

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

จุลินทรีย์มีบทบาทต่อสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศ โดยจุลินทรีย์ทำหน้าที่ในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ ซากพืชและซากสัตว์ อีกทั้งจุลินทรีย์ยังเป็นแหล่งที่ผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรม เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มาก และมีการเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์หลายชนิดมาใช้เพื่อช่วยในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมบางชนิด เช่น เอนไซม์เซลลูเลส นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก โดยเอนไซม์จะช่วยย่อยสลายโครงสร้างของเซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส เอนไซม์เพคตินเนสสามารถย่อยสลายโมเลกุลของเพคตินที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารพอลิเมอร์ ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้และการผลิตไวน์ เอนไซม์ไซลานเนส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารจำพวกไซเลน มีการนำไซลานเนสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และนอกจากนี้มีการคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งอื่นๆที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ เช่น จากดิน กระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง น้ำพุร้อน ทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ และจากระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนหนอนชนิดต่างๆ โดยการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส จากระบบทางเดินอาหารของหนอนชนิดต่างๆ เนื่องจากหนอนเป็นสัตว์ที่กินใบไม้และส่วนประกอบของพืชเป็นอาหาร ซึ่งโครงสร้างของพืชนั้นจะประกอบด้วยส่วนประกอบของเซลลูโลส ไซเลน อะไมโลส และเพคติน โดยที่ส่วนประกอบดังกล่าวส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ของพืช จึงเป็นสมมติฐานได้ว่าในระบบทางเดินอาหารของหนอนที่นำมาศึกษา อาจมีจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสี่ชนิด ซึ่งช่วยย่อยสลายโครงสร้างของพืชได้ โดยทำการแยกและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส ได้ จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีทางอนุชีวโมเลกุล และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ทั้งนี้หากสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้น ก็จะสามารถนำไปพัฒนาและวิจัยต่อยอดจนสามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้ในอนาคต ตลอดจนช่วยให้ประเทศสามารถลดต้นทุนการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศได้

## 1.2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคติเนสจากหนอนชนิดต่างๆ
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่แยกได้จากเชื้อแบคทีเรียจากหนอนชนิดต่างๆ
3. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene sequencing

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคติเนสจากหนอนชนิดต่างๆ ได้

## 1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

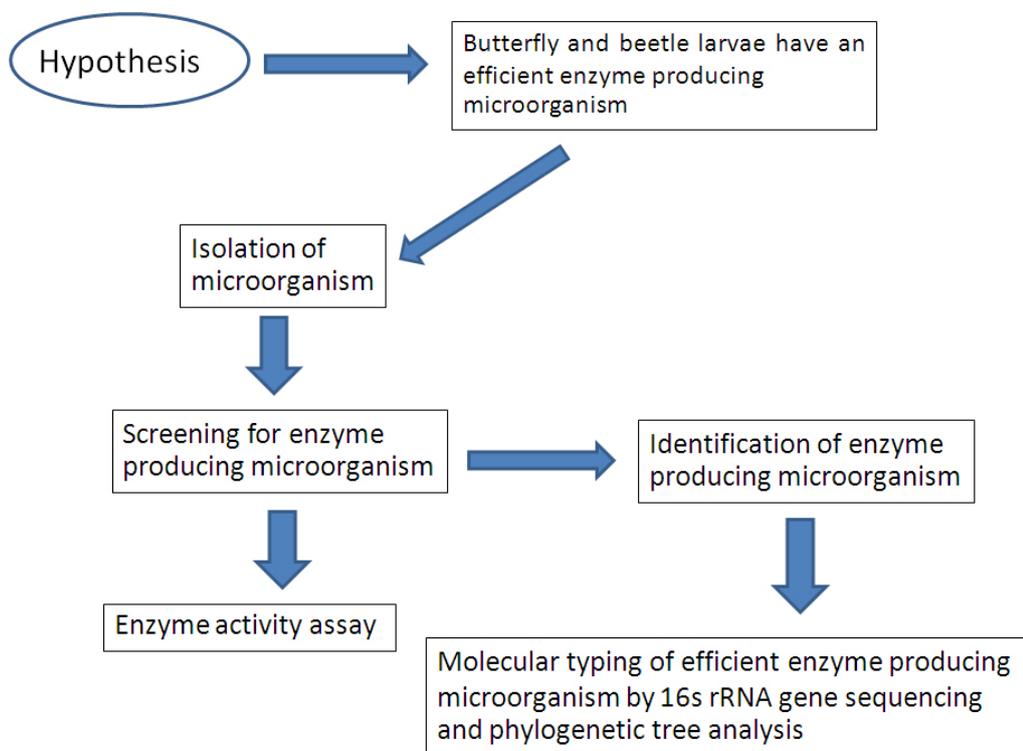
ขอบเขตของงานวิจัยในครั้งนี้ ทำการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนหนอน และด้วงชนิดต่างๆ บนต้นพืชที่ปลูกบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ และหนอนที่จำหน่ายในพื้นที่ใกล้เคียงอำเภอป่าพะยอม จังหวัด พัทลุง จากนั้นคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิคการเจือจางเป็นลำดับ (Serial dilution) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Plate Count Agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน นำไป subculture อีกครั้งบนอาหาร TSA (Tryptic soy agar) จากนั้นทำการย้อมสีแกรม เพื่อคุณลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรีย และเพื่อจำแนกเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อชนิดใด แล้วนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด โดยการวัดขนาดวงใส (clear zone) และทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด (enzyme activity) แล้วจึงนำแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด มาจำแนกด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ PCR ต่อบริเวณ 16S rRNA gene แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gene Bank และทำ alignment โดยโปรแกรม MEGA 5

## 1.5 สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดงานวิจัย

หนอนผีเสื้อ และหนอนด้วง เป็นแมลงที่กินพืชและส่วนของพืชเป็นอาหาร ซึ่งเราจะพบว่าในส่วนประกอบหลัก ๆ ที่สำคัญในเซลล์ของพืชคือ เซลลูโลส ไชเลน เพคติเนส และแป้ง สารบางอย่างเป็นสารที่ย่อยได้ยาก แต่ตัวอ่อนของแมลงดังกล่าว ก็สามารถย่อยและใช้ประโยชน์จากสารเหล่านั้นได้เป็นอย่างดี และหากได้มีการพิจารณาถึงลักษณะทางกายวิภาคของตัวหนอนแล้ว

จะพบว่าระบบทางเดินอาหารของสัตว์กลุ่มดังกล่าวสั้นมาก เมื่อเปรียบเทียบกับระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร เช่นสัตว์เคี้ยวเอื้อง ประสิทธิภาพในการย่อยส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืชในตัวหนอนนี้น่าจะมีประสิทธิภาพที่สูง ทำให้คณะผู้วิจัยมีข้อสมมุติฐานที่อาจจะเป็นไปได้อยู่ 2 ประการ คือ

1. ระบบย่อยอาหารของตัวอ่อนของหนอนผีเสื้ออาจจะสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืช
  2. ในระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนหนอนผีเสื้ออาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์ บางชนิดที่มีประสิทธิภาพในสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยส่วนประกอบของพืชได้เป็นอย่างดี
- โดยในเบื้องต้นผู้วิจัยให้ความสนใจในประเด็นเรื่องของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถตรวจและวิเคราะห์ได้สะดวกกว่า และการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ก็สามารถทำได้ง่ายกว่า ดังนั้นเบื้องต้นคณะผู้วิจัยจะศึกษาเพื่อสำรวจและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนหนอนผีเสื้อและหนอนด้วงชนิดต่างๆ และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ เซลลูเลส ไชทานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส โดยกรอบแนวคิดงานวิจัยแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

## 1.6 แผนการดำเนินงานวิจัย

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย 1 ปี

แผนการดำเนินงาน	เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. เก็บตัวอย่างของ หนอนและ ตัวหนอน ด้วง	←————→											
2. แยกเชื้อและทำการ ทดสอบการสร้าง เอนไซม์	←————→											
3. ทดสอบประสิทธิภาพ ของ เอนไซม์			←————→									
4. จำแนกเชื้อ ด้วย คุณสมบัติทางชีวเคมี						←————→						
5. จำแนกเชื้อโดยการทำให้ 16s rRNA gene sequencing							←————→					
6.วิเคราะห์ผล และทำ phylogenetic tree									←————→			
7. สรุปผลและจัดทำ รายงานการศึกษา										←————→		

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ข้อมูลทั่วไปของด้วงและหนอน

##### 2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของด้วงมะพร้าว

ด้วงมะพร้าว (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) เป็นแมลงศัตรูพืชที่พบได้ในต้นมะพร้าว ต้นลานและต้นสาเก ในระยะตัวหนอนจะกัดกินภายในต้นเป็นโพรงโดยจะกินส่วนที่อ่อนและอวบน้ำ ตัวอ่อนจะกัดกินผ่านก้านใบเข้าสู่ลำต้นเป็นระยะทางยาวโดยตัวอ่อนด้วงมะพร้าวจะกัดกินและเจริญเติบโตได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว (ภาพที่ 2) โครงสร้างของต้นพืชที่ตัวอ่อนกินนั้นประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ไซแลน และสารหนึ่งที่เป็นส่วนสำคัญของผนังเซลล์ของพืช สารประกอบเพคติน (pectin substances) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่พบได้ในส่วน middle lamella ของผนังเซลล์ของเซลล์ของพืชที่มีอายุยังน้อยและเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อพารานไคมา (parenchyma tissue) โดยจะพบมากในเนื้อเยื่อที่มีการขยายขนาดของเซลล์ (Harholt, et al., 2010; Mohnen, 2008) นอกจากนี้โครงสร้างของเพคตินเป็นโครงสร้างที่ย่อยสลายได้ยาก ร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย จึงต้องอาศัยเอนไซม์เข้าช่วยในการย่อยสลายโครงสร้างดังกล่าว ซึ่งก็คือเอนไซม์เพคตินเนส จากการศึกษาวงจรชีวิตตัวอ่อนด้วงมะพร้าวพบว่าจะกินส่วนประกอบของต้นพืชและใช้ประโยชน์ในสารอาหารดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้มีข้อสมมุติฐานประการหนึ่งคือ ภายในระบบย่อยอาหารของหนอนอาจจะมีจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เพคตินเนสที่ช่วยย่อยสลายโครงสร้างของเพคตินได้



ภาพที่ 2 ด้วงมะพร้าว

##### 2.1.2 ลักษณะทั่วไปของหนอนนก

หนอนนกมีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรปแถบประเทศที่มีอากาศหนาวหรือมีความหนาวเย็น หนอนนกเป็นแมลงที่ชอบกินของเน่าเสีย โดยเฉพาะเมล็ดพืชหรือแป้งที่สกปรกและมีเชื้อราขึ้น

นอกจากนี้ยังชอบกินขนมปัง รำ เศษเนื้อ ขนนกและซากแมลง เป็นต้น โดยชอบอาศัยอยู่บริเวณที่ อับชื้นและมีด (Evans, 1983)

กรมป่าไม้ได้นำเข้าหนอนนกจากต่างประเทศเพื่อเพาะพันธุ์และนำมาเลี้ยงนกและสัตว์จึง นิยมเรียกกันโดยทั่วไปว่าหนอนนกหรือหนอนเลี้ยงนก หนอนนกเป็นตัวอ่อนของแมลงปีกแข็งที่มี ชื่อว่า Meal-Beetle มีขนาดลำตัวกว้างประมาณ 6 มิลลิเมตร 16-17 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4) ซึ่งแมลง ชนิดนี้เป็นศัตรูข้าวสาลีที่ปลุกในเขตอบอุ่นและในเขตหนาว แถบทวีปยุโรป หนอนนกในวัยอ่อน หรือเป็นหนอนจะมีช่วงที่ยาวนานก่อนที่จะเข้าสู่ดักแด้ ซึ่งช่วงที่เป็นหนอนจะทำลายข้าวสาลีอย่าง รวดเร็วโดยหนอนนกในวัยนี้สามารถนำมาทำเป็นอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงทั่วไปหรือปลา สวยงามได้ (อานนท์, 2547) โดยธรรมชาติแล้วตัวเต็มวัยของหนอนนกจะกินซากเน่าเปื่อยของใบไม้ กิ่งไม้ หญ้า เป็นครั้งคราวเพื่อการเจริญเติบโต

### 1) วงจรชีวิตของหนอนนก

วงจรชีวิตของหนอนนกแบ่งออกเป็น 4 ระยะ (ภาพที่ 3) ดังนี้

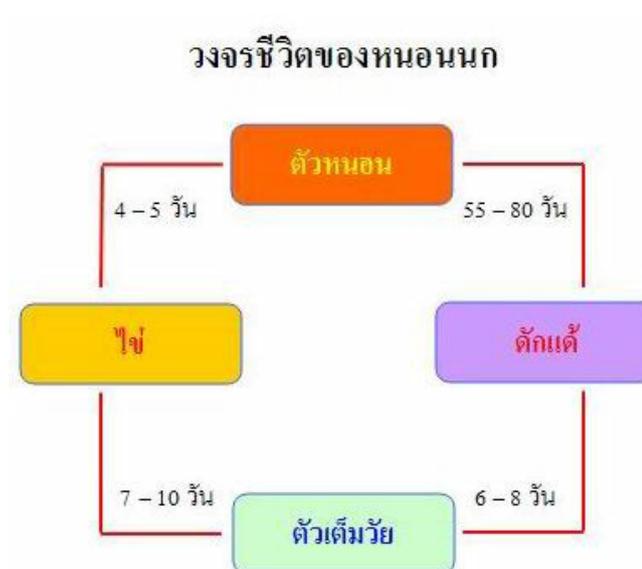
1.1) ระยะที่เป็นไข่ (Egg) ไข่ของหนอนนกจะมีลักษณะเป็นสีขาวค่อนข้างยาว มีสี ขาวนวล ผิวเป็นมันมีรูปร่างรี ขนาดลำตัวกว้างประมาณ 0.8-1.8 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1.5-2.0 มิลลิเมตร ระยะจากไข่ไปเป็นตัวหนอนใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน และระยะไข่จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ถ้าเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงอากาศร้อน ไข่จะฟักเป็นตัวเร็ว แต่ถ้าที่อุณหภูมิต่ำไข่จะฟักออกมาเป็นตัวช้า

1.2) ระยะตัวหนอน (Larvae) ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อนมีปล้อง 9 ปล้อง ปล้องสุดท้ายมี ขนาดเล็กสุด ลำตัวพอมยาวและมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ระยะนี้ลำตัวจะยาวมาก หลังจากฟัก ตัวออกมาจากไข่ใหม่ๆตัวจะมีสีขาว ขนาดเท่ากับเส้นด้าย ยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ขาสั้น จากนั้นจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนใช้เวลาประมาณ 55-80 วัน ก็จะกลายเป็นดักแด้

1.3) ระยะดักแด้ (Pupa) ดักแด้ของแมลงชนิดนี้เป็นแบบ Exarate pupa ส่วนหัวจะ โดดแล้วค่อยๆเรียวเล็กลงไปทางด้านหาง เมื่อเข้าดักแด้ใหม่ๆตัวจะเป็นสีขาวลำตัวจะเหยียดตรง หลังจากนั้นจะค่อยๆอตัวไปทางด้านท้อง (Ventral) แล้วเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน จากนั้นจะ เห็นนัยน์ตาเป็นสีดำ ส่วนขาโดยเฉพาะปลายขา หนวดและส่วนหัวจะเห็นเป็นสีน้ำตาลอ่อนๆ จนกระทั่งเข้มขึ้นเรื่อยๆส่วนหัวพับเข้าหาส่วนอก ส่วนปีกพับลงไปอยู่ระหว่างขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 ในระยะดักแด้นี้จะใช้เวลาประมาณ 6-8 วันก่อนจะเป็นตัวเต็มวัย

1.4) ระยะโตเต็มวัย (Adult) หลังจากตัวหนอนนกเข้าดักแด้แล้ว 6-8 วัน จะมีการ ลอกคราบอีกครั้ง เพื่อออกมาเป็นตัวเต็มวัย โดยจะดันตัวเอาส่วนหัวออกมาก่อน ตัวเต็มวัยที่ออกมา จากดักแด้ใหม่มีลำตัวสีขาวนวลด้านท้องบริเวณอกจะมีสีเหลืองอ่อน หัว ขา และหนวด มีสีน้ำตาล เข้ม นัยน์ตาสีดำ หลังจากนั้นส่วนต่างๆ จะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแล้วค่อยๆเข้มขึ้นเรื่อยๆจน

กลายเป็นสีดำในที่สุด เว้นส่วนท้องจะกลายเป็นสีน้ำตาล หลังจากนั้นตัวเต็มวัยที่ออกมาจากคราบใหม่ๆจะมีสีเข้มขึ้นจนกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ ขนาดลำตัวของตัวโตเต็มวัยกว้างประมาณ 6 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 16-18 มิลลิเมตร ตัวที่สมบูรณ์เพศมักจะมีสีดำมันวาว แล้วตัวเต็มวัยก็จะอยู่ได้ 7-10 วันก็จะตาย หนอนนกมีการเจริญเติบโตแบบ Complete metamorphosis แล้วจึงออกมาเป็นตัวเต็มวัยรวมอายุของชีพจักรหรือวงจรชีวิต (life cycle) จะใช้เวลาประมาณ 3-6 เดือน (ณัฐฐาและชนศักดิ์. 2548)



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของหนอนนก

ที่มา: เฉลิม (2556)



ภาพที่ 4 หนอนนกในระยะต่างๆ

ที่มา: Naturfoto@2014 (2557)

### 2.1.3 ลักษณะทั่วไปของหนอนคืบกะหล่ำ

#### 1) อนุกรมวิธานของหนอนคืบกะหล่ำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Trichoplusia ni* (Hubner)

ชื่อสามัญ : หนอนเขียว หนอนคืบ หนอนผักบุ้ง

วงศ์ : Noctuidae

อันดับ : Lepidoptera

หนอนคืบกะหล่ำ (ภาพที่ 5) เป็นแมลงศัตรูที่ทำความเสียหายต่อผักตระกูลกะหล่ำได้หลายชนิด เป็นหนอนขนาดกลางกินจุ ในระยะแรกตัวหนอนจะกัดกินที่ผิวใบ เมื่อตัวหนอนโตขึ้นจะกัดกินใบทำให้เป็นรอยแห้วเหลือแต่ก้านใบ แมลงชนิดนี้จะทำลาย โดยกัดกินใบเป็นส่วนใหญ่และการทำลายเป็นไปอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 5 หนอนคืบกะหล่ำ

ที่มา: Reynolds (2013)

#### 2) ลักษณะทั่วไปของหนอนคืบกะหล่ำ

ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ ลักษณะคล้ายฝ้ายตรงกลางมีรอยบุ๋ม ผิวมัน สีขาวนวล หรือสีเหลืองอ่อนตามใต้ใบ ขนาดประมาณ 0.5-0.6 มิลลิเมตร ระยะไข่ 3-4 วัน หนอนโตเต็มทีสีเขียวอ่อน ขนาดยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร หัวเล็ก ลำตัวแบ่งออกเป็นปล้องชัดเจนและมีขนปกคลุมกระจายทั่วไปใกล้ๆกับสันหลัง ลำตัวมีแถบสีขาว 2 แถบขนานกัน เคลื่อนตัวโดยการงอตัวและคืบไประยะหนอน 14-21 วัน ดักด้ระยะแรกมีสีเขียวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ขนาดดักด้ประมาณ 2 เซนติเมตร อายุดักด้ประมาณ 5-7 วัน เข้าดักด้ภายในรังสีขาวตามใต้ใบพืช ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อ

นอกจากนี้ตัวเต็มวัยของหนอนยังชอบกินซากเน่าเปื่อยของใบไม้ และหญ้า เป็นครั้งคราว เพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งในใบไม้ กิ่งไม้และหญ้าที่เน่าเปื่อยนั้นจะมีส่วนประกอบของเซลลูโลส เพคติน อะไมเลส และไซแลนซึ่งส่วนประกอบดังกล่าวส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ของพืช และคิดว่าในระบบทางเดินอาหารของหนอนนกนั้นอาจจะมีจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เพคตินเอส อะไมเลส และไซแลเนสซึ่งช่วยย่อยสลายโครงสร้างในผนังเซลล์ได้

## 2.2 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลส คือ เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะผลิตได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น ปลูกไต้เดือน หอยทาก แบคทีเรีย รา ไบยาซูบ และข้าวมอลต์ เป็นต้น (Klyosov,1990) จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความสามารถในการย่อยสลายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่ ส่วนใหญ่จะถูกสร้างและหลั่งออกมาออกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโดยสิ่งแวดล้อม เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ จุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่ออกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ จากนั้นจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

### 2.2.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ที่ทำงานร่วมกัน (พิจิตรา และคณะ, 2548) คือ

1) เอนโดกลูคาเนส หรือเอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่ง พันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม(random) ทำให้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligo-saccharides) เซลโลเพนทาโอส ( cellopentaose) เซลโลไตรโอส (cellotriose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักใดขึ้นอยู่กับสมบัติ ของแต่ละเอนไซม์

2) เอกโซกลูคาเนส หรือเอกโซ-1,4-กลูคาเนสหรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนส

ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มี น้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ น้ำตาล เซลโลไบโอส

### 3) เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคซิเนส

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง

กลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสโดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน

### 2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1) ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูง และมีองค์ประกอบครบทั้ง 3 ส่วน คือ endoglucanase ,exoglucanase,  $\beta$ - glucosidase

2) ส่วนประกอบทางอาหารในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะไม่มีอาหารที่จำเพาะต่อการเพาะเลี้ยงและการผลิตเซลลูเลส แต่จะประยุกต์ใช้ตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังการทดลองของ (Abhay Kumar and Dube, 1992) ที่ใช้อาหาร 3 ชนิด ในการเพาะเลี้ยง *Vibrio agar-liquefaciens* ได้แก่ Kodota medium, Zobell medium, Mandels and Sternberg medium ทั้ง 3 ชนิดมี Carboxymethyl cellulose (CMC) ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนแต่มีองค์ประกอบอื่นๆแตกต่างกัน พบว่า exoglucanase จะผลิตได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงใน Mandels and Sternberg medium ส่วน endoglucanase และ  $\beta$ - glucosidase จะให้ปริมาณสูงเมื่อเพาะเลี้ยงใน Kodota medium และ Zobell medium

