การคัดเลือกและแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกจากทางเดินอาหารของหนอนนก *Tenebrio molitor*

SCREENING AND ISOLATION OF CELLULOLYTIC ENZYMES PRODUCING-POTENTLAL BACTERIA FROM THE GUT OF *TENEBRIO MOLITOR*

ซัลไลลา แวมะยิ*[1] *ศุภารัตน์ สุทธิมุสิก[1] มณฑล เลิศวรปรีชา[2] วิชุดา กล้าเวช[3]*

***Sanlaila Waemayi*[1]*,** *Suparat Sutthimusik[1], Monthon Lertworapreecha[2], Wichuda Klawech[3]*

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210.

[2]หน่วยวิจัยการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210.

[2]Microbial Resource Management Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210.

[3]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[3]Department of Environmental Science, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210.

***Corresponding author, E-mail:** wichudaklawech@gmail.com*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ เซลลูเลส ไซลาเนส และเพคติเนส จากตัวอย่างทางเดินอาหารของหนอนนก (*Tenebrio molitor*) ทำการคัดแยกโดยเทคนิคการเจือจางตามลำดับขั้นและคัดเลือกโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลทที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งในจำนวนนี้พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท สร้างเอนไซม์เซลลูเลส 9 ไอโซเลท สร้างเอนไซม์ไซลาเนส และมีเพียง 2 ไอโซเลท ที่สร้างเอนไซม์เพคติเนส ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ พบว่าไอโซเลทที่มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และเพคติเนส สูงที่สุด คือไอโซเลท MW-I , MW-IV และ MW-IX ตามลำดับ โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และเพคติเนส เท่ากับ 1.150, 0.544 และ 0.934 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการจำแนกแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลท MW-I มีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus* spp. ร้อยละ 98 ไอโซเลท MW-IV มีความคล้ายคลึงกับ *Staphylococcus* spp. ร้อยละ 99 และไอโซเลท MW-IX มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus* spp. ร้อยละ 98

คำสำคัญ: หนอนนก เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส เอนไซม์ไซลาเนส

Abstract

The objectives of this study were to isolate and screen for cellulase, xylanase and pectinase producing microorganism form the gut of *Tenebrio molitor.* In this study, screening of cellulase, xylanase and pectinase producing microorganism by serial dilution and selective plating technique. The results showed that at least different 11 isolates of microorganism were be isolated from the samples. Only 6 isolates were able to produce cellulase, 9 isolates exhibited to produce xylanase and only 2 isolates indicated to produce pectinase. The enzyme activity assay indicated the highest cellulase, xylanase and pectinase producing strain was MW-I, MW-IV and MW-IX, respectively. The enzyme activity assay revealed that the cellulase, xylanase and pectinase producing –isolated bacteria strains were 1.150, 0.544 and 0.934 Unit/ml respectively. Molecular identification of 16S rRNA gene indicated that isolates MW-I was similarity *Enterococcus* spp., (98%) MW-IV was similarity *Staphylococcus* spp. (99%) and MW-IX similarity was *Bacillus* spp. (98%)

Keywords: *Tenebrio molitor*, Cellulase Enzyme, Pectinase Enzyme, Xylanase Enzyme

บทนำ

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต โดยเอนไซม์จะจับกับสารตั้งต้นและเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถใช้ประโยชน์จากปฏิกิริยาเคมีได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเอนไซม์จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานต่างๆ มากมาย เช่น เอนไซม์เซลลูเลส นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเกษตร มีการใช้ผสมอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหาร หรืออุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ ที่สามารถใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยพวกเซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำผลไม้ที่ใส เป็นต้น เช่นเดียวกับเอนไซม์เพคติเนสที่สามารถย่อยสลายโมเลกุลของเพคตินที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารพอลีเมอร์ ซึ่งเอนไซม์เพคติเนสนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้และการผลิตไวน์ ช่วยทำให้ได้น้ำผลไม้ที่ใสหรือมีสีที่ใสขึ้น และนอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารจำพวกไซเลน เป็นองค์ประกอบที่พบในโครงสร้างของพืช มีการนำไซลาเนสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เพื่อช่วยในการย่อยสารพวกพอลิแซ็คคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง ทำให้สัตว์นั้นสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่นำมาใช้ส่วนใหญ่เป็นการนำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นหากมีการวิจัยเพื่อค้นหาแหล่งของสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้ในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะกลุ่มของแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณภาพนั้นมาพัฒนาจนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านปศุสัตว์ต่อไป

ปัจจุบันเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนสสามารถสกัดได้จากพืช สัตว์และจุลินทรีย์ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ได้เช่น จุลินทรีย์จากดิน กระเพาะอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง น้ำพุร้อน และจากสิ่งแวดล้อม [1-4] นอกจากนี้หนอนเป็นแหล่งที่น่าสนใจ เนื่องจากตัวอ่อนของหนอนจะกินใบและส่วนประกอบของพืชเป็นอาหารหลักและพบว่าหนอนสามารถใช้ประโยชน์จากสารอาหารในพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง จึงเกิดข้อสันนิษฐานประการหนึ่ง

คือระบบทางเดินอาหารของหนอนอาจจะมีจุลินทรีย์บางชนิดที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกที่ช่วยย่อยสลายส่วนประกอบของใบพืช

หนอนนกเป็นตัวอ่อนของด้วงในกลุ่ม Mealworm Beetle มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tenebrio molitor* เป็นหนอนที่ชอบกินอาหารโดยเฉพาะเมล็ดธัญพืช ขนมปัง รำ และเศษพืช ซึ่งปัจจุบันยังไม่เคยมีรายงานการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์จากหนอนมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และเพคติเนส จากตัวอย่างทางเดินอาหารของหนอนนก (*Tenebrio molitor*) รวมทั้งทำการจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส และเพคติเนส จากตัวอย่างทางเดินอาหารของหนอนนก (*Tenebrio molitor*) ตลอดจนจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่าง

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างหนอนนกที่จำหน่ายในตลาดสดและพื้นที่ใกล้เคียง อ. ป่าพะยอม จ.พัทลุง โดยคัดเลือกตัวอ่อนในระยะการเจริญที่ 5 (Fifth Instar Larva) หรือระยะตัวหนอน (Larvae) หนอนของแมลงชนิดนี้ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อนมีปล้อง 9 ปล้อง ปล้องสุดท้ายมีขนาดเล็กสุด ลำตัวผอมยาวและมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ระยะนี้ลำตัวจะยาวมาก ยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ก่อนจะเข้าดักแด้มาทำการศึกษาจำนวน ประมาณ 10 ตัว

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

นำตัวอ่อนในระยะการเจริญที่ 5 จำนวน 10 ตัว มาสลบโดยนำหนอนนกไปแช่ในตู้เย็น ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่ฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำหนอนนกมาผ่าตามด้านท้อง ดึงเอาส่วนของระบบทางเดินอาหารของหนอน รวมกัน มาใส่ในน้ำเกลือ 0.85% จากนั้นทำการบดให้ละเอียด นำตัวอย่างมาทำการเจือจางในน้ำเกลือ 0.85% ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Plate Count Agar (PCA) ทำการกวาดจาน (Spread Plate Technique) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทุกโคโลนี มาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ Subculture ลงในอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) โดยทำการ streak plate technique แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาย้อมแกรม เพื่อดูลักษณะสันฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย

การตรวจคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์

การตรวจคัดกรองการสร้างโดยเทคนิค screening plate โดยการทดสอบเอนไซม์เซลลูเลสใช้อาหาร carboxy methyl cellulose (CMC) agar ($NaNO_3$ 1g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0.5 g, $MgSO_4$ 0.5 g, Yeast extract 0.5 g, CMC 4 g and agar 15 g ปริมาตร 1 ลิตร) [5] การสร้างเอนไซม์เพคติเนสใช้อาหาร PGA agar (K_2HPO_4 11 g,K_2HPO_4 5.5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.2 g, $MgSO_4$ 0.4 g, pectin 4 g and agar 15 g ปริมาตร 1 ลิตร)[6]และการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสใช้อาหารอาหาร xylan agar (xylan 5 g, Yeast extract 2 g, peptone 5 g, $MgSO_4$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $CaCl_2$ 0.15 g and agar 15 g

ปริมาตร 1 ลิตร) [7] ทดสอบการสร้างเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการวัด clear zone ที่เกิดขึ้นด้วยการย้อมด้วยสารละลาย Gram's iodine solution (iodine 1 g, potassium iodide 2 g ในแอลกอฮอล์ 70%) โดยเทให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีของแบคทีเรีย 5 นาที แล้วเทออกเพื่อดูผลของวงใส (clear zone)

การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA gene โดยเทคนิค PCR

การสกัด DNA เชื้อที่แยกได้ โดยใช้เชื้อแบคทีเรียประมาณ 1-2 โคโลนี ละลายใน TE buffer 200 µl จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA โดยใช้ primers คือ Bact-0341_5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' และ Bact-0785_5'GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' [8] สภาวะและองค์ประกอบสำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA แสดงในตารางที่ 1 ผลผลิตจากการทำ PCR จึงนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค Gel Electrophoresis และตัวอย่าง DNA ที่ได้จะส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Biobasic ประเทศแคนาดา ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และทำ Alignment โดยโปรแกรม MEGA 5

ตารางที่ 1 Primer ความเข้มข้นและสภาวะในการทำ PCR

Primers	Reaction (50 µl)	Condition
Bact-0341 Bact-0785	1X Buffer (100 mM.KCl, 20 mMTris) 1.5 mM $MgCl_2$ 250 µM dNTPs 0.5 pmol Primers 1.25 units of *Taq* 1 µl of DNA Sample	Start 95˚C 10 Min 1 Cycle Denaturation 95˚C 1 Min Annealing 55˚C 1.30 Min Extension 72˚C 1 Min (30 Cycles) Extension 72˚C 10 Min

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

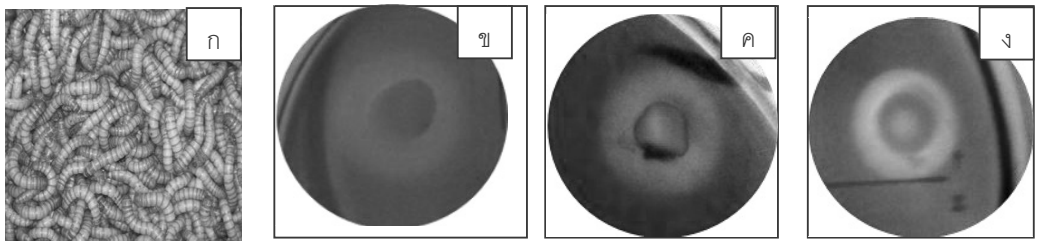
เตรียมหัวเชื้อโดยนำแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ในอาหารเหลว nutrient broth อีกครั้งบ่มที่ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว CMC, PGA และ xylan ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบที่ชั่วโมง 0, 6, 12, 18, 24 นำเชื้อที่ได้มาปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4˚C เป็นเวลา 6 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ Dinitrosalicylic (DNS) acid ของ Miller [9] โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือใช้ supernatant 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารตั้งต้นแต่ละชนิด 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50˚C สำหรับเอนไซม์เซลลูเลส 40˚C สำหรับเอนไซม์เพคติเนส และ 50˚C สำหรับเอนไซม์ไซลาเนส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ได้ 4 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูด

กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส ทำการทดลอง 3 ครั้ง

ผลการวิจัย

การแยกเชื้อแบคทีเรียและการทดสอบการสร้างเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก

การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จากทางเดินอาหารของหนอนนก พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 11 ไอโซเลท ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ได้ จากการทดสอบคัดกรองในอาหารที่ผสมสับสเตรท สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 6 ไอโซเลท แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพคติเนส จำนวน 2 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนส จำนวน 9 ไอโซเลท สรุปผลลักษณะของเชื้อที่แยกได้แสดงในภาพที่ 1 และ ตารางที่ 2



ภาพที่ 1 ตัวอย่างหนอนและวงใสของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการย่อยเอนไซม์ทั้งสามชนิดที่แยกได้จากหนอนนก ก) ตัวอย่างหนอนนก ข) ไอโซเลท MW-I ที่ให้ผลการย่อยเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดบนอาหาร CMC agar ค) ไอโซเลท MW-IV ที่ให้ผลการย่อยเอนไซม์เพคติเนสสูงสุดบนอาหาร PGA agar ง) ไอโซเลท MW-IX ที่ให้ผลการย่อยเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดบนอาหาร xylan agar

