รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1.**ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2.**โครงการวิจัย** : การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืชจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์

กิจกรรม : รวบรวมพัฒนาสายพันธุ์สารสำคัญ และผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

3.ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การศึกษาเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและการโคลนยีนไซลาเนสเพื่อการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : The Study of Fungi Which has the Potential to Produce Xylanase Enzymes and Cloning of Xylanase to Degrade Hemicellulose Using Biotechnology

4.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน

1. นางสาวภรณี สว่างศรี
2. นางสุภาวดี ง้อเหรียญ
3. นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5.บทคัดย่อ

จากการก็บรวบรวมเชื้อราทั้งหมด 32 สายพันธุ์นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูเลส พบว่ามี 10 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีบนอาหารทั้ง 4 ชนิดได้แก่ CMC เปลือกข้าวโพด เปลือกมัน และอากาเว่ สายพันธุ์เชื้อราดินที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ดีและผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก คือ *A. niger* S068, *A. niger* S040 เชื้อราสายพันธุ์ S008 และ S048 ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ยังไม่ได้ทำการจัดจำแนกทาง ITS จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นว่า เชื้อราดินส่วนใหญ่นั้นมีความสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสบนอาหารทั้ง 4 ชนิด ได้ดีกว่าเชื้อราที่แยกได้จากปาล์ม นั้นแสดงว่าเชื้อรากลุ่มดังกล่าวอาจมีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีทั้งเอนไซม์ Cellulase และ Xylanase ขณะที่เชื้อราบางกลุ่มมีความสามารถย่อยได้เพียงบางชนิดของอาหารเท่านั้น อาจเป็นเพราะเชื้อรามีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อย

เฮมิเซลลูโลสได้เพียงบางชนิดเท่านั้น เชื้อราบางชนิดอาจสร้างเอนไซม์ Cellulase และ Xylanase เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น **ด้านการโคลนยีน** เมื่อมีการเลี้ยง *E. coli* BL21 (DES 3) ที่พลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO มียีน β -D – xylosidase ได้แก่ XldC1, Xld2C1 และXldC4ที่กระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 4 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบเติมและแบบไม่เติม IPTG พบว่า มีการย่อยบนอาหารไซเลน ข้าวโพดและอากาเว่ได้ดี ในขณะที่มีการย่อยได้น้อยมากบนอาหารที่ผสมเปลือกมัน และไม่เกิดการย่อยบนอาหาร CMC เลย ซึ่งผลจากการเลี้ยงเชื้อ แบบเติมและแบบไม่เติม IPTG พบว่า ให้ผลการย่อยเคลียร์โซนบนอาหารที่มีส่วนผสมของไซเลน อากาเว่และข้าวโพดที่ไม่แตกต่างกัน

6.คำนำ

ปัจจุบันโลกมีอัตราการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลายๆ ประเทศทั่วโลกจึงแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่เพื่อเป็นหลักประกันความมั่นคงด้านพลังงานในระยะยาว ทั้งยังเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการใช้พลังงานที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมัน และ ถ่านหิน อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะ โลกร้อน

ในภาวะของภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงอย่างมาก ณ ปัจจุบัน น้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญของโลกกำลังจะหมดลง แหล่งอาหารของโลกก็ลดลงเช่นเดียวกันเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกแบบทวีคูณในขณะที่ผลิตอาหารเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลงเนื่องจากความแห้งแล้ง การใช้พื้นที่เพื่อการอยู่อาศัยมากขึ้นและภัยธรรมชาติต่างๆ จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะพัฒนาแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงเหลวจากแหล่งใหม่ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนธรรมชาติโดยไม่รบกวนพืชอาหาร ซึ่งแหล่งของพลังงานรุ่นแรกได้แก่ข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง อ้อยและอื่นๆ มีปริมาณจำกัดทั้งยังเป็นพืชอาหารและใช้ในการผลิตอาหารของโลก

จากการที่ประเทศไทยมีความต้องการใช้พลังงานของประเทศที่มีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และแหล่งพลังงานในประเทศมีอัตราการผลิตได้ไม่เพียงพอกับอัตราการใช้ ประกอบราคาน้ำมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในตลาดโลกมีราคาแพง จึงต้องเร่งรัด ค้นคว้าหาแหล่งพลังงานทดแทนซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด แม้ว่าการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จะยังผลิตจากแป้งและน้ำตาล แต่ปัจจุบันประเทศไทยกำลังให้ความสนใจการผลิตเอทานอลจากมวลชีวภาพซึ่งมีองค์ประกอบหลักได้แก่เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งรวมเรียกว่าลิกโนเซลลูโลส ซึ่งคาดว่าในปี 2010 ในต่างประเทศจะเน้นการผลิตด้วยลิกโนเซลลูโลสเป็นหลัก เนื่องจากแป้งและน้ำตาลเป็นพืชอาหารอาจผลิตได้ไม่เพียงพอสำหรับการบริโภค จึงต้องใช้วัสดุอื่นทดแทน (พิสมัย, 2548)

การผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสเป็นการผลิตแอลกอฮอล์จากการหมักพืช เศษซากพืชเพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชให้เป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งมีข้อดีหลายประการเช่น เป็นการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในท้องถิ่นนั้น ๆ ก่อให้เกิดการจ้างงานในท้องถิ่น ลดภาระการพึ่งพาแหล่งพลังงานจากต่างประเทศ ทำให้เกษตรกรมีรายได้ ลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ มีความมั่นคงทาง

พลังงานเพิ่มขึ้น ใช้เทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อนในกระบวนการผลิตจึงพึ่งพาตนเองได้ พลังงานที่ได้ในรูปของเหลวสามารถนำไปใช้กับเทคโนโลยียานยนต์ในยุคปัจจุบัน