2.1) แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอน เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเซลลูเลส โดยส่วนใหญ่ได้แก่ เซลลูโลส Carboxymethyl cellulose (CMC) หรือพวกวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

2.2) แหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการผลิตเซลลูเลส เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง โดยแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตของแต่ละเชื้อจะแตกต่างกัน บางชนิดเหมาะสมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์สารและบางชนิดเหมาะสมกับอนินทรีย์สาร

### 3) สภาพของการเพาะเลี้ยงในการผลิตเซลลูเลสขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่

3.1) ความเป็นกรด-ด่าง จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีและมีกิจกรรมต่างๆในสภาพเป็นกลาง (จิตตเสน, 2529) ได้เพาะเลี้ยง *Homicola nigrescens* CM 33 ใน Cellulose broth พบว่า pH 5.5 มีความเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด และที่ pH 4.5 จะไม่มีการผลิตเซลลูเลส และ

เช่นเดียวกับเชื้อ *Acetobacter xylinum* KU-1 แต่ (ระพีพรรณ, 2536) พบว่าเมื่อใช้ cellulose broth ที่ pH ต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ruminococcus albus* 21 Aa ที่ pH 6.8 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด

3.2) อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น จิตตเสน (2529) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Hemicola nigrescens* CM 33 B ในอาหาร cellulose broth พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 45 องศาเซลเซียส ส่วนระพีพรรณ (2536) ที่ใช้ cellulose broth ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ruminococcus albus* 21 Aa บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 37 องศาเซลเซียส

3.3) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง การผลิตเซลลูเลสของเชื้อแต่ละชนิดจะใช้เวลาต่างกัน โดยจิตตเสน (2529) ได้เลี้ยงเชื้อ *Hemicola nigrescens* CM 33 B ในอาหาร cellulose broth พบว่า เวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนระพีพรรณ (2536) ได้เพาะเลี้ยง *Ruminococcus albus* 21 Aa พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด

## 2.3 เอนไซม์ไซลานเนส

เอนไซม์ไซลานเนสเกี่ยวข้องในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ถูกเรียกรวมๆกันว่า เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) หรือ กลูแคนไฮโดรเลส (glucanhydrolase) ซึ่งแบ่งออกเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดอย่างจำเพาะตามชนิดของสารตั้งต้น คือ อะราบินอส (L- arabinose) ออกมา เอนไซม์กาแลค-กาเนส (D-galactanase) ย่อยสลายเฉพาะการแลกแทน (galactan) และน้ำตาลอะราบินโนกาแลคแทน (L- arabino-D-galactan) เอนไซม์แมนนาเนส (D- mannanase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะ  $\beta$ -(1,4)-D-mannanopyranosyl ของน้ำตาลแมนแนน (D-mannan) และเอนไซม์ไซลานเนส ( $\beta$ -xylanase) ตัดพันธะ  $\beta$ -(1,4)-D-xylopyranosyl ของไซแลน

ไซลานเนส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารจำพวกไซแลน เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม xylanolytic enzyme ที่มีความสำคัญที่สุดในการทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักของไซแลนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะที่พันธะ  $\beta$ -1,4-xylosidic linkage

### 2.3.1. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลานเนส

1) แหล่งคาร์บอน คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์พลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักเพื่อผลิต xylanolytic enzyme โดยทั่วไป

นิยมใช้สารคาร์โบไฮเดรต เป็นแหล่งคาร์บอน (Biswas *et al*, 1988) รายงานว่า *Aspergillus ochraceus* ผลิตไซลานเนสและเบต้าไซโลซิเดส เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีรำข้าวสาลี ฟางข้าวสาลี และชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและพบว่า เมื่อเติมไซแลนลงในอาหารที่มีรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น

2) แหล่งไนโตรเจน เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมักได้แก่ แก๊สแอมโมเนีย กลีโอะแอมโมเนียม และไนเตรท แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนอาจใช้ในรูปของกรดอะมิโน หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์เจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน

3) อุณหภูมิ ในธรรมชาติจุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-90 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ช่วงหนึ่ง ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงนี้จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่ส่งผลให้มีการเจริญสูงสุดในช่วงเวลาสั้น เรียกว่า optimum growth temperature (Honda *et al*, 1985) พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยเชื้อ *Bacillus* sp. No. C-125

4) พีเอช การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และการทำงานของเอนไซม์จะถูกควบคุมโดยพีเอช สำหรับพีเอชที่เหมาะสมต่อความเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดยทั่วไปยีสต์และราเจริญได้ดีในชนพีเอชที่ต่ำกว่าแบคทีเรีย การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารปกติ อาหารเลี้ยงเชื้อมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่จะช่วยรักษาระดับของพีเอชให้คงที่อยู่แล้ว แต่ในกระบวนการหมักหลายชนิด พีเอชในน้ำหมักเปลี่ยนแปลงเร็วมากจนไม่อาจรักษาพีเอชไว้ได้ เป็นผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญหรือผลิตผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในการหมักแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงหนึ่งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงสุด (Adamsen *et al*, 1995) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนสโดย *Dictyogloma* sp.B1 ที่เพาะเลี้ยงในสารอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ความเข้มข้นของไซแลนร้อยละ 1.5 และพีเอชเท่ากับ 8 เป็นสภาวะที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

## 2.4 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase)

อะไมเลส (amylase) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง สามารถย่อยโมเลกุลแป้งให้ได้เดกซ์ตริน (dextrin) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) แอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) จะย่อยสลายแป้งที่พันธะ  $\alpha$ -1,4 แบบสุ่ม (random) แต่จะไม่สามารถย่อยสลายที่พันธะ  $\alpha$ -1,6 ในขณะที่ไอโซอะไมเลส (isoamylase) และ พูลูลานเนส (pullulanase) จะย่อยสลายได้เฉพาะตำแหน่ง  $\alpha$ -1,6 เท่านั้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของโอลิโกแซคคาไรด์ต่างๆ เบตาอะไมเลส ( $\beta$ -amylase) จะย่อยสลายพันธะ  $\alpha$ -1,4 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non-reducing end) ให้ได้มอลโทส (maltose) สำหรับกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จะย่อยแป้งที่พันธะ  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 และ  $\alpha$ -1,6 จากปลายด้านที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ เข้าไปที่ละโมเลกุล ผลการย่อยจะได้กลูโคส (glucose) แม้ว่าอะไมเลสจะเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ก็ตาม แต่ไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์ทุกชนิดในกลุ่มนี้จะย่อยแป้งได้ ทั้งนี้เพราะการย่อยเม็ดแป้งจะเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีสารจำพวกเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ไขมัน (fat) อะไมโลเพคติน (amylopectin) และโปรตีน (protein) ห่อหุ้มเม็ดแป้งไว้ (Fogarty, 1993)

เอนไซม์อะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์และถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์ เรียกว่า Extracellular enzyme สามารถย่อยแป้งได้ พบในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด แบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งเป็น 2 ประเภท คือ Endoamylase สามารถย่อยสลายแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง  $\alpha$ (1,4) glycosidic linkage ถ้าการย่อยสลายไม่สมบูรณ์จะได้กลูโคส มอลโทส และเดกซ์ตริน ถ้าการย่อยแป้งสมบูรณ์จะได้มอลโทสและกลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้คือแอลฟาอะไมเลส อีกประเภทหนึ่งคือ Exoamylase ซึ่งย่อยแป้งจาก Non-reducing end เข้าไปเอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เบต้าอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ในส่วนของเบต้าอะไมเลสจะให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลมอลโทสและ Limit dextrin ส่วนกลูโคอะไมเลสหรือแกมมาอะไมเลส จะได้กลูโคสอย่างเดียว

### 2.4.1 Exo-acting amylase หรือ exoglucosidase มี 3 ชนิด คือ

1) อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyoglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งจนได้กลูโคส โดยการสลายพันธะแอลฟา-1,4 ไกลโคซิดิก และพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก การย่อยสลายพันธะจะเริ่มจากปลายด้าน non-reducing ของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ที่เอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 4.5-5.0 ส่วนอุณหภูมิอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส

2) เบต้าอะไมเลส ( $\beta$ -Amylase) เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในพืชชั้นสูง และเป็น extracellular enzyme ของจุลินทรีย์โดยเอนไซม์นี้สามารถสลายพันธะแอลฟา-1,4 ไกลโคซิดิกได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะแอลฟา -1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคติน โดยเอนไซม์จะเริ่มย่อย

สลายอะไมโลสและอะไมโลเพคตินจากปลายด้าน non-reducing ดังนั้นเมื่อเอนไซม์ย่อยสลายอะไมโลส อย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลมอลโตส แต่การย่อยสลายอะไมโลเพคติน จะได้น้ำตาลมอลโตสและ  $\beta$ -limit dextrin รวมกัน พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 6.8-7.0 และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส

3) แกมมา-อะไมเลส ( $\gamma$ -Amylase) หรือกลูโคอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดของแป้งที่ แอลฟา-1,4 แอลฟา-1,6 ในลักษณะการตัดสายโพลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์ เข้าไปสู่ภายในสายครั้งละหน่วยของโมเลกุลกลูโคส

Exo-acting enzyme ชนิดอื่นๆ Exo-acting enzyme สามารถย่อยแป้งให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 4 หรือ 6 โมเลกุล มีการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Pseudomonas stutzeri* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ Extracellular maltotetraose - producing Amylase ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตน้ำตาลกลูโคส 4 โมเลกุลจากวัตถุดิบที่มีโครงสร้างเป็นสายและเป็นสาขา โดยในการย่อยสลายอะไมโลเพคตินจะได้ maltotetraose และ limit dextrin ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ เอนไซม์นี้สลายพันธะที่ 4 ของพันธะแอลฟา-1,4 ไกลโคซิดิก จากปลายด้าน non-reducing ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ค่อนข้างกว้าง โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 6.5-10.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 47 องศาเซลเซียส

#### 2.4.2 Endo-acting amylase หรือ endoglycosidase

เอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่  $\alpha$ -1,4 glucan-4-glucanohydrolase หรือที่รู้จักทั่วไปว่า แอลฟาอะไมเลส นอกจากนี้ยังมีชื่อทางการค้าต่างๆ เช่น Taka-amylase A, Buclamase Foretzyme และ Termamyl เอนไซม์นี้ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic อย่างนุ่ม แต่ไม่สามารถสลายพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ในอะไมโลเพคติน คุณสมบัติและกลไกการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ ซึ่งคุณสมบัตินี้จะมีผลทำให้ความหนืด (viscosity) ของสารละลายแป้งลดลง การย่อยสลายอะไมเลสอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลมอลโตส และมอลโตไตรโอส (maltotriose)

#### 2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

1) แหล่งคาร์บอน คาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงานจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์แสง โดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง เป็นต้น

2) แหล่งไนโตรเจน เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป อนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่ แอมโมเนียซัลเฟต เกลือแอมโมเนีย และไนเตรท (สมาใจ, 2537) แหล่งไนโตรเจนที่ให้การเจริญและผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุดคือ เปปโตน รองลงมาคือ เคซีน ไฮโดรไลเซต ทริพติกเคสเปปโตน แอสพาราจีน และบีฟแอกแทรกตามลำดับ ส่วนเกลือแอมโมเนียไนเตรทและเกลือแอมโมเนียซัลเฟต ทำให้เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสต่ำ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดี คือ เปปโตน (แหล่งไนโตรเจน) และแป้งมันสำปะหลัง (แหล่งคาร์บอน) โดยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแหล่งอินทรีย์จะช่วยให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้มากขึ้น

3) ความเป็นกรดต่าง อิทธิพลของพีเอช มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องมาจากทำให้เกิดการแตกตัวของ side-chain groups โดยกลุ่มที่มีความจำเพาะ 2 กลุ่ม คือ substrate binding group และ catalytic group ซึ่งจะทำให้ได้กราฟเส้นตรงโค้งรูปประฆังแบบต่างๆที่เกิดจากการพล็อตกราฟระหว่างค่าพีเอชกับกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) แตกต่างกันไป ตามธรรมชาติของกลุ่มทั้งสอง

4) อุณหภูมิ เอนไซม์อะไมเลสส่วนใหญ่มีการทำงานดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 0-40 องศาเซลเซียสและการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 40-60 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่เป็นพวก thermophilic ทำงานได้สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์ที่ลดลงในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ส่วนหนึ่งมีสาเหตุจากการเพิ่มการสั้นสะเทือนเนื่องจากอุณหภูมิของ โมเลกุลที่เกิดจากการสับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท ซึ่งทำให้ลดสัมพรรคภาพทางเคมีของเอนไซม์ที่มีต่อสับสเตรทและอีกส่วนหนึ่งเกิดจากการทำลายเอนไซม์ (Campbell and Cleveland , 1961)

## 2.5 เอนไซม์เพคตินเอส

เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสามารถในการตัดย่อยสารประกอบเพคติน พบได้ทั้งพืชชั้นสูงและในจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่เนื่องจากสารประกอบเพคตินเป็นส่วนประกอบของพืชเกือบทุกชนิดทั่วโลก และสมบัติของสารประกอบเพคตินเหล่านั้นแตกต่างกัน มีผลให้ชนิดและกลไกการทำงานของเอนไซม์นั้นแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจะกล่าวโดยทั่วไปแล้ว สมบัติของเพคตินเอส คือ เอนไซม์ที่สามารถตัดย่อยสารประกอบเพคติน กรดเพคติกหรือสารประกอบ oligo-D-galacturonate ได้ด้วยปฏิกิริยาต่างๆ กันเช่น เกิดปฏิกิริยา translimination ตัดย่อยได้ผลิตภัณฑ์ที่มีพันธะคู่และบางชนิดเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ตัดย่อยได้ผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่รีดิวซิ่ง ซึ่งปฏิกิริยาการตัด

ย่อยเกิดขึ้นได้ทั้งแบบสุ่ม (random) จัดเป็นกลุ่ม endo-enzyme หรือปฏิกิริยาการตัดย่อยจากปลายซึ่งจัดเป็นกลุ่ม exo-enzyme

### 2.5.1 ชนิดของเพคตินเอส

พบได้ทั้งในพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ เพคตินเอสที่พบในพืชส่วนใหญ่เป็น pectinesterase และ polygalacturonase ส่วนในจุลินทรีย์นั้นสามารถพบเพคตินได้ทุกชนิด จุลินทรีย์ที่พบว่ามีการสร้างเพคตินเอสได้นั้นส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ซึ่งชนิดของเอนไซม์เพคตินเอสมีดังนี้

1) Pectinesterase (PE) มีชื่อเรียกหลายชื่อเช่น pectin methylesterase, pectase , pectin pectyl hydrolase, pectin demethoxylase พบเอนไซม์ชนิดนี้ในพืชชั้นสูง รา ยีสต์ และแบคทีเรีย กิจกรรมของเอนไซม์นี้คือ ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายหมู่ methyl ester ออกจากสารประกอบเพคติน ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ galacturonic acid และ primary alcohol และกรดที่ได้อาจเปลี่ยนรูปเป็นเกลือ galacturonate ได้เมื่อมีแคลเซียม (Lee et al., 1970)

2) Polygalacturonase (PG) เป็นเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาตัดย่อยพันธะ โดยกระบวนการ hydrolysis มีชื่อเรียกหลายชื่อ ได้แก่ pectolyase, pectin glycosidase, pectin depolymerase รวมทั้ง pectinase ด้วย (Deuel and Stutz, 1958)

3) Pectate lyase (PAL) หรือ polygalacturonate lyase (PGL) ทำปฏิกิริยา  $\beta$ -elimination ที่พันธะ glycosidic ที่อยู่ใกล้กับหมู่คาร์บอกซิลของ Low methoxyl pectin หรือ complete deesterified pectin หรือกรดเพคติก เอนไซม์นี้ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 กลุ่ม คือ pectate endo-lyase และ pectate exo-lyase

4) Pectin lyase (PL) หรือ methoxygalacturonide lyase ทำปฏิกิริยา  $\beta$ -elimination กับพันธะ glycosidic ที่อยู่ใกล้กับหมู่ methyl ester ของ high methoxyl pectin ตามรายงานที่ได้รวบรวมมายังไม่พบ PL ที่เป็น exo-enzyme พบเฉพาะที่เป็น endo-enzyme ที่ทำปฏิกิริยาตัดย่อยสับสเตรทแบบสุ่ม (random)

### 2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเพคตินเอส

1) แหล่งคาร์บอน โดยคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงานจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์แสง โดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง และแป้งมันฝรั่ง เป็นต้น

2) แหล่งไนโตรเจน ซึ่งเซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป อนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่ แอมโมเนียซัลเฟต เกลือแอมโมเนีย และไนเตรท (สมใจ, 2537) แหล่งไนโตรเจนที่ทำให้การเจริญและผลิตเอนไซม์ที่ดีที่สุดคือ เปปโตน รองลงมาคือ เคซีนไฮโดรไลเสท ทริพิเคสเปปโตน แอสพาราจีน และบีฟแอกแทรค ตามลำดับ

3) เกลือของสารอนินทรีย์ เกลือแร่มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการอิเลคโตรไลต์ของเซลล์ โดยทั่วไปเกลือแร่ที่แบคทีเรียและจุลินทรีย์ต้องการมาก ได้แก่ แมกนีเซียม โปแตสเซียม มักการนีส แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส และกำมะถัน เป็นต้น

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นฤมล (2544) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของแบคทีเรียทนร้อน ทำการคัดแยกจากตัวอย่างดิน พบว่า ตัวอย่างดินที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดจำนวน 2 ไอโซเลท คือ CMU4-4 และ TI-5 นำมาบอชนิต พบว่า ไอโซเลท CMU4-4 คือ *Bacillus subtilis* และ ไอโซเลท TI-5 คือ *Bacillus coagulans* นำมาทดสอบบนอาหารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เลี้ยงในอาหาร cellulose broth ที่มี  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH ของอาหาร 5.5 มี carboxymethyl cellulose ร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งคาร์บอน tryptone ร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.281 U/ml และ specific activity 1.778 U/mg protein ส่วน *Bacillus coagulans* TI-5 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เลี้ยงในอาหาร cellulose broth ที่มี  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ร้อยละ 0.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH ของอาหาร 5.5 มี cellulose acetate ร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งคาร์บอน peptone ร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.168 U/ml และ specific activity 1.108 U/mg protein เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส pH 4.0-8.0 ปฏิกิริยาสูงสุดเกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นก็ปฏิกิริยาจะลดลง ส่วนเซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus coagulans* TI-5 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส pH 4.0-6.0 และปฏิกิริยาสูงสุดเกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นก็ปฏิกิริยาจะลดลง

เลอลักษณะ และคณะ (2535) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพคตินเอสในวัสดุอาหารแข็ง โดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. 26R ที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่า จากเชื้อราทั้ง 14 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกว่ามีศักยภาพในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบ 11 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราในสกุล *Aspergillus* และ 3 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราในสกุล *Rhizopus* และพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์เพคตินเอสจากเชื้อ *Rhizopus* sp. 26R คือ วัสดุอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้าและแกลบในอัตราส่วน 6:12:2 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 58 และพีเอชเริ่มต้น 5.6 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ประมาณ 140 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือ 700 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักสดของวัสดุสารอาหาร

มีรายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนสใน shake flask ของ alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานกระดาษบางปะอิน พบว่า เปลือกข้าวโพดร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไซลานเนสเมื่อเทียบกับรำข้าว และเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหนียวทำให้ *Bacillus firmus* ผลิตโปรตีนที่มีขนาด 49 39 และ 33 กิโลดอลตัน เพิ่มขึ้นมากกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น โดยโปรตีนที่ผลิตได้อาจเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม xylanolytic enzyme ซึ่งมีส่วนช่วยในการย่อยไซแลนทำให้ตรวจวัดกิจกรรมของไซลานเนสได้สูงสุด และพบว่ายูเรียร้อยละ 0.40 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสสูงสุด เมื่อเทียบกับ แอมโมเนียไนเตรต แอมโมเนียซัลเฟต โซเดียมไนเตรต โดยไซลานเนสที่ผลิตได้ใน mineral salt medium ที่มีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย ร้อยละ 0.4 เป็นแหล่งไนโตรเจนมีกิจกรรมของไซลานเนส 1.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ชนิดา, 2543)

Hossain *et al* (2008) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในการหมักบนอาหารแข็งของถั่วเหลืองโดยเชื้อรา ซึ่ง parameters ที่แตกต่างกันจะได้รับการปรับปรุงให้เหมาะสมสำหรับเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด สำหรับ *Aspergillus niger*-ML-17 จะให้ผลผลิตของ amylase ที่เพิ่มขึ้นจาก  $2.3 \pm 0.014$  IU เป็น  $4.4 \pm 0.042$  IU โดยการเสริมอาหารหมักอาหารร่วมกับ maltose, yeast extract,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ , NaCl, Tween-80 และ Asparagine ส่วน *Rhizopus oligosporus*-ML-10 จะให้ผลผลิต amylase ได้  $2.5 \pm 0.023$  IU โดยเติมกลูต้าเชื้อร้อยละ 10 และเสริมด้วย maltose, yeast extract,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ , NaCl, Soluble starch และ Asparagine ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้ถึง  $3.2 \pm 0.07$  IU

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Bashir *et al* (2013) ที่แยกจุลินทรีย์ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสจากลำไส้ปลวก กิ้งกือเม็ด (pill bugs) หนอนกอข้าวสีครีม (yellow stem-borers) พบว่า แบคทีเรียมี 42 สายพันธุ์ ดังนี้ แบคทีเรียกลุ่ม Bacillaceae ร้อยละ 50

Enterobacteriaceae ร้อยละ 26 Microbacteriaceae ร้อยละ 17 Paenibacillaceae ร้อยละ 5 และ Promicromonosporaceae ร้อยละ 2 อีกทั้งยังพบว่าแบคทีเรียรหัส A11 และ A21 สร้างเอนไซม์ย่อย avicel และ p-nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobiose ได้

