

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะการเจริญคล้ายเชื้อรา สามารถสร้าง สปอร์ อับสปอร์ substrate mycelium และ aerial mycelium นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทมีประโยชน์ต่อสภาพแวดล้อมในด้านการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ที่มีปริมาณมากในธรรมชาติ เป็นผลทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์มีปริมาณธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืชและสัตว์ สำหรับเอนไซม์แบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทผลิตออกมาเพื่อใช้ในการย่อยสลายซากพืช ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่ม cellulase เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบมากในเซลล์พืช รวมทั้งยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยและทดลองเกี่ยวกับความสามารถของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทในหลายด้าน เช่น ด้านการแพทย์ได้มีการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และด้านการเกษตรได้มีการนำเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทมาใช้ในการทำปุ๋ยชีวภาพ เป็นต้น จากข้อมูลทางการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้มีการวิจัยการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรขึ้น (รัตนารักษ์, 2548)

เซลล์พืชประกอบด้วย ลิกนิน (lignin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในเซลล์พืช เซลลูโลสพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อกันของน้ำตาลกลูโคสเป็นสายยาวหลายโมเลกุลด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4- glycosidic bond) และจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ Cellulase เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase) เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase) และ เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดจะมีความทำงานที่แตกต่างกันออกไป โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่มทำให้โมเลกุลของเซลลูโลสสั้นลง เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสจะย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกด้านปลายของโมเลกุลได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกันหรือที่เรียกว่า เซลโลไบโอส (cellobiose) จากนั้นเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจะย่อยสลายโมเลกุลของเซลโลไบโอสเป็นน้ำตาลกลูโคส (glucose) (ทิพวรรณ, 2554)

ในปัจจุบันได้มีขยะที่เกิดขึ้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในปริมาณที่มากจนไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามกระบวนการย่อยสลายทางธรรมชาติหากปล่อยไว้เป็นเวลานานจะก่อให้เกิดปัญหาทางด้านมลภาวะตามมา เช่น มลภาวะทางอากาศ เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ เป็นต้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้และได้นำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยมีวัตถุประสงค์หลักในการเพิ่มมูลค่าและผลิตน้ำตาลจากของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร รวมทั้งเป็นการลดปริมาณขยะที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างดินในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ
2. เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar
3. เพื่อหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีส เช่นลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการศึกษาวิจัยเพื่อคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างดินในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ
2. เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเช่น หาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -glucosidase เพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีส ที่คัดเลือกจากเชื้อที่แยกได้ โดยคัดเลือกจากอัตราส่วนของโซนใสและขนาดของโคโลนีที่วัดได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีส
2. ทราบถึงประโยชน์ และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีสใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส
3. สามารถนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้
4. สามารถนำความรู้ที่ได้รับจากการดำเนินงานวิจัยไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส

แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้มีหลายกลุ่ม เช่น แบคทีเรียในกระเพาะอาหารของสัตว์กินพืช, แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาพทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นต้น แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนจะย่อยเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์หลัก 2 ชนิดคือ CO_2 และสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ส่วนราและแอคติโนมัยซีท จะได้ CO_2 เป็นผลิตภัณฑ์หลักและเกิดกรดอินทรีย์ในปริมาณน้อย อัตราการย่อยเริ่มต้นจะถูกจำกัดด้วยกระบวนการ oxidation ของคาร์โบไฮเดรตเพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสารตัวกลาง ซึ่งจะเกิดขึ้นขณะมีการใช้น้ำตาล ส่วน mesophilic และ thermophilic anaerobe ไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นอย่างสมบูรณ์ได้ สารอินทรีย์หลายชนิดจึงถูกขับออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดการสะสมของ CO_2 , H_2 , ethanol และกรดอินทรีย์ เช่น acetic acid, lactic acid และ succinic acid เป็นต้น

แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเส้นใย(hyphae) ส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร(substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร(aerial mycelium) หรือบางสายพันธุ์อาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีทมีความแตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ คือ มีลักษณะทึบแสงสร้างเส้นใยเหนือผิวน้ำอาหาร โคโลนีแห้งคล้ายผงแป้งหรือผิวโคโลนีเรียบคล้ายหนังสัตว์และจะมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่เมื่อสัมผัสด้วยตาเปล่า สามารถสร้างรงควัตถุที่มีสีต่างๆบนจานอาหารเช่น สีขาว เทา ส้ม เหลือง น้ำตาล ชมพู และสีดำ เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทยังมีความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และสร้างสารต้านมะเร็งหรือเซลล์เนื้องอก นับได้ว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์ และด้านเภสัชกรรมในปัจจุบัน

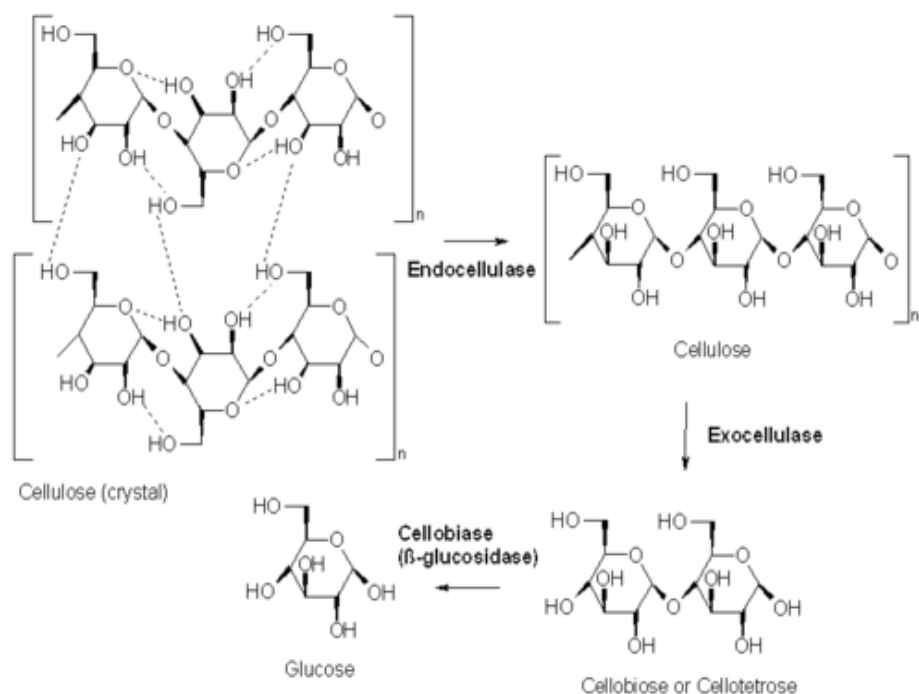
แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่างๆ โดยเฉพาะในดิน ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยอีกประเภทหนึ่งของจุลินทรีย์ที่พบแอคติโนมัยซีทในปริมาณมากและมีความสำคัญในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์และช่วยให้เกิดวัฏจักรการหมุนเวียนธาตุอาหารในธรรมชาติ โดยทั่วไปแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทจะมีการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่สำคัญหลายชนิดและยังสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ได้หลายชนิดเช่น เอนไซม์เซลลูเลส β -glucosidase และเฮมิเซลลูเลส เป็นต้น โดยเอนไซม์ที่มีการสร้างขึ้นจะมีความจำเพาะสำหรับการย่อยสลายสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน

กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การย่อยเซลลูโลสขั้นต้นเกิดจากการที่โมเลกุลถูก hydrolyse โดยเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเอนไซม์จะเข้าทำการย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ แต่ข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์เกิดจากการที่สารตั้งต้นละลายน้ำได้น้อย จากนั้น cellulose derivative ที่เกิดขึ้นก็จะถูกย่อยต่อ ได้เป็น monosaccharide หรือ disaccharide ผลผลิตขั้นจบต่อมาของการย่อยจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ และเนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ จากนั้นจึงดูดซึมสู่ภายในเซลล์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

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

กลไกการทำงานเริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดบวมตัว (swelling) พร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระ ส่วน exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลายซึ่งถูกย่อยสลายต่อไป โดย β -glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ



รูปที่ 1 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ปัจจุบันได้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมากซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมลภาวะทางอากาศจากการเผาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ที่เกิดจาก ความรู้เท่าไม่ถึงการณ์ของเกษตรกร ดังนั้นโครงการวิจัยการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีตที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงได้มีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีตโดยนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์โดยการนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจนเพื่อเป็นสารอาหารทดแทนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ศศิธร และ นฤมล (2553) การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน ขอนไม้ผุ และปุ๋ยหมัก ภายในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) agar ที่อุณหภูมิ 45, 50 หรือ 55°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแยกเชื้อตัวอย่างได้ 125 ไอโซเลท นำเชื้อที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ด้วย congo red test ปรากฏผลของการเกิดบริเวณใสรอบรอยเจริญของเชื้อเป็นจำนวน 62 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการเพาะเลี้ยงใน CMC broth พบว่าไอโซเลท CM120-1 มีค่า enzyme activity และ specific activity สูงกว่าไอโซเลทอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 22.84 U/ml และ 0.15 U/ml protein ตามลำดับ มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 45°C ในอาหาร pH 7 ภายหลังจากบ่มนาน 96 ชั่วโมง จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นพบว่าไอโซเลท CM120-1 จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus*

Day and Workman (1982) เอนไซม์ β -glucosidase ที่พบในเชื้อรา *Aspergillus terreus* ที่ทำให้บริสุทธิ์โดย acrylamide gel electrophoresis มีช่วง optimal activity ที่อุณหภูมิ 50°C pH 4.8 เอนไซม์ β -glucosidase มีค่า K_m เท่ากับ 0.78 และ 0.40 mM เมื่อใช้ *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside และ cellobiose เป็น substrate ในการทำปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลสตามลำดับ พบว่าน้ำตาลกลูโคสสามารถเป็น competitive inhibitor ต่อเอนไซม์ β -glucosidase ได้ ซึ่งกลูโคสจะมีค่า K_i เท่ากับ 3.5 mM นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ β -glucosidase มี specific activity เท่ากับ 210 IU และ 213 U/mg of protein เมื่อมีการใช้ *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside และ cellobiose เป็น substrate ปริมาณไอออน proteinase และปริมาณของ enzyme inhibitor ที่อยู่ในปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลสไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ β -glucosidase ซึ่งมี glycoprotein เป็นองค์ประกอบหลักของเอนไซม์ ชนิดนี้และประมาณ 65% ของส่วนที่เป็น glycoprotein จะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 275,000 g/mol⁻¹ การศึกษาเอนไซม์ β -glucosidase ที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus- terreus* มีจุดประสงค์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของพืชที่พบในธรรมชาติซึ่งมีเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายหลักๆ 3 ชนิด คือ enzyme exoglucanase, endoglucanase และ β -glucosidase โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะมีกลไกในการย่อยสลายเซลลูโลสที่แตกต่างกันคือ enzyme exoglucanase และ enzyme endoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่หรือ cellobiose จากนั้น enzyme β -glucosidase จะย่อยสลายโมเลกุลของ cellobiose ไปเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จากการศึกษาด้านการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตน้ำตาลในอดีต พบว่าในอดีตมีการใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งผลิตขึ้นโดย *Trichoderma reesei* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพต่ำ กล่าวคือไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลได้ตามที่ต้องการด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสหลายสายพันธุ์ด้วยกันได้แก่ *Aspergillus phoenicis*, *Botryodiplodia theobromae*, *Lenziter trabea*, *Sclerotium rolfsii*, และ *Aspergillus terreus* จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าเอนไซม์ β -glucosidase

ที่ผลิตจาก *Aspergillus terreus* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาลได้ดีกว่า เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆจากตัวอย่างที่กล่าวมา

