การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลติก

ISOLATION AND SCREENING FOR MICROBIAL CELLULOLYTIC ENZYME

โดย

นางสาววรนุช ภักดีเดชาเกียรติ

นางสาวประภาพันธ์ ศิริขันธ์แสง

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2553

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

เลขที่สัญญา 029/2553

การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลติก

ISOLATION AND SCREENING FOR MICROBIAL CELLULOLYTIC ENZYME

โดย

นางสาววรนุช ภักดีเดชาเกียรติ

นางสาวประภาพันธ์ ศิริขันธ์แสง

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
พ.ศ. 2553
(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

สิ่งประดิษฐ์

การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก

วร นุช ภักดีเดชาเกียรติ และประภาพันธ์ ศิริขันธ์แสง 2557 เลขที่สัญญา 029/2553

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัย และรายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ดีด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากสถาบันวิจัยและพัฒนา และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยให้สามารถดำเนินการศึกษาวิจัยได้อย่างสะดวกเป็นอย่างดี ขอขอบคุณนางสาวรจรินทร์ พาประจง นางสาวทัศนีย์ ดวงจันทร์แจ่ม นางสาวเยาวลักษณ์ แหลมไธสง และณัฐดนัย ผิวพรม ผู้ช่วยนักวิจัย ที่ให้ความเอาใจใส่ และดำเนินการทั้งการเก็บตัวอย่าง และปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการ ทำให้งานวิจัยได้ผลสำเร็จเป็นอย่างดี ขอขอบคุณอาจารย์สราวุธ แก้วศรี สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้กรุณาให้ความชี้แนะการเขียนบทคัดย่อ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา และศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่การดำเนินงานวิจัย เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีบางชนิด ทำให้สามารถดำเนินการวิจัยได้อย่างสะดวก และมีผลสำเร็จในการวิจัยได้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา อาจารย์และครอบครัวของผู้วิจัย ที่ให้ความสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด และขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนๆ ทุกท่านที่ได้มีส่วนให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงได้ ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ เนื่องด้วยทุกท่านที่ให้ความกรุณาและช่วยเหลือ ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งอย่างยิ่งและขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

วรนุช ภักดีเดชาเกียรติ และ ประภาพันธ์ ศิริขันธ์แสง

มิถุนายน 2557

หัวข้อวิจัย การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลติก

ผู้ดำเนินการวิจัย วรนุช ภักดีเดชาเกียรติ และ ประภาพันธ์ ศิริขันธ์แสง

หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ปีวิจัยสมบูรณ์ 2557

เลขที่สัญญา 029/2553

บทคัดย่อ

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร การวิจัยในครั้งนี้สามารถแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสได้จากมูลสัตว์ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ โดยใช้อาหาร CMC agar ได้จำนวน 31 ไอโซเลท ผลการย้อมสีคองโก เรดพบว่าจุลินทรีย์จำนวน 23 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสในช่วง 0.5-1 เซนติเมตร สำหรับ 8 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ AF1 ED1 EF1 EC1 GC1 GC3 ID2 และ IC3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสเท่ากับ 1.2 1.54 1.21 1.29 1.33 1.33 1.28 และ 1.23 เซนติเมตร ตามลำดับ ผลการเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ไม่มีสารสกัดจากยีสต์แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ทั้ง 8 ไอโซเลท ดังกล่าวไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 โดยบ่มร่วมกับสารตั้งต้น CMC เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากไอโซเลท GC1

คำสำคัญ : การแยกจุลินทรีย์ การผลิตเอนไซม์เซลลูโลไลติก

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ	(2)
Abstract	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญที่มาของปัญหา	1
1.2 โจทย์วิจัย/ปัญหาวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 ขอบเขตการวิจัย	2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 โครงสร้างเส้นใยพืช	4
2.2 การย่อยวัสดุเหลือทิ้งด้วยการใช้เอนไซม์	7
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติก	8
2.4 เอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก	11
2.5 การใช้ประโยชน์เอนไซม์เซลลูโลไลติก	14
บทที่ 3 วิธีวิจัย	16
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	16
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	16
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
4.1 การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส	18
4.2 กิจกรรมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (Carboxymethylcellulase; CMCase) ในสภาวะการเพาะเลี้ยงอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์	23
4.3 ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมเซลลูเลส	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	31
5.1 สรุปผลการทดลอง	31
5.2 ข้อเสนอแนะ	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	38

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	จำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์และลักษณะโคโลนี	18
4.2	ไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส	20
4.3	กิจกรรมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสในสภาวะการเพาะเลี้ยงการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที	25
4.4	กิจกรรม CMCase ของ GC1 ในสภาวะอุณหภูมิ และพีเอชที่ต่างกัน	29

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
ภาพที่ 2.1	การเรียงกันของแต่ละชั้นในผนังเซลล์พืช	4
ภาพที่ 2.2	น้ำตาลกลูโคสที่ต่อเป็นหน่วยซ้ำกันในโครงสร้างเซลลูโลส	5
ภาพที่ 2.3	เฮมิเซลลูโลส	6
ภาพที่ 2.4	โมเลกุลลิกนิน	7
ภาพที่ 2.5	การทำงานของเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกกับโครงสร้าง crystalline และ amorphous ในเซลลูโลส	13
ภาคผนวกที่ 1	กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	45
ภาคผนวกที่ 2	การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใส รอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบไม่ปรากฏโซนใส	46
ภาคผนวกที่ 3	การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใส รอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดน้อยกว่า 1 เซนติเมตร	47
ภาคผนวกที่ 4	การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใส รอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดน้อยกว่า 1 เซนติเมตร	48
ภาคผนวกที่ 5	การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.001 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใส รอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร	49
ภาคผนวกที่ 6	การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใส รอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดประมาณมากกว่า 1 เซนติเมตร	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
ภาคผนวกที่ 7	การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใส รอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดประมาณน้อยกว่า 1 เซนติเมตร	51
ภาคผนวกที่ 8	การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใส รอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร	52

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาที่ทำวิจัย

มีการนำเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก (Cellulolytic enzymes) มาใช้เพื่อประโยชน์ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่นการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเครื่องดื่มน้ำผลไม้ การเตรียมชิ้นส่วนเซลล์สำหรับการรวมโพรโทพลาส และปัจจุบันมีความพยายามในการพัฒนารูปแบบเพื่อการนำวัสดุทางการเกษตรที่เป็นเส้นใยพืชมาเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ด้วย เนื่องจากวัสดุพวกเส้นใยธรรมชาติมีโครงสร้างจากน้ำตาลกลูโคสที่เกิดพันธะต่อกันเป็นพอลิเมอร์ ดังนั้นการทำลายพันธะเพื่อแยกให้ได้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ และวัสดุที่เหลือทิ้งกลับยังถูกนำกลับมาใช้ได้ด้วย ซึ่งการย่อยสลายพันธะระหว่างน้ำตาลกลูโคสในพอลิเมอร์ที่เป็นเซลลูโลสนี้ จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกทำงานร่วมกันให้เกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอย่างน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์ทั่วไปสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเมทาบอลิซึมของเซลล์ให้เกิดพลังงานได้ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีหลายชนิด ทั้งวัสดุเหลือทิ้งจากการปศุสัตว์ และจากการเกษตรเพาะปลูก โดยการเกษตรในการผลิตพืช และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบเส้นใยนั้น ทำให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งจากพืชที่เป็นพวกเส้นใย หรือเยื่อใยในพืช จึงมีการพัฒนากระบวนการที่เหมาะสมที่สุดในการนำวัสดุเหล่านี้มาใช้ ให้ได้ประโยชน์สูงสุด ก่อนการนำไปกำจัดทำลาย ประเทศไทยที่มีพื้นที่ทางการเกษตรเป็นส่วนมาก หากมีการนำวัสดุเหล่านี้มาใช้จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุที่เหลือทิ้ง และเป็นการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์สูงสุดด้วย จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก และมีกิจกรรมที่เหมาะสมต่อการสลายพันธะในพอลิเมอร์เซลลูโลส ที่มีโครงสร้างสายตรงของกลูโคสได้

1.2 โจทย์วิจัย/ปัญหาวิจัย

การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์เพื่อการผลิตทางชีวภาพ โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์บางชนิดผลิตได้ อย่างเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกที่สามารถลยพันธะในโมเลกุลพอลิเมอร์เซลลูโลสให้ได้น้ำตาลในรูปแบบที่ใช้ได้ด้วยจุลินทรีย์เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.3.1 เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสจากตัวอย่างมูลสัตว์

1.3.2 เพื่อทดสอบปัจจัยการเพาะเลี้ยงที่มีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมคาร์บอกซีเมธิลเซลลู-เลส (Carboxymethy cellulase; CMCase)

1.3.3 เพื่อทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิ และพีเอชที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพวกเส้นใย เช่นเปลือกข้าวโพด ฟางข้าว ชานอ้อย ประกอบด้วยโมเลกุลคาร์บอนที่สามารถแยกได้เป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญให้กับจุลินทรีย์ เพื่อการใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ การสลายพันธะด้วยวิธีทางชีวภาพด้วยการใช้เอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงในการเกิดผลิตภัณฑ์จะช่วยให้ลดปัจจัยการใช้สารเคมีที่ออกฤทธิ์ไม่เฉพาะเจาะจงได้ โดยจุลินทรีย์บาชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกที่มีกิจกรรมในการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ และเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกนี้มีการนำไปใช้ในประโยชน์ที่หลากหลายทั้งอุตสาหกรรมอาหาร และการเกษตร

1.5 ขอบเขตการวิจัย

1.5.1 เก็บตัวอย่างแหล่งตัวอย่างในการแยกจุลินทรีย์ ในที่นี้คือมูลสัตว์

1.5.2 เตรียมตัวอย่างที่เก็บมา ด้วยการตีบดผสมตัวอย่างที่เก็บมาให้เป็นเนื้อเดียว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร CMC agar แยกโคโลนีที่ได้มาขีดไขว้บนอาหาร CMC agar เพื่อให้แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำมาจุด (Spot) บนอาหาร CMC agar และย้อมด้วย Congo red เป็นตัวบ่งชี้ สังเกตโคโลนีที่เกิดโซนใส และบันทึกขนาดโซนใส

1.5.3 นำไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาทดสอบปัจจัยของอุณหภูมิต่อการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยการเพาะเลี้ยงด้วยการจุดบนอาหาร CMC agar แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย Congo red เป็นตัวบ่งชี้ สังเกตโคโลนีที่เกิดโซนใส และบันทึกขนาดโซนใส

1.5.4 ทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อการแสดงกิจกรรมเซลลูเลสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ด้วยการบ่มเอนไซม์กับสารตั้งต้น (CMC) ในอุณหภูมิ และพีเอชต่างกัน อุณหภูมิที่ศึกษา ได้แก่ 30 37 45 และ50 องศาเซลเซียส ส่วนพีเอชที่ต่างกัน ได้แก่ พีเอช 5.0 ใช้บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และพีเอช 8.0 ใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

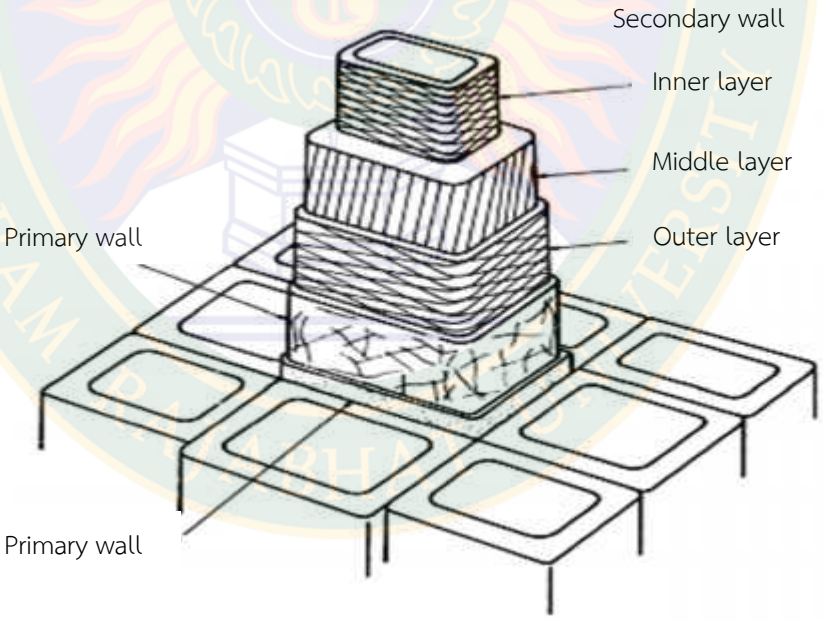
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีกิจกรรมเซลลูเลส ที่ได้จากการทดสอบกิจกรรม CMCase โดยเอนไซม์ที่ผลิตออกมาสามารถทำงานในการสลายโครงสร้างเซลลูโลส และมีการปลดปล่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอย่างน้ำตาลกลูโคสออกมาจากปฏิกิริยาได้ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ และพัฒนาต่อในการใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเส้นใยในการเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพต่อไปได้