รายงานการวิจัยเรื่องการคัดแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของหนอนไหม (*Bombyx mori*) ซึ่งอาหารของหนอนไหมคือใบหม่อน ที่มีองค์ประกอบของเพคติน ไชแลน เซลลูโลส และแป้ง ผลการทดลองพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ 11 ไอโซเลท โดยจำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus circulans* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Proteus vulgaris* *Klebsiella pneumonia* *Escherichia coli* *Citrobacter freundii* *Serratia liquefaciens* *Enterobacter* sp. *Pseudomonas fluorescens* *P. aeruginosa* *Aeromonas* sp. และ *Erwinia* sp. นอกจากนี้ *B. circulans* มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์มาย่อย CMcellulose ไชแลน เพคติน และแป้ง (Anand et al, 2009)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 96 well plate
- 3.1.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.1.3 เครื่องถ่ายภาพเจล Gel doc XR
- 3.1.4 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- 3.1.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 3.1.6 ตู้อบ
- 3.1.7 ไมโครเวฟ
- 3.1.8 ตู้บ่มเชื้อ
- 3.1.9 Vortex mixer
- 3.1.10 ขวดวัดปริมาตร
- 3.1.11 ตะแกรงวางหลอดทดลอง
- 3.1.12 หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร
- 3.1.13 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 3.1.14 Microplate Reader
- 3.1.15 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Incubator shaker)
- 3.1.16 water bath

#### 3.2 สารเคมี

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
  - 1) อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA)
  - 2) อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)
  - 3) อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA)
  - 4) อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ CMC
  - 5) อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ PGA
  - 6) อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ xylan
  - 7) อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ starch

### 3.2.2 สารเคมี

- 1) Peptone
- 2) Gram's iodine solution
- 3) Sodium chloride
- 4) Crystal violet
- 5) Safranin
- 6) Sodium acetate
- 7) Potassium acetate
- 8) Sodium phosphate buffer
- 9)  $MgSO_4$
- 10) NaCl
- 11) KCl
- 12)  $CaCl_2$
- 13)  $NH_4NO_3$

### 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารของตัวอย่างหนองและคั่ง

เก็บตัวอย่างตัวอย่างหนองและคั่งที่พบบนต้นไม้ภายในมหาวิทยาลัยทักษิณวิทยาเขตพัทลุง และที่จำหน่ายในตลาดสด รวมถึงพื้นที่ใกล้เคียงอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง อย่างน้อย 5 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกตัวอย่างที่อยู่ในระยะการเจริญที่ 5 จำนวน 5-10 ตัวอย่าง คัดเลือกตัวอย่างที่มีความยาว 3-5 เซนติเมตร นำตัวอย่างในระยะการเจริญที่ 5 มาสลับโดยนำหนองไปแช่ในตู้เย็น ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง แล้วนำตัวอย่างหนองมาผ่าตามด้านท้อง คึงเอาส่วนของระบบทางเดินอาหารของหนองประมาณ 10 ตัวอย่างมารวมกัน จากนั้นนำมาใส่ในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วบดให้ละเอียด ต่อมานำตัวอย่างมาทำการเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยผสมให้เข้ากัน แล้วคูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร plate count agar (PCA) ด้วยเทคนิคการกวาดจาน (spread plate technique) เรียบร้อยแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา สังเกตลักษณะโคโลนี แล้วเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคการ re-streak ลงในอาหาร Tryptic soy agar (TSA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาข้อมแกรม เพื่อคุณลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.3.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหนองและด่าง

#### 1) การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของตัวอย่างหนองและด่าง

เมื่อแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของตัวอย่างหนองและด่างจนบริสุทธิ์แล้ว นำเชื้อแบคทีเรีย 1 หลูปมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (NB) โดยการบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส ในขั้นตอนต่อไป

#### 2) การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

ในการตรวจคัดกรองเพื่อหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (Kasana *et al.*, 2008) โดยนำกล้าเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1) มาเลี้ยงในอาหาร Carboxymethyl cellulose (CMC) agar ( $\text{NaNO}_3$  1 กรัม,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 กรัม, KCl 0.5 กรัม  $\text{MgSO}_4$  0.5 กรัม, Yeast extract 0.5 กรัม, CMC 4 กรัม และ Agar 15 กรัม) โดยใช้ห้วงเขี่ยเชื้อมาประมาณ 5 โคโลนีเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ห้วงเขี่ยตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาตะบุนอาหาร CMC agar จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำจานไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการทดสอบการละลาย Gram's iodine solution (iodine 1 กรัม, potassium iodide 2 กรัมในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70) ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีของแบคทีเรีย 5 นาที แล้วเทออกเพื่อสังเกตและวัดขนาดวงใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยสลาย CMC

#### 3) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไชลานเนส

การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ไชลานเนส (Sea-Lee, 2007) โดยนำกล้าเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1) มาเลี้ยงในอาหาร Xylan agar (xylan 5 g, Yeast extract 2 g, pectone 5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 0.5 g,  $\text{CaAl}_2$  0.15 g, agar 15 g.) โดยใช้ห้วงเขี่ยเชื้อมาประมาณ 5 โคโลนีเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ห้วงเขี่ยตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาตะบุนอาหาร Xylan agar จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำจานไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไชลานเนสด้วยการทดสอบการละลาย Gram's iodine solution (iodine 1 กรัม, potassium iodide 2 กรัมในแอลกอฮอล์

ความเข้มข้นร้อยละ 70) ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีของแบคทีเรีย 5 นาที แล้วเทออกเพื่อสังเกต และวัดขนาดวงใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการสร้างเอนไซม์ไซลลเนส (xylanase) ที่ย่อยสลายไซลแลน (xylan)

#### 4) การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (สุริรัตน์, 2548) โดยนำกลีเซอรอลเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1) มาเลี้ยงในอาหาร starch agar (soluble starch 1 g, yeast extract 0.3 g, peptone 0.5 g,  $K_2HPO_4$  0.05 g, NaCl 0.15 g,  $CaCl_2$  0.1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g, agar 15 g) โดยใช้ห้วงเชี่ยเชื่อม่าประมาณ 5 โคโลนีเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ห้วงเชี่ยตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาตะบ่นอาหาร Starch agar จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำจานไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสด้วยการทดสอบด้วย Gram's iodine solution (iodine 1 กรัม, potassium iodide 2 กรัมในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70) ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีของแบคทีเรีย 5 นาที แล้วเทออกเพื่อสังเกต และวัดขนาดวงใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการสร้างเอนไซม์อะไมเลสที่ย่อยสลายแป้ง

#### 5) การทดสอบการสร้างเอนไซม์เพคตินเนส

การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์เพคตินเนส (Collmer and Keen, 1988) โดยนำกลีเซอรอลเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1) มาเลี้ยงในอาหาร PGA agar ( $K_2HPO_4$  11 g,  $K_2PO_4$  5.5 g,  $(NH_4)_2SO_4$  1.2 g,  $MgSO_4$  0.4 g,  $CaCl_2$  0.15 g, pectin 4 g, agar 15 g) โดยใช้ห้วงเชี่ยเชื่อม่าประมาณ 5 โคโลนีเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ห้วงเชี่ยตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาตะบ่นอาหาร PGA agar จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำจานไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพคตินเนสด้วยการทดสอบด้วย Gram's iodine solution (iodine 1 กรัม, potassium iodide 2 กรัมในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70) ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีของแบคทีเรีย 5 นาที แล้วเทออกเพื่อสังเกต และวัดขนาดวงใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการสร้างเอนไซม์เพคตินเนสที่ย่อยสลายเพคติน (Pectin)

### 3.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลลเนส อะไมเลส และเพคตินเนส จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีวงใส จากการทดลองข้อ 3.3.2 เพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ดังนี้

### 1) การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูกปมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (NB) โดยการบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เป็นกล้าเชื้อในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส ในขั้นตอนต่อไป

### 2) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว CMC broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ (Miller , 1959) (ภาคผนวก ก)

### 3) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไชลานเนส

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว Xylan broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไชลานเนส โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ (Miller , 1959) (ภาคผนวก ก)

### 4) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว starch broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ (Miller , 1959) (ภาคผนวก ก)

### 5) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเนส

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว PGA broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา-

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เพคตินเนสโดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ (Miller , 1959) (ภาคผนวก ก)

### 3.3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด หรือชนิดใดชนิดหนึ่งมาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ต่อบริเวณ 16S rRNA gene เริ่มจากการสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยใช้เชื้อประมาณ 1-2 โคโลนี ละลายใน TE buffer 200  $\mu$ l จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่าง DNA ที่ได้จะ เก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อรอทำ PCR ต่อไป การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA จะใช้ primers ที่จำเพาะต่อ 16S rRNA โดยใช้ primers ต่อไปนี้ คือ Bact-0341\_5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' และ Bact-0785\_5'GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (Klindworth *et al.*, 2013) ซึ่งสภาวะและ องค์ประกอบสำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA gene แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะในการทำ PCR

Primers	Reaction (50 ul)	Condition
Bact-0341 Bact-0785	1X buffer (100 mM.KCl, 20 mMTris) 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> 250 $\square$ McNTPs 0.5 $\square$ Mprimers 1.25 units of Taq 1 ul of DNA sample	Start 95 °C 10 min 1 cycle Denaturation 95 °C 1 min Annealing 55°C 1.30 min 30 cycles Extension 72°C 1 min Extension 72°C10 min

จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis ร้อยละ 1.2 แล้ว นำผลผลิตจากการทำ PCR ดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป Spin Clean™ PCR Purification Kit นำตัวอย่าง DNA ที่ได้จะส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังต่างประเทศ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gene Bank และทำเทียบเคียง (alignment) โดยโปรแกรม MEGA 5 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำ Phylogenetic tree

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารของตัวอย่างหนอนและด้วง

ผลการเก็บตัวอย่างหนอนและด้วงเพื่อแยกแบคทีเรียในทางเดินทางอาหาร ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคติเนส พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของด้วง 1 ชนิด ได้แก่ ด้วงมะพร้าว (*Rhynchophorus Ferrugines*) ได้จำนวน 4 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังแยกได้จากทางเดินอาหารของหนอน 7 ชนิด ได้แก่ หนอนปลอก (Bagworm) จำนวน 7 ไอโซเลท หนอนปกเหลือง (*Orgyia postica*) จำนวน 4 ไอโซเลท หนอนบู่ (*Eupterote testacca* Walker) จำนวน 7 ไอโซเลท หนอนผักบู่ (*Trichoplusia ni* (Hubner)) จำนวน 2 ไอโซเลท หนอนนก (*Tenebrio molitor*) จำนวน 11 ไอโซเลท หนอนม้วนใบกล้วย (*Erionata thrax* Linnaeus) จำนวน 5 ไอโซเลท และหนอนใบคะน้า (*Plutella xylostella*) จำนวน 2 ไอโซเลท

จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ ที่รวมทั้งสิ้น 42 ไอโซเลทมาแยกให้บริสุทธิ์ แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง แสดงดังภาพที่ 6 – 13 ย้อมสีแกรมแล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ผลการศึกษา แสดงดังภาพที่ 14 – 21



RPW-I



RPW-II



RPW-III

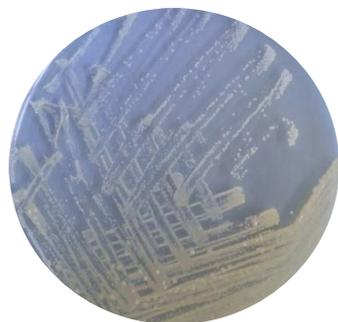


RPW-IV

ภาพที่ 6 ลักษณะ โคลนินบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่แยกได้จากด้วงมะพร้าว



M-I



M-II



M-V



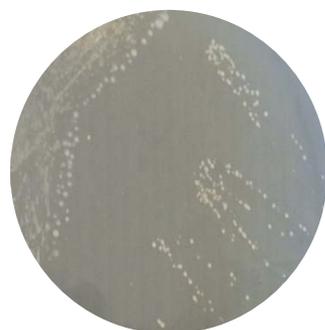
M-VIII



M-IX



M-XII



M-XIII

ภาพที่ 7 ลักษณะ โคลนินบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองพลอก



OP-I



OP-II



OP-III



OP-IV

ภาพที่ 8 ลักษณะ โคลนินของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองปกเหลือง

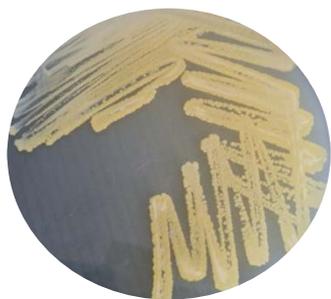


B-I



B-II

ภาพที่ 9 ลักษณะ โคลนินบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองผักบุ้ง



CP-I



CP-II



CP-VII



CP-VIII



CP-IX

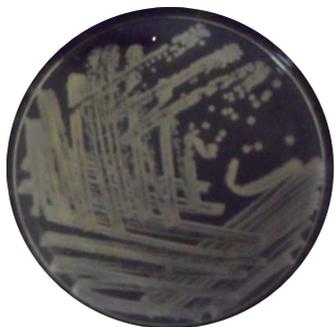


CP-X

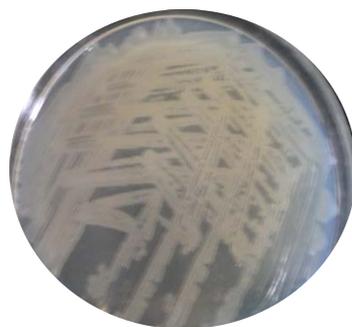


CP-XI

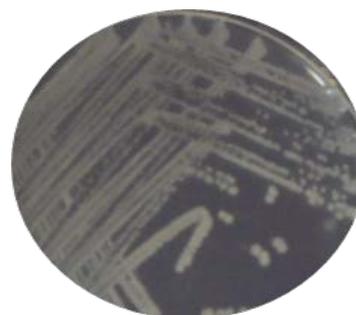
ภาพที่ 10 ลักษณะ โคลนีสบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนอนนึ่ง



MW-I



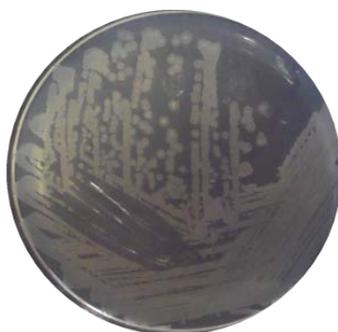
MW-II



MW-III



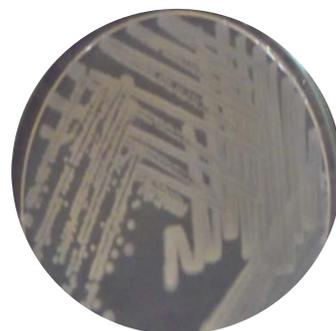
MW-IV



MW-VI



MW-VII



MW-VIII



MW-IX

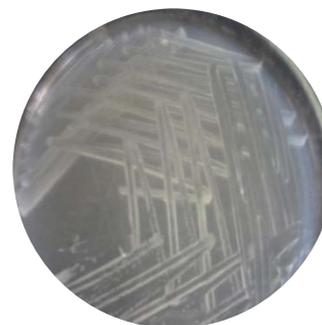
ภาพที่ 11 ลักษณะ โคลนินบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนอนนก



MW-XI



M-XII



M-XIII

ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองนก (ต่อ)



SP-I



SP-II



SP-III



SP-IV



SP-V

ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนอนม้วนใบกล้วย

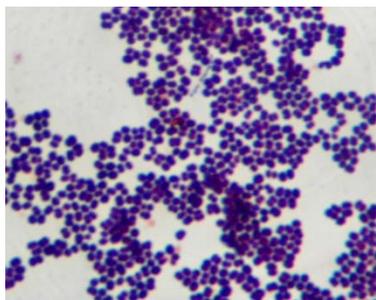


KL-I

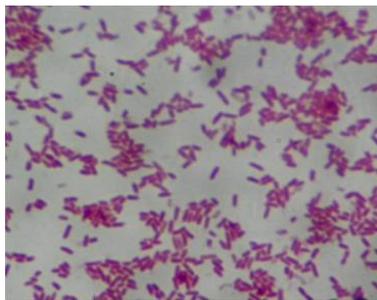


KL-II

ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองไผ่คะน้ำ



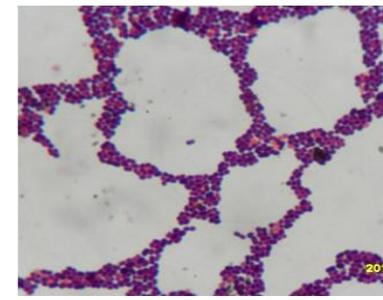
RPW-I



RPW-II

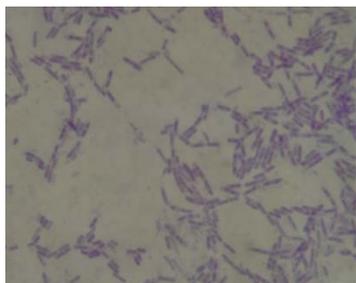


RPW-III

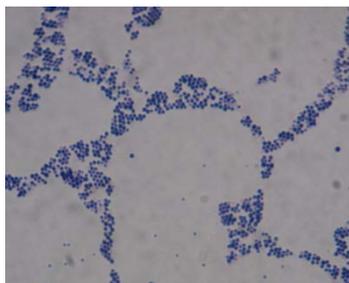


RPW-IV

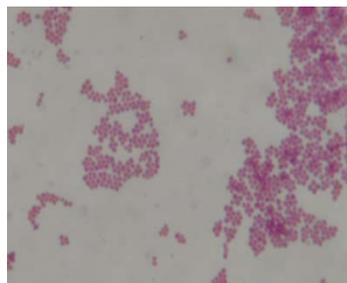
ภาพที่ 14 การติดสีย้อมของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวงมะพร้าว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



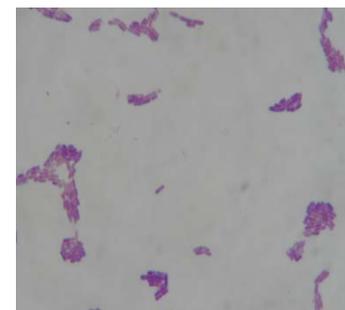
M-I



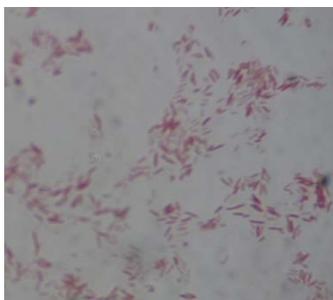
M-II



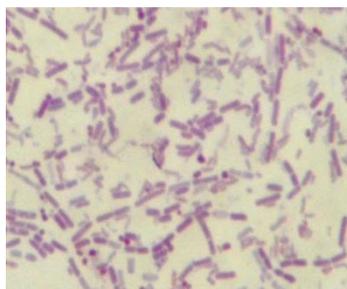
M-V



M-VIII



M-IX

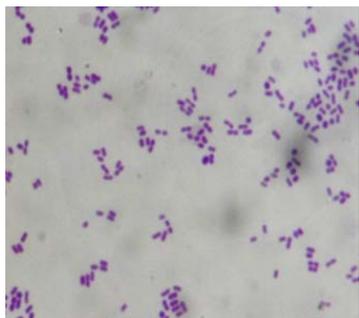


M-XII

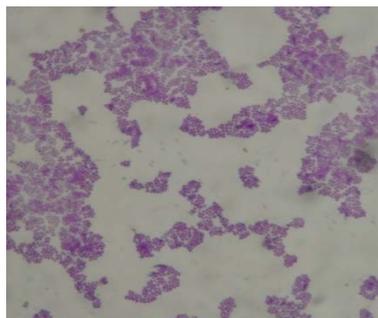


M-XIII

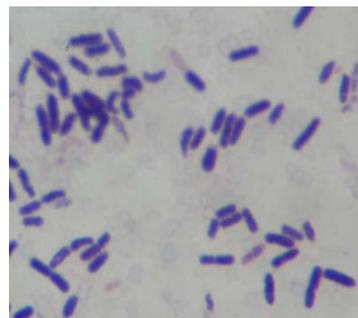
ภาพที่ 15 การติดสีของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองพลอก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



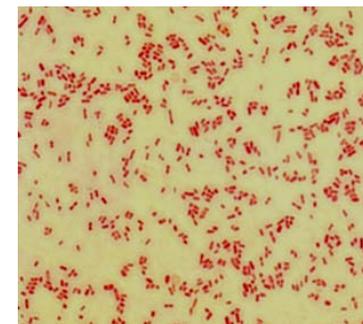
OP-I



OP-II

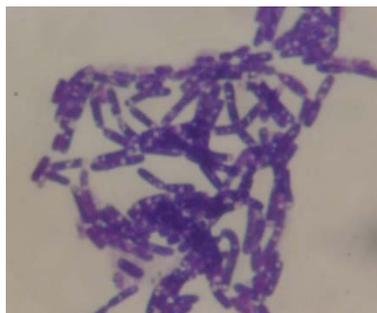


OP -III



OP -IV

ภาพที่ 16 การติดสีย้อมของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองปกเหลือง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

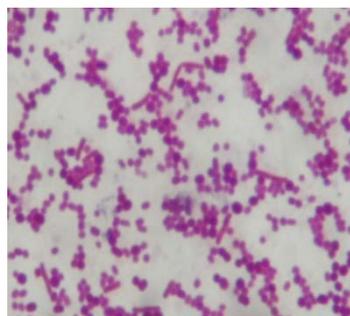


B-I

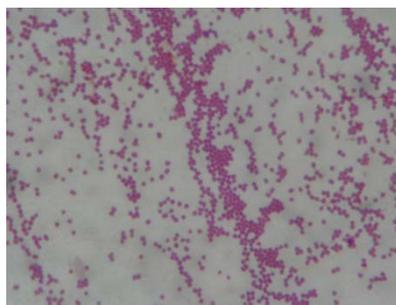


B-II

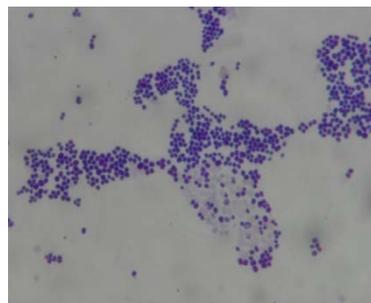
ภาพที่ 17 การติดสีย้อมของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองฝีกบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



