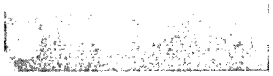
รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้เก็บไว้วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการหมักด้วย Gas chromatography

ผลการวิจัย

1. คัดแยกเชื้อที่เจริญและย่อยสลายเซลลูโลสได้ในสภาวะปราศจากออกซิเจน

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างดิน 150 ตัวอย่างที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์และแหล่งเกษตรกรรมใน Basal medium พีเอช 7.0 ที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่ต้องการอากาศ นาน 3 วัน สามารถคัดแยกเชื้อที่เจริญและย่อยกระดาษกรองได้เกือบหมด 20 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจพบโคโลนีสีเหลืองเกาะอยู่บนเส้นใยสายสั้นๆ และมีก๊าซเกิดขึ้น (การคัดเลือกครั้งที่ 1) จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่ต่อไปในอาหารที่มี cellulose powder เป็นแหล่งคาร์บอนอีก 4 ครั้ง (การคัดเลือกครั้งที่ 2-5) เพื่อกำจัดเชื้อที่ต้องการอากาศให้หมดไป จากนั้นคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มี cellulose powder เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 ที่ปรากฏวงใสจากการย่อยสลาย cellulose powder ภายใน 3 วัน เมื่อศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและย่อยสลายเซลลูโลสพาวเดอร์บนอาหารแข็งเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี (รูปที่ 4) จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งยาวและสร้างสปอร์ ดังแสดงในตารางที่ 1



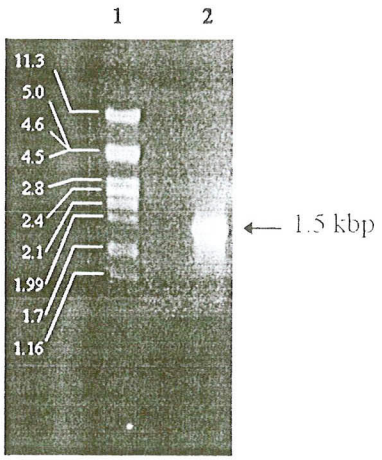
รูปที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงแข็งที่มีอะไวเซล ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19

คุณสมบัติ	ผลการทดสอบ
การย้อมติดสีแกรม	Gram-positive
รูปร่าง	Rod-shape
ความต้องการออกซิเจน	Anaerobic
การสร้างสปอร์	+
การผลิตเอนไซม์คะตะเลส	+

2. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อที่คัดแยกได้ ด้วยเทคนิค 16S rRNA ร่วมกับคุณสมบัติทางเคมี เพื่อระบุสายพันธุ์ที่ได้

เตรียมดีเอ็นเอจากโครโมโซมของเชื้อ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 โดยการทำให้เซลล์แตกด้วย Lysozyme และย่อยสลายโปรตีนและอาร์เอนเอปนเปื้อนด้วย proteinase และ RNase ตามลำดับ ก่อนสกัดดีเอนเอด้วย Chloroform/isoamyl alcohol จากนั้นสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ EUB8f และ U1492r ซึ่งเป็น universal ไพร์เมอร์สำหรับหา 16S rRNA ซึ่งพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1.5 kb (รูปที่ 5) ตรงตามขนาดของ 16s rRNA และวิเคราะห์ลำดับของ 16s rRNA ต่อไป



รูปที่ 5 อะกาโรสเจล (ร้อยละ 0.8) ของผลิตภัณฑ์จาก PCR ที่เพิ่มจำนวนด้วยไพร์เมอร์ EUB8f และ U1492r เมื่อเลนที่ 1 = λ DNA ย่อยด้วย *Pst* I, เลนที่ 2 = PCR products จากดีเอ็นเอของ NOI-19

จากการตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค 16s rRNA โดยสืบค้นข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ 16s rRNA จากฐานข้อมูลออนไลน์ DDBJ ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 มีความคล้ายคลึงกับ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* สายพันธุ์ FH1 (Hoster, 2001) และ DMS571 ร้อยละ 99.3 ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ผลิตเอนไซม์เชิงซ้อนที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ เมื่อศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 สามารถเจริญเติบโตได้ใน Avicel, α—cellulose, starch, xylan, cellobiose, xylose, glucose, mannose และ locust bean gum แต่ไม่สามารถเจริญใน pectin, chitin, maltose, sucrose, arabinose, gelatin, dextran, yeast extract, peptone, raffinose, lactose, manitol และ glycerol ดังตารางที่ 2 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มี 16s rRNA คล้ายคลึงกันแต่พบว่า *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 แตกต่างจาก FH1 และ DMS571 คือไม่สามารถใช้ chitin, maltose, sucrose, arabinose, yeast extact, raffinose และ lactose เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเจริญเติบโตได้ จากผลการ