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างเส้นใยพืช

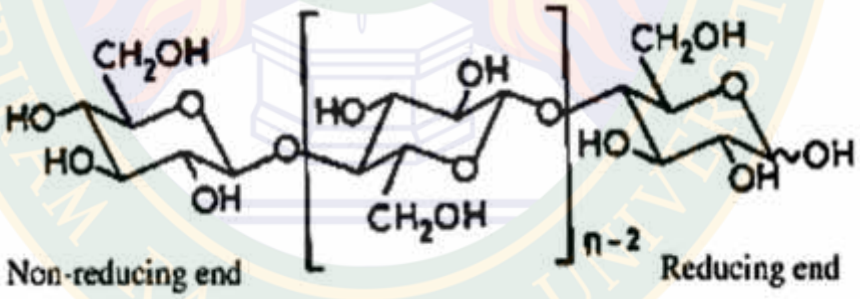
เซลล์พืชเป็นหน่วยพื้นฐานในพืช ซึ่งเซลล์พืชมีผนังเซลล์เป็นส่วนที่ห่อหุ้มอยู่ด้านนอกสุด (cell coat) มีหน้าที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับพืช โดยผนังเซลล์พืช (plant cell wall) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเป็นหลัก ผนังเซลล์ประกอบด้วยโครงสร้าง 3 ส่วน ได้แก่ 1) ได้แก่ (1) ชั้น middle lamella เป็นส่วนที่อยู่ด้านนอกสุดของผนังเซลล์ ประกอบด้วยเพคติก (pectin) และโปรตีน (2) ชั้น primary cell wall ประกอบด้วย เซลลูโลสไมโครไฟบริล (cellulose microfibrils) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และ (3) ชั้น secondary cell wall พบเมื่อพืชมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ซึ่งเนื้อเยื่อชั้นนี้จะช่วยให้โครงสร้างในพืชมีความแข็งแรงมากขึ้น ประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และ ลิกนิน (lignin) ดังนั้น ส่วน secondary cell wall นี้ จึงพบได้บ่อยในพืชที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว รวมทั้งในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพวกเส้นใย เช่น ฟางข้าว เศษพืชเศษไม้ เป็นต้น (Plant cell wall, 2004)



ภาพที่ 2.1 การเรียงกันของแต่ละชั้นในผนังเซลล์พืช (Illston และ Domone, 2001)

2.1.1 เซลลูโลส (Cellulose)

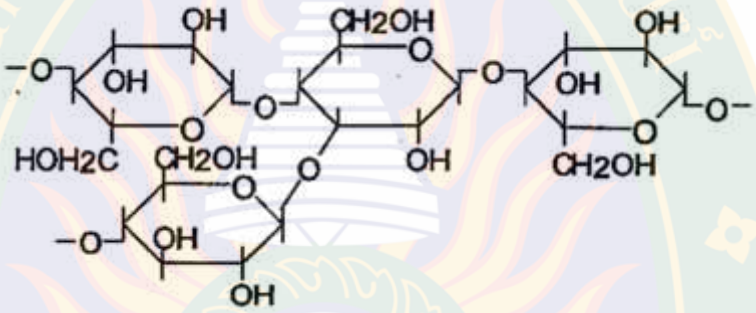
เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) ในลักษณะเชิงเส้นตรง (linear chain) ประกอบด้วยหน่วยซ้ำๆ ของน้ำตาลกลูโคส (glucose) มีสูตรโมเลกุลทั่วไป คือ $C_6H_{12}O_6$ ต่อกันประมาณ 2,000-14,000 หน่วย ด้วยพันธะเบต้า-1, 4- ไกลโคซิดิก (β-1, 4-glycosidic linkage) เซลลูโลสเป็นโครงสร้างในเนื้อเยื่อพืช โดยพบรวมกับลิกนิน เพนโตแซน (pentosan) กัม (gum) แทนนิน (tannin) ไขมัน (lipid) และสารที่ทำให้เกิดสี (pigment) เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) 3 หมู่ สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน และเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า ไฟบริล (fibrils) ทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสมีมาก และเซลลูโลสมีโครงสร้างที่จัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ เซลลูโลสจึงมีลักษณะความเป็นผลึกสูง (crystalline) มีอุณหภูมิสำหรับการหลอมตัวสูง และมีความสามารถในการละลายต่ำ หรือ ไม่ละลายในน้ำแต่ละลายในกรดเข้มข้น เช่น กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) และกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) เป็นต้น ในสารละลายกรดที่อุณหภูมิห้องสามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กับเซลลูโลสได้ และปฏิกิริยาจะหยุดลงที่อุณหภูมิต่ำ ในสารละลายด่างเข้มข้นบางชนิด เช่น สารละลายอัลคาไลไฮดรอกไซด์ (alkali hydroxide) เซลลูโลสจะเกิดการพองตัว ทำให้เซลลูโลสถูกละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น โดยเซลลูโลสธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่างกัน ซึ่งการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูโลสมีความสำคัญต่อสมบัติทางกายภาพ ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพไม่ดี ในทางอุตสาหกรรมสามารถหาน้ำหนักโมเลกุล โดยค่า ประมาณได้ ด้วยวิธีการวัดความหนืด (Cellulose, 2003 และ เส้นใยธรรมชาติ, 2005)



ภาพที่ 2.2 น้ำตาลกลูโคสที่ต่อเป็นหน่วยซ้ำกันในโครงสร้างเซลลูโลส (Cellulose, 2003)

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

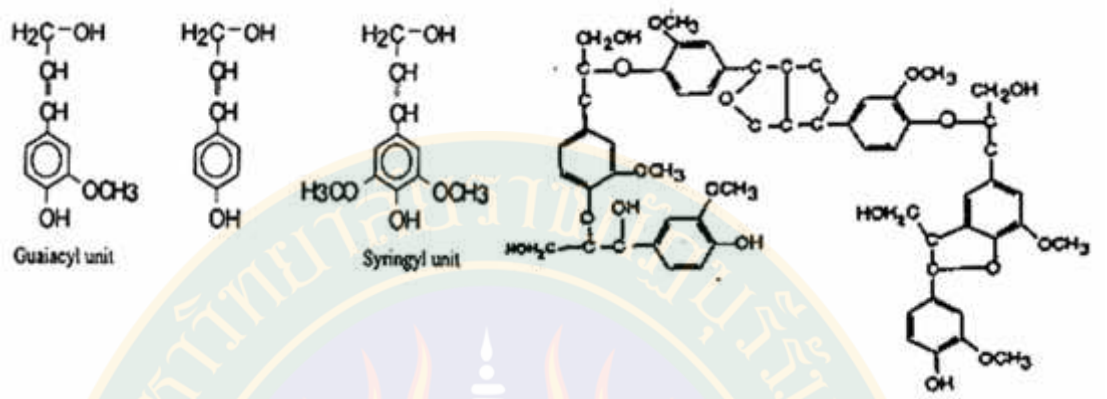
เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นโพลิแซกคาไรด์ชนิดหนึ่ง มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส แต่เฮมิเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น ไซโลส กลูโคส กาแลกโตส แมนโนส อะราบิโนส รวมทั้งกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และกรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อพืชโดยรวมกับสาร หรือโครงสร้างอื่นๆ เช่น ลิกนิน และเซลลูโลส โดยเฮมิเซลลูโลสเป็นโครงสร้างอีกส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ โดยส่วนใหญ่พบในแกลบ ซังข้าวโพด เฮกโซแซน (เส้นใยธรรมชาติ, 2005)



ภาพที่ 2.3 เฮมิเซลลูโลส ดัดแปลงจาก (เส้นใยธรรมชาติ, 2005)

2.1.3 ลิกนิน (Lignin)

ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบอะโรมาติกเชิงซ้อน มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่รวมกับเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โครงสร้างลิกนินมีสารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน รวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิด ซึ่งเป็นสารประกอบพวกอะโรมาติก ลิกนินมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ และโครงสร้างไม่มีสมบัติการยืดหยุ่น ฉะนั้นพืชที่มีลิกนินมากจึงมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายโครงสร้างลิกนินจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลิกเนส (lignase) หรือ ลิกนินเนส (ligninase) (เส้นใยธรรมชาติ, 2005) ผลิตโดยจุลินทรีย์ เช่น *Phanerochaete chrysosporium* เป็นกลุ่มเชื้อรา White rot basidiomycete (Zacchi, 2000) โครงสร้างลิกนินที่แทรกระหว่างเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส มีหน้าที่ช่วยเสริมความแข็งแรง รองรับน้ำหนัก และแรงกระแทกให้กับลำต้นพืช ซึ่งสารกลุ่มอะโรมาติกที่ต่อกันเป็นสายยาว (aromatic polymer) ในโครงสร้างลิกนินสังเคราะห์ได้จาก phenylpropanoid เป็นสารตั้งต้น (precursors) (Adler, 1977)



ภาพที่ 2.4 โมเลกุลลิกนิน ดัดแปลงจาก (เส้นใยธรรมชาติ, 2004)

2.2 การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งด้วยการใช้เอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

โดยส่วนใหญ่เอนไซม์เป็นโปรตีนประเภทหนึ่ง ซึ่งสิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นเพื่อทำหน้าที่เร่ง (catalyze) ปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ภายในเซลล์ เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูง โดยในสภาวะที่เหมาะสม เช่น pH, อุณหภูมิ เอนไซม์จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็ว 108-1011 เท่า เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ นอกจากนี้ เอนไซม์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อปฏิกิริยาใดปฏิกิริยาหนึ่งเท่านั้น ทำให้โอกาสเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์หลักน้อยมาก หรือ ไม่เกิดเลย ถึงแม้ว่าเอนไซม์จะเป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต (in vivo) แต่ก็สามารถสกัดออกมาจากสิ่งมีชีวิตและนำมาใช้งานได้เช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในสิ่งมีชีวิต ถ้าเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (วิชัย ลีลาวัชรมาศ, 2530) ซึ่งปัจจุบันสามารถผลิตเอนไซม์แล้วมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายตามความสามารถ และสภาวะการทำงานของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ โดย ทั่วไปการทำงานของเอนไซม์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1) ชนิดของสับสเทรตที่เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยา

2) ความเข้มข้นของสับสเทรตเปลี่ยนตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

3) ความเข้มข้นของเอนไซม์เปลี่ยนตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

4) ความเป็นกรด-เบสของสารละลาย โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วง พีเอชเป็นเบสเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วในช่วงพีเอชใดขึ้นกับชนิดของสับสเทรตด้วย อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์ส่วนใหญ่ทำงานได้ดี

5) หากในสภาวะที่อุณหภูมิสูง เอนไซม์อาจเสื่อมสภาพได้ เพราะเอนไซม์เป็นโปรตีน ซึ่งอุณหภูมิที่สูงเกินอาจมีผลต่อการเสื่อมสภาพของโปรตีนบางชนิด

6) สารบางชนิดสามารถเป็นสารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยเมื่อรวมกับเอนไซม์ จะทำให้เอนไซม์ทำงานช้าลง หรือ หยุดทำงานได้

7) สารกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์บางชนิดต้องการไอออนจำพวกอนินทรีย์เป็นตัวกระตุ้น จึงทำงาน และเกิดอัตราการเร่งปฏิกิริยาได้
(เอกสารประกอบคำบรรยายวิชาเคมี, 2000)

สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ และขั้นตอนในกระบวนการผลิตเอนไซม์ เช่น การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ การทำเอนไซม์ให้เข้มข้น มีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ให้ได้คุณภาพและมีความเข้มข้น ส่วนการนำเอนไซม์มาใช้ต้องคำนึงสภาวะในการทำงาน หรือ ความสามารถในการทำงานเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ เช่น พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาของการทำงาน เป็นต้น

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติก

การผลิตเอนไซม์โดยการใช้สภาวะต่างๆ สภาวะที่แตกต่างกันมีผลต่อคุณภาพ และปริมาณเอนไซม์ที่ถูกผลิต ตัวอย่างเช่น ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะมีปัจจัยต่างๆ เข้ามามีอิทธิพลต่อการผลิต โดยเกี่ยวข้องกับปริมาณเชื้อ (inoculum size) ค่าพีเอช (pH) อุณหภูมิ ตัวเหนี่ยวนำ (inducer) การเติมสารบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ ปริมาณอากาศที่ให้ ระยะเวลา หรือ ช่วงเวลาในการเจริญ และขนาดของเซลลูโลส (Greaves, 1971) เช่น เมื่อขนาดสับสเตรทลดลง อาจมีผลต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ให้มากขึ้น เป็นต้น (Immanuel, 2006) อย่างไรก็ตาม มี 2 ปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการควบคุมการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติก และเซลลูโลไลติก คือ ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ และแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