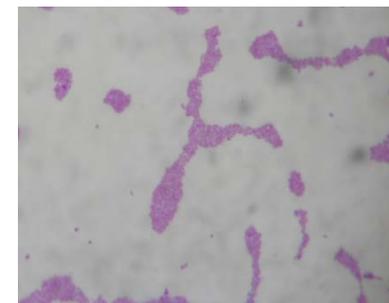
CP- I



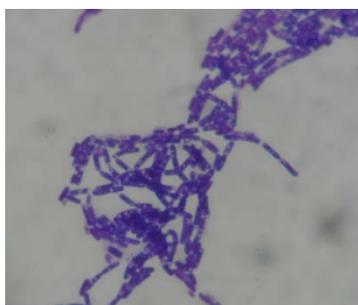
CP- II



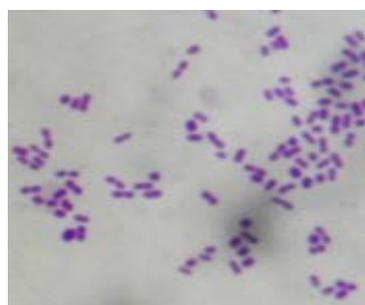
CP -VII



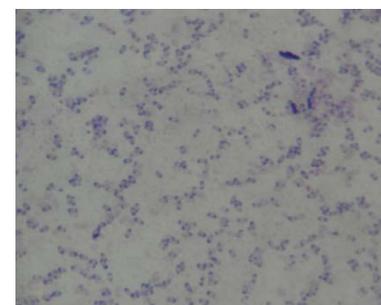
CP - VIII



CP -IX

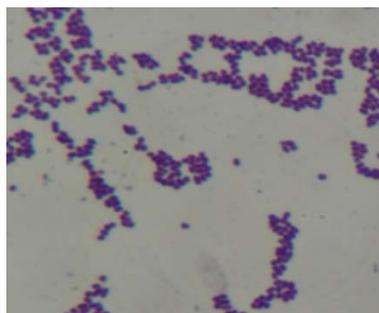


CP-X

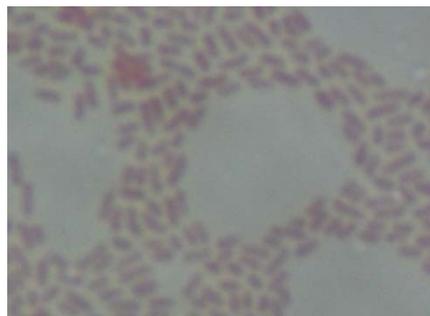


CP-XI

ภาพที่ 18 การติดสีข้อมของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองนึ่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



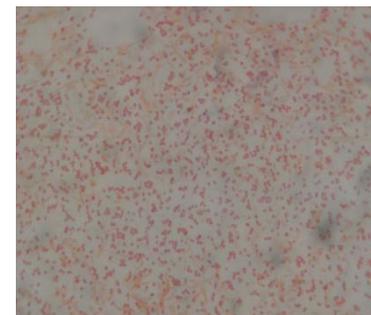
MW-I



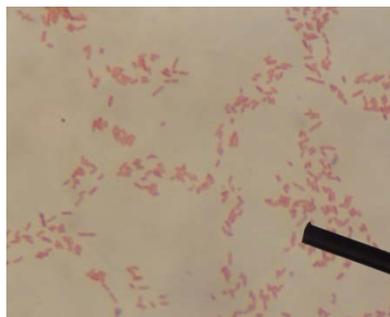
MW-II



MW-III



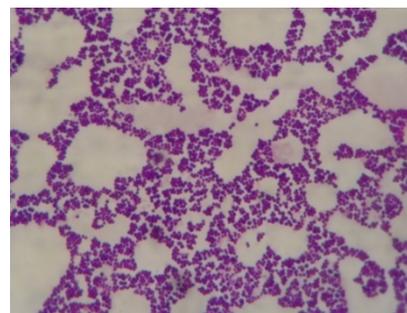
MW-IV



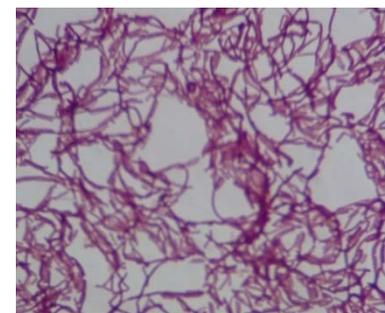
MW-VI



MW-VII

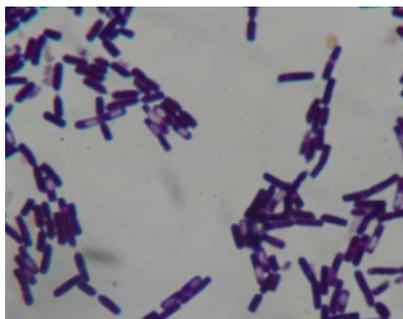


MW-VIII

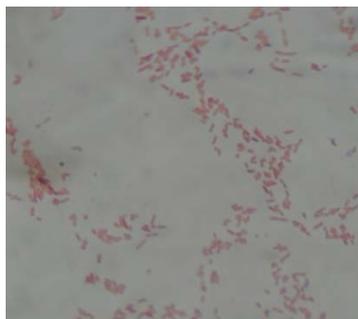


MW-IX

ภาพที่ 19 การติดสีของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองนก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



MW-XI

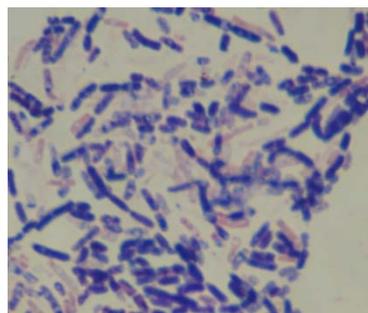


MW-XII

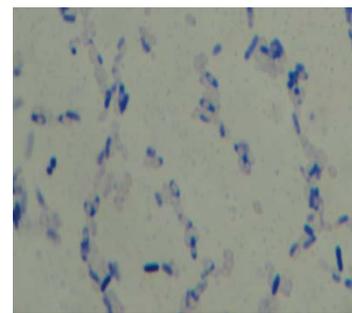


MW-XIII

ภาพที่ 19 การติดสีข้อมของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองนก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ต่อ)

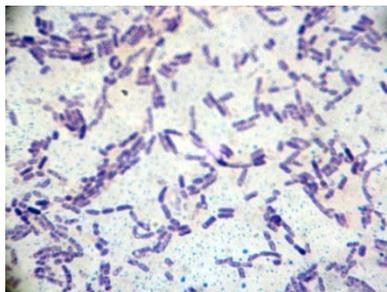


KL-I

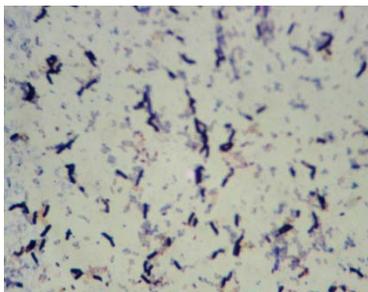


KL-II

ภาพที่ 20 การติดสีข้อมของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองใบคะน้า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



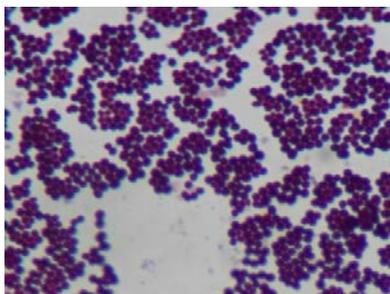
SP-I



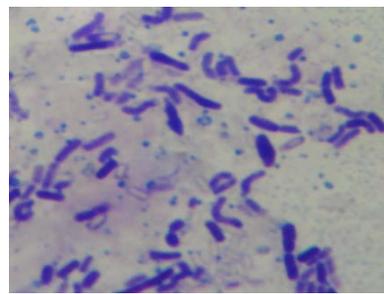
SP-II



SP-III



SP-IV



SP-V

ภาพที่ 21 การติดสีของแบคทีเรียที่แยกได้จากหนอนมันบัวกล้วย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

#### 4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหนอน และด้วง

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธีวัดวงใส (clear zone) บนอาหารแข็ง ผลการทดลองพบว่า ด้วงมะพร้าวมีเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 4 ไอโซเลท โดยทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อย CMC ได้ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากด้วงมะพร้าว

ตัวอย่าง	Code	เอนไซม์			
		เซลลูเลส	เพคตินเอส	ไซลานเอส	อะไมเลส
ตัวอ่อนด้วง มะพร้าว	RPW-I	+	-	-	+
	RPW-II	+	+	-	+
	RPW-III	+	+	-	-
	RPW-IV	+	+	-	-

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (clear zone)

- หมายถึง ไม่มีวงใส (clear zone)

นอกจากนี้ผลของการทดสอบการสร้างเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหนอน 7 ชนิด ซึ่งสามารถแยกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งสิ้น 72 ไอโซเลท ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 3 - 9

ตารางที่ 3 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองปลา

ตัวอย่าง	Code	เอนไซม์			
		เซลลูเลส	เพคตินเนส	ไซลลานเนส	อะไมเลส
หนองปลา	M-I	—	—	+	—
	M-II	—	—	+	+
	M-V	—	—	+	—
	M-VIII	—	—	—	+
	M-IX	—	—	+	—
	M-XII	—	—	—	+
	M-XIII	—	—	+	—

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (clear zone)

— หมายถึง ไม่มีวงใส (clear zone)

ตารางที่ 4 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองผักนึ่ง

ตัวอย่าง	Code	เอนไซม์			
		เซลลูเลส	เพคตินเนส	ไซลลานเนส	อะไมเลส
หนองผักนึ่ง	B-I	+	+	+	+
	B-II	+	+	+	+

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (clear zone)

— หมายถึง ไม่มีวงใส (clear zone)

ตารางที่ 5 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองปกเหลือง

ตัวอย่าง	Code	เอนไซม์			
		เซลลูเลส	เพคตินเอส	ไซลานเอส	อะไมเลส
หนอง ปก เหลือง	M-I	—	—	+	—
	M-II	—	—	+	+
	M-V	—	—	+	—
	M-VIII	—	—	—	+
	M-IX	—	—	+	—
	M-XII	—	—	—	+
	M-XIII	—	—	+	—

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (clear zone)

— หมายถึง ไม่มีวงใส (clear zone)

ตารางที่ 6 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองใบคะน้ำ

ตัวอย่าง	Code	เอนไซม์			
		เซลลูเลส	เพคตินเอส	ไซลานเอส	อะไมเลส
หนองใบ คะน้ำ	KL-I	+	—	—	+
	KL-II	+	+	—	+

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (clear zone)

— หมายถึง ไม่มีวงใส (clear zone)

ตารางที่ 7 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองน้ำ

ตัวอย่าง	Code	เอนไซม์			
		เซลลูเลส	เพคตินเอส	ไซลันเนส	อะไมเลส
หนองน้ำ	CP-I	—	—	+	—
	CP- II	—	—	+	—
	CP -VII	—	+	—	+
	CP-VIII	—	—	+	—
	CP -IX	—	—	+	+
	CP-X	—	—	+	—
	CP-XI	—	+	+	+

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (clear zone)

— หมายถึง ไม่มีวงใส (clear zone)

ตารางที่ 8 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหนองน้ำในบึง

ตัวอย่าง	Code	เอนไซม์			
		เซลลูเลส	เพคตินเอส	ไซลันเนส	อะไมเลส
หนองน้ำในบึง	SP-I	+	+	—	+
	SP-II	+	+	—	+
	SP-III	+	—	—	+
	SP-IV	+	+	—	+
	SP-V	+	—	—	—

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (clear zone)

— หมายถึง ไม่มีวงใส (clear zone)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหนอนนกก

ตัวอย่าง	Code	เอนไซม์			
		เซลลูเลส	เพคตินเอส	ไซลानเอส	อะไมเลส
หนอนนกก	MW-I	+	+	-	-
	MW-II	+	-	+	-
	MW-III	+	-	+	-
	MW-IV	-	-	+	-
	MW-VI	-	-	+	-
	MW-VII	-	-	+	-
	MW-VIII	-	-	+	-
	M-IX	-	+	+	-
	M-XI	+	-	-	-
	M-XII	+	-	+	-
	M-XIII	+	-	+	-

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (clear zone)

- หมายถึง ไม่มีวงใส (clear zone)

### 4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลानเนส อะไมเลส และเพคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

#### 4.3.1 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคติเนสโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของด้วงมะพร้าว

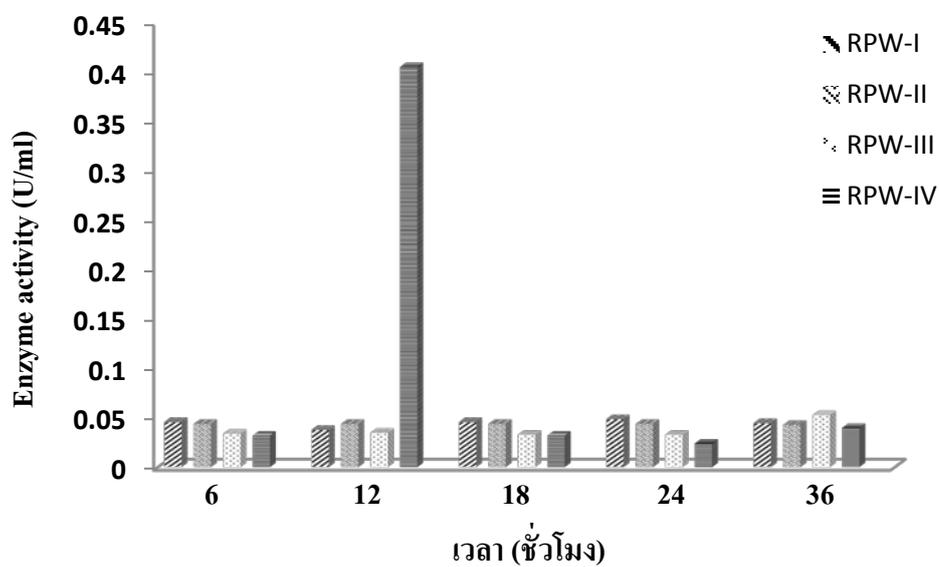
ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลทจากทางเดินอาหารด้วงมะพร้าว ได้แก่ ไอโซเลทรหัส RPW-I RPW-II RPW-III และ RPW-IV โดยทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และรหัส RPW-IV สร้างเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือ 0.405 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 22) ส่วน RPW-I และ RPW-II ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ ซึ่งรหัส RPW-I มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด เท่ากับ 0.363 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 23) ในขณะที่ RPW-II RPW-III และ RPW-IV สร้างเอนไซม์เพคติเนสได้ โดยรหัส RPW-IV ผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.961 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 24)

#### 4.3.2 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลสและเพคติเนสโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของหนอนปลอก

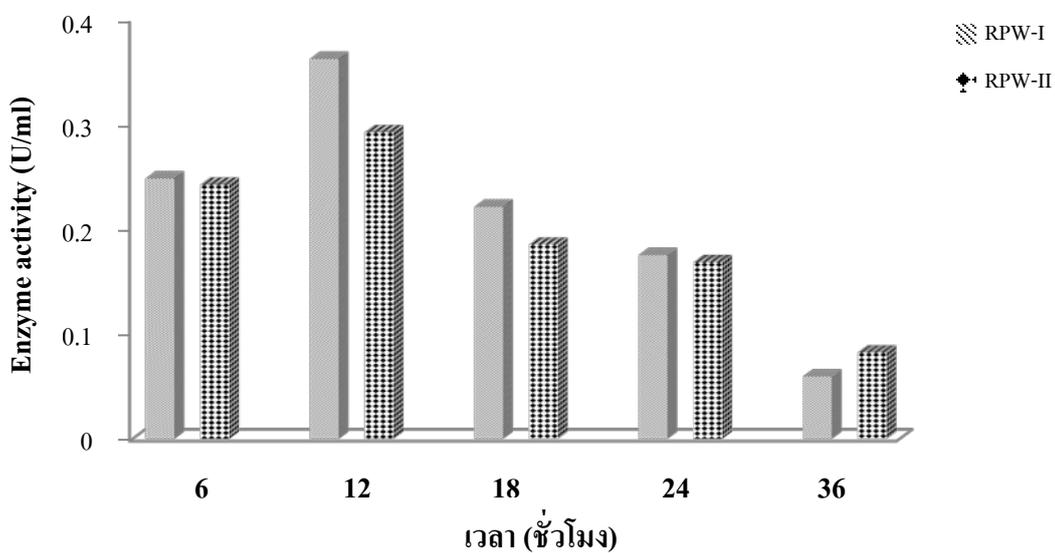
ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรีย 7 ไอโซเลทจากทางเดินอาหารหนอนปลอก ได้แก่ ไอโซเลทรหัส M-I M-II M-V M-VIII M-IX M-XII และ M-XIII โดย 5 ไอโซเลท (M-I M-II M-V M-IX และ M-XIII) สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนส และรหัส M-I สร้างเอนไซม์ไซลานเนสสูงที่สุด คือ 0.423 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 25) ส่วน M-II M-VIII และ M-XII ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ ซึ่งรหัส M-II มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด เท่ากับ 0.731 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 26)

#### 4.3.3 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคติเนสโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของหนอนปอกเหลือง

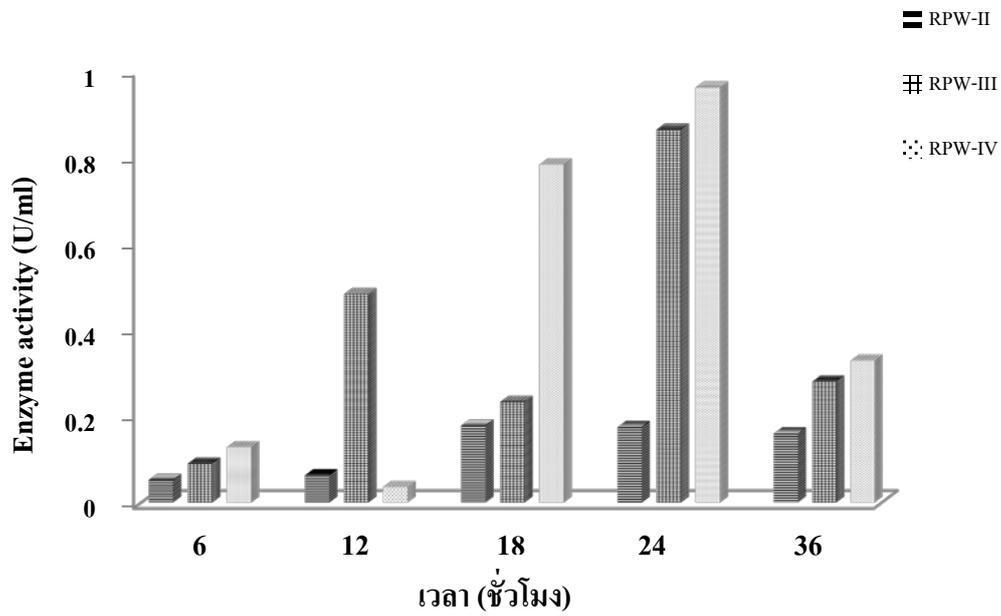
ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลทจากทางเดินอาหารหนอนปอกเหลือง ได้แก่ ไอโซเลทรหัส OP-I OP-II OP-III และ OP-IV โดยไอโซเลท OP-II สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนส อะไมเลส และเพคติเนสได้ ซึ่งรหัส OP-II สร้างเอนไซม์ไซลานเนส (ภาพที่ 27) และอะไมเลส (ภาพที่ 28) สูงที่สุด คือ 0.126 และ 1.807 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน รหัส OP-III มีกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสสูงที่สุด เท่ากับ 1.039 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 29)



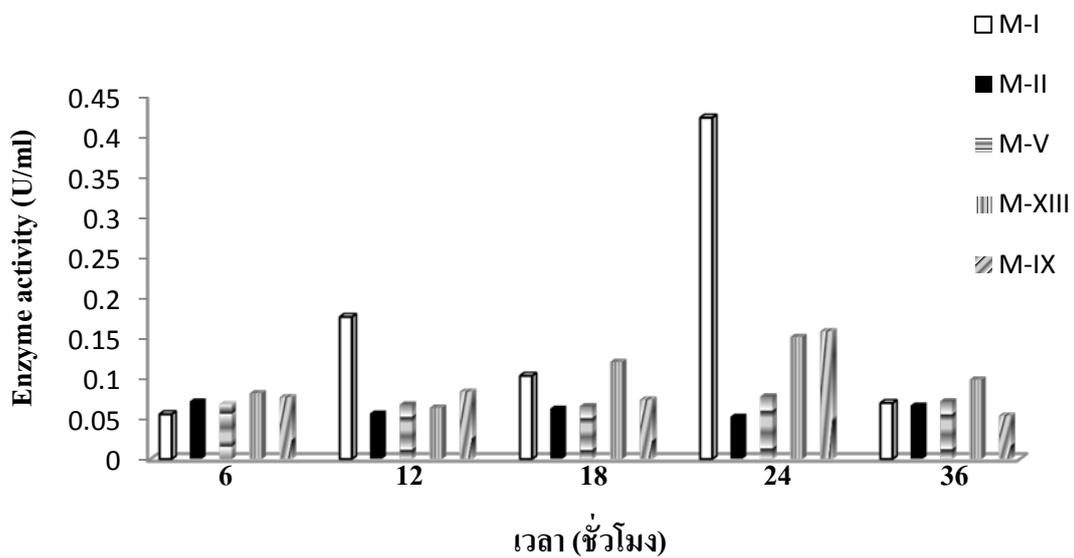
ภาพที่ 22 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดั่งมะพร้าว