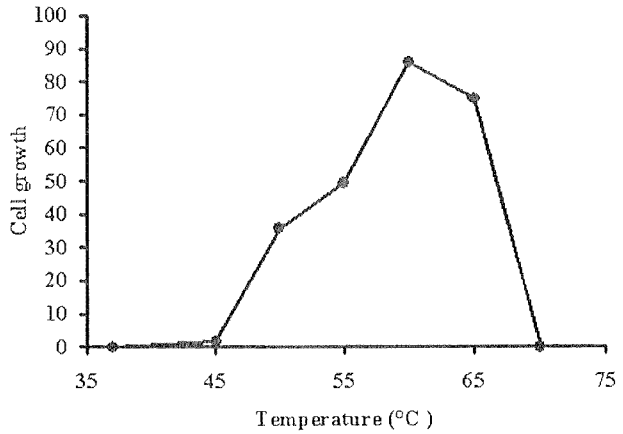
ทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 อาจจะเป็น สปีชีส์ใหม่ที่มีแตกต่างจาก FHI และ DMS571

ตารางที่ 2 ความสามารถในการเจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

Substrate	*Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19	*T. thermosaccharolyticum* strain FHI	*T. thermosaccharolyticum* strain DMS571
Avicel	+	ND	ND
α—cellulose	+	ND	ND
Starch	+	+	–
Xylan	+	+	–
Pectin	-	-	-
Chitin	-	+	ND
Cellobiose	+	+	–
Maltose	-	+	–
Sucrose	-	+	–
Xylose	+	+	–
Arabinose	-	+	–
Glucose	+	+	–
Gelatin	-	ND	ND
Mannose	+	ND	ND
Locust bean	+	ND	ND
gum	–	+	-
Dextran	-	+	+
Yeast extract	-	-	-
Peptone	-	+	–
Raffinose	-	+	–
Lactose	ND	+	+
Fructose	-	-	-
Manitol	-	-	-
Glycerol			

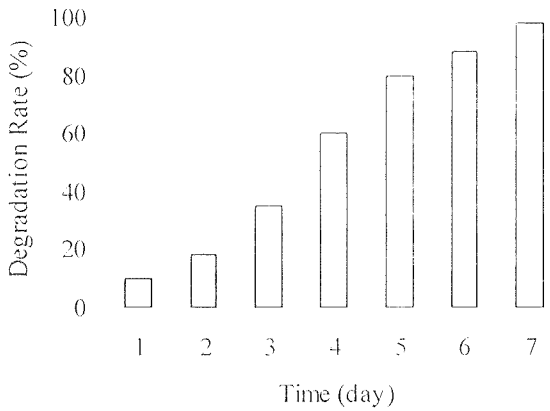
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19

ภายหลังการเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 ในอาหารเหลวที่มีเซลลูโลไบโอส 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิต่างๆ ในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm เป็นระยะเวลา 3 วัน ตรวจหาปริมาณของเซลล์ที่เจริญเติบโตโดยดูจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้น พบว่าเชื้อไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 และ 70 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ระหว่างอุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 6) แสดงว่าเชื้อจัดอยู่ในกลุ่ม thermophillic bacteria ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียชอบร้อนที่เจริญภายใต้สภาวะไม่ต้องการอากาศโดยเจริญได้ เช่น *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485 ที่เจริญระหว่างอุณหภูมิ 30-66 องศาเซลเซียส (Shao และ Wiegel 1995) และ *T. Thermosaccharolyticum* strain FH-1 เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 45-75 องศาเซลเซียส (Egelseer, 1995) รวมทั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Thermoanaerobacterium* sp. เช่น *T.sacchalolyticum*, *T.thermosulfurigenes*, และ *T.xylanolyticum* ซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 60°C (Lee และคณะ, 1993a; Lee และคณะ, 1993b).



