



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสของแบคทีเรียที่ผลิต
เอนไซม์เซลลูเลสและการโคลนยีนเซลลูเลสเข้าสู่ *Escherichia coli*

**Cellulase-producing bacteria: cellulose hydrolysis and cloning
of their cellulase genes into *Escherichia coli***

โดย

ผศ. ดร. วิไลลักษณ์ ศิริพรอดุลศิลป์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ประจำปีงบประมาณ 2554

บทคัดย่อ

ในการคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากฟางข้าว สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 48 ไอโซเลท และเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้ดีพบว่า มีจำนวน 8 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตและมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้ในช่วง pH 6.0 – 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและการเขย่าที่ 100 -150 รอบต่อนาที โดยมี 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลท เป็นแบบ non growth-associated type โดยเมื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเอนไซม์ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 9.3 และ JD 4.4 สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดที่ 0.032, 0.021 และ 0.020 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และมีสภาวะที่เหมาะสมตามลำดับดังนี้ คือ pH 6.0, 37 °C, 100 ml, pH 6.5, 37 °C, 150 ml และ pH 7.0, 37°C, 150 ml ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวจะได้รับการศึกษาวิจัยถึงคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสในระดับชีวโมเลกุลและนำไปสู่การพัฒนากระบวนการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อไป

คำสำคัญ : เซลลูเลส, คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

Abstract

In a study on isolation and characterization of cellulolytic bacteria from rice straw, the 48 isolated bacteria was selected for further study on ability in cellulose degradation. The study showed that 8 isolates including JD2.2, JD2.4, JD4.2, JD4.3, JD4.4, JD7.4, JD8.4 and JD9.3 had a high cellulase activity. The suitable medium of cellulase production was carboxymethylcellulose (CMC) medium containing 0.5% CMC, 0.5% NaNO_3 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KCl, 0.1% MgSO_4 , 0.05% yeast extract, pH 7.0. The condition effecting cell growth and cellulase production were tested as follows; temperature 30-40 °C, pH 6.0-7.5 and shaking rate at 100-150 ml. Interestingly, the relationship between cells growth and cellulase activity of the 8 isolates were non growth-associated type. Cellulase activity and optimal condition for cellulase production of isolate JD 2.2, JD 9.3 and JD 4.4 were 0.0320 U/ml at pH 6.0, 37 °C, 100 ml; 0.0210 U/ml at pH 6.5, 37 °C, 150 ml; and 0.0200 U/ml at pH 7.0, 37 °C, 100 ml, respectively. Therefore, these bacterial isolated will be further characterized for the cellulase genes and an application for a degradation of cellulosic-containing agricultural wastes.

Keyword : Rice straw, Cellulase, Carboxymethylcellulose

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง “การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการโคลนยีนเซลลูเลสเข้าสู่ *Escherichia coli*” เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความอนุเคราะห์เงินทุนวิจัยจากการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2554 ขอขอบคุณ นางสาวแคทรียา แสงศรีเรือง นักศึกษาภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับการเก็บตัวอย่างและการทดลองในห้องปฏิบัติการ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สำหรับความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ในการทำวิจัย ทั้งนี้เนื่องจากเป็นทุนวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี การศึกษาในระดับยีนของเอนไซม์เซลลูเลสจะได้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2555 ต่อไป

วิไลลักษณ์ ศิริพรอดุลศิลป์

21 มกราคม 2556

สารบัญ

เรื่อง	หน้า	
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญรูป	ซ	
บทที่ 1 บทนำ		1
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร		3
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง		15
1. การเก็บตัวอย่างฟางข้าว		16
2. การแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส		16
3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์		17
4. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียสร้างโดยวิธี DNS		17
5. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์		18
6. การศึกษาความเป็นกรด – ด่าง		18
7. การศึกษาความเร็วรอบของการเขย่า		19
8. การย้อมสีแกรมและทดสอบ catalase		19
บทที่ 4 ผลการทดลอง		20
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง		39
เอกสารอ้างอิง		43
ภาคผนวก		
ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง		45
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อ		52
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี และวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์		54
ภาคผนวก ง การย้อมสีแกรม (Gram's straining)		57
ภาคผนวก ฉ การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส		58

สารบัญตาราง

ผลการทดลอง	หน้า	
ตารางที่ 1 ส่วนของพีชชนิดต่าง ๆ ที่มีเซลล์โลสเป็นองค์ประกอบ		6
ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลล์โลส		12
ตารางที่ 3 สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลล์เลสของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท		34
ตารางที่ 4 การติดสีแกรมและรูปร่าง, การเรียงตัวของแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3		35
ตารางที่ 5 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3	36	
ตารางที่ 6 ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3	36	
ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท ได้แก่ JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3		38
ตารางที่ 8 ค่า OD ₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 7.0, 150 ml		45
ตารางที่ 9 ค่า OD ₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 7.5 , 150 ml		45
ตารางที่ 10 ค่า OD ₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 6.5, 150 ml		46
ตารางที่ 11 ค่า OD ₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 6.0, 150 ml		46
ตารางที่ 12 ค่า OD ₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 5.5, 150 ml		47
ตารางที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C, pH = 7.0, 150 ml		47
ตารางที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C, pH = 7.5, 150 ml		48
ตารางที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C, pH = 6.5, 150 ml		48
ตารางที่ 16 กิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C, pH = 6.0, 150 ml		49
ตารางที่ 17 กิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C, pH = 5.5, 150 ml		49
ตารางที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลล์เลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้		50

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) โดยวิธี DNS ณ สภาวะอุณหภูมิ, pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ที่คัดเลือกได้ ความเร็วรอบการเขย่า 100 ml	50
ตารางที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) โดยวิธี DNS ณ สภาวะอุณหภูมิ, pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ที่คัดเลือกได้ความเร็วรอบการเขย่า 150 ml	51
ตารางที่ 21 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS	55

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของผนังเซลล์พืชทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง	4
รูปที่ 2 โครงสร้างของเซลลูโลส	6
รูปที่ 3 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลส(native cellulose)ของเอนไซม์เซลลูเลส	8
รูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์เชิงซ้อนในการย่อยสลายเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช	9
รูปที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างฟางข้าว	21
รูปที่ 6 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 °C, pH = 7.0, 150 rpm	23
รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C, pH = 7.0, 150 rpm	23
รูปที่ 8 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 7.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm	25
รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C, pH = 7.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm	25
รูปที่ 10 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 6.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm	26
รูปที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C, pH = 6.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm	26
รูปที่ 12 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 6.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm	27

รูปที่ 13	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C, pH = 6.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm	27
รูปที่ 14	อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 5.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm	28
รูปที่ 15	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C, pH = 5.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm	28
รูปที่ 16	การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2 (A) และ JD 2.4 (B) เมื่อเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ตามลำดับ 30	
รูปที่ 17	การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 4.2 (A) และ JD 4.3 (B) เมื่อเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ตามลำดับ 31	
รูปที่ 18	การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 4.4 (A) และ JD 7.4 (B) เมื่อเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ตามลำดับ	32
รูปที่ 19	การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 8.4 (A) และ JD 9.3 (B) เมื่อเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ตามลำดับ	33
รูปที่ 20	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงสุดและปริมาณน้ำตาล reducing sugar ของแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท ณ สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 3 34	
รูปที่ 21	มาตรฐานกลูโคสสำหรับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS	55