2.3.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูโลไลติก

เอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติก เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายพันธะในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจะมีความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสร่วมด้วยเซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส เป็นเอนไซม์สำคัญในระบบการย่อยสลายโครงสร้างผนังเซลล์พืช (Warren, 1996) การย่อยสลายโครงสร้างผนังเซลล์พืชให้สมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน (synergistic enzyme หรือ multiple enzyme) เช่น การย่อยสลายโครงสร้างของไซแลนอย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้เมื่อทำงานร่วมกันจะสามารถย่อยสลายโครงสร้างของ ไซแลนได้อย่างสมบูรณ์ โดยสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ทั้งพืช และจุลินทรีย์ สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม ไซลาโนไลติกและ/หรือเซลลูโลไลติกได้ เช่น มีการนำกล้วยผลสุกชนิดต่างๆ ได้แก่ กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า และกล้วยไข่ มาสกัดแยกไซลาเนส โดยการตกตะกอนด้วย

ความเข้มข้นอิ่มตัวของเกลือ และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการนำโปรตีนมาผ่านคอลัมน์ (จำเนียร ชินวงค์ และคณะ, 2547) นอกจากนี้ มีการสกัดแยกไซลาเนสจากกล้วยน้ำว้าในแต่ละระยะจนกระทั่งผลสุก โดยเปรียบเทียบจากความแน่นเนื้อ ที่ค่าความแน่นเนื้อ 210 cN เป็นระยะที่ผลสุก พบกิจกรรมไซลาเนสสูงที่สุด (Phanayingphaisal และคณะ, 2006) สำหรับจุลินทรีย์บางชนิด เช่น แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคพืชมีความสามารถในการผลิตเบต้า-ไซลาเนส (β-xylanase) และมีกิจกรรมเซลลูเลส ด้วย โดยแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคพืชดังกล่าว จะมีการผลิตเบต้า-ไซลาเนส และเซลลูเลส ขณะที่แบคทีเรียเริ่มเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (host) ที่ถูกจู่โจม (Esteban และคณะ, 1982) โดยทั่วไปการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติก และเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก จะมีการเลือกใช้จุลินทรีย์มากกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตเร็วกว่า และจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีการผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้สูงกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มักจะถูกเลือกนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์กลุ่มไซลาเนส ได้แก่ เชื้อรา (Belancic และคณะ, 1995 และ Biely และคณะ, 1985) แอคติโนมัยซิส (actinomycetes) (Elegir และคณะ, 1994) และแบคทีเรีย (Dey และคณะ, 1992) และเอนไซม์ที่ถูกผลิตจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

2.3.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูโลไลติก

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกได้ โดยส่วนใหญ่ คือ เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซิส ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกมีทั้งชนิดที่เป็น aerobes และ anaerobes รวมทั้งชนิดที่เป็น mesophiles และ thermophiles เช่น *Clostridium thermocelum*, *Thermomonospora fusca*, *Thermoascus auarantiacus*, *Sporotrichum thermophile*, *Humicola insolens* และ *Chaetomium thermophile* โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการถูกปนเปื้อนระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ (Bhat, 1997)

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกได้หลายชนิด และมีกิจกรรมเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกด้วย เช่น ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus circulans* B6 ในอาหารที่เติมไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activities) ของเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (carboxymethyl cellulase) อะไวเซลเลส (avicelase) เบต้า-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) อะซิติล เอสเทอเรส (acetyl esterase) และอะราบิโนฟูราโนซิเดส (arabinofuranosi-dase) คือ 12.90, 0.76, 0.03, 0.12, 0.20 และ 0.22 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยเอนไซม์สามารถจับกับไซแลน และอะไวเซล ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้พบว่าเบต้า-ไซโลซิเดส และ อะราบิโนฟูราโนซิเดส ถูกชักนำให้ผลิตได้ด้วยไซโลส และอะราบิโนส (Rattithumkul และคณะ,1998)

รายงานผลของ Ibrahim และคณะ (2007) การแยกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเซลลูเลสที่ทำงานได้ในอุณหภูมิสูงจากน้ำพุร้อนในอียิปต์ ด้วยการใช้ตัวอย่างดินและน้ำ จากวิธี enrichment ตัวอย่างดินและน้ำด้วยเซลลูโลส นาน 3 สัปดาห์ บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ EHP1 EHP2 และ EHP3 ในการบ่งชี้สายพันธุ์ (phylogenetic analysis) พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus thermodenitrificans* และ *Geobacillus stearothermohilus* กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดจาก *Anoxybacillus flavithermus* EHP2 ในชั่วโมงที่ 36 โดยวัดกิจกรรมเซลลูเลสด้วยอะไวเซล (avicel) CMC เซลโลไบโอส (cellobiose) และไซแลน อัตราการสลาย CMC สูงกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่นในที่นี้ที่ศึกษา อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์คือ 75 องศาเซลเซียส และ พีเอช 7.5ตามลำดับ

รายงานการวิจัยของภัทรา และคณะ (2552) ในการแยกแบคทีเรียชอบร้อนที่สามารถผลิตไซลาเนสและเซลลูเลสในสภาวะที่ไม่ต้องการอากาศจากตัวอย่างดิน พบว่าสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 200 โคโลนี บนอาหารแข็งที่มี cellulose powder ในสภาวะที่ไม่ต้อการอากาศ ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยพบแบคทีเรียสายพันธุ์ M8.3 มีกิจกรรมไซลาเนสสูงสุด 12 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเซลลูเลสสูงสุด 24 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำมาทดสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี 6srRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คือ *Clostridium thermocellum* และเอนไซม์ที่ได้ยังสามารถย่อยสลายเปลือกข้าวโพด ชานอ้อย ซังข้าวโพด และฟางข้าวได้ด้วย

รายงานการวิจัยของ Boonmee (2009) ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก เพื่อการสลายฟางข้าว พบว่าแยกแบคทีเรียได้ 29 ไอโซเลท และ เชื้อรา 30 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ต้องการ โดยไอโซเลท FR14 แสดงกิจกรรม FPase จำเพาะสูงสุด 0.032 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน FR4 มีกิจกรรม CMCase จำเพาะสูงสุด 0.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ FC1 มีกิจกรรม cellobiase จำเพาะสูงสุด 0.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

2.4 เอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก (Cellulolytic enzyme)

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) หรือ เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส โดยเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกประกอบด้วยเซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobiohydrolase) เอ็นโดกลูคาเนส (endoglucanase) และเบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) ซึ่งในการย่อยสลายเซลลูโลสตามธรรมชาติให้สมบูรณ์จำเป็นต้องมีเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน (Martti, 1983 และ Kubicek, 1992) ซึ่งเซลลูเลสโดยทั่วไปมีคุณสมบัติ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) ดังนี้

1) มวลโมเลกุลโดยเฉลี่ย 63000 Da

2) พีเอช ที่เหมาะสมโดยทั่วไป คือ 5.5-6.0

3) ถูกยับยั้งได้ด้วยอิออนหนัก สารกลุ่มซัลไฟดริล สารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและรีดักชั่น และปริมาณของผลผลิตจากปฏิกิริยาของเซลลูเลส คือ กลูโคส

4) วัดกิจกรรมจากการวัดปริมาณ หรือความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยนิยมใช้สับสเทรตที่ละลายน้ำได้ดี ซึ่งเป็นสับสเทรตสังเคราะห์ เช่น คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose; CMC)

2.4.1 ชนิดเอนไซม์ในกลุ่มเซลูโลไลติก

เอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีการเข้าทำปฏิกิริยาต่างกัน (ภาพที่ 2.8) และมีคุณสมบัติต่างๆ กัน (Lee และคณะ, 2002) ดังนี้

2.4.1.1 เซลโลไบโอไฮโดรเลส (Cellobiohydrolase)

เซลโลไบโอส หรือ exoglucanase หรือ 1, 4-β-D-glucan-cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่กระตุ้น หรือ แตกสายเซลลูโลส โดยการไฮโดรไลสซิส crystalline cellulose, acid swollen cellulose และ 4-methylumbelliferyl-cellodextrin ให้มีสภาพที่เหมาะสม คือทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง (weakening) สำหรับเป็นสับสเทรตของเซลลูเลสลำดับต่อไป คือเอ็นโดกลูคาเนส โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ 1, 4- β -D-glycosidic linkages ของโครงสร้างเซลลูโลส และเซลโลเตตระโอส แล้วให้เซลโลไบโอส (cellobiose) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก

2.4.1.2 เอ็นโดกลูคาเนส (endoglucanase)

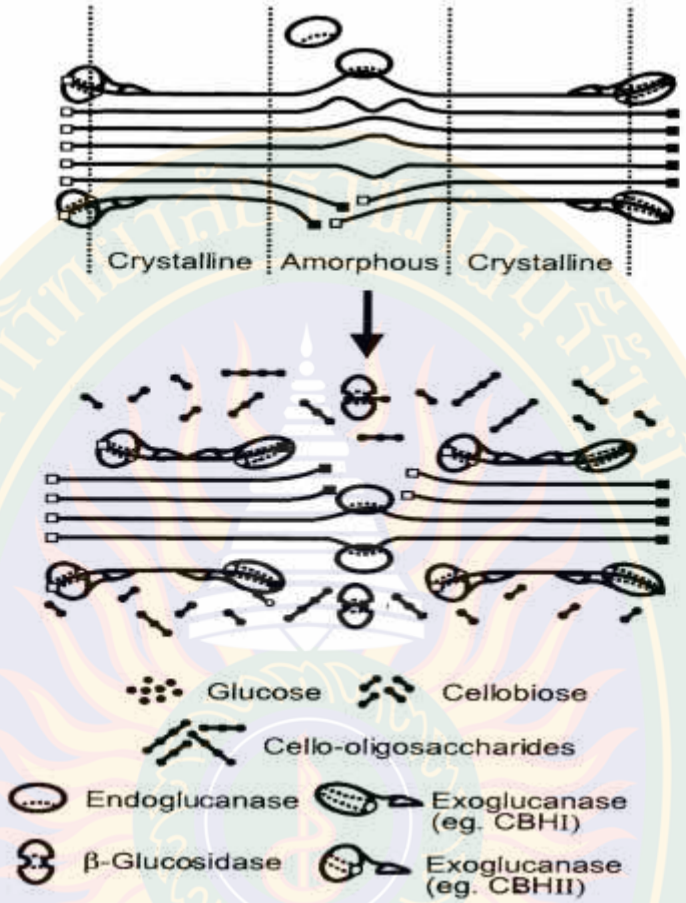
เอ็นโดกลูคาเนส หรือ 1, 4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรือ อนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเทรตที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ กล่าวคือ สามารถย่อยสลายพันธะ β -1, 4 ของสารตั้งต้นสังเคราะห์ เช่น คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (CMC) หรือไฮดรอกซีเอธิลเซลลูโลส โดยจะทำปฏิกิริยาอย่างสุ่มใน internal amorphous sites ในสายเซลูโลส ให้ได้สายใหม่ขนาดต่างๆ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1) Endo- β -1, 4-glucanase ย่อยสลายสายพอลิเมอร์ภายในสายอย่างอิสระ และได้ผลผลิตเป็นโอลิโกเมอร์ และกลูโคส

2) Exo- β -1, 4-glucanase ย่อยสลายสายพอลิเมอร์จากด้านของ non-reducing end อย่างมีระบบ และเปลี่ยนรูปของผลผลิต คือ เปลี่ยน β - เป็น α- configuration และได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอส และกลูโคส

2.4.1.3 เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase)

เบต้า-กลูโคซิเดส หรือ β -D-glucoside glucohydrolase (EC 3.2.1.21) คล้ายกับ exo- β -1, 4-glucanase แต่อัตราการย่อยสลายแตกต่างกัน โดยอัตราเร็วของเบต้า-กลูโคซิเดสจะลดลงเมื่อความยาวของสายพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับ common substrates หรือ เซลลูโลสทั่วไป เซลโลไบโอส (กลูโคส 2 โมเลกุล) ถึงเซลโลเฮกโซส หรือ cellodextrins (กลูโคส 6 โมเลกุล) และผลผลิตที่ได้ คือ กลูโคสชนิด D-glucose



ภาพที่ 2.5 การทำงานของเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกกับโครงสร้าง crystalline และ amorphous ในเซลลูโลส (Lee R. Lynd และคณะ, 2002)

2.5 การใช้ประโยชน์เอนไซม์เซลลูโลไลติก

เซลลูโลไลติกเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการของการผลิตผลิตภัณฑ์ทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุสาหกรรมเครื่องดื่ม อาหารสัตว์ และชีวโมเลกุล ซึ่งการนำเอนไซม์แต่ละชนิดมาใช้ ควรคำนึงถึงคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่มีสภาวะการทำงาน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องการการสลายผนังเซลล์พืชที่มีการนำมาใช้นอกจากเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติกแล้ว เอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกยังถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่นกัน ในที่นี้จึงกล่าวถึงการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกด้วย ได้แก่