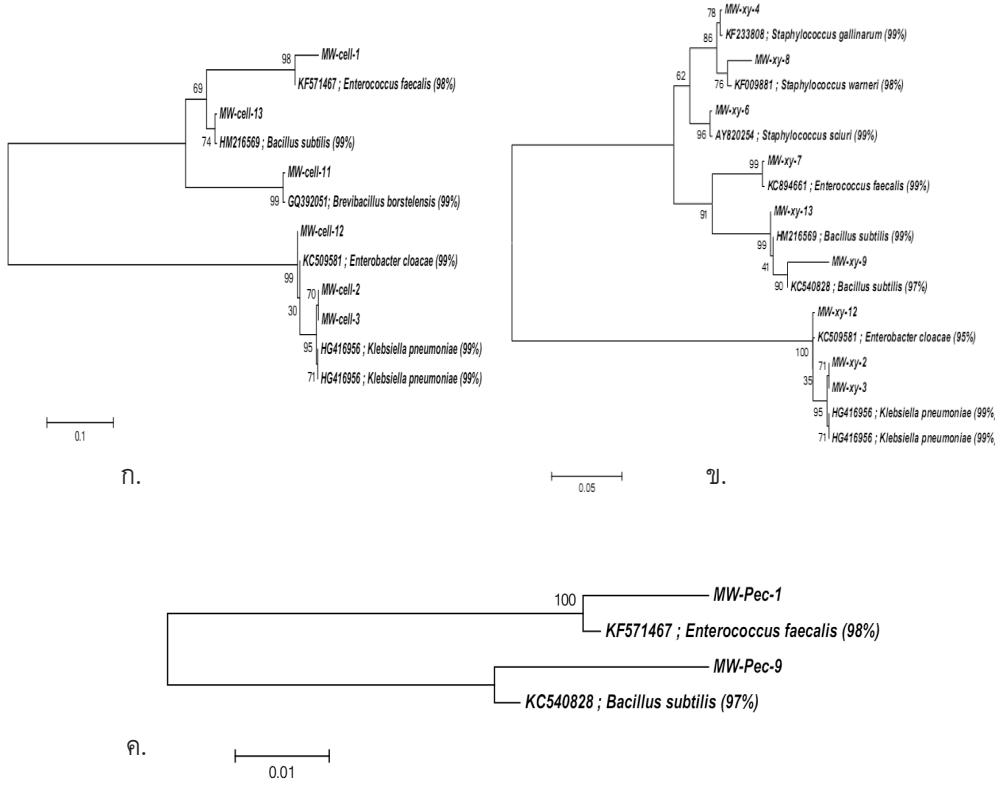
ตารางที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและการจำแนกเชื้อด้วยการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการย่อยเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง	การย้อมสีแกรม	ผลการจำแนก 16S rRNA gene	CMC	PGA	Xylan
MW-I	บวก กลม	*Enterococcus faecalis*	+	+	-
MW -II	ลบ ท่อนสั้น	*Klebsiella pneumoniae Klebsiella*	+	-	+
MW -III	ลบ ท่อนสั้น	*pneumoniae*	+	-	+
MW -IV	บวก กลม	*Staphylococcus gallinarum*	-	-	+
MW-VI	บวก กลม	*Staphylococcus sciuri*	-	-	+
MW-VII	บวก กลม	*Enterococcus faecalis*	-	-	+
MW-VIII	บวก กลม	*Staphylococcus warneri*	-	-	+
MW-IX	บวก ท่อนยาว เป็นเส้นสายยาวๆ	*Bacillus subtilis*	-	+	+
MW-XI	บวก ท่อนยาว มีสปอร์	*Brevibacillus borstelensis*	+	-	-
MW-XII	ลบ ท่อนสั้น	*Enterobacter cloacae*	+	-	+
MW-XIII	บวก ท่อนยาว	*Bacillus subtilis*	+	-	+

หมายเหตุ: + หมายถึง มีวงใส (Clear Zone) หรือมีการสร้างเอนไซม์
- หมายถึง ไม่มีวงใส (Clear Zone) หรือไม่มีการสร้างเอนไซม์

การจำแนกเชื้อด้วยการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA

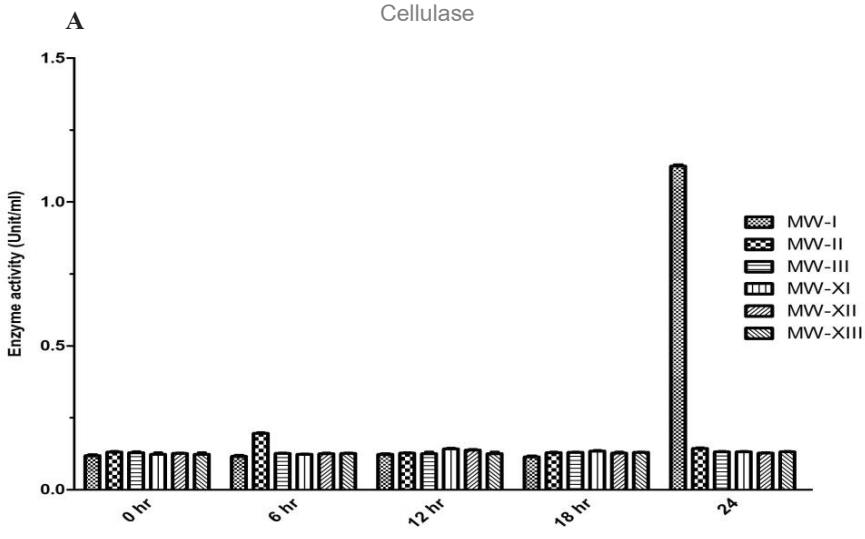
ผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล GenBank และข้อมูลพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW-I มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Enterococcus faecalis* (KF571467) ร้อยละ 98 และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW-II มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* (HG419656) ร้อยละ 99 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW-III มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Klebsiella pneumonia* (HG419656) ร้อยละ 99 เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท MW-IV มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Staphylococcus gallinarum* (KF233808) ร้อยละ 99 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW-VI มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Staphylococcus sciuri* (AY820254) ร้อยละ 99 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW -VII มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Enterococcus faecalis* (KC894661) ร้อยละ 99 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW -VIII มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Staphylococcus warneri* (KF009881) ร้อยละ 98 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW -IX มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* (KC540828) ร้อยละ 97 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW - XI มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Brevibacillus borstelensis* (QC392051) ร้อยละ 99 เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW - XII มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Enterobacter cloacae* (KC509581) ร้อยละ 95 และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท MW - XIII มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* (HM216569) ร้อยละ 99 (ภาพที่ 2)



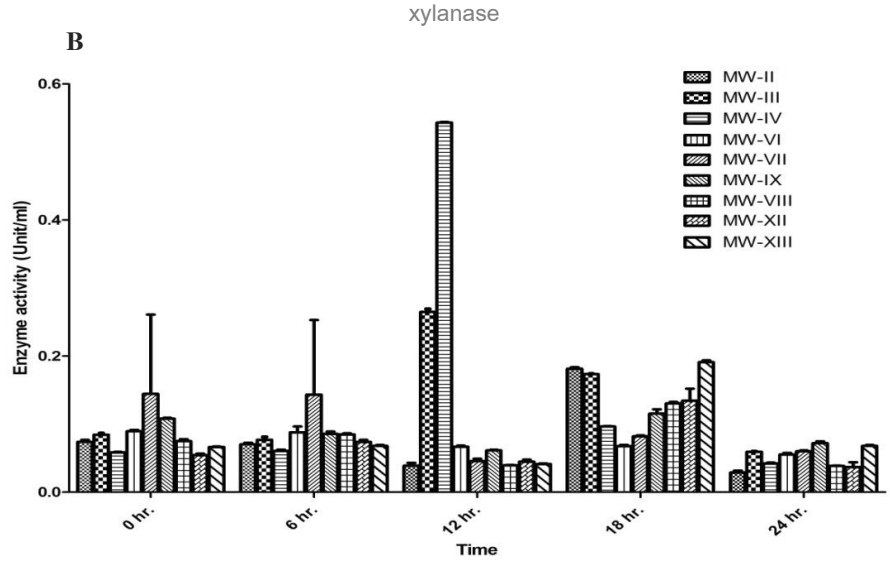
ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้าง Phylogenetic Tree แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ก. ไอโซเลทที่ย่อยเอนไซม์เซลลูเลส ข. ไอโซเลทที่ย่อยเอนไซม์ไซลาเนส ค. ไอโซเลทที่ย่อยเอนไซม์เพคติเนส

ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

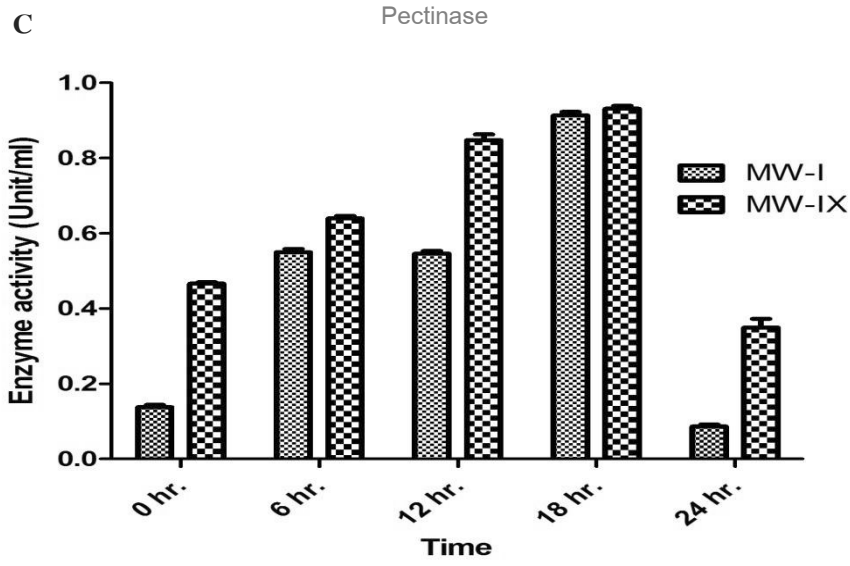
ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยเก็บตัวอย่างในช่วงระยะเวลาที่ 0,6,12, 18,24 ชั่วโมง ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า ไอโซเลท MW-I (*Enterococcus faecalis*) ให้ผลทดสอบกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 1.150 Unit/ml โดยให้ผลสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ไอโซเลท MW-IV (*Staphylococcus gallinarum*) มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.544 Unit/ml โดยให้ผลสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนส พบว่า ไอโซเลท MW-IX (*Bacillus subtilis*) ให้ผลทดสอบกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.934 Unit/ml โดยให้ผลสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 18 (ภาพที่ 3)



ก : แบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส



ข : แบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนส



ค : แบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์เพคติเนส

ภาพที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกสูงสุดจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ จำนวน 11 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ จาก *T.molitor*

สรุปและอภิปรายผล

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนสและเพคติเนส จากระบบทางเดินอาหารของหนอนนก พบว่ามีจุลินทรีย์ จำนวน 6 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และมีอีกจุลินทรีย์ จำนวน 9 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส และมีจุลินทรีย์จำนวน 2 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกต่อการสร้างเอนไซม์เพคติเนส ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในระบบทางเดินอาหารของหนอนนกมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะแยกเชื้อได้ไม่มากนักแต่ก็ไม่ได้หมายความว่าในระบบทางเดินอาหารของหนอนนกจะมีเพียงแค่เท่าที่ตรวจพบ อาจจะเนื่องมาจากในการศึกษานี้จะเน้นการหาเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่ต้องการออกซิเจน (Aerobic Condition) ในการเจริญหรือแม้แต่จุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเจริญเลี้ยงได้อีกเป็นจำนวนมากที่อาจจะสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้ และการศึกษานี้ยังพบอีกว่า ตัวอย่างจากหนอนนกพบเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่คือเชื้อ *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Brevibacillus borstelensis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcu*s sp.บางชนิด และยังพบเชื้อ *Enterococcus faecalis* กับ *Enterobacter cloacae* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหลายรายงาน ที่พบว่าสามารถพบเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ในทางอาหารของหนอนได้หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทั่วๆ ไป เช่น *Bacillus* sp. *Aeromonas* sp., *Citrobacter freundii, Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Pseudomonas. fluorescens, Serratia liquefaciens*, และ *Aeromonas* sp. [10-12] และผลการจำแนกเชื้อโดยการตรวจสอบยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อไอโซเลท MW-I คือ *Enterococcus faecalis*, ไอโซเลท MW-II คือ

Klebsiella pneumoniae, ไอโซเลท MW-III คือ *Klebsiella pneumonia*, ไอโซเลท MW-IV คือ *Staphylococcus gallinarum* ,ไอโซเลท MW-VI คือ *Staphylococcus sciuri*, ไอโซเลท MW-VII คือ *Enterococcus faecalis*, ไอโซเลท MW-VIII คือ *Staphylococcus warneri*, ไอโซเลท MW-IX คือ *Bacillus subtilis*, ไอโซเลท MW-XI คือ *Brevibacillus borstelensis*, ไอโซเลท MW - XII คือ *Enterobacter cloacae* และไอโซเลท MW - XIII คือ *Bacillus subtilis* ในการศึกษานี้ใช้ primers ที่สามารถจำแนกเชื้อที่มีความหลากหลายได้เป็นอย่างดี การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถครอบคลุมการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA จากแบคทีเรียได้สูงโดยครอบคลุมในกลุ่ม Bacteroidetes: 89.2%, Alphaproteobacteria: 81.4% และ Gammaproteobacteria: 90.6% [8] อย่างไรก็ตามเชื้อที่จำแนกได้ยังคงต้องการผลการวิเคราะห์ในด้านอื่นๆ เช่นคุณสมบัติทางชีวเคมี สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ รวมทั้งลักษณะของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อยืนยันว่าเชื้อที่ได้อาจจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ และผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า เชื้อไอโซเลท MW-I (*Enterococcus faecalis*) ให้ผลทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดเท่ากับ (1.150 Unit/ml) เชื้อไอโซเลท MW-IV (*Staphylococcus gallinarum*) ให้ผลทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ (0.544 Unit/ml) และ ไอโซเลท MW-IX (*Bacillus subtilis*) ให้ผลทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.934 (Unit/ml) เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิดที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของหนอนนกมีแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมเอนไซม์ทั้งสามชนิดที่สูง เป็นเพราะว่าสารตั้งต้นที่นำมาทดสอบนั้นอาจจะมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ และเอนไซม์ที่แสดงออกในแต่ละช่วงเวลาอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันทุกช่วงเวลาที่เก็บ ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นั้นมีการแสดงออกตลอดเวลา (Constitutive Expression) [13]

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อหาแนวทางการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาในด้านอื่นๆ เช่น การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเอนไซม์จากเชื้อที่แยกได้ รวมทั้งลักษณะของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพิจารณาในการคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

บทความวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยทักษิณ บางส่วนจากทุนอุดหนุนการวิจัยตามยุทธศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2555 และหน่วยวิจัยการจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

เอกสารอ้างอิง

[1] Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advance*. 18(5): 355-383.

[2] Han, Y. W., and Srinivasan, V. R. (1968). Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. *Applied Microbiology*. 16(8): 1140-1145.

[3] Li, X. and Gao, P. (1996). Isolation and partial characterization of cellulose-degrading strain of *Streptomyces* sp. LX from soil. *Letter Applied Microbiology*. 22(3): 209-213.

[4] Samanta, B. P., Cladera-Olivera, F., Daroit, D. J., and Brandelli, A. (2011). Cellulase-producing Bacillus strains isolated from the intestine of Amazon basin fish. *Aquaculture Research.* 42(6): 887-891.

[5] Kasana RC., Salwan R., Dhar H., Dutt S., and Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology.* 57(5): 503-507.

[6] Collmer and N.T.Keen. (1988). Assay method for pectic enzyme. *Method Enzymol*. 161: 329-399.

[7] Sea-Lee, N. (2007). The production of fungal mammanase cellulase and xylanase using plam kernel meal as a substrate. *Walailak journal science and technology*. 4(1): 67-82.

[8] Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glockner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41(1):1-11.

[9] Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.

[10] Anand, A. A. P., Vennison, S. J., Sankar, S. G. , Prabhu, D. I. G., Vassan, P. T., and Raghuraman, T. (2009). Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Boxbyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science.* 107(5): 355-383.

[11] Lehman, R.M., Lundgren, J.G., and Petzke, L.M. (2008). Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their modification by laboratory rearing and antibiotic treatment. *Microbial Ecology*. 57(2):349–358.

[12] Gusmao, D. S., Santos, A.V., Marini, D.C., de Souza Ruusso E , Peixoto, A.M.D., Junior, M. B., Berbert Molina, M.A., and Lemos, F. J. A. (2007). First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 102(8): 919–924.

[13] ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2556). *เอนไซม์เทคโนโลยี.* กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.