ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เอนไซม์เชิงซ้อนที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะปราศจากออกซิเจนและทนอุณหภูมิสูง มีบทบาทที่สำคัญต่อการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่ และโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ ซึ่งมีรายงานว่าไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ทางการแพทย์ เครื่องสำอาง และอาหาร นอกจากนั้นน้ำตาลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการผลิตสารให้ความหวานที่มีมูลค่าสูง เช่น น้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ และไซลิทอล กรดอินทรีย์ หรือนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ทดแทนการผลิตเอทานอลจากแป้งหรือกระบวนการทางเคมีที่มีต้นทุนในการผลิตสูงกว่า ยังสามารถช่วยลดผลภาวะสิ่งแวดล้อมที่จะเกิดขึ้นหลังจากขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวของวัตถุดิบทางการเกษตรเหล่านี้อีกด้วย และผลงานดังกล่าวสามารถเผยแพร่ในวารสารระดับประเทศและนานาชาติได้อีกด้วย

วิธีการดำเนินการวิจัย

แหล่งของจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ของห้องปฏิบัติการซึ่งเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศและอุณหภูมิสูงซึ่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสได้หลายชนิด และคัดแยกเชื้อเพิ่มเติมจากตัวอย่างดินและเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจาก สวน ทุ่งนา และโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายชีวมวลได้ดี โดยเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากแหล่งดินต่างๆ ใน basal medium (pH 7.0) ที่ประกอบไปด้วย (กรัม ต่อ ลิตร): KH_2PO_4, 1.5 กรัม; K_2HPO_4, 2.9 กรัม; urea, 2.1 กรัม, yeast extract, 4.5 กรัม และ Mineral salt solution ($MgCl_2 6H_2O$, 0.05 กรัม; $CaCl_2 2H_2O$, 0.0075กรัม และ $FeSO_4 6H_2O$, 0.000063 กรัม ในปริมาตร 1 ลิตร) ซึ่งมี 0.0004% resazurine เป็นตัวบ่งชี้ว่าปราศจากออกซิเจน และมีเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเตรียมอาหารเสร็จจะเป่าไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนก่อนทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน เชื้อที่สนใจพิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายกระดาษกรองและเซลลูโลส จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งและคัดแยกโคโลนีที่เจริญได้เร็วและย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี (Hungate, R. 1969)

ตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ด้วย 16S rRNA

สกัดดีเอ็นเอสายยาวจากโครโมโซมของแบคทีเรียโดยการทำให้ผนังเซลล์ของ *P. curdlanolyticus* B-6 แตกออกด้วย Lysozyme เพื่อปลดปล่อย DNA ออกมา จากนั้นแยกโปรตีนที่เกาะอยู่กับ DNA ออกและย่อยโปรตีนปนเปื้อนเหล่านั้นโดยเติมสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Proteinase K ตามลำดับ แยก DNA ออกโดยการสกัดด้วย phenol/chloroform (Sambrook และคณะ 1989) สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ EUB8f และ U1492r ซึ่งเป็น universal ไพร์เมอร์สำหรับหา 16S rRNA และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Licor model 4000L automated DNA Sequenced ตามวิธีของ Sanger และคณะ

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GENETYX เวอร์ชั่น 5.0 (Software Development Co. Ltd.) และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

ตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมี

ตรวจดูลักษณะรูปทรงของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการย้อยสีผนังเซลล์และย้อมสีสปอร์ (Garrity, 2001)

การเจริญของแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อใน Basal medium ที่มีน้ำตาลเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิระหว่าง 37 ถึง 70 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน โดยพิจารณาจากความขุ่นที่ลดลงเมื่อวัดที่ OD660 (Turbidity test) เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อลงไป