ไซแลน หรือเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสำคัญอันดับสองรองจากเซลลูโลส ในเซลพืชประกอบด้วยเซลลูโลส 40 - 60 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลสหรือไซแลน 30 - 40 เปอร์เซ็นต์ ในการย่อยสลายมวลชีวภาพให้สมบูรณ์จะต้องย่อยทั้งสองส่วนคือเซลลูโลสและไซแลนจึงจะสามารถใช้ประโยชน์สูงสุดจากมวลชีวภาพได้ ในการย่อยจะต้องใช้เอนไซม์ 2 กลุ่มคือ กลุ่มเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส ประกอบด้วย เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ cellobiohydrolases, Endoglucanases และ beta-glucosidases ส่วนเอนไซม์กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดได้แก่ Endo-beta-xylanase, beta-D-xylosidase และ alpha-l-Arabinofuranosidase ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะถูกควบคุมด้วยยีนต่างชนิดกัน ในการทดลองนี้จะเน้นการศึกษาเอนไซม์กลุ่มที่ 2 เป็นหลัก เนื่องจากได้ดำเนินการศึกษาเอนไซม์กลุ่มแรกแล้ว โดยหวังว่าจะสามารถผลิตน้ำตาลจากลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ คุ้มค่าต่อการลงทุนในการผลิตเอทานอลและการผลิตเอนไซม์ได้ในระดับอุตสาหกรรมได้ในที่สุด

7.อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดินจากบริเวณไม้ผุ กากชานอ้อยผุ และกองปุ๋ยหมักเก่า

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Basal media (BSS),

BSS + CMC-Na, BSS + เปลือกข้าวโพดป่น, BSS + อากาเว่ป่น, BSS + เปลือกมันสำปะหลังบด, BSS + ฟางข้าวบด

3.เครื่องมือ

- เครื่อง spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าดูดกลืนแสง
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR
- เครื่องอ่านเจล Gel documentation
- อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P20 P2 ไมโครลิตร

4.สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR Amplification)
- สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis
- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ
- สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method
- สารเคมีทดสอบโปรตีนด้วยวิธี Bradford method

5. ชุดสำเร็จรูป

- ชุดสกัดแยก MasterPure TM RNA Purification Kit ของ Epicentre® Biotechnologies (Madison, USA)สำหรับแยก total RNA
- ชุดการสังเคราะห์ cDNA สายแรก RevertAid TM Firststand cDNA Synthesis K ของ Qiagen
- ชุดการทำโคลนและเวคเตอร์ ชุด The EasySelect TM Pichia Expression Kit QIAGEN PCR Cloning Kit ของ Qiagen
- ชุดวิเคราะห์โปรตีน SDS PAGE ชุด NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (invitrogen)

วิธีดำเนินการ

การทดลองย่อยที่ 1 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากราดิน

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บรวบรวม จำแนกและคัดแยกเชื้อราที่มีคุณสมบัติทนร้อนด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

การเก็บรวบรวม และคัดแยกจุลินทรีย์จากดินที่เก็บรวบรวมได้จากประเทศไทย

ทำการเก็บตัวอย่างดินผุจากกองไม้ผุ กากชานอ้อย และกองปุ๋ยหมักเก่าๆ แล้วนำมาคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อรา แบคทีเรียด้วยการนำดิน และวัสดุมาผ่านความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกราดินกลุ่มทนร้อนบนอาหาร PDA เมื่อราดินเหล่านี้เจริญเติบโต จึงทำการเก็บเส้นใย แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหาร PDA อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนมั่นใจว่าเชื้อที่แยกได้บริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อน จึงนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหาร PDA จึงเก็บเกี่ยวเส้นใยเหล่านั้นไปทำการสกัด DNA ต่อไป

การจำแนกชนิดของราดินด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยของราที่เลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 5Sr RNA

โดยการใช้ Primer ITS1 และ ITS4

ITS1

ITS4

โดยใช้ปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

DNA template	2 ไมโครลิตร
5x Buffer	10 ไมโครลิตร

dNTPs (2mM)	4 ไมโครลิตร
MgCl2 (25mM)	4 ไมโครลิตร
Primer Forward (10μM)	2 ไมโครลิตร
Primer Reverse (10μM)	2 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase , Promega	0.2 ไมโครลิตร
Distrilled water	25.8 ไมโครลิตร
ปริมาณรวม	50 ไมโครลิตร

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้น ลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle , Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธี เจลอิเลคโตรโฟริซิส

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดที่สกัดได้ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณ 5SrDNA จำนวนเพียงชิ้นเดียวนั้นไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequence จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดปริมาณ 560 คู่เบส

การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Gene Bank

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gene Bank โดยใช้โปรแกรม BlastN จะได้ข้อมูลชื่อของสิ่งมีชีวิตจุลินทรีย์

ขั้นตอนที่ 2 การคัดแยกเชื้อราที่ย่อยไซแลนโดยการทดสอบผลการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสด้วย วิธี congo red diffusion assay

1.นำเชื้อราที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 3 วันเพื่อเป็นเชื้อตั้งต้น

2.ตัดปลายเส้นใยด้วย corkborer No. 2 นำไปเลี้ยงบน อาหารแข็งที่มี Xylan เป็นองค์ประกอบ เป็นเวลา 3 วัน

3.ราดทับด้วย 0.1 % congo red ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างออกด้วย 1 MNaCl

4.คัดแยกเอาเชื้อราที่สามารถทำให้เกิดบริเวณวงใสใหญ่ที่สุด เพื่อนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส

1.เลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิห้อง

2.ตัดปลายเส้นใยให้มีขนาด 0.5 x 0.5 cm. 5 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุ production medium 100 ml นำไปเขย่าในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน

3.อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส

4.นำเชื้อที่ได้มาปั่นด้วยเบลนเดอร์ นาน 30 วินาที กรองเอาน้ำใสเพื่อใช้เป็น crude enzyme

5.ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้ โดยวิธี DNS method เปรียบเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน

ขั้นตอนที่ 4 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา

1.นำเชื้อราที่คัดแยกได้จากขั้นตอนที่ 3 และเชื้อรามาตรฐาน มาเลี้ยงในอาหารแข็ง เป็นเวลา 3 วัน

2.ตัดปลายเส้นใยด้วย corkborer No. 2 จำนวน 30 ชิ้นใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มล. ที่บรรจุอาหาร production medium 200 มล. และ ไซแลน 5 กรัม นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.นำมาปั่นด้วยเบลนเดอนาน 30 วินาที นำ crude enzyme มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

ขั้นตอนที่ 5 วิเคราะห์ สรุปผลการทดลอง

การทดลองย่อยที่ 2 การโคลนยีน Xylanases จากราดินที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไซแลนได้ดีและการผลิตเอนไซม์ xylanases จาก Recombinant Yeast

ขั้นตอนที่ 1 การโคลนยีนไซลาเนสจากราดิน

1.ออกแบบไพรเมอร์ของกลุ่มยีนไซลาเนสจากราที่เกี่ยวข้อง จำนวน 3 ยีนการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ เข้าสู่เวคเตอร์ชนิด TA cloning

นำชิ้นยีนที่ได้จากพีซีอาร์มาทำฏิกิริยา ligation เข้ากับเวคเตอร์ ชนิด TA cloning (ชนิด cohesive end) โดยใช้ชุดโคลนของ Invitrogen

2.สกัดอาร์เอ็นเอของราที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไซแลนเป็นส่วนประกอบเพื่อกระตุ้นให้ราสร้างเอนไซม์ที่ต้องการ

การสกัดพลาสมิด

- นำเชื้อมาปั่นตกตะกอน เทส่วนใสทิ้ง เหลือไว้เพียงเล็กน้อย แล้ว vortex ให้ละลาย
- ดูดน้ำเชื้อ 200 µl ใส่ tube ใหม่ เติม A1 250 µl (ผสมแรงได้) ให้เข้ากัน
- เติม A2 250 µl (คว่ำหงายเบาๆ) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
- เติม A3 250 µl (คว่ำหงายเบาๆ) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000×g 5-10 นาที
- ดูดส่วนใส ใส่Corection tube 800 µl (ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที) ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000×g 1 นาที
- ใส่ AW 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000×g 1 นาที จากนั้นใส่ A4 600 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000×g 1 นาที
- ปั่นแห้ง 2 นาที
- เติม Hycole H2O 30 µl ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000×g 1 นาที
- เก็บส่วนใส

3.เปลี่ยนเป็น cDNA แล้วสร้าง expression library ด้วยระบบเวคเตอร์ยีสต์ (yeast expression system)

4.ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

5.คัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โดยการตรวจสอบวงใส ด้วยวิธี congo red diffusion assay

6.ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์โดยตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ บน Active PAGE ที่มี ไซแลนเป็นซับเสตรท

7.นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ว่าเป็นยีนที่สนใจหรือไม่

ขั้นตอนที่ 2 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก recombinant yeast

นำยีสต์ที่มียีนไซลาเนสมาเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ

- วัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้
- สกัดเอนไซม์หยาบ
- ตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี Bradford method
- แยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ ไซแลนเป็นซับเสรตทด้วยวิธี affinity chromatography
- ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี SDS PAGE
- นำเอนไซม์ไปทดสอบการย่อยสลายไซแลน

การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS method

นำสารละลายที่ได้จากการผลิตเอนไซม์มาทดสอบการผลิตน้ำตาลกลูโคสดังนี้

1 ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

2 เติมสารละลาย DNS ลงไป 2 ml ผสมให้เข้ากัน

3 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง

4 เติมน้ำกลั่น 10 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่า OD520 แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าจากค่ากราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส หาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

การคัดแยกเชื้อราที่ย่อยไซแลนโดยการทดสอบผลการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสด้วยวิธี congo red diffusion assay

นำเชื้อราที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 3 วัน สำหรับเป็นเชื้อตั้งต้น แล้วตัดปลายเส้นใยด้วยโคลนทิปขนาด 1000 µl ให้มีขนาดเดียวกันทุกตัวอย่าง นำไปวางบนอาหาร Basal media ที่มี Xylan เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 3 วัน ราดทับด้วย 0.1 % congo red ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วล้างออกด้วย 1 MNaCl จากนั้นคัดแยกเอาเชื้อราที่สามารถทำให้เกิดวงใสที่ใหญ่ที่สุด เพื่อนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสต่อไป

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งสูตร PDA เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อขยายเชื้อให้มีอายุเหมาะสมสำหรับนำไปเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่นต่อไป

ระยะเวลาดำเนินการ ปีที่เริ่มต้น 2557 ปีที่สิ้นสุด 2558

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตำบลรังสิต อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี

8.ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อทำการทดสอบการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ได้แก่ CMC, อากาเว่, เปลือกข้าวโพด และเปลือกมัน พบว่า *A. niger* S051, *A. niger* S004 , *A. niger* S040, *A. niger* S008 และ *A. niger* S068 มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทต่าง ๆ ได้ดีที่สุดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดลองการย่อยเฮมิเซลลูโลสชนิดต่าง ๆ จากเชื้อราดินที่เก็บรวบรวมได้ในประเทศไทย