Al-tai, A. M. (1989) การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม cellulolytic actinomycetes จากตัวอย่างดินในประเทศอิรักพบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่แยกได้จากตัวอย่างดินคือแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* sp. Strain AT7 มีลักษณะเฉพาะคือเป็น nonfragmented vegetative hyphae สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidia เรียงต่อกันเป็นสายยาวบน aerial mycelium มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลาย L-diaminopimelic acid และกรดอะมิโนบางชนิดได้แก่ ไกลซีน ลิวซีน และอะดีนีน เจริญบนอาหาร mineral medium ที่มี Carboxymethylcellulose (CMC) ในสภาวะที่เป็นกรดและด่างให้คาร์บอนเป็นผลิตภัณฑ์ รวมทั้งสร้างเอนไซม์ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 28°, 37° และ 48 °C ผลของการขัดแยก cellulolytic microorganism จากตัวอย่างดินในประเทศอิรัก ผลจากการเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ซึ่งเป็นเชื้อราในการกลุ่มที่ต้องการอากาศและเจริญได้ในที่ที่มีอุณหภูมิปานกลางพบว่าเอนไซม์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสและการย่อยสลายในกระบวนการ saccharification มีคุณภาพที่ต่ำกว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจาก *Streptomyces* sp. Strain AT7 ที่มีคุณสมบัติเป็น thermoactinomycetes เนื่องจากในประเทศอิรักมีสภาพภูมิประเทศเป็นแบบทะเลทรายมีอุณหภูมิสูงจึงส่งผลให้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ออกมาจากจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เป็น mesophile

Ibrahim and El-diwany (2007) Thermophilic cellulases producing bacteria ที่แยกได้จากน้ำพุร้อน Egyptian โดยมีวิธีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่เก็บจากตัวอย่างดินและน้ำโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มี 3 ไอโซเลทที่แยกได้คือ EHP1, EHP2 และ EHP3 ได้ทำการศึกษาทั้ง 3 ไอโซเลทโดยวิเคราะห์ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางด้านวิวัฒนาการของสารพันธุกรรมจากลำดับของ 16S rDNA เทียบกับฐานข้อมูลทางคอมพิวเตอร์ พบว่า EHP1 มีลักษณะความคล้ายคลึงทางด้านสารพันธุกรรมกับ *Anoxybacillus flavithermus* สูงถึง 98.5% EHP2 มีสารพันธุกรรมคล้ายคลึงกับ *Geobacillus thermodenitrificans* 98.5% และ EHP3 มีความคล้ายคลึงทางด้านสารพันธุกรรมกับ *Geobacillus stearothermophilus* 99% similarity มีปริมาณการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงมากในช่วงการเจริญในระยะ stationary phase หรืออายุประมาณ 36 ชั่วโมง *Anoxybacillus flavithermus* (EHP2) เอนไซม์เซลลูเลสที่ตรวจพบเป็นการตรวจพบในกระบวนการย่อยสลาย CMC, cellobiose และ xylan แต่ไม่สามารถตรวจพบในกิจกรรมการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside ยังตรวจพบว่าเซลลูเลสมีอัตราในการย่อยสลาย CMC และ substrate ชนิดต่างที่ใช้ศึกษาในปริมาณที่สูง มี optimum temperature และ optimum pH ของ enzyme activity ที่อุณหภูมิ 75 °C pH 7.5 ตามลำดับ

สมยศ(1987) การศึกษาหาเชื้อแอคติโนมัยซีท ทำโดยการเก็บตัวอย่างดินถ้าจำนวน 30 ตัวอย่างจากถ้า 6 แห่งในจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และสระบุรี พบว่าสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากถ้ามังกรทอง 2.23%, ถ้าเขาแหลม 3.92%, ถ้าสาริกา 7.23%, ถ้าจอมพล 0.16%, ถ้าเขาบิน 0.16% และถ้าโพธิ์สัตว์ 0.84% คิดเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ทั้งหมด 3.81% เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งที่มีผลยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 10534, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10612 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบเชื้อ 51 สายพันธุ์จาก 104 สายพันธุ์ (49.04%) ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ จำแนกเชื้อตามผลการยับยั้งเชื้อทดสอบออกได้เป็น 6 กลุ่ม คัดเลือกเชื้อ ST-13-2 ที่

ให้ผลดีต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบทุกชนิดบนอาหารแข็งมาศึกษา เพื่อจำแนกบ่งชี้เชื้อและศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว พบว่าเชื้อที่คัดเลือก ST-13-2 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* โดยมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces parvullus* มากที่สุด การเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหาร glucose soybean medium ที่มี pH 7.0 (ก่อนผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดัน) ณ อุณหภูมิ 23 °C จะให้ผลในการสร้างสารปฏิชีวนะสูงสุด

Tako M (2009) Filamentous fungi เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต extracellular enzyme ที่มีคุณภาพดีซึ่งมีคุณสมบัติและบทบาทที่สำคัญในกระบวนการย่อยสลายซากพืช และสารอินทรีย์ในธรรมชาติ โดยเฉพาะเชื้อราใน class *Zygomycetes* ที่มีความสำคัญและมีประโยชน์ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ ในการทดลองในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตและกิจกรรมของเอนไซม์ cellobiohydrolases (1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase) และเอนไซม์ beta-glucosidase จากเชื้อรา *Mucor corticolus* (syn.: *M. circinelloides* f. *corticolus*) และเชื้อรา *Gilbertella persicaria* ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตดังกล่าวถือเป็นกุญแจสำคัญในกระบวนการย่อยสลายทางชีวมวลของเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์ และถือเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอีกวิธีหนึ่ง วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อตรวจวัดปริมาณการผลิตเอนไซม์ cellobiohydrolases และเอนไซม์ beta-glucosidase จากกระบวนการหมักแบบ solid-state fermentation ที่ใช้ ขานข้าวโพดและใบข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 12 วัน และพบว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *Mucor corticolus* และ *Gilbertella persicaria* สามารถเจริญได้ดี ให้ผลผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง

Saadoun (2008) การศึกษาสภาวะที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Streptomyces* Sp. (Strain J2) โดยวิธีการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหาร Cellulose Agar (CA agar) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* (strain J2) มีความสามารถในการสร้าง clear zone บน CA agar ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 mm. และทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า crude enzyme มี activity สูงสุดเท่ากับ 432 U/L แล้วมาจัดจำแนกระดับความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส จากผลการทดลองพบว่า 94% ของเชื้อ *Streptomyces* ที่นำมาทำการทดสอบสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ มีเพียง 6% เท่านั้น ที่ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ และ *Streptomyces* (strain J2) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีมาก ความหมายก็คือ *Streptomyces* (strain J2) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่สามารถสร้าง clear zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 20-25 mm. คิดเป็น 1% ของเชื้อทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ การศึกษาครั้งนี้จะมีการแปรผันสภาวะในการเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เช่นการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน รวมทั้ง สภาวะความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือ น้ำตาลกลูโคส, NH₄Cl อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 30°C ในสภาวะที่เป็นกลาง (pH 7) ระยะเวลาในการเพาะบ่มนาน 3 วัน ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมาจะทำให้เชื้อ *Streptomyces* (strain J2) ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

Saadoun (2007) จากการคัดแยกเชื้อ *Streptomyces* ทั้งหมด 161 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน จำนวน 5 ตัวอย่างจากประเทศจอร์แดน เพื่อนำมาศึกษา characterized และความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ออกฤทธิ์เป็น antagonistic เพื่อใช้ในการผลิตยาต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ผลที่ได้หลังจากการทดสอบคือมีเชื้อ *streptomyces* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Ps. aeruginosa* จำนวน 3 ไอโซเลท คือ J2b, J4 และ J12 โดยในสภาวะการทดลองจะทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 °C และ 45 °C ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 45 °C เชื้อ *Streptomyces* ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถสร้าง inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 5 – 16 mm. จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาทำให้ทราบถึง inhibition activity ของ *Streptomyces* ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa*

Peela และ Kurada (2005) การคัดแยกแอสโคไมซีตจากตัวอย่างดิน 26 ตัวอย่างที่เก็บจาก 9 เกาะบริเวณทะเลอันดามันในคาบสมุทรมะละแควน้อย สามารถแยกแอสโคไมซีตที่เรียวยาวในกลุ่มแอสโคไมซีตได้ทั้งหมด 88 ไอโซเลท แล้วนำมาศึกษาลักษณะของสปอร์โครงสร้างของสายสปอร์พบว่า 64 ไอโซเลท มีลักษณะของสปอร์ที่จัดอยู่ใน genus *Streptomyces*, 8 ไอโซเลทจัดอยู่ใน genus *Micromonospora*, 5 ไอโซเลทจัดอยู่ใน genus *Nocardia*, 7 ไอโซเลทจัดอยู่ใน genus *Streptoverticillium* และอีก 4 ไอโซเลทจัดอยู่ใน genus *Saccharopolyspora* จากเชื้อแอสโคไมซีตทั้งหมด 88 ไอโซเลท พบว่ามี 64 ไอโซเลทจัดอยู่ใน genus *streptomyces* spp. มี 44 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็น antibacterial activity และ 17 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็น antifungal activity นอกจากนี้ยังพบอีก 3 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ antagonistic ที่ช่วยส่งเสริมการเติบโตของเชื้อก่อโรคหลายชนิด

ทิพวรรณ (2554) การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกรได้ทำการศึกษาคัดแยกจากมูลสุกรสดและจากมูลสุกรที่ได้บ่อหมัก biogas โดยนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยใช้อาหาร CMC บ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หาอัตราส่วนของบริเวณโซนใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (HC) ผลการคัดแยกพบว่า การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกรสด พบว่ามีเชื้อที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จากบ่อหมัก biogas มีเชื้อที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 9 ตัวอย่าง จากการศึกษาลักษณะการเรียงตัวและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียจากมูลสุกรสด ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้ 8 กลุ่มและพบว่าตัวอย่างหมายเลข SD6R1C79 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด โดยมีค่า HC เท่ากับ 3.88 เซนติเมตร ส่วนการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกรที่ได้บ่อหมัก biogas พบเชื้อแบคทีเรียหมายเลข L(A) โดยมีค่า HC เท่ากับ 3.09 เซนติเมตร ซึ่งเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงการจำแนกชนิดเชื้อและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์ของเชื้อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่อไป

Jongjeen and Akio (2007) ศึกษาการคัดแยก การจัดจำแนก การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราทนร้อน ที่มีคุณสมบัติ ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินรอบรากพืชในป่าชุมชนเขื่อนสิรินธร อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี เมื่อนำตัวอย่างดินมาคัดแยกเชื้อราบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่เติม Carboxymethyl cellulose (CMC) และ avicel (Av) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ทำ

การคัดแยกและจำแนกเชื้อราด้วยวิธี slide culture เพื่อตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ malt extract agar (MEA) และ Czapek's agar (CZA) พบว่าสามารถ จำแนกเชื้อราที่ได้ออกได้ 9 ชนิด ได้แก่ *Arthoderma* sp. isolate 1, *Arthoderma* sp. isolate 2, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Aspergillus fumigatus* var. *ellipticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus thomii* Smith, *Bispora* sp., *Penicillium* sp. และ *Thichothecium roseum* เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลสที่ใช้ CMC หรือ Av เป็นสับสเตรตด้วย congo-red test หรือ Lugol's iodine test muj pH 3.0, 7.0 และ 10.0 พบว่า *Aspergillus niger* สามารถสร้าง endocellulase ได้ดีที่สุดในทุกสภาวะ

กรรมกรและคณะ(2552) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นประโยชน์โดยการ สร้างสารปฏิชีวนะที่สำคัญในสิ่งแวดล้อม ที่อยู่ในดินแหล่งต่างๆ ซึ่งเป็นดินรอบรากข้าวจากนาข้าวในหลาย จังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี เชียงใหม่ กาฬสินธุ์ นนทบุรี และกรุงเทพฯ และดินรอบรากพืชที่เก็บจากจังหวัด นครปฐม แล้วนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาคัดเลือก และศึกษาสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ในข้าวชนิดต่างๆ รวมทั้งจำแนกสายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีท เพื่อเป็นความรู้ในการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไปใช้ ประโยชน์ในการยับยั้งโรค ข้าว และช่วยส่งเสริมการปลูกข้าวเพื่อพัฒนาด้านเกษตรอินทรีย์ เมื่อทำการคัดแยก เชื้อแล้ว นำมาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร แชนซ์ และเลี้ยงให้สร้างสปอร์จนเจริญดี เมื่อนำมาจำแนกตามกลุ่ม สีของสปอร์ สามารถแบ่งได้เป็น 7 กลุ่มสี ตามลักษณะสีสปอร์ พบว่ากลุ่มสปอร์สีเทามีสมาชิกจำนวนมากที่สุด จากนั้นได้วิเคราะห์ชนิดของ diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ที่ผ่านการย่อย พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ที่พบเป็นกลุ่มสเตรพโตมัยซีท เมื่อนำไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบการยับยั้ง การเจริญของจุลินทรีย์ ก่อโรคข้าว ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง โรคยอดฝักดาบ โรคใบจุดสีน้ำตาล และ โรคกาบใบแห้ง พบว่ามี 41 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด และพบว่าไอโซเลท K8S3 มี สมบัติเหมือนกับ *Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีความสามารถสูงที่สุดในการยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบได้ เกือบทุกชนิด และมีผลต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังได้ ค้นพบแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ คือ *Pseudonocardia acaceae* ไอโซเลท GMKU095 เจริญได้ดีที่ pH 6-7 อุณหภูมิระหว่าง 36-38 องศาเซลเซียส ย่อยสลายยูเรียได้ สร้างกรดจากน้ำตาลหลายชนิด เช่น ฟรุคโตส กลูโคส และสามารถย่อยสลายเจลาติน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ

- 1.1.1 จานเพาะเชื้อแบบแก้ว (Petri dishes)
- 1.1.2 ลวดเขี่ยเชื้อ , เข็มเขี่ยเชื้อ (Loop , Needle)
- 1.1.3 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml (Flask)
- 1.1.4 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 ml (Flask)
- 1.1.5 ขวดวัดปริมาณ ขนาด 100 ml (Volumetric Flask)
- 1.1.6 ขวดวัดปริมาณ ขนาด 500 ml (Volumetric Flask)
- 1.1.7 ขวดวัดปริมาณ ขนาด 1,000 ml (Volumetric Flask)
- 1.1.8 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
- 1.1.9 หลอดทดลองฝาเกลียว (Test Tube)
- 1.1.10 ปิเปต ขนาด 1-5 ml (pipet)
- 1.1.11 กระบอกตวง (Cylinder)
- 1.1.12 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 1.1.13 เครื่องซั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง
- 1.1.14 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)
- 1.1.15 ตู้อบไอร้อน (Hot air oven)
- 1.1.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 1.1.17 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)
- 1.1.18 กล้องจุลทรรศน์
- 1.1.19 ตู้ดูดควัน (Laboratory fume hood)
- 1.1.20 ตู้บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส (Incubator)
- 1.1.21 เครื่อง Vortex mixer
- 1.1.22 ตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1.1 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosiduronic acid (pNPG)
- 2.1.2 p-Nitrophenol (pNP)

2.1.3 โซเดียมอะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 5.0

2.1.4 3,5-Dinitro salicylic acid (DNS)

2.1.5 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

2.1.6 lactophenol cotton blue

2.1.7 70% alcohol

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท

3.1.1 อาหารแข็ง starch casein agar

3.1.2 อาหารที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส carboxymethyl - cellulose agar (CMC agar) และ carboxymethylcellulose broth (CMC broth)

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างดินบริเวณแปลงทดลอง เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่แปลงทดลอง เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มตามระยะทางของเส้นทางเดินป่าในแต่ละแปลงทดลอง เลือกบริเวณที่ห่างจากทางเดินเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอก โดยลักษณะของดินที่เลือกทำการเก็บตัวอย่างจะต้องเป็นดินที่มีซากพืช ซากสัตว์ปกคลุม และมีลักษณะที่บ่งบอกถึงการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยทำการกวาดผิวน้ำดินออก ขุดลึกลงไปจากหน้าดินให้มีความลึกประมาณ 6 นิ้วให้มีลักษณะรูปตัววี (V shave) เก็บตัวอย่างดินประมาณ 50 กรัม ลงในถุงเก็บตัวอย่าง

4.2 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท

4.2.1 ขั้นตอนการ pretreatment ทำการชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ที่เก็บจากแปลงทดลอง เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 15 นาที

4.2.2 ทำการเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-8} จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายแขวนลอยของตัวอย่างดินปริมาตร 0.1 มิลลิตร spread plate บนจานอาหาร starch casein agar (SCA agar) จุ่มแท่งแก้ว spreader ลงใน 95% alcohol จากนั้นเกลี่ยสารละลายแขวนลอยให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

4.2.3 คัดเลือกโคโลนีที่เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอสคิตินัมยีสแสดงที่มีลักษณะแตกต่างมาแยกให้บริสุทธิ์ โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะผิวหน้าหยาบ ไม่มันวาว เป็นผงคล้ายกำมะหยี่ สามารถสร้าง substrate mycelium, aerial mycelium และสปอร์บนผิวหน้าโคโลนี นำมา cross streak บนจานอาหาร starch casein agar (SCA agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วทำการเก็บเชื้อเพื่อเป็น stock culture บนอาหาร starch casein agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

4.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียกลุ่มแอสคิตินัมยีสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose(CMC) agar

4.3.1 น้ำเชื้อที่แยกได้มาทำให้การเจริญเติบโตอยู่ในสภาพว่องไวโดยการ cross -streak บนจานอาหาร starch casein agar (SCA agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มา point inoculation โดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรงปลอดเชื้อแตะบนโคโลนีของแอสคิตินัมยีส point บนจานอาหาร Carboxymethylcellulose(CMC) agar ที่แบ่งจานอาหารออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆกัน เมื่อทำการ point inoculation เสร็จนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำ

4.3.2 เมื่อทำการบ่มครบ 5 วัน ทำการทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการรดด้วย gram iodine ซึ่งให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที สังเกตลักษณะของการสร้างโซนใส วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสและขนาดของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานอาหาร จากนั้นหาค่าเฉลี่ย และอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

4.3.3 คัดเลือกไอโซเลทที่ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีสูงสุดทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยในการวิจัยในครั้งนี้จะศึกษากิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

4.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส (Tako,M. 2009)

4.4.1 นำเชื้อไอโซเลทให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีสูงสุดทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยนำมาปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) จากนั้นใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูด spore suspension ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Carboxymethylcellulose(CMC) broth 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 20 วัน

4.4.2 ทำการเก็บ crude enzyme โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร CMC broth ใส่ลงในหลอด centrifuge tube ปริมาตร 5-7 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทส่วนใสลงในหลอดปลอดเชื้อแช่แข็งที่ -20 °C เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของ

เอนไซม์และตรวจวัดปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ (ในขั้นตอนนี้จะทำการปั่น crude enzyme ในวันที่ 0, 5, 10, 15 และ 20 ของการบ่ม)

4.4.3 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส โดยการเติมสารละลาย crude enzyme ปริมาตร 100 μL ลงในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาดจากนั้นเติม 0.1 M โซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 800 μL บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}\text{C}$ เพื่อปรับอุณหภูมิของระบบประมาณ 2-3 นาที แล้วปิเปตสารละลาย pNPG ที่มีความเข้มข้น 0.7 mM ปริมาตร 100 μL ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ

4.4.4 การเตรียมชุดควบคุมการทดลอง เตรียม bank โดยปิเปตสารละลาย 0.1 M โซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 1,000 μL ลงในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาดจากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm.

4.4.5 การเตรียมชุดควบคุมการทดลอง เตรียมชุดควบคุมสับสเตรทโดย ปิเปตสารละลาย pNPG ที่มีความเข้มข้น 0.7 mM ปริมาตร 100 μL ลงในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาดจากนั้นเติม 0.1 M โซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 900 μL นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm

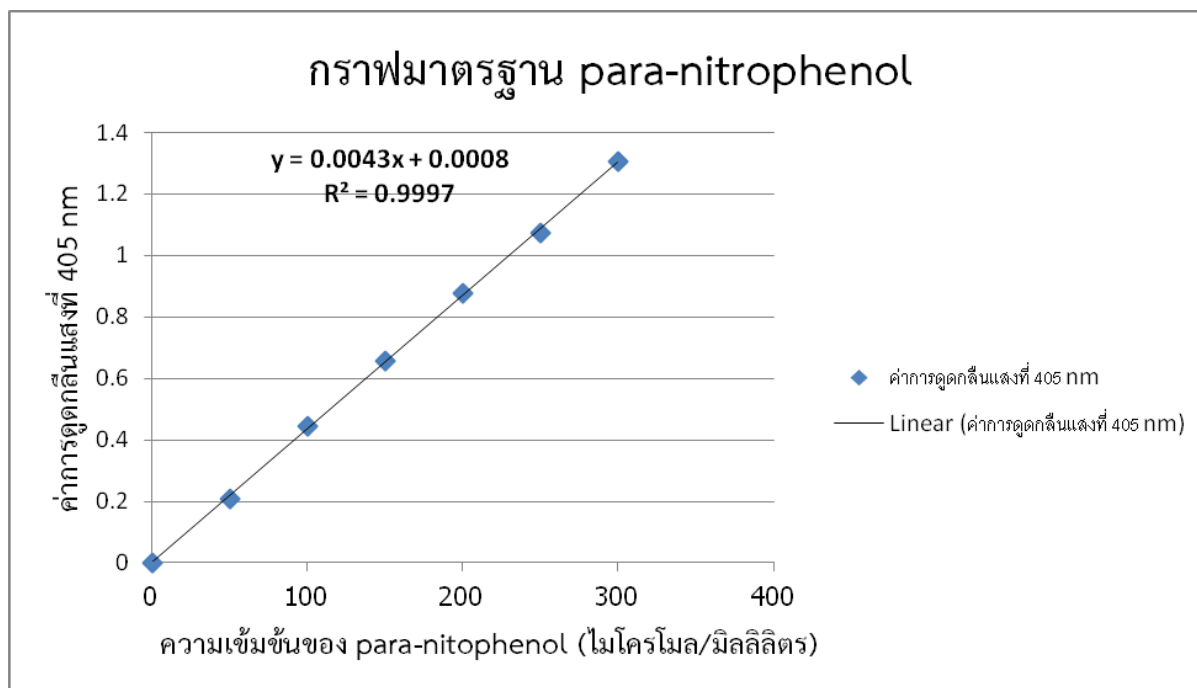
4.4.6 การเตรียมชุดการทดลอง โดย ปิเปตสารละลาย crude enzyme ปริมาตร 100 μL ลงในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาดจากนั้นเติม 0.1 M โซเดียมอะซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 900 μL นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 M โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm. นำค่าที่วัดได้จากข้อ 4.3.6 – 4.3.9 มาหาค่าการดูดกลืนแสงที่แท้จริงของปฏิกิริยาจาก

สูตร ค่าการดูดกลืนแสงที่แท้จริง = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา – ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่แท้จริงของปฏิกิริยาแล้วนำค่าที่ได้ไปแทนในสมการของกราฟมาตรฐานของ para-nitrophenol (pNP) ที่มีสมการค่าความชันเท่ากับ $y = 0.0043x + 0.0008$ ที่มีค่า $R^2 = 0.9997$ เพื่อเทียบหาปริมาณเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ที่ใช้ในการย่อยสลายสับสเตรท para-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น para-nitrophenol (pNP) ในหน่วย ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

4.4.7 เตรียมกราฟมาตรฐานสารละลาย para-nitrophenol โดยเจือจางสารละลาย para-nitrophenol ให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4.4.1-4.4.3 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ para-nitrophenol

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ (U/ml) เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายสับเตรท para-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น para-nitrophenol (pNP) ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร จาก กราฟมาตรฐาน para-nitrophenol (pNP)



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย para-nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

4.4.7 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)} = [A_{(405 \text{ nm})} \times 10 \times d] / t$$

เมื่อ $A_{(405 \text{ nm})}$ เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

