บทคัดย่อ

T 151480

เซลลูโลส เป็นโพลิแซกคาไรด์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะβ - 1,4 link เป็นเยื่อใยที่พบได้มากในพืช เซลลูโลสถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเอนไซม์นี้มีความสำคัญในอุตสาหกรรมชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อยอาหารหยาบอยู่แล้ว แต่การเสริมเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารสัตว์ก็พบว่าช่วยเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือ การแยกยีนที่แปรรหัสเป็นเอนไซม์เซลลูเลสชนิดใหม่จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ในขั้นต้นนำแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโคมาแยกและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) และ กระดาษกรอง เป็นสับสเตรท แบคทีเรียทั้งแบบกลุ่มและแบบโคโลนีเดี่ยวที่พบกิจกรรมของเอนไซม์จะถูกคัดเลือกเพื่อแยกยีนเซลลูเลส โดยใช้เทคนิค PCR-based cloning technique ซึ่งไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ออกแบบมาจากลำดับอนุรักษ์จากกรดอะมิโนของเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ ที่มีรายงานไว้แล้ว ดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จะนำไปเชื่อมต่อกับ pGEM®T-Easy vector ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ซึ่งจะนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในลำดับต่อไป ผลที่ได้พบว่าโคลนที่ 10.4 และ 11.3 มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 800 เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีนเซลลูเลส ชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองมีความคล้ายคลึงกันกับยีน *endB* ของ *Ruminococcus flavefaciens* โดยผลการทดลองสามารถบอกถึงความเป็นไปได้ในการที่จะได้ยีนเซลลูเลสชนิดใหม่จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน การหาลำดับของยีนทั้งหมดจากแบคทีเรียโดยเทคนิค Genome walking และการโคลนยีนนี้เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ต่อไปในอนาคต

Cellulose, a polysaccharide composed of β-1,4-link glucose units, is the most abundant fiber in plants. Cellulases which are involved in hydrolysis of cellulose have been found in several microorganisms. They are important for several industries, especially in animal feeds. Although ruminal bacteria exhibited multiple cellulase activities for digesting forage, supplementation of cellulases in the animal feeds will accelerate ruminant growth and production. This study aimed to isolate genes encoding novel cellulase enzymes from the ruminant bacteria. The bacteria from cattle rumen were isolated and screened for cellulolytic activities using Carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) and filter paper as substrates. Both bacterial group and single isolates that exhibited cellulolytic activities were selected for amplification of cellulase genes by PCR-based cloning technique. The primers used in this study were designed from the conserved amino acid sequences of known cellulase enzymes. The resulting PCR products were cloned into pGEM®-T Easy vector and the DNA inserts in the obtained recombinant plasmids were subjected for nucleotide sequencing. Two clones, No.10.4 and 11.3 with 800 bp PCR fragment were shown to contained partial cellulase genes. Both had 81% identities to the *endB* gene from *Ruminococcus flavefaciens*. These results suggested the possibility to obtain novel cellulase enzymes from isolated ruminal bacteria. Further identification of full length cellulase genes from these bacteria can be done by Genome walking. Cloning of this full length gene will be useful for enzyme improvement and applications.