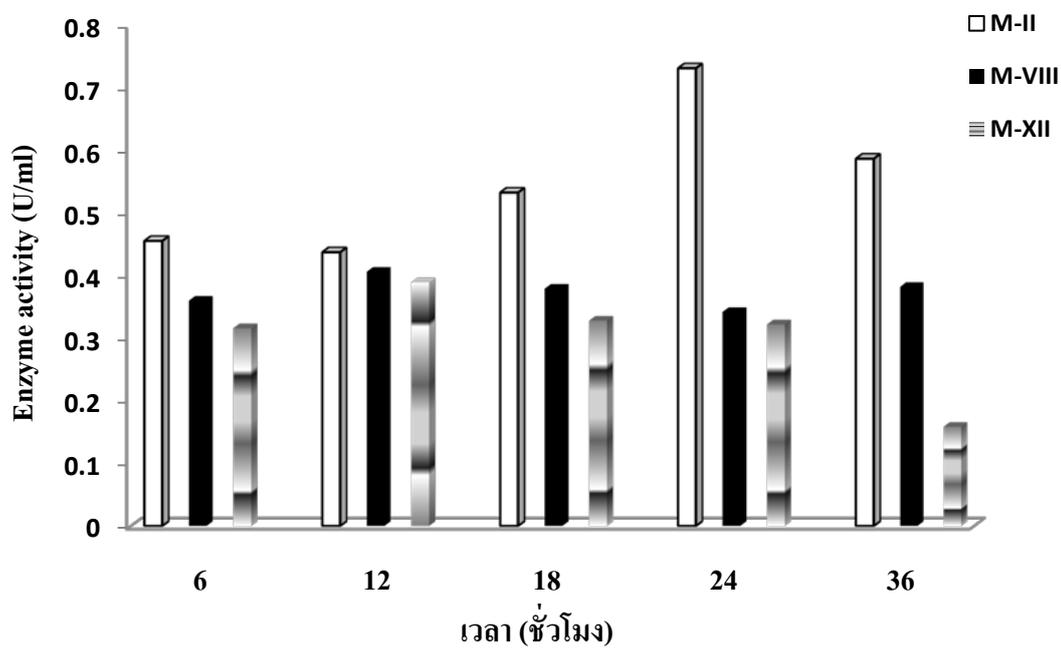
ภาพที่ 23 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดั่งมะพร้าว



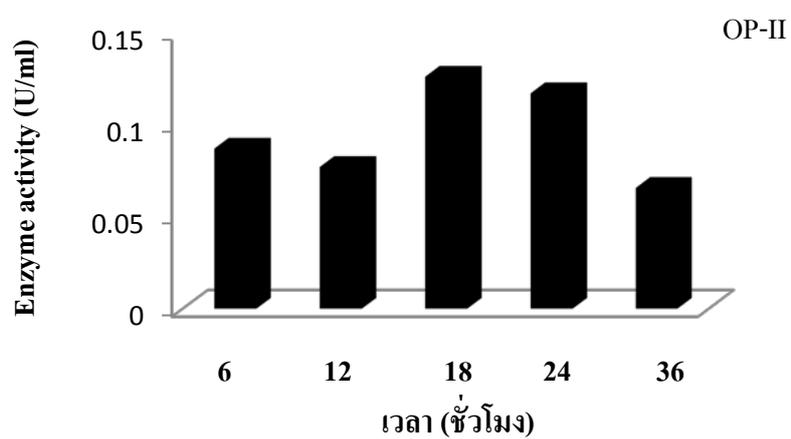
ภาพที่ 24 กิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดั่งมะพร้าว



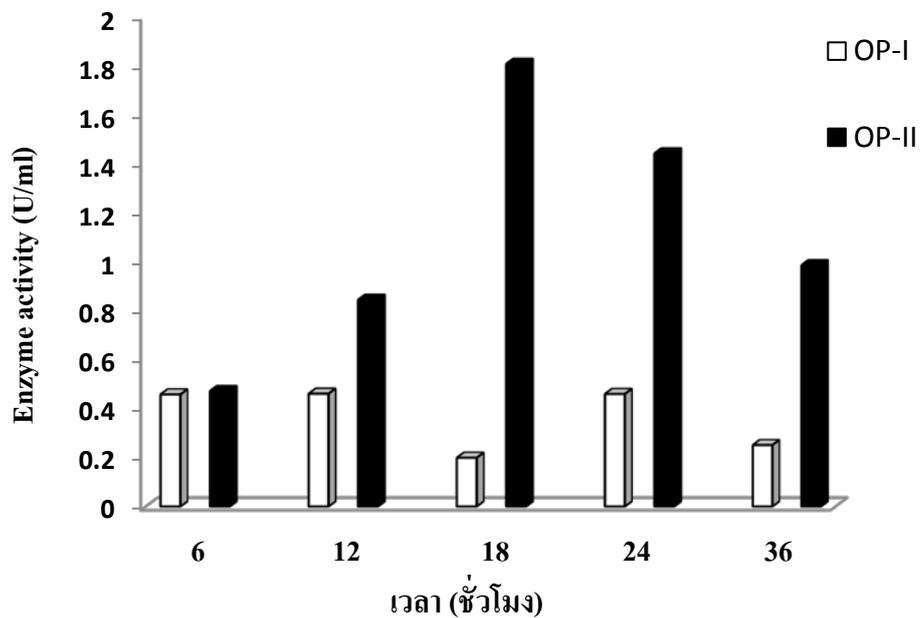
ภาพที่ 25 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนปลอก



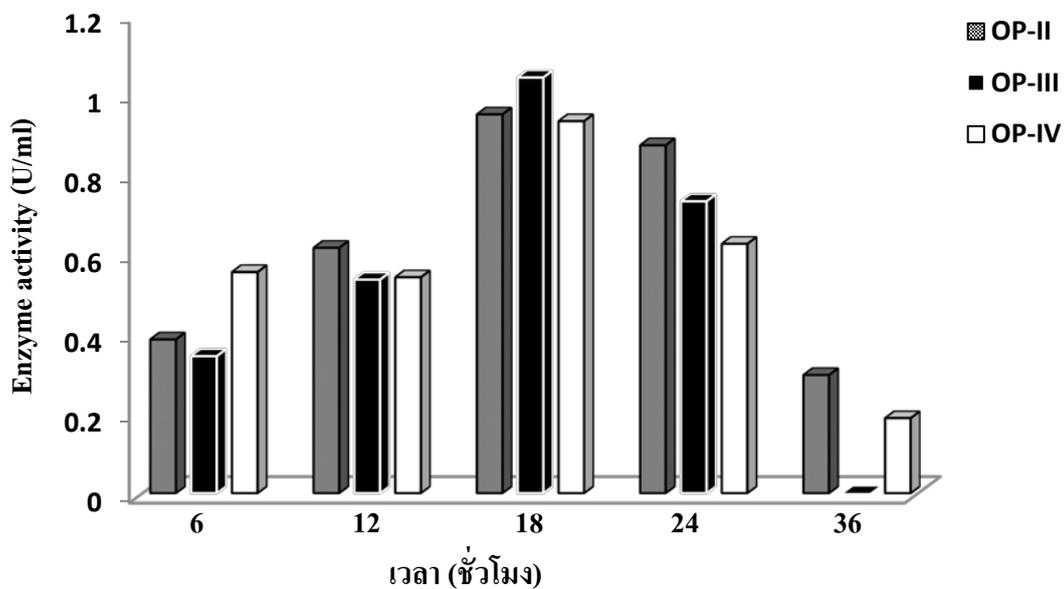
ภาพที่ 26 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนองปลา



ภาพที่ 27 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนองปลาเหลือง



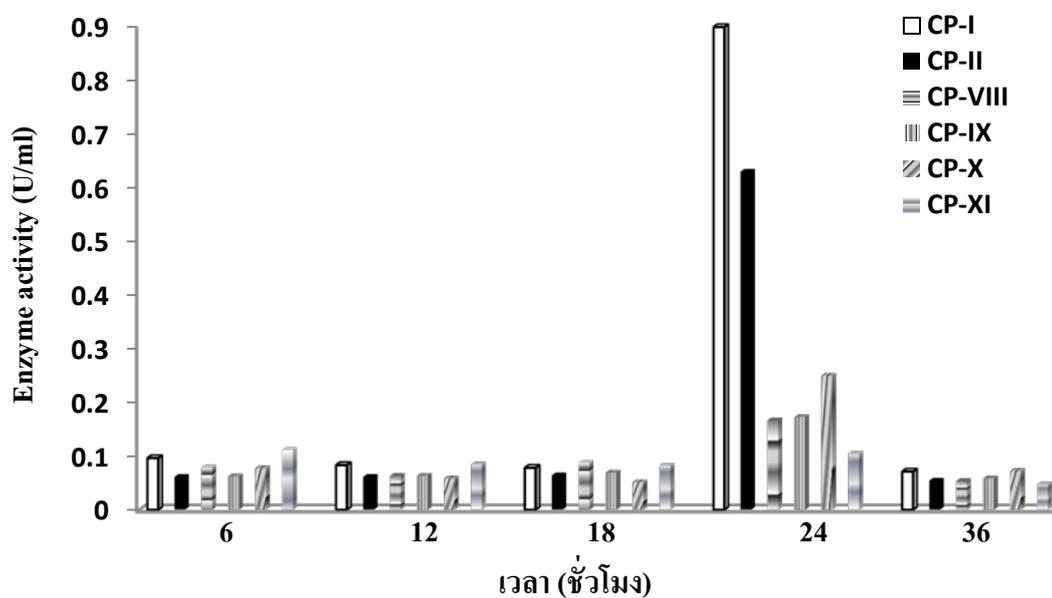
ภาพที่ 28 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนองปกเหลือง



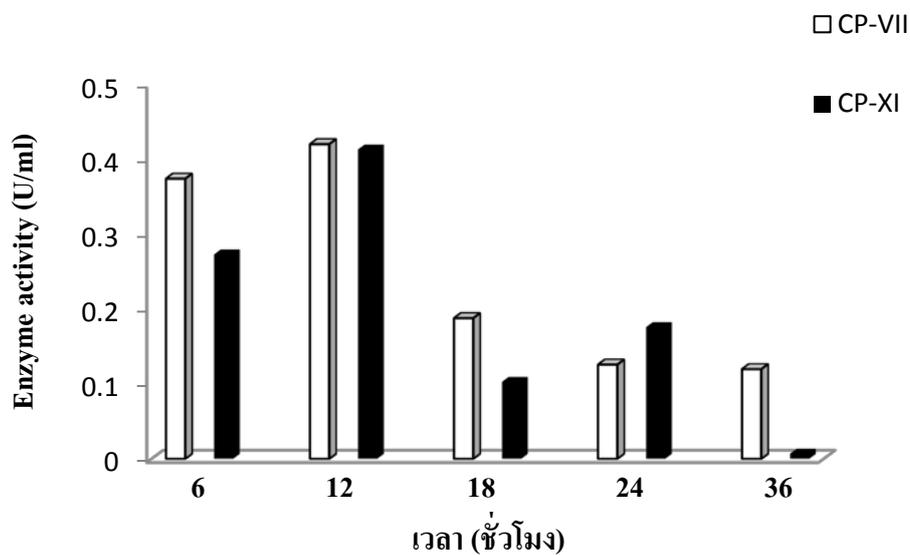
ภาพที่ 29 กิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนองปกเหลือง

#### 4.3.4 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคตินเอสโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของหนอนบู่

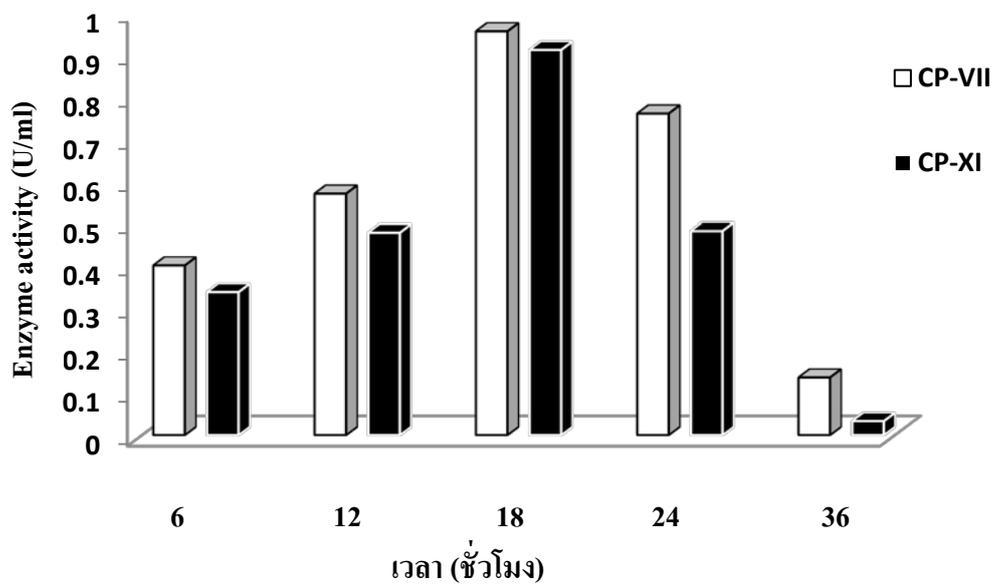
ผลการทดลองพบว่า มีแบคทีเรีย 7 ไอโซเลทจากทางเดินอาหารหนอนบู่ ได้แก่ ไอโซเลทรหัส CP-I CP-II CP-VII CP-VIII CP-IX CP-X และ CP-XI โดยไอโซเลท CP-I สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนส สูงที่สุด คือ 0.897 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 30) ส่วน CP-VII ผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ภาพที่ 31) และเพคตินเอส (ภาพที่ 32) ได้สูงที่สุด เท่ากับ 0.42 และ 0.953 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 30 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนบู่



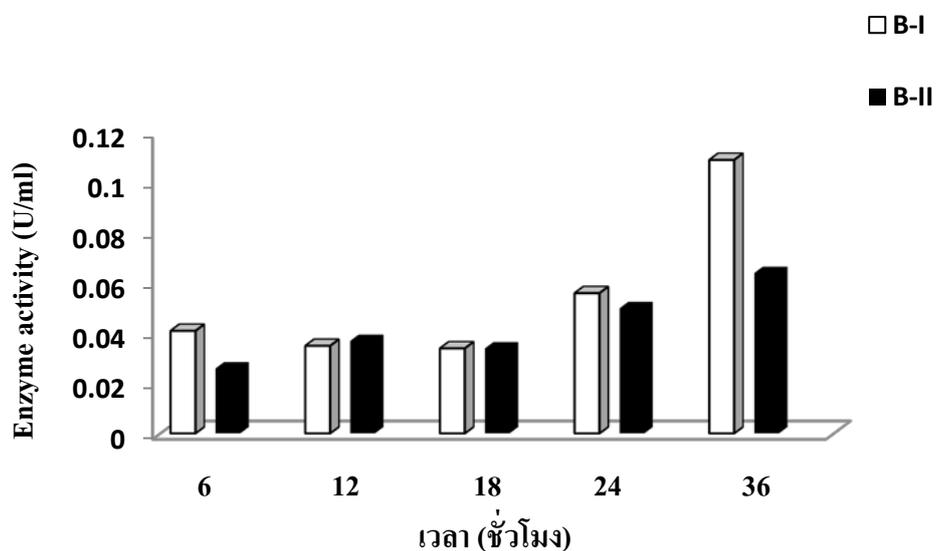
ภาพที่ 31 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนบั้ง



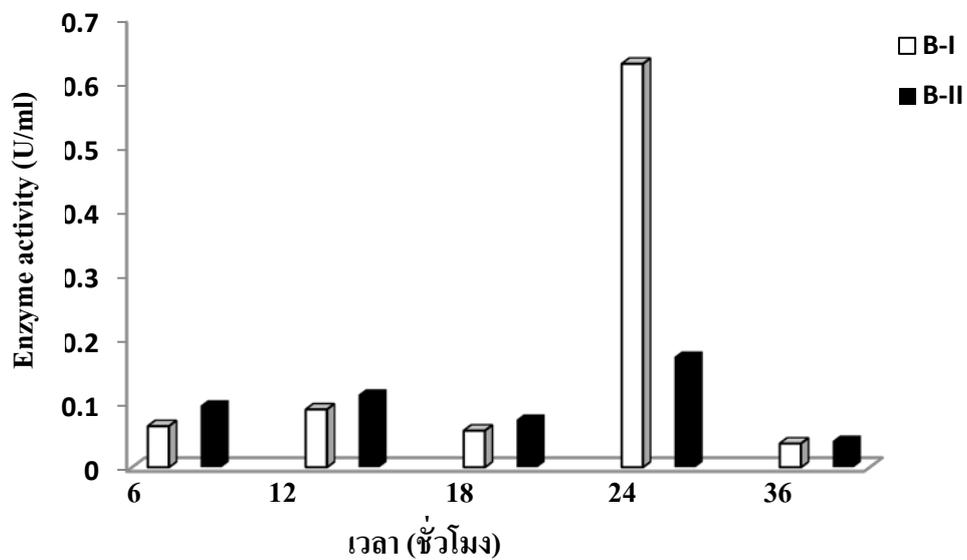
ภาพที่ 32 กิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนบั้ง

#### 4.3.5 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคตินเอสโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของหนอนผักบุ้ง

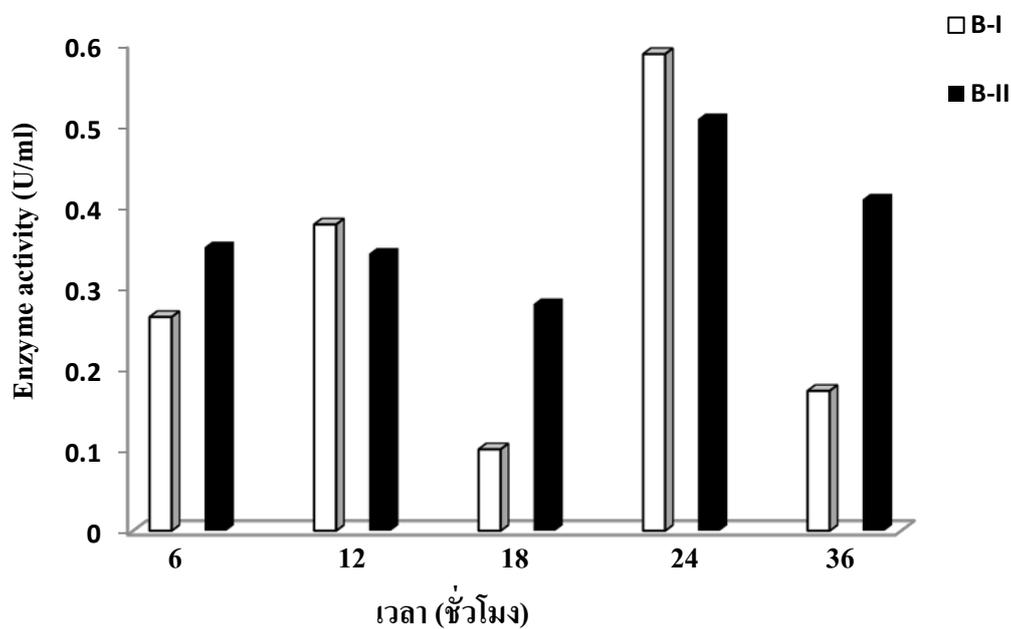
ผลการทดลองพบว่า มีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทจากทางเดินอาหารหนอนผักบุ้ง ได้แก่ ไอโซเลทรหัส B-I และ B-II โดยทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 4 ชนิด กล่าวคือ รหัส B-I ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ภาพที่ 33) ไซลานเนส (ภาพที่ 34) และอะไมเลส (ภาพที่ 35) ได้ 0.109 0.172 และ 0.587 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่รหัส B-II สร้างเอนไซม์เพคตินเอสสูงที่สุด คือ 0.980 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 36)



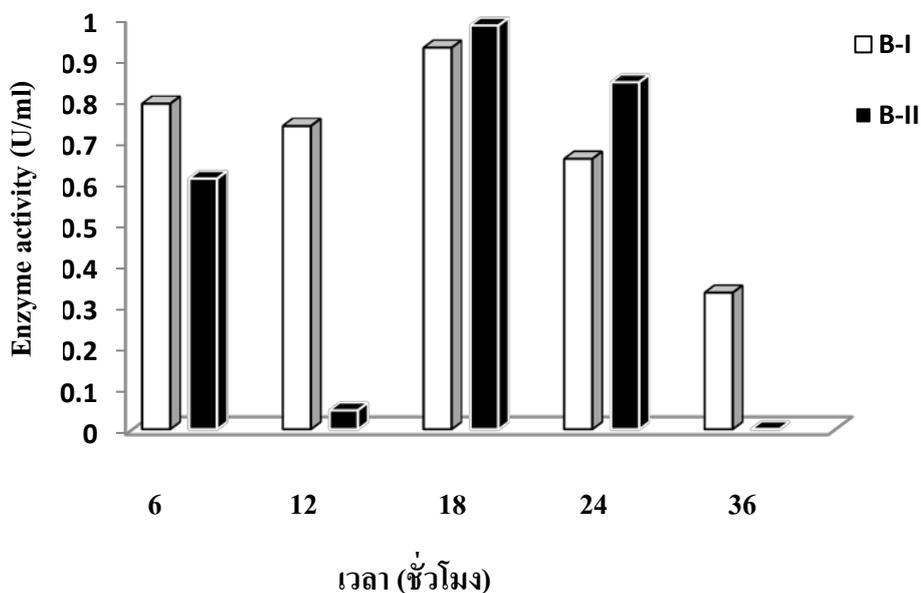
ภาพที่ 33 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนผักบุ้ง



ภาพที่ 34 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลันเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนผักบุ้ง



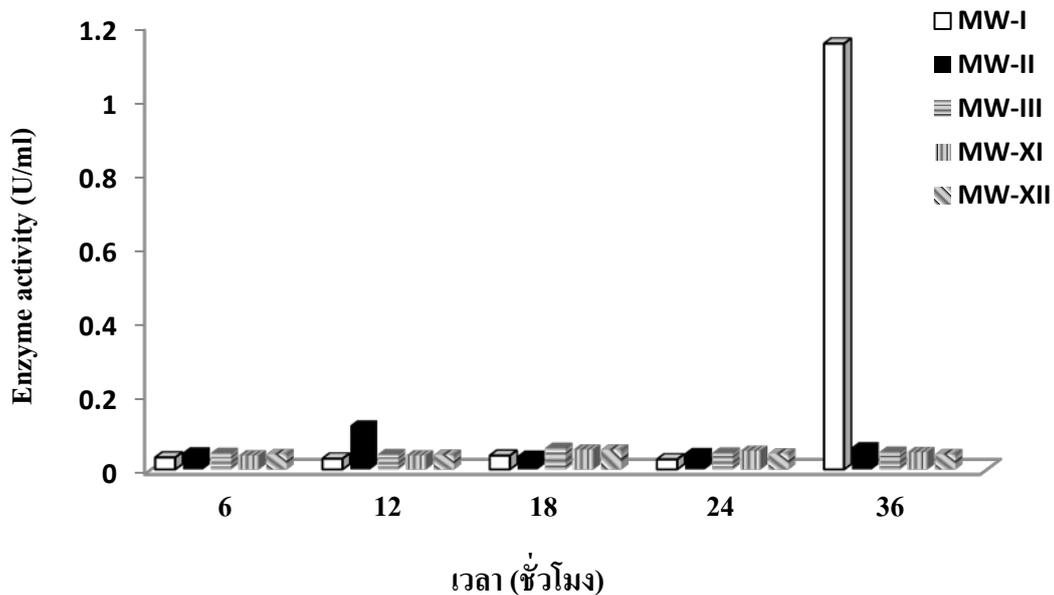
ภาพที่ 35 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนผักบุ้ง



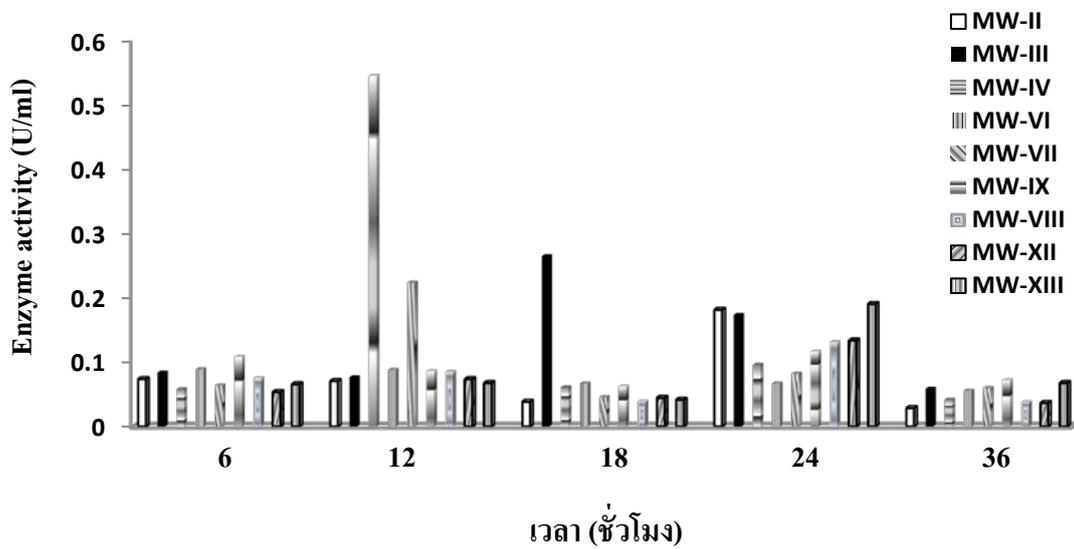
ภาพที่ 36

#### 4.3.6 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลानเนส อะไมเลส และเพคตินเอสโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของหนอนนก

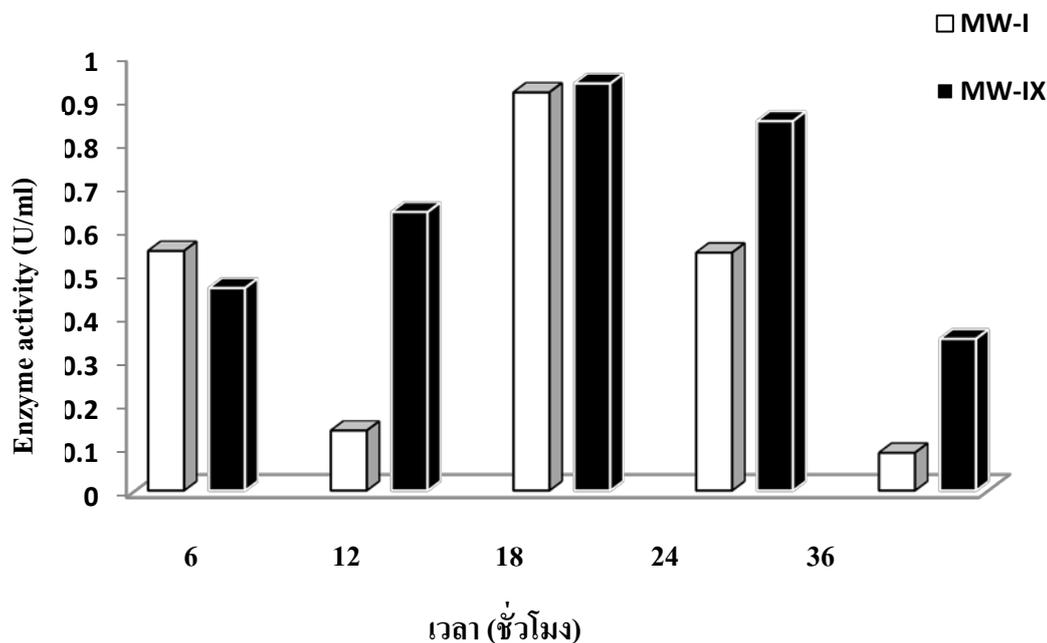
ผลการทดลองพบว่า มีแบคทีเรีย 11 ไอโซเลทจากทางเดินอาหารหนอนนก ได้แก่ ไอโซเลทรหัส MW-I MW-II MW-III MW-IV MW-VI MW-VII MW-VIII MW-IX MW-XI MW-XII และ MW-XIII โดยไอโซเลท MW-I MW-II MW-III MW-XI และ MW-XII สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งรหัส MW-I มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 1.150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 37) ส่วนรหัส MW-II MW-III MW-IV MW-VI MW-VII MW-VIII MW-IX MW-XII และ MW-XIII สามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนสได้ 0.544 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 38) ในขณะที่รหัส MW-I และ MW-IX สร้างเอนไซม์เพคตินเอสได้ โดยรหัส MW-IX มีกิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเอสสูงสุด คือ 0.934 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 37 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนนก



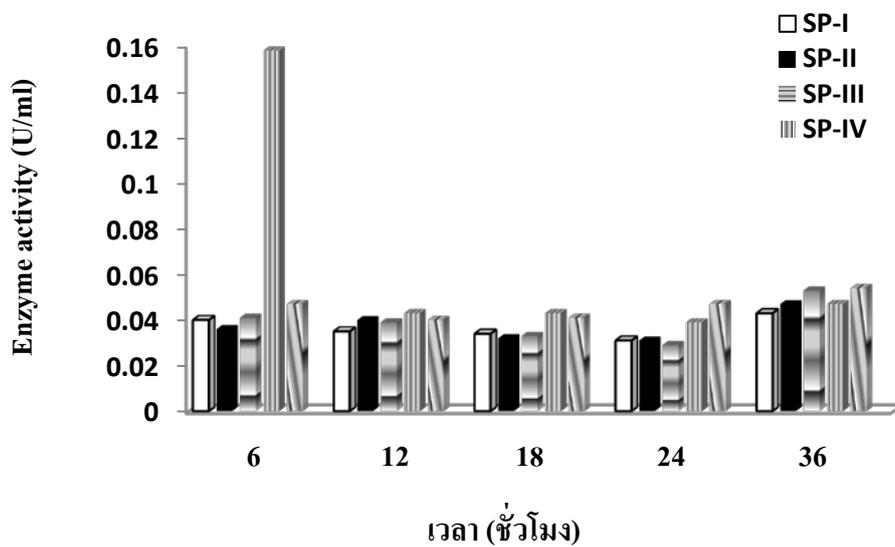
ภาพที่ 38 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนนก



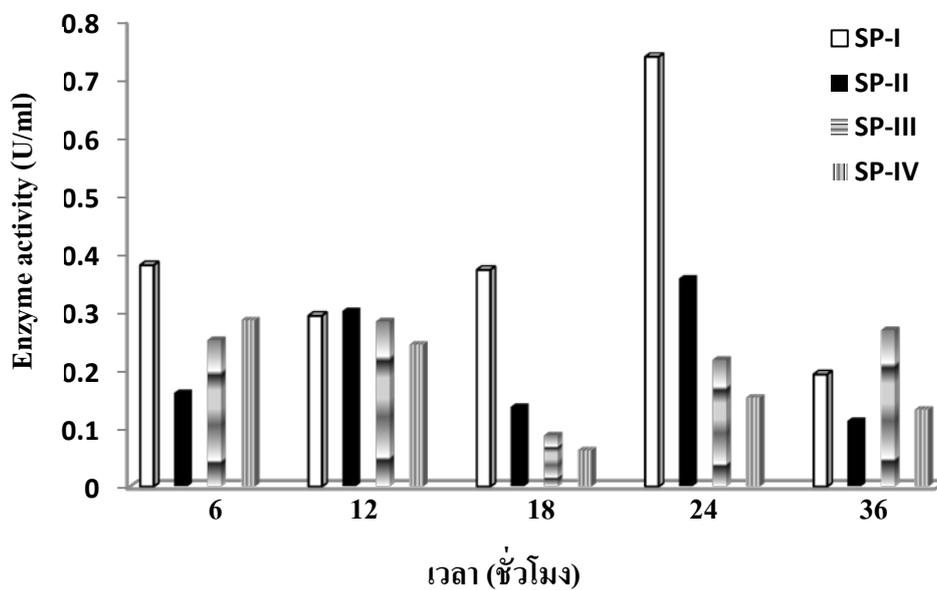
ภาพที่ 39 กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนนก

#### 4.3.7 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส อะไมเลส และเพคติเนสโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของหนอนม้วนใบกล้วย

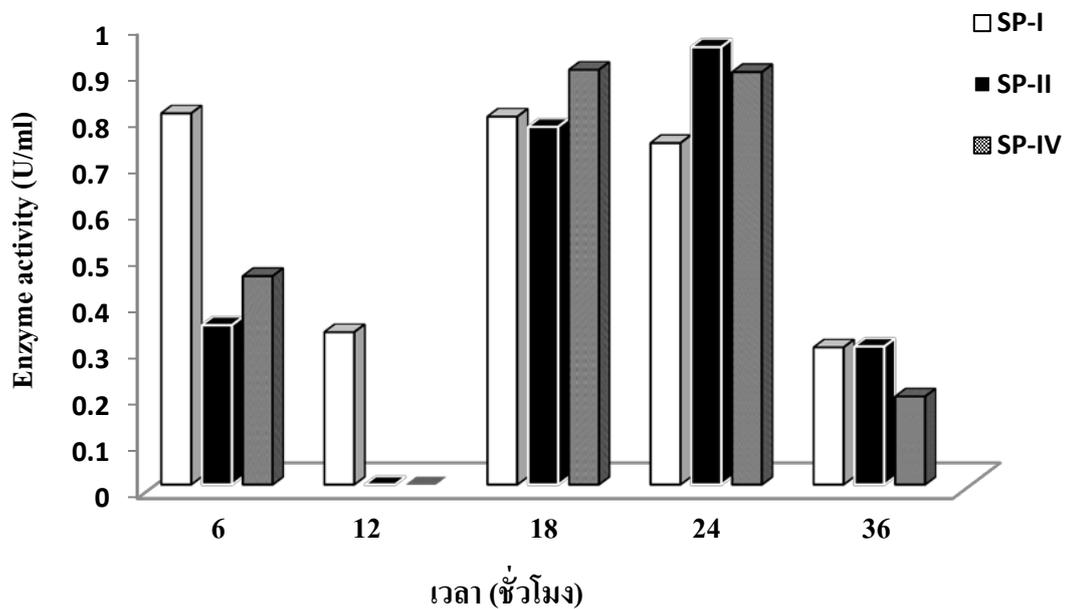
ผลการทดลองพบว่า มีแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทจากทางเดินอาหารหนอนม้วนใบกล้วย ได้แก่ ไอโซเลทรหัส SP-I SP-II SP-III SP-IV และ SP-V โดยไอโซเลท SP-I และ SP-II สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสได้ นอกจากนี้รหัส SP-I SP-II SP-III SP-IV และ SP-V สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งรหัส SP-IV มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ 0.158 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 40) ส่วนรหัส SP-I สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดได้ 0.738 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 41) ในขณะที่รหัส SP-II สร้างเอนไซม์เพคติเนสสูงที่สุด คือ 0.944 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 42)



ภาพที่ 40 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนม้วนใบกล้วย



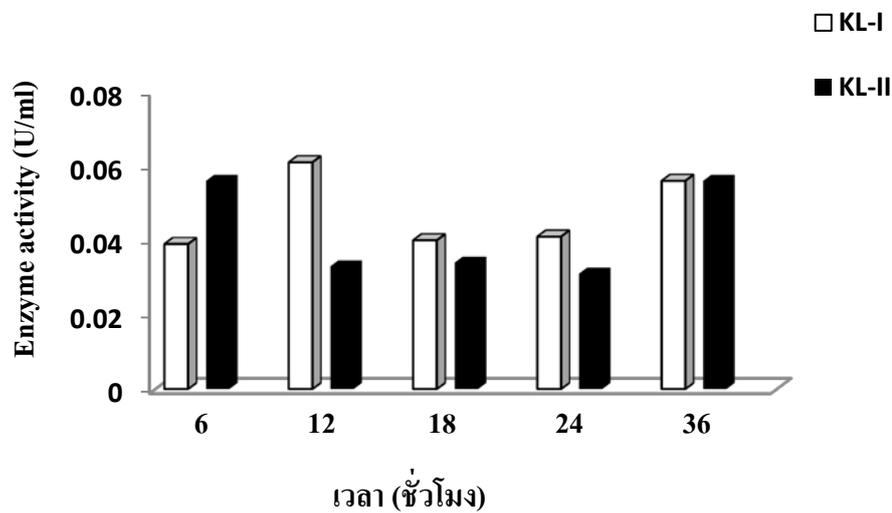
ภาพที่ 41 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนม้วนใบกล้วย



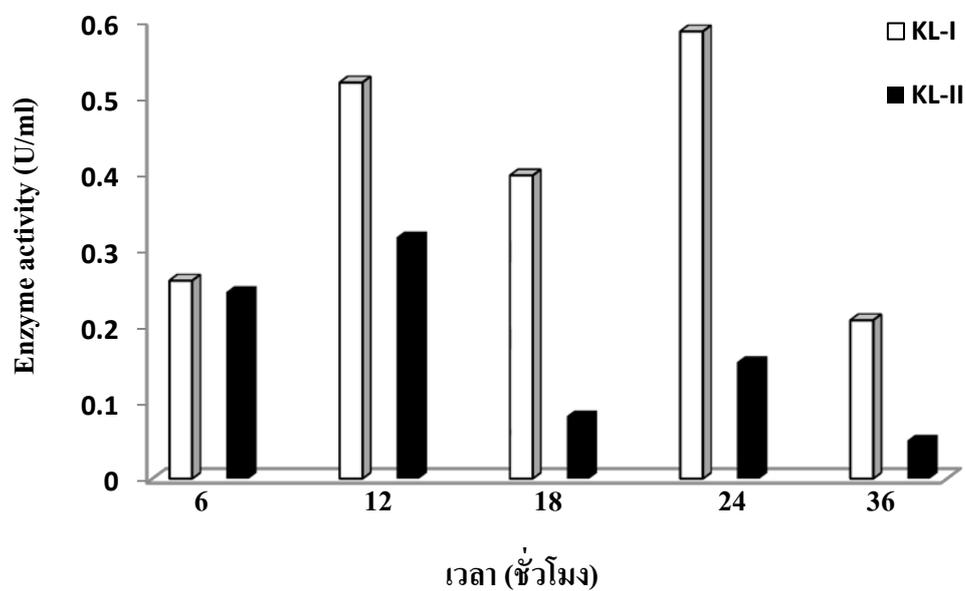
ภาพที่ 42 กิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนม้วนใบกล้วย

#### 4.3.8 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนสโดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของหนอนใบคะน้า

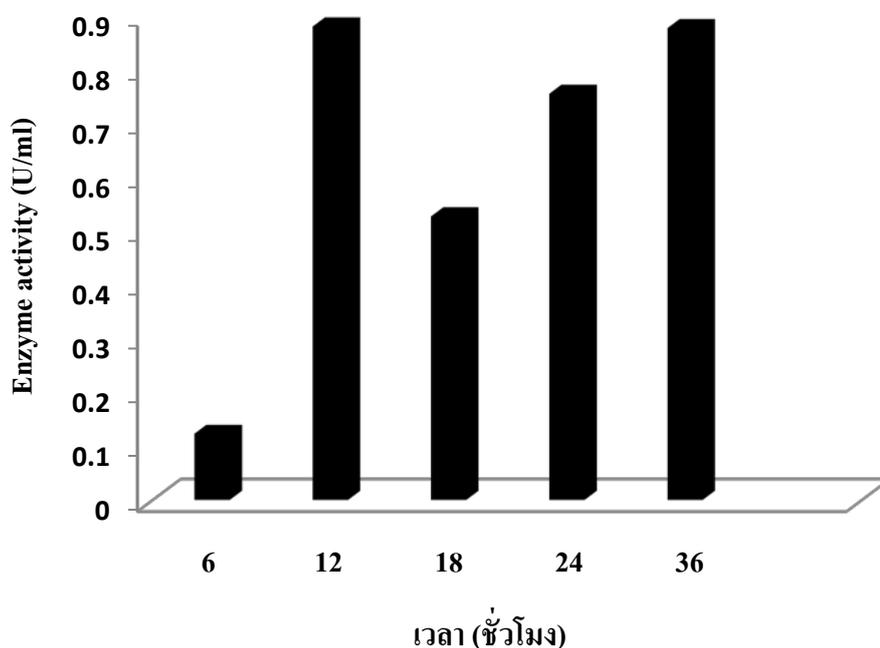
ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทจากทางเดินอาหารหนอนใบคะน้า ได้แก่ ไอโซเลทรหัส KL-I และ KL-II โดยไอโซเลท KL-II สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคตินเนสได้ ซึ่งรหัส KL-I มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ภาพที่ 43) และเอนไซม์อะไมเลส (ภาพที่ 44) สูงสุดเท่ากับ 0.061 และ 0.586 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่รหัส KL-II สร้างเอนไซม์เพคตินเนสสูงที่สุด คือ 0.879 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 45)



ภาพที่ 43 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนใบคะน้า



ภาพที่ 44 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนใบคะน้า



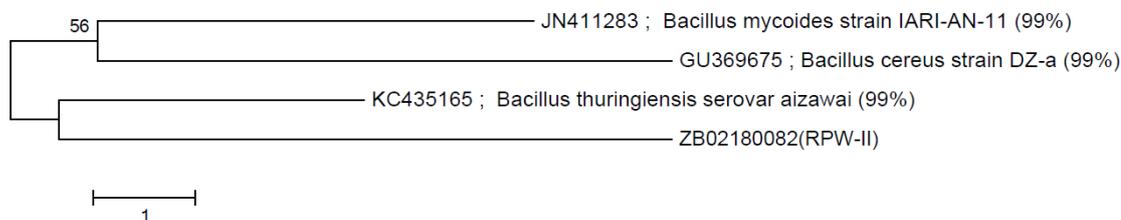
ภาพที่ 45 กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากหนอนใบคะน้า

#### 4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

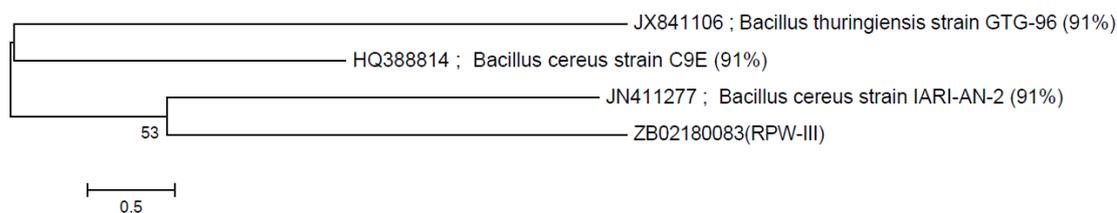
เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคติเนสมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดย 16S rRNA ผลการวิเคราะห์มีดังนี้

##### 4.4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างด้วงมะพร้าว

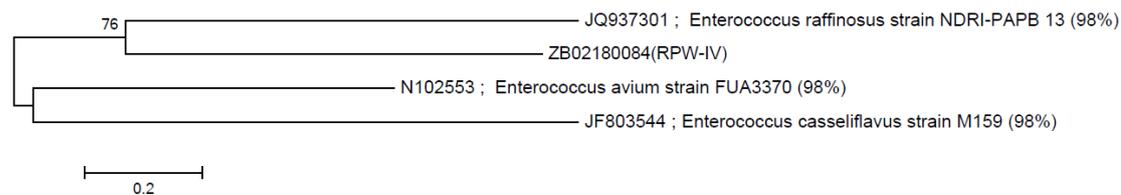
แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารด้วงมะพร้าวสามารถเทียบเคียงกับแบคทีเรียใน GenBank 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* (homology ร้อยละ 99) (ภาพที่ 46) *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 91) (ภาพที่ 47) และ *Enterococcus raffinosus* (homology ร้อยละ 99) (ภาพที่ 48)



ภาพที่ 46 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RPW-II ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคตินเอส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างด้วงมะพร้าว (*Rhynchophorus ferrugineus Olivier*)



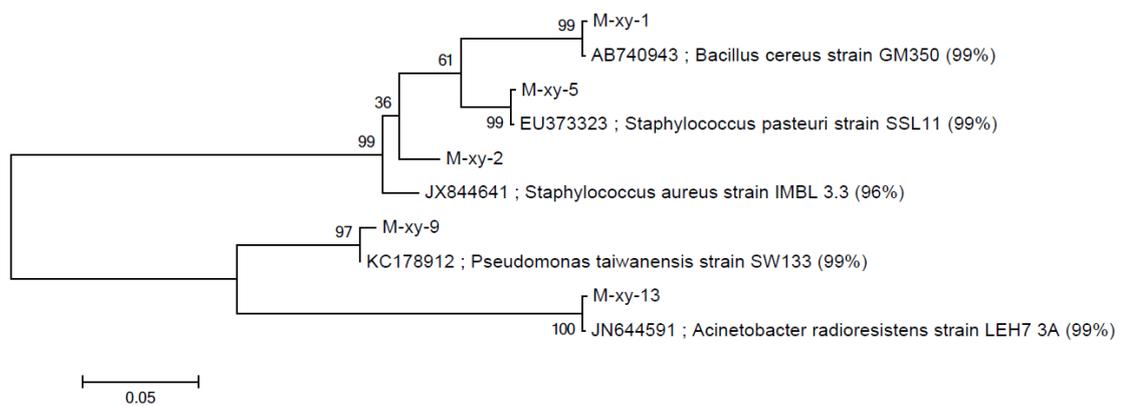
ภาพที่ 47 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RPW-III ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และเพคตินเอส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างด้วงมะพร้าว (*Rhynchophorus ferrugineus Olivier*)