10 คือ เทียบปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร

D คือ dilution factor

t คือ เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา

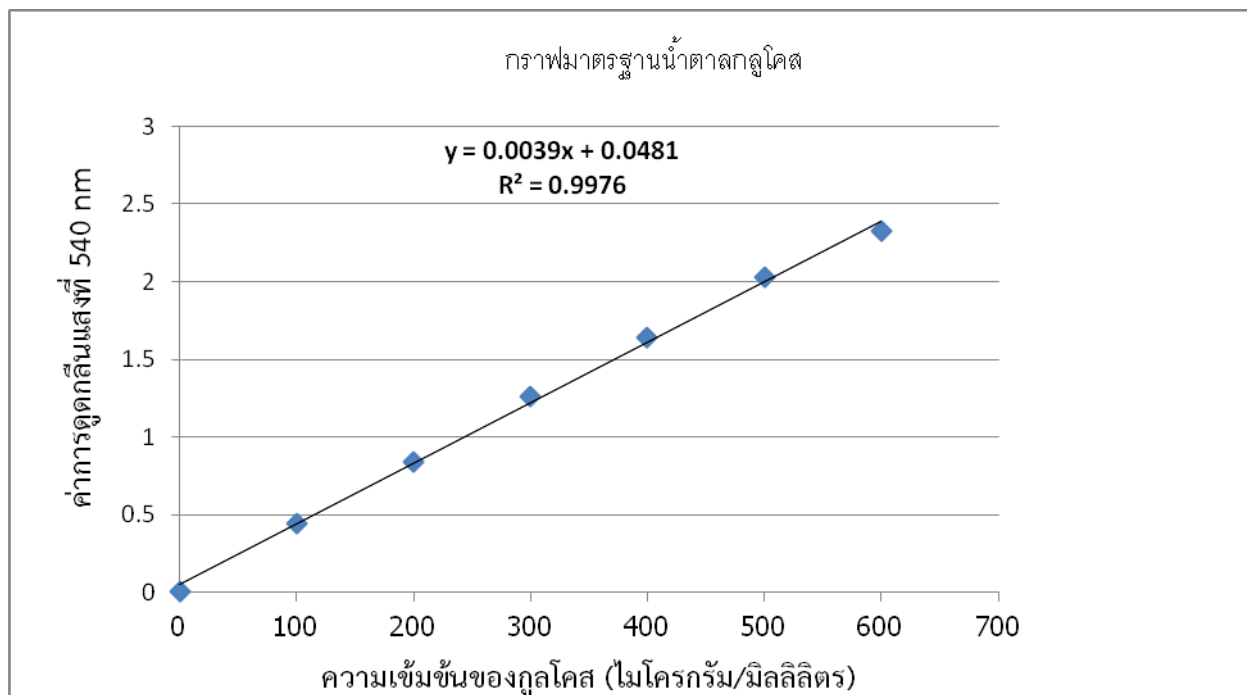
4.5 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Saqib, 2011)

4.5.1 นำตัวอย่างที่ต้องการหาความเข้มข้นของน้ำตาล ใส่ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

4.5.2 เติมน้ำตาลละลาย DNS ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นทันที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

4.5.3 เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4.5.4 เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาล โดยเจือจางสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อบ D-glucose ที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้) ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4.5.1-4.5.3 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4.5.5 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ต้องการ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แทนในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส

$y = 0.0039x + 0.0481$ ที่มีค่า $R^2 = 0.9976$ จะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อไอโซเลท $CDF_2L_1D_{13}$ โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

4.6.1 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยการแปรผันแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยการใช้รำและฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน มีวิธีการศึกษาคือ เริ่มจากการคัดเลือกวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ รำและฟางข้าว ที่มีลักษณะสด ใหม่ ไม่มีการเจริญของเชื้อรา จากนั้นนำฟางข้าวมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ผึ่งแดดให้แห้งเป็นเวลา 2 วัน นำมาบดด้วยเครื่องบดแล้วร่อนด้วยตะแกรงร่อนที่มีขนาด 0.2 มิลลิเมตร ซึ่งน้ำหนักฟางข้าวที่ผ่านการร่อน 40 กรัม แช่ใน 1% โซเดียมไฮดรอกไซด์ นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำประปา จนกระทั่งวัด pH ได้เท่ากับ 7

4.6.2 นำวัสดุที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมจากข้อ 4.6.1 มาใช้ทดแทนแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร Carboxymethyl cellulose(CMC) broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรจากนั้น inoculation 10% spore suspension ของเชื้อแอสกีโนมัยซีท ไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 100 rpm. เป็นเวลา 20 วัน แล้วทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 5, 10, 15 และ 20 ของการบ่ม โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm นาน 20 นาที เก็บส่วนใสของสารละลายแขวนลอยที่ -20 °C เพื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

4.6.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส โดยการแปรผันแหล่งไนโตรเจนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethyl cellulose(CMC) broth ทำได้โดยการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนของอาหารจาก yeast extract เป็น peptone และ แอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นทำการทดลองดังข้อที่ 4.6.2

4.7 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียกลุ่มแอสกีโนมัยซีส

4.7.1 ทำการคัดเลือกเชื้อไอโซเลทที่ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของโคโลนีและขนาดของเคลียร์โซนที่สูงที่สุดคือ CDF₂L₁D₁₃ ซึ่งมีค่าอัตราส่วนระหว่างโคโลนีและโซนใสเท่ากับ 14.02 มา cross streak บนจานอาหาร starch casein agar (SCA agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพที่พร้อมต่อทดสอบ จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยเทคนิค cover slip culture บนจานอาหาร starch casein agar (SCA agar)

4.7.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอสกีโนมัยซีสด้วยเทคนิค cover slip culture ทำได้โดยการใช้ลูปปลอดเชื้อ เชื้อเชื้อแอสกีโนมัยซีทไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ จำนวน 2 ลูป ลงบนจานอาหาร starch casein agar (SCA agar) ด้วยวิธีการ simple streak จากนั้นใช้ cover slip ปลอดเชื้อปักลงไปบนเนื้อวุ้นโดยให้กระจก cover slip ปักอยู่ในลักษณะเอียงทำมุมประมาณ 45 °C บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

4.7.3 เมื่อบ่มเชื้อครบ 7 วัน ใช้ปากคีบ (forceps) จับ 95% แอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟ (ทำ 2 ครั้ง) คีบกระจก cover slid ที่ปักอยู่ในจานอาหารวางบนกระจกสไลด์แล้วหยดด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue 1 หยดเพื่อทำ cover slip culture

4.7.4 ศึกษาลักษณะของสายสปอร์ของแบคทีเรียกลุ่มแอสกีโนมัยซีท ไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast microscope เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยและสายสปอร์

บทที่ 4

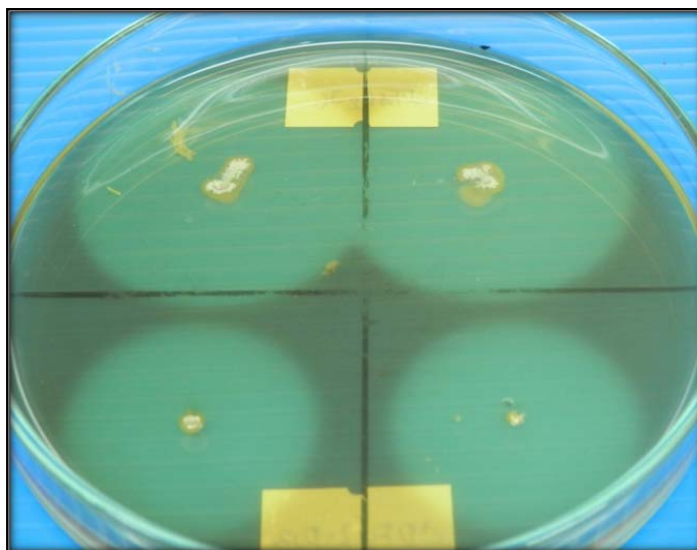
ผลการวิจัย

1. ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท จากตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่แปลงทดสอบเขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณใต้ต้นไม้ ที่เก็บจากพื้นที่แปลงทดสอบเขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทโดยใช้เทคนิคการ Spread plate บนอาหาร starch casein agar (SCA agar) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่เกิดขึ้นบนจานอาหาร แล้วทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak บนอาหาร starch casein agar (SCA agar) จนได้ลักษณะโคโลนีที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 190 ไอโซเลท

2. ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar

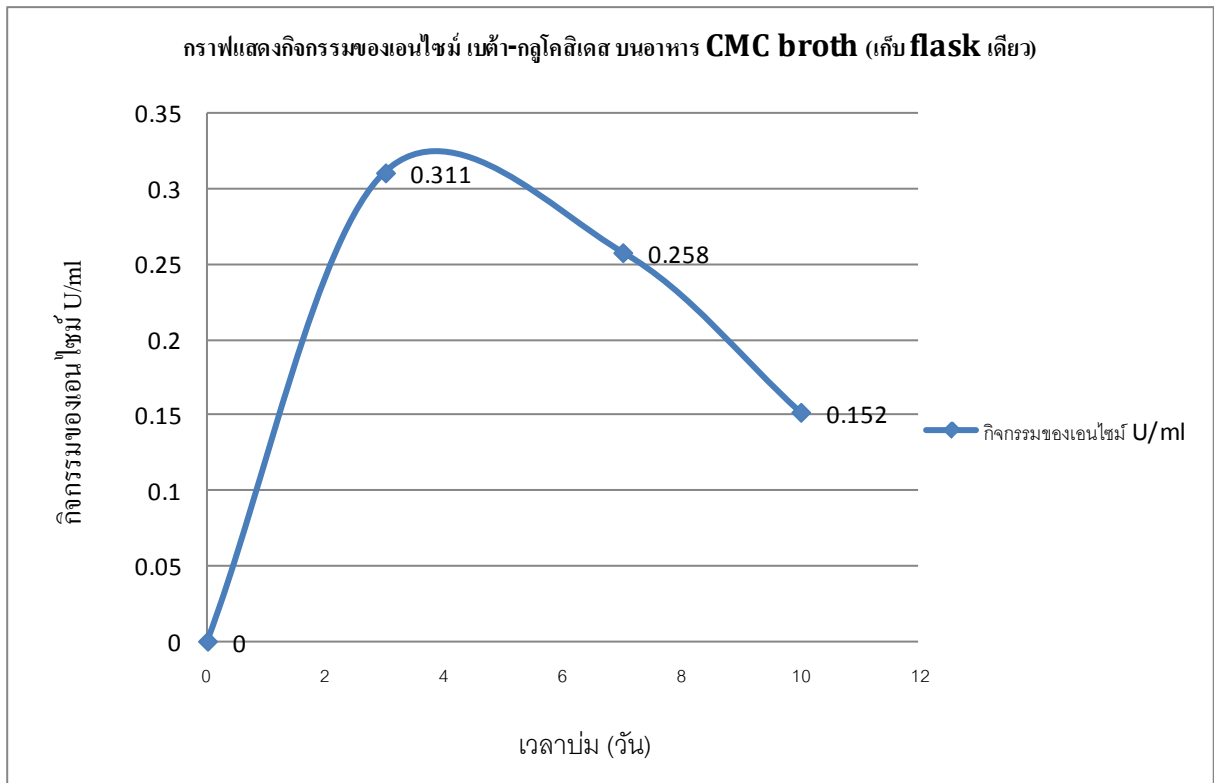
การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar ของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ทั้ง 190 ไอโซเลท โดยการวัด clear zone ที่เกิดขึ้นบนจานอาหารหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่มีการรดด้วยแกรมไฮโดลีน พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ มีอัตราส่วนระหว่าง clear zone กับ โคโลนีสูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.02 (วัดในหน่วยมิลลิเมตร) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงลักษณะการย่อย carboxymethyl cellulose บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃

3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (เบต้า-กลูโคซิเดส)

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC broth



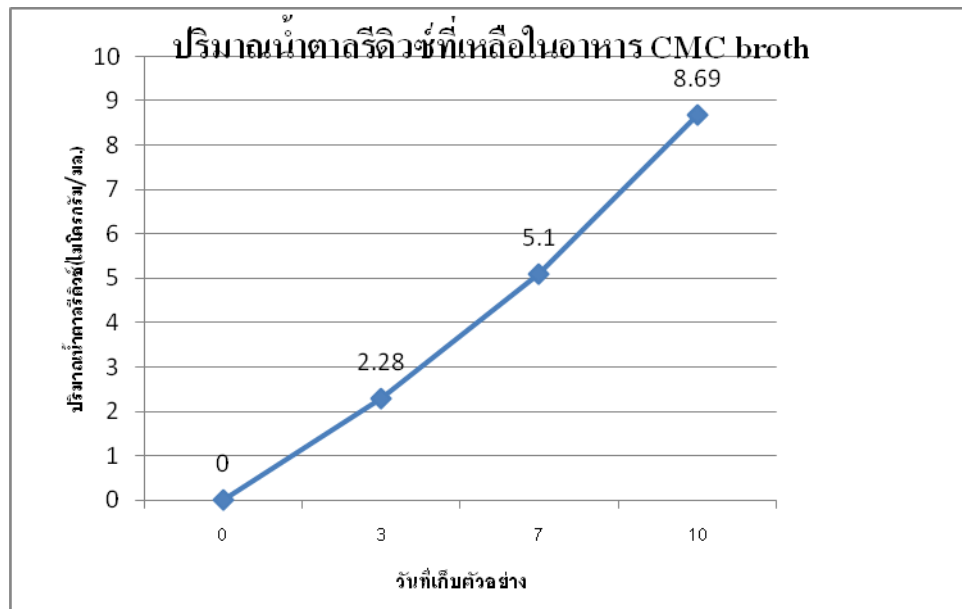
รูปที่ 5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) - broth

จากกราฟรูปที่ 5 จะพบว่า ปริมาณเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส สูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CMC broth โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สูงสุดเท่ากับ 0.311 U/ml และจะลดลงในวันที่ 7 ของการบ่ม และจะมีการลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 10 ของการบ่ม ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.152 U/ml.

