่37°C เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด

4.3 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ดังเช่น การเพาะเลี้ยง *Rhizopus stolonifer*ในอาหารที่มี cassava waste เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อเริ่มผลิต

เอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 2 และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดในวันที่ 10(Pothiraj et al., 2006) ส่วนการเพาะเลี้ยง*Penicillium fellutanum*ในสภาวะ submerged fermentation เมื่อนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 1-6 วันพบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน มีค่า enzyme activityเท่ากับ 79 U/ml (Kathiresan and Manivannan, 2006) ส่วน *Trichoderma koningii*พบว่าผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง (Liu and Yang, 2006และพบอีกว่า *Penicilluim jantheinellum*มีเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 48 ชั่วโมง (Keskar, 1992) และพบว่า *Anoxybacillus flavithermus* EHP1 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่เวลา 36 ชั่วโมง(Salah et al., 2007) แต่ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. No. N-4 ในอาหาร CMC medium พบว่าที่เวลา24 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด (Horikoshi et al., 1984) ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaceins*ในอาหารที่มี sago pith เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่เวลา24 ชั่วโมง เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด โดยให้ค่า enzyme activity เท่ากับ 1.30 mg/ml(Apun et al., 2000) และพบอีกว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 มีเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 18 ชั่วโมง (นฤมล, 2544)

2.2.6 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิด อาจมีคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ โครงสร้างของเอนไซม์ ชนิดและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ประกอบด้วย

1. น้ำหนักโมเลกุล เอนไซม์เซลลูเลสจะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิต

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 2.5 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์

ชนิดของจุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (Daltons)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus oryzae	130,000	Riou *et al.*, 1998
A. niger CCRC 31494	49,000	Yan and Lin, 1997
Bacillus amyloliquefaciens DL-3	55,118	Lee *et al.*, 2008
Bacillus subtilis KSM-635	40,000	Ozaki *et al.*, 1995
Bacteroides succinogenes S85	43,000	Shellhorn and Forsberg, 1987
Cladosporium resinae	98,000	Oh *et al.*, 1999
Clostridium thermocellum	60,000	Ahsan *et al.*, 1997
Streptomyces flavogriseus	45,000	Mackenzie *et al.*, 1984
Trichoderma reesei	81,600	Chirio and Brown, 1987

2. อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม และความเสถียร

เอนไซม์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (optimum temperature) เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ80°C ดังเช่น รายงานของ Okoshi et al. (1990) พบว่า CMCase จาก Bacillus sp. KSM-522มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานต่างกัน คือ เซลลูเลส EI มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60°C ส่วนเอนไซม์ EII และ EIII มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50°C ส่วนการทดลองนฤมล (2544) พบว่า CMCaseจาก *Bacillus subtilis* CMU4-44 และ *Bacillus coagulans* TI-5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 60°C ส่วน Lee et al. (2008) พบว่าที่อุณหภูมิ 50°C เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 นอกจากนี้ Berthelot and Delmotte(1999) ได้ศึกษา β-glucosidase จาก *Rhizobium* sp. USDA 4280 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส คือ

148963

35°Cสำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เซลลูเลสนั้นนฤมล (2544) รายงานว่าCMCase จาก *Bacilus subtilis* CMU4-44 และ *Bacillus coagulans* TI-5 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 10 นาที พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิไม่เกิน 60°C ส่วนLee et al. (2008) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 มีความเสถียรสูงที่สุด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50-70°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นอกจากนี้ Okoshi et al. (1990) รายงานว่าCMCase จาก *Bacillus* sp. KSM-522 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันเป็นเวลา 30 นาที พบว่าเซลลูเลสEII และ EIII มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงไม่เกิน 50°C แต่ EI มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงไม่เกิน 40 °C แต่การทดลองThomas and Zeikus (1981) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum* LQRI และ*Trichoderma reesei* QM9414 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 25-50°C ซึ่งเอนไซม์จะเสียสภาพเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที

2.2 pH ที่เหมาะสม และความเสถียร

การเปลี่ยนแปลงของ pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อ pH เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย อาจทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์มีการแตกตัวตรงหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิลหรือ side chain ได้ต่างกัน ในสภาวะที่ pH แตกต่างกันจะมีผลให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ค่าหนึ่ง เรียกว่า ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ณ จุดที่ pH มีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะลดลง เอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่สุดใน pH ช่วง 5.0 ถึง 9.0 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและลดช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงขึ้น จนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยา จะไม่เพิ่มขึ้นอีก นฤมล (2544) พบว่า pH ที่เหมาะสมของ CMCase *ของ Bacillus subtillis* CMU4-44 และ*Bacillus coagulans* TI-5 คือ pH 5.0 ส่วน Lee et al. (2008) พบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส คือ 7.0 และ จากรายงานของ Salah et al. (2007) พบว่า *Anoxybacillus flavithermus* EHP1 ซึ่งเป็น thermophilic bacteria มี pH ที่เหมาะสมคือ 7.5ส่วนความเสถียรต่อ pH ของเซลลูเลส จากรายงานของ นฤมล (2544) พบว่าเซลลูเลสจาก *Bacillus subtilis* CMU4-44 มีความเสถียรที่ pH ในช่วง 4.0-8.0 และ *Bacillus coagulans* TI-5 มีความเสถียรต่อ pH อยู่ในช่วง 4.8-6.0 ส่วนรายงานของ Lee et al. (2008) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา20 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH ในช่วง 4.0-9.0 นอกจากนี้ Okada (1985) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากA. *niger*เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ใน pH แตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความเสถียรที่ pH 5.5-6.5 และเมื่อ Yan and Lin (1997) นำ β-glucosidase จาก A. *niger*CCRC-31494 เก็บใน pH ที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 5.0-7.0

3. ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้ง

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น และลักษณะของfunctional group ที่บริเวณ active site ทำให้เข้าใจและสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ รายงานของLee et al. (2008) พบว่า Hg^{2+}, EDTA, Mn^{2+}, N-bromosuccinimide, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+}, และ K^{+}มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Singh and Kumar (1998) ที่พบว่า Hg^{2+} และ Ag^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus brevis* VS-1 เช่นเดียวกับ Thomas and Zeikus (1981) ที่รายงานว่า Ag^{2+} และHg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum* LQRI แต่ Ca^{2+},Mg^{2+} และ Mn^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* QM9414 ส่วนCu^{2+}, Zn^{2+} และ ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether) -N, N-tetraacetic acid มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* QM9414 และ *Clostridium thermocellum*LQRI นอกจากนี้ Forsberg and Groleau (1982) ศึกษาความเสถียรของ endo-β-1,4 glucanase และβ-1,4 glucosidase (cellobiase) ที่ผลิตจาก Bacteroides succinogenes ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติม merthiolate ปริมาณ40 µg/ml ทำให้ CMCase สูญเสียการทำงาน 20% ระหว่าง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง

2.2.7 **การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์** (Goksoyr and Eriksen, 1980)

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ จึงมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ มาใช้ในกระบวนการผลิตสารสำคัญหลายชนิด โดยมีเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบสำคัญ เนื่องจากหาง่าย และเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมตัวอย่างของการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์ได้แก่

1. สกัดสารในใบชา ถั่วเหลือง มันเทศ แป้งข้าวโพด และวุ้น
2. ผลิตน้ำส้มสายชูจากเยื่อส้ม และเยลลี่จากสาหร่าย
3. ย่อยเซลลูโลสที่ตกค้างจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ
4. ย่อยเปลือกถั่วเหลือง
5. เปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่ออาหารของผัก ข้าวเจ้า และข้าวเหนียว
6. เป็นส่วนผสมในผงซักฟอก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขจัดความสกปรกและไม่ทำลายเส้นใยผ้า
7. ช่วยแยกเซลล์เดี่ยว และ active protoplast ของพืช
8. ช่วยทำให้น้ำผัก ผลไม้ ใสขึ้น
9. ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสในสิ่งปฏิกูล

10. นำกลูโคสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์ ไปใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ และโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein)

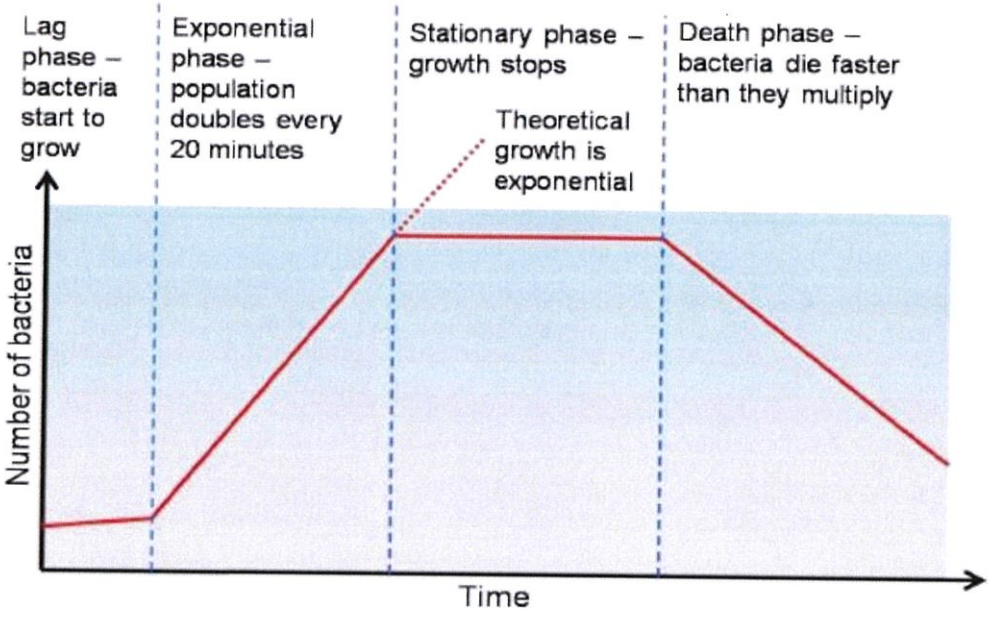
ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์มาผลิตเพื่อการค้า โดยมีการผลิตอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีจำหน่ายในบริษัทยักษ์ใหญ่ทางด้านสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์หลายแห่ง เช่น ในปี 2008 บริษัท Fluka มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก Aspergillusniger จำหน่ายในราคา 4,365 บาทต่อ 25 กรัม ส่วนบริษัท Sigma ผลิตจาก Aspergillus nigerจำหน่าย 5,000 unit ในราคา 1,656 บาท นอกจากนั้นยังมีการผลิตจาก Trichoderma reesei โดยจำหน่าย 5,000 unit ในราคา 3,032 บาท และจาก Trichoderma viridae ขาย 5,000 unit ในราคา5,259 บาท (Anonymous 4, 2008)

2.3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การเจริญเติบโตของจุลินทรียโดยเฉพาะจุลินทรียเซลลเดี่ยว เชน แบคทีเรียและยีสต ตลอดจนโปรโตซัวและสาหรายบางชนิดที่อยูเปนเซลลเดี่ยว การเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสตนั้นไมไดหมายความวาขนาดของเซลลใหญขึ้น ถึงแมวาบางทีดูเหมือนเปนเชนนั้น แตหมายถึงการเพิ่มจำนวนเซลล ซึ่งเปนผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและฟสิกสภายในเซลล การเจริญเติบโตเปนปจจัยที่สำคัญอยางยิ่งในการดำรงชีวิต เซลลแตละเซลลมีชวงอายุที่จำเพาะเจาะจงสำหรับ species หนึ่งๆ การเจริญเติบโตของประชากรนั้นสามารถที่จะตรวจสอบไดโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลลหรือมวลชีวภาพ (biomass) ของประชากรตอหนึ่งหนวยเวลา ซึ่งเรียกวา “อัตราการเจริญเติบโต” (growth rate) เวลาที่ใชในการเพิ่มจำนวนประชากรจากเดิมเปน 2 เทา เรียกวา generation time(doubling time) จะแตกตางกันไปในแตละ species ในสภาวะแวดล้อมหนึ่งๆ การเติบโตของจุลินทรียสามารถบอกไดโดยการวัดความขุน(turbidity) ของจุลินทรียในอาหารเหลว การเพิ่มขนาดของโคโลนีบนอาหารแข็ง หรือการเพิ่มของจำนวนเซลลภายใตกลองจุลทรรศน ทั้งนี้การวัดนั้นตองเทียบกับหนวยเวลาจุลินทรียเซลลเดี่ยวจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนดวยการแบงเซลลจาก 1 เปน 2 (binary fission) เซลลรุนลูกแตละเซลลมีลักษณะเหมือนเซลลแมทุกประการ เมื่อการแบงเซลลสิ้นสุดลง จำนวนเซลลหรือมวลชีวภาพ(biomass) จะเพิ่มเปน 2 เทาจากเมื่อกอนแบงเซลล์

การเจริญเติบโตของจุลินทรียสามารถศึกษาไดจากกราฟการเติบโต (growth curve) โดยที่กราฟการเติบโตปกติ (typical growthcurve) จะแสดงใหเห็นถึงระยะการเติบโต 4 ขั้นด้วยกัน คือ