รูปที่ 6 ความสามารถในการเจริญเติบโตของ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายอะไวเซลของเอนไซม์จาก *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 โดยตรวจวัดน้ำหนักแห้งของสับสเตรทที่ลดลงและคำนวณเป็นค่าความสามารถในการย่อยสลาย พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลายอะไวเซลที่ pH 7 ใน 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วย crude enzyme จากเชื้อ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 โดยการย่อยสลายอะไวเซลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสับสเตรทอย่างมีประสิทธิภาพโดยความสามารถในการย่อยสลายเกิดขึ้นเกือบ 100 % เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 7

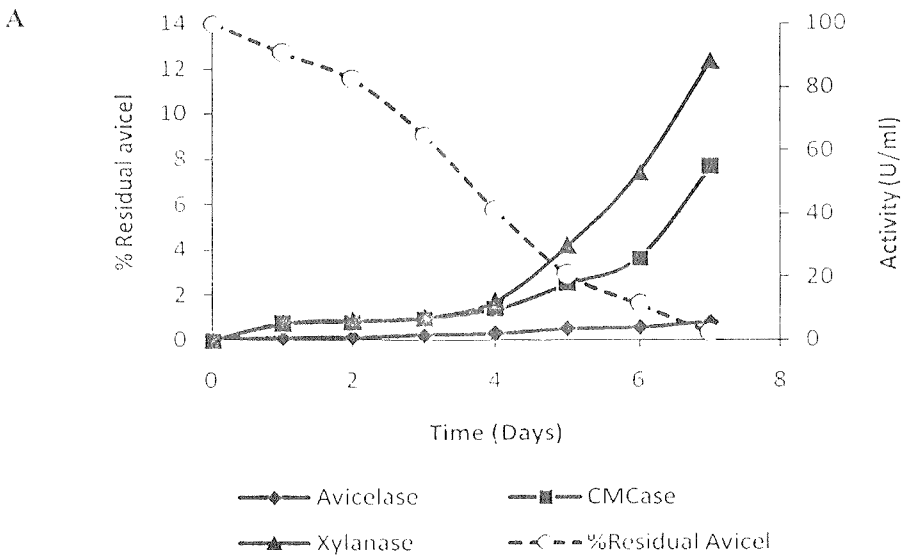


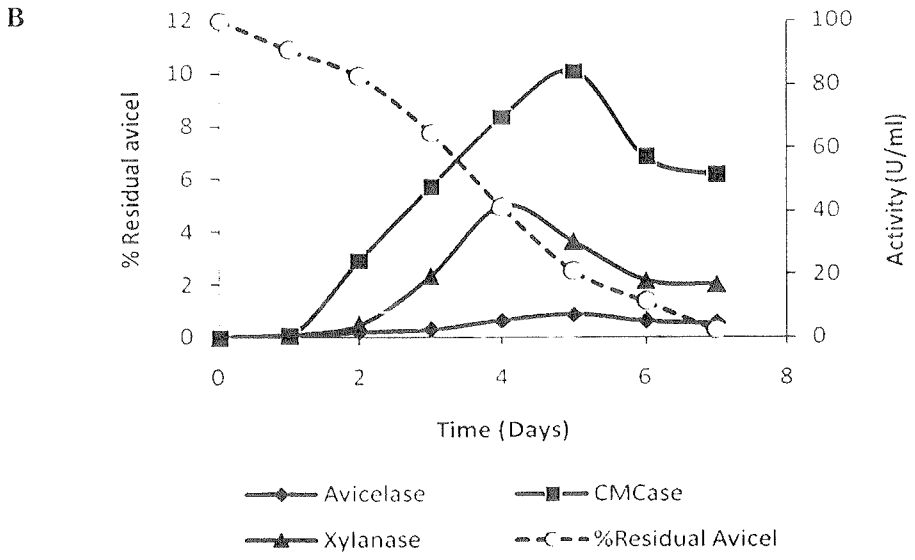
รูปที่ 7 ความสามารถในการย่อยสลายอะไวเซล เมื่อเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 เป็นระยะเวลา 7 วัน

4. การผลิตไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์

ศึกษาการช่วงเวลาในการผลิตไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์ของ *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 เมื่อเพาะเลี้ยง BM medium ที่มี อะไวเซลร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน จากนั้นแยกตะกอนเซลล์และน้ำเลี้ยงออกจากกัน นำส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน อะไวเซล และ CMCase ขณะที่ส่วนกากตะกอนเซลล์ (pellet) นำไปชะโปรตีนที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์และเซลลูโลสออกด้วยสารละลาย triethylamine (TEA) 1% แล้วนำไป dialysis เพื่อกำจัด TEA จากนั้นนำมาตรวจสอบเช่นเดียวกับน้ำเลี้ยง ผลการทดลองในช่วงสี่วันแรกของการเจริญสามารถตรวจพบไซลาเนส อะไวเซลเลส และ CMCase ในน้ำเลี้ยงและกากตะกอน โดยอัตราการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส อะไวเซลเลส และ CMCase ในกากตะกอนเพิ่มสูงกว่าในน้ำเลี้ยง แสดงว่าในระยะแรกเอนไซม์ส่วนใหญ่ผลิตออกมาเกาะกับผิวเซลล์ อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในน้ำเลี้ยงและกากตะกอนสอดคล้องกับปริมาณอะไวเซลที่ลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายอะไวเซลให้เป็นอาหารเพื่อเจริญเติบโตต่อไป (รูปที่ 8) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน เอนไซม์ที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์จุลินทรีย์