4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC broth

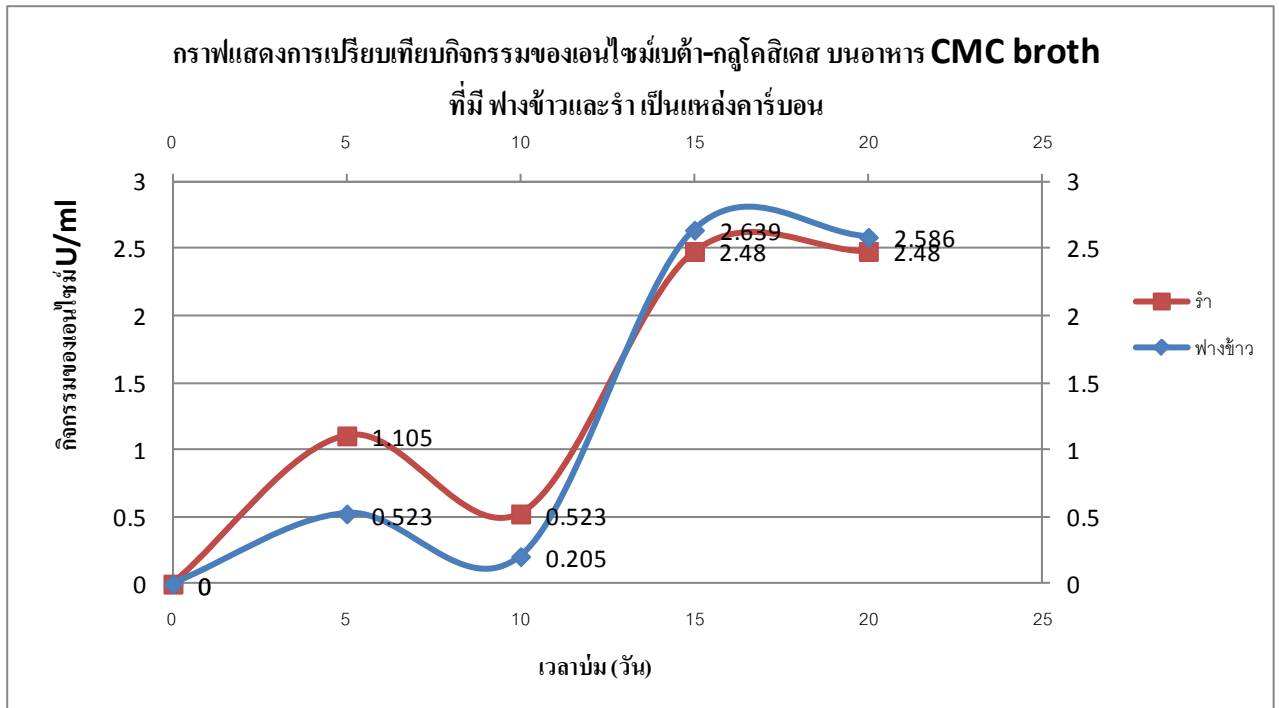
เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC broth ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิสเพื่อผลิตเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส เป็นเวลา 0, 3, 7 และ 10 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจาก CMC เป็นสารโพลีแซ็กคาไรด์ใหญ่โดยเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ของกลูโคสมาต่อกันเป็นสายที่เรียกว่า polysaccharide การย่อยสลายสารนี้จะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์เจริญในช่วง log phase และมีการใช้สารนี้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการ

เจริญเติบโต เมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase และ death phase จุลินทรีย์จะเริ่มหยุดการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงพบว่าการนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลาย CMC ไปใช้น้อยลง จึงปรากฏการหลงเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นจำนวนมากในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์



รูปที่ 6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC broth เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7 และ 10

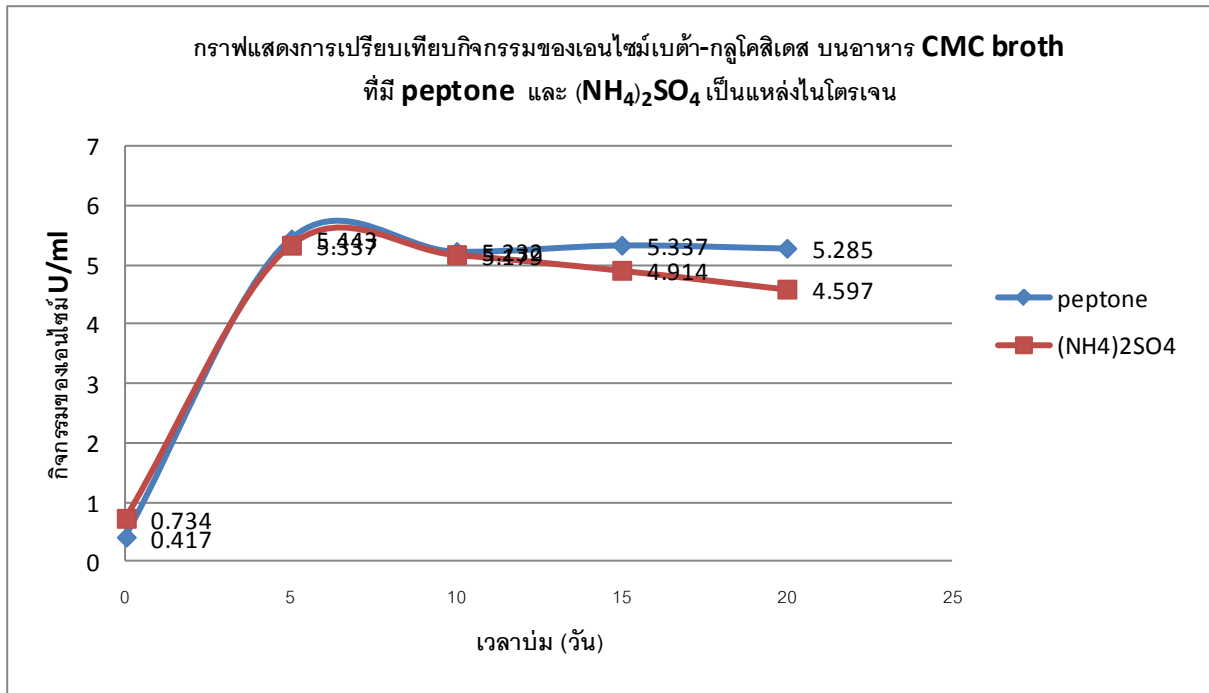
5. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (เบต้า-กลูโคซิเดส) เพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยใช้ฟางข้าวและรำเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 7 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) - broth ที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนโดยใช้ฟางข้าวและรำเป็นสับสเตรท

จากกราฟรูปที่ 7 จะเห็นได้ปริมาณการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนที่มี ฟางข้าวและรำสับสเตรท พบว่ารำเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ซึ่งจะมีค่า กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2.639 U/ml.ในวันที่ 15 ของการบ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ที่ผลิตจากฟางข้าวพบว่าการผลิตเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 15 และ 20 ของการบ่มซึ่งมีกิจกรรมของ เอนไซม์เท่ากับ 2.48 U/ml แสดงว่าแอสคิโนมัยซีทีไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ สามารถใช้รำเป็นแหล่งคาร์บอนใน การเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าการใช้ฟางข้าว

6. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (เบต้า-กลูโคซิเดส) เพื่อผลิตน้ำตาลจาก วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยการใช้ peptone และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 8 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Carboxymethylcellulose (CMC) - broth ที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ peptone และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสับสเตรท

จากกราฟรูปที่ 8 พบว่าเชื้อไอโซเลท $\text{CDF}_2\text{L}_1\text{D}_{13}$ มีการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในปริมาณที่สูงใน peptone ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสิ่งมีชีวิต โดยใช้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เท่ากับ 0.417, 5.443, 5.232, 5.337 และ 5.285 U/ml โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุด อยู่ที่ 5.443 U/ml ในวันที่ 5 ของการบ่ม และการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในแหล่งไนโตรเจนที่เป็น แอมโมเนียมซัลเฟต มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.734, 5.337, 5.179, 4.914 และ 4.597 เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่ได้ตามที่แสดงในกราฟ พบว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท $\text{CDF}_2\text{L}_1\text{D}_{13}$ และจากแหล่งไนโตรเจนทั้งสองแหล่งจะส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ได้ดีในวันที่ 5 ของการบ่มเชื้อ จากนั้นเมื่อใช้เวลาในการบ่มนานขึ้นจะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดต่ำลงเรื่อยๆ ตามข้อมูลที่แสดงในกราฟ

7. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท

7.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar (SCA agar)

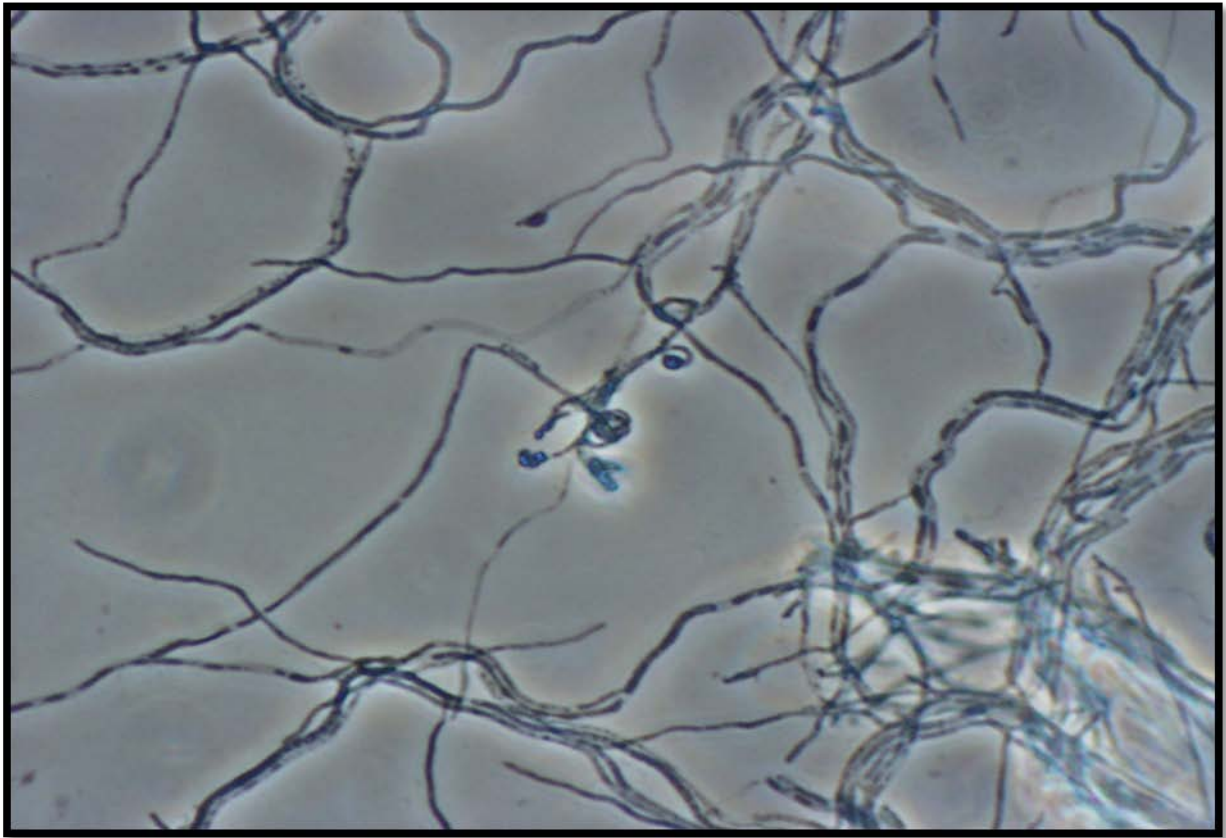


รูปที่ 9 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar ของไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃

ลักษณะโคโลนีของไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃

โคโลนีมีลักษณะการเจริญตามรอย streak ขนาดเล็ก ขอบหยัก สร้าง substrate mycelium สีขาว aerial mycelium สีขาว สร้างสปอร์สีดำมีลักษณะคล้ายผงถ่าน

7.2 ลักษณะเส้นสายโซ่สปอร์ และลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast microscope