1. ระยะ lag (A) เซลลอยูในชวงการปรับตัวกอนแบงเซลลเพิ่มจำนวน
2. ระยะ log (B) เซลลมีการเจริญเติบโตอยางเต็มที่ จำนวนเซลลเพิ่มขึ้นแบบ exponential
3. ระยะstationary (C) อัตราการเพิ่มมวลชีวภาพเปน 0
4. ระยะ decline (D) จำนวนของเซลลที่มีชีวิตลดลงอัตราการเพิ่มจำนวนนอยกวาอัตราการตาย



รูปที่ 2.5 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *(Bikramjit Sen. Team PrepGenie , 2009)*

2.4 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียโดยวัดความขุ่น

ใช้หลักการดูดกลืนคลื่นแสงที่ไม่เท่ากันของจำนวนแบคทีเรียที่มากขึ้น ปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้และกระจายออกจะเป็นสัดส่วนกับความหนาแน่นของเซลล์ เครื่องมือที่ใช้คือ Spectrophotometer โดยการนำ suspension ของแบคทีเรียใส่ในหลอดวัดอ่านเปอร์เซ็นต์แสงที่ผ่านออกมา (%transmittance) ถ้าsuspension มีความขุ่นมาก เปอร์เซ็นต์ที่แสงจะผ่านได้มีน้อยโดยทั่วไปมักอ่านค่า Optical density (OD) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นหรือจำนวนเซลล์

ข้อดี สะดวกรวดเร็ว หาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับจำนวนเซลล์ได้เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อใช้ในการคำนวณจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียนั้นเอง

ข้อเสีย เชื้อที่จะนำมาวัดต้องมีความขุ่นมากพอ เป็นการวัดทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

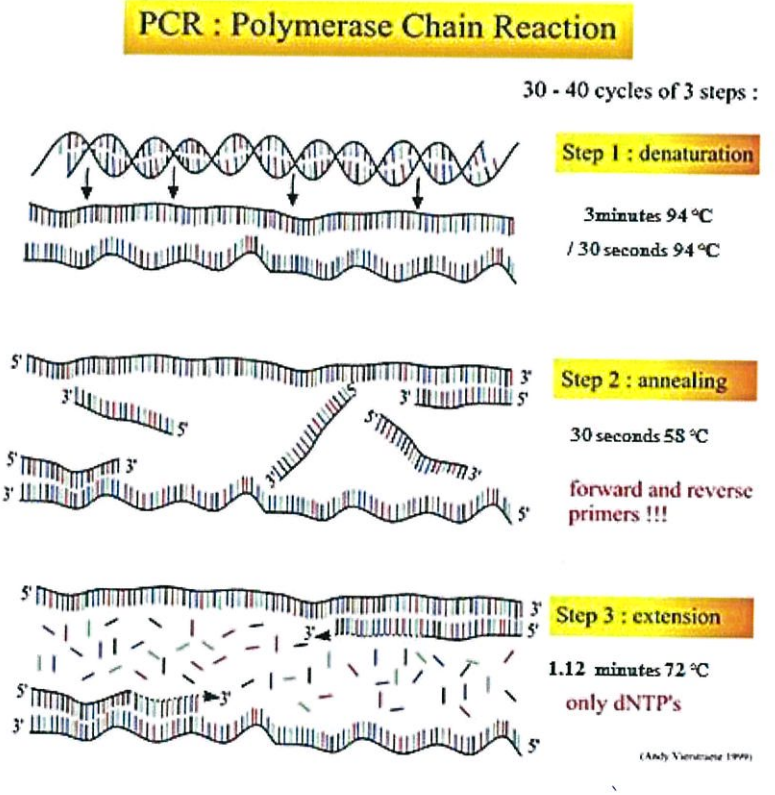
คือเทคนิคหนึ่งที่มักใช้ในงานวิจัยทางด้านอณูชีววิทยา (Molecular biology) อยู่บ่อยๆ เป็นกระบวนการในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ(DNA) ในหลอดทดลอง โดยวิธีการได้เลียนแบบมาจาก

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ(DNA) ในสิ่งมีชีวิต ผู้คิดค้นเทคนิค PCR (พีซีอาร์) นี้คือ Karry Mullis ซึ่งนักวิจัยโดยส่วนมากจะใช้เทคนิค PCR (พีซีอาร์) นี้ในการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ(DNA) โดยใช้เครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยามีอยู่3 ขั้นตอนหลักๆ คือ

1. Denaturing คือ เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ (DNA) ที่เป็นเกลียวคู่ หรือ Double Strand DNA (คือ สภาพ Native DNA) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆจนกลายเป็นดีเอ็นเอ (DNA) สายเดี่ยว หรือ Single Strand DNA (คือ สภาพ Denatured DNA) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 90-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing คือ เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆและใส่ไพร์เมอร์ (Primer, short dna) ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส (Complementary base pair) ระหว่างไพร์เมอร์ (Primer) กับ Template DNA โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

3. Extension คือ เป็นขั้นตอนการ ใส่ DNA polymerase ลงไปในระบบ เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) สายใหม่ หรือ เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ (DNA) ให้มากขึ้น โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 72-75 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.6 กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (barascientific, 2004) ที่มา http://www.thaibiotech.info/what-is-pcr.php

2.6 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดย วิธีการทางโมเลกุล (Molecular techniques)

การระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้ถึงระดับสปีชีส์และระดับสายพันธุ์ภายในสปีชีส์ โดยอาศัยฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่มีผู้รวบรวมไว้แล้ว หรือเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์มาตรฐานที่รู้สปีชีส์ไว้ก่อน การระบุชนิดจุลินทรีย์อาจทำด้วยหลักการตัดด้วยเอนไซม์ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) หรือการหาลำดับเบส (sequence)

2.6.1 การตัดด้วยเอนไซม์ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

การระบุชนิดจุลินทรีย์อาจทำโดยการใช้ restriction enzyme ตัดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR แล้วนำไปแยกตามขนาดด้วย gel electrophoresisบริเวณของดีเอ็นเอบางบริเวณจะมีความจำเพาะเจาะจงในแต่ละสปีชีส์ เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ จะทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กัน เมื่อแยกขนาดด้วย electrophoresis จะทำให้เกิด pattern ต่างๆ กัน ตามชนิดของจุลินทรีย์แต่ละสปีชีส์

หากต้องการจำแนกจุลินทรีย์ถึงระดับสายพันธุ์อาจต้องใช้เทคนิคอื่นนอกเหนือจาก RFLP เช่น การใช้ primer ที่แตกต่างกันใน PCR ให้ได้รูปแบบของผลผลิต PCR ที่แตกต่างกัน โดยต้องเลือกบริเวณของดีเอ็นเอที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้ได้ความแตกต่างของรูปแบบของแต่ละสายพันธุ์

2.6.2 การหาลำดับเบส (Sequence)

การหาลำดับเบส (Sequence) เป็นการหาลำดับของเบส ในชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบางบริเวณที่ทราบลำดับเบสของจุลินทรีย์แต่ละชนิด และมีฐานข้อมูลไว้แล้ว เมื่อนำจุลินทรีย์ที่ต้องการทราบชนิดมาหาลำดับเบส แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เทียบกับฐานข้อมูล GenBank ซึ่งใช้ผ่านระบบอินเทอร์เน็ต ก็สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้ถึงระดับสปีชีส์การทำ sequence กับบริเวณของดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ก็อาจทำให้สามารถจำแนกจุลินทรีย์สปีชีส์เดียวกันออกเป็นหลายสายพันธุ์ได้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รัชรา,สมบูรณ์ และ มาโมรุ (2557) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากของเหลวในกระเพาะหมักของวัว พบแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลท โดยไอโซเลท B4 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด เมื่อบ่งบอกสายพันธุ์จุลินทรีย์นี้ โดยวิธี 16s rDNA sequencing พบวามีความใกล้เคียงกั บ Bacillus subtilis มากที่สุด (>99%) เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยไอโซเลท B4 ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านคอลัมน์ DEAD Toyopearl 650M, Butyl-Toyopearl 650M และSuperQ-650 ตามลำดับ พบวาเอนไซม์มีค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

เท่ากับ4.70 U/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็ น 67.2 เท่า น้ำหนักของโมเลกุลเอนไซม์มีค่าประมาณ 35 KDaและทำงานได้ที่อุณหภูมิ 60 °C และพีเอช 6.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ50°C พีเอช 5.0โดย Mn2+และ Fe3+ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ นอกจากนี้ด้านความจำเพาะต่อสารตั้งต้น เอนไซม์บริสุทธิ์มีความสามารถในการย่อยCMC และของเหลือใช้ทางการเกษตรได้

ระพีพรรณ (2530) ที่ทำการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากกระเพาะหมักของโคพื้นเมือง พบว่า Ruminococcus albus21Aa มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ Whatman No.1 filter paperpulpนอกจากนั้นยังมีการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากธรรมชาติ เช่น การเพาะเลี้ยง Bacillus amyloliquefaciens DL-3 พบว่ามีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือrice hull และ rice bran โดยวัดการทำงานของ CMCaseได้เท่ากับ 153.0 และ112 Unit/mlตามลำดับ

นฤมล (2544) พบว่า Bacillus subtilis CMU4-4 และBacillus coagulans TI-5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญแตกต่างกัน คือ 45 และ 37°C ตามลำดับสอดคล้องกับ Singh and Kumar (1998) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง Bacillus brevis VS-1 และพบว่าที่37°C เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด พบอีกว่า Bacillus subtilis CMU4-4 และ Bacillus coagulans TI-5 มีเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 18 ชั่วโมง

พรทิพา (2554) การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่มS.violaceusniger 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล Fabaceae 5 ชนิด ได้แก่ หางนกยูงไทยและมะขาม (subfamily Caesalpinioideae) กระถินไทย (subfamily Mimosoideae) และอัญชันและแค (subfamily Papilionoideae) โดย sequence-based molecular techniques ผลจากการสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดินโดย DNeasy plant mini kit และ PCR amplification โดยใช้eubacterial 16S rRNA gene-specific primers และ S.violaceusniger 16S rRNA gene clade-specific primers แสดงให้เห็นว่าไม่มีการกระจายของแบคทีเรียในกลุ่ม S.violaceusniger 16S rRNA gene clade ในตัวอย่างดินบริเวณรากของพืชทั้ง 5 ชนิด

Kathiresan and Manivannan (2006) ทำการเพาะเลี้ยง Penicilliumfellutanumที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40°C พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด รองลงมา คือ 20 และ 40°C ตามลำดับการเพาะเลี้ยง Penicilliumfellutanum ในสภาวะ submerged fermentation เมื่อนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 1-6 วันพบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน มีค่า enzyme activity เท่ากับ 79 U/ml

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ตัวอย่างมาจากโครงงานพิเศษ เรื่องการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัววิเคราะห์โดยการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส ศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย วัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ทำการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยขีดเชื้อลงบนอาหารแข็งทุกๆ 1 สัปดาห์

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดเหลว
  1. Yeast Extractเกรดวิเคราะห์ บริษัท Titan Biotech Ltd. ประเทศอินเดีย
  2. Peptone เกรดวิเคราะห์ บริษัท Titan Biotech Ltd. ประเทศอินเดีย
  3. Carboxymethylcellulose (CMC) เกรดวิเคราะห์ บริษัทTitan Biotech Ltd. ประเทศอินเดีย
- อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดแข็ง
  1. Yeast Extract เกรดวิเคราะห์ บริษัทTitan Biotech Ltd. ประเทศอินเดีย
  2. Peptone เกรดวิเคราะห์ บริษัทTitan Biotech Ltd. ประเทศอินเดีย
  3. Carboxymethylcellulose (CMC) เกรดวิเคราะห์ บริษัทTitan Biotech Ltd. ประเทศอินเดีย
  4. Agar เกรดวิเคราะห์ บริษัท Titan Biotech Ltd. ประเทศอินเดีย

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรีย

1. คองโกเรด
2. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เกรดวิเคราะห์ บริษัทCarlo ERBAReagents ASA ประเทศฝรั่งเศส

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

DNA extraction kit (Favorgen Biotech Corp. ประเทศไต้หวัน)

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

1. 10x Reaction
2. dNTP
3. Primer 16s RNA Forward
4. Primer 16s RNA Reverse
5. Tag

3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (Purification of PCR Products for Sequencing)

DNA extraction kit (Favorgen Biotech Corp. ประเทศไต้หวัน)

3.2.6 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR ขั้นพื้นฐาน โดยวิธี Gel Electrophoresis

1.Tris-borate-EDTA (TBE)