สายพันธุ์เชื้อรา	ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการย่อยเฮมิเซลลูโลส (cm)				ความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส (cm)
		CMC	อากาเว่	ข้าวโพด	มัน	
***A.niger* S051**	7	3.30	2.30	4.80	4.80	+++
A. niger S004	7	2.30	6.30	5.30	3.30	+++
A.niger S068	7	3.80	6.30	5.80	2.60	+++
S026	7	3.80	1.80	1.30	1.30	++
Rhizopus oryzae	7	3.30	2.80	2.30	1.30	++
S023	7	3.30	2.30	-	2.30	++
S064	7	3.30	1.80	1.80	1.80	++
A.niger S041	7	4.30	-	4.30	-	++

S048	7	2.30	1.30	1.30	-	++
S099	7	2.80	1.30	-	-	++

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดลองการย่อยเฮมิเซลลูโลสจากเชื้อราดิน (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อรา	ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการย่อยเฮมิเซลลูโลส (cm)				ความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส (cm)
		CMC	อากาเว่	ข้าวโพด	มัน	
S040	7	4.30	4.30	3.30	3.30	+++
S066	7	3.00	1.30	1.30	1.30	++
S070	7	3.00	1.80	1.30	1.30	++
S052	7	1.20	1.30	-	2.10	+
S034	7	0.80	1.30	1.30	1.30	+
S100	7	2.80	1.30	1.30	1.80	+
S014	7	3.30	1.30	1.80	2.30	++
S097	7	-	1.80	-	2.30	+

S082	**7**	**3.30**	**1.80**	**-**	**1.50**	++
S088	**7**	**3.30**	**1.30**	**2.30**	**0.80**	++

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดลองการย่อยเฮมิเซลลูโลสจากเชื้อราดิน (ต่อ)

สายพันธุ์	**ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน)**	**ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการย่อยเฮมิเซลลูโลส (cm)**				**ความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส (cm)**
		CMC	**อากาเว่**	**ข้าวโพด**	**มัน**	
S092	**7**	**3.30**	**-**	**2.30**	**0.80**	++
S008	**7**	**2.80**	**2.80**	**2.30**	**3.80**	+++
S090	**7**	**3.30**	**-**	**-**	**0.80**	+
P8022	**7**	**3.80**	**-**	**-**	**-**	+
P1032	**7**	**3.30**	**-**	**3.80**	**-**	++
P5021	**7**	**2.70**	**-**	**-**	**1.30**	++
P2033	**7**	**3.80**	**-**	**-**	**2.80**	++
P8023	**7**	**3.30**	**1.30**	**-**	**2.30**	++

P2031	**7**	**3.80**	**-**	**-**	**3.30**	**++**
P2325	**7**	**4.30**	**-**		**1.80**	**++**

สายพันธุ์เชื้อรา	**ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน)**	**ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการย่อยเฮมิเซลลูโลส (cm)**				**ความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส (cm)**
		CMC	**อากาเว่**	**ข้าวโพด**	**มัน**	
P1013	**7**	**4.30**	**-**	**4.30**	**3.30**	**+++**
P5011	**7**	**4.30**	**4.30**	**-**	**3.30**	**+++**

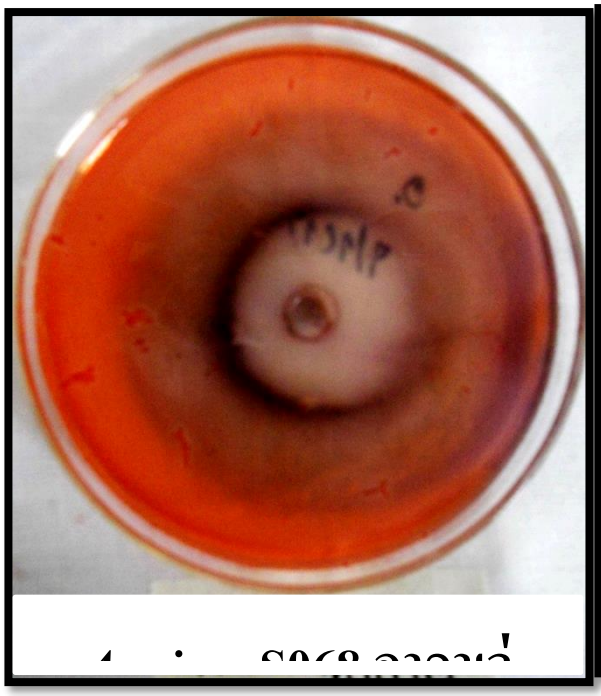
หมายเหตุ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง = เคลียร์โซนที่เกิดขึ้น – ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูที่เจาะ

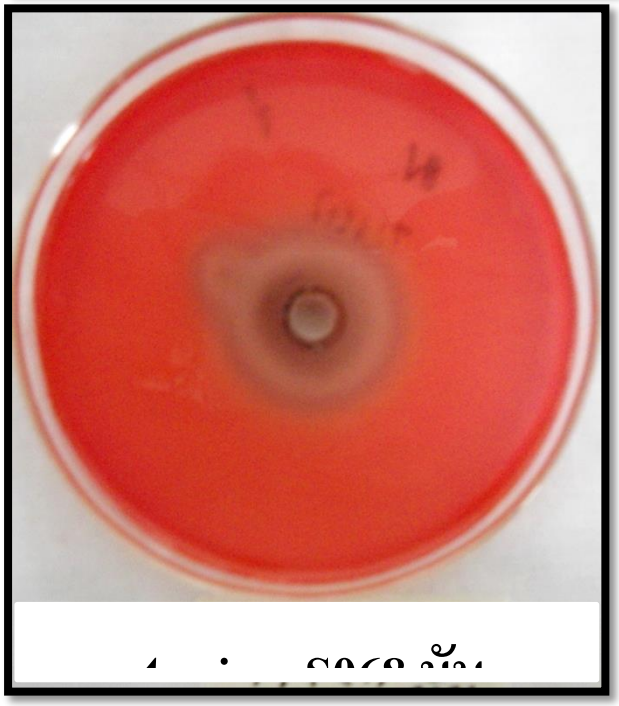
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูที่เจาะ = 0.7 cm.