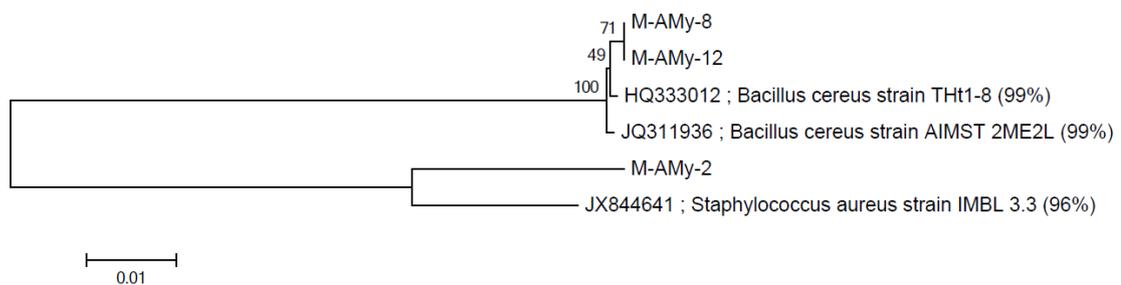
ภาพที่ 48 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส RPW-IV ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และเพคตินเอส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างด้วงมะพร้าว (*Rhynchophorus ferrugineus Olivier*)

#### 4.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างหนอนปลอก

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารหนอนปลอกสามารถเทียบเคียงกับแบคทีเรียใน GenBank 6 สายพันธุ์ โดยในภาพที่ 49 แสดงแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนสได้ ได้แก่ *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 99) *Staphylococcus aureus* (homology ร้อยละ 96) *Staphylococcus pasteurii* (homology ร้อยละ 99) *Pseudomonas taiwanensis* (homology ร้อยละ 99) และ *Acinetobacter radioresistens* (homology ร้อยละ 99) ในขณะที่ภาพที่ 50 แสดงแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (homology ร้อยละ 96) *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 99)



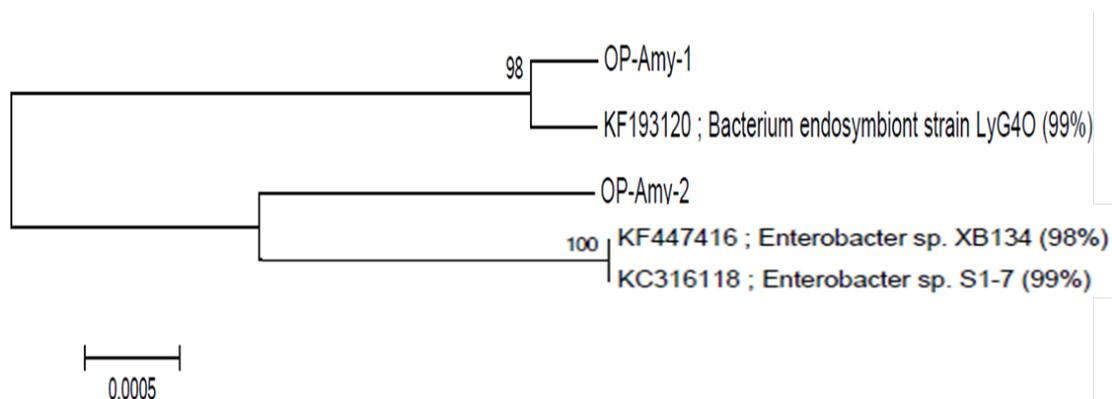
ภาพที่ 49 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส M-I M-II M-V M-IX และ M-XIII ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลานเนส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนปลอก (Bagworm)



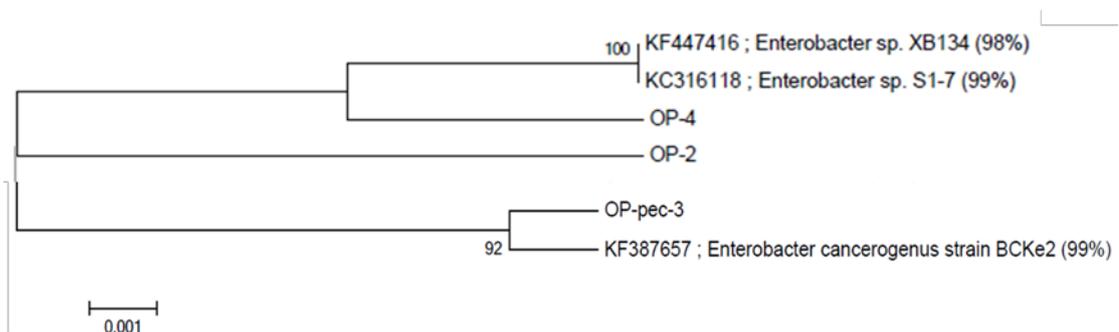
ภาพที่ 50 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส M-II M-VIII และ M-XII ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนปลอก (Bagworm)

#### 4.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างหนอนปลอกเหลือง

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารหนอนปลอกเห็องสามารถเทียบเคียงกับแบคทีเรียใน GenBank 4 สายพันธุ์ โดยในภาพที่ 51 แสดงแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลันเนสได้ ได้แก่ *Bacterium endosymbiont* (homology ร้อยละ 99) และ *Enterobacter* sp. (homology ร้อยละ 98) ในขณะที่ภาพที่ 52 แสดงแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพคตินเนส ได้แก่ *Enterobacter* sp. (homology ร้อยละ 98) *Enterobacter cancerogenus* (homology ร้อยละ 98) และ *Enterobacter* sp. (homology ร้อยละ 99)



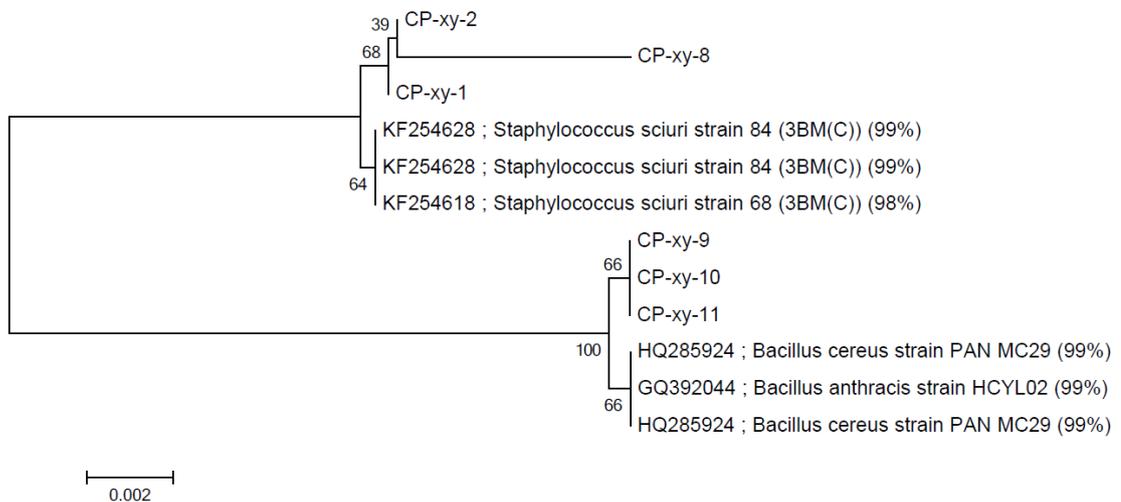
ภาพที่ 51 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส OP-I และ OP-II ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนปลอกเห็อง (*Orgyia postica*)



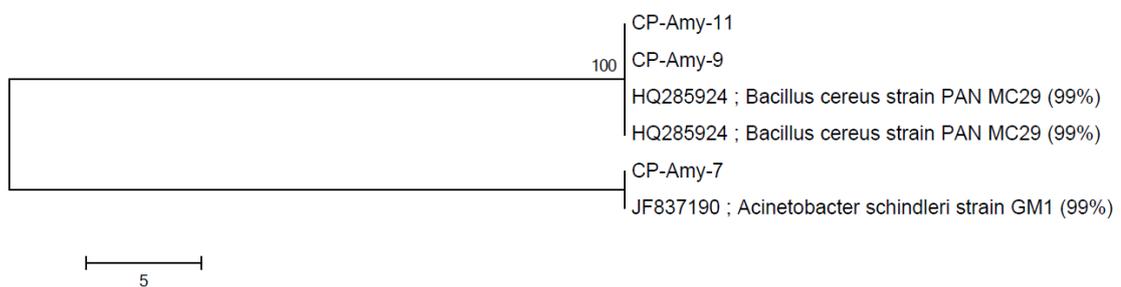
ภาพที่ 52 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส OP-II OP-III และ OP-IV ที่สามารถสร้างเอนไซม์เพคตินเนส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนปลอกเห็อง (*Orgyia postica*)

4.4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างหนอนบู่

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารหนอนบู่สามารถเทียบเคียงกับแบคทีเรียใน GenBank 5 สายพันธุ์ โดยในภาพที่ 53 แสดงแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลันเนสได้ ได้แก่ *Staphylococcus sciuri* (homology ร้อยละ 99) *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 99) และ *Bacillus anthracis* (homology ร้อยละ 99) ในขณะที่ภาพที่ 54 แสดงแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ *Acinetobacter schindleri* (homology ร้อยละ 99) และ *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 99)



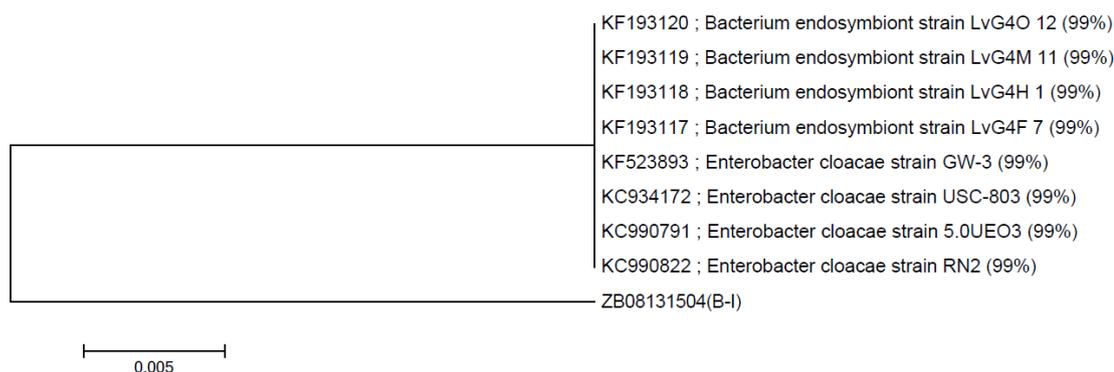
ภาพที่ 53 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส CP-I CP-II CP-VIII CP-IX และ CP-XI ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลันเนส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนบู่ (*Eupterote testacca* Walker)



ภาพที่ 54 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส CP-VII CP-IX และ CP-XI ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนบู่ (*Eupterote testacca* Walker)

#### 4.4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างหนอนผักบึ้ง

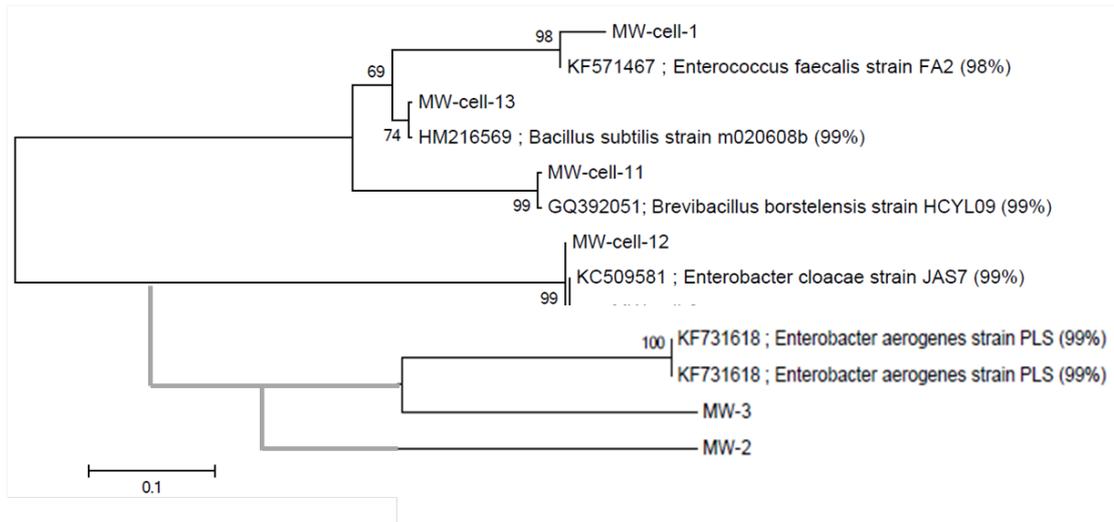
แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารหนอนผักบึ้งสามารถเทียบเคียงกับแบคทีเรียใน GenBank 1 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียรหัส B-I สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคติเนสได้ ได้แก่ *Enterobacter cloacae* (homology ร้อยละ 99) ซึ่งแสดงดังภาพที่ 55



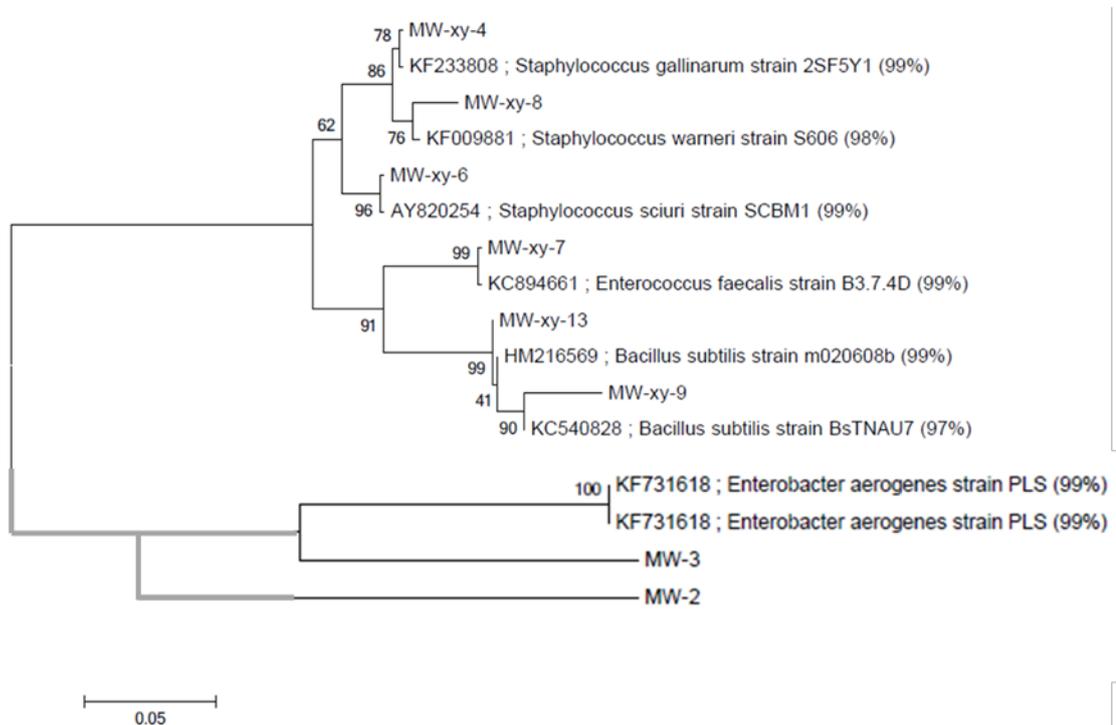
ภาพที่ 55 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส B-I ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลสและเพคติเนส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนผักบึ้ง (*Trichoplusia ni* (Hubner))

#### 4.4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างหนอนนก

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารหนอนนกสามารถเทียบเคียงกับแบคทีเรียใน GenBank 11 สายพันธุ์ โดยในภาพที่ 56 แสดงแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ได้แก่ *Enterococcus faecalis* (homology ร้อยละ 98) *Enterobacter aerogenes* (homology ร้อยละ 99) *Brevibacillus borstelensis* (homology ร้อยละ 99) *Enterobacter cloacae* (homology ร้อยละ 99) และ *Bacillus subtilis* (homology ร้อยละ 99) ในขณะที่ภาพที่ 57 แสดงแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ไชลานเนส ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* (homology ร้อยละ 99) *Staphylococcus gallinarum* (homology ร้อยละ 99) *Staphylococcus sciuri* (homology ร้อยละ 99) *Enterococcus faecalis* (homology ร้อยละ 99) *Staphylococcus warneri* (homology ร้อยละ 99) *Bacillus subtilis* strain (homology ร้อยละ 97) และ *Enterobacter cloacae* (homology ร้อยละ 99)



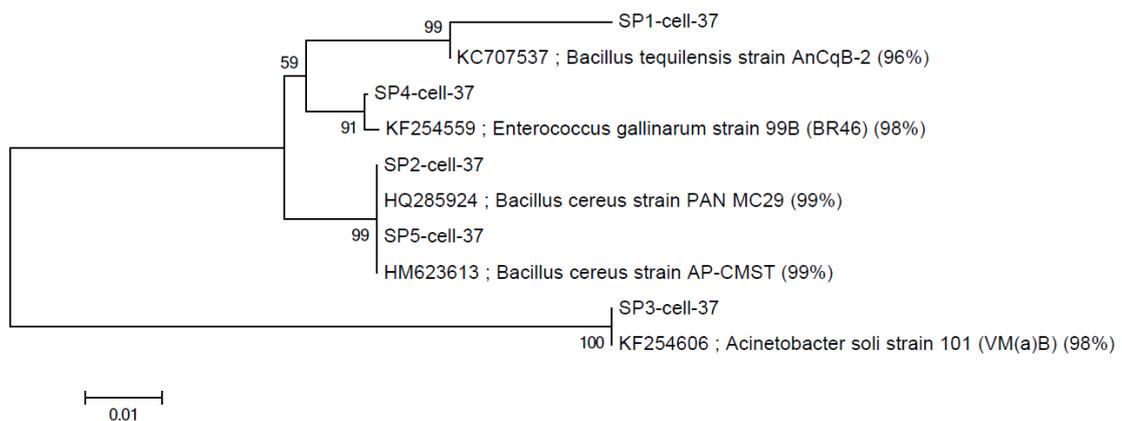
ภาพที่ 56 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส MW-I MW-II MW-III MW-XI MW-XII และ MW-XIII ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนนก (*Tenebrio molitor*)



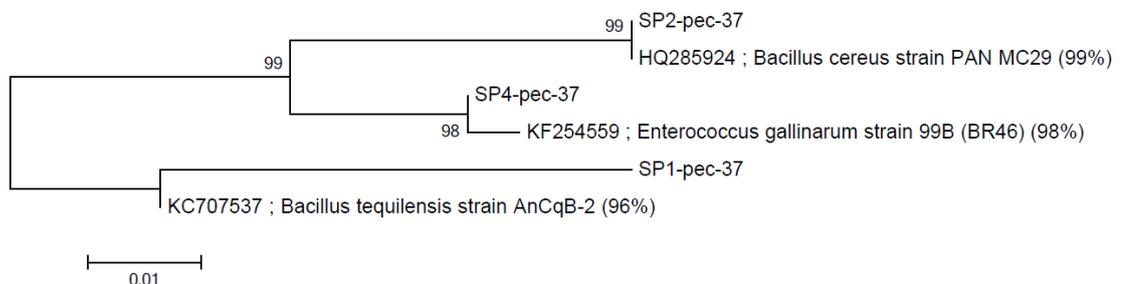
ภาพที่ 57 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส MW-II MW-III MW-IV MW-VI MW-VII MW-VIII MW-IX MW-XII และ MW-XIII ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลลาเนสซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนนก (*Tenebrio molitor*)

#### 4.4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างหนอนม้วนใบกล้วย

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารหนอนม้วนใบกล้วยสามารถเทียบเคียงกับแบคทีเรียใน GenBank 5 สายพันธุ์ โดยในภาพที่ 58 แสดงแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ได้แก่ *Bacillus tequilensis* (homology ร้อยละ 96) *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 99) *Acinetobacter soli* (homology ร้อยละ 98) และ *Enterococcus gallinarum* (homology ร้อยละ 98) ในขณะที่ภาพที่ 59 แสดงแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพคตินเอส ได้แก่ *Bacillus tequilensis* (homology ร้อยละ 96) *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 99) และ *Enterococcus gallinarum* (homology ร้อยละ 98)



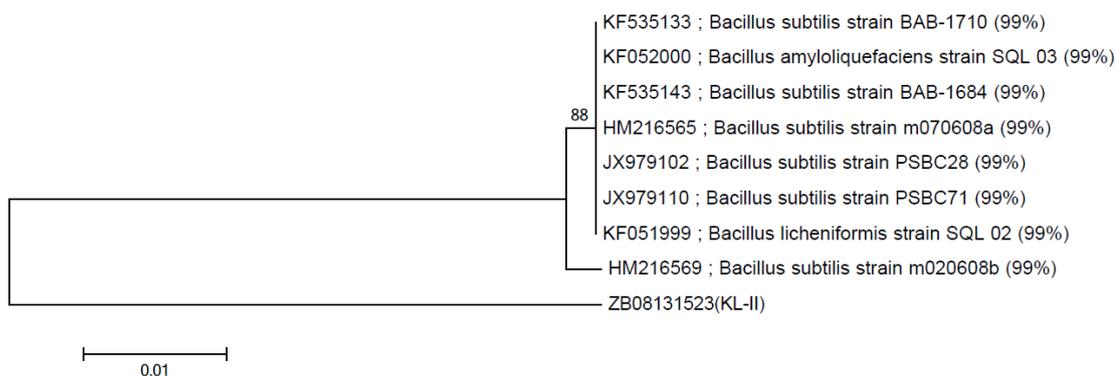
ภาพที่ 58 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส SP-I SP-II SP-III SP-IV และ SP-V ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนม้วนใบกล้วย (*Erionata thrax* Linnaeus)