2.สีย้อม DNA

3. 1.2 % Agarose

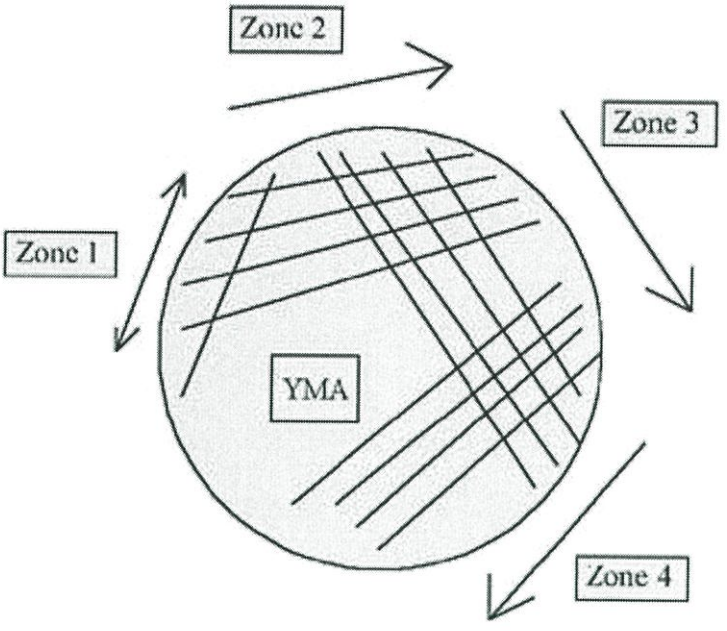
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. คิวเวต
2. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งInternal Calibration รุ่น Sartorius บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมันนี
4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท JS Research INC
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo Centrifuge) ยี่ห้อThermo-Scientific รุ่นHeraeus-Megafuge 8R
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อThermo Scientific รุ่น Genesys10S
7. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก

8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet)รุ่น Horizontal Laminar Flow
10. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาดต่างๆบริษัท NICHIRYO ประเทศญี่ปุ่น
11. หลอดเซนติฟิวก์50 มิลลิลิตร
12. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
13. เครื่องพีซีอาร์ ยี่ห้อ Thermal Cycler รุ่น Bio-Rad T100 Thermal Cycler
14. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
15. เครื่องกวนสาร
16. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Quick Spin)
17. เครื่อง Electrophoresis และ power supply
18. ชุดอุปกรณ์DNA extraction
19. ชุดอุปกรณ์ PCR
20. ชุดอุปกรณ์การกำจัดสิ่งเจือปน

3.4 การขีดเชื้อบนอาหารแข็ง (Restreak)

การขีดเชื้อบนอาหารแข็งสามารถทำได้โดยการขีดเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างลงบนอาหารแข็งเพื่อให้เชื้อที่มีปริมาณมากๆ กระจายออกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ซึ่งแต่ละโคโลนีจะเจริญมาจากเซลล์เดี่ยวซึ่งเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์ (วิธีการเตรียมอาหารแข็ง ภาคผนวก ก) โดยวิธีในการขีดเชื้อจะเป็นแบบ Four – way cross Streak คือการใช้ Loop ที่เผาไฟแล้วรอให้เย็นแล้วแตะเชื้อมาขีดบนอาหารแข็ง (Solid Media) ดังภาพที่3.1 ซึ่งในการขีดเชื้อทุกแนวควรเปลี่ยน Loop ที่ใช้ หรือเผาไฟทุกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อที่มากเกินไป เชื้อจะหนาแน่นมากที่รอยขีดแรกแล้วค่อยๆ หนาแน่นน้อยลงในรอยขีดท้ายๆจนแต่ละเซลล์แยกออกจากกันได้ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับเชื้อ



รูปที่ 3.1 การขีดเชื้อจะเป็นแบบ Four – way cross Streak

ที่มา Revista de Microbiologia, 1999

3.5 การวัดการเจริญเติบโต

ในการวัดการเจริญเติบโตสามารถทำได้โดยการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว 1-2 โคโลนีลงในอาหารเหลวCMC(วิธีการเตรียมอาหารเหลว ภาคผนวก ก) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำมาวัดค่า Optical density ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำไปคำนวณเพื่อปรับค่า Optical density เริ่มต้นของเชื้อแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันที่ 0.05 ทำการวัดทุกๆ 1 ชั่วโมงและนำค่าไปพล็อตกราฟเทียบระหว่างระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อกับการเจริญเติบโตของเชื้อเพื่อเปรียบเทียบแต่ละช่วงระยะของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดังรูปที่2.5

3.6 การทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีสังเกตวงใส (Clear zone)

การทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีสังเกตวงใส (Clear zone) นั้นสามารถทำได้โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตได้จากการวัดเจริญเติบโตทั้ง 4 ระยะมาทำการปั่นเหวียงและนำส่วนใสมา50

ไมโครลิตร หยดลงบนจานเลี้ยงเชื้ออาหารแข็งCMCแบบหลุมมีทั้งหมด 5 หลุมโดยมี 1 หลุมเป็นหลุมควบคุม ทิ้งไว้หนึ่งคืนหรือประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วยสีย้อมคองโกเรด แล้วล้างสีย้อมออกด้วยโซเดียมคลอไรด์1 M เพื่อให้เห็นวงใสชัดเจนยิ่งขึ้น แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิด

3.7 วิธีการวิเคราะห์โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA)

1. นำสารตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาส่วนใส่ทิ้งแล้วเก็บตะกอนไว้ในหลอด Microcentifuge ทำไปเรื่อยๆจนสารตัวอย่างหมด

2. ใส่ FAPG1 400 ไมโครลิตร+RNaseA 8 ไมโครลิตร ดีดหลอดให้ตะกอนเป็นเนื้อเดียวกัน

3. นำไปใส่ใน Heat box อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที ครบ 5 นาทีนำออกมาคว่ำหงาย หลังจากนั้นนำไปใส่ใน Heat box อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที อีกรอบ เมื่อครบ 5 นาที แล้วเอาออก

4. ใส่ FAPG2 130 ไมโครลิตร คว่ำหงายหลอด แช่น้ำแข็ง 5 นาที

5. เทสารตัวอย่างที่แช่ในน้ำแข็งใส่ Filter Column ที่ด้านล่างรองด้วย Collection tube 2 มิลลิลิตร

6. นำไปปั่นเหวี่ยง 3 นาที ด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที

7. เอา Filter Column ออกเทส่วนใสลงในหลอด Microcentifuge ที่เตรียมไว้

8. ใส่ FAPG3 Buffer ปริมาณ1.5เท่า ของส่วนใสที่ได้

9. เตรียม Filter Column ใส่ Filter Column2 มิลลิลิตร ดูดสารละลายในข้อ8 ลงไป 750 ไมโครลิตร

10. นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำจนสารละลายในข้อ8 หมด

11. เติม W1 Buffer 500 ไมโครลิตร ใส่ Wash Buffer 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที

12. เทส่วนใสทิ้ง แล้วใส่หลอด Filter Column กลับมาที่ Collection tube นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที ให้แห้ง

13. แยกส่วน Filter Column ข้างบนใส่หลอด Microcentifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

14. ใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Clave) หรือ Preheater Elution Buffer 50 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางทิ้งไว้ให้ซึม 3 นาที

15. นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที

3.7.2 ขั้นตอนการทำ PCR

1. เติมส่วนผสมในการทำ PCR ตามลำดับในตารางที่ 3.1

2. ดูดส่วนผสมมาใส่ในหลอด PCR หลอดละ 10 ไมโครลิตร เติมtemplate DNA หลอดละ 2.5 ไมโครลิตร ผสมสารในหลอดทดลองนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2-3 วินาที

3. นำไปเข้าเครื่อง Thermocycler และตั้งค่าการทำงานของเครื่อง ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมในการทำ PCR

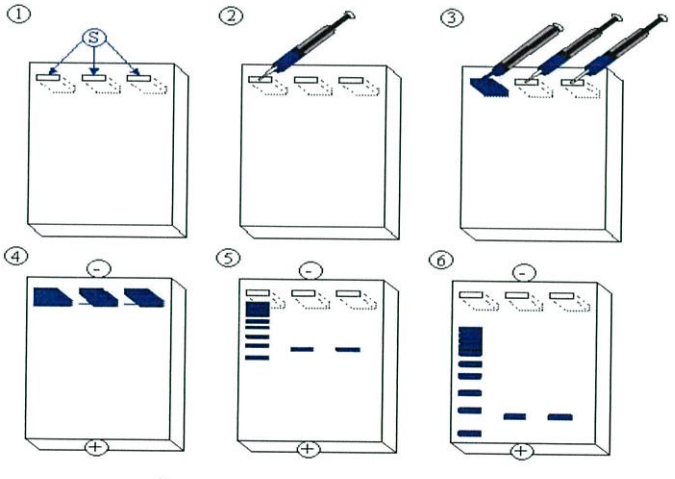
สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (50 ไมโครลิตร)	ปริมาณที่ใช้จริง (12.5 ไมโครลิตร)
10X reaction	5.0 ไมโครลิตร	1.25 ไมโครลิตร
dNTP	0.5 ไมโครลิตร	0.125 ไมโครลิตร
Primer Forward	1.0 ไมโครลิตร	0.25 ไมโครลิตร
Primer Reverse	1.0 ไมโครลิตร	0.25 ไมโครลิตร
tag	0.25 ไมโครลิตร	0.0625 ไมโครลิตร
Template (Sample)	0.5-10 ไมโครลิตร	2.5 ไมโครลิตร
น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Clave)	จนปริมาตรครบ 50 ไมโครลิตร	8.06 ไมโครลิตร
รวม	50 ไมโครลิตร	12.5 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.2 ค่าการทำงานของเครื่อง Thermocycler

Initial Denaturation	94 องศาเซลเซียส3นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส30วินาที	30 รอบ
Annealing	58 องศาเซลเซียส30วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส1.12 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส5นาที	

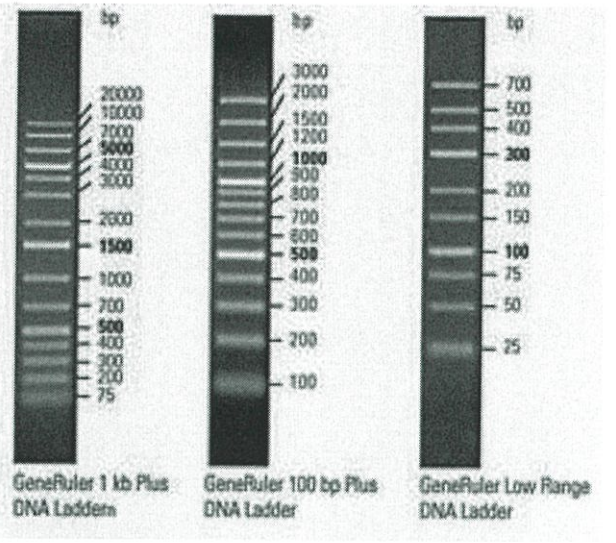
3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR ขั้นพื้นฐาน โดยวิธี Gel Electrophoresis

เป็นกระบวนการที่ใช้แยก DNA ของสารตัวอย่างโดยใช้ไฟฟ้าเพื่อตรวจหาองค์ประกอบของ DNA ในสารตัวอย่างเพื่อประโยชน์ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของสารตัวอย่าง โดยการนำเจล 1.2% agarose (ภาคผนวก ก) วางลงบนถาดและใส่ลงไปในเครื่อง Electrophoresis ในแนวตั้ง เทสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ให้ท่วมเจลและใส่สาร DNA ตัวอย่างมีปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในเจล จากนั่นให้กระแสไฟ 250 volts เข้าเครื่อง DNA จะมีการเคลื่อนย้ายไปยังขั้ว anode เป็นเวลา 15-20 นาทีหรือจนกว่าแถบสีของDNAตัวอย่างที่ย้อมสีเคลื่อนที่จนเลยกลางเจลมาเล็กน้อยตามน้ำหนักโมเลกุลระยะทางที่ DNA ได้เคลื่อนไปในเจลสามารถเห็นได้ชัดจากการย้อมสีและส่วนต่างๆของ DNA ที่แยกออกมาจะมีค่าตั้งแต่ 300 – 4000 bp จากนั่นจะได้ภาพการแยกที่ชัดเจน



รูปที่ 3.2 การทำ Gel Electrophoresis

ที่มา http://ku-scmicro36bkk.tripod.com/PCR.html



รูปที่ 3.3 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

ที่มา https://www.thermofisher.com

3.7.4 การทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยวิธีการ PCR product purification

1. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มา 200 ไมโครลิตร ใส่ FADF ไป5เท่า
2. เตรียมหลอด Column ใส่ Collection tube
3. นำสารตัวอย่างข้อ1 ใส่หลอดข้อ2 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งส่วนใสไป
4. ใส่ Wash Buffer 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งส่วนใสไป
5. นำไปปั่นเหวี่ยงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที ให้แห้ง
6. ย้าย Column ไปที่หลอด Microcentifuge 1.5 มิลลิลิตร
7. ใส่ 40 ไมโครลิตร Elution Buffer ลงไปตรงกลางทิ้งไว้ 2 นาที
8. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที

3.7.5 การหาความคล้ายคลึงของลำดับเบสบน DNA ด้วยโปรแกรม BLAST

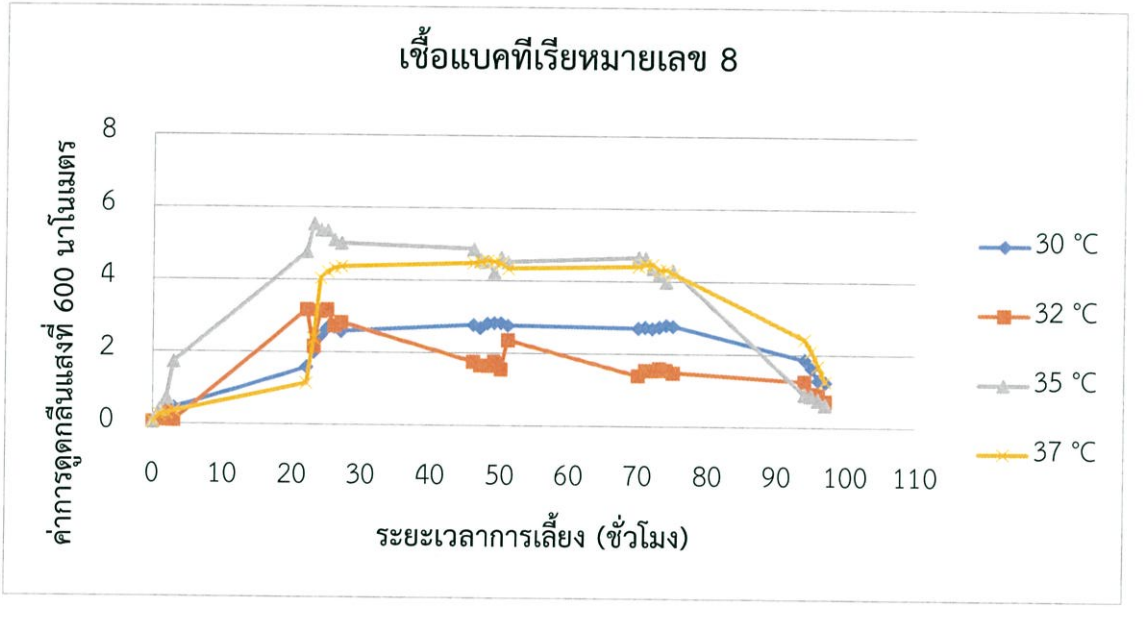
นำ PCR Product ที่สกัดได้จากข้อ 3.7.4 ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท SolGent co., Ltd. จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบในฐานข้อมูลโดยใช้ความรู้ทางชีวสารสนเทศและโปรแกรม BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)มาช่วยในการระบุสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลทางอินเตอร์เน็ต (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 4 ตัวอย่างคือหมายเลข 8,10,16 และ 21 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้

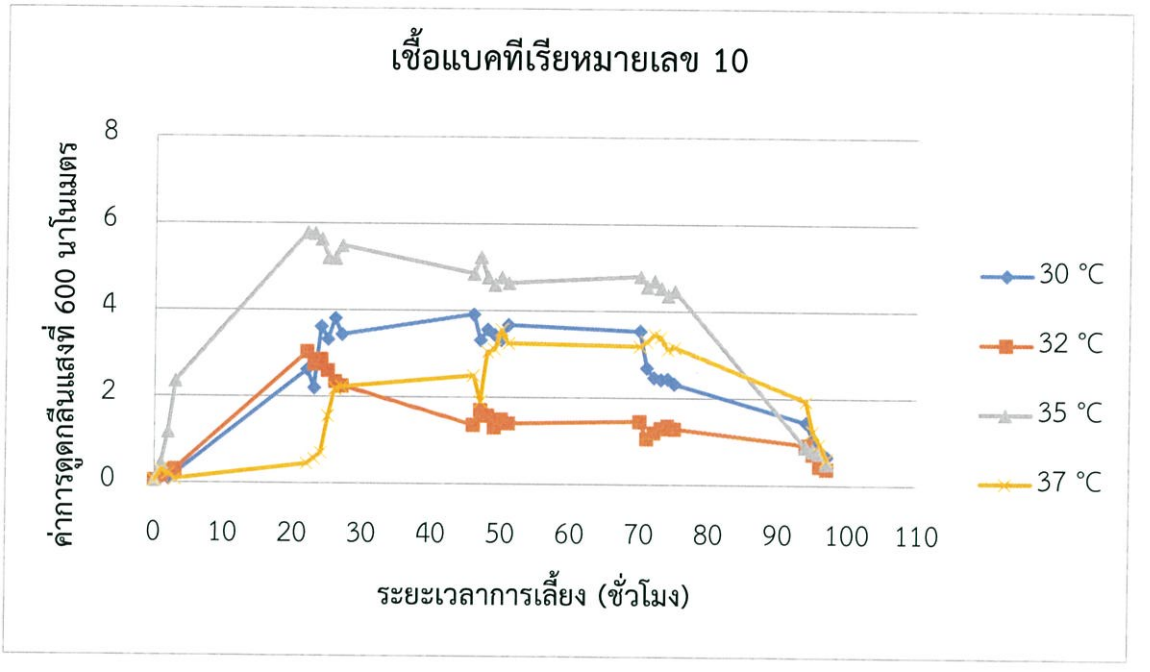
4.1.1 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากรูปที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 49 มีค่า OD เท่ากับ 2.83, ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 22 มีค่า OD เท่ากับ 3.17, ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 23 มีค่า OD เท่ากับ 5.54 และ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 มีค่า OD เท่ากับ 4.54

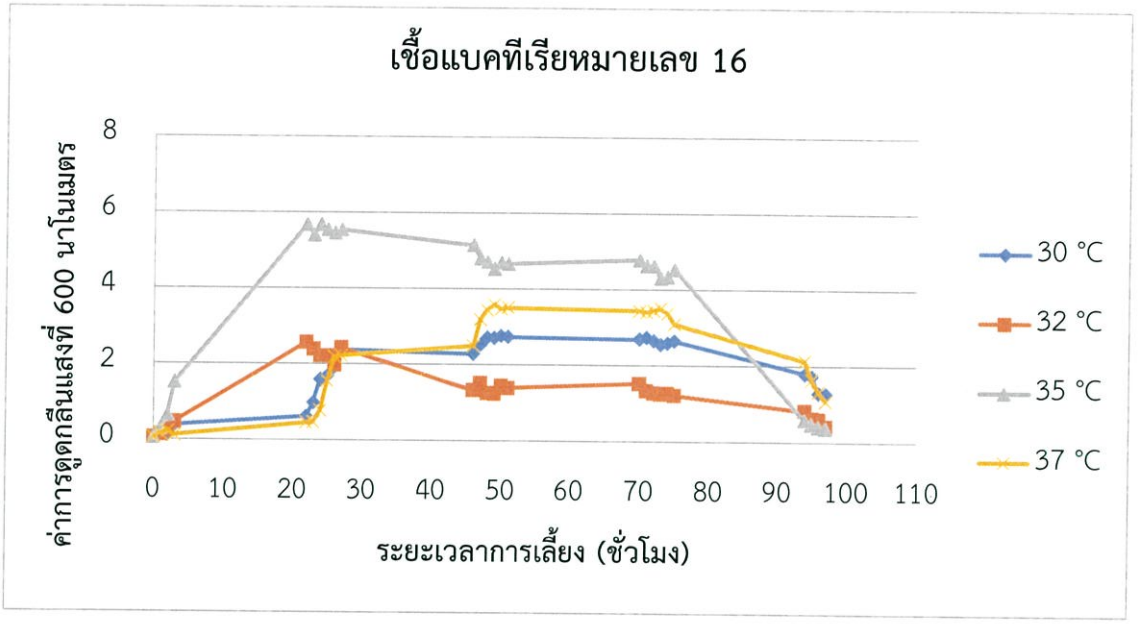
4.1.2 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10 ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากรูปที่ 4.2 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10 ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 46 มีค่า OD เท่ากับ 3.91, ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 มีค่า OD เท่ากับ 2.86, ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 23 มีค่า OD เท่ากับ 5.77และ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 50 มีค่า OD เท่ากับ 3.56

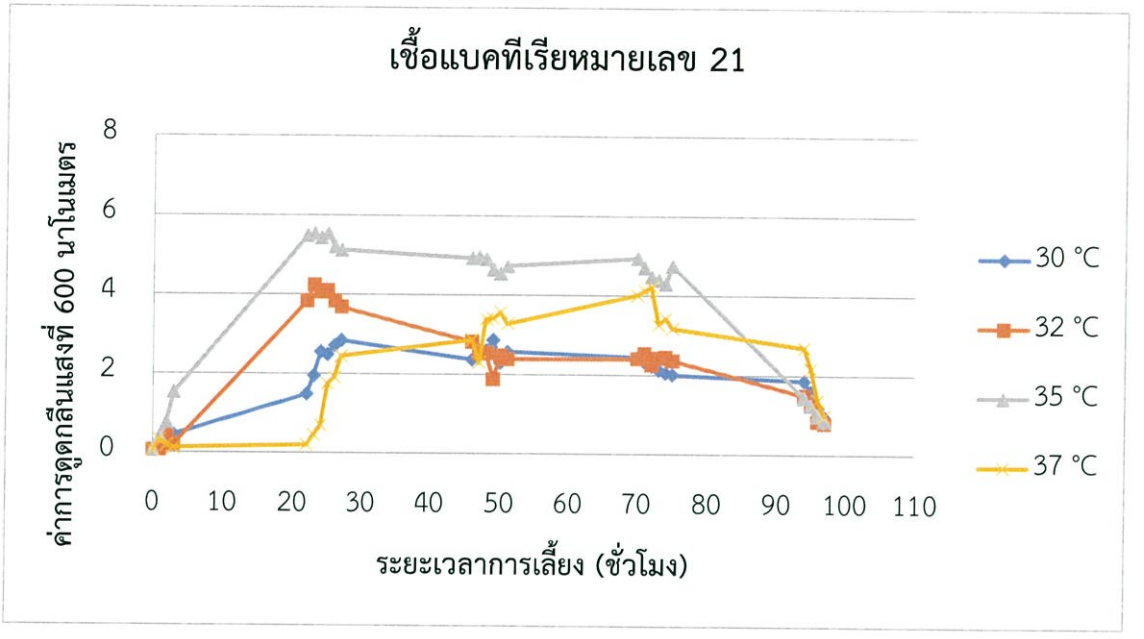
4.1.3 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16 ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากรูปที่ 4.3 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16 ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 50 มีค่า OD เท่ากับ 2.77, ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 27 มีค่า OD เท่ากับ 2.43, ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 22 มีค่า OD เท่ากับ 5.68และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 49 มีค่า OD เท่ากับ 3.59

4.1.4 เชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21

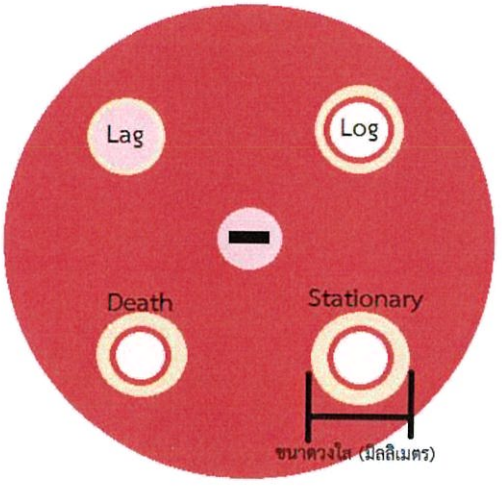


รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21 ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากรูปที่ 4.4 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21 ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 49 มีค่า OD เท่ากับ 2.87, ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 23 มีค่า OD เท่ากับ 4.23, ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 23 มีค่า OD เท่ากับ 5.54และ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีค่า OD สูงสุดในชั่วโมงที่ 50 มีค่า OD เท่ากับ 3.57

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

ขนาดวงใสที่กว้างขึ้นบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสทำการวัดขนาดวงใส่โดยการเลือกส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียจากการปั่นเหวี่ยงที่มีค่า OD_{600} สูงสุดในแต่ละช่วงมาหยอดในเพลทอาหารหลุมโดยมีหลุมกลางเป็นหลุมควบคุม ดังรูปที่ 4.5 และมีตัวอย่าง ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.5 รูปแบบการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและการวัดวงใสที่เกิดขึ้นจานเลี้ยงเชื้ออาหารแข็ง

รูปที่ 4.6 ตัวอย่างเพลทอาหารแข็งที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส

ตารางบันทึกขนาดวงใสเฉลี่ยจากการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ซ้ำ ที่อุณภูมิต่างๆ

ตารางที่ 4.1 ขนาดวงใสเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8

อุณหภูมิ	ขนาดของวงใสแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต (mm)			
	Lag	Log	Stationary	Death
30	0(SD=0)	16.33(SD=0.10)	18.33(SD=0.10)	13.33(SD=0.19)
32	0(SD=0)	19.00(SD=0.37)	18.00(SD=0.50)	12.60(SD=0.20)
35	0(SD=0)	20.67(SD=0.58)	19.00(SD=0.37)	16.67(SD=0.31)
37	0(SD=0)	18.30(SD=0.10)	19.00(SD=0.35)	12.70(SD=0.40)