การผลิตเอนไซม์

ในการวิจัยครั้งนี้เอนไซม์ถูกผลิตขึ้นภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน ซึ่งการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นใช้ Basal medium เป็นแหล่งอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ และใช้เซลลูโลส 0.5 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน จุลินทรีย์ตั้งต้น (starter culture) ถูกถ่ายลงในอาหารที่เตรียมใน vial ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้ (supernatant) ใช้เป็น crude enzyme เก็บไว้ตรวจสอบกิจกรรมและคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ต่อไป

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

ตรวจสอบกิจกรรมของเซลลูเลสโดยการเติม crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย carboxymethyl cellulose (CMC) ร้อยละ 1.0 ใน 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยวิธีของ Somogyi (1952) โดยใช้ D-glucose ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน ส่วนการตรวจสอบกิจกรรมไซลาเนสมีขั้นตอนการวิเคราะห์และสภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมของเซลลูเลส แต่ใช้ oat spelt xylan เป็นสับสเตรทแทน CMC และใช้ D-xylose ในการเตรียมกราฟมาตรฐานแทน D-glucose

1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ไซลาเนส และเซลลูเลส หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส และกลูโคส ตามลำดับ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

ตรวจสอบกิจกรรมของเบต้าไซโลซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลส และเบต้ากลูโคซิเดส ด้วยวิธีของ Kyu และคณะ (1994) และ Kohring และคณะ (1990) (เอนไซม์แต่ละชนิดใช้ *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, *p*-nitrophenyl-β-D-cellobioside และ *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นซับสเตรต ตามลำดับ) ตรวจหาปริมาณ *p*-nitrophenol (Sigma-Aldrich Inc.) ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ตรวจสอบกิจกรรมของอะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะเซทิลเอสเตอเรส โดยวิธีของ Mockenzie และ Bilous (1988) โดยใช้ *p*-nitrophenyl-β-D-arabinofuranoside และ *p*-nitrophenyl acetate (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นซับสเตรต ตามลำดับ ตรวจหาปริมาณ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลส เบต้ากลูโคซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะเซทิลเอสเตอเรส 1 ยูนิต (U) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิต *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดสอบ

การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์โดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) และใช้สารละลาย bovine serum albumin ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน ส่วนปริมาณโปรตีนที่ได้จากการชะคอลัมน์ต่างๆ ใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ

ชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ (ไซแลน เซลลูโลส และเศษพืช) 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และปั่นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น แยกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำออกด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความ เร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปปรับพีเอชให้เป็น 7 ด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะได้ตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำ นำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงในตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำที่แยกได้จากข้อ 4. จากนั้นปรับพีเอชให้เป็น 7 ด้วยกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ กรองพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และล้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ ด้วยน้ำกลั่นจนกว่าส่วนของสารละลายใส จากนั้นนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer

การตรวจสอบการยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ

ใช้วิธีการทดลองตามวิธีของ Ratanakhanokchai และคณะ (1999) โดยนำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร บ่มกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ 0.25 กรัม ที่แช่ใน acetate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาทีโดยเขย่าเป็นครั้งคราว ปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที สารละลายส่วนใส (unbound) นำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น

Gel electrophoresis และ active-PAGE

SDS-PAGE ใช้วิธีการของ Laemmli (1970) โดยต้มตัวอย่างโปรตีนใน SDS ร้อยละ 2 (W/V), 2-mercaptoethanol ร้อยละ 5 (V/V), glycerol ร้อยละ 10 (V/V) และ Tris-HCl 15 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 6.8) นาน 3 นาที โดยใช้ stacking และ separating gel ที่ประกอบด้วย polyacrylamide ร้อยละ 5 และ 12 ตามลำดับ และใช้โปรตีนมาตรฐานต่างๆ (prestained low molecular weights calibration kit, control no. 89694) จากบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา ภายหลังจากที่ electrophoresis เสร็จแล้ว นำเจลไปย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