2.5.1 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

การนำเซลลูเลสมาผสมกับอาหารสัตว์ เพื่อช่วยในระบบการย่อยทั้งในสัตว์เคี้ยวเอื้องและสัตว์กระเพาะเดี่ยว (monogastric animals) (Mandels, 1985) ปัญหาการลดลงของน้ำหนักตัวในไก่เลี้ยงและประสิทธิภาพในการเปลี่ยนรูปอาหารของไก่เลี้ยง มีสาเหตุที่มีความสัมพันธ์กับความหนืดในลำไส้ไก่เลี้ยง จึงการเติมไซลาเนสร่วมกับอาหารที่ใช้เลี้ยง จะมีผลต่อการลดความหนืดในลำไส้ไก่ (Bedford และ Classen, 1992 และ vanParidon และคณะ, 1992). และการใช้ไซลาเนสในการเตรียม forage crops เพื่อช่วยปรับปรุงการย่อยอาหาร ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้สัตว์ที่เลี้ยงสามารถรับสารอาหารที่ดีขึ้น (Gilbert และ Hazlewood, 1993)

2.5.2 อุตสาหกรรมอาหาร

เช่น มีการใช้ไซลาเนสในปรับปรุงคุณภาพขนมปัง ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มปริมาตรของขนมปังอย่างมาก และมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อใช้ไซลาเนสร่วมกับการใช้อะไมเลส (Maat และคณะ, 1992) ใช้ในการสกัดกาแฟ พืชน้ำมัน และใช้เพื่อการแยกเอาแป้งจากพืช (Biely, 1985) มีการนำเซลลูเลสมาใช้ในการสกัดน้ำมันจากเมล็ดพืช มีการนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพความชุ่มน้ำ หรือ การซึมน้ำได้ของเมล็ดพืช เช่น ถั่วเหลือง ซึ่งจะนำมาใช้ในการทำ อาหารหมัก เช่น ซอสถั่วเหลือง มิโสะ เป็นต้น นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในการสกัดวุ้นจากสาหร่าย (Beguin และ Aubert, 1993; Coughlan, 1985 (a, b อ้างถึงใน Bhat, 1997) และ Mandels, 1985)

2.5.3 อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม

โดยการใช้ไซลาเนสร่วมกับเซลลูเลส และเพกติเนส ในการ สกัดน้ำผัก ผลไม้ รวมถึงการทำให้น้ำผลไม้มีความใสมากขึ้น (Biely, 1985) มีการนำเซลลูเลสมาใช้เพื่อการไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) β-1, 3 และ β -1, 4 glucan บาเลย์คุณภาพต่ำ โดยจะช่วยให้การกรองเบียร์ง่ายขึ้น และเป็นการเพิ่มสาร aroma ในไวน์ด้วย ซึ่งมีการใช้ recombinant yeast ที่สามารถผลิต β -1, 3 และ β -1, 4 glucanase มาใช้ใน

การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ด้วย (Beguin และ Abert, 1993) และมีการนำไซลาเนสมาใช้ในขั้นตอนการผลิตไวน์ช่วยให้เครื่องดื่มที่ได้มีความใสมากขึ้น (Biely, 1985)

2.5.4 การผลิตพลังงานทดแทน

โดยการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ให้เกิดน้ำตาล แล้วนำมาใช้ในการหมักด้วยจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอล โดยการใช้เอนไซม์กลุ่มไซลาโนไลติกและ /หรือกลุ่มเซลลูโลไลติกมาย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อให้เกิด fermentable sugar ซึ่งเป็นน้ำตาลที่สามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เช่น กรดแลคติก ไซลิทอล เป็นต้น (Ahring และคณะ, 1999)

2.5.5 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

มีการนำเซลลูเลสมาใช้ในการแยกส่วน microfibrils จากผ้าฝ้าย เพื่อรักษาความนุ่ม และความสว่างของผ้าฝ้าย (Beguin และ Aubert, 1993 และ Mandels, 1985)

2.5.6 การประยุกต์ใช้ในชีวโมเลกุล

โดยเซลลูเลส หรือ เซลลูเลสที่มีกลูคาเนสชนิดอื่นๆ อยู่ด้วย ได้ถูกนำมาใช้ในการสลายผนังเซลล์ของพืชหรือเชื้อรา เพื่อนำ protoplast ที่ได้มาศึกษาในงานทางพันธุวิศวกรรม เช่น การศึกษา hydrid strain เป็นต้น (Bauchop, 1981)

จากที่กล่าวมา การนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ จำเป็นต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ และเลือกใช้ตามคุณสมบัติของเอนไซม์แต่ละชนิด เช่นในอุตสาหกรรมกระดาษจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ปราศจากกิจกรรมเซลลูเลส (cellulase-free xylanase) เนื่องจากเมื่อผ่านขั้นตอนการฟอกขาวแล้ว จะได้เยื่อใยเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (Dhillon และคณะ, 2000)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 แหล่งคัดแยก

ดินในแปลงเกษตรอินทรีย์ และมูลสัตว์ จากโคที่เลี้ยงเขตอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์

3.1.2 อาหารเพาะเลี้ยง วัสดุ และสารเคมี

1) อาหารสูตร CMC (ภาคผนวก)

2) สารละลายวัดน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Somogyi-Nelson (ภาคผนวก)

3) สารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 (ภาคผนวก)

4) น้ำตาลกลูโคส

5) ถุงไดอะไลซิส

6) สารทดสอบทางชีวเคมีในการบ่งชี้สกุลจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ (ภาคผนวก)

7) กระดาษกรอง

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเก็บแหล่งคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส

การเก็บตัวอย่างมูลสัตว์เคี้ยวเอื้อง (โค) โดยการเก็บตัวอย่างมูลโคจากอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ที่มีการทำการเกษตรเป็นแบบเกษตรอินทรีย์ โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเย็นของวัน ประมาณเวลา 17.00 น. ด้วยอุปกรณ์ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ และถุงเก็บตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการนำตัวอย่างมาใช้เป็นแหล่งคัดแยก

3.2.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส

ชั่งตัวอย่างแหล่งคัดแยกที่เป็นดิน หรือมูลสัตว์มา 10 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 วินาที นำตัวอย่างแหล่งคัดแยกที่เป็นของเหลวมาเจือจางลำดับส่วน (Serial dilution) 10^{-1}-10^{-7} แล้วมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร CMC agar (ภาคผนวก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาขีดไขว้บนอาหาร เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว 2-3 รอบ นำโคโลนีเดี่ยวมาจุด (Spot) บนอาหาร CMC agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ย้อมสีด้วย Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แล้วล้างสีย้อม

ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นาน 10-15 นาที เทออก แล้วสังเกตการเกิดโซนใส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส แล้วบันทึกผล

3.2.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

ย้ายไอโซเลทที่แยกได้ลงในอาหารตามสูตร CMC broth บ่มเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายย้ายมา 1 เปอร์เซ็นต์ ลงใน CMC broth ที่มีเพียง CMC เป็นแหล่งคาร์บอน เก็บตัวอย่างมาปั่นแยกเอาส่วนใสออกจากตะกอนด้วยความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.2.3.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวก)

นำเอนไซม์มา 0.1 มิลลิลิตร เติมลงผสมกับ CMC ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อยู่ใน Sodium acetate buffer ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 แล้วบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์น้ำตาลที่ได้จากกิจกกรมเอนไซม์ โดยกิจกรรมเอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยกลูโคส1 ไมโครโมลต่อนาที

3.2.4 ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส มี 3 สภาวะ ได้แก่ 37 45 และ 50 องศาเซลเซียส การศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสมี 3 สภาวะ ได้แก่ พีเอช 5.0 ใช้บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และพีเอช 8.0 ใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยการบ่มเอนไซม์กับ CMC ในบัฟเฟอร์แต่ละพีเอช และสภาวะอุณหภูมิที่ทดสอบ จากนั้นนำมาวัดปริมาณน้ำตาลที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา (ภาคผนวก)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส

4.1.1 การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสจากมูลสัตว์

เมื่อเก็บตัวอย่างมูลโค ที่เลี้ยงในเขตอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ นำแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส บนอาหาร CMC agar ที่มีคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose; CMC) 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นย้อมสีด้วยสารละลาย Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวบ่งชี้ แล้วสังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนี จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส ได้ 31 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีต่างๆ กัน (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์และลักษณะโคโลนี

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี
AF2	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้านูน
AF1	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้านูน
AC1	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้านูน
AF11	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น
AD1	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ
BF2	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้านูน ตรงกลางเว้า
BD3	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้านูน ตรงกลางเว้า
BF1	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้านูน
BE33	รูปร่างกลม สีขาว ขอบหยัก
BE3	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบมีลักษณะหยัก
TF1	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ
TF3	รูปร่างกม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้านูนเว้าตรงกลาง
TC3	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ
TC22	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบหยักเล็กน้อย
TC2	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์และลักษณะโคโลนี (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี
ED1	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ
EF1	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้านูน ตรงกลางเว้า
EC1	รูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ
GC1	รูปร่างกลม สีเหลือง ขอบเรียบ ผิวหน้านูน
GC2	รูปร่างกลม สีเหลือง ขอบเรียบ ผิวหน้านูน
GD1	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้านูน
GF1	รูปร่างกลม สีเหลือง ผิวแห้งไปกับอาหาร
GC3	รูปร่างกลมรี สีเหลือง ขอบเรียบ ผิวหน้านูน
HC1	รูปร่างกลมสีขาว ขอบหยัก เว้าตรงกลาง
HD2	รูปร่างกลม สีขาว ขอบหยักเล็กน้อย
HD1	รูปร่างกลม สีขาวขอบเรียบ ผิวหน้าเว้าตรงกลาง
ID2	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้าเว้าตรงกลาง
IF1	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ
ID33	รูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้าเว้าตรงกลาง
ID3	รูปร่างกลมรี สีขาว ขอบเรียบมีเมือกห่อหุ้ม
IC3	รูปร่างกลม สีขาว ขอบหยัก

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์ ที่พบกิจกรรมเซลลูเลส มี 30 ไอโซเลท โดยแต่ละไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่ไอโซเลทที่แยกได้มักมีโคโลนีรูปร่างกลม สีขาว ขอบเรียบ และผิวหน้านูน ได้แก่ AF1, AC1, BF2, BF1, GD1 ไอโซเลทมีโคโลนีรูปร่างกลม สีขาวขุ่น ได้แก่ AF11, TF1, TC3, TC2 ไอโซเลทที่มีโคโลนีรูปร่างกลมสีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้านูน เว้าตรงกลาง ได้แก่ BF2, BD3, TF3, EF1, HD1, ID2 และID33 ไอโซเลทที่มีรูปร่างรี สีเหลือง ขอบเรียบ ผิวหน้านูน ได้แก่ GC1 และ GC2 ไอโซเลทที่มีรูปร่างกลมรี สีเหลือง ขอบเรียบ ผิวหน้านูน ได้แก่ GC1 และ GC2 ส่วนไอโซเลทที่มีรูปร่ากลม สีขาว ขอบหยัก ได้แก่ BE33, TC22, HD2 และ IC3 ไอโซเลทที่มีรูปร่างกลม สีขาว ขอบหยัก เว้าตรงกลางได้แก่ HC1 ไอโซเลทที่มีโคโลนีรูปร่างกลมรี สีเหลือง ขอบเรียบ ผิวหน้านูน ได้แก่ GC2 สำหรับไอโซเลทที่มีรูปร่างโคโลนีรูปร่างกลมสองชั้น สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ได้แก่ EC1 ไอโซเลทที่มีรูปร่างกลม สีเหลือง ผิวแห้งไปกับอาหาร ได้แก่ GF1 ไอโซเลทที่มีโคโลนีรูปร่างกลมรี สีขาว มีเมือกหุ้ม ได้แก่ ID3

4.1.2 การทดสอบกิจกรรมเซลลูเลส

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยง ด้วยการจุด (spot) บนอาหาร CMC agar แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการมีกิจกรรมเซลลูเลสด้วยการย้อมสี Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นาน 15 นาที จากนั้นสังเกตการเกิดโซนใส รอบโคโลนี โดยจากผลการทดสอบพบว่าไอโซเลทที่แยกได้นั้น พบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างกัน (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)
AF2	0.53
AF1	1.20
AC1	0.71
AF11	0.80
AD1	0.99
BF2	0.89
BD3	0.51
BF1	0.36
BE33	0.98
BE3	0.81
TF1	0.50
TF3	0.84
TC3	0.75
TC22	1.19
TC2	1.01
ED1	1.54
EF1	1.21
EC1	1.29

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (ต่อ)

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)
GC1	1.33
GC2	0.64
GD1	0.49
GF1	0.78
GC3	1.33
HC1	1.18
HD2	0.93
HD1	0.96
ID2	1.28
IF1	1.08
ID33	0.99
ID3	1.15
IC3	1.23

การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสจากตัวอย่างซึ่งพบว่าไอโซเลทที่แยกได้สามารถแสดงการเกิดกิจกรรมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสได้ โดยแสดงการเกิดโซนใสจากการทดสอบด้วยสารละลายบ่งชี้ congo red โดยสารละลาย congo red มีคุณสมบัติสามารถจับกับเซลลูโลสได้ดีด้วยพันธะ non-covalent ซึ่งในที่นี้อาหารที่ใช้สำหรับการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นเซลลูโลสชนิดหนึ่ง โดยการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสได้ มีการนำไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างมาจุดบนอาหารทดสอบ เมื่อบ่มที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาย้อมสีด้วย congo red โมเลกุลสารบ่งชี้สามารถจับกับเซลลูโลสในอาหารได้ จากนั้นจึงล้างออก (decolorization) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เพื่อล้างสีส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับเซลลูโลสออก ดังนั้นหาจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทดสอบสามารถสร้างเซลลูเลส เอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเกิดการสลายเซลลูโลส ทำให้เซลลูโลสถูกย่อยสลาย เมื่อย้อมด้วย congo red โมเลกุลของสารบ่งชี้จึงไม่มีเซลลูโลสให้สามารถจับได้ เมื่อล้างสีส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับเซลลูโลสออก สีส่วนเกินที่ไม่จับกับเซลลูโลสจึงถูกชะออกได้ ดังนั้นเมื่อทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวจึงพบโซนใส (clear zone) รอบโคโลนีของไอโซเลทที่มีกิจกรรมเซลลูเลส (Carder, 1986)

จากผลการทดสอบพบว่าแต่ละไอโซเลทแสดงการเกิดโซนใสขนาดต่างกัน ซึ่งจากไอโซเลทที่แยกได้ 31 ไอโซเลท จากตัวอย่างมูลสัตว์ มี 23 ไอโซเลท ที่แสดงการเกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วงตั้งแต่ 0.5-1.1 เซนติเมตร และมี 8 ไอโซเลทที่แสดงการเกิดโซนใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสใกล้เคียงกันและมากกว่า 1.2 ได้แก่ AF1 ED1 EF1 EC1 GC1 GC3 ID2 IC3 โดยแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส 1.2 1.54 1.21 1.29 1.33 1.33 1.28 และ 1.23 เซนติเมตร ตามลำดับ

จากรายงานของ Kuar และ Arora (2012) ในการแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นของทิ้งจากครัวเรือนพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ 21 ไอโซเลท โดยมีเพียง 4 ไอโซเลท ที่แสดงการเกิดโซนใสจากการทดสอบด้วยสารละลาย congo red โดย 4 ไอโซเลทนั้นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแล้ววัดค่ากิจกรรมเซลลูเลส พบว่า ไอโซเลท CDB 18 มีค่ากิจกรรมสูงสุด คือ 24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

รายงานของ Behera และคณะ (2014) เกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากดินแมนกรูฟ และแม่น้ำมาฮานาดิ (Mahanadi river) ประเทศอินเดีย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ 15 ไอโซเลท โดยการแยกแบคทีเรียที่ต้องการด้วยการทดสอบย้อมสี congo red ซึ่งแบคทีเรียที่ทดสอบแสดงการไฮโดรไลซิสคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสด้วยค่าการเกิดโซน (halo zone) สูงสุดในช่วง 1.18-2.5 เซนติเมตร

4.2 กิจกรรมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส (Carboxymethylcellulase; CMCase) ในสภาวะการเพาะเลี้ยงอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่แยกได้ ที่ปรากฏโซนใสชัดเจนขนาดมากกว่า 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส แต่มีเพียง คาร์บอกซีเมธิลเซลูโลส (Carboxymethylcellulose; CMC) ซึ่งเป็นเซลลูโลสชนิดที่ละลายได้ (soluble cellulose) เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยในการเพาะเลี้ยงได้มีการใช้อาหารตามส่วนประกอบในส่วนประกอบอาหารเพาะเลี้ยง CMC broth ซึ่งประกอบด้วย $NaNO_3$ K_2HPO_4 KCl $MgSO_4$ สารสกัดยีสต์ (yeast extract) และ CMC แต่ไม่เติมกลูโคสตามที่กล่าวมาในข้างต้น ในการศึกษาโดยนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร CMC broth ที่ไม่มีสารสกัดจากยีสต์ พบว่าเชื้อที่แยกได้ไม่สามารถเจริญ และไม่พบกิจกรรรมเอนไซม์ในการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้อาจเกี่ยวเนื่องจากปัจจัยหลายประการที่นำมาพิจารณา ได้แก่

1. อาหารเพาะเลี้ยง CMC ที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย $NaNO_3$ K_2HPO_4 KCl $MgSO_4$ Yeast extract กลูโคส (glucose) และ Carboxymethylcellulose (soluble cellulose) จากส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงที่กล่าวมา โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate; $NaNO_3$) เป็นส่วนประกอบที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งไนเตรทในอาหารเพาะเลี้ยง ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate; K_2HPO_4) ทำหน้าที่เป็นแหล่งโพแทสเซียมและฟอสเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride; KCl) ทำหน้าที่เป็นแหล่งโพแทสเซียมและคลอไรด์อิออน แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate; $MgSO_4$) ทำหน้าที่เป็นแหล่งแมกนีเซียม ส่วนสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจน กลูโคสทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน

2. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่สิ่งมีชีวิตทั่วไปสามารถนำเข้าสู่วิถีเมทาบอลิซึม (Metabolism) ด้วยการผ่านการหายใจระดับเซลล์ (cellular respiration) เพื่อให้เกิดการสร้างพลังงานที่นำมาใช้ได้ ซึ่งในที่นี้ต้องการให้จุลินทรีย์ที่แยกได้มีกิจกรรมเซลลูเลส ในอาหารเพาะเลี้ยงจึงไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นอื่นๆ อย่างน้ำตาลกลูโคสลงไป เพื่อต้องการตัดปัจจัยการมีแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ ซึ่งอาจมีผลต่อจุลินทรีย์ในการชะงักการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

3. สำหรับคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CMC) หรือ cellulose gum เป็นอนุพันธ์เซลลูโลสชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซีเมทธิล (carboxymethyl group) มีพันธะกับส่วนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) ใน glucopyranose monomers โดยทั่วไปมักอยู่ในรูปเกลือโซเดียม (sodium salt) สังเคราะห์ด้วยการนำเซลลูโลสมาทำปฏิกิริยา alkali-catalyzed reaction ด้วย chloroacetic acid ดังนั้น CMC ที่สังเคราะห์จึงมีคุณสมบัติละลายในน้ำได้

4. สารกัดจากยีสต์ ได้จากการสกัดจากไซโทพลาสซึมของเซลล์ยีสต์ มีลักษณะเหนียวหนืดสีน้ำตาล ในทางอุตสาหกรรมมีการผลิต วางจำหน่ายในรูปแบบหลายชนิด ได้แก่ ยีสต์สกัดแบบครีม (yeast extract paste) สารสกัดจากยีสต์แบบเข้มข้นที่เป็นของเหลวหนืด (concentrated yeast extract) และแบบผง (yeast extract powder) ซึ่งมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารปรุงแต่งอาหาร (food additive) และเนื่องจากเป็นสารที่สกัดได้จากในเซลล์จึงมีคุณค่าทางโภชนาการ โดยสารสกัดจากยีสต์มีปริมาณโปรตีน กรดอะมิโน (amino acid) และวิตามิน

ในการทดสอบเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่แยกได้ในอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ เนื่องจากสารสกัดยีสต์มีราคาสูง เมื่อเทียบกับสารเคมีชนิดอื่นๆ ที่เป็นสารประกอบแบบสารอนินทรีย์ ส่วนสารสกัดจากยีสต์จัดว่าเป็นสารอินทรีย์ ซึ่งในปัจจุบันถึงแม้ว่าจะมีการผลิตและจำหน่ายอย่างทั่วไป และมีการนำมาใช้อุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงมีการผลิตจำหน่ายในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบราคาต้นทุนแล้ว ยังแสดงให้เห็นว่าในอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์หากมีการใช้สารสกัดจากยีสต์จะเป็นการเพิ่มต้นทุน อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่แยกได้ในอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ พบว่าจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทมีการเจริญน้อย และนอกจากนี้ยังไม่พบกิจกรรมเซลลูเลสจากการเพาะเลี้ยงด้วย ทั้งนี้จากที่กล่าวมาถึงปัจจัยคุณสมบัติของส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ อย่างสารสกัดจากยีสต์ซึ่งมีสารประกอบที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การเกิดกิจกรรมในเซลล์ รวมถึงการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสด้วย

สำหรับการทดสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ ในที่นี้ได้นำตัวอย่างจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งคัดแยกดิน มูลสัตว์ และน้ำหมักชีวภาพ (รจรินทร์ พาประจง; 2555) มาเพาะเลี้ยงในสภาวะทดสอบ 3 สภาวะ ได้แก่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แล้วเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลส ซึ่งพบว่าตัวอย่างจุลินทรีย์ในแต่ละสภาวะการเพาะเลี้ยง สามารถผลิตเซลลูเลสได้ใกล้เคียงกันในสภาวะต่างๆ โดยที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบสามารถเกิดกิจกรรม CMCase ได้มากกว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงอื่น (ตารางที่ 4.3)

ตัวอย่างไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 และ S11 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินในแปลงเกษตรอินทรีย์ อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ เมื่อนำไอโซเลทดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงใน 3 สภาวะ ได้แก่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส และ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรม CMCase พบว่าทุกไอโซเลทที่คัดแยกได้สามารถมีกิจกรรม CMCase สูงสุด ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ใน

ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง โดยพบกิจกรรม CMCase 1.2 1.19 1.19 1.19 1.19 1.19 1.18 1.17 1.17 1.17 และ 1.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ เมื่อนำไอโซเลทดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงใน 3 สภาวะ ได้แก่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส และ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรม CMCase พบว่าทุกไอโซเลทที่คัดแยกได้สามารถมีกิจกรรม CMCase สูงสุด ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง โดยแต่ละไอโซเลท M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 และ M8 พบกิจกรรม CMCase สูงสุดคือ 1.16 1.16 1.16 1.15 1.15 1.15 1.15 และ 1.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ไอโซเลทจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพ จากเกษตรกรที่ทำการเกษตรอินทรีย์ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ เมื่อนำไอโซเลทดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงใน 3 สภาวะ ได้แก่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส และ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรม CMCase พบว่าทุกไอโซเลทที่คัดแยกได้สามารถมีกิจกรรม CMCase สูงสุด ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง โดยจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลท N1 N2 N3 N4 N5 และ N6 พบกิจกรรม CMCase สูงสุดคือ 1.14 1.12 1.12 1.12 1.14 และ 1.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 กิจกรรมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสในสภาวะการเพาะเลี้ยงการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

ไอโซเลท	กิจกรรม CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
S1	1.20
S2	1.19
S3	1.19
S4	1.19
S5	1.19
S6	1.19

ตารางที่ 4.3 กิจกรรมคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสในสภาวะการเพาะเลี้ยงการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่ออนาที (ต่อ)

ไอโซเลท	กิจกรรม CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
S7	1.18
S8	1.17
S9	1.17
S10	1.17
S11	1.17
M1	1.16
M2	1.16
M3	1.16
M4	1.15
M5	1.15
M6	1.15
M7	1.15
M8	1.15
N1	1.14
N2	1.12
N3	1.12
N4	1.12
N5	1.14
N6	1.11

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์สามารถแสดงกิจกรรมกับสารตั้งต้นได้มากกว่าเพียงชนิดเดียว รายงานการวิจัยของ Boonmee (2009) จากการคัดเลือก (screening) จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก เพื่อการสลายฟางข้าว พบว่าแยกแบคทีเรียได้ 29 ไอโซเลท และเชื้อรา 30 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ต้องการ โดยไอโซเลท FR14 แสดงกิจกรรม FPase จำเพาะสูงสุด 0.032 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน FR4 มีกิจกรรม CMCase จำเพาะสูงสุด 0.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ FC1 มีกิจกรรม cellobiase จำเพาะสูงสุด 0.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

รายงานการวิจัยของ Tabao และ Monsalud (2010) พบว่า 225 ไอโซเลทแบคทีเรียแมนกรูฟ (mangrove) แยกได้จากบริเวณที่มีแมนกรูฟต่างๆ ในฟิลิปปินส์ โดยมีประมาณ 10 สายพันธุ์ที่แสดงกิจกรรมเซลลูเลสดี และมี 5 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมสูงกว่าสาพันธุ์อื่นๆ ในทางสถิติ ได้แก่ BBCS-11, BBCS-14, BBoB2L2-2, BOrMGS-2 และ BOrMGS-3 โดยมีกิจกรรมเซลลูเลสตามสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ 54.80 56.60 66.50 50.33 51.04 และ 48.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบไอโซเลทที่มีกิจกรรมเซลลูเลสด้วยการย้อมสี congo red แล้ววัดกิจกรรมเอนไซม์เช่นเดียวกับการทดสอบของ Behera และคณะ (2014) เกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากดินแมนกรูฟ และแม่น้ำมาฮานาดิ (Mahanadi river) ประเทศอินเดีย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ 15 ไอโซเลท โดยการแยกแบคทีเรียที่ต้องการด้วยการทดสอบย้อมสี congo red ซึ่งแบคทีเรียที่ทดสอบแสดงการไฮโดรไลซิสคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสด้วยค่าการเกิดโซน (halo zone) สูงสุดในช่วง 1.18-2.5 เซนติเมตร โดยไอโซเลทที่แยกได้มีกิจกรรม CMCase ในช่วง 2.471 ถึง 98.253 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที โดยแต่ละไอโซเลทมีลักษณะทางสัณฐาน และทางชีวเคมีเป็น *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. และ *Brucella* spp.

