



รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง การแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูโลสจากมูล ช้าง ม้า แพะ และ โคอาลา

Isolation and Screening for Cellulase Producing Bacteria from Dung of Elephant, Horse, Goat and Koala

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2555

จำนวน 297,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นายรัฐพร จันทรเดช

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30 กันยายน 2555

คำนิยม

โครงการวิจัยเรื่อง การแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลช้าง ม้า แพะ และโคอาล่า (Isolation and Screening for Cellulase Producing Bacteria from Dung of Elephant Horse Goat and Koala) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2555 ผู้วิจัยขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์เรื่องสถานที่และอุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

ผู้วิจัย

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
เลขเรียกหนังสือ	
ย :	
ร :	
วันที่ 4 ม.ค. 2556	

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์ แล วิธีการ	35
ผลการวิจัย	50
วิจารณ์ผลการวิจัย	71
สรุปผลการวิจัย	75
เอกสารอ้างอิง	76

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่1 ผลลัพธ์จากการย่อยเซลลูโลส	9
ตารางที่2 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส	10
ตารางที่3 การย่อยสลายสารต่างๆ โดยเซลลูเลส	11
ตารางที่4 ผลทดสอบการย่อยเซลลูโลสของแต่ละไอโซเลท โดย วิธีการ spot plate	57
ตารางที่5 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย	59
ตารางที่6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	61
ตารางที่7 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส ไอโซเลทที่ 16 ของช้าง	67
ตารางที่8 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส ไอโซเลทที่ 2 ของม้า	68
ตารางที่9 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา	70

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่1 สูตร โครงสร้าง โมเลกุลของเซลลูโลส	7
ภาพที่2 ลักษณะการจัดเรียงตัวของ โมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส	7
ภาพที่3 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลาย เซลลูโลส	13
ภาพที่4 ข้าว	27
ภาพที่5 มัน	29
ภาพที่6 แป้ง	30
ภาพที่7 โคอาลา	31
ภาพที่8 ขั้นตอนการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล	33
ภาพที่9 มวลสัตว์ 4 ชนิด ที่ใช้ในการทดลอง	39
ภาพที่10 ลักษณะของเชื้อแต่ละ ไอโซเลทที่แยกได้จากมูลช้างด้วยวิธี Streak Plate	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่11 ลักษณะของเชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากมูลม้าด้วยวิธี Streak Plate	53
ภาพที่12 ลักษณะของเชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากมูลแพะด้วยวิธี Streak Plate	55
ภาพที่13 ลักษณะของเชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากมูลโคอาลาด้วย วิธี Streak Plate	56
ภาพที่14 แสดงผลความสามารถในการย่อยสลายเซลล์ลูโลสด้วยวิธี Spot Plate	58
ภาพที่15 สันฐานวิทยาของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท	61
ภาพที่16 ค่า enzyme activity ของไอโซเลทที่ 16 ของช้าง	62
ภาพที่17 ค่า enzyme activity ของไอโซเลทที่ 2 ของม้า	62
ภาพที่18 ค่า enzyme activity ของไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา	63
ภาพที่19 แสดงภาพ PCR product ที่ได้จากprimer 27F และ 1492R	64
ภาพที่20 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท	65

การแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูโลสจากมูล

ช้างม้าแพะและโคอาลา

Isolation and Screening for Cellulase Producing Bacteria from Dung of Elephant, Horse, Goat and Koala

รัฐพร จันทร์เดช

Ruttaporn Chundet

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากมูลสัตว์ 4 ชนิดได้แก่ ช้าง ม้า แพะ และโคอาลา สามารถแยกได้เชื้อทั้งหมด 40 ไอโซเลต จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร carboxymethylcellulose (CMC) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบและคัดเลือกแบคทีเรีย ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี congo red ปรากฏผลของการเกิดวงไฮรอลรอยเจริณของเชื้อพบว่าแบคทีเรีย 3 ไอโซเลตที่สร้างวงไฮรอลรอยเจริณขนาดใหญ่ คือ แบคทีเรียไอโซเลตที่ 16 ของช้าง แบคทีเรียไอโซเลตที่ 2 ของม้า และแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4 ของโคอาลา เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของทั้ง 3 ไอโซเลตโดยเพาะเลี้ยงใน CMC broth เขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30, 60, 120 และ 180 นาที พบว่าแบคทีเรียไอโซเลตที่ 16 ของช้าง ที่เวลา 60 นาที ให้ค่า enzyme activity ได้สูงสุดเท่ากับ 0.290 U/ml แบคทีเรียไอโซเลตที่ 2 ของม้า ที่เวลา 30 นาที ให้ค่า enzyme activity ได้สูงสุดเท่ากับ 0.878 U/ml และแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4 ของโคอาลา ที่เวลา 30 นาที ให้ค่า enzyme activity ได้สูงสุดเท่ากับ 168.237 U/ml

ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าแบคทีเรียไอโซเลตที่ 16 ของช้างคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus sp.* แบคทีเรียไอโซเลตที่ 2 ของม้า คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus pumilus.* และแบคทีเรียไอโซเลตที่ 4 ของโคอาลา คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis.*

คำสำคัญ: กิจกรรมเซลลูเลส การแยก แบคทีเรีย (CMC) วงไฮรอล

Abstract

Bacterial strains were isolated from dung of elephants, horses, goats and koalas. Initially, 40 strains were isolated in selective agars (carboxymethylcellulose, CMC) at 37°C for 24 hours. After monitoring, 3 strains (from elephants, horses and koalas) were selected. The strains were evaluated their cellulose activity by cultured in CMC broth. The results showed that the strain which isolated from koalas displayed the highest enzyme activity (168.237U/ml).

A partial 16S rDNA sequence analysis and standard biochemical and physiological tests were used for the assignment of 3 isolates. The analysis of these strains using its 16S rDNA sequence data showed that strain 16 (from elephant) had highest homology (98%) with *Bacillus sp.*, strain 2 (from horse) showed 100% similarity with *Bacillus pumilus* and strain 4 (from koalas) showed similarity with *Bacillus subtilis*.

Keywords: Cellulase activity, Isolation, carboxymethyl cellulose, clear zone

คำนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นโพลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรตที่พบมากที่สุดในธรรมชาติโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและสะสมอยู่ในผนังเซลล์ ประมาณว่าในแต่ละปีจะมีเซลลูโลสสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นถึงสี่พันล้านตัน (Beguin,1990) ดังนั้นการนำส่วนประกอบเซลลูโลสในธรรมชาติ หรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์โดยการย่อยสลายเพื่อให้อยู่ในรูปที่นำมาใช้ได้ เช่น น้ำตาลกลูโคส อัลทอซอส์ หรือทำเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส ได้แก่คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส ซึ่งใช้ส่วนประกอบของผงซักฟอก ยาสีฟัน และครีม (สุมิตรา , /2553 และสมภพ ,2529) นอกจากนี้ ปัจจุบันการใช้พลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงมีเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำมันราคาแพงและเป็นแหล่งพลังงานธรรมชาติที่ใช้แล้วหมดลง ดังนั้น ในระยะ 20 กว่าปีมานี้จึงมีการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อผลิตน้ำตาลและสามารถเปลี่ยนไปเป็นพลังงานได้ อย่างไรก็ตาม ในธรรมชาติเซลลูโลสเป็นสารประกอบที่รวมกับสารชนิดอื่น ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) และลิกนิน จึงมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่จะย่อยสลายเซลลูโลส (SinghandHayashi,1995)

เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส พืช หอยบางชนิด ได้แก่ *Helix pomatia* (West et al., 1968) และจุลินทรีย์ได้แก่แบคทีเรีย ยีสต์ ฟังไจ และแอคติโนไมซีต สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์นี้ในทางอุตสาหกรรม เพื่อใช้ผลิตสารที่เป็นประโยชน์ดังที่กล่าวข้างต้น และศึกษาในจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากการย่อยสลายเซลลูโลส อาศัยการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ จะมีข้อได้เปรียบมากกว่า การใช้วิธีการทางเคมี นั่นคือ จุลินทรีย์จะผลิตเอนไซม์เพื่อไฮโดรไลซ์เป็นกลูโคสในปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง และไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายเซลลูโลส ส่วนทางเคมีนั้น นอกจากจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ แล้วน้ำตาลบางส่วนที่เกิดขึ้นยังสูญเสียไปกับการทำปฏิกิริยาโดยกรด

ปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่ใช้วัตถุดิบหลัก 2 ประเภท ได้แก่ น้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล และแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด อย่างไรก็ตามเริ่มมีความกังวลเกี่ยวกับวัตถุดิบว่าวัตถุดิบดังกล่าวอาจ ไม่เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลในอนาคต และเป็นการนำพืชอาหารมาใช้ผลิตเอทานอลซึ่งในบางประเทศ เช่น สหรัฐฯ และจีน ที่นำข้าวโพดมาใช้ผลิตเอทานอล ส่งผลให้ราคาสินค้าอาหารภายในประเทศปรับสูงขึ้น ดังนั้น ปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลใน

หลายประเทศจึงมุ่งเน้นไปที่วัตถุดิบประเภทอื่นคือเซลลูโลสซึ่งเป็นเศษเหลือใช้ที่ได้จากพืช

เนื่องจากประเทศไทย เป็นประเทศเกษตรกรรม ที่มีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เป็นสารประกอบพอลิกลูโคสชนิดต่างๆ อยู่มากมายไม่ว่าจะเป็นฟางข้าว หนุ่ยแฝง และพืชเส้นใยชนิดอื่นๆ เป็นที่ทราบกันคืออยู่แล้วว่า เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์พอลิเมอร์คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์พืชเซลลูโลสเกิดขึ้นจากหน่วยย่อย ของน้ำตาลกลูโคส (β -D-glucose) เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวหรือโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ด้วยพันธะ β -1,4 linkage เมื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จะได้น้ำตาลกลูโคส และเมื่อนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปหมักต่อด้วยยีสต์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอทานอล ออกมา

ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงมีความสนใจ ที่จะคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากมูลสัตว์ 4 ชนิด ได้แก่ มูลช้าง, มูลม้า, มูลแพะ และ มูลโคอาลา ซึ่งสัตว์ทั้ง 4 ชนิดนี้บริโภคหญ้าสด, ฟางข้าว และพืชผัก เป็นอาหารหลัก ซึ่งต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ภายในกระเพาะหมักในการย่อยอาหาร ที่เป็นชิ้นส่วนขนาดใหญ่ หรือย่อยสลายเส้นใยของอาหารเช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน เป็นต้น โดยจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมักนี้สามารถผลิตเอนไซม์ ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆได้ โดยจะทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากมูลสัตว์บางชนิด และบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับลำดับเบสในฐานข้อมูลทางชีวภาพ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาและผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการสลายเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอล

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากมูลสัตว์ 4 ชนิด ได้แก่ มูลช้าง,มูลม้า ,มูลแพะ และ มูลโคอาลา ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
2. ศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย และบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับลำดับเบสในฐานข้อมูลทางชีวภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบบที่เรียสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้คาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้พัฒนาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่อไป



ตรวจเอกสาร

2.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช (บุญศรี, 2548) พบตามผนังของเซลล์พืชทุกชนิด มีหน้าที่ช่วยให้พืชมีโครงสร้างแข็งแรง เป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิปกติ และไม่ละลายน้ำในตัวทำละลายส่วนใหญ่ เอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยสลายได้ แต่มีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มกากอาหาร ในธรรมชาติจะไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระ แต่มักจะพบร่วมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส กัม (gum) เพนโตเซน (pentose) แทนนิน (tannins) ไขมัน (lipid) และสารเกิดสี (coloring matter) เป็นต้น (Cowling & Irk, 1976) เซลลูโลส เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45% ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่ผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ เช่น ฝ้าย มีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่า 97-99% จัดว่าเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ ประกอบด้วย polymer chain เรียงขนานและยึดกันด้วย dispersion force และ hydrogen bond ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่น ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ช้า เพราะสารจะไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลลูโลสได้ ยังพบในสาหร่ายและพืชหลายชนิด นอกจากนี้ ยังพบในสัตว์ทะเลบางชนิด เนื่องจากเซลลูโลส สามารถถูกย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมโดยจุลินทรีย์

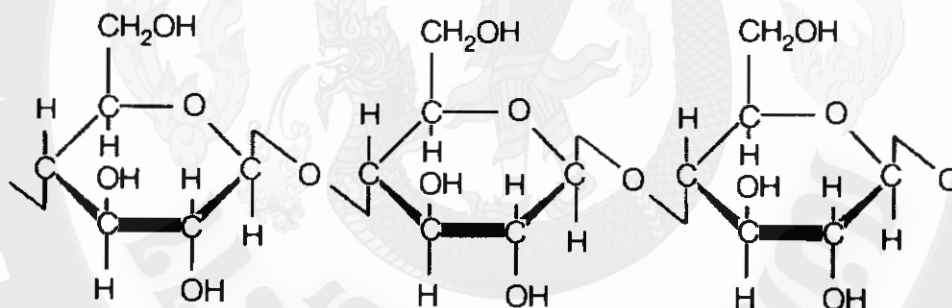
จึงเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญคือ วัฏจักรคาร์บอน (จุฑาธัญ, 2544)

2.2 ลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลส

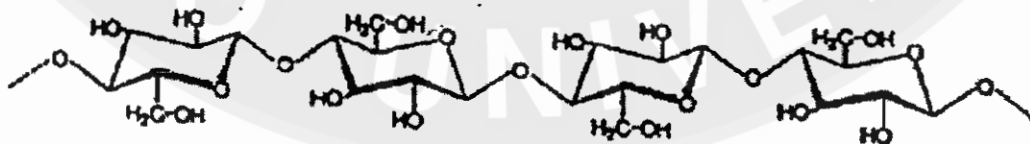
ลักษณะโครงสร้างสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่เป็นโฮโมโพลิแซคคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ประกอบด้วย anhydrous glucose unit ที่เชื่อมต่อกัน

หลายโมเลกุลแต่ละ glucose unit จะหมุนได้ 180° และมีรูปแบบการเรียงตัวเป็นโครงสร้างคล้ายลูกโซ่ สายตรงไม่มีการแตกแขนง แต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของโมเลกุลถัดไป เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl

group, -OH) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 อยู่ในตำแหน่งบีตา (beta) จึงเรียกพันธะนี้ว่า พันธะบีตา -1,4 glycosidic bond) พันธะนี้ทำให้โมเลกุลที่ต่อกันในสายลูกโซ่ของเซลลูโลสยึดตัวออกในแนวเส้นตรง ได้ทำให้สายเซลลูโลสหลายสายมีโอกาสเข้ามาชิดกัน โดยที่โมเลกุลของน้ำไม่สามารถเข้าไปแทรกอยู่ได้ จึงทำให้เซลลูโลสมีความเหนียว แข็งแรง และไม่ละลายน้ำ โดยรูปแบบของการจะเรียงตัวของหน่วย ดี-กลูโคสจะอยู่ในรูปลักษณะรูปเก้าอี้ (Chair-form) แต่สารละลายของเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังนั้นโครงร่างของสายเซลลูโลสส่วนใหญ่จะมีการจัดระเบียบเป็น crystalline structure และบริเวณ crystalline structure จะถูกแยกออกจากกันโดย amorphous cellulose ที่มีอยู่เป็นจำนวนหน่วยของดี-กลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง ความยาวเฉลี่ยของสายเซลลูโลสจะมีความแตกต่างกันไปตามแหล่งที่พบคือ ประมาณ 2,000-15,000 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50,000-2500,000 (บุญชรริก, 2548)



ภาพที่ 1: แสดงสูตร โครงสร้าง โมเลกุลของเซลลูโลส



ภาพที่ 2: ลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส

ที่มา: Nisizawa (1973)

จากคุณสมบัติในการละลายใน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ของเซลลูโลส สามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามปริมาณการละลายได้เป็น 3 ชนิดคือ

1. แอลฟา-เซลลูโลส (α -cellulose) คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง
2. บีตา-เซลลูโลส (β -cellulose) คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง และสามารถดกตะกอนได้ง่ายในสารที่มีสภาพเป็นกรด
3. แกมมา-เซลลูโลส (γ -cellulose) คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้องโดยละลายได้ในสารละลายกรด และสามารถดกตะกอนได้โดยการใส่แอลกอฮอล์ (บุญจริก, 2548)

2.3 การย่อยเซลลูโลส (cellulose hydrolysis) (จุฑาธัญ, 2544)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้าง เป็นพอลิเมอร์หรือเป็น linear photopolymer ของกลูโคสที่จับกันด้วย β -1,4-glycosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลายนอกจากนี้โดยธรรมชาติจะมี lignin จับเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลาย

การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธีคือ

1. วิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูง วิธีนี้จะมีข้อจำกัดในการแยกน้ำตาลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ออกจากกรดและเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

2. วิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymic hydrolysis) ปฏิกิริยาย่อยจะเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงคือที่อุณหภูมิประมาณ 50 ° C ความดันบรรยากาศเพราะเอนไซม์มีความจำเพาะต่อเซลลูโลสไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ และการสูญเสียกลูโคสระหว่างการเกิดปฏิกิริยา

พืช สัตว์ และจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูโลสได้ ได้แก่ ข้าว บาร์เลย์ ข้าวมอลต์ ราก และใบต้นยาสูบ สัตว์ ได้แก่ ไล่เดือนบางชนิดและได้ปลวก (ฉวีวรรณ, 2530) จุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์ เช่น *kluyveromyces marxianus* เชื้อราเช่น *Trichoderma viride* แอคติโนไมซีต เช่น *Talaromyces thermophiles* แบคทีเรีย เช่น *Clostridium cellobiopsrus*

เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเติบโตอย่างรวดเร็ว เพาะเลี้ยงง่าย และผลิตเอนไซม์ได้มากจึงมีการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอย่างกว้างขวาง ทั้ง aerobic bacteria และ anaerobic bacteridifa สามารถย่อยเซลลูโลสได้ aerobic bacteria จะย่อยเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์หลัก 2 ชนิด คือ CO_2 และสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบเซลล์ ส่วน ฟังไจ และ แอคติโนไมซีต จะย่อยได้ CO_2 เป็นหลัก และเกิดอินทรีย์ในปริมาณน้อย อัตราการย่อยเริ่มต้นจะถูกจำกัดด้วยกระบวนการ oxidation ของคาร์โบไฮเดรตเพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสารตัวกลาง ซึ่งจะเกิดขึ้นขณะมีการใช้น้ำตาล ส่วน mesophilic และ therophilic anaerobe ไม่สามารถย่อยสับแตร์อย่างสมบูรณ์ได้ สารเคมีหลายชนิดจึงถูกขับออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดการสะสมของ CO_2 , H_2 ethanol และกรดอินทรีย์ เช่น กรด acetic, fumaric, butyric และ lactic (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลลัพธ์จากการย่อยเซลลูโลส

Bacteria	Products
Mesophiles	
<i>Clostridium cellobiopsrus</i>	CO_2 , H_2 ethanol, acetic, lactic, and formic acids
<i>Bacteriodes succinogenes</i>	CO_2 , acetic, and succinic acids
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Acetic, formic, and succinic acids
Thermophiles	
<i>Clostridium thermocellum</i>	CO_2 , H_2 ethanol, acetic, lactic, and succinic acid

การย่อยเซลลูโลสขั้นต้นเกิดจากการที่โมเลกุลถูก hydrolyse โดยเอนไซม์เซลลูเลส จะย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ แต่ข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์เกิดจากการที่สับแตร์ละลายน้ำได้น้อย เมื่อย่อยได้ cellulose derivative ก็จะถูกย่อยต่อ ผลจากการย่อยได้ monosaccharide หรือ disaccharide ผลผลิตจากขั้นตอนต่อมาของการย่อยจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ aerobe จะสลายน้ำตาลได้ CO_2 ส่วน anaerobe จะสลายได้กรดอินทรีย์และอัลกอฮอล์ เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น จุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ แล้วดูดซึมสู่ภายในเซลล์

เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนใช้ในกิจกรรมของเซลล์ต่อไป เซลลูเลสจะทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ β -1,4-glycosidic ในโมเลกุลสาร ที่ประกอบด้วยโครงสร้างนี้ได้แก่ cellobiose, cellotriose, cellotetraose และ cellulose ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยกลูโคสตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปตามลำดับ

2.4 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulose)