active-PAGE ใช้วิธีการของ Nakamura และคณะ (1993) โดยใช้ polyacrylamide ร้อยละ 12 ที่ประกอบด้วย oat spelt xylan ที่ละลายน้ำร้อยละ 0.1 ภายหลังจากที่ electrophoresis เสร็จ โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับ SDS-PAGE นำเจลไปล้างด้วย isoprepanol ร้อยละ 25 (V/V) โดยเขย่าเบาๆเพื่อล้าง SDS ออก และ renature โปรตีนที่ติดบนเจล หลังจากนั้นล้างเจล 4 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเจลไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสารละลาย Congo red ร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์จนกระทั่ง excess dry ถูกชะออกจาก active band จนหมด เมื่อเติมกรดอะซิติกร้อยละ 0.5 ลงไปจะเกิด zymogram ที่เป็นแถบใสของ active xylanase ส่วน background จะปรากฏสีม่วงน้ำเงิน

ผลของพีเอชต่อการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์

ตรวจสอบผลของพีเอชต่อการทำงานของ crude enzyme โดยใช้วิธีการเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมไซลาเนส แต่ผสมไซแลนใน 100 มิลลิโมลาร์ของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่มีค่าพีเอช ระหว่าง 5.0-11.0 ซึ่งประกอบด้วยซิตริกบัฟเฟอร์ (พีเอช 5.0-6.0) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0-7.0) Tris-HCl บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.0-9.0) และคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (พีเอช 9.0-11.0) ส่วนการตรวจสอบเสถียรภาพของ crude enzyme ทำการทดลองโดยบ่มเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชระหว่าง 5.0-11.0 เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตรวจวัดกิจกรรมที่เหลืออยู่ตามวิธีการข้างต้น และเปรียบเทียบกับ กิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงสุด (คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์)

ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์

การตรวจสอบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude enzyme ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมไซลาเนส โดยนำเอนไซม์บ่มกับไซแลนใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 ระหว่างอุณหภูมิ 40 ถึง 90 องศาเซลเซียส ส่วนเสถียรภาพของ crude enzyme ทำการทดสอบโดยบ่มเอนไซม์กับ Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่เหลืออยู่ตามวิธีการข้างต้น และเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงสุด (คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์)

การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด และรำข้าว ถูกนำมาปั่นให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ และร่อนผ่านตระแกรงขนาด 40 mesh ล้างน้ำตาลที่ปนอยู่ออกให้หมด ด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง และทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นบ่มวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ร้อยละ 0.5 (น้ำหนักแห้ง/ปริมาตร) ใน 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 9.0 กับ crude enzyme ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีของ Somogyi-Nelson

การตรวจสอบชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาล

การตรวจสอบหาชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography โดยการใช้ Silica gel 60 F 254 (Merck art. No.1.05554 ขนาด 20x20 เซนติเมตร) และ solvent system ที่ประกอบด้วย isopropanol-acetone-lactic acid 0.1 โมลาร์ (4:2:2) ตรวจสอบ sugar spot โดยการ spray ด้วย reagent ที่ประกอบด้วย aniline-α-diphenylamine-acetone-80% H_3PO_4 (4 มิลลิลิตร: 4 กรัม: 200 มิลลิลิตร: 30 มิลลิลิตร) (Ratanakhanokchai และคณะ, 1992) โดยใช้ D-glucose, maltose, D-xylose และ D-xylobiose เป็นน้ำตาลมาตรฐานในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย ส่วนการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิค HPLC ทำได้โดยการใช้คอลัมม์ Shodex Ionpak KS-800P (strong cation-exchange resin gels) และใช้ refractive index detector ในการตรวจวิเคราะห์ที่อุณภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ของ mobile phase โดยมีน้ำตาลดังที่กล่าวมาข้างต้นเป็นน้ำตาลมาตรฐาน

การหมักเปลือกเศษวัสดุทางการเกษตรด้วยจุลินทรีย์

โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ตั้งต้น (starter culture) ใน basal medium ที่มีใช้เซลลูโลสและเปลือกข้าวโพดร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่เตรียมใน vial ขนาด 50 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000