จากตารางที่ 4.1 สามารถสรุปผลขนาดวงใสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8 ของทั้ง 4 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่มีขนาดวงใสมากสุดคือ 35 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log ขนาด 20.67 มิลลิเมตร, รองลงมา อุณหภูมิที่ 32และ 37 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log และช่วง stationary ขนาด 19.00มิลลิเมตร ตามลำดับ และอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ช่วง stationary ขนาด 18.33 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.2 ขนาดวงใสเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10

อุณหภูมิ	ขนาดของวงใสแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต (mm)			
	Lag	Log	Stationary	Death
30	0(SD=0)	14.30(SD=0.11)	19.00(SD=0.37)	13.00(SD=0.50)
32	0(SD=0)	16.37(SD=0.31)	14.37(SD=0.46)	12.10(SD=0.72)
35	0(SD=0)	21.33(SD=0.28)	18.34(SD=0.30)	16.33(SD=0.35)
37	0(SD=0)	17.30(SD=0.10)	18.80(SD=0.53)	12.97(SD=0.83)

จากตารางที่ 4.2 สามารถสรุปผลขนาดวงใสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10 ของทั้ง 4 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่มีขนาดวงใสมากสุดคือ 35 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log ขนาด 21.33 มิลลิเมตร, รองลงมา อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ช่วง stationary ขนาด 19.00 มิลลิเมตร, อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ช่วง stationary ขนาด 18.80 มิลลิเมตร และอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log ขนาด 16.70 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.3 ขนาดวงใสเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16

อุณหภูมิ	ขนาดของวงใสแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต (mm)			
	Lag	Log	Stationary	Death
30	0(SD=0)	12.00(SD=0.45)	16.70(SD=0.72)	13.33(SD=0.20)
32	0(SD=0)	15.30(SD=0.10)	13.70(SD=0.60)	11.30(SD=0.36)
35	0(SD=0)	20.67(SD=0.58)	19.00(SD=0.35)	15.00(SD=0.30)
37	0(SD=0)	16.00(SD=1.00)	18.70(SD=0.56)	13.70(SD=0.53)

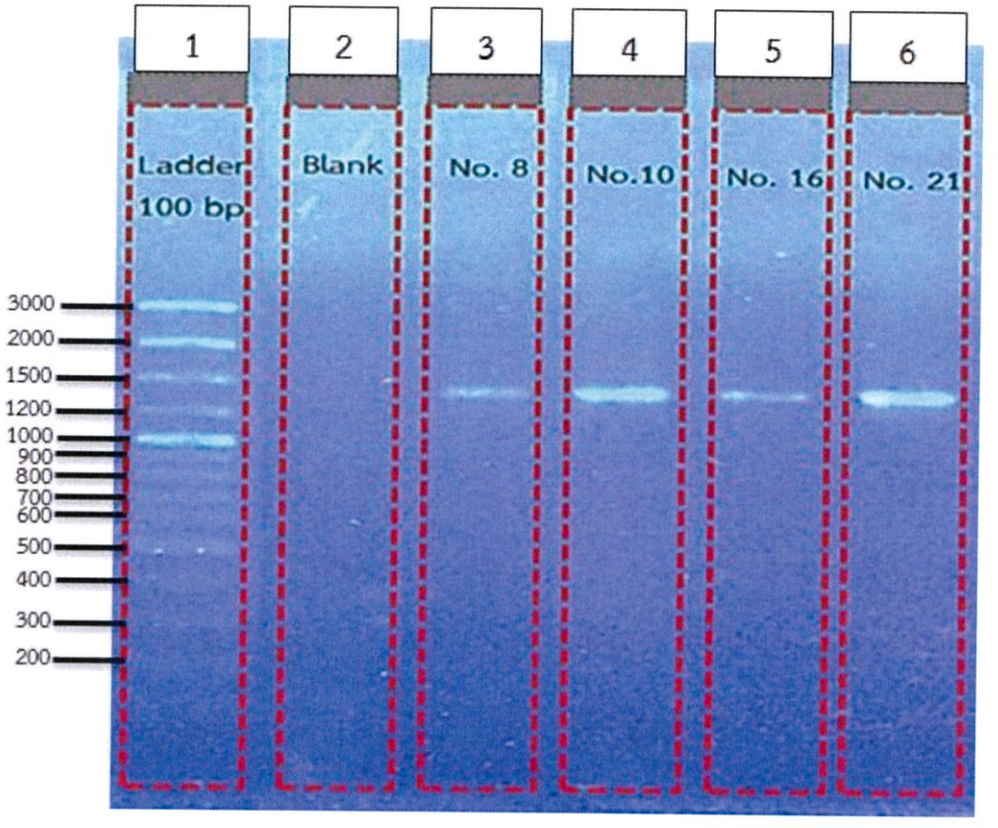
จากตารางที่ 4.3 สามารถสรุปผลขนาดวงใสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16 ของทั้ง 4 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่มีขนาดวงใสมากสุดคือ 35 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log ขนาด 20.67 มิลลิเมตร, รองลงมา อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ช่วง stationary ขนาด 18.70 มิลลิเมตร, อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ช่วง stationary ขนาด 16.70 มิลลิเมตร และอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log ขนาด 15.30 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.4 ขนาดวงใสเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21

อุณหภูมิ	ขนาดของวงใสแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต (mm)			
	Lag	Log	Stationary	Death
30	0(SD=0)	14.60(SD=0.17)	15.33(SD=0.15)	11.67(SD=0.29)
32	0(SD=0)	16.67(SD=0.31)	14.00(SD=0.20)	10.63(SD=0.58)
35	0(SD=0)	19.67(SD=0.57)	16.33(SD=0.35)	13.33(SD=0.20)
37	0(SD=0)	14.30(SD=0.58)	15.70(SD=0.56)	12.30(SD=0.03)

จากตารางที่ 4.4 สามารถสรุปผลขนาดวงใสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21 ของทั้ง 4 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่มีขนาดวงใสมากสุดคือ 35 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log ขนาด 19.67 มิลลิเมตร, รองลงมา อุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log ขนาด 16.67 มิลลิเมตร, อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ช่วง stationary ขนาด 15.70 มิลลิเมตร และอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ช่วง Log ขนาด 15.33 มิลลิเมตร

4.3 ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)



รูปที่ 4.7 แสดงภาพถ่ายอะกาโรสเจล ลักษณะของ band และ lane ที่เกิด

โดยที่ 1 = ดีเอนเอมาตรฐาน DNA ladder ขนาด 100 bp

2 = Blank (ใช้น้ำแทนยีนDNA)

3,4,5,6 = PCR Product หมายเลข 8,10,16 และ 21 ตามลำดับ

4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อระบุสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ข)

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบจากฐานข้อมูลในเว็บ NCBI (National Center for Biotechhnology Information) ของเชื้อแบคที่เรียหมายเลข 8, 10, 16 และ21 พบว่ามีความคล้ายถึง 100 % กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus stratosphericus*

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคที่เรียหมายเลข 8, 10, 16และ 21 คือ 35°C โดยมีค่าODที่ความยาวคลื่น600 นาโนเมตรเท่ากับ 5.54, 5.77, 5.68 และ 5.54 และมีขนาดวงใสของเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ18.33, 21.33, 20.67 และ 19.67 mm ตามลำดับส่วนการระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8,10, 16และ21คือ *Bacillus stratosphericus*

5.2 วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียและการปรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ผลที่ได้ทั้งอุณหภูมิและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างกับรายงานการศึกษาการวิเคราะห์ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวกับเอนไซม์เซลลูเลสและเชื้อแบคทีเรียอยู่พอสมควร นอกจากนี้ในการทดลองควรเพิ่มปัจจัยด้านอุณหภูมิให้มีอุณหภูมิในการทดลองมากขึ้น ด้านความเข้มข้นและค่ากรด-เบสของอาหาร ในด้านการวิเคราะห์ลำดับเบสควรนำเชื้อ*Bacillus stratosphericus* และเชื้อ*Bacillus pumilus*มาวิเคราะห์ทางชีววิทยาเพื่อทดสอบว่าเชื้อทั้งสองสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองให้มีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ.2555. **รูปแบบและแนวทางการจัดการขยะมูลฝอยภายใต้แผนปฏิบัติการเพื่อการจัดการคุณภาพสิ่งแวดล้อมในระดับจังหวัด.** {วิดีทัศน์} กรุงเทพฯ:สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ.

ฉัตรชัย ไกรสรพงษ์. 2548. **การผลิตเอทานอลจากกากของเสียการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร.** กรุงเทพฯ: กองวิจัยพัฒนายุทศาสตร์ ศูนย์พัฒนาปิโตรเลียมภาคเหนือ กรมการพลังงานทหาร ศูนย์การอุตสาหกรรมป้องกันประเทศและพลังงานทหาร.

นฤมล นะธรรมโม.2544.**สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทนร้อน.** เชียงใหม่: สาขาวิชาชีววิทยาบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ผลการเทียบลำดับเบสจากฐานข้อมูล [ออนไลน์].
ได้จาก : https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1031620297

ผลการทำ Nucleotide Sequence [ออนไลน์].
ได้จาก : http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม BLAST [ออนไลน์].
ได้จาก : http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

พรทิพา.2554. **การศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม Streptomyces violaceusniger 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล Fabaceae.**กรุงเทพฯ:สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

รัชรา, สมบูรณ์ และ มาโมรุ.2557.**การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่แยกจากกระเพาะหมักของวัว.**ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระพีพรรณ อินปั่นแก้ว. 2530. **แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส.** เชียงใหม่: สาขาวิชาชีววิทยาบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รุสนี โตะกีเล.2551. **คุณสมบัติเพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมของเอนไซม์ผสมที่ผลิตจากจุลินทรีย์สารเร่ง พด.1 โดยใช้ชานอ้อย และเปลือกถั่วลิสงเป็นแหล่งคาร์บอน**. สงขลา: สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม.มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมรักษ์ พันธ์ผล.2535.**การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซเลนเนสจาก *Aspergillus niger ATCC 6275.*** สงขลา: ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพบัณฑิตวิทยาลัย.มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ajarncharoen. 2011. **การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์** [Online].
Available : https://ajarncharoen.wordpress.com/2011/09/07/identify/

Alexander M. 1967. **Introduction to soil microbiology.Toppan Printing Co(S) Pte.**Ltd. Singapore

AnchaleeLa-ard. 2001. **Species identification of mycobacteria by sequencing of amplified 16S rDNA from hemocultures.**

Anonymous 2. 2007. **Mechanism of cellulose hydrolysis.**[Online].
Available : http//www.upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/b/be/Types_of_Cellulase2.png.

Anonymous1. 2008. **Cellulose structure.**[Online].
Available : http://www.chemistryland.com/ElementarySchool/BuildingBlocks/BuildingOrganic.htm.

Anonymous 4. 2008. **Price of cellulose.**[Online].
Available : http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.

Bhakta Institute of Biotechnology UkaTarsadia University.2013.**Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhabiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production.** India: pp: 39-49.

Bisaria VS, Ghose TK. 1981. **Biodegration of cellulosic materials: substrates, microorganisms ,enzymes and products.** Enzy and Microbial Tech. pp: 90–104.

Fan, L.T.,M.M. Gharpuray and Y.H. Lee. 1987. **Cellulose Hydrolysis. 1st Edn.**Springer Verlag, Berlin, Germany, pp: 1-68.

Fergus CL. 1969.**The cellulolytic activity of thermophilic fungi and Actinomycetes.** Mycologia. 61:120-129.

Goksoyr, J. and Eriksen, J. 1980. **Cellulase in economic microbiology.Academic Press.** New York.

Kathiresan K, Manivannan S (2006).**α-amylase production by Penicilliumfellutanum isolated from mangrove rhizosphere soil.** Afr. J. Biotechnol. 5:829-832

Keskar, S.S. 1992.**Cellulase production by Penicillium janthinellum.**World J. Microbiol.Biotech. 8(5): 534-535

K. Selby and C. C. Maitland. 1967. **The cellulase of Trichoderma viride Separation of the components involved in the solubilization of cotton.**Biochem J. ; 104(3): 716–724.

Klysov AA. 1990. **Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. Biochemistry.**

Mandel,Mary and Elwyn T. Reese. 1957. **Inducation of cellulase in*Trichoderma viride*as influenced by carbonsources and metals.**

Mawadza, C., Rahni, H., Zvauya, R., Bo, M. 2000. **Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains.**

Milala, M.A., A. Shugaba, A. Gidado, A.C. Ene and J.A. Wafar. 2005. **Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger.*** Res. J. Agric. Biol. Sci., 1: 325-328.

SELBY, K. & MAITLAND, C. C. (1967).**The cellulase of Trichodermu viride.Biochem.** J. IW, 716.

Sengbusch, P.V. 2003.**Biomolecules.**[Online]. Available:http://61.19.151.188/scimath/biomolecules/chapter2_4.html.