ได้มีการศึกษาเซลลูเลสที่ได้จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ ไล้เดือน ปลวก หอยทาก และจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเซลลูเลสที่สำคัญ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ทำให้สะดวกต่อการสกัด สามารถผลิตได้ปริมาณมาก ไม่ต้องใช้พื้นที่และเวลามากเหมือนกับการผลิตโดยใช้พืชและสัตว์ ทำให้ทุนในการผลิตต่ำ ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส แสดงตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส

แบคทีเรีย	รา
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Aspergillus phonicis</i>
<i>Pseudomonas cellulose</i>	<i>Pestalotiopsis versicolor</i>
<i>Sporotrichum mycelium</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Streptomyces antibioticus</i>	<i>Trichoderma reesei</i>

ที่มา: วิกิพีเดีย (2534)

องค์ประกอบและการทำงานของเซลลูเลส

เซลลูเลส ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzyme) ที่ทำงานร่วมกัน คือ

1. เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนแอลง เพื่อเป็นขั้นตอนแรกของเซลลูเลส
 2. เอนไซม์ C_2 หรือ β -1,4 glucanase เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายขั้นตอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้
- กลุ่มนี้มี 2 ชนิด คือ linkage

2.1 Endo- β -glucanase (β -D-glucan glucanohydrolase, EC.3.2.1.4) จะทำหน้าที่ ย่อย β -glucosidic linkage แบบสุ่ม ได้ผลผลิต คือ กลูโคส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลลูโลส ไบโอส สามารถย่อยเซลโลเดกซ์ทริน (cellodextrin) เซลลูโลสที่เกิดการพองตัว (swollen cellulose) carboxymethyl cellulose (CMC), hydroxy-ethyl cellulose (HEC) ตรวจสอบเอนไซม์ตัวนี้ใช้ (CMC) และ HEC เป็นซับสเตรท

2.2 Exon- β -glucosidase (1,4- β -D-glycan cellobiohydrolase EC. 3.2.1.91) หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสด้าน non-reducing end สามารถย่อยเซลลูโลสในรูป ผลึก (crystalline cellulose) หรือย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble cellulose) เป็นเซลโลเดกซ์ทรินและเซลโลไบโอส ตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยการใช้ฝ้าย อวิเซล (avicel) และ amorphous cellulose เป็นซับสเตรท

2.3 β -glucosidase (β -D-glucosylhydrolase EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cello-oligosaccharide) ได้กลูโคส ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดกซ์ทริน ตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอส , *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside หรือซาลิซินเป็น ซับสเตรท การย่อยสลายสารต่างๆ โดยเซลลูเลสแสดงตารางที่ 3

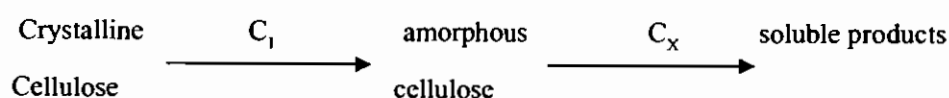
ตารางที่ 3: การย่อยสลายสารต่างๆ โดยเซลลูเลส

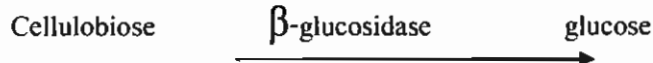
ชนิดของเอนไซม์	ชนิดของสาร				
	Crystalline cellulose	CMC	amorphous cellulose	cellotetraose	cellobio
Endo- β -glucanase	-	+	+	+	-
Cellobiohydrolase	+	-	+	+	-
β -glucosidase	-	-	+	+	+

ที่มา: นฤมล(2544)

2.5 กลไกในการย่อยสลายเซลลูโลส

จากการศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสที่ได้เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1950 จนถึงปัจจุบันนี้ ทำให้สมมุติฐานหลายแนวความคิดซึ่งเป็นที่ยอมรับดังนี้ (วรรณภา , 2546) รายงานว่ากลไกการทำงานของระบบเอนไซม์เซลลูเลส เป็นไปดัง สมการ

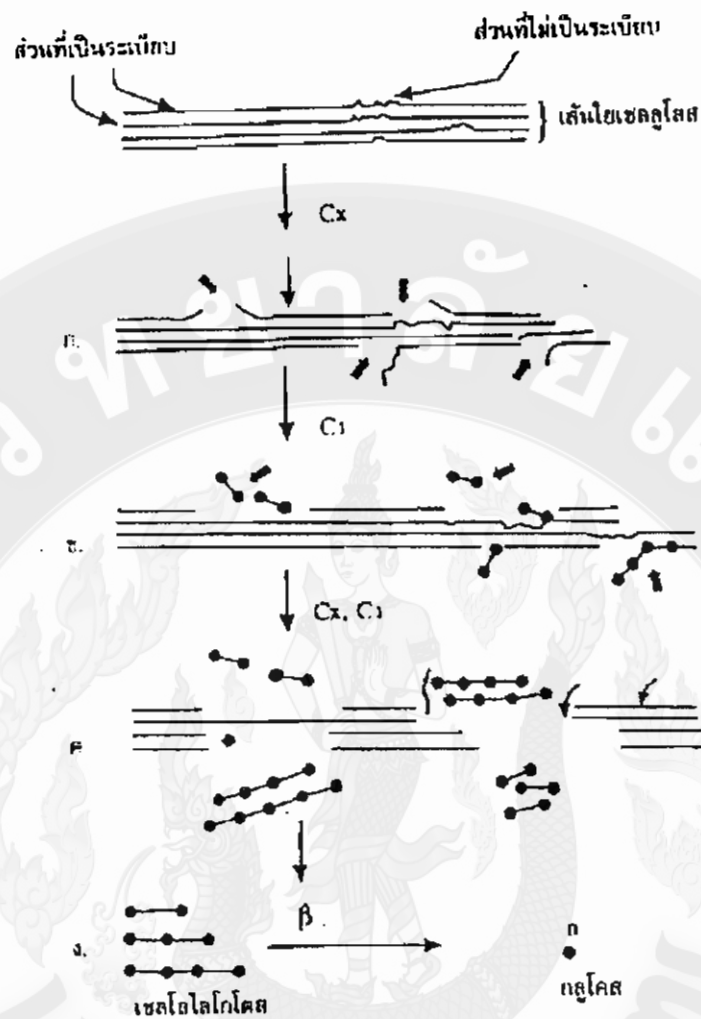




สมมุติฐานนี้แสดงให้เห็นว่า เซลลูโลสถูกย่อยโดยเอนไซม์ C_1 ให้เป็นเซลลูโลสเส้นตรงยาว ต่อมาเอนไซม์ C_x จะย่อยสลายอนุพันธ์เซลลูโลสที่เกิดจากการย่อยสลายของ C_1 ให้กลายเป็นเซลโลไบโอส ทั้งหมดนี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ หลังจากนั้นเซลโลไบโอสซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก จะซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์จุลินทรีย์ เอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) ก็จะย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสต่อไป

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสตามธรรมชาติได้จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและขับออกมานอกเซลล์ โดยเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบทั้ง 3 ชนิด จะแบ่งกันทำการย่อยสลายเซลลูโลส โดยที่ C_1 ย่อยสลายเส้นใยเซลลูโลสให้มีขนาดเล็กลง จากนั้น C_x จะทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสที่ถูกย่อยแล้ว จนกระทั่งเป็นเซลโลไบโอส และ เอนไซม์เบตา -กลูโคซิเดส จะย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล หลังจากนั้นกลูโคสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ต่อไป

กลไกการย่อยเซลลูโลส ดังแสดงในภาพที่ 3 เส้นใยเซลลูโลสประกอบด้วยส่วนที่เป็นระเบียบ เอนไซม์ C_x เข้าไปย่อยสลายส่วนที่ไม่เป็นระเบียบตามภาพ ก. ทำให้เส้นใยเซลลูโลสขาดเป็นช่วงๆ เอนไซม์ C_1 เข้าไปย่อยส่วนปลายของเส้นที่ขาดออกมาตามภาพ ข. จากนั้น สายโซ่โมเลกุลของเซลลูโลสจะ ถูกย่อยให้เป็น โมเลกุลที่สั้นลงโดยเอนไซม์ C_x และ C_1 ดัง ภาพ ค. และสายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงนี้ถูกย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส ให้ผลิตภัณฑ์ สุดท้ายเป็นกลูโคส ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3: กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส

2.6 การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (Singh and Hayashi, 1995)

การสังเคราะห์เซลลูเลสเกิดจาก 2 การบวนการคือการควบคุมทางชีวเคมีและทางพันธุกรรม ในการควบคุมการสร้างเอนไซม์จะต้องควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูเลส โดยกระบวนการ induction, repression และ catabolite repression เซลลูเลสเป็น inducible enzyme โดยมีตัวชักนำที่ดี ได้แก่ cellulose, cellobiose, thicellulose, laetosen และ sophorose (2-O-β-D-glycopyranosyl-D-glucose) และสารที่เกิดจากการสังเคราะห์เอนไซม์จะถูกเหนี่ยวนำโดยเซลลูโลส ที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำและสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ปกติเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์จะเป็น extracellular enzyme แต่บางครั้งพบที่ผนังเซลล์หรือที่เหนือหุ้มเซลล์ พบว่า *T.reeset* QM9414 ผลิต

เซลลูเลสจับออกสู่นอกเซลล์ปริมาณมากในอาหารที่มี cellobiose ความเข้มข้นต่ำหรือพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสถานะที่เหนียวทำให้เกิดการสร้างเพื่อให้เกิดการผลิต β -glucosidase ซึ่งจะถูกขับออกมาเมื่อเซลล์เกิดการ autolysis

2.7 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

แบ่งการทำงานของเอนไซม์เป็น 2 วิธี ตามความซับซ้อน ของลักษณะเอนไซม์คือ

1. การวัดความสามารถในการทำงาน complex enzyme ที่ได้จาก filtrate ประกอบด้วย 2 วิธี

1.1 การสลายให้ได้น้ำตาล เป็นการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อโดย complex enzyme โดย Mandels (1977) ได้รวบรวมวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น จากการย่อยเซลลูโลส โดยใช้ DNS reagent เป็นการทดสอบ ซึ่งสับสเตรดที่นิยมใช้ได้แก่ กระดาษกรอง เส้นใยฝ้าย และ CMC

CMC assay เป็นวิธีที่นิยมใช้วัดความสามารถในการทำงานของ เอนไซม์เซลลูเลสเนื่องจากเตรียมง่าย จากการที่ CMC เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี จึงง่ายต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์วิธีการนี้ทำโดยเตรียม 1% CMC กับ crude enzyme บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม DNS reagent คำนวณน้ำตาลรีดิวซ์

1.2 การตรวจสอบโครงสร้างของเซลลูเลส ที่เปลี่ยนแปลงหลังเกิดการย่อย ในกรณีที่ต้องการย่อยสลายเซลลูโลสไม่สมบูรณ์หรือไม่เกิดน้ำตาลขึ้น วิธีการที่ให้ผลเชื่อถือได้มากที่สุดคือการวัดความเหนียวของเส้นใยฝ้ายก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในเวลาที่กำหนด ซึ่งต้องอาศัยเครื่องมือที่มีความละเอียดสูง และยังอาจตรวจสอบเส้นใย อิสระที่เกิดจากการย่อยสลายกระดาษกรองและหาน้ำหนักของสับสเตรดที่หายไป

การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส อาจทำได้โดย ศึกษาการย่อยสลายในอาหารวุ้น (Teather and Wood, 1982) ได้เสนอวิธีการตรวจสอบ ความสามารถในการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งที่มี CMC เป็นส่วนประกอบ เทปด้วย 0.1 % congo red เป็นเวลา 15 นาที เททิ้งแล้วเททับด้วย 1 M NaCl จะปรากฏวงใสที่ไม่ติดสีของ congo red ที่เกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลส

2.การวัดการทำงานของเอนไซม์แต่ละองค์ประกอบ

2.1 Endoglucanase นิยมใช้ CMC และ hydroxyethylcellulose เป็นสับสเตรต โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

2.2 Exoglucanase วิธีการนี้ยังไม่มีสับสเตรตที่จำเพาะต่อเอนไซม์ การวัด การทำงาน ขององค์ประกอบนี้ยังต้องทำให้ได้ exoglucanase ที่บริสุทธิ์ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับสับสเตรต ซึ่งสับสเตรตที่นิยมใช้ได้แก่ Avicel และเซลลูโลสที่ผ่านการแช่ด้วยกรดฟอสฟอริก

2.3 β -glucosidase นิยมใช้ cellobiose และ p-nitrophenyl- β -D-glucosidase(pNPG) เป็นสับสเตรต โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมา

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเซลลูโลส

การเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสขึ้นกับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ในโตรเจน ปริมาณออกซิเจน ความชื้น อุณหภูมิ PH องค์ประกอบของคาร์บอนชนิดอื่น และอัตราส่วนของลิกนินที่ประกอบในเซลลูโลส การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีในสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้น จึงมีผลต่อการย่อยสลายสารในธรรมชาติด้วย

อากาศหรือออกซิเจนมีผลต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ แตกต่างกันตาม ความต้องการตามชนิดของเชื้อ annerobe จะย่อยเซลลูโลสในสภาวะที่ขาดออกซิเจน เช่นในที่ที่มีความชื้นสูง พบว่าปริมาณ anaerobe bacteriam จะมีมากกว่าปริมาณของฟังไจและแอคดิโนไมซิสที่มาสารถย่อยสลายเซลลูโลส แต่ในระดับความชื้นปานกลางพบว่า celllolytic fungi และ aerobic bacteria จะเจริญได้ดี Forsberg and Groleau (1982) ได้ศึกษาความเสถียรของ endo- β -I, 4-glucanase และ β -1,4-glucosidase(cellobiase) ที่ผลิตจาก *Bacteriod succinogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ จากกระเพาะบนอาหารที่มี cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสลดลงเมื่อ carboxymethylcellulase (CMCase) และ cellobiase สูญเสียการทำงาน 20 % ระหว่าง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ส่วน cellobiase จะถูกยับยั้งการทำงานอย่างรวดเร็ว หลังการเพาะเลี้ยงเพียง 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 39 °C แต่เอนไซม์สามารถทำงานได้ในสภาวะที่ขาดออกซิเจน และจะเสถียรเมื่อมี dithiothereitol ในบรรยากาศที่มีไนโตรเจนของเอนไซม์

2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน มีรายงานจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบครบ ทั้งสามส่วน คือ endoglucanase, exoglucanase และ β -glucosidase ในปริมาณที่พอเหมาะ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีผู้นิยมนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. และ *Clostridium* sp. เป็นต้น

2. ส่วนประกอบทางอาหาร

ส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่สำคัญบางชนิด ได้แก่

2.1 แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอน

เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการทดลองของจิตตเสน (2529) ซึ่งนำเชื้อ *Hemicella nigrescens* CM33 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่ง คาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ cellulose powder, cellulose acetate, CMC และ cellobiose พบว่าอาหาร ที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณเซลลูเลสสูงสุด แต่ (ระพีพรรณ, 2530) ที่ทำการแยก แบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากกระเพาะหมักของโคพื้นเมือง พบว่า *Ruminococcus albus* 21Aa มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ Whatman No.1 filter paper pulp นอกจากนั้นยังมีการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากธรรมชาติ เช่น การเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 พบว่ามีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ rice hull และ rice bran โดยวัดการทำงานของ CMCase ได้เท่ากับ 153.0 และ 112 Uni/ml ตามลำดับ (Lee et al., 2008) นอกจากนั้น ภัทรา และคณะ (2551) ได้เพาะเลี้ยง *Clostridium thermocellum* พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกข้าวโพด ชานอ้อย ชังข้าวโพด และแกลบได้ดี ส่วน Haq et al. (2006) นำ *Trichoderma harzianum* มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติแตกต่างกัน คือ wheat bran, wheat straw, ricebran, rice husk และ soybean meal พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดในอาหารที่มี wheat bran เป็นแหล่งคาร์บอน

นอกจากนี้แล้วความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผล ต่อการผลิต เอนไซม์เซลลูเลสเช่นกัน โดยปริมาณ ของแหล่งคาร์บอนมาก หรือน้อยเกินไปในอาหาร จะส่งผลกระทบต่อให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเติบโต และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้อย่างเต็มที่ ดังเช่นการทดลองของนฤมล (2544) เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5% พบว่าแบคทีเรีย ทั้งสองไอโซเลทให้

ค่า enzyme และ specific activity ได้สูงที่สุด เมื่อมี CMC 0.2% เป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Bacillus subtilis* CMU4-4 ให้ค่าเท่ากับ 0.255 U/ml และ 1.465 U/mg protein ตามลำดับ และ *Bacillus coagulans* ให้ค่าเท่ากับ 0.154 U/ml และ 0.543 U/mg protein ตามลำดับ ส่วนการทดลองของ Desai *et al.* (1988) พบว่า *Seytaliidum lignicola* CD-48 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี cellulose 1.75% เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Haq *et al.* (2005) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* UM-11 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้นของ CMC 1.75% เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด นอกจากนี้ Narasimha *et al.* (2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 0.5-2.0% พบว่าที่ความเข้มข้น 1.5% เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดคือ 0.650 U/ml และ Denison and Koehn (1977) ทำเพาะเลี้ยง *Peronia oedipus* ในอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ที่ความเข้มข้น 20.0 mg/ml เชื้อให้ปริมาณ reducing sugar สูงที่สุดคือ 0.7 U/ml

2.2 แหล่งและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน Keskar (1992) ได้เพาะเลี้ยง *Penicillium janthinellum* ในอาหารเหลว พบว่าในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน เชื้อเจริญได้ไม่ดีและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสน้อย เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนให้เชื้อ พบว่า ammonium sulphate ช่วยให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดีกว่า nitrate และ Ali *et al.* (1991) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของ *Aspergillus terreus* พบว่า ammonium nitrate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า cnzyme และ specific activity สูงที่สุด นอกจากนั้นฤมล (2544) ได้ทำการศึกษา *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 โดยเพาะเลี้ยงใน cellulose broth ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ tryptone, ammonim nitrate, soy tone, ammonium sulphate และ peptone พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 ใช้ try tone และ *Bacillus coagulans* TI-5 ใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด นอกจากนั้น Oikawa *et al.* (1994) ได้ทดลองเพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-I โดยใช้ polypeptone, peptone และ try tone พบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ส่วน จิตตเสน (2529) เพาะเลี้ยง *Homicola nigrescens* CM33 ในอาหารเหลว พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ potassium nitrate และจากรายงานของ Moussa and Tharwat (2007) เพาะเลี้ยง *Sclerotium rolfsii* โดยมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ potassium nitrate, ammonium sulfate และ DL-asparagine พบว่า *Sclerotium rolfsii* ใช้ DL-asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด

ส่วนความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญเช่นเดียวกันโดย Lee and Blackburn (1974) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *thermophilic Clostridium* sp. โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของ yeast extract แตกต่างกัน พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 0.5% โดยวัดค่า enzyme activity ได้เท่ากับ 124 U/ml แต่ Keskar (1992) ทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium janthinellum* ในอาหารเหลว พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดในอาหารที่มี ammonium sulphate 0.7% เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ Ali *et al.* (1991) ได้ศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Aspergillus terreus* พบว่า ammonium nitrate ที่ความเข้มข้น 0.25% ให้ค่า enzyme และ specific activity สูงที่สุด และในการทดลองของ Singh and Kunene (1980) พบว่า potassium nitrate ที่ความเข้มข้น 0.5% มีผลให้ *Pyricularia oryzae* ผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสได้ดีกว่า glycine และ ammonium chloride และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ potassium nitrate เป็น 10% พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้นเช่นกัน และในการทดลองของ Desai *et al.* (1988) พบว่าแหล่งและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของ *Scytalidium lignicola* CD-48 คือ peptone 0.2% และ potassium nitrate 0.2%

3. เทคนิคในการเพาะเลี้ยง

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีวิธีที่นิยมนำมาใช้ 2 วิธี ดังนี้

3.1 Submerge culture การเพาะเลี้ยง ในอาหารเหลวที่มี การเติมอาหารแข็งลง

ไป และมีการให้อากาศหมุนเวียนตลอดเวลาหรือใช้เครื่องพ่นอากาศ เช่น Milala *et al.* (2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* ในสภาวะ submerge culture พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี maize straw เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด คือ 102 U/ml นอกจากนี้ ชรีดา และคณะ (2549) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lentinus* sp. ในสภาวะ solid state และ submerge culture ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแกลบข้าวเจ้าป่น พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ 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* 1MB3 สามารถผลิต ethanol เมื่อเจริญในอาหารที่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส และพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง ใน

shake-flask culture ได้ผลิตเพิ่มขึ้น 21% และ Desai *et al.* (1988) ใช้การเพาะเลี้ยงแบบ shake culture ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และ β -glucosidase ของ *Scytalidium lignicola* CD-4