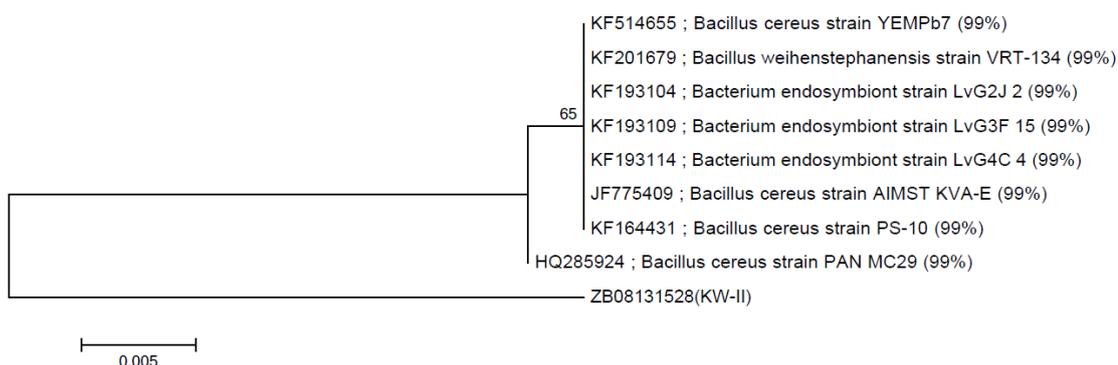
ภาพที่ 59 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส SP-I SP-II และ SP-IV ที่สามารถสร้างเอนไซม์เพคตินเอส ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนม้วนใบกล้วย (*Erionata thrax* Linnaeus)

#### 4.4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างหนอนใบคะน้า

แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารหนอนใบคะน้าสามารถเทียบเคียงกับแบคทีเรียใน GenBank 2 สายพันธุ์ โดยในภาพที่ 60 แสดงแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลสได้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* (homology ร้อยละ 99) ในขณะที่ภาพที่ 61 แสดงแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคตินเอส ได้แก่ *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 99)



ภาพที่ 60 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส KL-II ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลสซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนใบคะน้า (*Plutella xylostella*)



ภาพที่ 61 Phylogenetic tree ของเชื้อแบคทีเรียรหัส KW-II ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคตินเอสซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนใบคะน้า (*Plutella xylostella*)

## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผล

ผลการแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของตัวอย่างด้วงและหนอน ได้แก่ ด้วงมะพร้าว 1 ตัวอย่าง หนอน 7 ตัวอย่าง ดังนี้ หนอนปลอก หนอนปกเหลือง หนอนผักบุ้ง หนอนบู่ หนอนนก หนอนม้วนใบกล้วย และหนอนใบคะน้า ในพื้นที่อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ 42 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Anand *et al* (2009) ที่ทำการแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้สามารถย่อยเซลลูโลส ไชแลน เพคติน และแป้ง โดยแยกแบคทีเรียได้ 11 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus circulans* และแกรมลบ ได้แก่ *Proteus vulgaris* *Klebsiella pneumonia* *Escherichia coli* *Citrobacter freundii* *Serratia liquefaciens* *Enterobacter* sp. *Pseudomonas fluorescens* *P. aeruginosa* *Aeromonas* sp. และ *Erwinia* sp. นอกจากนี้ *Pr. vulgaris* *K. pneumonia* และ *C. freundii* สร้างเอนไซม์ในกลุ่มย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic) และไชแลน (Xylanolytic) *P. fluorescens* และ *Erwinia* sp. สร้างเอนไซม์ในกลุ่มย่อยเพคติน (Pectinolytic) รวมถึง *K. pneumonia* ย่อยแป้งได้ *Aeromonas* sp. สามารถย่อย CMcellulose และ ไชแลน ส่วน *S. liquefaciens* สร้างเอนไซม์มาย่อย CMcellulose ไชแลน และเพคติน ในขณะที่ *B. circulans* สร้างเอนไซม์มาย่อย CMcellulose ไชแลน เพคติน และแป้ง ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียซึ่งสามารถย่อยโพลีแซคคาไรด์ทั้ง 4 ชนิดได้มากกว่า นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* สามารถย่อย CMcellulose ไชแลน เพคติน และแป้ง ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างหนอนผักบุ้ง (*Trichoplusia ni* (Hubner))

อีกทั้งมีผลการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลส CDB (Cellulose Degrading Bacteria) จากทางเดินอาหารของปลวก หอยทาก ดักแด้ และเหาหนังสือได้จำนวน 8 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลท CDB8 และ CDB10 ให้ผลของวงใส (clear zone) มากที่สุดเท่ากับ 48 และ 50 มิลลิเมตร และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่อ endoglucanase ตั้งแต่ 0.162-0.400 IU ต่อ มิลลิลิตร (Gupta *et al.*, 2012) อีกทั้งยังสอดคล้องกับรายงานของ Ekperigin (2007) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter anitratus* และ *Branhamella* sp. สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดย *A. anitratus* สามารถย่อย CMC และกลูโคสได้สูงสุดเท่ากับ 0.48 และ 0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ตามลำดับ ในขณะที่ *Branhamella* sp. ย่อย CMC และกลูโคสได้สูงสุดเท่ากับ 2.56 และ 0.34 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของหนอนนกสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อย CMC ได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.15 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของหนอนปกเหลืองสร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้งได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.80 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร

ในส่วนของการย่อยไซแลนมีรายงานวิจัยของ Hossain *et al* (2008) ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไซลานเนส โดยทำการแยกเชื้อจากลำไส้ปลวกงานพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส 0.86 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่งานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียจากหนอนบุง ซึ่งคือสายพันธุ์ *Staphylococcus sciuri* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนส 0.90 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร

## 5.2 สรุปผล

งานวิจัยนี้สามารถแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลส ไซลานเนส อะไมเลส และเพคตินเนส จากหนอนชนิดต่างๆ ในพื้นที่อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุงได้ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ ตัวงมะพร้าว หนอนปลอก หนอนปกเหลือง หนอนผักบุง หนอนบุง หนอนนก หนอนม้วนใบกล้วย และหนอนใบคะน้า โดยคัดแยกได้จำนวน 42 ไอโซเลท (ตัวงมะพร้าว 4 ไอโซเลท หนอนปลอก 7 ไอโซเลท หนอนปกเหลือง 4 ไอโซเลท หนอนผักบุง 2 ไอโซเลท หนอนบุง 7 ไอโซเลท หนอนนก 11 ไอโซเลท หนอนม้วนใบกล้วย 5 ไอโซเลท และหนอนใบคะน้า 2 ไอโซเลท) ที่ให้วงใสบนอาหาร CMC ไซแลน แป้ง และเพคติน จากนั้นผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16S rRNA gene sequencing ได้ทั้งสิ้น 37 สายพันธุ์ โดยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อย CMC ได้มี 9 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus thuringiensis* *Bacillus cereus* *Enterococcus raffinosus* *Enterobacter aerogenes* *Bacillus tequilensis* *Acinetobacter soli* *Enterococcus gallinarum* *Bacillus subtilis* และ *Enterobacter cloacae* นอกจากนั้นเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไซลานเนสเพื่อย่อยไซแลน มี 12 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus pasteurii* *Pseudomonas taiwanensis* *Acinetobacter radioresistens* *Staphylococcus sciuri* *Bacillus subtilis* *Enterobacter aerogenes* *Staphylococcus gallinarum* *Enterococcus faecalis* *Staphylococcus warneri* และ *Enterobacter cloacae* ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้ง มี 8 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus thuringiensis* *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* *Bacterium endosymbiont* *Enterobacter* sp. *Acinetobacter schindleri* *Bacillus subtilis* และ *Enterobacter cloacae*

ในขณะที่แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพคตินเอสเพื่อย่อยเพคติน มี 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* *Enterococcus raffinosus* *Bacillus cereus* *Enterobacter cancerogenus* *Enterobacter* sp. *Bacillus tequilensis* *Enterococcus gallinarum* และ *Enterobacter cloacae* อีกทั้งเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ โดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดคือเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส อะไมเลส และเพคตินเอส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.11 0.63 0.59 และ 0.98 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด คือ 1.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus sciuri* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไชลานเนสมากที่สุด คือ 0.90 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter* sp. มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือ 1.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter cancerogenus* มีกิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเอสสูงที่สุด คือ 1.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

งานวิจัยนี้ถือได้ว่าเป็นการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างหนอนที่มากที่สุดในประเทศไทย คือ 8 ตัวอย่าง อีกทั้งยังสามารถแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส ไชเลน แป้ง และเพคตินได้จำนวนมากกว่างานวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ โดยแยกและคัดเลือกได้ 42 ไอโซเลท เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้แบคทีเรียทั้งหมด 37 สายพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยเซลลูโลส เอนไซม์ไชลานเนสเพื่อย่อยไชเลน เอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้ง และเอนไซม์เพคตินเอสเพื่อย่อยเพคติน

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส เพคตินเอส และอะไมเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
- 2) ควรศึกษาการทำเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส เพคตินเอส และอะไมเลสให้บริสุทธิ์ ตลอดจนศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่ได้เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ต่อไป

### บรรณานุกรม

- จิตตเสน อรุณศรี . (2529). การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราที่เจริญที่อุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เฉลิม วัชระ. (2547). สืบค้นเมื่อ 3 พฤษภาคม 2556. จาก  
[http://www.thaigoodview.com/library/teachershow/songkhla/chalerm\\_w/test/  
sec01p03.html](http://www.thaigoodview.com/library/teachershow/songkhla/chalerm_w/test/sec01p03.html)
- ชนิดา เลิศศลารักษ์ (2543). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลานเนสจาก alkaliphilic  
*Bacillus firmus* K-1. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัย  
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ณัฐา วิศิษฐ์วิทยากร และชนศักดิ์ พิณไชยงค์. (2548). หนอนนกทางเลือกสำหรับอาหารสัตว์น้ำ.  
วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 13(2): 9-16.
- นฤมล นະธรรมโน. (2544). สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่เรียก  
ร่อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. เชียงใหม่ :มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พิจิตรา ตั้งเขื่อนขันธุ์, รสรินทร์ รุจนาพันธ์ และ อัญชลี อำนาจสมบุญ. (2548) . การคัดเลือกเชื้อ  
ราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัชพืชมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน. วิทยานิพนธ์  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. กรุงเทพมหานคร: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร  
ลาดกระบัง
- ระพีพรรณ อินปั้นแก้ว. (2536). แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและการผลิตเอนไซม์  
เซลลูเลส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เลอลักษณ์ จิตรดอน , พลสันต์ มหพันธ์, วิเชียร กิจปรีชาวนิช และ นภา โล่ทอง .(2535). สภาวะที่  
เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสในวัสดุอาหารแข็ง โดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. 26R ที่  
สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ:  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมใจ ศิริโกศล. (2537). เทคโนโลยีการหมัก. พิมพ์ครั้งที่ 1 ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. หน้า 84-107.
- สุริรัตน์ คู่ชุมพู่ . (2548). การคัดแยกและจัดจำแนกราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส. โครงการวิจัย.  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต: มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม.
- อานนท์ เศษจำรูญ .(2547). ธุรกิจอาหารปลาสวยงาม. พงษ์สาส์น. กรุงเทพมหานคร
- Abhay Kumar, V.K., and Dube, H.C. (1992). Cellulase of *Vibrio agar- liquefaciens* isolated  
from sea mud. World Journal Microbiology Biotechnology. 8: 313- 315.

- Adamsen, A.K., Lindhagen, J. and Ahring, B.K., 1995 Optimization Of Extracellular Xylanase Production by *Dictyoglomus* sp. B1 in Continuous Culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44(9): 327-332.
- Anand, A.A.P, Vennison, S.J., Sankir, S.G., Prabhu, D.I.G., Vasana, P.T., Raghuraman, T., Geoffrey, C.J. and Vendan, S.E. (2009). Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*. 10(107): 1-20.
- Bashir, Z., Kondpalli, V.K., Adlakha, N., Sharma, A., Bhatnagar, R.K., Chandel, G. and Yazdani, S.S. (2013). Diversity and functional significance of cellulolytic microbes living in termite, pill bug and stem-borer guts. *Scientific Reports*. 3(2558): 1-11. doi: 10.103/srep02558
- Biswas, S.R., Mishra, A.K. and Nanda, G. (1988) Xylanase and B-xylosidase Production by *Aspergillus ochraceus* During Growth on Lignocelluloses. *Bioengineering*. 31(13): 613-616.
- Campbell, L.L. and Cleveland, P.D. (1961). Thermostable  $\alpha$ -amylase of *B. stearothermophilus*. I crystallization and some general properties. *Journal Biology Chemistry*. 236: 2952-2957.
- Collmer and N.T.Keen. (1988). Assay method for pectic enzyme. *Method Enzymology* .161:329-399
- Deuel, H. and E. Stutz. (1958). Pectin substances and pectin enzyme, in F.F. Nord (ed.). *Advances in Enzymology*. 20. Interscience Publisher Inc., London
- Ekperigin, M.M. (2007). Preliminary studies of cellulose production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella* sp. *African Journal of Biotechnology*. 6(1): 28-33.
- Evans, D.E. (1983). The biology of stored products Colepter. *Proceedings of Australian Development Assistance Course on Preservation of Stored Cereals*. CSIRO Division of Entomology Canberra Australia, p.149-185.
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. (1980). Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. *Microbial Enzyme and Bioconverters*. 5: 116-158.
- Gupta, P., Samant, K. and Sahu, A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*. 578925: 1-5. doi:10.1155/2012/578925

- Harholt, J., Suttangkakul, A. and Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*. 153 (2): 384-395.
- Honda, H., Kudo, T., Ikura, Y. and Horikoshi, K., (1985). Two Types of Xylanases of Alkalophilic *Bacillus sp.* No.C-125. *Canadian Journal of Microbiology*. 31: 538-542.
- Hossain, M.M., Uddin, M.A., Malek, M.A., Bashar, SAM.K., Noor, P. and Rahman, M.M. (2008). Production of extracellular xylanase from intestinal bacteria in termite. *Bangladesh Journal Microbiology*. 25(2): 123-127.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., and Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*. 57(5): 503-507.
- Klyosov, A.A. (1990). Trends in biochemistry and enzymology of cellulase degradation. *Biochemistry*. 29: 10577-10585.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glockner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41(1): 1-11.
- Lee, M, L. Miller and Macmillan, J.D. (1970). Similarities in the action patterns of exopolysaccharidase and pectinesterase from *Costidium multifurcans*. *Journal Bacteriology*. 103: 595-600.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analysis Chemistry*. 31: 426- 428.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion Plant Biology*. 11 (3): 266- 277.
- Mukesh kuma, . D. J., Saranya , G. M., Suresh,. K, Andal Priyadharshini, D ., Rajakumar and Kalaichelvan ,P. T. (2012). Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus sp.* MFW7 using Cassava Waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2(3): 369-375.
- Naturphoto. (2014). สีสันเมื่อ 2 มกราคม 2557 จาก [http://www.naturphoto-cz.com/หนอนนก-picture\\_th-19456.html](http://www.naturphoto-cz.com/หนอนนก-picture_th-19456.html)

Reynolds, R.J. (2013). สืบค้นเมื่อ 16 ธันวาคม 2556 จาก

<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1440110>

Sea-Lee, N.(2007). The production of fungal mammanase cellulase and xylanase using plam kernel meal as a substrate. Walailak Journal Science and Technology. 4(1): 67-82.

ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก

#### 1. การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (Miller, 1959)

##### สารเคมี

1. 3,5-Dinitrosalicylic acid
2. ฟีนอล
3. โซเดียมซัลไฟด์
4. โพแทสเซียมโซเดียมคาร์เตรท
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์

##### วิธีการเตรียมสารเคมี

เตรียมสารละลาย DNS โดยชั่ง 3,5-Dinitrosalicylic acid 1.5 กรัม ฟีนอล 0.1 มิลลิลิตร โซเดียมซัลไฟด์ 0.075 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมคาร์เตรท 30 กรัม ละลายในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.9 กรัมปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 150 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

1.1 เตรียมสารละลายของน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ปิเปตสารละลายในข้อ 1.1 มาความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)

1.3 เติมน้ำกลั่น DNS (3-5dinitrosalicylic acid) reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

1.5 เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

1.7 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

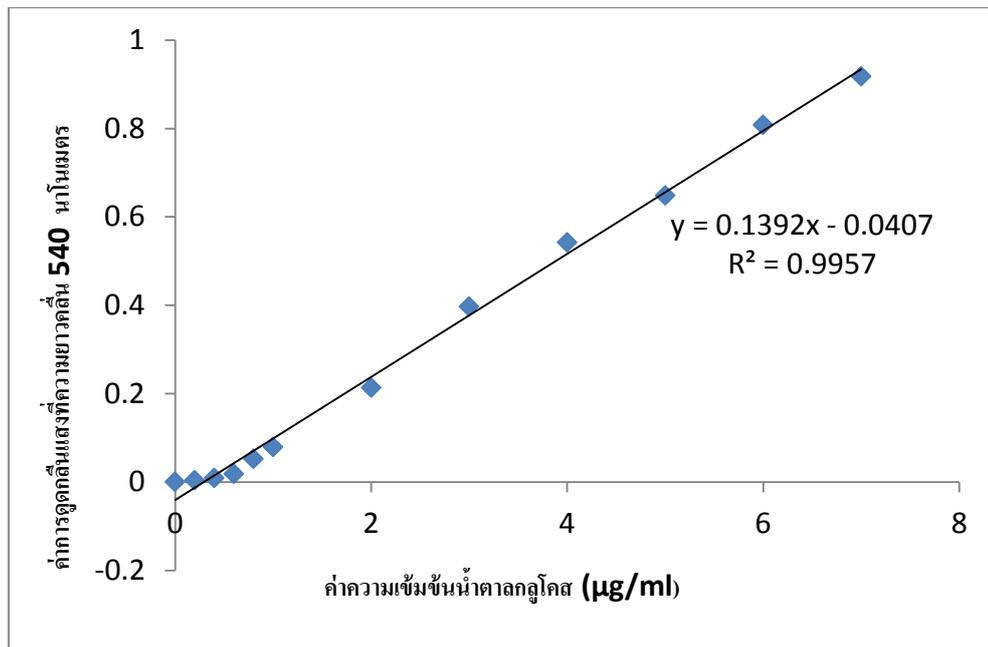
##### วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำ culture broth ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (culture supernatant) ซึ่งคือสารละลายเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยในหลอดทดลองมีส่วนผสมดังนี้

1. สารละลายเอนไซม์หยาบปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
2. สารตั้งต้น: กรณีเอนไซม์เซลลูเลส ใช้สารละลาย CMC ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ซึ่งละลายในซิตเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
  - กรณีเอนไซม์ไซลันเนส ใช้สารละลายไซเลนความเข้มข้นร้อยละ 1 (ซึ่งละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
  - กรณีเอนไซม์อะไมเลส ใช้สารละลาย soluble starch ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ซึ่งละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
  - กรณีเอนไซม์เพคตินาส ใช้สารละลายเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 1 (ซึ่งละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
3. นำส่วนผสมไปบ่ม ดังนี้
  - เอนไซม์เซลลูเลสบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
  - เอนไซม์ไซลันเนสบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
  - เอนไซม์อะไมเลสบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
  - เอนไซม์เพคตินาสบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มล.
5. ต้มในน้ำเดือด 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นทันที
6. ทำการเจือจางด้วยการเติมน้ำกลั่น 4 มล.
7. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยเทียบกับกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ตารางภาพผนวก ก-1 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0	0
0.2	0.004
0.4	0.009
0.6	0.018
0.8	0.052
1.0	0.079
2.0	0.213
3.0	0.397
4.0	0.542
5.0	0.648
6.0	0.808
7.0	0.918



ภาพภาคผนวก ก-1 กราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

**ภาคผนวก ข**  
**ผลสัมฤทธิ์**

**การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ ดังนี้**

ซัล ไลลา แวมะยิ นิภาภรณ์ จิตเชาวนะ มณฑล เลิศวรปรีชา และ วิชชุดา กล้าเวช. 2556. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากระบบทางเดินอาหารของหนอนม้วนใบกล้วย. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ประจำปี 2556 22-24 พฤษภาคม 2556 หน้า 1004-1009.

นิภาภรณ์ จิตเชาวนะ ซัล ไลลา แวมะยิ วิชชุดา กล้าเวช และมณฑล เลิศวรปรีชา. 2556. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เพคติเนสจากระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนด้วงมะพร้าว. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ประจำปี 2556 22-24 พฤษภาคม 2556 หน้า 799-804.

ซัล ไลลา แวมะยิ นิภาภรณ์ จิตเชาวนะ มณฑล เลิศวรปรีชา และ วิชชุดา กล้าเวช . การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และอะไมเลสจากทางเดินอาหารของหนอนม้วนใบกล้วย. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6 มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20-21 มีนาคม 2557 หน้า 141.

นิภาภรณ์ จิตเชาวนะ ซัล ไลลา แวมะยิ วิชชุดา กล้าเวช และมณฑล เลิศวรปรีชา. การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และอะไมเลสจากทางเดินอาหารของตัวอ่อนด้วงมะพร้าว. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6 มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20-21 มีนาคม 2557 หน้า 140.

ซัล ไลลา แวมะยิ นิภาภรณ์ จิตเชาวนะ มณฑล เลิศวรปรีชา และ วิชชุดา กล้าเวช . การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส อะไมเลส และเพคติเนสจากทางเดินอาหารของหนอนนก. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วลัยลักษณ์วิจัย ครั้งที่ 6 มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ 3-4 กรกฎาคม 2557 หน้า 79.

นิภาภรณ์ จิตเชาวนะ ซัล ไลลา แวมะยิ วิชชุดา กล้าเวช และมณฑล เลิศวรปรีชา. การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส อะไมเลส และเพคติเนสจากทางเดินอาหารของหนอนคืบกะหล่ำ. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วลัยลักษณ์วิจัย ครั้งที่ 6 มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ 3-4 กรกฎาคม 2557 หน้า 77.