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่เป็นเอนไซม์กลุ่มเซลลูโลไลติก เอนไซม์ที่ได้อาจมีคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำงานได้มากกว่าจำเพาะเพียงปฏิกิริยาเดียว จากรายงานของ Syed และคณะ (2013) เกี่ยวกับรา *Penicillium* sp. CPF2 (NFCCI 2862) ที่แยกได้ ซึ่งสามารถใช้ในการย่อยสลายชานอ้อย และกิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้จากการใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกัน โดยพบกิจกรรม FPase 1.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เอนโดเซลลูเลส (endocellulase) 19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไซลาเนส (xylanase) 40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) 2.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากโปรตีนปริมาณ 0.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในอาหารเพาะเลี้ยงมีเซลลูโลส 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับเพปโตน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

อย่างไรก็ตามในสภาวะการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *Penicillium* sp. CPF2 (NFCCI 2862) จากรายงานของ Syed และคณะ (2013) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ และพีเอช คือ 28 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.5

ดังนั้นปัจจัยในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จึงมีผลต่อการผลิตเซลลูเลสของจุลินทรีย์ จากรายงานของ Chakraborty และ Mahajan (2014) พบว่าสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่มีน้ำมันอยู่มาก จากบริเวณที่เป็นสถานีน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งขาดออกซิเจนทำให้มีโอกาสสะสมอยู่มากของแบคทีเรียที่เป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic bacteria) อาหารเซลลูโลโมแนส (cellulomonas medium) ซึ่งมีการปรับปริมาณกรดอะมิโน แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสม เอนไซม์เซลลูเลส (crude enzyme) จากการใช้กรดอะมิโนซีสเทอีน (Cysteine) น้ำตาลมอลโทส (maltose) เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยพบว่าที่ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7.15 เอนไซม์ (crude enzyme) ให้ผลผลิตที่เป็นกลูโคสได้สูงที่สุด

4.3 ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมเซลลูเลส

เอนไซม์มีปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานหลายประการ ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ ปริมาณสารตั้งต้นตัวยับยั้ง อุณหภูมิ และพีเอช ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดสามารถทำงานได้ในอุณหภูมิ และพีเอชช่วงหนึ่งๆ ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ และคุณสมบัติของแหล่งตัวผู้ผลิตเอนไซม์ ซึ่งในช่วงอุณหภูมิและพีเอชที่เอนไซม์ทำงานได้นั้น มีอุณหภูมิ และพีเอชช่วงหนึ่งเท่านั้น ที่เอนไซม์สามารถทำงานได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด หรือกล่าวว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน นั่นคือเอนไซม์แต่ละชนิดจะสามารถทำงานได้ดี ในอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมเซลลูเลสในที่นี้ได้พิจารณานำจุลินทรีย์ไอโซเลท GC1 มาศึกษาคุณสมบัติ เพื่อให้พิจารณาปัจจัยที่อาจเป็นแนวโน้มให้สามารถเพิ่มศักยภาพให้เอนไซม์ในการนำมาใช้ประโยชน์ และเพื่อเป็นแนวทางกับเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ด้วย

GC1 มีกิจกรรม CMCase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 5.0 7.0 และ 8.0 คือ 1.33 1.33 และ 3.8 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH pH 5.0 7.0 และ 8.0 คือ 1.11 4.44 และ 1.33 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH pH 5.0 7.0 และ 8.0 คือ 1.33 0.67 และ 0.22 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 กิจกรรม CMCase ของ GC1 ในสภาวะอุณหภูมิ และพีเอชที่ต่างกัน

	กิจกรรม CMCase (mU/ml)		
อุณหภูมิ (°C) / pH	37	45	50
5	1.33	1.11	1.33
7	1.33	4.44	0.67
8	3.8	1.33	0.22

จะเห็นว่าการวัดกิจกรรมเอนไซม์ CMCase ในอุณหภูมิ และพีเอชแต่ละสภาวะ จะพบกิจกรรมเอนไซม์ที่ต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 7 จะพบกิจกรรม CMCase สูงกว่าสภาวะการทดสอบอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องจากไอโซเลท GC1 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์ ซึ่งในระบบทางเดินอาหารของโค น้ำลายโคจะมีพีเอชประมาณ 8 รูเมน (rumen) มีพีเอชประมาณ 6-7 ส่วนอะโบมาซัม (abomasum) มีพีเอชประมาณ 2-3 ลำไส้เล็ก (small intestinal) มีพีเอช 8 จากลำไส้เล็กกากอาหารถูกส่งต่อไปที่ลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นทางเดินของกากอาหารก่อนที่จะถูกขับออกทางทวารหนัก และในบริเวณนี้มีจุลินทรีย์อยู่ จากตัวอย่างไอโซเลท GC1 ที่นำมาศึกษานี้แยกได้จากมูลสัตว์ ซึ่งในสภาวะที่ทดสอบกิจกรรม CMCase สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7 ซึ่งอาจเนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของโคในส่วนลำไส้เล็กมีสภาวะพีเอชประมาณ 8 ซึ่งอาจทำให้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์ยังคงมีชีวิต และทำงานได้ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดเล็กน้อย ไปจนถึงพีเอชที่เป็นเบสเล็กน้อย

มีรายงานการวิจัยของ Pardo และ Forchiassin (1999) เกี่ยวกับอิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์เซลลูเลส โดยอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมความคงตัวของเอนไซม์ระหว่าง 23-37 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเอนไซม์ผ่านไป 72 ชั่วโมง เอนไซม์แต่ละชนิดมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 4.2-5.8 โดยที่พีเอช 4.8 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวเหมาะสมที่สุด พลังงานกิจกรรมเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) คือ 4.97 กิโลแคลลอรี่ต่อโมล (Kcal mol^{-1}) เอกโซกลูคาเนส (endoglucanase) 4.37 กิโลแคลลอรี่ต่อโมล และเซลโลไบเอส (cellobiase) 13.73 กิโลแคลลอรี่ต่อโมล

ในทำนองเดียวกันจากรายงานผลของ Ibrahim และคณะ (2007) การแยกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเซลลูเลสที่ทำงานได้ในอุณหภูมิสูงจากน้ำพุร้อนในอียิปต์ ด้วยการใช้ตัวอย่างดินและน้ำ จากวิธี enrichment ตัวอย่างดินและน้ำด้วยเซลลูโลส นาน 3 สัปดาห์ บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ EHP1 EHP2 และ EHP3 ในการบ่งชี้สายพันธุ์ (phylogenetic analysis) พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus thermodenitrificans* และ *Geobacillus stearothermohilus* กิจกรรมเซลลูเลสสูงสุดจาก *Anoxybacillus flavithermus* EHP2 ในชั่วโมงที่ 36 โดยวัดกิจกรรมเซลลูเลสด้วยสารตั้งต้นอะไวเซล (avicel) CMC เซลโลไบโอส (cellobiose) และไซแลน อัตราการสลาย CMC สูงกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่นในที่นี้ที่ศึกษา อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์คือ 75 องศาเซลเซียส และ พีเอช 7.5 ตามลำดับ

เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของภัทรา และคณะ (2552) ในการแยกแบคทีเรียชอบร้อนที่สามารถผลิตไซลาเนสและเซลลูเลสในสภาวะที่ไม่ต้องการอากาศจากตัวอย่างดิน พบว่าสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 200 โคโลนี บนอาหารแข็งที่มี cellulose powder ในสภาวะที่ไม่ต้อการอากาศ ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยพบแบคทีเรียสายพันธุ์ M8.3 มีกิจกรรมไซลาเนสสูงสุด 12 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเซลลูเลสสูงสุด 24 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำมาทดสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี 6srRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คือ *Clostridium thermocellum* และเอนไซม์ที่ได้ยังสามารถย่อยสลายเปลือกข้าวโพด ชานอ้อย ซังข้าวโพด และฟางข้าวได้ด้วย

จากที่กล่าวมาเอนไซม์มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ทั้งนี้เอนไซม์ยังมีคุณสมบัติในการทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิและช่วงพีเอชด้วย จากรายงานของ Ariffin และคณะ (2006) ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูเลสจาก *Bacillus pumilus* EB3 มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่พีเอช 6 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอช 5-9 อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 จากการนำตัวอย่างแหล่งคัดแยกที่เป็นมูลโคมาแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส บนอาหาร CMC agar โดยมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วบ่ม 48 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อแยกได้เชื้อบริสุทธิ์ นำมาจุดบนอาหารและ บ่ม ในสภาวะที่กล่าว นำมาย้อมด้วยสารละลาย Congo red แล้วล้างด้วย 1 M NaCl พบว่า สามารถแยกเชื้อที่มีกิจกรรมเซลลูเลสได้ 31 ไอโซเลท ซึ่งแต่ละไอโซเลทมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสต่างกัน

5.1.2 จากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของแต่ละไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสขนาดมากกว่า 1.2 เซนติเมตร มี 8 ไอโซเลท ได้แก่AF1, ED1, EF1, EC1, GC1, GC3, ID2 และIC3 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส ดังนี้ 1.2 1.54 1.21 1.29 1.33 1.33 1.28 และ 1.23 เซนติเมตร ตามลำดับ

5.1.3 ในการเพาะเลี้ยงตัวอย่างไอโซเลทที่แยกได้จากดิน มูลสัตว์ และน้ำหมักชีวภาพ ในสภาวะการเพาะเลี้ยง 3 สภาวะ ได้แก่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส และ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยตัวอย่างไอโซเลท S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10 และ S11 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินในแปลงเกษตรอินทรีย์ อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง โดยพบกิจกรรม CMCase 1.2 1.19 1.19 1.19 1.19 1.19 1.18 1.17 1.17 1.17 และ 1.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับตัวอย่างจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมูลสัตว์ ไอโซเลท M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 และ M8 ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง พบกิจกรรม CMCase สูงสุดคือ 1.16 1.16 1.16 1.15 1.15 1.15 1.15 และ 1.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และตัวอย่างจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพ ไอโซเลท N1 N2 N3 N4 N5 และ N6 ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง พบกิจกรรม CMCase สูงสุดคือ 1.14 1.12 1.12 1.12 1.14 และ 1.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5.1.4 จากการทดสอบกิจกรรม CMCase ของไอโซเลท GC1 ในแต่ละช่วงอุณหภูมิและพีเอช พบว่า GC1 มีกิจกรรม CMCase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 7.0 และ 8.0 คือ 1.33 1.33 และ 3.8 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 7.0 และ 8.0 คือ 1.11 4.44 และ 1.33 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 7.0 และ 8.0 คือ 1.33 0.67 และ 0.22 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 พบกิจกรรม CMCase มากกว่าที่สภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่ทดสอบอื่นๆ โดยพบกิจกรรม CMCase คือ 4.44 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ของแต่ละไอโซเลท ควรมีการปรับความขุ่นของไอโซเลทนั้น ก่อนเติมลงในอาหารเพื่อทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ เนื่องจากแต่ละภาชนะหมักอาจมีปริมาณเชื้อที่ต่างกัน ซึ่งอาจมีผลต่อกิจกรรมด้วย

5.2.2 การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างควรมีตัวอย่างสำหรับเป็นแหล่งคัดแยกให้หลากชนิด เช่นการใช้มูลโคจากที่ในอำเภอเมือง บุรีรัมย์ควรเก็บในแหล่งตำบลที่หลากหลายมากขึ้น ทำให้สามารถเปรียบเทียบและนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประโยชน์ได้กว้างมากขึ้นด้วย

5.2.3 การบ่งชี้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ ควรศึกษาทางชีวเคมี และชีวโมเลกุล เพื่อให้สามารถบ่งชี้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ และเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

5.2.4 ควรมีการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์จากไอโซเลทที่แยกได้นอกเหนือจาก GC1 เพื่อให้ทราบคุณสมบัติเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทที่แสดงการเกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 เซนติเมตร ซึ่งอาจจะแสดงกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสได้มีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

จำเนียร ชินวงค์, อุดมลักษณ์ ภิรมย์อยู่, พัชรินทร์ แน่นอุดร. การเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสในกล้วย 3 ชนิด หลังจากทำให้บริสุทธิ์. ***เอกสารประกอบการประชุมวิชาการโครงการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 4***; 2547; มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

ปราณี อ่านเปรื่อง. ***เอ็นไซม์ทางอาหาร.*** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2543.