3.1.2 Static culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบสถานะนิ่ง ไม่มี

การเขย่าเช่น การทดลองของ Kalra and Sandhu (2004) นำเชื้อ *Trichoderma pseudokonigii* มาเพาะเลี้ยงใน สภาวะ shake culture และ static culture พบว่า การเพาะเลี้ยงทั้งสองแบบให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน แต่การทดลองของ Moussa and Tharwat (2007) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Sclerotium rolsii* ในอาหารเหลว พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะ shake culture เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเลี้ยงในสภาวะ 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 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวอาหาร

แข็งที่ขึ้น ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้เลี้ยงเชื้อมากกว่าแบคทีเรีย ส่วนผสมของอาหารแข็งประกอบด้วยวัสดุที่เป็น ของแข็งแห้ง 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 bagasse เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state เชื้อสามารถผลิต reducing sugar และเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ submerge culture เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Grajek (1987) ซึ่งนำ *Thermoascus aurantiacus* และ *Sporotrichum thermophile* มาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state และ submerge culture พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ submerge culture

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.1 ความเป็นกรด-ด่าง

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญ และมีกระบวนการชีวเคมีใน สภาพที่เป็นกลางอย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์หลายชนิดมีการเจริญและผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสได้ดีในสภาวะที่มีความเป็น กรดหรือด่าง

มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น เช่น Immanuel *et al.* (2007) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* และ *A. fumigatus* ในอาหารที่มีกาบมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดที่ pH 5 ในปี 2544 นฤมล ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 ใน cellulose broth พบว่า pH 5.5 มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด และที่ pH 3 ไม่พบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Oikawa *et al.* (1994) ที่เพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 ใน cellulose broth และพบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ pH 5.5 เช่นเดียวกันกับ Singh and Kumar (1998) ที่เพาะเลี้ยง *Bacillus brevis* VS-1 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ pH 5.5 แต่ Desai *et al.* (1988) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Scytalidium lignicola* CD-48 ใน 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 ต่างกัน 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 ภัทธาและคณะ (2551) ที่พบว่า *Clostridium thermocellum* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด ที่ pH 7

4.2 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง เช่น Haq *et al.* (2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* UM-11 ใน CMC broth ที่อุณหภูมิ 20-40°C พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 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 ส่วนจิตตเสน (2529) ได้ศึกษา *Hemicella nigrescens* CM33 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 45°C และไม่พบการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55°C และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฟางข้าวป่นเป็น แหล่งคาร์บอน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 40°C และที่อุณหภูมิ 55°C ไม่มีการผลิตเอนไซม์เช่นกัน ซึ่งการทดลองนี้

สอดคล้องกับ Immanuel *et al.* (2007) ที่พบว่า *Aspergillus niger* และ *A. fumigatus* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40°C ในอาหารที่มี กาบมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่า enzyme activity สูงที่สุด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี sawdust เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อให้ค่า enzyme activity สูงที่สุด ที่อุณหภูมิ 50°C เช่นเดียวกันกับ 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 สามารถผลิต เอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด 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 และพบว่าที่ 37°C เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด แต่ Stutzenberger (1971) ทำการเพาะเลี้ยง *Thermomonospora curvata* พบว่าเชื้อ ผลิตเอนไซม์ได้ดีในอุณหภูมิ 55°C และ จากรายงานของ ภัทร และคณะ (2551) พบว่า *Clostridium thermocellum* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีเมื่อทำการเพาะเลี้ยงใน cellulose broth บ่มที่อุณหภูมิ 60°C ในสภาวะที่ไม่ต้องการออกซิเจน

4.3 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตาม ชนิดของจุลินทรีย์ ดังเช่น การเพาะเลี้ยง *Rhizopus stolonifer* ในอาหารที่มี cassava waste เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 2 และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดในวันที่ 10 (Poithiraj *et al.*, 2006) ส่วนการเพาะเลี้ยง *Trichoderma reesei* Rut C-30 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงใน อาหารเหลว เป็นเวลา 7 วัน เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และในการเพาะเลี้ยง *Hemicola nigrescens* CM33 ในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่าเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ วันที่ 5 เช่นกัน (จิตตเสน, 2529) ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยง *Penicillium fellutanum* ในสภาวะ submerged fermentation เมื่อนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 1-6 วันพบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน มีค่า enzyme activity เท่ากับ 79 U/ml (Kathiresan and Manivannan, 2006) ส่วน *Trichoderma koningii* พบว่าผลิต เอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง (Liu and Yang, 2006) แต่ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CY5 และ *Bacillus circulans* TP3 เป็นระยะเวลา 24-120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง (Ray *et al.*, 2007) และพบอีกว่า *Penicillium 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 พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด (Horikoshi *et al.*, 1984) ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaceins* ในอาหารที่มี sago pith เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่เวลา 24 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)

2.10 การใช้ประโยชน์เอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรม

แบ่งตามประเภทของอุตสาหกรรมได้ดังนี้

อุตสาหกรรมสิ่งทอ

อุตสาหกรรมสิ่งทอเริ่มจากการผลิตเส้นใยแล้วนำมาปั่นเส้นด้าย นำมาเป็นผ้าผืน โดยการทอหรือดัก จากนั้นต้องนำผ้าผืนหรือเส้นด้ายเข้าสู่ขั้นตอนการเตรียมผ้า ซึ่งก็คือการทำความสะอาดผ้าหรือเส้นการนำไปย้อมด้ายเพื่อให้คุณสมบัติเหมาะต่อการนำไปย้อม พิมพ์ หรือฟอกขาว เมื่อเรียบร้อยแล้วจึงมาดกแต่งด้วยสารเคมีหรือโดยทางกล เพื่อให้เนื้อผ้ามีผิวสัมผัส หรือคุณสมบัติต่างๆ ตามความต้องการ ซึ่งจะได้ผ้าสำเร็จรูปที่พร้อมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ขั้นตอนที่มีการนำเอนไซม์ไปใช้ ได้แก่ การลดน้ำหนักผ้า การลดน้ำหนักผ้าการขัดผิวผ้าและการทำความสะอาดเส้นใย เป็นต้น

การลดน้ำหนักผ้า (Weight Reduced) เป็นกระบวนการปรับปรุงคุณสมบัติของผ้า เพื่อให้ผ้ามีคุณสมบัติตรงตามประโยชน์ใช้สอยบางประการ เช่น ทำให้นุ่ม ทำให้ผ้าพลิ้วตัว น่าสวมใส่โดยให้เอนไซม์ย่อยสลายเส้นใยเซลลูโลสออกไปบางส่วน ทำให้ความเหนียวของเส้นใยลดลงและผิวเป็นขรุขระ หลังจากนำผ้าไปย้อม หรือพิมพ์เรียบร้อยแล้วต้องนำไปดกแต่งด้วยสารประเภท อะมิโนซิลิโคลน จึงจะทำให้ผ้ามีความนุ่มเป็นพิเศษน่าสัมผัส แลงามเหนียวของเส้นใยสูงขึ้น นอกจากนั้นการลดน้ำหนักผ้าฝ้าย ผิวผ้าจะถูกย่อยสลายออกไปก่อนจึงทำให้ขนบนผ้าเรียบขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำการขจัดขนบนผิวผ้า และถ้าผ้าที่ทำการลดน้ำหนักเป็นผ้ายีนส์ สีผ้ายีนส์จะถูกกัดออกไปบางส่วน ทำให้เกิดลายแปลกๆ ขึ้นกับผ้ายีนส์ กลายเป็นแฟชั่นที่ได้รับความนิยม

กระบวนการลดน้ำหนักผ้าฝ้ายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ผ้าฝ้ายที่จะทำการลดน้ำหนักต้องผ่านกรรมวิธีการเตรียมผ้ามาก่อน คือ ต้องกำจัดแป้ง กำจัดสิ่งสกปรก ฟอกขาว และเมอร์เซอไรซ์ (mercerize) แล้วจึงมาทำการลดน้ำหนัก วิธีการทั่วไปในการลดน้ำหนักผ้าฝ้ายคือ ใช้เอนไซม์เซลลูเลสมาเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเส้นใยเซลลูโลสในปริมาณที่เหมาะสม และปรับ PH ของ สารละลายให้มีค่าอยู่ระหว่าง 4.5-5.0 อุณหภูมิที่ให้อยู่ระหว่าง 45 °C- 55 °C ใช้เวลา 5-10 นาทีเพื่อให้เอนไซม์สลายตัวและเป็นการหยุดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

อุตสาหกรรมสารซักฟอก

สิ่งสกปรกในเสื้อผ้าประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด อาจเป็นสารละลายน้ำได้ หรือเป็นสารไม่ละลายน้ำ อาจเกาะอยู่ที่ผิวของเส้นใยผ้าหรือฝังแน่นอยู่ภายในใยผ้า และบางครั้งสิ่งสกปรกเหล่านี้อาจติดแน่นอยู่กับใยผ้า โดยมีโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเหงื่อไคลจากร่างกายเป็นตัวยึดการจับสิ่งสกปรกออกจากเนื้อผ้าอาศัยกลไกของน้ำ และสารซักฟอกเข้าไปละลายหรือชะสิ่งสกปรกให้เล็กลงและหลุดออกมา โปรตีนที่เป็นสิ่งสกปรกเอง หรือเป็นตัวยึดสิ่งสกปรกมักมีลักษณะเหนียวและติดแน่นกับใยผ้า สารซักฟอกเพียงอย่างเดียวไม่สามารถขจัดออกได้หมด จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ในการย่อยสลาย โปรตีนให้มีขนาดเล็กอ่อนตัวลง และหลุดออกจากเนื้อผ้าได้ง่ายขึ้น ในระยะแรกของการใช้เอนไซม์ในการซักฟอก เพื่อขจัดคราบสิ่งสกปรกฝังแน่นที่เกิดจากโปรตีน ไขมัน และแป้ง จึงใช้เฉพาะเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส แต่ปรากฏว่าผ้ายังไม่สะอาดเท่าที่ควร ยังมีคราบสิ่งสกปรกหลงเหลืออยู่สะสมไว้ในช่องระหว่างโมเลกุลของใยผ้าทำให้ผ้าหมองคล้ำ เป็นปัญหาที่มักพบในผ้าฝ้าย และผ้าใยผสมฝ้าย ซึ่งเป็นผ้าที่มีปริมาณการใช้สูงมาก ด้วยเหตุนี้ใน ปัจจุบันอัลคาไลน์เอนไซม์เซลลูเลสที่ ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างจึงเข้ามามีบทบาทใน การทำความสะอาดผ้าฝ้าย และผ้าใยผสมฝ้าย

เนื่องจากสภาวะการซักฟอกด้วยสารซักฟอก จะต้องใช้สภาวะที่เป็นด่าง เอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้จึงต้องทนต่อสภาพการซักฟอกและส่วนประกอบอื่นๆ ของสารซักฟอกได้ Novo Nerdish ได้ศึกษาผลของการนำเซลลูเลสมาใช้ในการซักฟอก ทำให้การซักผ้า มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น โดยทำให้ผ้าสีสว่างสดใส(color brightening) ขึ้น เมื่อฝ้ายผ่านการใช้งานและซักหลายครั้งสีหมองคล้ำลง เพราะปลายบางส่วนของเส้นใยละเอียดแยกออกมาจากกลุ่มของเส้นใยฝ้าย ทำให้เกิดเป็นขนละเอียดบนผิวผ้า ทำให้ผิวผ้าไม่เรียบ และปลายของเส้นใย ละเอียดเหล่านี้จะเก็บกักสิ่งสกปรกเอาไว้ ความสามารถในการสะท้อนแสงจึงลดลง สีจึงหมองคล้ำ เมื่อซักด้วยซักฟอกผสมเอนไซม์เซลลูเลสเส้นใยละเอียดเหล่านี้จะถูกย่อยสลายไปทำให้ เส้นใยฝ้ายเรียบขึ้น การสะท้อนแสงก็จะดีขึ้น สีของฝ้ายก็จะคืนสภาพเดิม ทำให้สีสว่างสดใสขึ้น และทำให้ผิวสัมผัสของผ้าเรียบและอ่อนนุ่มขึ้น

อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล

ในการผลิตเอทานอล (ethanol) สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายประเภท เช่น วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง หรือผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น น้ำหางนม (whey) จากการ

ผลิตเนย จากผลไม้จากโรงงานผลไม้กระป๋อง หรือแม้กระทั่งสารประกอบลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloses) จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในการผลิตเอทานอลจากสารประกอบลิกโนเซลลูโลสนั้น มีขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ กระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส หรือกรด เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส และกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยเชื้อยีสต์ หรือแบคทีเรีย เพื่อให้ได้เอทานอล อย่างไรก็ตามการผลิตเอทานอลจากสารประกอบลิกโนเซลลูโลส มีข้อจำกัดที่เอนไซม์เซลลูเลสมี ราคาแพง และโครงสร้างซับซ้อนของ ลิกโนเซลลูโลส ที่ลิกโนและเฮมิเซลลูโลสห่อหุ้มเซลลูโลสไว้ทำให้เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ยาก จึงมีการพัฒนาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากรา *Trichoderma sp.* ซึ่งเป็นราที่ถือได้ว่าผลิต เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูง โดยการใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ และการใช้สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักสารประกอบลิกโนเซลลูโลส

เอทานอลที่ผลิตได้ แบ่งตามวัตถุประสงค์การใช้งานได้ 2 ประเภท คือ ใช้สำหรับเป็นเชื้อเพลิง (fuel alcohol) และใช้สำหรับการผลิตเป็นเครื่องดื่ม (beverage alcohol) การผลิตสำหรับเป็นเชื้อเพลิง จะเน้นความสำคัญที่ปริมาณผลผลิตที่ได้ การผลิตสำหรับใช้ผลิตเครื่องดื่มนั้น เน้นความสำคัญที่กลิ่นรส และคุณภาพผลผลิต ด้วยเหตุนี้ที่ทำให้ต้องเลือกใช้กระบวนการผลิตจากแป้ง และควบคุมการหมักที่เข้มงวด ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงเหมาะกับการผลิตเอทานอล สำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงมากกว่าสำหรับใช้เป็นเครื่องดื่ม

อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ขนมอบ

ผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะขนมปัง ผลิตขึ้นจากกระบวนการหมักแป้งสาลีด้วยยีสต์ ยีสต์จะใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแก๊สคาร์บอน ไดออกไซด์ แก๊สที่ได้จะถูกกักเก็บไว้ใน โครงสร้างที่เป็นร่างแหของโปรตีนกลูเตน (gluten) ในแป้งสาลี เอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตแป้งสำหรับทำขนมอบ คือ เอนไซม์อะไมเลส (amylase) เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลจากการย่อยแป้งสำหรับใช้ในกระบวนการหมักของยีสต์ และเอนไซม์โปรติเอสเพื่อเพิ่มความนุ่มของแป้งนวด หรือที่เรียกว่า โด (dough) ลดเวลาการนวด และทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมปังมีความเป็นรูพรุนสม่ำเสมอ ขนมปังมีปริมาณเพิ่มขึ้นในแป้งสาลี และแป้งข้าวไรย์ มีเพนโตซาน (pentosan) ประมาณร้อยละ 3-5 และ 9 ตามลำดับ โดยเพนโตซานอยู่ในรูปของอะราบีโนไซเลน (arabinoxylan) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีโครงสร้างหลักเป็นน้ำตาลไซโลส 100-150 โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4 กลูโคสิดิก และน้ำตาลอะราบีโนไซด์เหนียวกับโมเลกุลของไซโลสส่วนลูกโซ่ด้านข้าง (side chain) ไซเลนมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำได้สูง

ประมาณ 10 เท่าของน้ำหนัก ซึ่งมีผลทำให้ขนมปังไม่ขึ้นฟู และเนื้อขนมปังจับเป็นก้อนหยาบ เมื่อมีการเติมเอนไซม์ไซเลนเนสในสูตรขนมปัง เอนไซม์เหล่านี้จะย่อยไซเลน ซึ่งทำให้การอุ้มน้ำลดลง เพราะโมเลกุลน้ำที่จับกับไซเลนถูกปล่อยออกมา โดขนมปังจึงไม่เหนียวและ และขนมปังที่อบออกมา มีขนาดใหญ่และนุ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเพนโดซานที่มีอยู่ในแป้งสาลีและแป้งข้าวไรย์ยึดติดอยู่กับ เซลลูโลส จึงทำให้เอนไซม์ไซเลนเนส ไม่สามารถเข้าย่อยสลายไซเลนได้ ดังนั้นจึงมีการเติม เอนไซม์เซลลูเลส ลงไปในแป้งขนมอบด้วย เพื่อช่วยให้เอนไซม์ไซเลนเนสทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์

อาหารสัตว์มีส่วนประกอบหลัก คือ เมล็ดพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ ถั่วเหลือง ซึ่งพืชชนิดเหล่านี้จัดเป็นแหล่ง โปรตีนจากพืชที่สำคัญแต่โครงสร้างของ เมล็ดพืชเหล่านี้ ประกอบด้วยเปลือก หรือเยื่อหุ้มที่เป็นเส้นใยห่อเอนโดสเปิร์ม (endosperm) เยื่อหุ้มนี้ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในปริมาณที่แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของพืช ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ย่อยสลายได้ยาก ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลำไส้ของสัตว์บางชนิด โดยเฉพาะสุกร และสัตว์ปีก จึงทำให้สัตว์เกิดการแน่นท้องเมื่ออาหารย่อยไม่ได้จะทำให้ร่างกายสัตว์ไม่สามารถดูดซึมสารอาหารที่เป็นประโยชน์ได้มีผลให้คุณค่าทางโภชนาการของอาหารชนิดนั้นลดลงด้วย ดังนั้นจึงมีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส ลงไปในอาหารสัตว์ เพื่อย่อยสลายสารประกอบเหล่านี้ ทำให้อาหารสัตว์สามารถใช้ประโยชน์จาก โปรตีนหรือสารอาหารต่างๆในเมล็ดพืชได้มากขึ้น นอกจากนั้นเอนไซม์เซลลูเลสยังถูกนำมาใช้ใน กระบวนการผลิตอาหารสัตว์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนินออก (delignification) มีค่าใช้จ่ายสูง เพื่อลดต้นทุนการผลิต จึงมีการนำเศษวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ไปใช้โดยตรงด้วยการหมักเชื้อในสภาพอากาศแห้ง (solid state fermentation) โดยใช้ เชื้อราที่สามารถเจริญบนวัสดุเหล่านี้ได้ดีเนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลาย สารประกอบลิกโนเซลลูโลสเป็นกลูโคส และไซท์โคสเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ เมื่อเชื้อราเจริญมากขึ้นก็ทำให้มีปริมาณ โปรตีน เพิ่มขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

อุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ

เริ่มมีการนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษมากขึ้น ตั้งแต่กลางทศวรรษ 1980 เนื่องจากมาจากความต้องการ ให้การผลิตระดับอุตสาหกรรม ใช้เทคโนโลยีที่ไม่มากระทบต่อสิ่งแวดล้อมเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต และลดต้นทุนการผลิต เยื่อกระดาษได้มาจากการนำเนื้อมาผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยวิธีทางกล หรือวิธีทางเคมี จากนั้นจึงมีการเติมองค์ประกอบอื่นๆ เช่น สารเสริมเยื่อกระดาษ วัตถุช่วยสร้างคุณภาพพิเศษ เพื่อให้ได้กระดาษที่มีคุณภาพที่มีคุณสมบัติตามต้องการ นอกจากนั้นยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสมาใช้ เพื่อเพิ่มอัตราการรีดน้ำเยื่อกระดาษ และเพิ่มความแข็งแรง (strength) ของกระดาษ เนื่องจากอนุภาคเยื่อกระดาษประกอบไปด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เมื่อเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเยื่อกระดาษ ให้ผลิตภัณฑ์บางส่วนที่ละลายน้ำได้ อนุภาคที่มีขนาดเล็กลงจะจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อน (flocculation) และสิ่งสกปรกที่จับยึดกับพื้นผิวเส้นใยจะหลุดออก จึงทำให้รีดน้ำได้ง่ายขึ้นมีอัตราการรีดน้ำเพิ่มขึ้น กระดาษที่ผ่านการรีดน้ำ จะถูกส่งต่อไปยังลูกกลิ้งอบไอร้อน เพื่อให้กระดาษแห้งสนิท ทำการม้วนเป็นกระดาษเพื่อนำไปใช้ในการพิมพ์ต่อไปเอนไซม์ผลสมเซลลูเลส กับ เฮมิเซลลูเลส โดยเติมเอนไซม์ในรูปสารละลายความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จากนั้นจึงค่อยๆ เติมเยื่อกระดาษที่เจือจางจนมีปริมาณของแข็งร้อยละ 2-4 ทำให้เอนไซม์และเยื่อกระดาษผสมกันอย่างทั่วถึง โดยควบคุม PH อยู่ที่ 5-7 อุณหภูมิ 35-50°C ใช้เวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงผ่านเข้าสู่การรีดน้ำออก และผลิตเป็นแผ่นกระดาษ ข้อควรระวัง คือหากใช้เอนไซม์ปริมาณมากเกินไปเยื่อกระดาษจะอ่อนมากเพราะเซลลูโลสถูกย่อยสลายมากเกินไป และเยื่อกระดาษที่ละเอียดจะส่งผลกระทบต่อการใช้งานของกระดาษ

อุตสาหกรรมผลิตกระดาษรีไซเคิล

กระบวนการ deinking คือ การทำให้หมึกพิมพ์หลุดออกจากกระดาษ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการผลิตกระดาษรีไซเคิล (second fiber processin) และจำเป็นต้องจัดการก่อนการนำกระดาษใช้แล้วมาเข้าสู่กระบวนการผลิตกระดาษอีกครั้ง กระบวนการสลายหมึกพิมพ์ทำได้โดยนำกระดาษใช้แล้วทำเป็นเยื่อกระดาษ (repairing) ให้มีปริมาณของแข็งร้อยละ 3-4 จากนั้นเติมสารซักฟอก และตัวทำละลาย ทำการกวนเพื่อให้อากาศ หมึกพิมพ์ก็จะลอยสู่ผิวน้ำจนสามารถเก็บและกำจัดออกไปได้ ปัจจุบันนี้มีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อ เพิ่มประสิทธิภาพในการสลายหมึกพิมพ์ เนื่องจาก

เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส ทำให้หมักที่ติดอยู่หลุดออกมาได้ง่ายขึ้น และได้กระดาษที่มีคุณภาพดีกว่าในด้านความสว่าง (brightness) อีกทั้งยังไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย โดยลดการใช้สารฟอกขาว

อุตสาหกรรมเครื่องดื่มน้ำผลไม้

โดยทั่วไปการสกัดน้ำผลไม้ใช้วิธีการบีบคั้นเพื่อให้ผนังเซลล์ของผลไม้ถูกทำลาย และปลดปล่อยส่วนที่เป็นน้ำซึ่งอยู่ภายในเซลล์ออกมา ผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และสารประกอบเพคติน (pectin) ที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจากแรงภายนอกและสารเชื้อโรคได้ง่ายรอยเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ประกอบด้วยสารประกอบเพคติน ซึ่งทำหน้าที่คล้ายซีเมนต์ยึดเซลล์ที่อยู่ติดกันเข้าไว้ด้วยกัน ดังนั้นการใช้เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส และเพคตินา ย่อยสลายผนังเซลล์ และสารเชื่อมต่อระหว่างเซลล์จะช่วยให้ประสิทธิภาพในการบีบคั้นน้ำจากเนื้อผลไม้สูงกว่าการใช้วิธีการบีบคั้นน้ำผลไม้เพียงอย่างเดียว และให้ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีคุณสมบัติดีกว่า และมีต้นทุนต่ำกว่ากระบวนการผลิตน้ำใส เช่น น้ำองุ่น น้ำแอปเปิล ต้องผ่านขั้นตอนสำคัญ คือ หลังจากการคั้นน้ำผลไม้จะแยกตะกอนแขวนลอยของเพคติน เซลลูโลสออกไป ถ้าเป็นตะกอนแข็ง เรียก เซลหิน (stone cell) ก็กรองออกได้ง่ายด้วยตะแกรง หรือแรงเหวี่ยง แต่หากเป็นเซลล์สำลี (cotton cell) เพคตินหรือเซลลูโลสก็อาจจะรวมตัวกับโปรตีน การแยกออกโดยวิธีการกรองจึงทำได้ยาก

2.11 ตัวอย่างประเภทสัตว์ที่ นำมูลมาใช้ในการทดลอง

ช้าง



ภาพที่ 4: ช้าง

ช้าง จัดอยู่ในประเภทสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ขนาดลำตัวใหญ่ จมูกและริมฝีปากบนยาว ที่เรียกว่า "งวง" ใช้สำหรับหายใจ จับสิ่งของ และจับอาหารเข้าปาก พื้นหน้าเจริญไปเป็น "งา" ฟันกรามมีขนาดใหญ่ ไม่เกิน 1 คู่ เช่น Dinotherium มีงาที่กรรไกรล่างคู่หนึ่งและช้างโบราณพวก Tetrabelodon มีงาที่กรรไกรบนคู่หนึ่งและที่กรรไกรล่างอีกคู่หนึ่ง) ไม่มีฟันเขี้ยวขนาดใหญ่ตรงลักษณะ คล้ายคั่นเส้า ขาหน้ามีกระดูก radius และ ulnar บริบูรณ์ขาหลังก็มี กระดูก tibia และ fibula บริเวณ นิ้วข้างละนิ้วแต่เล็ก

ช้างเป็นสัตว์ขนาดใหญ่ น้ำหนักกว่าสองตัน ช้างเป็นสัตว์ที่ไม่กินเนื้อ อาหารส่วนใหญ่ได้แก่ ต้นไม้ใบหญ้า ความต้องการอาหารประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักตัว ช้างที่เจริญวัยแล้วจะกินอาหาร เฉลี่ยวันละประมาณ 250 กิโลกรัม อาหารของช้างได้แก่ หญ้าชนิดต่างๆ ไม้ หน่อไม้ เถาวัลย์ พืชล้มลุก พืชไร่ และไม้ยืนต้น เช่น กัลย อ้อย สับปะรด ข้าวโพด มะพร้าว อาหารธรรมชาติ ที่ช้างป่า ชอบกิน คือ ดินโป่ง ที่ประกอบด้วย แร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อร่างกาย ส่วนช้างเลี้ยง หรือช้างบ้าน ก็มักจะผสม เกลือลงในอาหารเพื่อแทนดินโป่ง แม้ช้างจะเป็นสัตว์เขตร้อนแต่กลับไม่ชอบอากาศร้อนอบอ้าว อุณหภูมิที่ช้างรู้สึกสบายๆ อยู่ระหว่าง 20-33 องศาเซลเซียส ช้างมีกระเพาะอาหารแบบธรรมดา ไม่ได้ เป็นกระเพาะอาหาร Compound แบบสัตว์เคี้ยวเอื้อง อย่างวัวหรือควาย ตัวผู้ลูกอันจะอยู่ในท้อง ไม่ อยู่ในถุงห้อยออกมาอย่างสัตว์บกเลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ เช่น เสือ วัว ควาย กวาง และสุนัข เป็นต้น ส่วนตัวเมียคลอดลูกแยกเป็น Bicornuate และมีเต้านม 1 คู่ อยู่ที่หน้าอกระหว่างขาหน้าทั้ง 2 ข้าง ช้างเป็น สัตว์บกที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ช้างใช้เวลาในการตั้งครรภ์นานที่สุดในบรรดาสัตว์บกคือ 22 เดือน ช้าง แรกเกิดจะมีน้ำหนักประมาณ 120 กิโลกรัม มีอายุขัยประมาณ 50 ถึง 70 ปี ช้างที่มีอายุมากที่สุดที่ได้ บันทึกไว้คือ 82 ปี

ม้า



ภาพที่ 5: ม้า

ม้า (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Equus caballus* หรือ *Equus ferus caballus*) เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ที่ถูกมนุษย์นำมาเลี้ยงและถูกใช้ในกิจกรรมการเดินทางขนส่ง การทหาร กีฬา สันทนาการ และอาจจะใช้เป็นอาหารของมนุษย์ในบางวัฒนธรรมมานานนับพันปีแล้ว ปัจจุบันบทบาทของม้าถูกแทนที่ด้วยยานพาหนะแบบใหม่จนบทบาทลดลงไปเหลือเพียงทางกีฬา และสันทนาการ โดยส่วนใหญ่

ม้าเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง ที่กินพืช หรือหญ้าเป็นอาหารเหมือนกัน แต่ม้าเป็นสัตว์กระเพาะเดี่ยว ไม่มี 4 กระเพาะเหมือนโค การที่สัตว์ต้องเคี้ยวเอื้องก็เพื่อช่วยย่อยอาหาร หรือบดอาหาร แต่เป็นการย่อยเชิงกล สัตว์ไม่สามารถย่อยเซลล์พืชได้ ต้องอาศัยการย่อยของแบคทีเรียด้วยการหมักในกระเพาะหมัก ดังนั้นสัตว์เคี้ยวเอื้องจึงต้องอาศัยการย่อยของแบคทีเรียเหมือนกัน การเคี้ยวเอื้องก็เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับแบคทีเรียในการย่อยเซลล์พืชได้ดีขึ้น สารที่ได้จากการหมักย่อยของแบคทีเรียซึ่งเป็นกรดไขมันระเหย (volatile fatty acids) ร่างกายของสัตว์เหล่านี้ก็จะดูดซึมไปใช้ในการสร้างพลังงาน สร้างเนื้อและนม

แพะ



ภาพที่ 6: แพะ

แพะ เป็นชื่อสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิด *Capra hircus* ในวงศ์ Bovidae เป็นสัตว์กึ่งคู้ขนาดกลาง มีความอดทนแข็งแรงและทนทานต่อโรคได้ดีกว่าสัตว์กึ่งคู้ชนิดอื่นๆ สามารถปีนป่ายที่สูง โดยเฉพาะ โขดหินหรือภูเขาได้ดี ขนหยาบสีดำ ขาว หรือน้ำตาล มีเขา 1 คู่ ตัวผู้มีเครา หางสั้น

แพะเป็นสัตว์ที่ให้ผลผลิตได้หลากหลายรูปแบบซึ่งส่วนใหญ่เป็นเนื้อและนม เช่นเดียวกับปศุสัตว์ทั่วไปอีกทั้งเป็นทั้งเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องทำให้ผลของการให้ผลผลิตเนื้อและนมจึงขึ้นกับคุณภาพของอาหารหยาบที่สัตว์กินและศักยภาพการย่อยอาหารของสัตว์โดยการทำหน้าที่ของ จุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารส่วนหน้า (Fore stomach) กระเพาะหมักที่ทำหน้าที่หมักอาหารพวกเยื่อใย และการสังเคราะห์วิตามินให้แก่สัตว์ โดยปกติอาหารพวกเยื่อใยจะมีคุณค่าทางอาหารต่ำแต่จุลินทรีย์จะเปลี่ยนเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ที่สัตว์นำไปใช้ในการดำรงชีวิตและการสร้างผลผลิตต่อไป โดยระบบทางเดินอาหารของแพะมีรูปแบบเช่นเดียวกับโค กระบือ ดังนี้

1. รูเมน (Rumen) เรียกว่า ผีชีว์ มีลักษณะเป็นผนังยื่นออกมา ทำหน้าที่หมักอาหารโดยจุลินทรีย์อาหารจะถูกส่งออกมาเคี้ยวเอื้องอีกครั้งหนึ่งเพื่อบดสลายให้ละเอียด
2. เรติคิวลัม (Reticulum) เรียกว่า กระเพาะรังผึ้ง
3. โอมาซั่ม (Omasum) เรียกว่า กระเพาะสามสิบกลีบ
4. อะโบมาซั่ม (Abomasum) หรือกระเพาะจริง จะมีการย่อยอาหารทางเคมี และส่งอาหารต่อไปยังลำไส้เล็กเพื่อย่อยอาหารที่กินเข้าไปและย่อยจุลินทรีย์เป็นอาหารต่อไป

หญ้าที่แพะกินเข้าไปนั้นจะเข้าไปอยู่ในกระเพาะส่วนเรติคิวลัม จากนั้นจะมีการหดตัวของกระเพาะส่วนเรติคิวลัม เพื่อส่งอาหารผ่านเข้าสู่กระเพาะส่วนรูเมน ซึ่งเป็นกระเพาะที่มีขนาดใหญ่กว่ากระเพาะอื่นๆ เมื่อวัวกินอาหารจนเต็มที่แล้วก็จะสำรอกอาหารที่เก็บอยู่ในกระเพาะส่วนรูเมนออกมาเคี้ยวใหม่เป็นครั้งเพื่อบดอาหารให้ละเอียดขึ้น เรียกว่า เคี้ยวเอื้อง แล้วกลืนกลับเข้าไปใหม่ อาหารจะ

ถูกหมักอยู่ในกระเพาะ รูเมนเป็นเวลาหลายชั่วโมง โดยมีแบคทีเรียและโพรโตซัว ช่วยย่อยสลาย เซลลูโลสให้เป็นกรดไขมันอย่างง่าย กรดไขมันนี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อใช้เป็น แหล่งให้พลังงานและจุลินทรีย์เหล่านี้ ยังช่วยสังเคราะห์กรดไขมัน จากคาร์โบไฮเดรต และสังเคราะห์ กรดอะมิโน จาก ยูเรีย แอมโมเนียจากการหมักนอกจากนี้จุลินทรีย์ยังสามารถสร้างวิตามิน บี12 ได้ด้วยจากนั้นอาหารและ จุลินทรีย์ที่อยู่ใน กระเพาะรูเมน จะถูกบีบส่งกลับไปยังกระเพาะ ส่วนเรติคิวลัม และส่งต่อไปยังกระเพาะโอมาซัม เพื่อบดอาหารผสมรวมกัน และบีบคั้นน้ำออกเพื่อให้ อาหารแห้งและเป็นก้อน จากนั้นส่งเข้ากระเพาะอาหารแอมโอมาซัมหรือกระเพาะจริง เพื่อทำการย่อย ตามปกติ โดยมีเอนไซม์ช่วยในการย่อย

เมื่ออาหารย่อยในกระเพาะอาหารแล้วจะถูกขับออกมาสู่ลำไส้เล็กตอนต้นและมีอวัยวะอื่นๆ อีกที่ช่วยในการย่อยอาหาร ได้แก่ ตับอ่อน สร้างเอนไซม์มาย่อยอาหารพวกโปรตีน ไขมัน และแป้ง ตับสร้างน้ำดีเพื่อช่วยในการย่อยในลำไส้เล็กโดยทำให้ไขมันแตกตัว เมื่ออาหารย่อยเสร็จเรียบร้อยแล้ว จะดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อนำไปใช้ในส่วนต่างๆ ของร่างกาย

โคอาลา



ภาพที่ 7: โคอาลา

โคอาลา (Koala) เป็นสัตว์ในกลุ่มสัตว์จำพวกจิงโจ้ (มีไซ้หมี) ตัวเมียจะมีกระเป๋าหน้าท้อง สำหรับให้ลูกอ่อนอาศัยอยู่ จากการที่มันมีลักษณะรูปร่าง หน้าตาคล้ายสัตว์ในตระกูลหมี ทำให้คนส่วนมากเรียกมันว่า หมีโคอาลา (Koala bear)

โคอาลากินใบยูคาลิปตัสเป็นอาหาร พืชและระบบย่อยอาหารถูกพัฒนาให้สามารถกินและย่อยใบยูคาลิปตัสได้ ใบยูคาลิปตัสมีสารอาหารน้อยมาก และยังมีสารที่มีพิษต่อสัตว์ แต่ระบบย่อยอาหารของโคอาลามีการปรับตัว ทำให้สามารถทำลายพิษนั้นได้ โคอาลามีอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการย่อยไฟเบอร์ (ส่วนประกอบหลักของใบยูคาลิปตัส) ยาวมากถึง 200 ซม. ที่บริเวณอวัยวะนี้ จะมี

แบคทีเรียที่ช่วยในการย่อยไฟเบอร์ให้กลายเป็นสารอาหารที่ดูดซึมได้ อย่างไรก็ตาม โคอาลามีการดูดซึมสารที่ได้จากการย่อยไฟเบอร์ไปใช้เพียงแค่ 25 % ของที่มันกินไปเท่านั้น ส่วนน้ำในใบยูคาลิปตัสส่วนใหญ่ถูกดูดซึม ทำให้โคอาลาไม่ค่อยหาน้ำกินจากแหล่งน้ำ ส่วนใหญ่โคอาลากินใบยูคาลิปตัสประมาณวันละ 2000 ถึง 5000 กรัม โดยปกติมันจะนอนถึง 16-24 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อรักษาพลังงานไว้

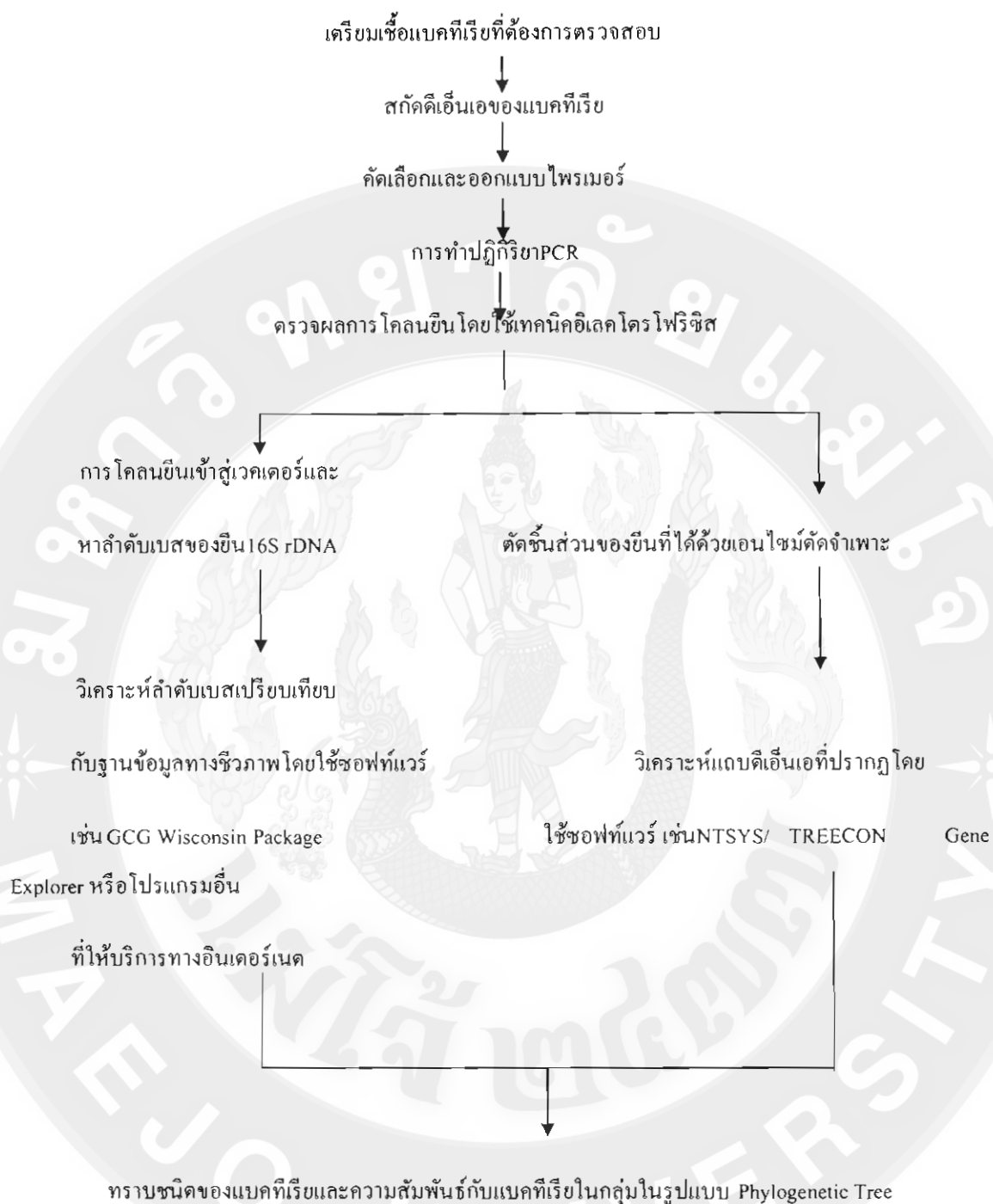
2.12 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วย 16S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR และฐานข้อมูลทางชีวภาพ