White, A.R. 1982.**Visualization of cellulase and cellulose degradation.In cellulose and othernatural polymer systems biogenesis, structure and degradation.** Plenum Press, NewYork.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก-1 การเตรียมอาหารเลี้ยงชนิดเหลว

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้
1.Yeast Extract	3.0 กรัม/ลิตร
2.Peptone	5.0 กรัม/ลิตร
3.Carboxymethylcellulose (CMC)	10.0 กรัม/ลิตร

ก-2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้
1.Yeast Extract	3.0 กรัม/ลิตร
2.Peptone	5.0 กรัม/ลิตร
3.Carboxymethylcellulose (CMC)	10.0 กรัม/ลิตร
4.Agar	15.0 กรัม/ลิตร

ก-3 การเตรียมสีย้อมคองโกเรด (Congo Red) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

คองโกเรด (Congo Red)	0.1 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ก-4 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	58.44 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ก-5 การเตรียม Agarose set gel เพื่อทดสอบ DNA

1.ชั่ง 1.2% Agarose เพื่อเตรียมใน 40 มิลลิลิตร จะได้ Agarose 0.48 กรัม

2. นำ Agarose ที่ชั่งมา 0.48 กรัม ใส่ในflask

3. เติม 0.5X TBE 40 มิลลิลิตร มาร์คจุดที่flaskไว้ เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยนำไปอุ่นให้ปริมาตรลงมาถึงขีดที่มาร์คไว้

4. นำไปทำให้เย็นแล้วเติม Eco Dye ลงไปในflask

5. เทเจลลงใน BOX ที่ใส่ Comb ไว้แล้ว รอจนเจลเซทตัว

ภาคผนวก ข
ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อระบุสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรีย

ข-1 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8, 10, 16 และ 21

ข-1.1.ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 8

ACGCAGTCGA GTTGCAGACT GCGATCCGAA CTGAGAACAG ATTTGTGGGA
TTGGCTAAAC CTTGCGGTCT CGCAGCCCTT TGTTCTGTCC ATTGTAGCAC
GTGTGTAGCC CAGGTCATAA GGGGCATGAT GATTTGACGT CATCCCCACC
TTCCTCCGGT TTGTCACCGG CAGTCACCTT AGAGTGCCCA ACTGAATGCT
GGCAACTAAG ATCAAGGGTT GCGCTCGTTG CGGGACTTAA CCCAACATCT
CACGACACGA GCTGACGACA ACCATGCACC ACCTGTCACT CTGTCCCCGA
AGGGAAAGCC CTATCTCTAG GGTTGTCAGA GGATGTCAAG ACCTGGTAAG
GTTCTTCGCG TTGCTTCGAA TTAAACCACA TGCTCCACCG CTTGTGCGGG
CCCCCGTCAA TTCCTTTGAG TTTCAGTCTT GCGACCGTAC TCCCCAGGCG
GAGTGCTTAA TGCGTTAGCT GCAGCACTAA GGGGCGGAAA CCCCCTAACA
CTTAGCACTC ATCGTTTACG GCGTGGACTA CCAGGGTATC TAATCCTGTT
CGCTCCCCAC GCTTTCGCTC CTCAGCGTCA GTTACAGACC AGAGAGTCGC
CTTCGCCACT GGTGTTCCTC CACATCTCTA CGCATTTCAC CGCTACACGT
GGAATTCCAC TCTCCTCTTC

ข-1.2.ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10

CACGCAGTCG AGTTGCAGAC TGCGATCCGA ACTGAGAACA GATTTGTGGG
ATTGGCTAAA CCTTGCGGTC TCGCAGCCCT TTGTTCTGTC CATTGTAGCA
CGTGTGTAGC CCAGGTCATA AGGGGCATGA TGATTTGACG TCATCCCCAC
CTTCCTCCGG TTTGTCACCG GCAGTCACCT TAGAGTGCCC AACTGAATGC
TGGCAACTAA GATCAAGGGT TGCGCTCGTT GCGGGACTTA ACCCAACATC
TCACGACACG AGCTGACGAC AACCATGCAC CACCTGTCAC TCTGTCCCCG
AAGGGAAAGC CCTATCTCTA GGGTTGTCAG AGGATGTCAA GACCTGGTAA

GGTTCTTCGC GTTGCTTCGA ATTAAACCAC ATGCTCCACC GCTTGTGCGG
GCCCCCGTCA ATTCCTTTGA GTTTCAGTCT TGCGACCGTA CTCCCCAGGC
GGAGTGCTTA ATGCGTTAGC TGCAGCACTA AGGGGCGGAA ACCCCCTAAC
ACTTAGCACT CATCGTTTAC GGCGTGGACT ACCAGGGTAT CTAATCCTGT
TCGCTCCCCA CGCTTTCGCT CCTCAGCGTC AGTTACAGAC CAGAGAGTCG
CCTTCGCCAC TGGTGTTCCT CCACATCTCT ACGCATTTCA CCGCTACACG
TGGAATTCC CTCTCCTCTT

ข-1.3. ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 16

CGCAGTCGAG TTGCAGACTG CGATCCGAAC TGAGAACAGA TTTGTGGGAT
TGGCTAAACC TTGCGGTCTC GCAGCCCTTT GTTCTGTCCA TTGTAGCACG
TGTGTAGCCC AGGTCATAAG GGGCATGATG ATTTGACGTC ATCCCCACCT
TCCTCCGGTT TGTCACCGGC AGTCACCTTA GAGTGCCCAA CTGAATGCTG
GCAACTAAGA TCAAGGGTTG CGCTCGTTGC GGGACTTAAC CCAACATCTC
ACGACACGAG CTGACGACAA CCATGCACCA CCTGTCACTC TGTCCCCGAA
GGGAAAGCCC TATCTCTAGG GTTGTCAGAG GATGTCAAGA CCTGGTAAGG
TTCTTCGCGT TGCTTCGAAT TAAACCACAT GCTCCACCGC TTGTGCGGGC
CCCCGTCAAT TCCTTTGAGT TTCAGTCTTG CGACCGTACT CCCCAGGCGG
AGTGCTTAAT GCGTTAGCTG CAGCACTAAG GGGCGGAAAC CCCCTAACAC
TTAGCACTCA TCGTTTACGG CGTGGACTAC CAGGGTATCT AATCCTGTTC
GCTCCCCACG CTTTCGCTCC TCAGCGTCAG TTACAGACCA GAGAGTCGCC
TTCGCCACTG GTGTTCCTCC ACATCTCTAC GCATTTCACC GCTACACGTG
GAATTCCACT CTCCTCTTCT

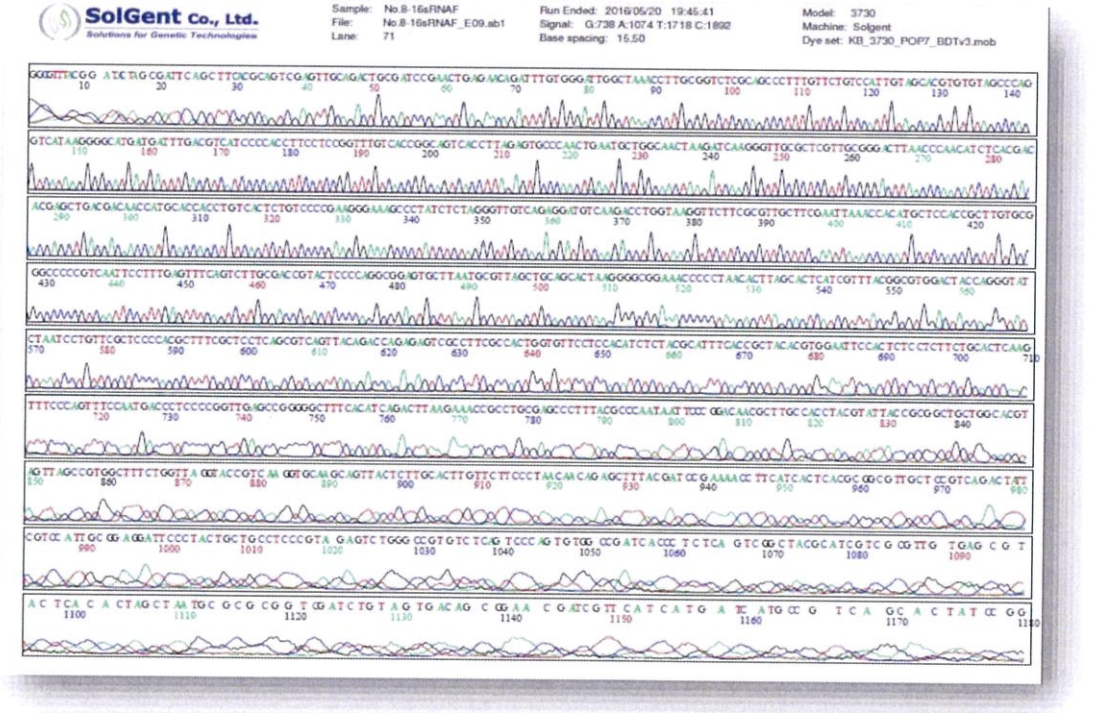
ข-1.4. ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 21

CACGCAGTCG AGTTGCAGAC TGCGATCCGA ACTGAGAACA GATTTGTGGG
ATTGGCTAAA CCTTGCGGTC TCGCAGCCCT TTGTTCTGTC CATTGTAGCA
CGTGTGTAGC CCAGGTCATA AGGGGCATGA TGATTTGACG TCATCCCCAC
CTTCCTCCGG TTTGTCACCG GCAGTCACCT TAGAGTGCCC AACTGAATGC
TGGCAACTAA GATCAAGGGT TGCGCTCGTT GCGGGACTTA ACCCAACATC

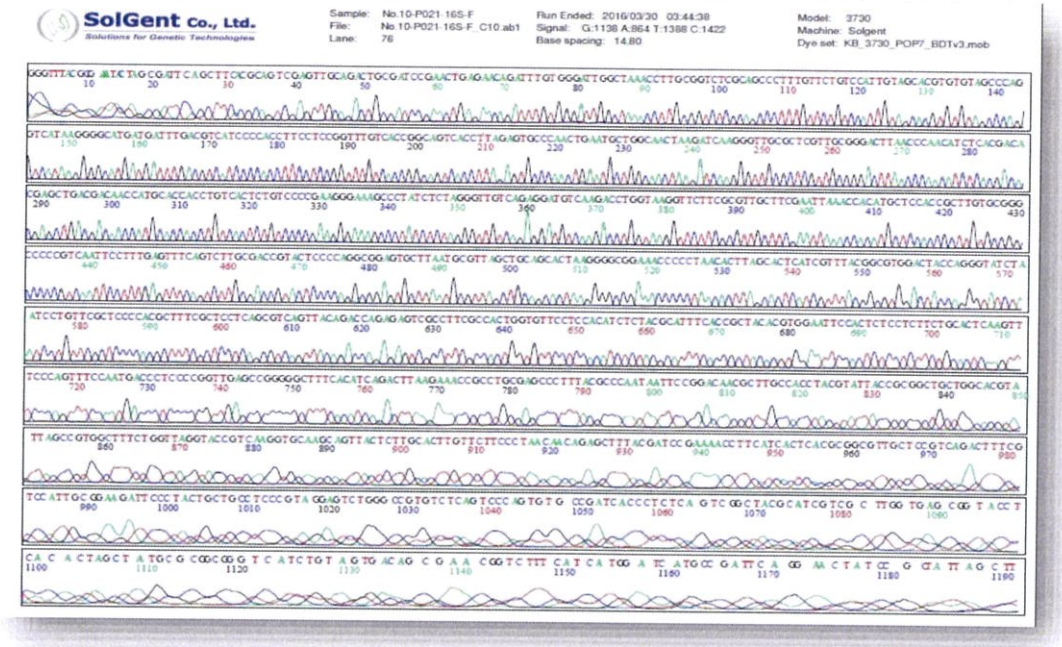
TCACGACACG	AGCTGACGAC	AACCATGCAC	CACCTGTCAC	TCTGTCCCCG
AAGGGAAAGC	CCTATCTCTA	GGGTTGTCAG	AGGATGTCAA	GACCTGGTAA
GGTTCTTCGC	GTTGCTTCGA	ATTAAACCAC	ATGCTCCACC	GCTTGTGCGG
GCCCCCGTCA	ATTCCTTTGA	GTTTCAGTCT	TGCGACCGTA	CTCCCCAGGC
GGAGTGCTTA	ATGCGTTAGC	TGCAGCACTA	AGGGGCGGAA	ACCCCCTAAC
ACTTAGCACT	CATCGTTTAC	GGCGTGGACT	ACCAGGGTAT	CTAATCCTGT
TCGCTCCCCA	CGCTTTCGCT	CCTCAGCGTC	AGTTACAGAC	CAGAGAGTCG
CCTTCGCCAC	TGGTGTTCCT	CCACATCTCT	ACGCATTTCA	CCGCTACACG
TGGAATTCCA	CTCTCCTCTT			