ภัทรา ผาสอน, จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, นิษก์นิภา สุนทรกุล, คิน เลย์ คู และกนก รัตนะกนกชัย. การคัดแยกแบคทีเรียชอบร้อนที่เจริญในสภาวะไม่ต้องการอากาศเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร. ***ว. วิทย. กษ.*** 2552; 40(1) (พิเศษ) :369-372.

วิชัย ลีลาวัชรมาศ. ***การผลิตไซโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยวิธีทางเอนไซม์***. [ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ]. กรุงเทพฯ: คณะพลังงานและวัสดุ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี; 2530.

สันทณีย์ รัตติธรรมกุล. ***การศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของ xylanolytic enzyme จาก Bacillus circulans*** B6. [ปริญญาวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ]. กรุงเทพฯ: คณะทรัพยากรธรรมชาติและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี; 2541.

เส้นใยธรรมชาติ [ออนไลน์] 2549 [อ้างเมื่อ 6 มิถุนายน 2550]. จาก http://www.nationalpark.go.th/biocom/garbage_fiber.html

เอกสารประกอบคำบรรยายวิชาเคมี, โครงการส่งเสริมความสามารถพิเศษภาคฤดูร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [ออนไลน์] 2000 [อ้างเมื่อ 6 มิถุนายน 2550]. จาก http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet5/topic8/enzyme.html

Adler, E. Lignin chemistry - past, present and future. ***Wood Sci Technol***. 1977; 11: 169-218.

Ariffin, H., Abdullah, N., Kalsom, U.M.S., Shirai, Y., and Hassan, A.M. Production and characterization of cellulose by *Bacillus pumilus* EB3.

International Journal of Engineering and Technology. 2006; 3(1): 47-53.

Ahring, B.K., Licht, D., Schimdt, A.S., Sommer, P., Thomsen, A.B. Production of ethanol from wet oxidised wheat straw by *Thermoanaerobacter mathranii*. ***Bioresource Technol***. 1999; 68 (3).

Bauchop, T. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. ***Agri. Environ***. 1981; 6: 339-348.

Boonmee A. Screening of rice straw degrading microorganisms and their cellulose activities. ***KKU Sci. J.*** 2009; 37(supplement): 83-88.

Behera, C.B., Parida, S., Dutta, K.S., and Thatoi, N.H. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi river Delta and their cellulase production ability. ***American Journal of Microbiological Research.*** 2014; 2(1): 41-46.

Bedford, M. R., and Classen, H. L. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. ***J. Nutr***. 1992; 122:560-569.

Beguin, P., Aubert, J.P. The biological degradation of cellulose. ***FEMS Microbiol. Rev***. 1993; 13: 25-58.

Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Diaz, R., Steiner, J., Eyzayuirre, J. Penicillium purpurogenum produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. ***J Biotechnol***. 1995; 41: 71–79.

Bhat, M.K., Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. ***Biotechnol. Adv***. 1997; 15: 583-620.

Biely, P. Microbial Xylanolytic Systems. ***Trends in Biotechnology***. 1985; 3: 286-289.

Carder, H.J. Detection and quantitation of cellulase by Congo red staining of substrates in

a cup-plate diffusion assay. ***Anal Biochem***. 1986; 153(1):75-9.

Cellulose. [online] 2003 [cited 2006 June 10]. Available from http://www.fibresource.com/f-tutor/cellulose.html.

Coughlan, M.P. Cellulases: Production properties and applications. ***Biochem. Soc. Trans***. 1985a; 13: 405-406.

Coughlan, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. ***In Biotechnology and Genetic Engineering Reviews***. Vol 3. (Russell GE. Ed.). Interscience, Newcastle-upon-Tyne. 1985b; 39-109.

Chakraborty, A. and Mahajan, A. Cellulase activity enhancement of bacteria isolated from oil-pump soil using substrate and medium optimization. ***American Journal of Microbiological Research***. 2014; 2(2): 52-56.

Dey, D., Hinge, J., Shendye, A., Rao, M. Purification and properties of extracellular endo-xylanases from alkalophilic thermophilic Bacillus sp. ***Can J Microbiol***. 1992; 38: 436–442.

Dhillon, A, Gupta, J.K., Jauhari, B.M., Khanna, S. A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. ***Bioresour. Technol***. 2000; 73: 273–7.

Digestive physiology of the cow. [online] 2014 [cited 2014 June 9]. Available from http://www.milkproduction.com/Library/Scientific-articles/Animal-health/Digestive-Physiology-of-the-Cow/

Elegir, G., Szakacs, G., Jeffries, TW. Purification, characterization and substrate specificities of multiple xylanases from Streptomyces sp. strain B-12–2. ***Appl Environ Microbiol***. 1994; 60: 2609–2615.

Esteban, R., Villanueva, J.R., Villa, T.G. β-D-xylanases of Bacillus circulans WL-12.

Can J Microbiol. 1982; 28: 733–739.

Gilbert, J.H., and Hazlewood, P.G. Review article: Bacterial cellulases and xylanases. ***J. Gen. Microbiol***. 1993; 139: 187-194

Greaves, H. The effect of substrate availability on cellulolytic enzyme production by selected wood rotting microorganisms. ***Australian J. Bio. Sci***. 1971; 24: 1167-1180.

Ibrahim, S.S.A., and EI-diwany, I.A. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. ***Aust. J. Basic Appl. Sci***. 2007; 1(4): 473-478.

Illston, J.M., Domone, P.L.J. ***Construction Material: Their Nature and Behaviour***. New York: Routledge; 2001.

Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., Palavesam, A. Effect of different growth Parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. ***Int. J. Environ. Sci. Tech***. 2006; 3(1): 25-34.

Kaur, M. and Arora S. Isolation and Screening of Cellulose Degrading Bacteria in Kitchen Waste and Detecting Their Degrading Potential. ***Journal of Mechanical and Civil Engineering***. 2012; 1(2): 33-35.

Kubicek, C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. ***Adv Biochem Engin/. Biotechnol***. 1992. 45: 1-27.

Lee, R.L., Paul J.W., Willem H. van Z., and Isak S.P. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. ***Microbiol Mol Biol Rev***. 2002; 66: 506-577.

Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., daSilra, M.J.S., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., vanGarcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., vanDerhondel, C.A.M.J.J., vanRotterdam, C. ***Xylanases and their application in bakery***. In: Visser, J., Beldman, G., and vanSomeren, M.A.K., and Voragen, A.G.J. (eds). ***Xylans and xylanases***.

Elsevier, Amsterdam. 1992; pp 349–360.

Mandels, M. Applications of cellulases. ***Biochem Soc. Trans***. 1985; 13: 414-415.

Pardo, G.A., and Forchiassin F. Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in Nectria catalinensis. ***Rev. Argent. Microbiol***. 1999; 31(1):31-35.

Plant cell wall. [Online] 2004 September 6 [cited 2007 June 10]. Available from http:// www.bio.indiana.edu/~hangarterlab/courses/b373/lecturenotes/cellwall/cellwall. html.

Phanayingphaisal, W., Suttimool, W., Pinphanichkarn, P. Purification and properties of cellulase-free xylanase from Namwa banana fruit *Musa sapientum*. ***J. Sci. Res. Chula. Univ***. 2006; 31: 87-93.

Rattithumkul, S., Kyu, L.K., Ratanakhanokchai, K., Tonticharoen, M. ***Studies on the xylanolytic enzyme system of Bacillus circulans B6***. The 10 th Annual General Meeting of the Thai Society for Biotechnology for a Self-Sufficient Economy. Bangkok, Thailand.

Somogyi, M. Notes in Sugar Determination. ***J Biol Chem***. 1952; 195: 19-23.

Syed, S., Hassan, Riyaz-Ul S., and Johri S. A novel cellulase from an endophyte, *Penicillium* Sp. NFCCI 2862. ***American Journal of Microbiological Research***. 2013; 1(4): 84-91.

Tabao, C.S.N., and Monsalud, G.R. Screening and optimization of cellulose production of *Bacillus* strain isolates from Philippine mangroves. ***Philipp. J. systematic Biol***. 2010; 4: 79-87.

Van Paridon, P.A., Boomanm, J.C.P., Selten, G.C.M., Geerse, C., Barug, D., Debot, P.H.M., and Hemke G. ***Application of Fungal Endoxylanase in Poultry Diets. In: Xylans and Xylanases***, Visser, J., G. Beldman, M.A.K. Someren and A.G.J. Voragen (Eds.). Elsevier, Amsterdam, 1992. pp: 371-378.

Warren, R.A.J. Microbial hydrolysis of polysaccharide. ***Annu. Rev. Microbiol***. 1996; 50:

183-212.

ภาคผนวก

1. อาหาร CMC agar (Carboxymethylcellulose agar)

อาหาร CMC agar (% (w/v) ประกอบด้วย

Sodium nitrate ($NaNO_3$)	0.1
Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.1
Potassium chloride (KCl)	0.1
Magnesium sulphate ($MgSO_4$)	0.05
Yeast extract	0.05
Glucose	0.1
Carboxymethylcellulose (soluble cellulose)	0.5
วุ้น (Agar)	1.0

เมื่อผสมแต่ละส่วนประกอบในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ถ้าเตรียมเป็นอาหารเหลวไม่ต้องเติมวุ้น)

ถ้าเป็นอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงในการผลิตเอนไซม์ ไม่ต้องเติมน้ำตาลกลูโคส (glucose)

2. สารละลายบ่งชี้กิจกรรมเซลลูเลส

2.1 สารละลายคองโกเรด (Congo red) โดยละลาย Congo red 1 มิลลิกรัม ในน้ำ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (หรือความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์)

2.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

3. บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate buffer)

การเตรียมบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (M) พีเอช 5.0

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 0.2 โมลาร์

1. เตรียมสารละลายA กรอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 M (acetic acid; CH_2COOH)

ตวงกรดอะซิติก 11.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. เตรียมสารละลายB โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.2 M (sodium acetate; CH_3COONa)

ชั่ง CH_3COONa 16.4 กรัม หรือ $CH_3COONa•3H_2O$ 27.4 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. เจือจางสาร A และ B ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.05 โมลาร์

4. ผสมสารละลาย A และ B ตามปริมาตร

pH	สารละลาย A	สารละลาย B
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.5
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

4. ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.8

4. บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Phosphate buffer)

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7 และ pH 8

1. เตรียมสารละลายA 1 M K_2HPO_4 ; ชั่ง K_2HPO_4 มา 87.09 กรัม
2. เตรียมสารละลายB 1 M KH_2PO_4 ; ชั่ง KH_2PO_4 มา 68.045 กรัม
3. เจือจางสารละลาย A และ B ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.05 โมลาร์
4. ผสมสารละลาย A และ B ตามปริมาตร

pH	Volume of 1 M K_2HPO_4	Volume of 1 M KH_2PO_4
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	92
8.0	94	6

5. การวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

หลักการ น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสในสารละลายตัวอย่างจะรีดิวซ์คอปเปอร์ในสารละลายด่างได้ cuprous oxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลายอาซิโนโมลิบเดท (arsenomolydate) ทำให้เกิดสีเขียวแกมน้ำเงิน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

อุปกรณ์

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. Somogyi (อัตราส่วน Somogyi I: Somogyi II = 4:1เตรียม Somogyi ใช้ภายใน 1 วัน)

Somogyi I: ละลายโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate; Na_2SO_4) 288 กรัม โปแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (potassium sodium tartrate; NapT) 24 กรัม โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate; Na_2CO_3) 48 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 32 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1600 มิลลิลิตร

Somogyi II: ละลายโซเดียมซัลเฟต 72 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร

2. Nelson

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท (ammonium molybdate; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 100 กรัม ในน้ำกลั่น 1,800 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (sulfuric acid; H_2SO_4) 84 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนอาซิเนท (sodium hydrogen arsenate; $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$) 12 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. ใส่สารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย Somogyi ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที

2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นทันที เติม Nelson ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (OD) 520 นาโนเมตร โดยเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

4. อ่านค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากขั้นตอนการทดลองเดียวกัน โดยใช้น้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 50 100 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์กิจกรรมเซลลูเลส (สันทนีย์, 2541)

หลักการ วัดความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากกิจกรรมเอนไซม์ต่อการย่อยสารตั้งต้น (substrate)