ลดลงอย่างรวดเร็วในขณะที่เอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเพิ่มขึ้นแสดงว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่หลุดจากผิวเซลล์และอะไวเซลล์มาอยู่ในน้ำเลี้ยง คุณสมบัติของเอนไซม์ที่ยึดเกาะกับเซลล์ในระยะแรกเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์เชิงซ้อน แบคทีเรียจำเป็นต้องยึดเกาะกับสับสเตรทเพื่อให้เซลล์เข้าใกล้กับสับสเตรท ทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์บริเวณผิวสัมผัสของสับสเตรทเพิ่มขึ้น จึงมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย (Bayer และคณะ, 1998; Demain และคณะ 2005)

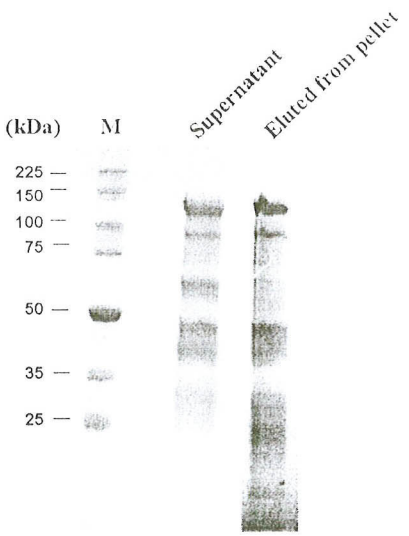




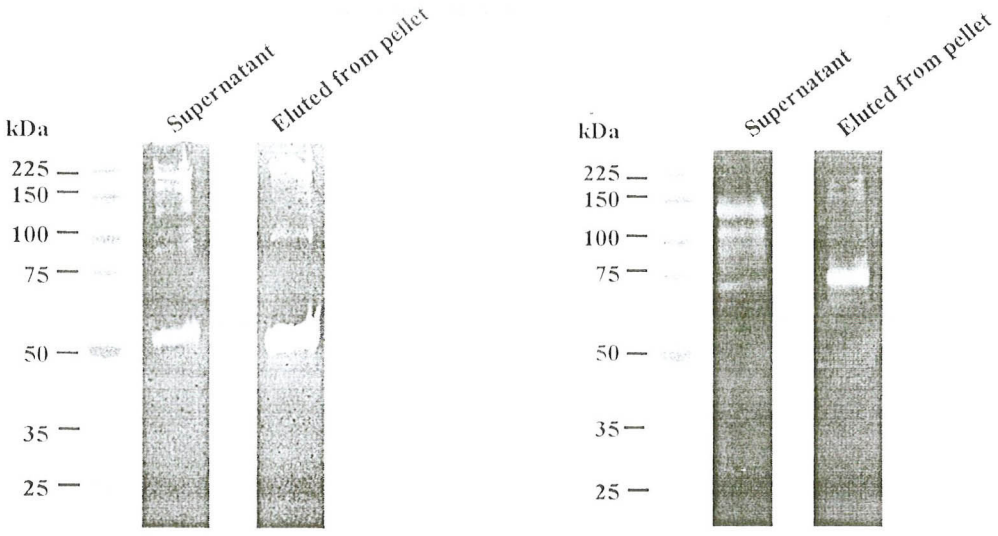
รูปที่ 8 ความสามารถในการย่อยสลายอะไวเซลและผลิตเอนไซม์ในน้ำเลี้ยง (A) และส่วนที่กากตะกอนเซลล์และอะไวเซล (B) เมื่อเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 เป็นระยะเวลา 7 วัน

5. ศึกษาคุณสมบัติของเซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติกเอนไซม์