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียมีหลายวิธี เช่น การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี (อภิัญญา, 2546) การตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี และการตรวจสอบดีเอ็นเอ ซึ่งประการหลังมีหลายวิธี วิธีที่นิยมมี 2 แบบ คือ เทคนิค RFLP และเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งมีความสะดวกหลายประการในการตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนต่างๆ เช่น การใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณเพียงเล็กน้อยตรวจสอบดีเอ็นเอที่เสื่อมสภาพได้ เนื่องจากส่วนที่จะใช้เพิ่มขยายจะอยู่ในช่วง 100-2000 เบสเท่านั้น ซึ่งเป็นประสิทธิภาพสูงสุดของเทคนิคนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบนั้นๆ

การตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียนั้น นิยมตรวจสอบที่ยีน 16S rDNA ซึ่งพบในแบคทีเรียทุกชนิดมีขนาดประมาณ 1500 เบสหรือมากกว่า การตรวจสอบยีนนี้มี 2 วิธีคือ PCR-RFLP และการหาลำดับเบส โดยการโคลนยีนด้วยไพรเมอร์จำเพาะจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1500 เบส แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบชิ้นที่ตัดด้วยวิธี Electrophoresis และโปรแกรมตรวจวิเคราะห์หรือการนำชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้ไปหาลำดับเบสแล้วตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบกับฐานข้อมูลของยีน โดยใช้ software สำหรับการตรวจวิเคราะห์เช่น GCG Wisconsin Package, Gene Explorer หรือโปรแกรมที่ให้บริการผ่านทางอินเทอร์เน็ต เป็นต้น ก็จะสามารถจำแนกได้ว่าแบคทีเรียที่เราต้องการตรวจสอบเป็นชนิดใด

ribosomal DNAs เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ดีในการใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตเพราะเป็นโมเลกุลยุคโบราณ มีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิตโดยการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มีการกระจายตัวของโมเลกุลนี้อย่างกว้างขวาง พบได้ทั่วไปและมีการอนุรักษ์ปานกลาง นิยมใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความคล้ายกัน (similarity) ของลำดับเบสของ 16S rDNA genes สำหรับภาพรวมในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย สามารถสรุปได้ดังภาพต่อไปนี้



ภาพที่ 8: ขั้นตอนการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลร่วมกับการใช้ฐานข้อมูลทางชีวภาพ (Bioinformatics)

2.13 การหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA

ผลผลิตของ PCR ที่ได้ ได้แก่ ยีน 16S rDNA ซึ่งควรจะมีประมาณ 1500-1600 เบส นำขนาดผลผลิตที่ได้ไปหาลำดับเบสต่อไป ซึ่งในการหาลำดับเบสมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น Chemical cleavage

method, Enzymatic method และ Automated DNA sequence ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการสุดท้ายคือการหาลำดับเบสโดยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งเป็นการพัฒนาของเทคโนโลยีนี้มีหลักการเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในธรรมชาติ อาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA Polymerase ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีเบสคู่สม (Complementary base) กับดีเอ็นเอต้นแบบแล้วใช้นิวคลีโอไทด์ที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงร่วมกับเทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยวิธี Cycle Sequencing ซึ่งจะต้องใช้ร่วมกับเทคนิค Electrophoresis สำหรับแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอ บนวุ้นที่เรียกว่า slab gel ค่าที่อ่านได้จะมีความละเอียดสามารถแยกขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 1 base ได้ ปัจจุบันเทคนิคนี้พัฒนาเป็นระบบ capillary electrophoresis ซึ่งจะลดขั้นตอนการเตรียมแผ่นวุ้น และใช้งานได้สะดวกและแม่นยำขึ้น สามารถรองรับงานวิจัยด้านยีนอม ของสิ่งมีชีวิตและงานด้านชีวโมเลกุลต่างๆ ได้มาก

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์มาช่วยจัดการข้อมูลทางด้านชีวภาพในการเก็บรวบรวม วิเคราะห์ข้อมูลเรียกว่า Bioinformatics เป็นเทคโนโลยีที่มีบทบาทสำคัญมากต่อนักวิจัยด้านชีวโมเลกุล ข้อมูล ยีน ยีนอม และลำดับเบสต่างๆ ที่มีการศึกษา ค้นคว้า วิจัยในโลกจะเก็บไว้ที่ฐานข้อมูลของดีเอ็นเอ ได้แก่ EMBL และ GENBANK เป็นต้น

นอกจากการใช้ลำดับเบสของยีน 16S rDNA บ่งชี้หรือจำแนกชนิดของแบคทีเรียแล้วยังใช้ในการบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อีกมากมาย เช่น การบ่งชี้ Cyanobacteria Strains *Synechococcus* (Honda *et al.*, 1998) ทั้งนี้ยังมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาความหลากหลาย

ของ Cyanobacteria ในกลุ่ม *Mastigocladus* (Sompong *et al.*, 2006) ที่บ่อน้ำพุร้อนระนอง จังหวัดระนอง ซึ่งใช้ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA และเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลจนสามารถบ่งบอกชนิดของ Cyanobacteria ที่ทำการศึกษาได้ นอกจากนั้น สามารถบ่งบอกความแตกต่างของ *Clostridium butyricum* ออกจากสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีความใกล้เคียงกันมากได้ (Pourshaban *et al.*, 2002) โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA เป็นต้น จากตัวอย่างที่ได้กล่าวมานั้นสามารถบอกได้ถึงความสำคัญและประโยชน์ของการใช้ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ในการบ่งบอกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดีและควรจะใช้วิธีการนี้เป็นแนวทางการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ตัวอย่างมูลสัตว์ที่นำมาศึกษา ซึ่งได้มาจาก สวนสัตว์เชียงใหม่

- มูลสัตว์ช้าง
- มูลสัตว์ม้า
- มูลสัตว์แพ
- มูลสัตว์โคอาลา

โดยมูลสัตว์ที่นำมาเป็นมูลสัตว์สดๆ ที่สัตว์ขับถ่ายออกมานอกร่างกาย

3.1.2 อาหารที่ใช้แยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- Carboxymethylcellulose (CMC) agar
- Carboxymethylcellulose (CMC) broth
- Luria broth (LB)

3.1.3 สารเคมี

- สารเคมีที่สกัด Genomic DNA

สารเคมีสำหรับเตรียม Lysis buffer 40 mM (ภาคผนวก ข)

- Tris-acetate pH 7.8
- Sodium acetate
- Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) 1 mM
- 1%SDS
- 5 M NaCl(ภาคผนวก ข)
- Isopropanal
- 70% Ethanol
- Liquidnitrogen
- Chloroform

3.1.3.2 ชุดสารเคมี ที่ใช้ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Primer 27F

- Primer 1492R
- 25 mM dNTP (Promega)
- 50 mM $MgCl_2$ (Fermantas)
- 5u/ μ l *Taq* DNA polymerase (Fermantas)
- 10X PCR buffer (Fermantas)

3.1.3.3 ชุดสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา PCR product

- Bindig solution
- Buffer
- Silica power
- Washing Buffer

3.1.3.4 ชุดสารเคมีที่ใช้สำหรับ เชื่อมต่อดีเอ็นเอเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม (DNA ligation)

- Vector p TZ57R/T (ภาคผนวก ค)
- 5 $\times$ ligation
- T4 DNA Ligase

3.1.3.5 สารเคมีสำหรับทำ Agarose gel electrophoresis

- agarose ความเข้มข้น 1.4%
- 1x TBE buffer (ภาคผนวก ข)
- Ethidium bromide (เตรียมจาก Stock ใน ภาคผนวก ข)

3.1.3.6 สารเคมีสกัดพลาสมิด

- BP₁ : 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 (เตรียมจาก Stock ภาคผนวก ข)
- BP₂ : 200 mM NaOH, 1% SDS (เตรียมจาก Stock ใน ภาคผนวก ข)
- BP₃ : 3 M Potassium acetate pH 5.1(ภาคผนวก ข)

-สารเคมี สำหรับ ทำบริสุทธิ์ PCR product

- TBE Conversion buffer
- Binding buffer solution
- Ice cold washing buffer

- สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก ข)

- 0.1% Congo red
- 1 M NaCl
- Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent
- 1% Carboxymethylcellulose solution

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง
- ตู้บ่มเชื้อ(incubator) อุณหภูมิ 37°C

3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดเอนไซม์เซลลูเลส

- micropipette
- หลอดทดลอง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ความคุมอุณหภูมิ(centrifuge)
- เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)
- tip

3.1.6 อุปกรณ์อื่นๆ

- ปีเปตขนาด 1 และ 10 ลิลลิตร
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ห่วงถ่ายเชื้อ
- Sterile spreader รูปตัว L
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)
- หม้อนึ่งความดันไ (autoclave)
- ตู้อบอุณหภูมิสูง
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
- กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)

สไลด์

- Adjustable automatic pipette และ yellow tip ขนาดต่างๆ

Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml และ Muli Ulte PCR tube (Sorenson

TMBioscience, Inc., U.S.A.) ขนาด 0.5 ml และ 0.2 ml

- เครื่อง PCR (Perkin Elmer; Gene Amp PCR system 2400)
- ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์แนวนอน (BIO-RAD, U.S.A)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอโดยแสง UV (UV trans illuminator, BIO-RAD

Mini- Trans illuminator)

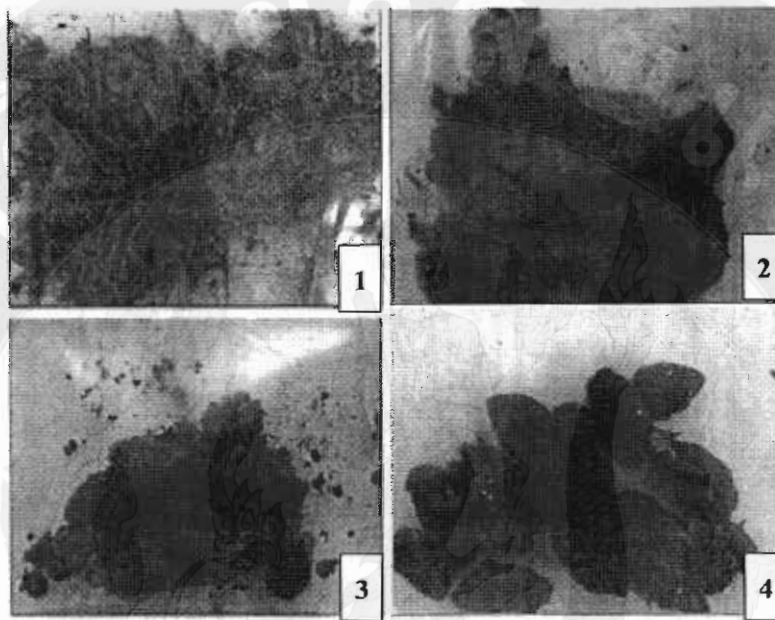
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Beckman รุ่น DU-7500)

- เครื่องเขย่า
- เครื่องอบเครื่องแก้ว
- เครื่องทำความเย็น (Freezer) ได้แก่ ตู้แช่ 4 °C, -20 °C และ -80 °C
- เครื่องกวนสารละลายด้วยความร้อน (hot plate)
- เครื่องกวนผสมด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- เครื่องผสม (vortex mixer)
- เตาไมโครเวฟ (microwave)
- ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
- เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beakers)
- ขวดรูปชมพู่ (Flasks)
- กระบอกตวง (cylinders) แท่งแก้วคนสาร (stirrer)
- วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ข้อนดักสาร กระดาษขังสาร กระดาษติดฉลาก กระดาษเทปใส กระดาษทิชชู ถังพลาสติกไซชนิดทนร้อน ปากคีบ ถังมือ กล่องโฟม มีดตัดเตอร์ กรรไกร กล้องจุลทรรศน์

3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

3.2.1 เก็บตัวอย่างมูลสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 9: มูลสัตว์ 4 ชนิด ที่ใช้ในการทดลอง 1:มูลช้าง 2:มูลม้า 3:มูลแพะ 4:โคอาลา

3. 2.2 การแยกเชื้อจากมูลสัตว์ ทั้ง 4 ชนิด

- เตรียมน้ำกลั่นใส่หลอดทดลอง ทั้งหมด 4 หลอด โดยใส่ลงไปหลอดละ 4.5 ml (ต้องทำการนิ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้)
- ทำการชั่งมูลสัตว์ ทั้ง 4 ชนิด ในปริมาณตัวอย่างละ 0.5 กรัมจากนั้นนำไปใส่หลอดทดลอง
- นำไป vortex เพื่อทำให้ตัวอย่างกับน้ำผสมกันเป็นเนื้อเดียวกัน และ ทิ้งไว้เวลา 10 นาที
- ทำการเจือจางโดยการดูดสารละลายส่วนใสของตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 μ l โดยไมโครปิเปต
- จากนั้นใส่ลงไป ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำที่ทำการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้ได้ความเจือจางเป็น 10^{-4} เท่า (ภาคผนวก จ)

- นำสารละลายจากข้อ 1.5 ทุกตัวอย่าง 500 μ l มาเกลี่ยให้ทั่วบนเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรCMC ด้วยวิธี spread plate (ภาคผนวก จ)
- เพาะเลี้ยงเชื้อในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 วัน
- เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารทำก็ทำการคัดแยกเชื้อ โดยดูลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น นำหว่านถ่ายเชื้อลงไฟจนร้อนแดง รอให้เย็นแล้วนำไปป้ายแต่ละโคโลนีของเชื้อมาแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate (ภาคผนวก จ)และ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยการย้อมแกรมและย้อมสปอร์ (ภาคผนวก ง)
- นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 วัน

3.2.3 การทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสโดยวิธี การspot plate

- นำเชื้อที่ได้จากการ streak plate ในข้อ 3.1.8 โดยเลือกเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว 1 plate ต่อ 1 โคโลนี มาทำ การ Spot plate (ภาคผนวก) ลงบน plate ที่มีอาหาร CMC(carboxymethyl cellulose เป็น สับเตรต)
 - โดยที่ทำการ Spot โคโลนีหนึ่ง โคโลนี ต่อ 2 Plate
 - บ่มที่อุณหภูมิ 37°C
 - เลี้ยงในเวลาที่ แตกต่าง กัน คือ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง
- เมื่อครบ เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงแล้ว ทำการเก็บข้อมูลโดยการ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี ที่เกิดขึ้นจากการ Spot plate
- ทำการ fast plate เพื่อทดสอบ activityของเชื้อในการย่อยสลาย เซลลูโลส โดยการย้อมด้วย Congo red 1.0% (w/v) (ภาคผนวก ง) เขย่าเบาๆเป็นระยะเวลา 15 นาที แล้วเททิ้ง
- ล้าง Congo red ด้วย NaCl 1 M จนสามารถเห็นวงใส วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

3.2.4 การเก็บรักษาเชื้อ

- นำเชื้อแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากข้อ 3.1.9 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria broth
- นำหลอดอาหารจากข้อ 3.3.1 ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 คืน
- เก็บรักษาเชื้อโดยผสม Glycerol ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 30 %
- เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20°C

3.2.5 สกัด Genomic DNA (Ifakut, 2005)

- เชื้อโคโลนีลงในอาหารสูตร Luria broth และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
- แบ่งเชื้อ 1.5 ml ใส่ใน Microcentrifuge tube และนำไปปั่นที่ 1,300 rpm 2 นาที
- เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วเติม 200 µl Lysis buffer ผสมให้เข้ากัน
- เติม 5M NaCl 66 µl ทำการฟัดใน ไนโตรเจนเหลว (นับ 1-10) จากนั้นนำมาแช่ในน้ำร้อน ทันที (ระวังฟาระเบิด) ทำอย่างนี้ ทั้งหมด 3 ครั้ง (เพื่อทำให้เซลล์แตก)
- นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 1,300 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส่หลอด Microcentrifuge tube หลอดใหม่ แล้วเติม Chloroform ปริมาตร 1 เท่า ส่วนใสที่ดูมา
- กลับ Micro centrifuge tube ไปมาเบาๆและนำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- ทำในขั้นตอนเหมือน 2.57-2.5.8 อีก 1 หนึ่งรอบ
- ดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ในปริมาตรที่เท่ากับ ส่วนใสที่ดูมา
- เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนและนำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- เท isopropanol ทิ้งแล้วเติม 70%Ethanol 200µl นำไปปั่นที่ 13,000 rpm 5 นาที
- เท 70% Ethanol ทิ้ง และรองจนระเหยหมด
- เติมน้ำกลั่น 2-3 µl เพื่อละลาย Genomic DNA และตรวจสอบโดย Electrophoresis

3.2.6 เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

- สังเคราะห์ Primer ที่มีลำดับเบสสำหรับใช้ตรวจสอบ 16S rDNA ตามงานวิจัยของ Weisburg *et al.*(1991) จากบริษัท Operon, America

27F GAGTTTGATCCTGGCTCAG

1492R GGTTACCTTGTTACGACTTC

- เติมนสารต่อไปนี้ลงใน PCR tube

Genomic DNA 12 μ l

Primer 27F 0.5 μ l

Primer 1492R 0.5 μ l

10nM dNTP 0.4 μ l

Taq DNA polymerase 0.5 μ l

MgCl₂ 1.6 μ l

10 X buffer 2 μ l

น้ำกลั่น(จนครบ 20 μ l)

3.2.6.1 กำหนดเงื่อนไข

- | | | |
|--------------------|-------|--------|
| - Pre-denaturation | 94 °C | 2 นาที |
| - Denaturation | 94 °C | 1 นาที |
| Annealing | 55 °C | 1 นาที |
| Extension | 72 °C | 2 นาที |

- ทำซ้ำ 30 รอบ
- Final extension 72 °C 5 นาที
- แยกขนาด PCR product โดยเทคนิค Electrophoresis

3.2.7 ทำบริสุทธิ์ PCR product ตามวิธีใน QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN)

- ตัดแถบ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 1500 bp ใส่ Microcentrifuge tube
- เติม TBE Conversion buffer 50 µl และ Binding buffer solution 250 µl และนำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 5 นาที
- เติม Silica powder suspension 5 µl แล้ว
- นำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 55 °C 2 นาที ผสมให้เข้ากัน (Vortex) (3 ซ้ำ)
- นำไปปั่นที่ 13000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที และเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
- เติม Ice cold washing buffer 500 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ 13000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที
- เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง และทำซ้ำข้อ 5 อีก สองครั้ง
- รองนของเหลวระเหยหมดแล้วเติมน้ำกลั่น 20 µl เพื่อละลาย PCR product
- นำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 5 นาทีและปั่นที่ 13000 rpm 2 วินาที
- ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส่หลอดใหม่ และทำการตรวจสอบผลที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ PCR product ด้วย Electrophoresis

3.2.8 เชื่อมต่อดีเอ็นเอเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม (DNA ligation)

- เติมสารต่อไปนี้ลงใน PCR tube

pTZ57R/T	1 µl
5×ligation	4 µl
PCR product	3 µl
T4	1 µl
dH ₂ O	11 µl
Total	20 µl

- กำหนดเงื่อนไข

3.2.9 การเตรียม Competent Cell

- นำเชื้อจาก Stock เชื้อลงในหลอดทดลองที่มี LB 3 ml แล้ว incubate จนขึ้น (overning)
- ทำการดูดเชื้อในหลอดทดลอง 1 ml ลงใน Flask (50 ml LB medium) เขย่า ในตู้ 37°C นาน 5 ชั่วโมง
- ทำการ Stop growth โดยการแช่ลงในน้ำแข็ง แล้วแบ่งใส่หลอด Centrifuge tube หลอดใหญ่ 4 หลอด ให้เท่าๆกัน
- Centrifuge 5000 rpm เป็นเวลา 10 min จากนั้นเทสารละลายทิ้งไปให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์
- ละลายตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง เขย่า
- Centrifuge 5000 rpm เป็นเวลา 10 min
- เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือตะกอนเซลล์
- สะด้วยการเติมน้ำกลั่น 35 ml ทุกหลอด
- ละลายตะกอนด้วยเครื่องเขย่า
- Centrifuge 5000 rpm เป็นเวลา 10 min เทส่วน ทิ้ง จะเหลือตะกอนเซลล์
- เติม glycerol 10% 15 ml จากนั้น Centrifuge 5000 rpm เป็นเวลา 10 min
- เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือ glycerol 10% เล็กน้อย
- ทำให้เข้ากัน ดูด ใส่ลง Eppendorf tube 70 µl
- Franz ด้วย nitrogen เหลว จากนั้นเก็บไว้ที่ ตู้เย็น -80 °C ทัน

3.2.10 วิธีการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ *E. coli* และการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของ โคลิโคน

(Transformation and Recombinant clone screening by blue/ selection)

- วิธีการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ *E. coli*

- นำดีเอ็นเอที่ได้จากการ ligation มาทำการ
- ทำการดูดสารละลายดีเอ็นเอมาทำการผสมลงในหลอด ที่มี competent cell ปริมาตร 70 μl (ที่เตรียมเสร็จใหม่หรือที่นำออกมาจากตู้แช่แข็ง -80°C แล้วปล่อยให้ละลายบน น้ำแข็ง)
- ทำการดูดลงใน คิวเวส จากนั้นนำลงเครื่อง electroporation หรือเรียกวิธีนี้ว่า physical method เป็นการใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อทำให้ cell membrane ของ *E. coli* เปลี่ยนแปลงเป็นรูพอให้ดีเอ็นเอ ผ่านชั่วคราว
- เมื่อทำวิธีการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ *E. coli* ด้วยเครื่อง electroporation แล้ว จากนั้นทำการดูด DNA ใน คิวเวส ลงในหลอดทดลอง ที่มีอาหารเหลว (LB broth) 1000 μl
- นำหลอดทดลองไปเขย่าในตู้บ่มเชื้อ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- และในขณะที่รอการบ่มในข้อ 3.8.4 นำอาหารแข็ง (LB agar plate) มาทำการ spread บนอาหาร แข็งด้วย IPTG (20 mg/ml) ปริมาตร 40 μl และ X-gal (20 mg/ml) ปริมาตร 40 μl
- นำหลอด ในข้อ 3.8.4 ปริมาตร 200 μl มาทำการ spread ลงบนอาหารแข็ง (LB agar plate) ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.5 บ่มที่ 37°C ข้ามคืน (ประมาณ 14-1 ชั่วโมง)

3.2.11 การตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม

ภายหลังจากการส่งถ่ายพลาสมิดด้วย วิธี Bacterial Transformation System (Fermentas) จะเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีลักษณะสีขาว ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB+Amp ความเข้มข้น 100 $\mu\text{l/ml}$ ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ 140 rpm เป็นเวลา 1 คืน นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาเตรียมพลาสมิด

วิธีการสกัดพลาสมิด

- นำเชื้อ ในข้อ 3.8.1 เทลงใน Eppendorf tube เกือบเต็ม
- Centrifuge 13,000 rpm 1 min 4 °C
- เทส่วนใสออก แล้วเติม BP₁ 300 µl (ภาคผนวก ข) นำไป Vortex ให้เข้ากัน
- เติม BP₂ 300 µl (ภาคผนวก ข) mix เบาๆ (ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที)
- เติม BP₃ 300 µl (ภาคผนวก ข) mix เบาๆ แช่ลงในน้ำแข็ง 15 นาที เพื่อทำการตกตะกอน
- Centrifuge 13,000 rpm 15 min 4 °C
- คูณส่วนใส ใส่ Eppendorf tube ใหม่ และเติม isopropanol 1 เท่า
- ทำการตกตะกอนที่ -20 °C 2 hr หรือ overnight
- Centrifuge 13,000 rpm 30 min หรือ 15 min 4 °C.
- เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 75 % ethanol 300 µl
- Centrifuge 13,000 rpm 5 min 4 °C
- เทส่วนใสทิ้ง และทำการ air drug จนแห้ง
- ละลายดีเอ็นเอกลับด้วย DNase-free water 20 µl
- คูณมา 2 µl mix กับ dH₂O 2 µl
- ตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ข)

หลังจากนั้นตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI

หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอและขนาดของพลาสมิดที่ได้ กับดีเอ็นเอมาตรฐานโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

การตัดชิ้น DNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

- เติมสารต่อไปนี้ลงใน Eppendorf tube

buffer Tango 2 µl

*Xba*I 0.5 µl

*Bam*HI 0.5 µl

RNase 0.5 µl

template	3 μ l
dH ₂ O	13.5 μ l
Totol	20 μ l

- จากนั้นไปปั่น ที่ตู้ 37 °C ข้ามคืน
- ทำการตรวจสอบโดยวิธี Electrophoresis

3.2.12 วิธีการสกัดพลาสมิด ด้วยชุดคิด

- นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ 1.5 ml ใส่ลงในหลอด micro centrifuge
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm 1 นาที
- ทำการเหวี่ยงใสทิ้ง

Resuspension

- เติม PD₁ 200 μ l จากนั้นนำไป vortex

Lysis

- เติม PD₂ 200 μ l และทำการ mix เบาๆ ห้ามนำไป vortex (เพราะจะทำให้ genomic DNA

เกิด

การชักขาด) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

Neutralization

- เติม PD₃ 200 μ l ทำการผสมทันทีโดยการพลิกเบาๆ ไปมา 10 ครั้ง โดยห้าม vortex

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm 2 นาที

DNA Binding

- ดูดส่วนใสที่ได้ใส่คอลัมน์
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm 30 วินาที
- ทิ้งส่วนใสด้านล่าง PD column ทิ้ง

Wash

- เติม W₁ buffer 400 μ l ลงใน PD column
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm 30 วินาที
- ทิ้งส่วนใสด้านล่าง PD column ทิ้ง

- เติม Wash Buffer 600 μ l ลงใน PD column
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm 30 วินาที
- ทิ้งส่วนใสด้านล่าง PD column ทิ้ง
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm 3 นาที เพื่อทำการ dry

DNA Elution

- นำส่วนบนของ PD column ทอดออกจากส่วนล่าง จากนั้นนำหลอด 1.5 micro centrifuge มาใส่แทน
- เติม Elution Buffer 35 μ l ตรงบริเวณกลาง membrane ซึ่งห้ามโดนบริเวณ membrane
- ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm 2 นาที
- จะได้ส่วนใสหรือพลาสมิดในหลอด micro centrifuge จากนั้นก็นำไปตรวจสอบโดย Electrophoresis

3.2.13 การอ่านลำดับเบสและการวิเคราะห์ผล

ดีเอ็นเอสายผสมของแบคทีเรียจะถูกส่งไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia) และนำผลนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA กับฐานข้อมูล GenBank

3.2.14 การวัดการทำงานของเอนไซม์โดยหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Miller (1959) ทำการเลี้ยงเชื้อโดยการ

- 100 μ l ลง ในหลอดทดลองที่มีอาหาร CMC broth
3 ml
- บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะแบบเขย่า (ภาชนะ, 2535)
- นำมาเก็บเอนไซม์โดยนำมามั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ
ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ทำการดูดส่วน ใส หรือ crude enzyme ที่เก็บได้ไปวัดการทำงานของ โดยเตรียม
ชุดทดลอง 2 ชุดคือ

- หลอดที่มี CMC 1% ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ง) และ 0.05 citrate buffer pH 4.8 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (substrate control : SC)
- หลอดที่มี crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร และ CMC 1 % ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (enzyme substrate ; ES)
- เติม DNS reagent (ภาคผนวก ง) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากหลอด ด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer เปรียบกับ blank

ผลการวิจัย

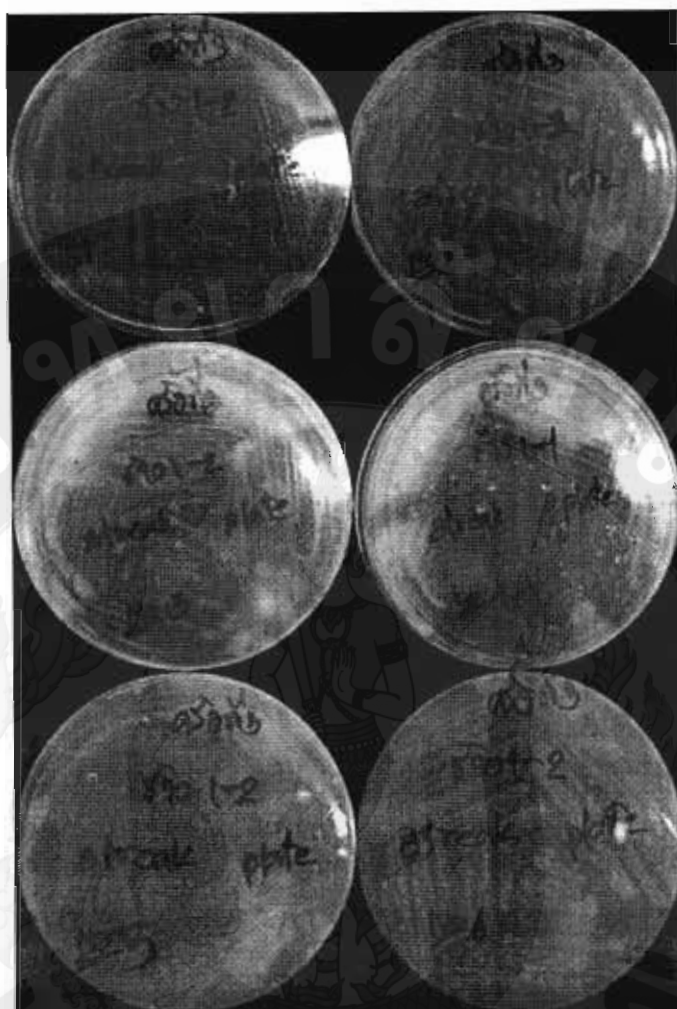
5.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากมูลสัตว์ 4 ชนิด ที่เจริญ CMC agar

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากมูลสัตว์ 4 ชนิด ได้แก่ ช้าง ม้า แพะ และ โคอาลา ตัวอย่างละ 0.5 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 4.5 ml เพื่อให้ได้ความเจือจางเป็น 10^{-1} เท่า ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำสารละลายไปเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอาหาร CMC (carboxymethyl cellulose เป็นสับสเตรท) ด้วยวิธี spread plate เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 1 วัน พบแบคทีเรียที่เป็นโคโลนี ของ ทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยวิธี streak plate พบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ดังนี้ มูลช้างพบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 16 ไอโซเลท มูลม้าพบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 8 ไอโซเลท มูลแพะพบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 12 ไอโซเลท และ มูลโคอาลาพบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 4 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 40 ไอโซเลท และพบว่าทุกๆ ไอโซเลทของทุกตัวอย่างสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนในอุณหภูมิ 37°C

เมื่อแยกแบคทีเรียได้เป็นโคโลนีเดี่ยวพบลักษณะดังต่อไปนี้

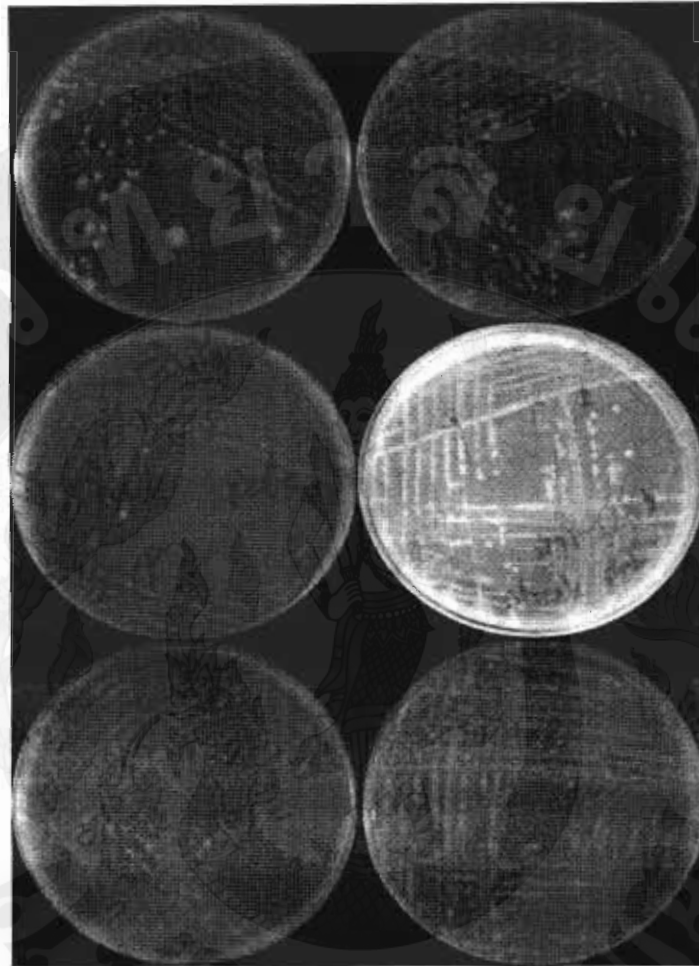
โคโลนีทั้ง 16 ไอโซเลท ของมุลข้าง





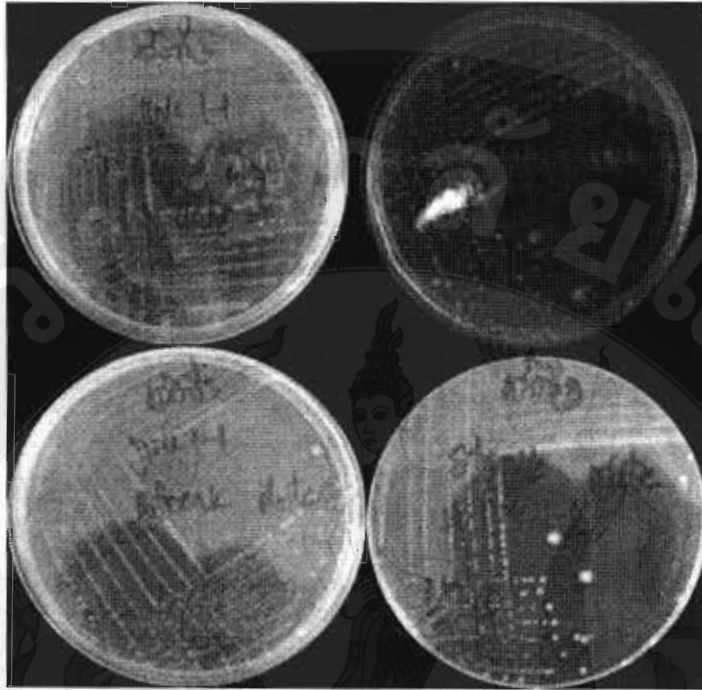
ภาพที่ 10: ลักษณะแต่ละไอโซเลทเมื่อทำเป็นโคโลนีเดี่ยว โดยวิธี Streak plate โดยเรียงจากไอโซเลท
ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 และ 16 ตามลำดับของมุล ช้าง

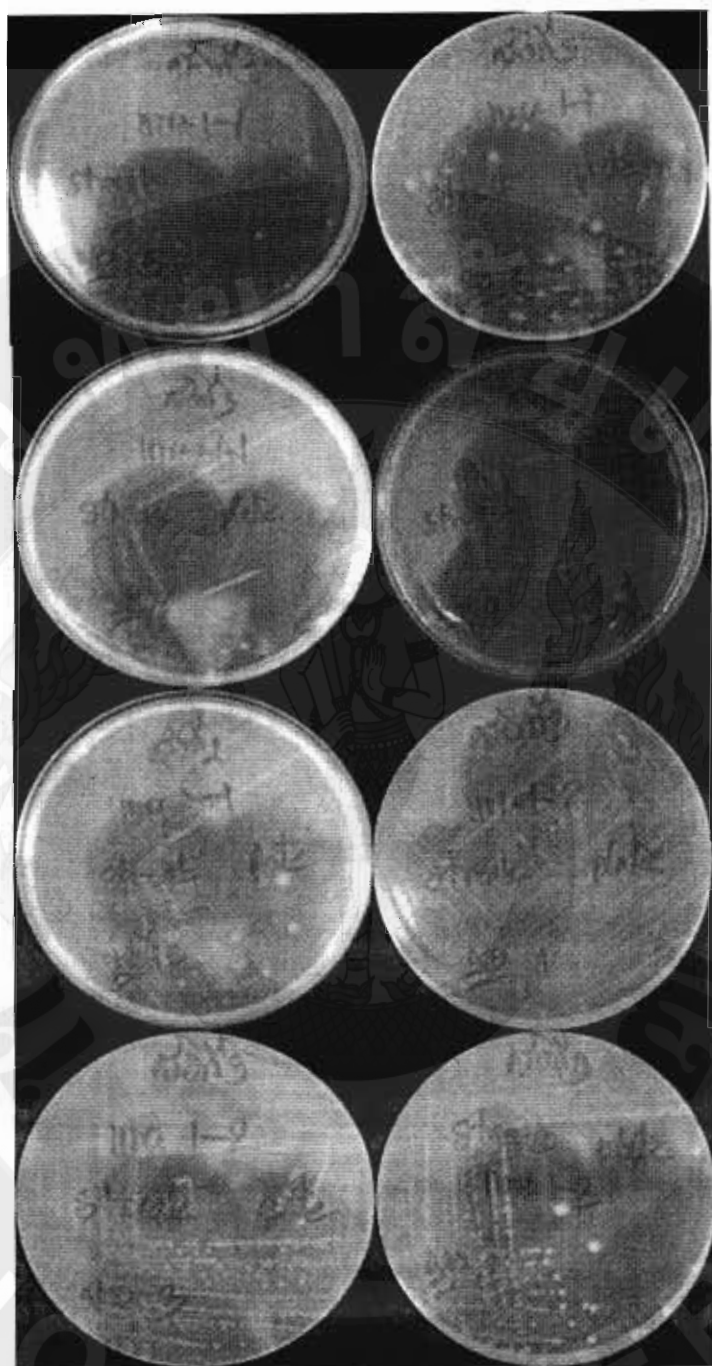
โคโลนีทั้ง 7 ไอโซเลท ของมูลม้า



ภาพที่ 11: ลักษณะแต่ละไอโซเลทเมื่อทำเป็นโคโลนีเดี่ยว โดยวิธี Streak plate โดยเรียงจากไอโซเลท
ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ตามลำดับของมูล ม้า

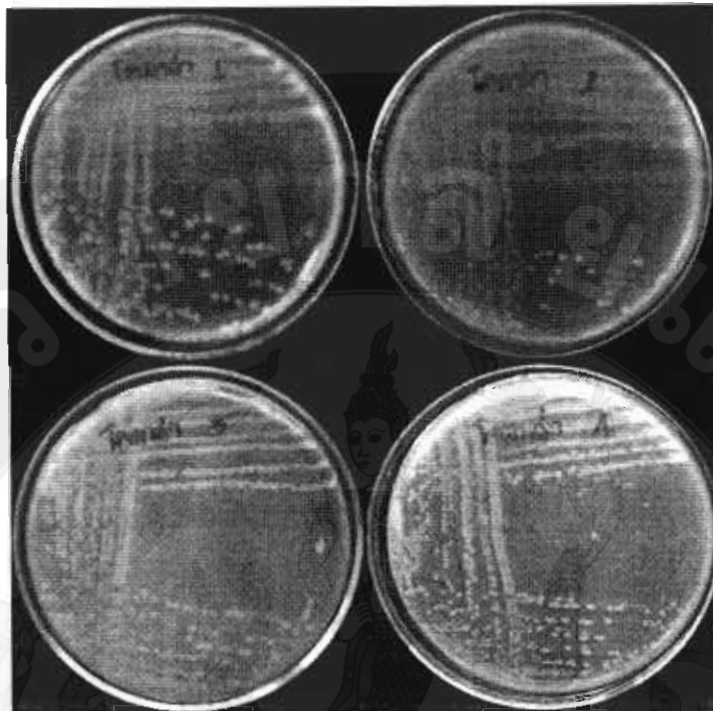
โคลนนิ่ง 12 ไอโซเลต ของมูลแพะ





ภาพที่ 12: ลักษณะแต่ละไอโซเลทเมื่อทำเป็นโคโลนีเดี่ยว โดยวิธี Streak plate โดยเรียงจากไอโซเลท
ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 และ 16 ตามลำดับของมูลแพะ

โคโลนีทั้ง 4 ไอโซเลท ของมูลโคอาลา



ภาพที่ 13: ลักษณะแต่ละไอโซเลทเมื่อทำเป็นโคโลนีเดี่ยว โดยวิธี Streak plate โดยเรียงจากไอโซเลทที่ 1, 2, 3, และ 4, ตามลำดับของมูล โคอาลา

5.2 การทดสอบการย่อยเซลลูโลสของแต่ละไอโซเลท โดยวิธีการspot plate

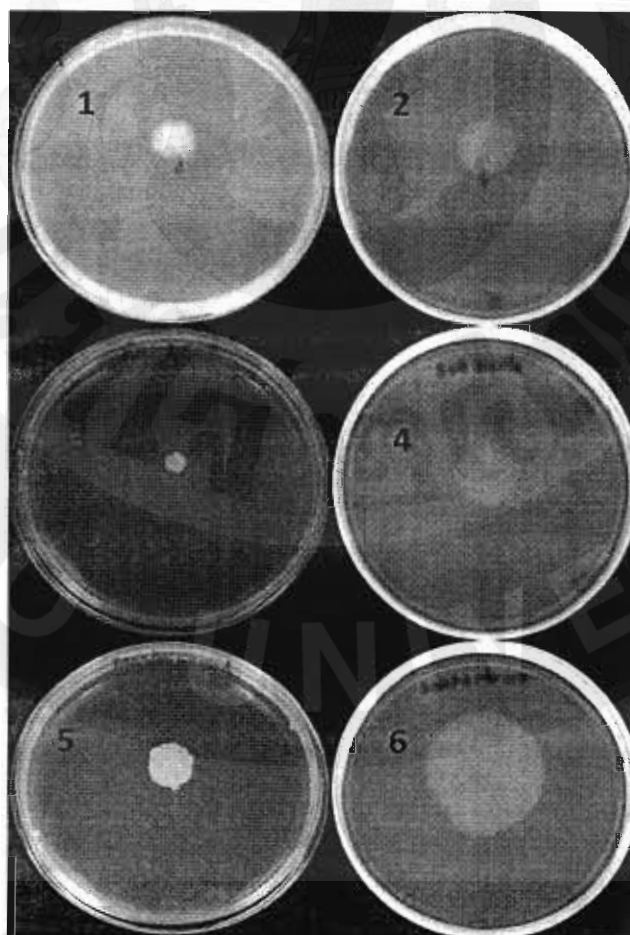
เมื่อนำโคโลนีเดี่ยวแต่ละไอโซเลทของมูลสัตว์ ทั้ง 4 ชนิด มาทำการ spot plate บนอาหาร CMC agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย Congo red เพื่อทำการย้อม หลังจากนั้นล้าง Congo red ด้วย NaCl 1 M สังเกตการเกิดวงใส ทั้ง 40 ไอโซเลท วัดขนาดความกว้างของวงใส(d_0) โดยคำนวณจากผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (d_1) และรอบรอยเจริญของเชื้อ (d_2) จากนั้นทำการคัดแยกไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส ได้มากที่สุด โดยดูค่าเฉลี่ยของการเกิดวงใส ทำการคัดเลือก 3 ไอโซเลทดังนี้ ไอโซเลทที่ 16 ของช้าง ไอโซเลทที่ 2 ของ ม้า และ ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา

ตารางที่ 4 : ผลทดสอบการย่อยเซลลูโลสของแต่ละไอโซเลท โดยวิธีการ spot plate

ชนิด	isolate	24 ชั่วโมง (d_t/d_0) (cm)	d_x (cm)
ข้าง	1	0.4/0.4	1
ข้าง	2	0.5/0.3	1.6
ข้าง	3	0.2/0.1	2
ข้าง	4	0.7/0.2	3.5**
ข้าง	5	0.4/0.3	1.3
ข้าง	6	0.1/0.2	0.5
ข้าง	7	0.3/0.4	0.75
ข้าง	8	0.4/0.3	1.3
ข้าง	9	0.1/0.1	1
ข้าง	10	0.4/0.4	1
ข้าง	11	0.1/0.3	0.3
ข้าง	12	0.5/0.5	1
ข้าง	13	0.6/0.6	1
ข้าง	14	0.6/0.6	1
ข้าง	15	0.1/0.1	1
ชนิด	isolate	24 ชั่วโมง (d_t/d_0) (cm)	d_x (cm)
ข้าง	16	1.0/0.4	2.5
ม้า	1	0.5/0.4	1.25
ม้า	2	1.2/0.4	3
ม้า	3	0.5/0.4	1.25
ม้า	4	2.8/2.0	1.4
ม้า	5	0.5/0.4	1.25
ม้า	6	0.9/0.9	1
ม้า	7	1.5/1.1	1.3
แพะ	2	0.4/.03	1.3
แพะ	3	0.4/0.3	1.3
แพะ	4	0.1/0.2	0.5
แพะ	5	0.1/0.2	0.5

แพะ	6	0.2/0.3	0.6
แพะ	7	0.1/0.7	0.14
แพะ	8	0.2/0.4	0.5
แพะ	9	0.4/0.2	2
แพะ	10	0.5/0.7	0.11
แพะ	11	0.5/0.5	1
แพะ	12	0.1/0.1	1
โคอาล่า	1	0.1/0.1	1
โคอาล่า	2	0.1/0.1	1
โคอาล่า	3	0.2/0.1	2
โคอาล่า	4	2.8/0.8	3.5

หมายเหตุ ** เกิดการตายของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลตที่ 4 ของช้าง



ภาพที่ 14: แสดงผลความสามารถในการย่อยสลายเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลตที่ 4 ของช้าง โดยวิธีการ spot plant

A= ลักษณะโคโลนีในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่มี CMC agar หลังจากการ spot plant ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 B= ลักษณะการเกิดวงใส จากการเททับด้วย Congo red เพื่อทำการย้อม และ ล้าง Congo red ด้วย NaCl 1 M

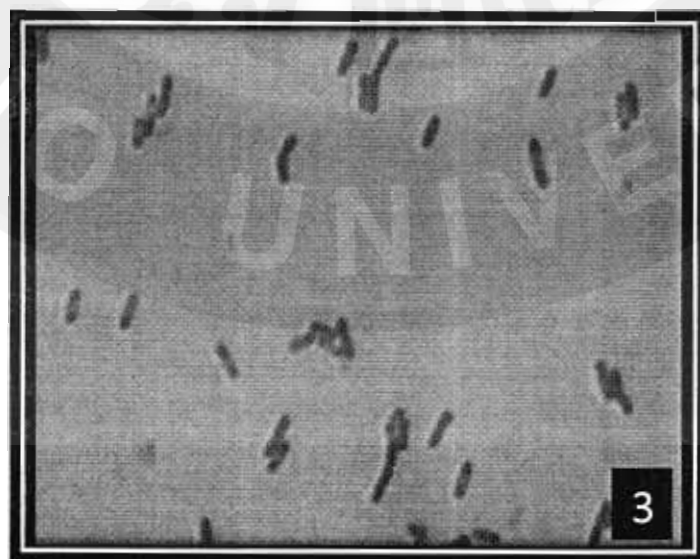
- 1 = โคโลนี ไอโซเลท ที่ 16 ของช้าง 2 = การเกิดวงใส ไอโซเลท ที่ 16 ของช้าง
- 3 =โคโลนี ไอโซเลท ที่ 2 ของม้า 4 = การเกิดวงใส ไอโซเลท ที่ 2 ของม้า
- 5= โคโลนี ไอโซเลท ที่ 4 ของโคอาลา 6= การเกิดวงใส ไอโซเลท ที่ 4 ของโคอาลา

5.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

จากผลการนำไอโซเลท 3 ไอโซเลทที่ได้จากการทดสอบการย่อยเซลลูโลส มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย โดยการเพาะเลี้ยงในขวด slant ที่มีอาหาร CMC agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมสีแกรม ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลัง ขยาย 100 เท่า ดูรูปร่างเซลล์พบลักษณะ ทั้ง 3 ไอโซเลท ดังตาราง

ตารางที่ 5 :ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

แบคทีเรียไอโซเลท	ลักษณะแบคทีเรีย
ไอโซเลทที่ 16 ของช้าง	รูปท่อน สร้างสปอร์ ดิคสีแกรมบวก
ไอโซเลทที่ 2 ของม้า	รูปท่อน สร้างสปอร์ ดิคสีแกรมบวก
ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา	รูปท่อน สร้างสปอร์ ดิคสีแกรมบวก



ภาพที่ 15: สันฐานวิทยาของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท

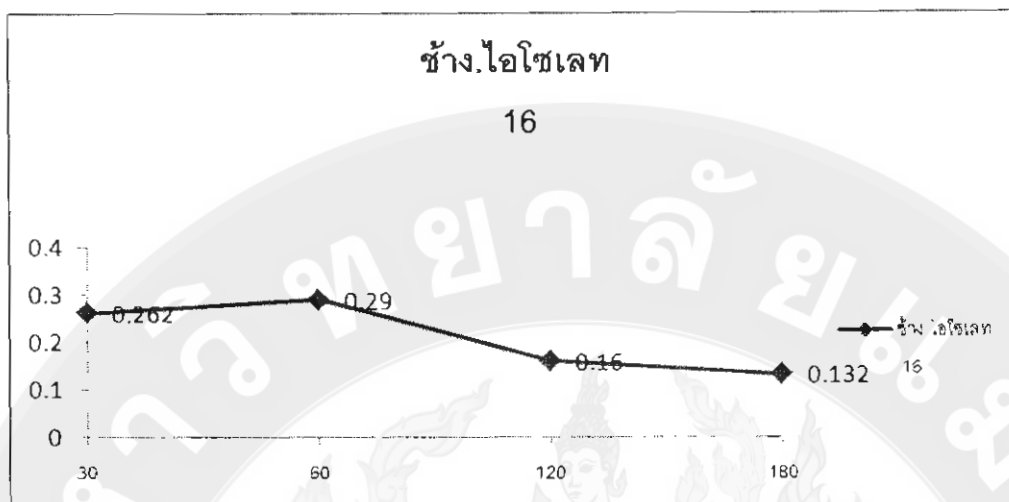
- 1= สันฐานวิทยาของแบคทีเรีย ไอโซเลทที่ 16 ของช้าง รูปท่อน สร้างสปอร์ ดิคซีแกรมบวก
- 2=สันฐานวิทยาของแบคทีเรีย ไอโซเลทที่ 2 ของม้า รูปท่อน สร้างสปอร์ ดิคซีแกรมบวก
- 3=สันฐานวิทยาของแบคทีเรีย ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา รูปท่อน สร้างสปอร์ ดิคซีแกรมบวก

5.4 การทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

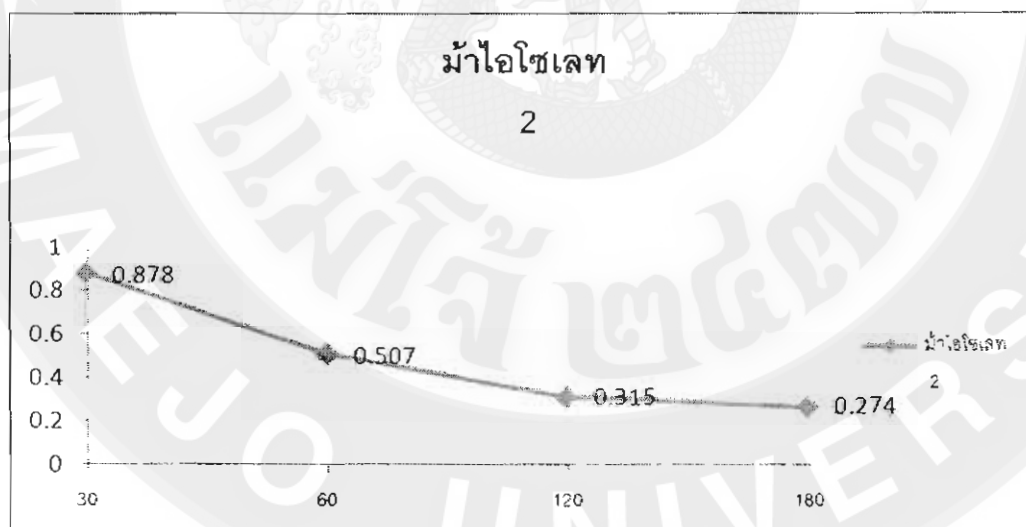
เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลทที่ให้ผลการเกิดวงใสรอบรอยการเจริญของเชื้อ ทั้ง 3 ไอโซเลท ในอาหาร CMC broth ที่อุณหภูมิ 37 °C นำมาตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาลดสลายเซลลูโลสด้วย DNS reagent โดยที่ทำการเลี้ยงที่เวลาต่างๆ คือ 30,60,120 และ 180 นาที พบว่า ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา ให้ผลของ enzyme activity สูงสุดที่ เวลา 30 นาที คือ 186.237 U/ml (ตารางที่)

ตารางที่ 6: ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของแบคทีเรีย จำนวนสามไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงใน CMC broth

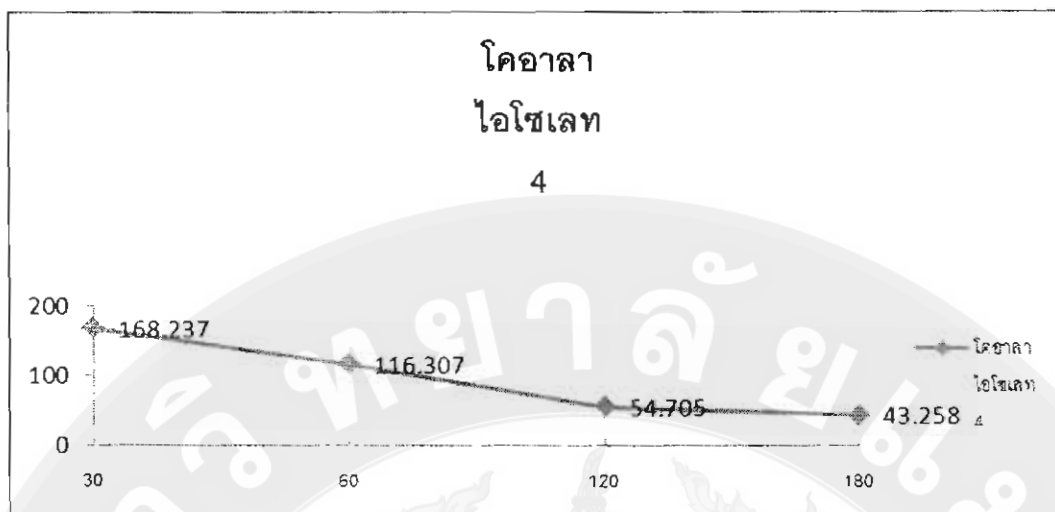
ตัวอย่าง	เวลา (นาที)	ctrl	A ₅₄₀	A ₅₄₀ -ctrl	ค่าX Y=0.2819X+0.0419 (mg/ml)	×dilution	ค่าความเข้มข้นของ น้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	Enzyme activity (U/ml)
ช้าง. ไอโซเลท 16	30	0.039	0.280	0.241	0.706	0.000	0.706	0.262
	60	0.034	0.518	0.484	1.568	0.000	1.568	0.290
	120	0.036	0.564	0.528	1.724	0.000	1.724	0.160
	180	0.046	0.691	0.645	2.139	0.000	2.139	0.132
ม้า ไอโซเลท 2	30	0.039	0.749	0.710	2.370	0.000	2.370	0.878
	60	0.034	0.847	0.813	2.735	0.000	2.735	0.507
	120	0.036	1.036	1.000	3.399	0.000	3.399	0.315
	180	0.046	1.339	1.293	4.438	0.000	4.438	0.274
โคอาลา ไอโซเลท 4	30	0.039	0.337	0.298	0.908	500 เท่า	454.239	168.237
	60	0.034	0.430	0.396	1.256	500 เท่า	628.060	116.307
	120	0.036	0.411	0.375	1.182	500 เท่า	590.812	54.705
	180	0.046	0.483	0.437	1.402	500 เท่า	700.780	43.258



ภาพที่ 16: ค่า enzyme activity ของไอโซเลทที่ 16 ของช้าง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ อุณหภูมิ 37 °C ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน



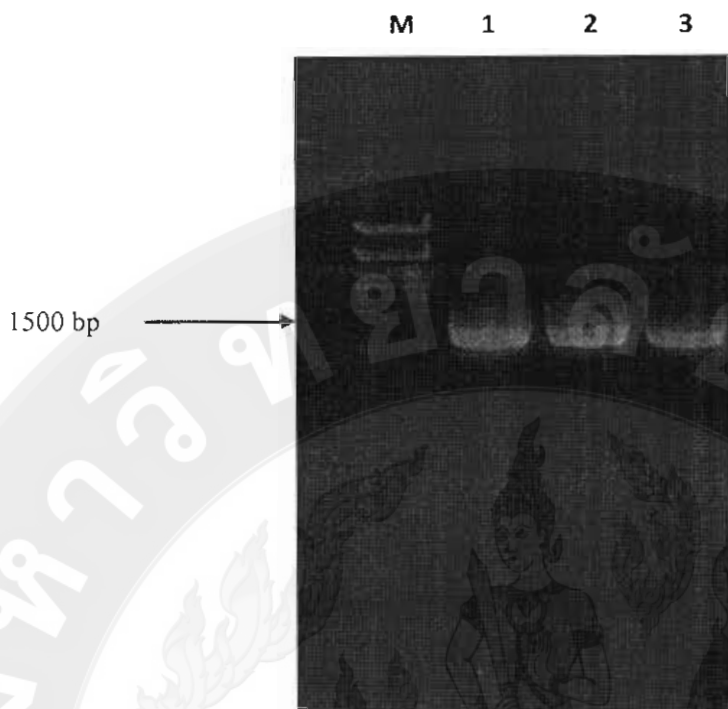
ภาพที่ 17: ค่า enzyme activity ของไอโซเลทที่ 2 ของม้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ อุณหภูมิ 37 °C ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 18: ค่า enzyme activity ของไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ อุณหภูมิ 37 °C ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน

5.5 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ที่ 20 เมื่อนำจีโนมของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงมาทำการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ F-R โดยไพรเมอร์ที่ใช้ specific มีลำดับเบสสำหรับใช้ตรวจสอบ 16S rDNA ของ *Bacillus spp* ตามงานวิจัยของ Weisburg *et al.* (1991) จากบริษัท Operon, America คือ 27F AGAGTTTGATCCTGGTCAG และ 1492 R GGTTACCTTGTTACGACTT ซึ่งคาดว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของดีเอ็นเอ จีโนม ทั้ง 3 ไอโซเลท มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 คู่เบสเป็นแถบ ดีเอ็นเอหลัก ดังแสดงใน ภาพ



ภาพที่ 19: แสดงผลผลิต PCR ได้จาก primer 27F และ 1492R โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) แยกขนาด PCR product โดยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

- M = DNA marker แสดงแถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน ซึ่งเตรียมจากการตัด λ DNA ด้วย *HindIII*
- 1 = ไอโซเลทที่ 16 ของ ช้าง
- 2 = ไอโซเลทที่ 2 ของ ม้า
- 3 = ไอโซเลทที่ 4 ของ โคอาลา

5.6 ผลการส่งถ่ายยีนและการตรวจสอบโคลนที่ได้

เมื่อทำการแยกเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล แล้วนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pTZ57R/T จากนั้นส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ที่มีสภาพเป็นคอมพลีเมนเซลล์โดยวิธี electroporation ตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยการเลือกโคลนจากการแสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลง ในลักษณะการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และเปลี่ยนสีของโคโลนีจากการย่อยสับสเตรท X-Gal หรือ Blue-White screening นำโคลนที่คัดเลือกได้มาทำการสกัดพลาสมิด หลังจากนั้นตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI* กับ *BamHI* และนำมาวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอและขนาดของพลาสมิดที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยให้ผล ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 20: แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่าง 3 ไอโซเลท หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI* กับ *BamHI* เพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

- M = DNA Ladder SM0331
- 1-5 = ชิ้นส่วนดีเอ็นเอและขนาดของพลาสมิด ไอโซเลทที่ 16 ของช้าง
- 6-10 = ชิ้นส่วนดีเอ็นเอและขนาดของพลาสมิด ไอโซเลทที่ 2 ของม้า
- 7-15 = ชิ้นส่วนดีเอ็นเอและขนาดของพลาสมิด ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา

จากผลการทดลอง เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่ามีผลการทดลอง ดังต่อไปนี้ จากการตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI* กับ *BamHI* พบว่าเกิด แถบดีเอ็นเอ ที่ได้มีทั้ง 1 แถบ และ 3 แถบ เกิดขึ้น ซึ่งเหตุที่เกิด 3 แถบ นั้น เกิดจาก แถบที่เป็นขนาดของดีเอ็นเอพาหะ pTZ57R/T คือ 2886 bp และ สองแถบที่ได้ คือ ขนาดของ ดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ ซึ่งมีขนาด 800 และ 700 bp ซึ่งรวมกัน จะได้ขนาด 1500 bp แต่ส่วน ที่ได้ 1 แถบ เกิดจากการที่ตัดไม่สมบูรณ์ หรือไม่มีดีเอ็นเอที่สนใจแทรกอยู่ในเวกเตอร์