อุปกรณ์

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง
3. เตาให้ความร้อน

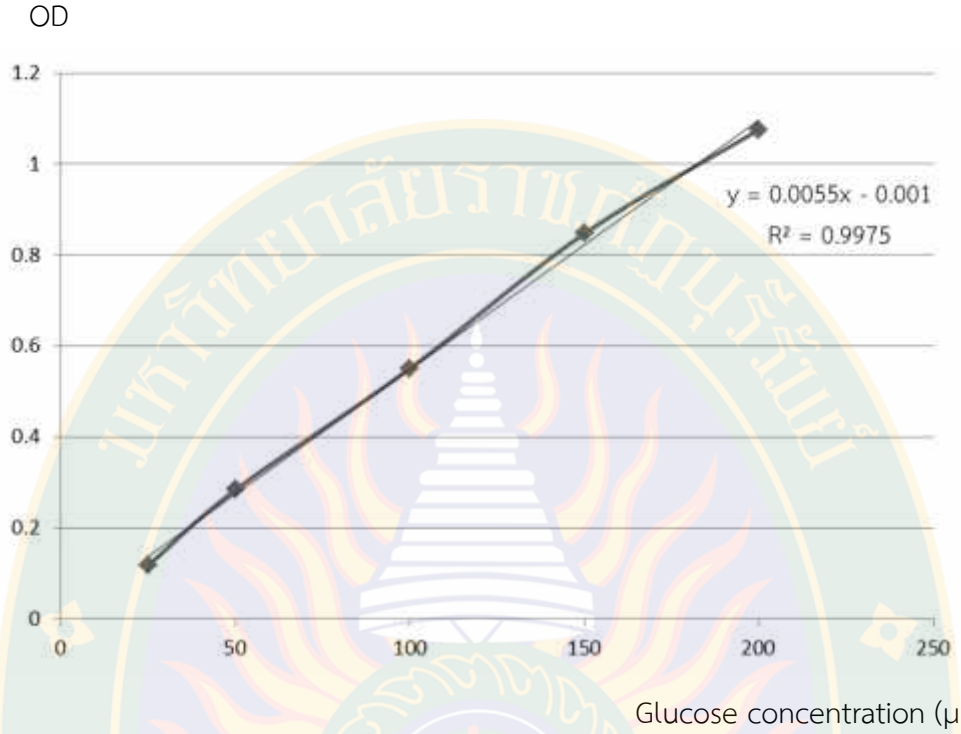
สารเคมี

1. Carboxymethy cellulose
2. sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (M) พีเอช 5.0
3. สารละลาย Somogyi และ Nelson

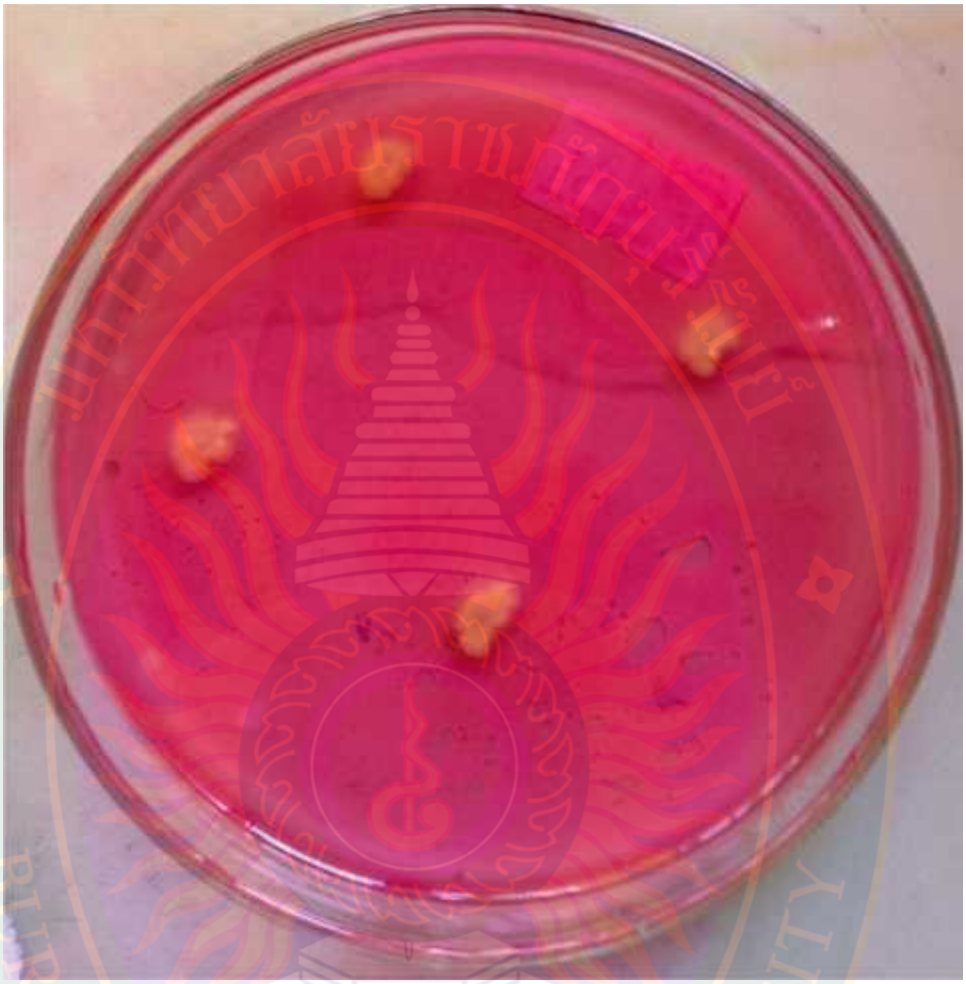
วิธีทดลอง

1. เติมเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย CMC ความเข้มข้น ร้อยละ 1 ใน sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (เป็นสารตั้งต้น)
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้มาวัดน้ำตาลรีดิวซ์
4. ทำ substrate blank โดยเติมสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร นำไปหาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์
5. ทำ enzyme blank โดยเติมเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นแทนสับสเตรท 0.5 มิลลิลิตร นำไปหาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์
6. นำความเข้มข้นน้ำตาลในข้อ 4 และ 5 ลบจากความเข้มข้นน้ำตาลจากปฏิกิริยาที่เติมเอนไซม์และสับสเตรท จะได้น้ำตาลที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายใน 30 นาที
7. อ่านความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

สำหรับการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์ จะเปลี่ยนอุณหภูมิและพีเอชตามที่ต้องการศึกษาในสภาวะที่ต่างกัน

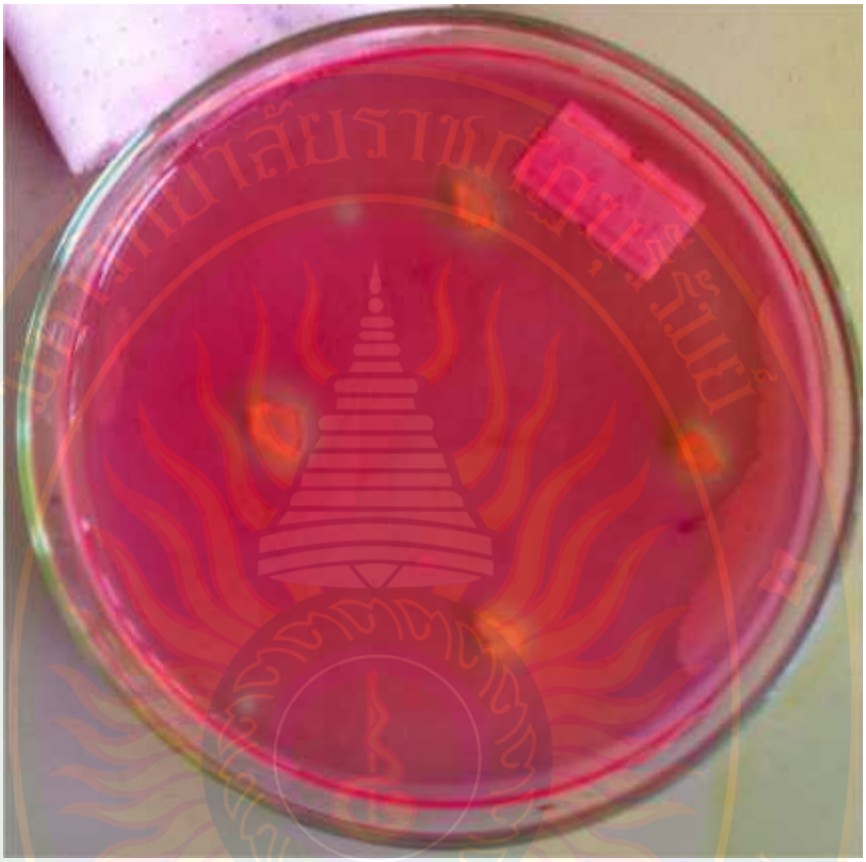


ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



ภาพภาคผนวกที่ 2 การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบไม่ปรากฏโซนใส

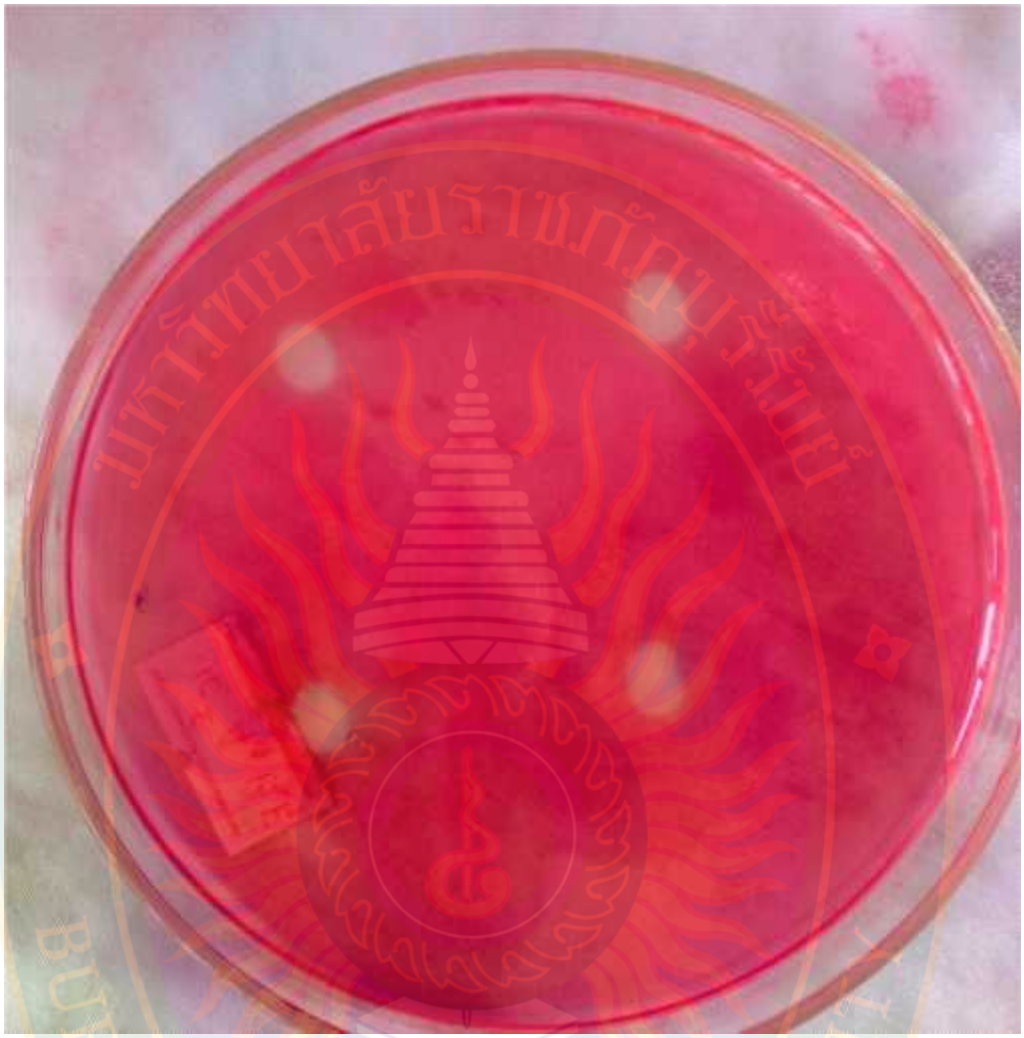
ภาพภาคผนวกที่ 3 การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดน้อยกว่า 1 เซนติเมตร



ภาพภาคผนวกที่ 4 การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดน้อยกว่า 1 เซนติเมตร

ภาพภาคผนวกที่ 5 การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.001 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร

ภาพภาคผนวกที่ 6 การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดประมาณมากกว่า 1 เซนติเมตร



ภาพภาคผนวกที่ 7 การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดประมาณน้อยกว่า 1 เซนติเมตร

ภาพภาคผนวกที่ 8 การแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเซลลูเลสบนอาหาร CMC agar โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ Congo red เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไอโซเลทที่ทดสอบปรากฏโซนใสขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร