หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเอนไซม์เชิงซ้อน (เซลลูโลโซม/ไซลาโนโซม) จากแบคทีเรียภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนและอุณหภูมิสูง
หน่วยกิต	48
ผู้เขียน	นางสาวสุภาวดี ฉิมทอง
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. กนก รัตนะกนกชัย
	ผศ.ดร. จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ
หลักสูตร	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวเคมี
สายวิชา	เทคโนโลยีชีวเคมี
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
พ.ศ.	2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารชีวมวลและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เชิงซ้อนที่แบคทีเรียดังกล่าวผลิตขึ้นภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนและอุณหภูมิสูง โดยทำการคัดแยกเชื้อจากแหล่งตัวอย่างต่างๆ ได้แก่ ดิน ของเสีย และเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่างๆ ภายในประเทศไทย จากตัวอย่างจำนวนทั้งสิ้น 150 ตัวอย่างที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร basal medium ที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า NKP เป็นกลุ่ม enrichment culture ที่สามารถย่อยสลายเปลือกข้าวโพดได้สูงสุด และจากการตรวจสอบพบว่า NKP ประกอบด้วยแบคทีเรียสองชนิดอยู่ร่วมกัน (co-culture) ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียสองสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ NKP-2 และสายพันธุ์ NOI-1 ออกจากตัวอย่าง NKP โดยอาศัยคุณสมบัติการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ต่างกัน โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ NKP-2 สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้เป็นอย่างดีแต่เจริญเติบโตในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ช้า (2-5 สัปดาห์) ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-1 สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้เป็นอย่างดีแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถแยกแบคทีเรียทั้งสองออกจากกันได้ หลังจากการคัดแยกได้แบคทีเรียบริสุทธิ์สองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ NKP-2 และสายพันธุ์ NOI-1 เมื่อนำไปตรวจสอบ

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ NKP-2 คล้ายคลึงกับ *Clostridium thermocellum* ร้อยละ 99 และสายพันธุ์ NOI-1 คล้ายคลึงกับ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ร้อยละ 99 ดังนั้นสายพันธุ์ NKP-2 และสายพันธุ์ NOI-1 จึงถูกเรียกว่า *C. thermocellum* สายพันธุ์ NKP-2 และ *T. thermosaccharolyticum* สายพันธุ์ NOI-1 ตามลำดับ นอกจากนั้นแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ยังถูกตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยอาศัย primer ที่มีความจำเพาะกับแต่ละสายพันธุ์ พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความบริสุทธิ์ ตรวจสอบคุณลักษณะของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียทั้งสองเจริญเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนและอุณหภูมิสูง เป็นแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ได้และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและพีเอช 6.0 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์แบบเดี่ยวในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการตรวจสอบเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้น พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์เซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติกได้ต่างกัน โดยสายพันธุ์ NKP-2 ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างหลักของสายเซลลูโลสและไซแลนเป็นหลักได้แก่ คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส อะไวซิเลสและไซลาเนส ในขณะที่สายพันธุ์ NOI-1 ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างสายสั้นของเซลลูโลสและไซแลนและ/หรือ กิ่งก้านของไซแลนได้แก่ เซลโลไบโอไฮโดรเลส เบต้ากลูโคซิเดส เบต้าไซโลซิเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะซิติลเอสเทอเรส เมื่อศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์จากทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าการใช้เอนไซม์ผสมสามารถเพิ่มการย่อยสลายเปลือกข้าวโพดได้สูงขึ้นถึง 2.8 เท่าที่เวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ร่วมกัน พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายเปลือกข้าวโพด อัตราการเจริญเติบโต และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก (แอลกอฮอล์ บิวทานอล กรดอะซิติก กรดบิวทีริก ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์) สูงขึ้นเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์แบบเดี่ยวๆ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าพฤติกรรมการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้ จัดเป็นรูปแบบหนึ่งของการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยมีการทำงานร่วมกันในการย่อยสลายสารชีวมวลให้ได้น้ำตาลเพื่อนำมาใช้ในการดำรงชีวิตอยู่ในธรรมชาติ

สิ่งที่น่าสนใจจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่ายังไม่มีรายงานว่า *T. thermosaccharolyticum* สามารถผลิตเอนไซม์เชิงซ้อนได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาเอนไซม์เชิงซ้อนจาก *T. thermosaccharolyticum* สายพันธุ์ NOI-1 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลน (oat spelt xylan) เป็นแหล่งคาร์บอน เอนไซม์ที่ผลิตในน้ำเลี้ยงถูกใช้เป็นเอนไซม์หยาบเพื่อทำการศึกษาต่อไป และจากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์หยาบแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส อะซิติลเอสเทอเรส เซลโลไบโอไฮโดรเลส และเบต้ากลูโคซิเดส แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดเซลลูเลส เอนไซม์หยาบสามารถทำงานได้

ในช่วงพีเอชและอุณหภูมิกว้าง โดยทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและเมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง scanning electron microscope (SEM) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-1 สามารถยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำและเซลลูโลส (อะไวเซล) ได้ดี ดังนั้นจึงทำการแยกเอนไซม์เชิงซ้อนออกจากเอนไซม์หยาบโดยใช้เทคนิค affinity chromatography ซึ่งยึดเกาะอย่างจำเพาะกับเซลลูโลสร่วมกับ Sephacryl S-300 gel filtration chromatography พบว่าเอนไซม์เชิงซ้อนที่แยกได้มีขนาดประมาณ 1,200 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้เทคนิค native-PAGE, native-zymogram, SDS-PAGE และ SDS-zymogram พบว่ามีโปรตีนเพียงกลุ่มเดียวและแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในรูปแบบธรรมชาติ (เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค native-PAGE และ native-zymogram) ซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยอย่างน้อย 21 ชนิด และไซลาเนสอย่างน้อย 5 ชนิด (เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ SDS-zymogram ตามลำดับ) นอกจากนี้เอนไซม์เชิงซ้อนยังแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟูราโนซิเดส เบต้ากลูโคซิเดส และเซลโลไบโอไฮโดรเลส จากการตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อย พบว่าเอนไซม์เชิงซ้อนที่แยกได้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไซแลนและเปลือกข้าวโพดซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เชิงซ้อนที่ผลิตจากแบคทีเรียในจีนัส *Thermoanaerobacterium* โดยเอนไซม์เชิงซ้อนสายพันธุ์ NOI-1 ที่ผลิตขึ้นนี้จัดเป็นเอนไซม์เชิงซ้อนที่ปราศจากเอนโดเซลลูเลส

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงร่วมกัน/ แบคทีเรียไม่ต้องการออกซิเจนและทนอุณหภูมิสูง/ พฤติกรรมการอยู่ร่วมกัน/ เอนไซม์เชิงซ้อนที่ปราศจากเอนโดเซลลูเลส/ เอนไซม์เซลลูโลไลติก-ไซลาโนไลติก/ *Clostridium thermocellum*/ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*