ชื่อเรื่อง การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

หัวหน้าโครงการ: นางสาวนันทวัน ฤทธิ์เดช

ผู้ช่วยวิจัย:นาย ณัฐพล ชาฮาม

ที่อยู่: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาสาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยจะทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคสิเดส ซึ่งสามารถย่อยสลายโครงสร้างของเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพเช่น เอทานอล จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทในครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่แปลงทดลองเขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 4 แปลง แปลงทดลองละ 16 ตัวอย่าง คัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 190 ไอโซเลท แล้วทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar พบว่า ไอโซเลท $CDF_2L_1D_{13}$ มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดซึ่งพบค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดเคลียร์โซนกับขนาดโคโลนี เท่ากับ 14.02 จากนั้นได้นำเชื้อไอโซเลตนี้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคสิเดส ในอาหาร CMC broth ที่มีการแปลผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าไอโซเลท $CDF_2L_1D_{13}$ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2.639 U/mlในแหล่งคาร์บอนที่ได้จากฟางข้าว ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคสิเดส สูงสุดคือ เปปโตน ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 5.443 U/ml. นอกจากนี้ยังมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อไอโซเลท $CDF_2L_1D_{13}$ พบว่ามีรูปร่างของอัปสปอร์ม้วนเป็นวงกลม ลักษณะคล้าย loop คาดว่าน่าจะอยู่ใน genus *Streptosporangium.*

Title of Project : Screening of cellulolytic actinomycetes from soil for producing sugar from agricultural residues

Author: Miss Nuntavun Riddech

Assistant researcher: Mr. Natthapon Saham

Address: Department of Microbiology, Faculty of Science in Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Abstract

The aim of this study was to isolate cellulolytic actinomycetes from soil for sugar production by using agricultural residues as substrate. Enzyme β glucosidase can degrade cellulose to glucose and use glucose as a carbon source in the process of biofuel production. Seventy-two Soil samples were collected from the plots Chulabhorn Dam for screening cellulolytic microorganisms. Actinomycetes 190 isolates were obtained. Isolate that has highest ability to degrade carboxymethylcellulose on the agar plate was Actinomycetes isolate CDF2L1D13 which showed HC value was 14.02. β glucosidase activity was 2.639 U / ml. when used rice straw as carbon sources. The optimum nitrogen source for producing β glucosidase was peptone and the enzyme activity was 5.443 U / ml. The morphology of isolate CDF2L1D13 was studies. It was found that the shape of spores resembled circular loop coil and it expected to be in the genus *Streptosporangium.*

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนทั่วไปจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นภายใต้ชุดโครงการพระราชดำริอนุรักษ์พันธุกรรมพืชปีงบประมาณ 2555 (โครงการต่อเนื่อง ปีที่ 1) ที่ให้เงินสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ นายณัฐพล ซาฮาม ผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง และอุปกรณ์บางชนิดในระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิต เขื่อนจุฬาภรณ์ และเจ้าหน้าโครงการพระราชดำริ ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

นันทวัน ฤทธิ์เดช

สิงหาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย	10
บทที่ 4 ผลวิจัย	17
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	24
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	27
ภาคผนวก ข ผลการทดลองข้อมูลดิบ	30
ภาคผนวก ค ภาพประกอบแปลงเก็บตัวอย่าง และลักษณะโคโคนีของเชื้อ	34

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	4
2	กราฟมาตรฐานของสารละลาย para-nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร	14
3	กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	15
4	แสดงลักษณะอัตราส่วนระหว่าง clear zone กับโคโลนีของไอโซเลท $CDF_2L_1D_{13}$	17
5	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) broth	18
6	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC broth เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7 และ 10	19
7	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารCarboxymethylcellulose(CMC) broth ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนโดยใช้ฟางข้าวและรำเป็นสับสเตรท	20
8	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Carboxymethylcellulose(CMC) broth ที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ peptone และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสับสเตรท	21
10	แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar ของไอโซเลท $CDF_2L_1D_{13}$	22
12	แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast microscope ของไอโซเลท $CDF_2L_1D_{13}$	23