5.7 ผลการอ่านลำดับเบสและการวิเคราะห์ผล

จากการนำดีเอ็นเอสายผสมของแบคทีเรียส่งไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia) และนำผลนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA กับฐานข้อมูล GenBank ให้ผลดังนี้

5.7.1 ลำดับเบสของ 16S rDNA ไอโซเลท ที่ 16 ของช้าง

และพบว่าลำดับเบสดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรียในกลุ่มของ สายพันธุ์ต่างๆ คิดเป็น 100% เมื่อเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI (ตาราง) เมื่อใช้โปรแกรม BLASTN เปรียบเทียบ

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGG
ATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAA
GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATT
GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTG
AATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA
GAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG
CCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCTGCGA
GACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGAC
ACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAG
CCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC

ตาราง ที่ 7: ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส ไอโซเลทที่ 16 ของช้าง

Accession	Description	Max ident
AF406633.1	<i>Bacillus sp.</i> CM03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
FJ529033.1	<i>Bacillus sp.</i> S-Js-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%
CP001283.1	<i>Bacillus cereus</i> AH820, complete genome	97%
AE017194.1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987, complete genome	97%
HM362783.1	<i>Bacillus cereus</i> strain YYW-8 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	97%
HM345997.1	<i>Bacillus cereus</i> strain DZ-h 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%
EU573774.1	<i>Bacillus sp.</i> NS3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%

5.7.2 ลำดับส่วนของ 16S rDNA ไอโซเลทที่ 2 ของม้า

และพบว่าลำดับเบสดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรียในกลุ่มของ สายพันธุ์ต่างๆ คิดเป็น 98% เมื่อเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI (ตารางที่ 8) เมื่อใช้โปรแกรม BLASTN เปรียบเทียบ

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAG
AAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG
ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG
AAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTA
ACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGC
GACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA

ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG
TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAG
CATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA
TCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACC
GCAAGGTTTAGCCAATCCCAAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTTCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCG
AAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC

ตารางที่ 8: ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส ไอโซเลทที่ 2 ของม้า

Accession	Description	Max ident
FJ768456.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain S1 16S ribosomal RNA gene,, partial sequence	100%
FJ615523.1	<i>Bacillus</i> sp. 41KBZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
FJ615522.1	<i>Bacillus</i> sp. 41KAZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
EU874254.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain SDB-01 16S ribosomal RNA gene, partial	100%
AB308441.1	<i>Bacillus pumilus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence. strain: TUT1346	100%
EF528287.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain CICCHLJ Q74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
EF197942.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain CICCHLJ Q74 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%

5.7.3 ลำดับเบสของ 16S rDNA ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา

และพบว่าลำดับเบสดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแบคทีเรียในกลุ่มของ สายพันธุ์ต่างๆ คิดเป็น 98% เมื่อเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI

(ตารางที่ 9) เมื่อใช้โปรแกรม BLASTN เปรียบเทียบ

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCC TAATACATGCAAGTCGAGCGGACAG
ATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA
CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAA
AAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAA
TAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAAGA
GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGCGGAAGG
CGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCA
GCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAA
CCGCGAGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT
GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGCCTTGACACAC
CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGC
CGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGAACC

ตาราง ที่ 9: ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา

Accession	Description	Max ident
EU257436.1	<i>Bacillus subtilis</i> isolate C8-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
DQ520955.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain B-FS01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
DQ444283.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain YJ001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
HQ407277.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain H102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
FN869038.1	<i>Bacillus subtilis</i> partial 16S rRNA gene, strain SCUT09	99%
HM372880.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ZDS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
GQ903336.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain dhs-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%

วิจารณ์ผลการวิจัย

6.1 การค้นหาแบคทีเรียจาก มูลช้างม้า , แพะ และ โคอาลา

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในย่อยสลายเซลลูโลส จากมูลสัตว์ 4 ชนิด โดยเหตุที่ว่าสามารถพบเชื้อแบคทีเรียได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในมูลสัตว์ซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะหมักของสัตว์ เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ เพราะอาหารส่วนใหญ่ที่สัตว์ได้รับนั้นเป็นประเภทหญ้า หรือฟางข้าว และ ผัก ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์หรือย่อยสลายเยื่อใยของอาหารเช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน เป็นต้น (Ogimoto and Imai, 1981) จุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมักนี้ต้องสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆได้ และเมื่อสัตว์ได้ขับถ่ายของเสียออกมา แบคทีเรียก็ยังคงไม่สลายไป ดังนั้น การนำตัวอย่างมูลสัตว์ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ มูลช้าง,มูลม้า , มูลแพะ และ มูลโคอาลา มาทำการแยกเชื้อจึงมีโอกาที่จะแยกได้ไอโซเลทที่แตกต่างกันได้มาก และสามารถผลิตเซลลูโลสได้ การแยกเชื้อจะทำบน (carboxymethylcellulose agar ; CMC agar) จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากมูลสัตว์ทั้ง 4 ชนิด ในสภาวะมีออกซิเจนพบว่าแยกเชื้อแบคทีเรียได้ ทั้งหมด 40 ไอโซเลท เมื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยวิธี streak plate แล้ว มูลช้าง พบ 16 ไอโซเลทที่มีลักษณะแตกต่างกัน มูลม้า 8 ไอโซเลทที่มีลักษณะแตกต่างกัน ,มูลแพะ 12 ไอโซเลทที่มีลักษณะแตกต่างกัน และมูลโคอาลาพบ 4 ไอโซเลทที่มีลักษณะแตกต่างกัน การที่มูลสัตว์บางชนิดเมื่อนำมาแยก เชื้อแล้วพบว่า ไม่ค่อยมีเชื้อเกิดขึ้น ซึ่งอาจจะเกิดเนื่องมาจากการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ อาจจะเก็บในช่วงเวลาที่ มูลสัตว์ไม่สด หรือไม่ได้เก็บในช่วงเวลาที่สัตว์ ถ่ายมูลออกมาทันที จึงทำให้เชื้ออาจย่อยสลายหรือตายไป

6.2 การทดสอบการย่อยเซลลูเลสของแต่ละไอโซเลท(Downie *et al.*, 1994)

การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่แยกได้ ทำโดยวิธีการ spot plate บนอาหารแข็งที่มี carboxymethyl cellulose เป็นส่วนประกอบหลักแล้ว สังเกตการเกิดวงใส โดยใช้ congo red เทปซึ่งวิธีนี้ได้รับความนิยมเพราะทำได้สะดวก รวดเร็วและสีย้อมมีความคงทน สามารถอ่านผลได้นาน(Teather and Wood,1982) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียแต่ละชนิดแต่ละชนิดมีความไวต่อวิธีทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ต่างกัน Prasertan *et al.* (1992) ได้ทดลองแยกเชื้อจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มพบว่า F33 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร CMC agar และทำการตรวจสอบ ด้วย congo red test ไม่ให้ผลการเกิดวงใส แต่เมื่อทดสอบในอาหารเหลว โดยการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วย DNS reagent พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท F33 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดดังนั้น การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย congo red test เป็นการตรวจสอบเบื้องต้น ซึ่งต้องมีการตรวจค่าการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อในขั้นต่อไป

ไอโซเลทที่ไม่เกิดวงใส อาจเป็นเพราะสาเหตุต่างๆดังต่อไปนี้

1. แบคทีเรียแต่ละไอโซเลทไม่สร้าง cellulose เพราะสภาวะที่ใช้เลี้ยงไม่เหมาะสม
2. แบคทีเรียที่แยกได้เป็นพวกที่ย่อยสลายเฉพาะสารประกอบอย่างง่าย (simple compounds) เช่น cellobiose หรือ glucoses หรืออาจเป็น bacteria ที่ใช้ end products ที่เกิดจากการย่อยของ bacteria ชนิดอื่นๆ
3. แบคทีเรียที่แยกได้อาจจะใช้ยับยั้งสารอื่นๆในการดำรงชีพ จึงไม่สร้างเซลลูเลสมาย่อยเซลลูโลสในอาหาร หรืออาจจะสร้างเซลลูเลสในรูป ที่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาแล้วได้ตามการทดลองของ Geoffrey and Michael (1989)
4. แบคทีเรียอาจจะต้องการชักนำด้วยยับยั้งสารอื่นๆ ที่เหมาะสมกว่า carboxymethyl cellulose เช่นการใช้ฟางข้าวบดเป็นยับยั้งสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Geoffrey and Michael, 1989) หรือเวลาที่ใช้ ในการชักนำ ให้เกิดการสร้างเซลลูเลส โดยการเลี้ยงในอาหารที่มี ส่วนประกอบของ carboxymethyl cellulose ยังไม่เหมาะสมซึ่งต้องทำการทดลองต่อไปโดยการเปลี่ยนยับยั้งสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเพิ่มเวลาในการชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์นานขึ้น

5. เอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างมีอยู่หลายชนิดหรือมีอยู่ในหลายรูปเช่น CM-cellulase, Azure cellulose, Aryl- β -glucosidase , aaryl- β -xylosidase , xylanase ซึ่งแต่ละชนิดจะเจาะจงกับ ซับสเตรทที่เฉพาะเท่านั้น ซึ่งสารนั้นอาจต้องถูกย่อยมาก่อน

6.3 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วย DNS reagent

เปปซินวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลส ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่ง สารตั้งต้น ที่นิยมใช้ คือ 5-ได-แซ็กคาไรด์ กระดาษกรองเซลลูโลสเป็นสื่อให้กำหนดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยทำการบ่มเอนไซม์กับสารตั้งต้นนี้ที่อุณหภูมิ 37 °C จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท ที่ 4 ของโคอาลา สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นโดย enzyme activity และ คือ 186.237 U/ml ซึ่งการที่จะนำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไป ใช้ได้นั้นควร จะนำไปศึกษาหา สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไปทั้งนี้การผลิต เอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ ขึ้นกับหลายปัจจัยได้แก่ ปริมาณเชื้อ แหะเลอุณหภูมิการมี ตัวชักนำ (inducer) และหรือตัวยับยั้ง (inhibitor) ขนาดของการเพาะเลี้ยงและการให้อากาศ อุณหภูมิเปปซินปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ โดย จุลินทรีย์บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้สูงใน สภาวะอุณหภูมิต่ำ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้สูงในสภาวะอุณหภูมิ สูง จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 ของช้าง ไอโซเลทที่ 2 ของม้าและไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง มี enzyme เท่ากับ 90 U/ml , 0.878 U/ml และ 168.237 U/ml ซึ่งเป็นอุณหภูมิ ที่สามารถเลี้ยงได้ง่าย

6.4 การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรีย

เนื่องจากการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียจากการทดสอบทางชีวเคมีขั้นตอนการทำยุ่งยาก ใช้ เวลามาก นอกจากนั้นผลที่ได้อาจไม่ชัดเจนว่าแบคทีเรียเป็น Species หรือ Strain ได้ผู้ทำการวิจัยจึง เปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงใน Species เดียวกัน (Lewin, 2004) ทำให้บ่งบอกชนิดของแบคทีเรียในระดับ Species หรือ Strain ได้ โดย 16S rDNA เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มยีนที่ถอดรหัสให้ rRNA ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไรโบโซม สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ได้จากงานวิจัยของ Weisburg *et al.* (1991) ซึ่งระบุว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถใช้กับ Eubacteria ส่วนใหญ่ได้ นอกจากนี้ Alejande *et al.*

(2002) ยังนำไปบ่งบอกชนิดของ *Bacillus halodurans* strain MIR32 ด้วย เมื่อทราบลำดับเบส บางส่วนของ 16S rDNA จึงนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ NCBI โดยอาศัย โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) ทำให้ทราบว่าลำดับเบสของไอโซเลทที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในกลุ่มของ *Staphylococcus* sp. 98 % และไอโซเลทที่ 7 มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับลำดับเบสในกลุ่มของ *Bacillus* sp. 93 % ทั้งนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้นั้น ไม่สูงถึง 100% เนื่องจากลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพหาได้นั้นมีเบสที่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น เบสใดแน่นอน (degenerated base) จึงทำให้ผลการเปรียบเทียบที่ได้ไม่ถูกต้อง 100%

จะเห็นได้ว่าการบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัย 16S rDNA ให้ผลชัดเจนและรวดเร็วกว่า การทดสอบทางชีวเคมี นอกจากนี้ยังสามารถบอกได้ถึงระดับ strain ด้วย อย่างไรก็ตามควรหาลำดับเบสซ้ำหลายครั้งเพื่อให้ผลการทดลองน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

หากมีการศึกษางานวิจัยนี้ต่อไปควรศึกษาชนิด และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสให้มากขึ้น โดยอาจมีการแยกให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ และกลไกการทำงานของเอนไซม์ และที่สำคัญต้องศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสให้แน่ชัดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมต่อ

สรุปผลการวิจัย

ผู้ทำการวิจัยได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากมูลสัตว์ 4 ชนิด ด้วย CMC agar พบว่าได้ เชื้อทั้งหมด 40 ไอโซเลทที่แยกได้จากช้าง 16 ไอโซเลท ม้า 8 ไอโซเลท แพะ 12 ไอโซเลท และ โคอา 4 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสบนอาหารแข็งที่มี carboxymethyl cellulose เป็นส่วนประกอบ ปรากฏว่ามีบางไอโซเลทเท่านั้นที่เกิดวงใส จึงทำการเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ทำการเลือก 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทที่ 16 ของช้าง ไอโซเลทที่ 2 ของม้า และ ไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา และเมื่อ ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลสด้วย DNS reagent พบว่า ไอโซเลทที่ 16 ของช้าง ให้ค่า enzyme activity สูง ที่เวลา 60 นาที เท่ากับ 0.290 U/ml ไอโซเลทที่ 2 ของม้า ให้ค่า enzyme activity สูง ที่เวลา 30 นาที เท่ากับ 0.878 U/ml และไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา ให้ค่า enzyme activity สูง ที่เวลา 30 นาที เท่ากับ 168.237 U/ml

ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ 16 ของช้าง มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus* sp. แบคทีเรียไอโซเลท ที่ 2 ของม้ามี่ความคล้ายคลึงกับ *Bacillus pumilus* และแบคทีเรียไอโซเลทที่ 4 ของโคอาลา มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis*.

ในการศึกษาครั้งนี้คงเป็นแนวทางในการค้นพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากมูลสัตว์ แหล่งใหม่ในอนาคตที่สามารถนำไปพัฒนาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- จุฑาธัญ ครุดีกานันท์. 2544. การแยกและ การคัดเลือกแบคทีเรียทนความร้อน ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จิตตเสน อรุณศรี. 2529. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราที่เจริญที่อุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ฉวีวรรณ เปลี. 2530. การปรับปรุงสภาวะ การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Mycelipohthora thermophila* เพื่อให้ได้เซลลูเลสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ชรีดา ปุกहुต จูฑามาส จิตต์เจริญ และอรุณญา พิมพ์มงคล. 2549. การย่อยสลายกลีบข้าวเจ้าโดยวิธีชีวภาพด้วยเชื้อราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้. การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 32 , 10-12 ตุลาคม 2349 , กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย
- นฤมล นะธรรมโม. 2544. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทนร้อน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- บุญทริก ภูมิรา. 2548. การคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิสูงเพื่อการผลิตเอทานอล จาก ปอสา(paper Muberry). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ภัทรา ผาสอนเดชะอภัยคุณนิษก ๒ นิภาสุนทรกุลคินเลข ๒ คู และกนกรัตน์ะกนกขั๕51.การคัดแยกแบคทีเรียชอบร ๒ ่อนที่เจริญในสภาวะไม ๒ ัด ๒ ้องการอากาศเพื่อผลิตน้ำตาลจากเหลือทิ้งทางการเกษตร. คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ๒ ารนบุรี. กรุงเทพมหานคร.

ยุพดี ชัยสุขสันต์ ๒๕๒๗. เอนไซม์ ๒ เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma viridae* สายพันธุ์ ๒
TISTR 3161. วิทยานิพนธ์ ๒ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ๒.

ระพีพรรณ อินปัฐนันท์ แก้ว. ๒๕๓๖. แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและการผลิต
เซลลูเลส. วิทยานิพนธ์ ๒ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ๒. เชียงใหม่ ๒

Ali, S., Sayed, A., Sarker, T.I. and Alam, R. 1991 Factors affecting cellulase production
by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. *World Journal of Microbiology*
and *Biotechnology*. 43:518-520

Barron, N., Marchant, R., Mchale, L. and Mchale, A. P. 1995. Studies on the use of
a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous
saccharification and ethanol formation from cellulose. *Applied*
Microbiology and Biotechnology. 43:518-520.

Desai, J.D., Desai, A. J. and Patel, N. P. 1988. Production of cellulase and β -
glucosidase by shake culture of *Scytalidium lignicola*. *Journal of*
Fermentation Technology. 60(2):117-124.

Fungsin, B., Suttikul, S., Akaracharany, A. and Srinorakutara, T. 2008. Conversion of
cassava waste into sugar using *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*
for ethanol production. Poster of Fourth Biomass-Asia Workshop. November
20-23. Selangor Darul Ehsan, Malaysia.

Grajek, W. 1987. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic
fungi in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology*
and *Biotechnology*. 26:126-129.

Haq, K., Shahzadi, K., Hameed, U., Javed, M. M. and Qadeer, M. A. 2006. Solid-state
fermentation of cellulase by locally isolated *Trichoderma harzianum* for the
exploitation of agriculture by-products. *Pakistan Journal of Biological*
Sciences. 9(9):1779-1782

- Horikoshi, H., Nakao, M., Kuruno, Y. and Sashihara, N. 1984. Cellulase of and alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 30:774-779.
- Immanuel, G., Bhagavath, C. M. A., Raj, P. I., Esakkiraj, P. and Palavesam, A. 2007. Production and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* fermented in coir waste and sawdust. *The Internet Journal of Microbiology*. 3(1):1-12.
- Kalra, M. K. and Sandhu, D. K. 2004. Optimal production of cellulolytic enzymes and their location in *Trichoderma pseudokinigii*. *Biotechnology and Bioengineering*. 27(10):1445-1450.
- Kathiresan, K. and Manivannan, S. 2006. Cellulase production by *Penicillium fellutanum* isolated from costal mangrove rhizosphere soil. *Research Journal of Microbiology*. 1(5):438-442.
- Keskar, S. S. 1992. Cellulase production by *Penicillium janthinellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8:534-535.
- Lee, Y. J., Kim, B. K., Lee, B. H., Jo, K. I. and Lee, N. K. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*. 99:378-386.
- Lee, B. H. and Blackburn, T. H. 1974. Cellulase production by thermophilic *Clostridium* species. *Applied Microbiology*. 30(3):346-353.
- Liu, J. and Yang, J. 2006. Cellulase producing by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry. *Food Technology and Biotechnology*. 45(4):420-425.
- Mandels, M. 1977. Laboratory procedures in growth, enzyme measurement and related analytical procedure. Unpublished papers, International Course-Cum-symposium.

- Milala, M. A., Shugaba, A., Gudado, A., Ene, A. C. and Wafar, J. A. 2005. Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agriculture and Biological Sciences* . 1(4):325-328.
- Moussa, T. A. A. and Tharwat, N. A. 2007. Optimization of cellulase and β -glucosidase induction by sugarbeet pathogen *Sclerotium rolfsii*. *African Journal of Biotechnology*. 6(8): 1048-1054.
- Narasimha, G., Sridevi, A., Buddolla, V., Subhosh, C. M. and Rajasekhar, R. B. 2005. Nutrient effects on production of cellulolytic enzyme by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*. 5(5):472-476.
- Oikawa, T., Takagi, M. and Ameyama, M. 1994. Detection of carboxymethyl cellulase activity in *Acetobacter xylinum* KU-1. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 58(11):2102-2103.
- Pothiraj, C., Balaji, P. and Eyini, M. 2006. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. *African Journal of Biotechnology*. 5(20):1882-1885.
- Ray, A. K., Bairagi, A., Sarkar ghosh, K. and Sen, S. K. 2007. Optimization of fermentation condition for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica ET Piscatoria*. 37(1):47-53.
- Singh, N. and Künene, I. S. 1980. Cellulose decomposition by four isolates of *Pyricularia oryzae*. *Mycologia*. 72:182-190.
- Stutzenberger, F. J. 1971. Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. *Applied Microbiology*.