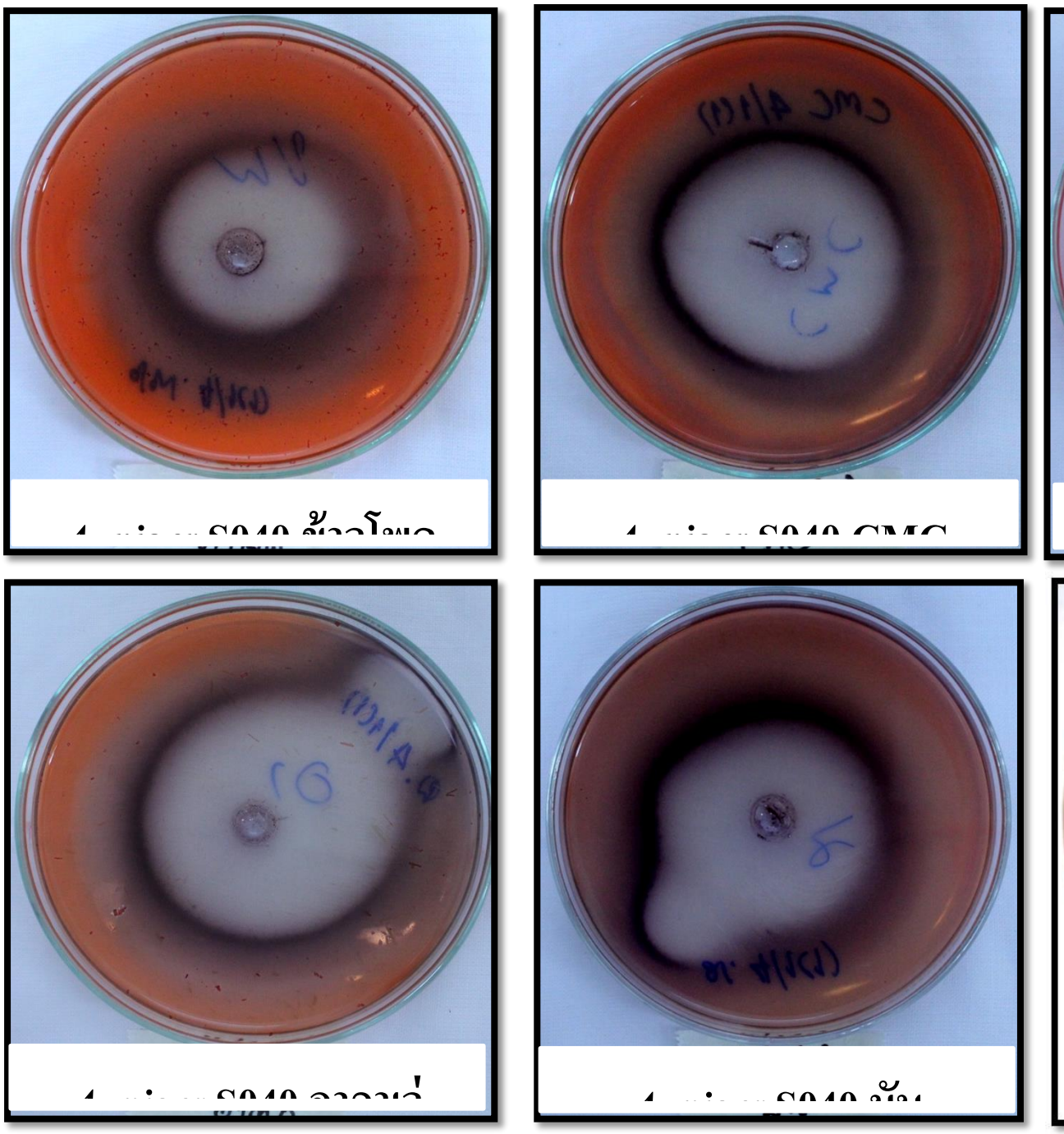
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-2.0 cm.= ย่อยเซลลูโลสได้เล็กน้อย (+)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0-3.0 cm.= ย่อยเซลลูโลสได้ปานกลาง (++)