ศึกษารูปแบบของโปรตีนที่ถูกผลิตภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนโดย *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอะไวเซลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเอนไซม์เชิงซ้อนนี้ประกอบไปด้วยโปรตีนอย่างน้อย 19 ชนิด ที่มีขนาดระหว่าง 23 – 150 kDa เมื่อทดสอบด้วย SDS-PAGE โดยสามารถตรวจพบเอนไซม์ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและส่วนที่ยึดเกาะกับผนังเซลล์เมื่อชะด้วย 1% TEA ดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ยังเกาะอยู่บริเวณผนังเซลล์และ/หรือสับสเตรท เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคไซโมแกรม (รูปที่ 10) พบว่าประกอบด้วย CMCase อย่างน้อย 7 แถบ ที่มีขนาดระหว่าง 65-150 kDa (รูปที่ 10A) และไซลาเนสอย่างน้อย 5 แถบ ที่มีขนาดระหว่าง 70-200 kDa (รูปที่ 10B) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกสู่น้ำเลี้ยงในวันที่ 7 รูปแบบของเอนไซม์ส่วนใหญ่ปลดปล่อยสู่น้ำเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. NOI-19 ผลิตเอนไซม์ที่มีความหลากหลายของเอนไซม์หลายชนิดในกลุ่มเซลลูเลสและไซลาเนส สอดคล้องกับคุณสมบัติของเอนไซม์เชิงซ้อนที่ประกอบด้วยเอนไซม์หน่วยย่อยหลายชนิดซึ่งระยะแรกสามารถยึดเกาะกับผิวเซลล์ก่อนปล่อยสู่น้ำเลี้ยง (Beguin 1994, Coughlan 1992, Lamed 1991).



รูปที่ 9 รูปแบบโปรตีนในน้ำเลี้ยง (supernatant) และส่วนกากตะกอนเซลล์ (Eluted from pellet) เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE โดยขนาดของโปรตีนเปรียบเทียบได้จากโปรตีนมาตรฐานในเลน M



A. Zymogram for CMCase

B. Zymogram for xylanase

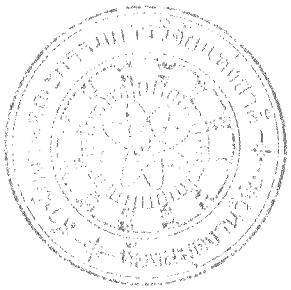
รูปที่ 10 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ xylanase ด้วย zymogram สำหรับ CMCase (A) และไซลาเนส (B) ตัวอย่างทดสอบบนเจล SDS-PAGE ที่มี CMC และ soluble birchwood xylan ละลายอยู่ ร้อยละ 1 ตามลำดับ

เมื่อเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 ในอาหารที่มีอะไวเซลเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนและอุณหภูมิสูง 60°C เป็นเวลา 5 วัน สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ อะไวซิเลส คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส เบต้ากลูโคซิเดส และเซลโลไบโอไฮโดรเลส และเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก ได้แก่ ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะซิติลเอสเทอเรส ทั้งส่วนน้ำเลี้ยงและกากตะกอน ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกในส่วนน้ำเลี้ยงมีมากกว่าในส่วนกากตะกอน ส่วนเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกพบเอ็นโดเซลลูเลส (อะไวซิเลส และคาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส) ในส่วนกากตะกอนมากกว่าในส่วนน้ำเลี้ยง ขณะที่เอ็กโซเซลลูเลส (เบต้ากลูโคซิเดส และเซลโลไบโอไฮโดรเลส) พบในส่วนน้ำเลี้ยงเป็นส่วนใหญ่

เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติกหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลากหลาย และเอนไซม์ส่วนใหญ่ปล่อยปล่อยสู่น้ำเลี้ยงซึ่งเป็นข้อดีในการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ จุดเด่นของระบบเอนไซม์จากเชื้อนี้คือ ความหลากหลายของเอนไซม์โดยเฉพาะเบต้ากลูโคซิเดสซึ่งมีน้อยในเอนไซม์ทั่วไป อย่างไรก็ตามการที่ผลิตเอนไซม์หลายชนิดออกมาทำงานร่วมกันย่อมมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสับสเตรทโดยเฉพาะเศษวัสดุทางการเกษตรที่มีโครงสร้างซับซ้อน

ตารางที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยง (extracellular) และกากตะกอน (pellet-bound protein) เมื่อเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 ในอาหารที่มีอะไวเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

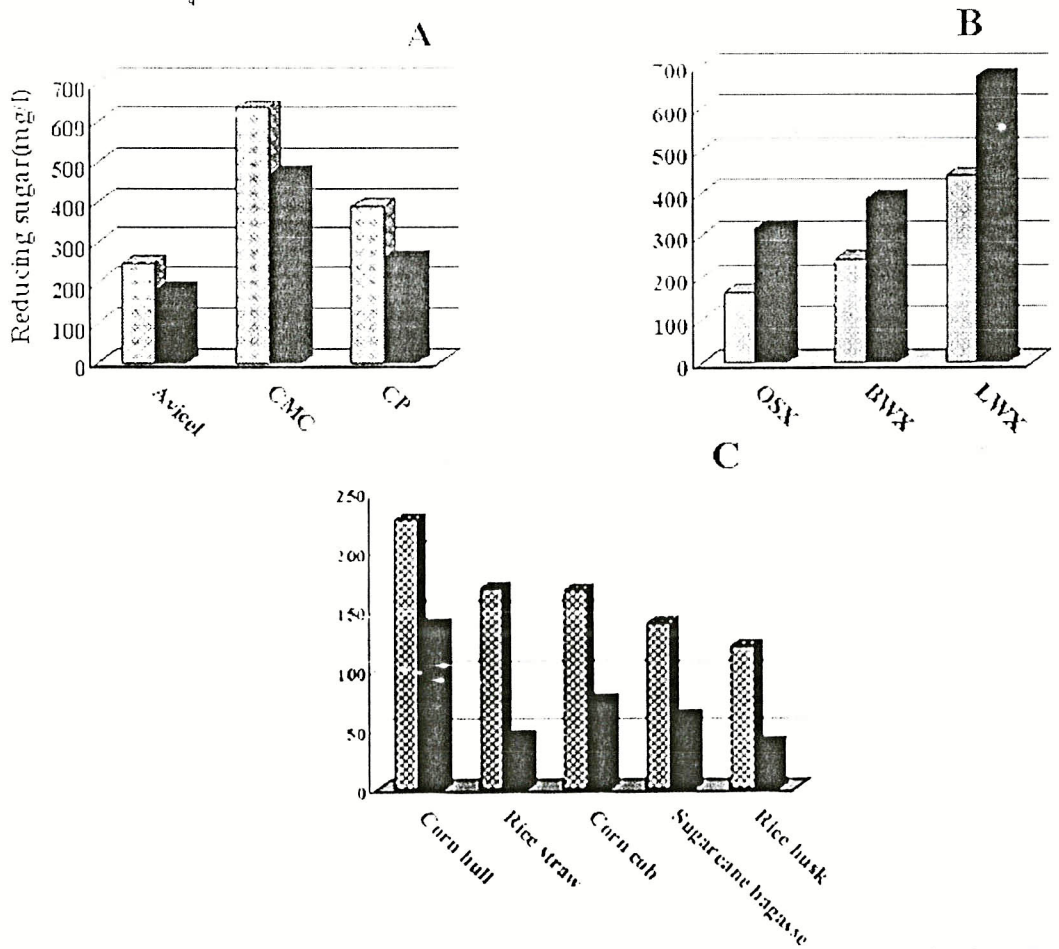
กิจกรรมของเอนไซม์	แหล่งของเอนไซม์	
(ยูนิท ต่อมิลลิกรรมโปรตีน)	น้ำเลี้ยง	กากตะกอนเซลล์
เซลลูโลไลติกเอนไซม์		
อะไวซิเลส	0.28	0.35
คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส	2.72	4.12
เบต้ากลูโคซิเดส	10.40	1.96
เอ็กโซเซลโลไบโอไฮโดรเลส	4.73	3.91
ไซลาโนไลติกเอนไซม์		
ไซลาเนส	4.40	1.47
เบต้าไซโลซิเดส	3.34	0.40
อะราบิโนฟูราโนซิเดส	1.02	0.30
อะซิติลเอสเทอเรส	4.22	1.96



6. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเซลลูโลส ไซแลน และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ

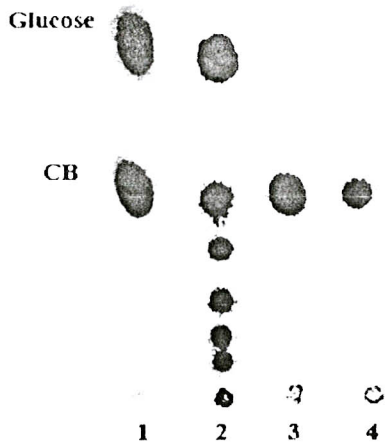
เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเศษวัสดุทางการเกษตรจึงทำการทดลองโดยนำเอนไซม์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-19 ที่เพาะเลี้ยงในอะไวเซลเป็นระยะเวลา 5 วัน ที่ 60 องศาเซลเซียส (5 mg protein) มาบ่มกับเศษวัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆ (1% w/v) โดยตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตน้ำตาลจากการย่อยเซลลูโลสบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์ในส่วนน้ำเลี้ยงและกากตะกอน พบว่าหลังบ่มเอนไซม์กับเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สามารถตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยเซลลูโลสชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 11A โดยเอนไซม์จากส่วนกากตะกอนสามารถผลิตน้ำตาลจากเซลลูโลสบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ได้มากกว่าเอนไซม์ในส่วนน้ำเลี้ยง เนื่องจากในส่วนกากตะกอนมีเซลลูโลไลติกเอนไซม์ชนิดเอ็นโดเซลลูเลสที่มีบทบาทสูงต่อการย่อยเซลลูโลสมากกว่าส่วนน้ำเลี้ยง และเอนไซม์ทั้งสองส่วนปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จาก CMC ได้มากกว่า CP และอะไวเซล ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเนื่องจาก CMC มีโครงสร้างที่จัดเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ ละลายน้ำได้ดี จึงสามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่าอะไวเซลและ CP ซึ่งมีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นผลึกที่อัดตัวกันแน่น จึงทำให้ย่อยได้ยาก (Waconukul และคณะ 2006) สำหรับการย่อยไซแลนบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ (รูปที่ 11B) พบว่าการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้

มากกว่ากากตะกอน โดยเอนไซม์ทั้งสองส่วนปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จาก LWX ได้มากกว่า BWX และ OSX ตามลำดับ โดย LWX และ BWX เป็นไซแลนจากไม้เนื้อแข็งซึ่งมีส่วนกิ่งก้านน้อยกว่า OSX ที่เป็นไซแลนจากไม้เนื้ออ่อน (Coughlan และ Hazlewood, 1993) ดังนั้นไซลาโนไลติกเอนไซม์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-19 น่าจะเหมาะสมต่อการย่อยไซแลนที่มีกิ่งก้านน้อย การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ได้แก่ เปลือกข้าวโพด (corn hull) ฟางข้าว (rice straw) เปลือกข้าวโพด(corn cop) แกลบ (bagasse) รำข้าว (rice bran) โดยเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงและกากตะกอน พบว่าเอนไซม์จากกากตะกอนสามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแล้วปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าเอนไซม์จากน้ำเลี้ยง (รูปที่ 11C) จากการทดลองพบว่าเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงและกากตะกอนสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกข้าวโพดได้มากกว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นๆ อาจเนื่องจากเปลือกข้าวโพดมีปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นๆ จึงทำให้เปลือกข้าวโพดถูกย่อยแล้วปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด นอกจากนี้พืชแต่ละชนิดมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน จึงทำให้ความสามารถในการย่อนเซลลูโลสและไซแลนที่เป็นองค์ประกอบในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-19 แตกต่างกันด้วย



รูปที่ 11 การผลิตน้ำตาลจากสับสเตรทชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์จากส่วนกากตะกอน (▨) และน้ำเลี้ยง (■) ของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 เมื่อ A คือสับสเตรทในกลุ่มเซลลูโลส B คือสับสเตรทในกลุ่มไซแลนและ C คือสับสเตรทในกลุ่มวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายสับเสตรทต่างๆ ด้วยเทคนิค TLC หลังจากบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท (0.1% W/V) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์แตกต่างกันตามชนิดของสับสเตรท ดังแสดงในรูปที่ 12 โดยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำจากเซลลูโลสพาวเดอร์ และอะไวเซล ถูกย่อยได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กได้แก่ น้ำตาลเซลโลไบโอส แต่ไม่ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุพันธุ์ของกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์แสดงว่าเอนไซม์เข้าไปย่อยแบบสุ่มภายในสายไม่ได้ ในขณะที่ คาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ (G_1-G_6) เนื่องจากเป็นสับสเตรทที่ละลายน้ำได้เอนไซม์จึงย่อยสลายได้ง่ายกว่าและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลายกว่า จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแม้โครงสร้างพื้นฐานของเซลลูโลสทุกชนิดเกิดจากโมเลกุลของกลูโคสเหมือนกัน แต่การเรียงตัวในรูปแบบโครงสร้างผลึกที่ไม่ละลายน้ำและโครงสร้างแบบหลวมที่ละลายน้ำได้ง่ายส่งผลให้ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเอนไซม์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำได้แสดงว่ามี carbohydrate-binding domain (CBM) เป็นองค์ประกอบซึ่งมีรายงานว่า CBM ทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์บริเวณผิวสัมผัสของสับสเตรทเพิ่มขึ้น จึงมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย (Bayer และคณะ, 1985; Millwaed-Sadler, 1994)



รูปที่ 7 Thin layer chromatography ของน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายสับสเตรทชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19

เมื่อ แถวที่ 1: กลูโคสและเซลโลไบโอส

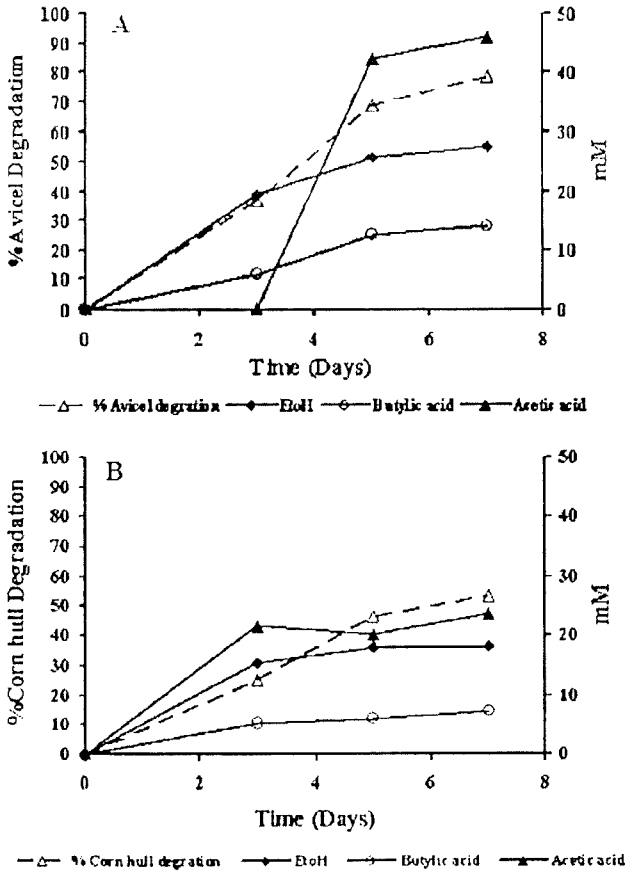
แถวที่ 2: ผลิตภัณฑ์จากการย่อยคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส

แถวที่ 3: ผลิตภัณฑ์จากการย่อยเซลลูโลสพาวเดอร์

แถวที่ 4: ผลิตภัณฑ์จากการย่อยอะไวเซล

7. ผลิตภัณฑ์จากการหมัก

จุลินทรีย์บางชนิด เช่น กลุ่ม Clostridium สามารถผลิตเอทานอลได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีพอลิแซ็กคาร์ด์เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งช่วยลดขั้นตอนในการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ให้เป็นน้ำตาล (saccharification) ก่อนเปลี่ยนเป็นเอทานอล (fermentation) จากการตรวจสอบเอทานอลและกรดอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 ในอาหารที่มีอะไวเซลและเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน พบว่า *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 ผลิตเอทานอล ออกมาร่วมกับกรดบิวทีริกและกรดแอซีติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (รูปที่ 13) โดยตรวจพบว่ามีอัตราการผลิตอย่างรวดเร็วในระยะ 3 วันแรกของการเจริญเติบโต โดยปริมาณเอทานอลมากที่สุดในวันที่ 7 เมื่อเพาะเลี้ยงในอะไวเซลคือ ตรวจพบเอทานอล 28 มิลลิโมลาร์ กรดบิวทีริก 16 มิลลิโมลาร์ และกรดแอซีติก 46 มิลลิโมลาร์ สูงกว่าที่พบเมื่อเลี้ยงในเปลือกขาวโพดซึ่งตรวจพบเอทานอล 19 มิลลิโมลาร์ กรดบิวทีริก 8 มิลลิโมลาร์ และกรดแอซีติก 25 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตามพบว่าสามารถประยุกต์ใช้เชื้อชนิดนี้ในการผลิตเอทานอลจากเปลือกข้าวโพดซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ นอกจากนี้ยังทำงานในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (60 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีข้อดีของการทำงานที่อุณหภูมิสูงคือลดการปนเปื้อนจองเชื้อชนิดอื่นและสามารถลดพลังงานในกระบวนการ evaporation เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลได้



รูปที่ 13 ผลิตภัณฑ์จากการหมักจาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 เมื่อเพาะเลี้ยงในอะไวเซล (A) และเปลือกข้าวโพด (B)