ข-2 กราฟ DNA squencing interferogram หมายเลข 8, 10, 16 และ 21

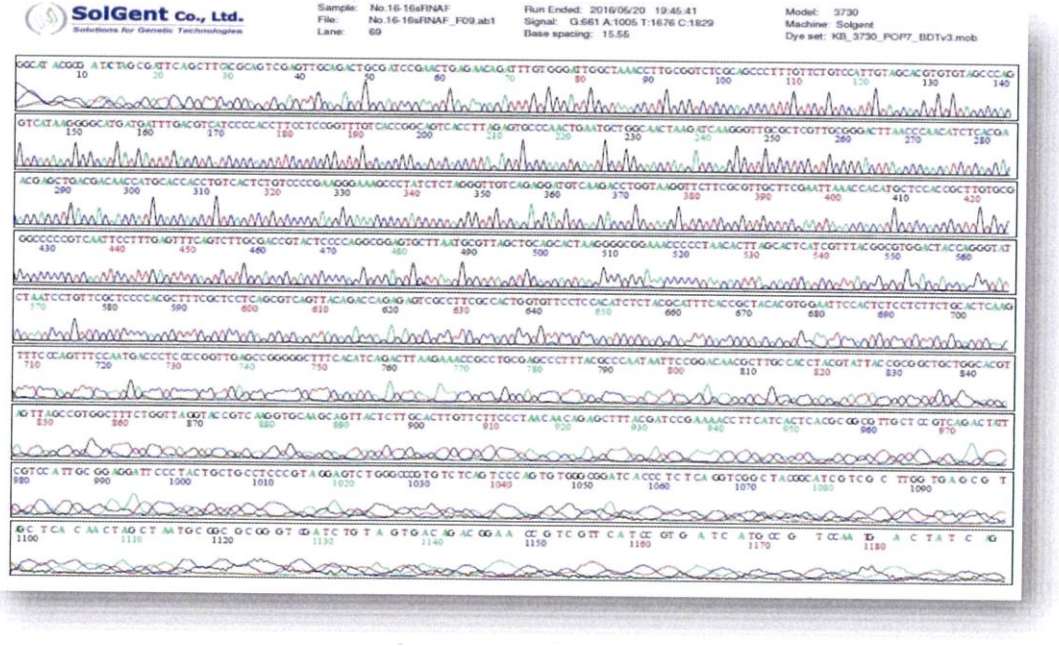
ข-2.1 กราฟ DNA squencing interferogram หมายเลข 8



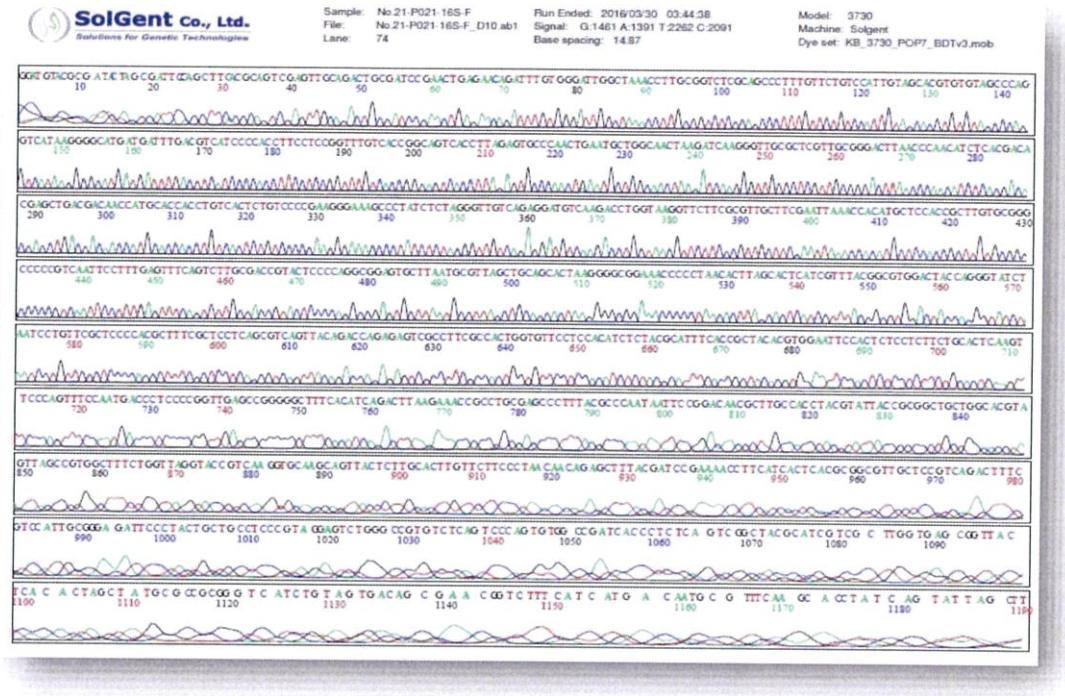
ข-2.2 กราฟ DNA squencing interferogram หมายเลข 10



ข-2.3 กราฟ DNA squencing interferogram หมายเลข 16



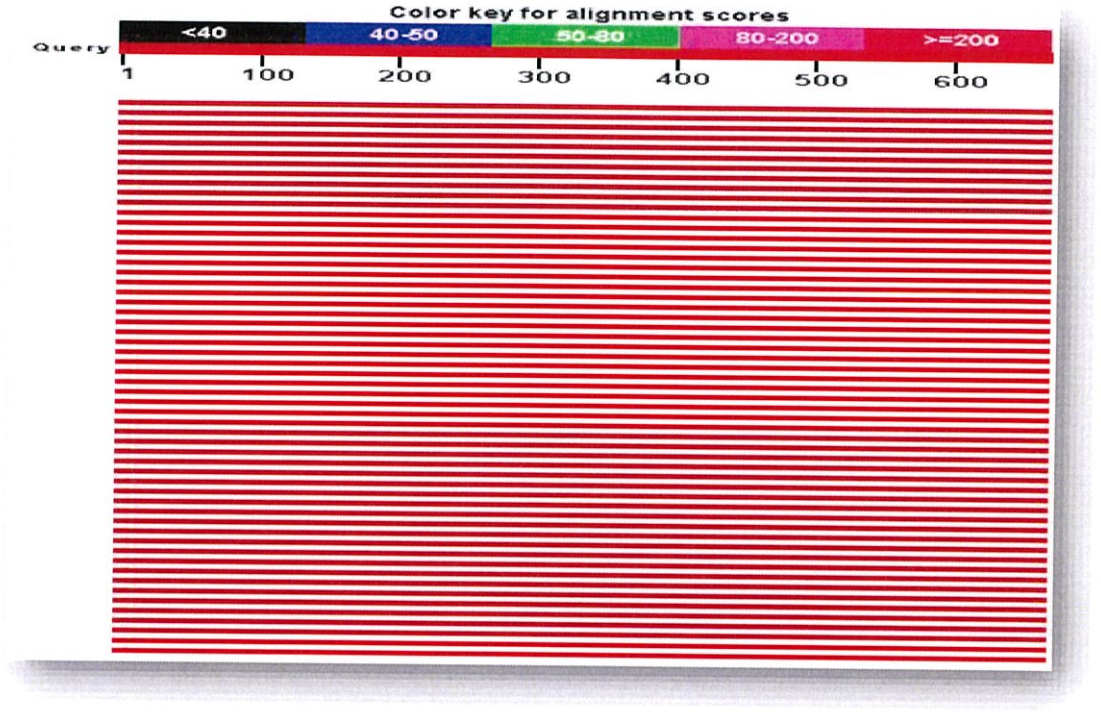
ข-2.4 กราฟ DNA squencing interferogram หมายเลข21



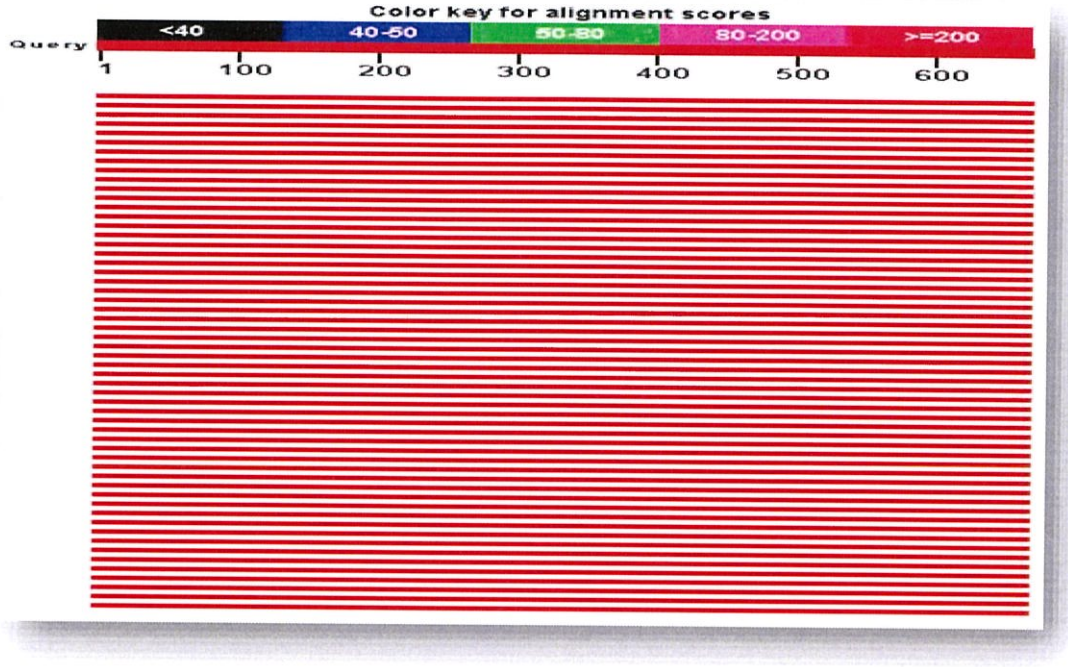
ข-3 ผลการทำ Nucleotide Sequence ของเชื้อหมายเลข 8, 10, 16 และ 21

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

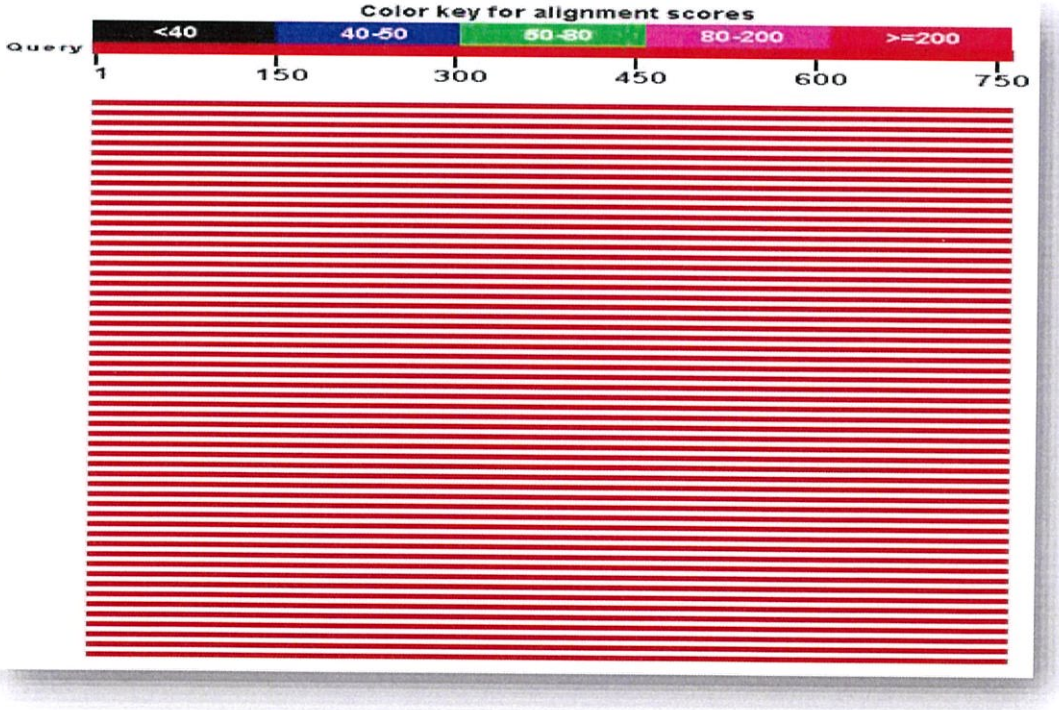
ข-3.1. ผลการทำ Nucleotide Sequence ของเชื้อหมายเลข 8



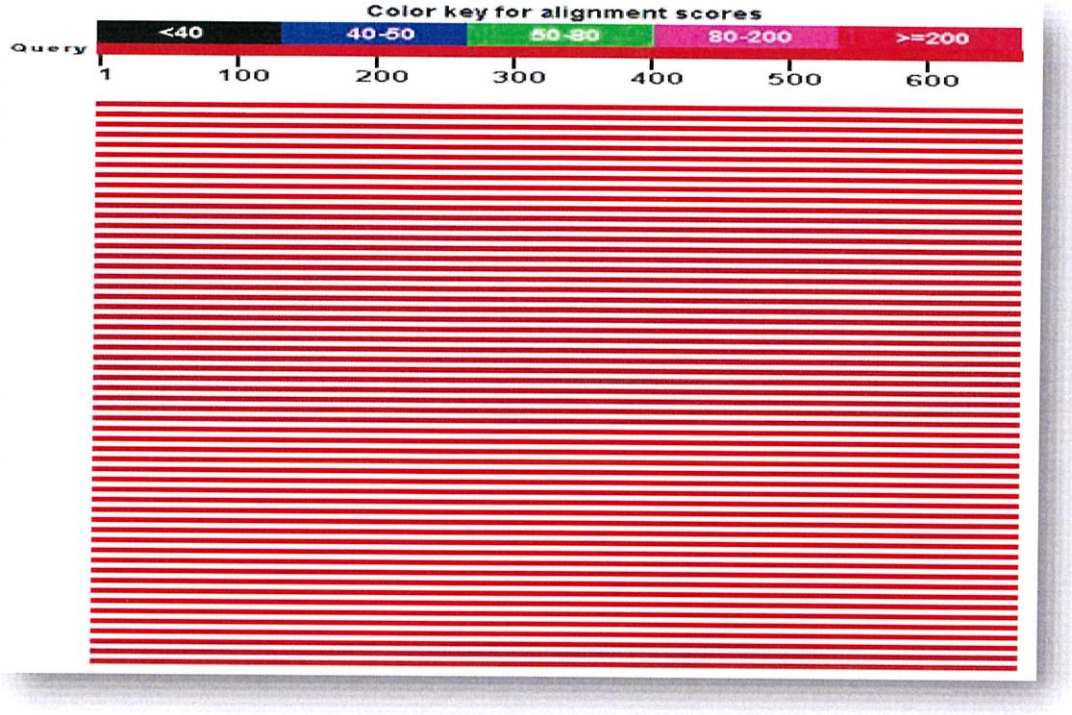
ข-3.2. ผลการทำ Nucleotide Sequence ของเชื้อหมายเลข 10



ข-3.3. ผลการทำ Nucleotide Sequence ของเชื้อหมายเลข 16

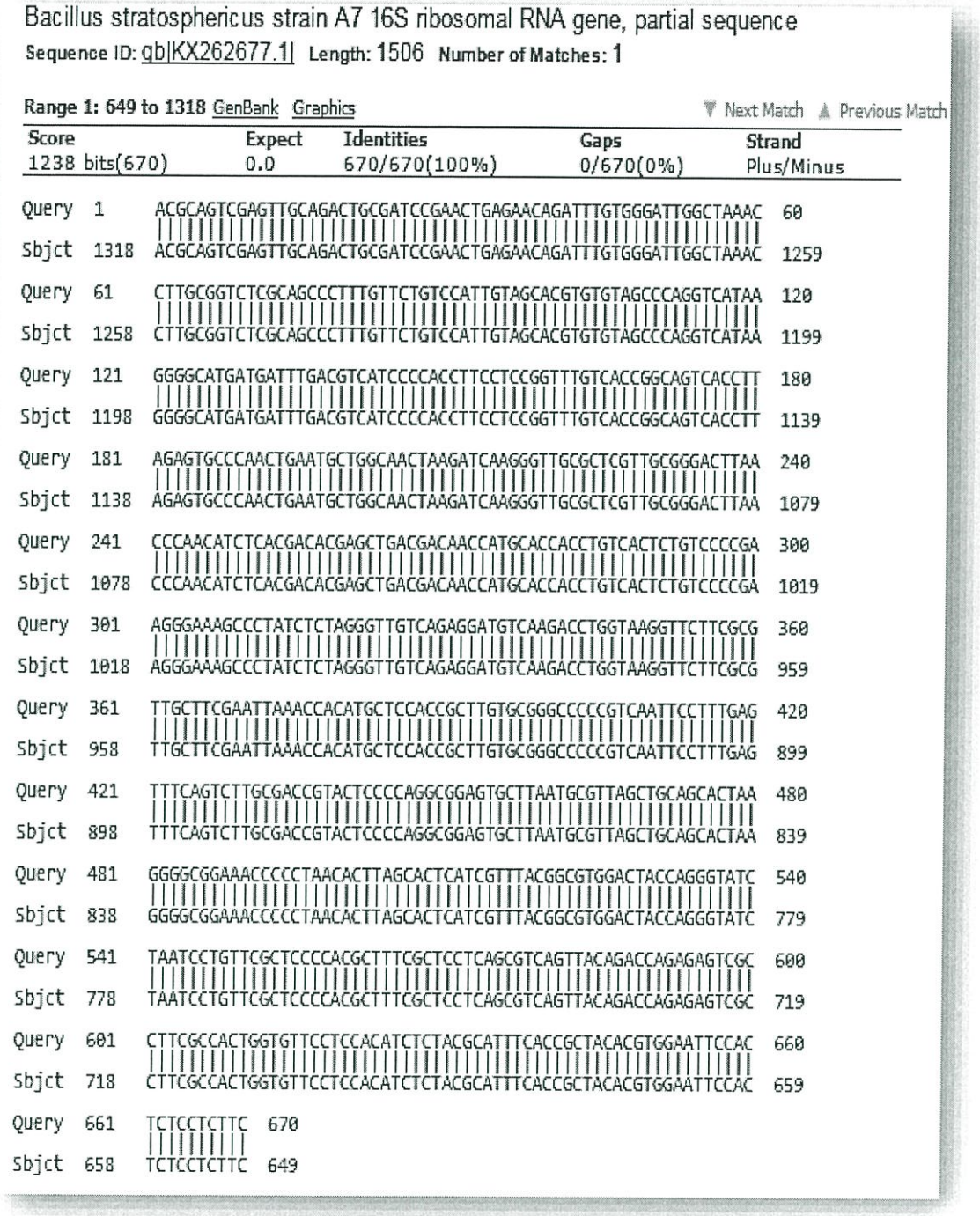


ข-3.4. ผลการทำ Nucleotide Sequence ของเชื้อหมายเลข 21



ข-4 ผลการเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลของเชื้อหมายเลข 8, 10, 16 และ 21 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1031620297)

ข-4.1ผลการเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลของเชื้อหมายเลข 8



Bacillus stratosphericus strain A7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KX262677.1| Length: 1506 Number of Matches: 1

Range 1: 649 to 1318 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1238 bits(670)	0.0	670/670(100%)	0/670(0%)	Plus/Minus

```
Query  1     ACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1318  ACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAAC  1259

Query  61    CTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1258  CTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA  1199

Query  121   GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1198  GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTT  1139

Query  181   AGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1138  AGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA  1079

Query  241   CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1078  CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGA  1019

Query  301   AGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1018  AGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCG  959

Query  361   TTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  958   TTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG  899

Query  421   TTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  898   TTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAA  839

Query  481   GGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  838   GGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC  779

Query  541   TAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  778   TAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGC  719

Query  601   CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCAC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  718   CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCAC  659

Query  661   TCTCCTCTTC  670
             ||||||||||
Sbjct  658   TCTCCTCTTC  649
```

ข-4.2.ผลการเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลของเชื้อหมายเลข 10

Bacillus stratosphericus strain A7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KX262677.1| Length: 1506 Number of Matches: 1

Range 1: 650 to 1319 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1238 bits(670)	0.0	670/670(100%)	0/670(0%)	Plus/Minus

```
Query  1     CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1319  CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAA  1260

Query  61    CCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1259  CCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA  1200

Query  121   AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1199  AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT  1140

Query  181   TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1139  TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  1080

Query  241   ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1079  ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCG  1020

Query  301   AAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1019  AAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC  960

Query  361   GTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  959   GTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA  900

Query  421   GTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  899   GTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTA  840

Query  481   AGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  839   AGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT  780

Query  541   CTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCG  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  779   CTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCG  720

Query  601   CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCA  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  719   CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCA  660

Query  661   CTCTCCTCTT  670
             ||||||||||
Sbjct  659   CTCTCCTCTT  650
```

ข-4.3.ผลการเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลของเชื้อหมายเลข 16

Bacillus stratosphericus strain A7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KX262677.1| Length: 1506 Number of Matches: 1

Range 1: 548 to 1317 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1423 bits(770)	0.0	770/770(100%)	0/770(0%)	Plus/Minus

```
Query  1     CGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1317  CGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACC  1258

Query  61    TTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1257  TTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAG  1198

Query  121   GGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1197  GGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTA  1138

Query  181   GAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1137  GAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC  1078

Query  241   CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1077  CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAA  1018

Query  301   GGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1017  GGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT  958

Query  361   TGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGT  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  957   TGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGT  898

Query  421   TTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  897   TTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAG  838

Query  481   GGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  837   GGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  778

Query  541   AATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  777   AATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCC  718

Query  601   TTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACT  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  717   TTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACT  658

Query  661   CTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  657   CTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGC  598

Query  721   TTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAAT  770
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  597   TTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAAT  548
```

ข-4.4.ผลการเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลของเชื้อหมายเลข 21

Bacillus stratosphericus strain A7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KX262677.1| Length: 1506 Number of Matches: 1

Range 1: 650 to 1319 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

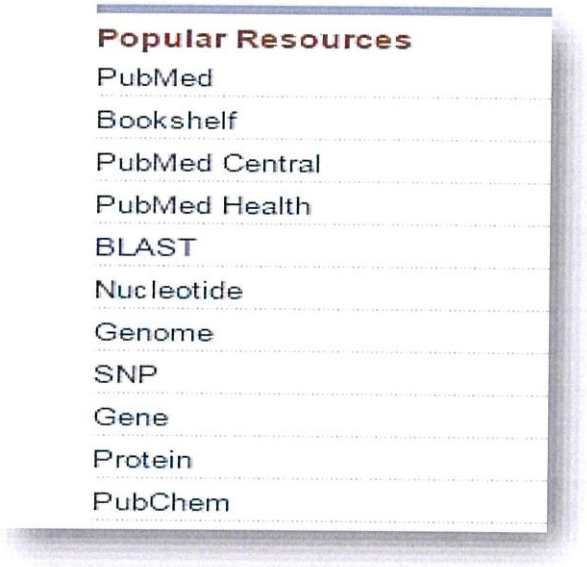
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1238 bits(670)	0.0	670/670(100%)	0/670(0%)	Plus/Minus

```
Query  1     CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1319  CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAA  1260

Query  61    CCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1259  CCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA  1200

Query  121   AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1199  AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT  1140

Query  181   TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1139  TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA  1080

Query  241   ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1079  ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCG  1020

Query  301   AAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1019  AAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC  960

Query  361   GTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  959   GTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA  900

Query  421   GTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  899   GTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTA  840

Query  481   AGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  839   AGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT  780

Query  541   CTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCG  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  779   CTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCG  720

Query  601   CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCA  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  719   CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCA  660

Query  661   CTCTCCTCTT  670
             ||||||||||
Sbjct  659   CTCTCCTCTT  650
```

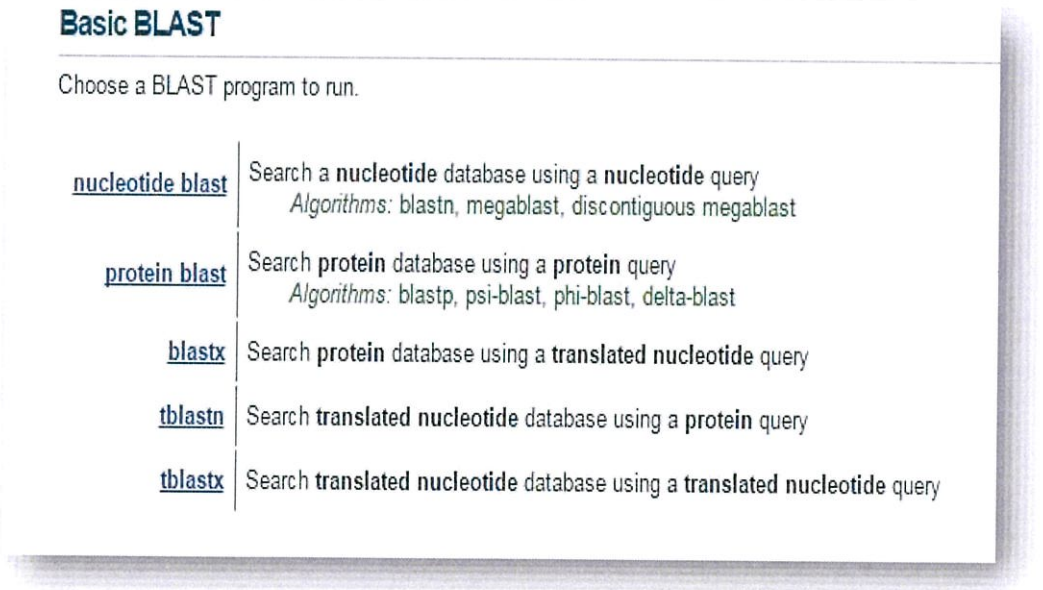
ข-5 วิธีการระบุสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียโดยใช้ลำดับเบส

เทียบฐานข้อมูลจากเว็บ NCBI (National Center for Biotechhnology Information)

1.เลือก BLAST จากมุมขวามือของเว็บ



2.เลือกnucleotide blast จากซ้ายมือ



3.เลือกลำดับเบสตำแหน่งที่ 30-700 (เนื่องจากลำดับเบสอื่นที่ไม่ได้เลือกเพราะมีความแปรปวนสูงเทียบได้จากกราฟภาคผนวกค-5 ถึงค-8) ลงใน FASTA sequence และเลือก BLAST ที่อยู่ด้านล่างของเว็บ