รูปที่ 10 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast microscope ของไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃

ลักษณะสายโซ่สปอร์ม้วนเป็นวงกลมคล้าย loop สายโซ่สปอร์มีลักษณะเรียงต่อกันเป็นท่อนๆ ภายใต้เส้นใย คาดว่าน่าจะอยู่ใน genus streptosporangium

บทที่ 5

สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีส์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน เพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ และได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีส์ทั้งหมด 190 ไอโซเลท จากนั้นได้นำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ซึ่งให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

5.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีส์

ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีส์จากตัวอย่างดินบริเวณแปลงตัวอย่าง พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีส์ได้จำนวน 190 ไอโซเลท ซึ่งแต่ละไอโซเลทจะถูกทำการคัดแยกบนอาหาร starch casein agar เพื่อคัดเลือกลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีส์ เพื่อที่จะนำไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

5.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีส์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose(CMC) agar จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 190 ไอโซเลท แล้วทำการทดสอบโดยใช้เทคนิค point inoculation บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง clear zone กับ colony diameter ด้วยวิธีการวัดแกรมไโอดินในหน่วยวัดที่เป็นมิลลิเมตร พบว่าเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ มีค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone กับ colony diameter เท่ากับ 14.02 ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดที่วัดได้จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อบน CMC agar

5.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยการแปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหาร CMC broth

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส โดยจะทำการศึกษาไปที่เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase มีหน้าที่ในการเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโมเลกุลของ cellobiose ได้เป็นน้ำตาล glucose ซึ่งจะตรวจวัดด้วยวิธี DNS method ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ ผลจากการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ พบว่าในแหล่งคาร์บอนที่เป็นฟางข้าว CDF₂L₁D₁₃ มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สูงสุดเท่ากับ 2.639 U/ml ในวันที่ 15 ของการบ่ม ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เป็นรำจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดเท่ากับ 2.480 U/ml

5.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยการแปรผันแหล่งไนโตรเจนในอาหาร CMC broth

จากการแปรผันแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และอัตราเร็วในการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการเจริญในแหล่งไนโตรเจนที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต จะส่งเสริมการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 5.337 U/ml และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ peptone จะให้ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สูงสุดเท่ากับ 5.443 U/ml ในวันที่ 5 ของการบ่ม จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแหล่งไนโตรเจนมีส่วนช่วยในการทำให้เชื้อที่ใช้ทดสอบ มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้เร็วขึ้น

5.5 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ ซึ่งทำการศึกษาลักษณะของโคโลนีบนจานอาหารและลักษณะสายโซ่สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า CDF₂L₁D₁₃ มีลักษณะโคโลนีเจริญตามรอย streak ขนาดเล็ก ขอบหยัก สร้าง substrate mycelium สีขาว aerial mycelium สีขาว สร้างสปอร์สีดำนี้อาศัยลักษณะคล้ายผงถ่าน และสายโซ่สปอร์มีวนเป็นวงกลมคล้าย loop สายโซ่สปอร์มีลักษณะเรียงต่อกันเป็นท่อนๆ ภายใต้เส้นใย คาดว่าน่าจะอยู่ใน genus Streptosporangium

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์นอกเหนือจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เช่น เอนไซม์ exo-glucanase และ endo glucanase รวมทั้งปริมาณโปรตีนเพื่อตรวจสอบว่าเป็นโปรตีนที่ต้องการหรือไม่ รวมทั้งจะทำให้มีข้อมูลพื้นฐานและง่ายสำหรับการศึกษาลำดับยีนในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์ ดวงมัลย์ และคณะ. 2552. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สยบโรคข้าว. รายงานวิจัย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทิพวรรณ แต่งสวน. (2554). การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี หลักสูตรสัตวศาสตร์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตและประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- รัตนารณ ศรีวิบูลย์. (2548). แอคติโนมัยซีท. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี
- ศศิธร ไกลฤทธิ์ชัย และ นฤมล ทองไว. (2553). การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Al-tai, A.M. et al. (1989). Cellulase production from actinomycetes isolated from Iraq soil : characterization of a cellulolytic *streptomyces* sp. Strain AT7. Journal of Islamic Academy, 109-112
- Day, D.F. and Workman, W.E. (1982). Purification and Properties of β -Glucosidase from *Aspergillus terreus*. American Society for Microbiology, 1289-1295
- Ibrahim, A. and El-diwany, A. (2007). Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and some Properties of the Crude Enzyme. Australian Journal of basic and applied Science, 1(4), 473-478
- Jonjeen, J. and Akio, S. (2007). Screening and Identification of Thermophilic Cellulolytic Fungi from Soil. Agricultural Sci. J. 38(6) (Suppl.): 291-294.
- Peela, S. and Kurada, B. (2005). Studies on Antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. World Journal of Microbiology, 21:583-585
- Saadoun, I. et.al., (2008). Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* sp. (Strain J2). Jordan Journal of microbiological Science, 1(4), 141-146
- Saadoun, I. et.al., (2008). Recovery of soil streptomycetes from arid habitats in Jordan and their potential to inhibit multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* pathogens. World J Microbiol Biotechnol. 1(24), 157-162
- Tako, M. et.al. (2009). Production of cellulolytic enzymes on agricultural waste by different Zygomycetes. Department of Microbiology faculty of Science and Informatic, University of Szeged

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch-Casein Agar

Casein	1.0 g
Soluble starch	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Agar	15.0 g
น้ำกลั่น	1,000 ml
ปรับ pH 7-7.2	

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) Agar

NaNO ₃	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄	0.5 g
KCl	0.5 g
Carboxymethylcellulose sodium salt	2.0 g
Peptone	0.2 g
Agar	17.0 g
น้ำกลั่น	1,000 ml
ปรับ pH 7.0-7.2	

63. อาหารเลี้ยงเชื้อ Soil extract agar

Peptone	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Yeast extract	1.0 g
(H ₂ NO ₄) ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄	0.05 g
FeCl ₃	0.01 g
CaCl ₂	0.1 g
Agar	15 g
Soil extract	250 ml
น้ำกลั่น	750 ml

การเตรียม Soil extract

ขังดิน 1000 g ใส่ลงในน้ำกลั่น 1,000 ml นำไปต้มเป็นเวลา 20 นาที เติม CaCO₃ 0.5 g ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วนำไปกรองเพื่อแยกสารแขวนลอย

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose Congo red agar

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.25 g
CMC sodium salt	1.88 g
Congo red	0.2 g
Agar	15 g
Galatin	2.0 g
Soil extract	100 ml
น้ำกลั่น	1,000 ml

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP medium 8

Beef Extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
KNO ₃	1.0 g
น้ำกลั่น	1,000 ml
ปรับ pH 7.0	

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Asparagine Agar

Glucose	10.0 g
Asparagine	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
Agar	15.0 g
น้ำกลั่น	1,000 ml
ปรับ pH 6.8	

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP medium 9

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64 g
KH ₂ PO ₄	2.38 g
K ₂ HPO ₄	5.65 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
Trace salt solution	1 ml
น้ำกลั่น	1,000 ml
ปรับ pH 6.9-7.0	

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) Agar

Carboxymethylcellulose (CMC)	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
Agar	15 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

ภาคผนวก ข.

ผลการทดลองข้อมูลดิบ

ตารางบันทึกผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase บนอาหาร CMC broth

ตารางบันทึกผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ บนอาหาร CMC broth

วันที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm						A ที่แท้จริง	กิจกรรมของเอนไซม์ U/ml
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	Con. Sub.	Con. Enz.		
0	0.009	0.007	0.008	0.008	0.002	0.006	0	0
3	0.012	0.014	0.012	0.013	0.002	0.005	0.006	0.311
7	0.011	0.018	0.013	0.014	0.002	0.007	0.005	0.258
10	0.013	0.012	0.015	0.013	0.002	0.008	0.003	0.152

ตารางบันทึกผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดส บนอาหาร CMC broth ที่มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน

วันที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm						A ที่แท้จริง	กิจกรรมของเอนไซม์ U/ml
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	Con. Sub.	Con. Enz.		
0	0.010	0.011	0.015	0.012	0.002	0.002	0.008	0.417
5	0.110	0.110	0.112	0.111	0.002	0.006	0.103	5.443
10	0.108	0.105	0.103	0.105	0.002	0.004	0.099	5.232
15	0.116	0.103	0.105	0.108	0.002	0.005	0.101	5.337
20	0.110	0.108	0.110	0.109	0.002	0.007	0.100	5.285

ตารางบันทึกผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดส บนอาหาร CMC broth ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

วันที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm						A ที่แท้จริง	กิจกรรมของเอนไซม์ U/ml
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	Con. Sub.	Con. Enz.		
0	0.022	0.019	0.019	0.020	0.003	0.003	0.014	0.734
5	0.122	0.098	0.099	0.106	0.003	0.002	0.101	5.337
10	0.101	0.102	0.110	0.104	0.003	0.003	0.098	5.179
15	0.101	0.103	0.100	0.101	0.003	0.005	0.093	4.914
20	0.100	0.095	0.102	0.099	0.003	0.009	0.087	4.597

ตารางบันทึกผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดส บนอาหาร CMC broth ที่มี ฟางข้าวเป็น แหล่งคาร์บอน

วันที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm						A ที่แท้จริง	กิจกรรมของเอนไซม์ U/ml
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	Con. Sub.	Con. Enz.		
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.154	0.158	0.165	0.159	0.140	0.009	0.010	0.523
10	0.165	0.167	0.153	0.162	0.140	0.018	0.004	0.205
15	0.199	0.198	0.200	0.199	0.140	0.009	0.050	2.639
20	0.196	0.200	0.201	0.199	0.140	0.010	0.049	2.586

ตารางบันทึกผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดส บนอาหาร CMC broth ที่มี รำเป็นแหล่งคาร์บอน

วันที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm						A ที่แท้จริง	กิจกรรมของเอนไซม์ U/ml
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	Con. Sub.	Con. Enz.		
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.158	0.174	0.167	0.166	0.143	0.002	0.021	1.105
10	0.164	0.152	0.155	0.157	0.143	0.004	0.010	0.523
15	0.195	0.203	0.196	0.198	0.143	0.008	0.047	2.480
20	0.200	0.200	0.203	0.201	0.143	0.011	0.047	2.480

การหาค่า A ที่แท้จริง

$$A_{\text{ที่แท้จริง}} = (\text{Con. Sub} + \text{Con. Enz}) - \text{เฉลี่ย}$$

การหากิจกรรมของเอนไซม์

แทน $A_{\text{ที่แท้จริง}}$ ใน Y ในสูตร $Y = 0.0063X + 0.0194$; $R^2 = 0.9997$ ซึ่งได้จากกราฟมาตรฐาน pNP

นำค่า X ที่ได้ แทน A_{pNP} ในสูตร $\text{activity of Enzyme (U/ml)} = \frac{A_{\text{pNP}} \times 10}{30}$

วิธีคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากสมการ $y = 0.0039x - 0.0481$, $R^2 = 0.9976$

แทนค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย ใน y ในสมการ $y = 0.0039x - 0.0481$ โดยแทน $y = 0.057$

$$0.057 = 0.0039x - 0.0481$$

$$X = 2.28$$

จะได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่หลงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ($\mu\text{g/ml}$) = $2.28 \mu\text{g/ml}$.

ตารางบันทึกผลการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ บนอาหาร CMC broth (เก็บ flask เดียว)

วันที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm.				ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ $\mu\text{g/ml}$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
0	0	0	0	0	0
3	0.057	0.056	0.057	0.057	2.28
7	0.070	0.066	0.069	0.068	5.10
10	0.077	0.085	0.084	0.082	8.69

ภาคผนวก ค.

ภาพประกอบ

1. สถานที่เก็บตัวอย่าง



เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอกอนสาร

คอนสาร จังหวัดชัยภูมิ



พื้นที่แปลงที่ 1 จำนวน

18 ตัวอย่าง



พื้นที่แปลงที่ 2 จำนวน

18 ตัวอย่าง



พื้นที่แปลงที่ 3 จำนวน 18 ตัวอย่าง

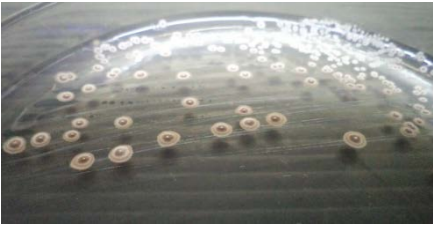
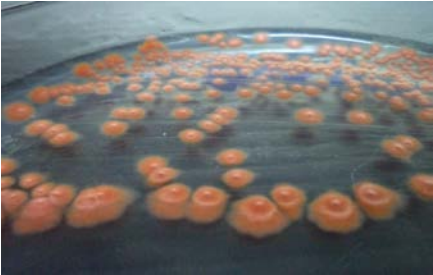
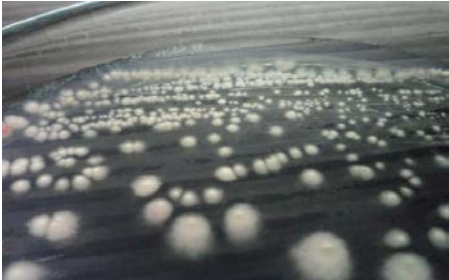


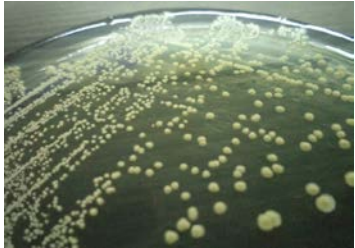
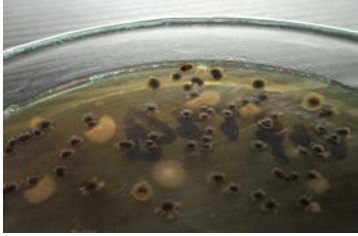
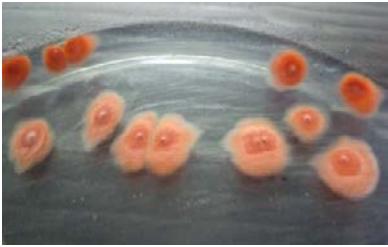
พื้นที่แปลงที่ 4 จำนวน 18 ตัวอย่าง

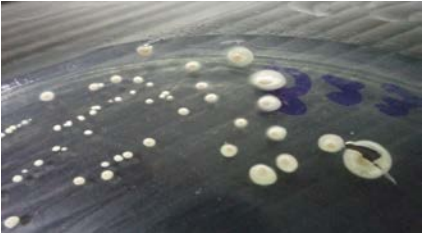
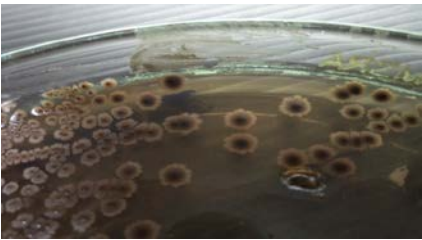
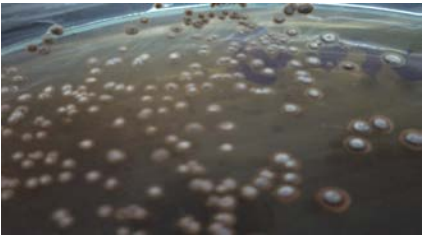


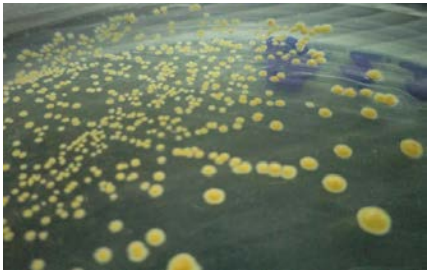
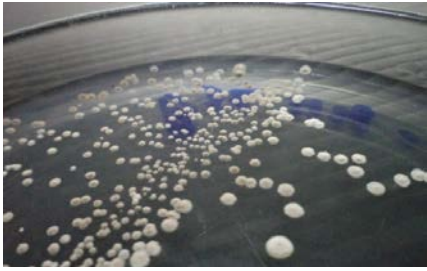
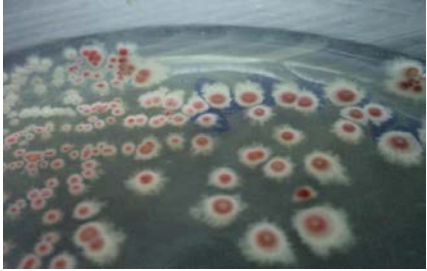
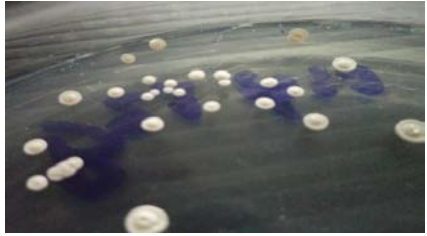
2. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทจำนวน 190 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ

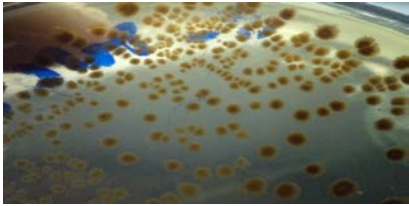
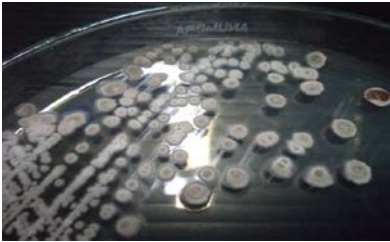
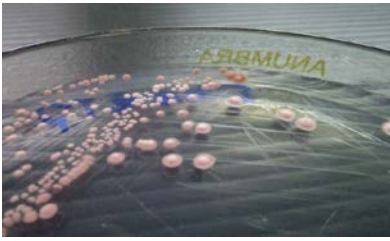
ตารางแสดงลักษณะของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้

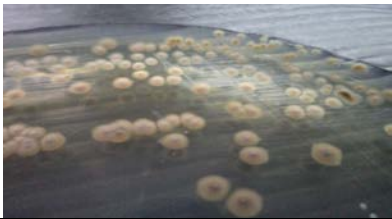
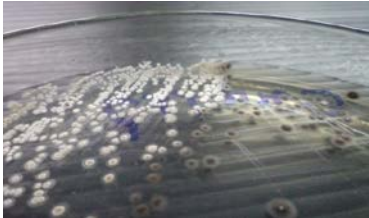
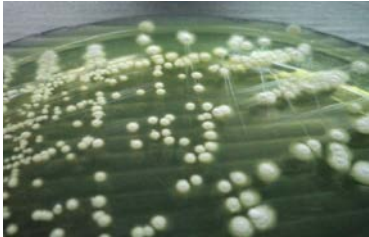
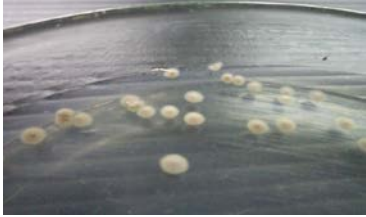
isolate	ลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร	ลักษณะโคโลนี (ภาพ)
1	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ สร้างเส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่ สร้างสปอร์สีน้ำตาลตรงกลางโคโลนี	
2	โคโลนีขนาดใหญ่ สร้าง substrate mycelium และสร้าง aerial mycelium สีส้ม ขอบโคโลนีหยักมีลักษณะแผ่ลาม	
3	โคโลนีขนาดใหญ่ สร้าง substrate mycelium และสร้าง aerial mycelium สีส้ม ขอบโคโลนีหยักมีลักษณะแผ่ลาม	
4	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว การเจริญติดกันเป็นแถวยาวตามรอย streak	
5	โคโลนีสีขาวขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สีขาวคล้ายเส้นใยของเชื้อรา	

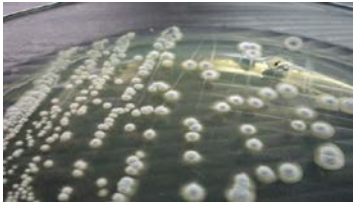
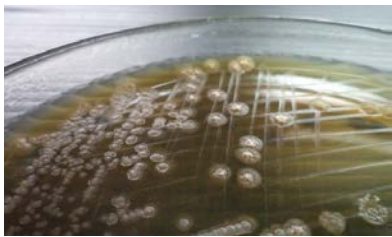
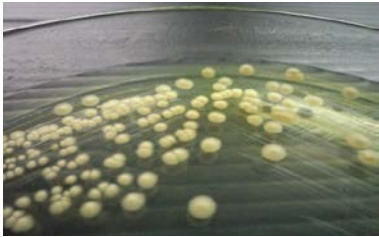
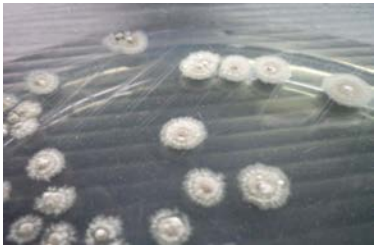
isolate	ลักษณะโคโลนียบนจานอาหาร	ลักษณะโคโลนี (ภาพ)
6	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ ไม่สร้าง pigment	
7	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ ลักษณะคล้ายกำมะหยี่	
8	โคโลนีขนาดเล็ก สีดำ ขอบเรียบ และสร้าง pigment สีน้ำตาลบนจานอาหาร	
9	โคโลนีเป็นวงกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาว คล้ายกำมะหยี่	
10	โคโลนีขนาดใหญ่ สร้าง substrate mycelium และสร้าง aerial mycelium สีส้มแดง ขอบโคโลนียังมีลักษณะแผ่ลาม	
11	โคโลนีขนาดใหญ่ สร้าง substrate mycelium และสร้าง aerial mycelium สีส้มแดง ขอบโคโลนียังมีลักษณะแผ่ลาม	

isolate	ลักษณะโคโลนิบนจานอาหาร	ลักษณะโคโลนี (ภาพ)
12	โคโลนีขนาดใหญ่ สร้าง substrate mycelium และ สร้าง aerial mycelium สีส้ม ขอบโคโลนีหยาบมีลักษณะแผ่ ลาม	
13	โคโลนีวงกลมขนาดใหญ่มีสี น้ำตาล ขอบเรียบ สร้าง substrate mycelium ที่มี ลักษณะแผ่ลาม	
14	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ คล้าย กำมะหยี่	
15	โคโลนีขนาดเล็ก สีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ สร้าง pigment สี น้ำตาลบนจานอาหาร	
16	โคโลนีสีดำ ขอบหยาบ ผิวหน้า โคโลนีมันวาว สร้าง pigment สีน้ำตาลบนจานอาหาร	
17	โคโลนีสีน้ำตาล ขนาดเล็ก ขอบ เรียบ	

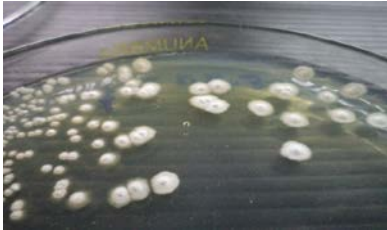
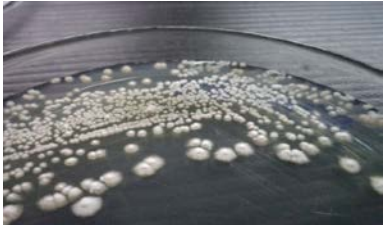
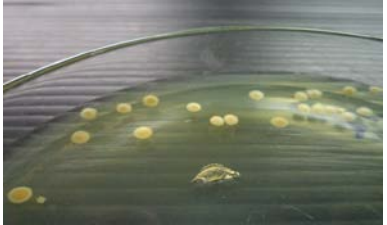
isolate	ลักษณะโคโลนียบนจานอาหาร	ลักษณะโคโลนี (ภาพ)
18	โคโลนีนูนผิวมัน ขอบเรียบ ขนาดเล็ก สร้าง aerial mycelium สีเหลือง	
19	โคโลนีเป็นวงกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาว คล้าย กำมะหยี่	
20	โคโลนีสีขาว ขอบหยัก ตรง กลางของโคโลนีสร้าง aerial mycelium สีชมพู	
21	โคโลนีวงกลมขนาดใหญ่ขอบ เรียบ คล้ายกำมะหยี่	
22	โคโลนีสีน้ำตาล ขอบหยัก ผิวหน้าโคโลนีมันวาว สร้าง pigment สีน้ำตาลบนจาน อาหาร	

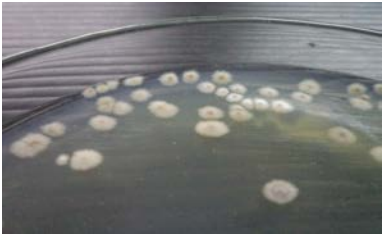
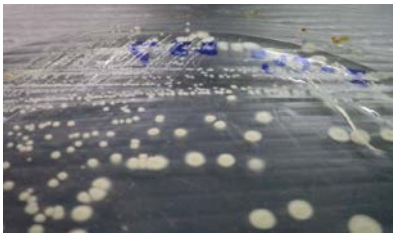
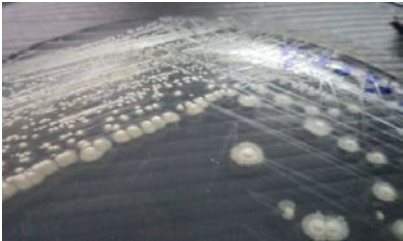
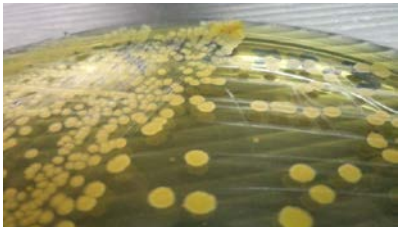
23	โคโลนีสีน้ำตาลแกมเขียว ขอบหยัก ผิวหน้าโคโลนีมันวาว สร้าง pigment สีน้ำตาลบนจานอาหาร	
24	โคโลนีขนาดใหญ่สีขาว ขอบเรียบ สร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
25	โคโลนีมีสีขาว ขอบหยัก สร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
26	โคโลนีขนาดเล็ก สีน้ำตาลอ่อน ขอบเรียบ สร้างสปอร์ตรงกลางโคโลนี	
27	โคโลนีขนาดเล็ก สีชมพู ขอบเรียบ	
28	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีน้ำตาล	

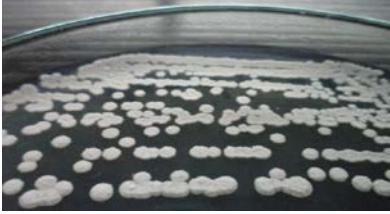
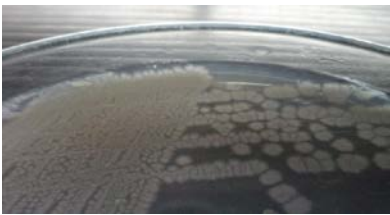
29	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีน้ำตาล	
30	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว และมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ และจะสร้างสปอร์สีดำ	
31	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ สร้าง pigment สีเหลืองอ่อนบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	
32	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบสร้าง substrate mycelium สีขาว	
33	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบสร้าง substrate mycelium สีขาว	
34	โคโลนีนูน สีขาว ขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สีขาว และสร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	

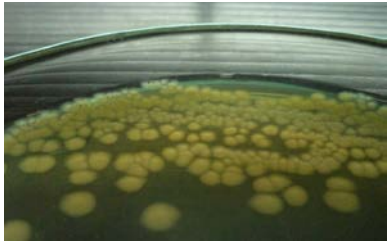
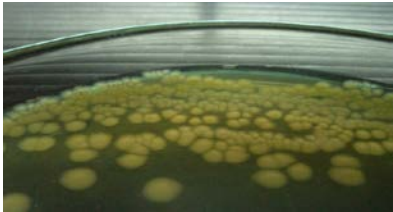
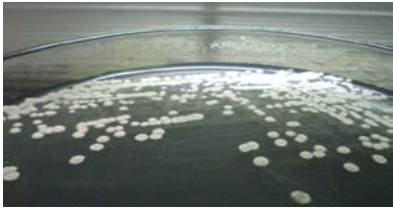
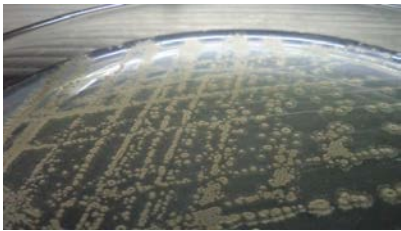
35	โคโลนีรูปร่าง สีขาว ขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สีขาว และสร้างสปอร์สีดำตรงกลาง โคโลนี	
36	โคโลนีขนาดเล็กสีน้ำตาล ขอบ หยัก สร้างสปอร์และสร้าง pigment สีน้ำตาลบนจาน อาหารเลี้ยงเชื้อ	
37	โคโลนีวงกลมขนาดเล็ก ขอบ เรียบ สีขาว มีลักษณะคล้าย กำมะหยี่	
38	โคโลนีขนาดใหญ่ สีขาว ขอบ เรียบ มีการสร้างเส้นใยลักษณะ แผ่นลามคล้ายเส้นใยของเชื้อรา	
39	โคโลนีขนาดเล็ก ขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สี เหลือง	
40	โคโลนีขนาดใหญ่ สีขาว ขอบ หยักสร้างเส้นใยคล้ายเชื้อรา	

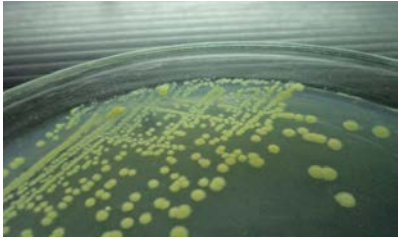
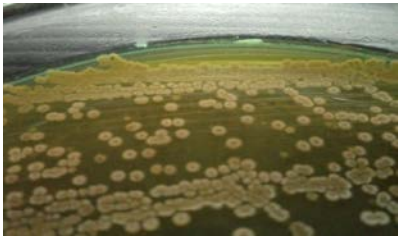
41	โคโลนีขนาดเล็กสีขาวแกมเหลือง ขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สีเหลือง	
42	โคโลนีขนาดใหญ่ สีขาว สร้าง aerial mycelium สีขาว และมีการสร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
43	โคโลนีมีขนาดใหญ่ ขอบเรียบ ผิวหนายน สร้าง aerial mycelium สีขาว	
44	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สีขาวและสร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
45	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ ลักษณะคล้ายกำมะหยี่	
46	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ ลักษณะคล้ายกำมะหยี่	

47	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ และสร้าง aerial mycelium สีขาวบนจานอาหาร	
48	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว มีการเจริญแบบแผ่นลามคล้ายการเจริญของเชื้อรา	
49	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ ลักษณะคล้ายกำมะหยี่	
50	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ สร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
51	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ มีการเจริญตามรอย streak สร้างเส้นใยคล้ายเชื้อรา	
52	โคโลนีขนาดเล็ก สีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ และสร้าง pigment สีเหลืองบนจานอาหาร	
53	โคโลนีขนาดเล็ก สีเหลือง สร้างเฉพาะ substrate mycelium	

54	โคโลนีนูน ขอบเรียบ สร้างเส้นใยและสปอร์คล้ายเชื้อรา	
55	โคโลนีนูน ขอบเรียบ สร้างเส้นใยและสปอร์คล้ายเชื้อรา	
56	โคโลนีนูน ขอบเรียบ สร้างเส้นใยและสปอร์คล้ายเชื้อรา	
57	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ และสร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
58	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่	
59	โคโลนีขนาดเล็กสีเหลือง ขอบเรียบ สร้าง pigment สีเหลืองบนจานอาหาร	

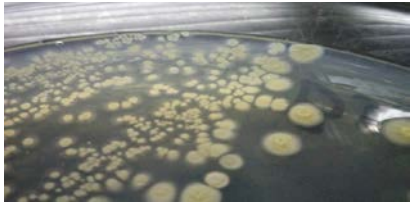
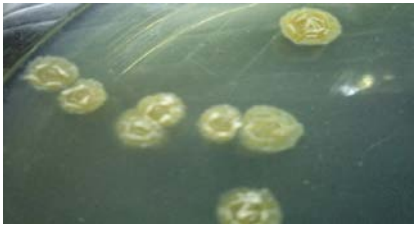
60	โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ คล้ายกำมะหยี่	
61	โคโลนีขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ สร้างเส้นใยคล้ายเชื้อรา	
62	โคโลนีมีสีเหลือง สีเหลือง ขอบหยัก สร้าง pigment สีเหลืองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	
63	โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่	
64	โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่	
65	โคโลนีมีสีเทาเข้มขอบหยัก สร้าง pigment สีม่วงบนจานอาหาร	
66	โคโลนีมีสีเทาเข้มขอบหยัก สร้าง pigment สีม่วงบนจานอาหาร	

67	โคโลนีมีขนาดเล็ก สีเหลืองขอบเรียบสร้าง pigment สีเหลืองบนจานอาหาร	
68	โคโลนีมีขนาดเล็ก สีเหลืองขอบเรียบสร้าง pigment สีเหลืองบนจานอาหาร	
68	โคโลนีมีขนาดเล็ก สีเหลืองขอบเรียบสร้าง pigment สีเหลืองบนจานอาหาร	
69	โคโลนีมีขนาดเล็กสีขาว ขอบเรียบมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่	
70	โคโลนีมีขนาดเล็ก ขอบหยัก สร้าง aerial mycelium และมีสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
71	โคโลนีขนาดเล็ก กลม มีสีขาว ขอบเรียบสร้าง substrate - mycelium สีขาว	
72	โคโลนีมีขนาดเล็กสีขาว ขอบเรียบสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium สีขาว	

73	โคโลนีมีขนาดเล็กสีขาว ขอบเรียบสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium สีขาว	
74	โคโลนีสีครีม สร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง และมีการเจริญตามรอย streak	
75	โคโลนีมีขนาดเล็กขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สีเขียวอ่อน	
76	โคโลนีขนาดเล็กสีน้ำตาล ขอบเรียบสร้าง pigment สีเหลืองบนจานอาหาร	
77	โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ สร้าง substrate - mycelium สีขาว	
78	โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สีขาวและสร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	

79	โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ สร้าง aerial mycelium สีขาวและ สร้างสปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี มีลักษณะการเจริญตามรอย streak	
80	โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลม ขนาดเล็กขอบเรียบ และสร้าง สปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
81	โคโลนีมีสีขาวขอบเรียบ สร้าง substrate mycelium สีขาว	
82	โคโลนีสีขาว ขอบหยัก สร้าง สปอร์สีดำตรงกลางโคโลนี	
83	โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลม ขอบเรียบสร้าง aerial - mycelium สีขาวที่มีลักษณะ คล้ายขนสัตว์	
84	โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลม ขอบเรียบสร้าง aerial - mycelium สีขาวที่มีลักษณะ คล้ายขนสัตว์	

85	โคโลนีมีสีเหลือง ขอบเรียบมี การเจริญในเนื้อวุ้น	
86	โคโลนีมีรูปร่างกลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ มีความนูน จากผิวหน้าวุ้นเล็กน้อย	
87	โคโลนีมีขนาดเล็ก ขอบเรียบ สี ขาว มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่	
88	โคโลนีมีสีขาวขอบเรียบ มี ลักษณะการเจริญในเนื้อวุ้น	
89	โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว ขอบ เรียบและมีลักษณะแบ่งเป็น แฉกคล้ายดอกไม้ม	
90	โคโลนีมีขนาดเล็กสีขาว คล้าย กำมะหยี่	
91	โคโลนีมีสีครีม ขอบเรียบ มี ลักษณะเป็นวงแหวนซ้อนกัน หลายชั้น	

92	โคโลนีมีลักษณะเป็นผงสีขาว เจริญตามรอย streak	
93	โคโลนีขนาดเล็กสีครีม ผิวหน้า โคโลนีมีรอยย่น	
94	โคโลนีขนาดเล็กสีครีม ผิวหน้า โคโลนีมีรอยย่น	
95	โคโลนีมีขนาดใหญ่สีเหลือง ขอบหยักผิวหน้าขรุขระ	
96	โคโลนีมีขนาดใหญ่สีเหลือง ขอบหยักผิวหน้าขรุขระ	
97	โคโลนีมีสีส้ม ขนาดใหญ่ ขอบ เรียบและมีลักษณะคล้ายร่ม	
98	โคโลนีมีสีครีมเจริญตามรอย streak โคโลนีเป็นผง	

99	โคโลนีขนาดเล็กสีขาวขอบเรียบ สร้าง pigment สีดำบนจานอาหาร	
100	โคโลนีขนาดเล็กสีขาว ขอบหยัก สร้าง aerial mycelium สีขาว	
101	โคโลนีมีขนาดเล็ก รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบคล้ายกำมะหยี่	
102	โคโลนีมีขนาดเล็ก รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบคล้ายกำมะหยี่	
103	โคโลนีขนาดเล็ก ขอบเรียบ สร้างสปอร์สีดำ	
104	โคโลนีมีขนาดใหญ่ สีส้มผิวหน้า มีลักษณะเป็นชั้นคล้ายวงแหวนซ้อนกัน	

105	โคโลนีมีขนาดใหญ่ สีส้ม ขอบหยัก มีลักษณะการเจริญคล้ายเส้นใยของเชื้อรา	
-----	---	--