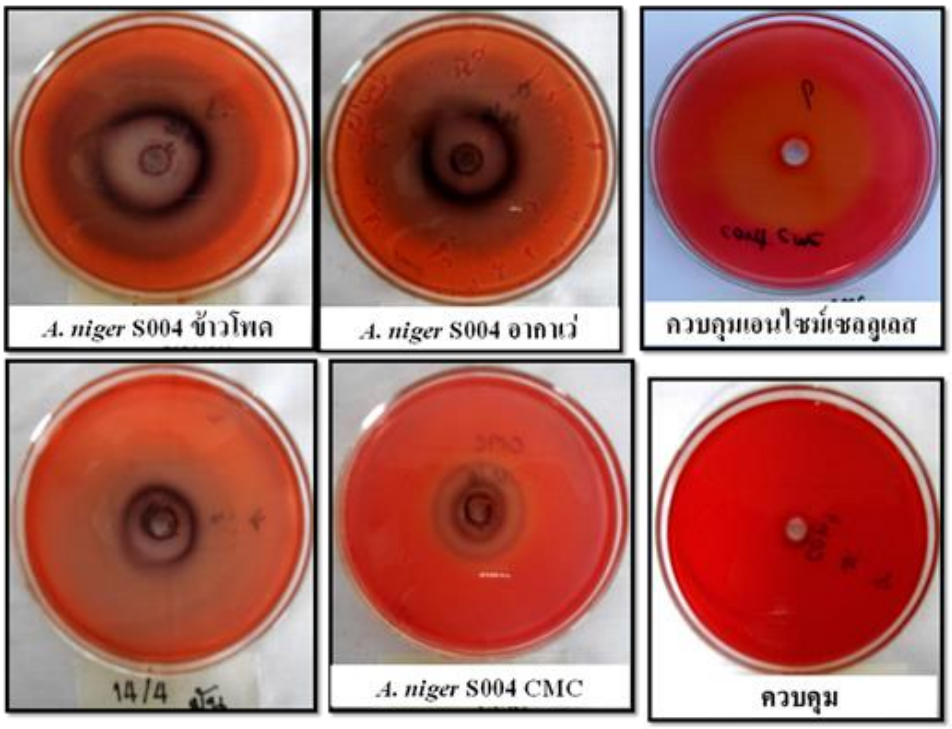
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0-5.0 cm.= ย่อยเซลลูโลสได้มาก (+++)







ภาพที่ 1 แสดงผลการย่อยสลายเปลือกข้าวโพด ใบอากาเว่บด เปลือกมันสำปะหลัง CMCและ อาหารควบคุมที่ไม่มีซับเตรท



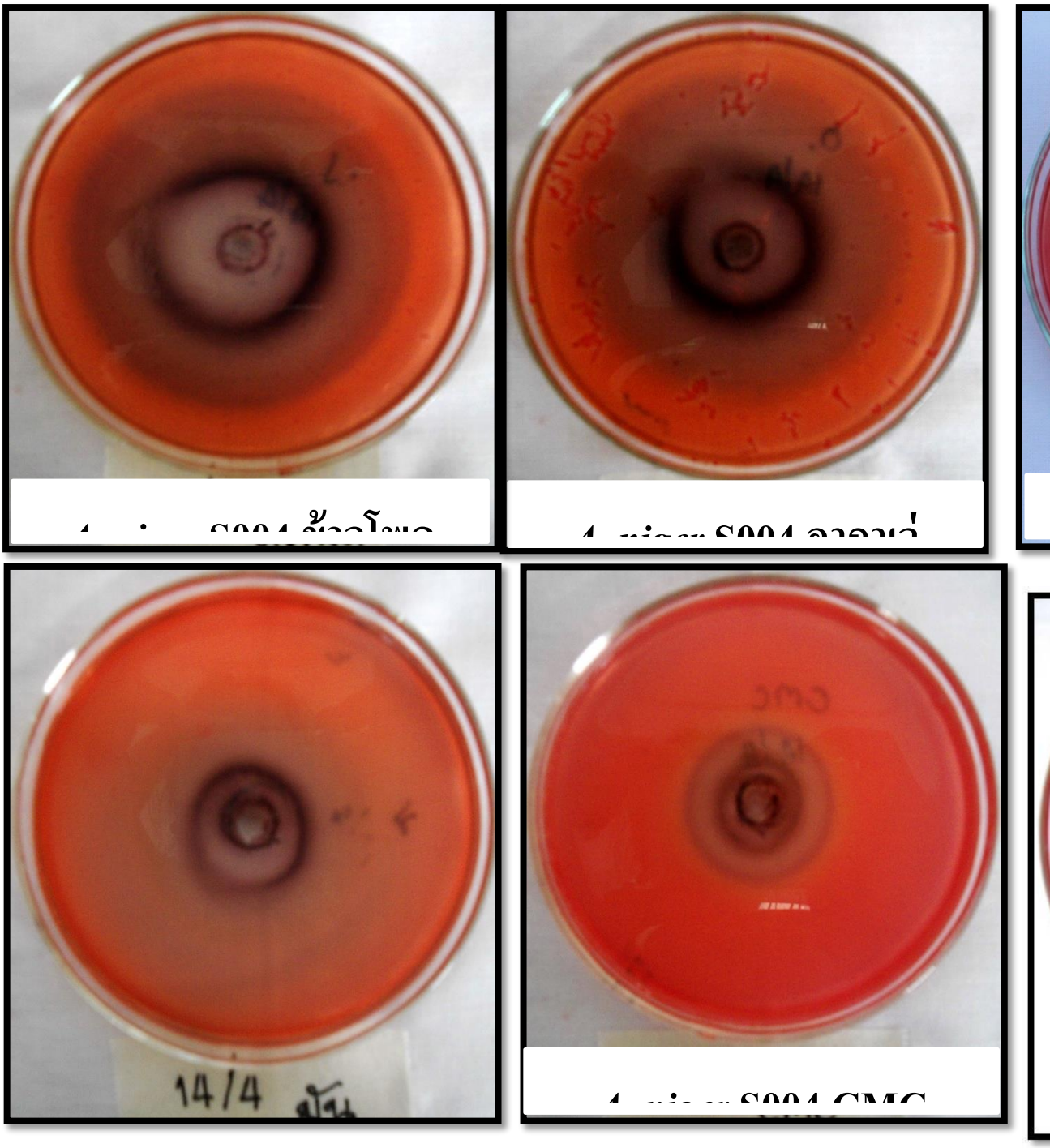
A. niger S004 ข้าวโพด

A. niger S004 อาคาว่

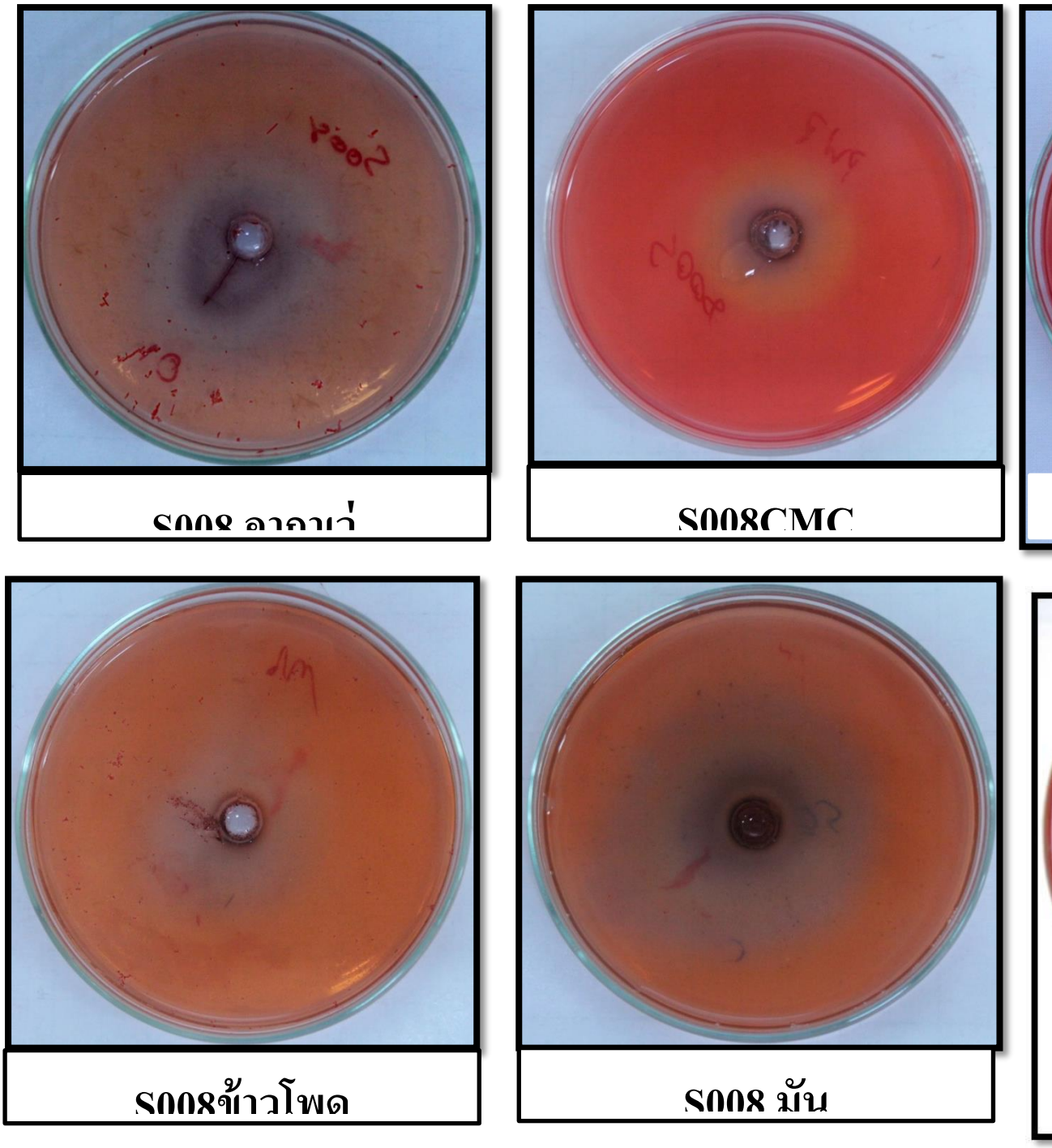
ควบคุมเอนไซม์เซลลูเลส

A. niger S004 CMC

ควบคุม



ภาพที่ 1 แสดงผลการย่อยสลายเปลือกข้าวโพด ใบอากาเว่บด เปลือกมันสำปะหลัง CMCและ อาหารควบคุมที่ไม่มีซับเตรท (ต่อ)



ภาพที่ 1 แสดงผลการย่อยสลายเปลือกข้าวโพด ใบอากาเว่บด เปลือกมันสำปะหลัง CMCและ อาหารควบคุมที่ไม่มีซับเตรท (ต่อ)

ผลการโคลนยีน

ผลของการทำ PCR ของยีน β -D – xylosidaseและโคลนยีน ใน expression vector pET160/GW/D-TOPO และtransform เข้า E.coli Top10 จากนั้นคัดเลือกโคลนโดยใช้ T7 promotor Primer และ T7 reverse Primer จะมีชิ้นยีน β -D – xylosidaseอยู่ จะมีแบนโดยรวม 2.5 kb โดย

คัดเลือกโคโลนีอย่างสุ่มมา 3 โคโลนี โคโลนีที่เลือกคาดว่าจะ มีชิ้นยีน β -D – xylosidase แล้วนำมาสกัดพลาสมิด จะได้พลาสมิดที่มีชิ้นยีนอยู่ ได้แก่ XldC1, Xld2C1 และ XldC4 จากนั้น transform เข้า competent cell ของ E. coli BL21 (DES 3)

การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักการสังเคราะห์ recombinant protein ยีน β -D – xylosidase ในเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย E. coli BL21 (DES 3) ที่พลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO มียีน β -D – xylosidase ได้แก่ XldC1, Xld2C1 และXldC4 ในอาหารเหลว LB 100 มิลลิลิตรที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิลิตรเขย่า 200 rpm ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็น starter จากนั้น นำเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตรมาปลูกเชื้อในอาหาร เหลว LB ใหม่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100มิลลิลิตร และเติม 1% Glucose เข่ยาต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเติม และแบบไม่เติม IPTG ปริมาตร 5 มิลลิลิตร shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ 2, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาทีเก็บไว้ที่ -20 °C

จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ที่ 4 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลสบนอาหารแข็งทั้ง 5 ชนิดได้แก่ ไซเลน CMC
อากาเว่ มัน และข้าวโพด

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลสบนอาหารแข็งทั้ง 5 ชนิด ของ E. coli BL21 (DES 3) ที่พลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO มียีน β -D – xylosidase ได้แก่ XldC1, Xld2C1 และXldC4ที่กระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 4 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบเติมและแบบไม่เติม IPTG

ตัวอย่างเซลล์ที่ 4 ชั่วโมง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เคลียร์โซน (cm)				
	ไซเลน	อากาเว่	เปลือกมัน	ข้าวโพด	CMC
ไม่เติม IPTG *E.coli* BL21/XldC1	4.00 cm	2.00 cm	1.00 cm	3.00 cm	x
E.coli BL21/XldC4	3.00 cm	3.50 cm	1.50 cm	2.50 cm	x
E.coli BL21/Xld2C1	2.00 cm	3.00 cm	1.00 cm	2.30 cm	x

เติม IPTG *E.coli* BL21/XldC1	4.50 cm	2.50 cm	1.50 cm	3.50 cm	x
E.coli BL21/XldC4	2.50 cm	4.00 cm	1.00 cm	2.50 cm	x
E.coli BL21/Xld2C1	3.00 cm	3.50 cm	1.00 cm	2.50 cm	x

X= ไม่เกิดเคลียร์โซน

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากเชื้อราทั้งหมด 32 สายพันธุ์นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูเลส พบว่ามี 10 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีบนอาหารทั้ง 4 ชนิดได้แก่ CMC เปลือกข้าวโพด เปลือกมัน และอากาเว่ สายพันธุ์เชื้อราดินที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ดีและผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก คือ *A. niger* S068, *A. niger* S040 เชื้อราสายพันธุ์ S008 และ S048 ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ยังไม่ได้ทำการจัดจำแนกทาง ITS

จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นว่า เชื้อราดินส่วนใหญ่นั้นมีความสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสบนอาหารทั้ง 4 ชนิด ได้ดีกว่าเชื้อราที่แยกได้จากปาล์ม นั้นแสดงว่าเชื้อรากลุ่มดังกล่าวอาจมีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีทั้งเอนไซม์ Cellulase และ Xylanase

ขณะที่เชื้อราบางกลุ่มมีความสามารถย่อยได้เพียงบางชนิดของอาหารเท่านั้น อาจเป็นเพราะเชื้อรามีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้เพียงบางชนิดเท่านั้น เชื้อราบางชนิดอาจสร้างเอนไซม์ Cellulase และ Xylanase เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

การโคลนยีน

จากตารางแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเลี้ยง E. coli BL21 (DES 3) ที่พลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO มียีน β -D – xylosidase ได้แก่ XldC1, Xld2C1 และXldC4ที่กระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ 4 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบเติมและแบบไม่เติม IPTG พบว่า มีการย่อยบนอาหารไซเลน ข้าวโพดและอากาเว่ได้ดี ในขณะที่มีการย่อยได้น้อยมากบนอาหารที่ผสมเปลือกมัน และไม่เกิดการย่อยบนอาหาร CMC เลย ซึ่งผลจากการเลี้ยงเชื้อ แบบเติมและแบบไม่เติม IPTG พบว่า ให้ผลการย่อยเคลียร์โซนบนอาหารที่มีส่วนผสมของไซเลน อากาเว่และข้าวโพดที่ไม่แตกต่างกัน

10.การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ นำราที่ได้ไปทดสอบการผลิตเอนไซม์หรือการใช้ประโยชน์ด้านอื่นต่อไป

11.คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12.เอกสารอ้างอิง

พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล. 2548. Biofuel Roadmap, APEC Symposium on Foresighting Future Fuel Technology. ณ อาคารสำนักงานใหญ่ บริษัทปตท. จำกัด (มหาชน) วันที่ 28 พฤศจิกายน 2548.

13.ภาคผนวก

13.1 สูตรอาหารพื้นฐาน Basal media (BSS) ต่อปริมาณอาหาร 1 ลิตร

$(NH_4)_2SO_4$	0.5 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSo_2\ 7H_2O$	0.2 กรัม
KCL	0.5 กรัม
$CaCl_2$	0.1 กรัม

สูตรอาหารตามทรีตเมนต์ ดังนี้

1. สูตรอาหารพื้นฐาน (BSS) + ซับเสรต CMC-Na 5 กรัม/ลิตร
2. สูตรอาหารพื้นฐาน (BSS) + ซับเสรต เปลือกข้าวโพดป่น 5 กรัม/ลิตร
3. สูตรอาหารพื้นฐาน (BSS) + ซับเสรตอากาเว่ป่น 5 กรัม/ลิตร
4. สูตรอาหารพื้นฐาน (BSS) + ซับเสรตเปลือกมันสำปะหลังบด 5 กรัม/ลิตร
5. สูตรอาหารพื้นฐาน (BSS) + ซับเสรตฟางข้าวบด 5 กรัม/ลิตร

13.2 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS method

นำสารละลายที่ได้จากการผลิตเอนไซม์มาทดสอบการผลิตน้ำตาลกลูโคสดังนี้

1 ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

2 เติมสารละลาย DNS ลงไป 2 ml ผสมให้เข้ากัน

3 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง

4 เติมน้ำกลั่น 10 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่า OD520 แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าจากค่ากราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส หาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง