สรุปผลการทดลอง

สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในประเทศไทยใน basal medium ที่พีเอช 7 อุณหภูมิสูง 60°C ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน โดยใช้อะไวเซลเป็นแหล่งคาร์บอน ) พบว่าแบคทีเรียตัวอย่าง NOI-19 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายอะไวเซลสูง ผลการตรวจสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาแสดงให้เห็นว่า มีลักษณะเป็นแท่ง สร้างสปอร์ และเป็นแกรมบวก การจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ด้วย 16s rRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-19 ใกล้เคียงกับ 97% แบคทีเรียในจีนัส *Thermoanaerobacterium* sp. แต่น่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่เนื่องจากเจริญเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นในกลุ่ม *Thermoanaerobacterium*

เมื่อตรวจสอบชนิดของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาสามารถตรวจพบไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและกากตะกอน โดยในระยะแรกของการเจริญเติบโตสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไวเซลเลส เซลลูเลสและไซลาเนสในกากตะกอนเซลล์มากกว่าในน้ำเลี้ยงหลังจากนั้น 5 วัน ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติกหลายชนิดในน้ำเลี้ยงและกากตะกอน โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่พบในส่วนน้ำเลี้ยงมีมากกว่าในกากตะกอน ยกเว้นเอ็นโดเซลลูเลส (อะไวซิเลส และคาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส) ซึ่งพบในส่วนกากตะกอนมากกว่าในส่วนน้ำเลี้ยง แบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-19 สามารถผลิตโปรตีน 19 ชนิด เมื่อทดสอบด้วย SDS-PAGE ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสอย่างน้อย 7 ชนิด ขนาด 65 ถึง 150 kDa และไซลาเนสอย่างน้อย 5 ชนิด ขนาด 70 ถึง 200 kDa เมื่อทดสอบด้วย active-PAGE เอนไซม์จากกากตะกอนสามารถย่อยเซลลูโลสและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้มากกว่าเอนไซม์จากน้ำเลี้ยง แต่ในทางกลับกันเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงย่อยไซแลนได้ดีกว่าเอนไซม์จากกากตะกอน จากการศึกษาการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้แก่ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว ชานอ้อย และแกลบด้วยเอนไซม์จากกากตะกอน พบว่าเปลือกข้าวโพดถูกย่อยได้ดีที่สุดและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด (227 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยกลูโคสและเซลลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทุกชนิด

เมื่อตรวจวัดผลิตภัณฑ์จากการหมักของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสพบว่าสามารถหมักเซลลูโลสในรูปแบบที่เป็นผลึก (อะไวเซล) และเศษวัสดุทางการเกษตร (เปลือกข้าวโพด) เป็นเอทานอลในขั้นตอนเดียว

เอกสารอ้างอิง


1) Bayer, E.A., Shimon, L.J., Shoham, Y., and Lamed, R., Cellulosomes - structure and ultrastructure. *J. Struct. Biol.*, 124, 221–234 (1998).

2) Beguin P, and Aubert JP., The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13, 25–58 (1994).

3) Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P., β-1,4 D-xylan degrading enzyme system : biochemistry, molecular biology and applications, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17, 259-289. (1993).

4) Coughlan MP, and Mayer F., The cellulose-decomposing bacteria and their enzyme system., In "The Prokaryotes", Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W. and Schleifer K-H, eds., 2nd ed., vol. 1.Springer-Verlag, New York., pp. 460–516 (1992).

5) Demain, A. L., M. Newcomb, and J. H. D. Wu. Cellulase, Clostridium, and Ethanol. *Microbiol. Mol Biol Rev.* 69:124-154 (2005).

6) Doi, R.H., Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru,Y., and Han, S. O., Cellulosomes from mesophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, 185, 5907–5914 (2003).

7) Doi, R.H. and Kosugi, A., Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat. Rev. Microb.*, 2, 541-551. (2004)

8) Egelseer, E., I. Schocher, M. Sa'ra, and Sleytr U. B., The S-layer from *Bacillus stearothermophilus* DSM 2358 functions as an adhesion site for a high-molecular-weight amylase. *J. Bacteriol.*, 177, 1444–1451 (1995).

9) Felix CR, and Ljungdahl LG., The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium. Ann. Rev. Microbiol*, 47, 791– 819 (1993).

10) Garrity, G., Endospore-forming gram-positive rods and cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer.*, 2, 1104—1207 (2001).

11) Henrissat, B. and Bairoch, A. Updating the sequence – based classification of glycosyl hydrolases, *Biochemical Journal*, 326, 695-696. (1996)

12) Henrissat, B. and Coutinho, P.M., Classification of glycoside hydrolases and glycosyls transferases from hyperthermophiles, *Methods in Enzymology*, 330, 183-201.(2001).

13) Hoster F., Daniel R., and Gottschalk G., Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 47, 187–192 (2001).

14) Hungate, R.E., A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, *Meth. Microb.,* 1.3, 117–131. (1969).

15) Karita, S., Sakka, K., and Ohmiya, K., Cellulose-binding domains confer an enhanced activity against insoluble cellulose to *ruminococcus albus* endoglucanase iv. *J. Ferment. Bioeng.,* 81, 553–556 (1996).

16) Kosugi, A., Murashima, K. and Doi, R.H. Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: expression of xylanase activity dependent on growth substrates. *J. Bacteriol.*, 183, 7037-7043. (2001).

17) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680—685 (1970).

18) Lama, L., Calandrelli, V., Gambacorta, A. and Nicolaus, B., Purification and characterization of thermostable xylanase and β-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*, *Resear. Microbiol*, 1-7. (2004).

19) Lamed R, and Bayer EA., Cellulose degradation by thermophilic anaerobic bacteria., In "Biosynthesis and biodegradation of cellulose"., Haigler, C. H. and Weimer, P. J. eds., M. Dekker, Inc., New York., pp.377–410 (1991).

20) Lamed, R., Setter, E., and Bayer, E.A., Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in clostridium thermocellum. *J. Bacteriol*, 156, 828–836 (1983).

21) Lee, Y.-E., S. E. Lowe, and Zeikus J. G., Gene cloning, sequencing, and biochemical characterization of endoxylanase from Thermoanaerobacterium saccharolyticum B6A-RI. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3134–3137 (1993a).

22) Lee, Y., M. K. Jain, C. Lee, S. E. Lowe, and J. G. Zeikus., Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostndium thermosulfurogenes*, and *C. thermohydrosulfurncum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thennoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 41–51 (1993b).

23) Lowry, O.H., Roasebrough, N.J., Fan, A.L. and Randail, R.S., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275. (1951).

24) Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:506-577. (2002)

25) McKan's L. and Kendel, J., Microbiology (Essentials and Application), McGraw Hill Publicher, (1996)

26) Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Auno, R. and Horikoshi, K., Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1, *Appl. Environ Microbiol.*, 59, 2311-2316. (1993)

27) Paul H.S.R. ChistopherH.S., Roy M.D., and Hugh W.M., Comparison of cellulolytic activity in *C.thermocellum* and three thermoplilic cellulolytic anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 12–17 (1986).

28) Pason, P., Kyu, K. L., and Ratanakhanokchai, K., *Peanibacillus curdlanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2483—2490 (2006).

29) Ponpium1P., Ratanakhanokchai K., and Kyu K.L., Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1. *Enzyme Microb Technol.*, 26, 459–465 (2000).

30) Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., and Tanticharroen, M., Purification and properties of xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *bacillus* sp. K-1. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 694–697 (1999).

31) Reese, E.T., Sui, R.G.H. and Levinson, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacterio*, 59, 485-497 (1950).

32) Rixon, J.E., Clarke, J.H., Hazelwood, G.P., Hoyland, R.W., McCarty, A.J. and Gilbert, H.J., Do the non-catalytic polysaccharide-binding domains and linker regions enhance the biobleaching properties of modular xylanases, *Appl. Microbiol. Biotechnol*,. 46, 514-520. (1996).

33) Schwarz, W. H., The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol,* 56, 634–649 (2001).

34) Shao W. and Wiegel J. , Purification and Characterization of Two Thermostable Acetyl Xylan Esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485. *Appl. Environ. Microbiol*, 61, 729–733 (1995).

35) Shoham, Y., Lamed, R. and Bayer, E.A., The cellulosome concept as an efficient microbial stratergy for the degradation of insoluble polysaccharides, *Trend in Microb*, 7, 275-281 (1999).

36) Somogyi, M., Notes in sugar determination", *J. Biol. Chem.,* 195, 19-23. (1952).

37) Sunna, A. and Antranikian, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 36-67. (1997).

38) Teeri, T.T., Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolase, *Trend. Biotechnol*, 15, 160-167. (1997)

39) Tomme, P., Warren, R.A., Miller, R.C., Kilburn, D.G., and Gilkes, N.R., Cellulose-binding domains - classification and properties in the enzymaztic degradation of insoluble polysaccharides. *American Chemical Society, Washington*, pp.142–161 (1995).

40) Thomas K. Ng. and Zeikus J.G., Comparison of Extracellular Cellulase Activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl Environ Microbiol.*, 42, 231–240 (1981).

41) Yaser R., Ehab R., Khaled M., and Walid A., Application of factorial designs for optimization of avicelase by a thermoplilic *Geobacillus* isolate. *J. Microbiol*, 2, 13–23 (2007).

42) Weimer, P. J., and Zeikus, J. G., Fermentation of cellulose and cellobiose by Clostridium thermocellum in the absence and presence of Methanobacterium thermoautotrophicum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 289–297 (1977).

43) Wiegel, J. The obligately anaerobic thermophilic bacteria., "Thermophilic bacteria"., In J. K. Kristjansson (ed.) CRC Press, London. p. 105-184. (1992).

44) Wood TM, and Bhat KM., Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol*, 160, 87–117 (1988).

45) Wu JHD, Orme–Johnson WH, and Demain AL., Two components of an extracellular protein aggregate of *Clostridium thermocellum* together degrade crystalline cellulose. *Biochemistry*, 27, 1703–1709 (1988).

**ผลงานตีพิมพ์**

Chimtong S., Soontorngun, N., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Kyu, K. L. and Ratanakhanokchai, K. (2009) Sugar Production from agricultural residues by xylanolytic-cellulolytic enzyme from *Thermoanaerobacterium* sp. strain. NOI-19, Agricultural Science Journal, 40, 1 (Suppl.), 373-376.

# การผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19

# Sugar Production from Agricultural Residues by Xylanolytic-Cellulolytic Enzyme from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain NOI-19

สุภาวดี ฉิมทอง[1] นิษก์นิภา สุนทรกุล[1] จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ[2] ภัทรา ผาสอน[2] คิน เลย์ คู[1] และ กนก รัตนะกนกชัย[1]

Chimtong, S.[1], Soontorngun, N.[1], Tachaapaikoon, C.[2], Pason, P.[2], Kyu, K. L.[1] and Ratanakhanokchai, K.[1]

## Abstarct

*Thermoanaerobacterium* sp. strain NOI-19 isolated from a soil sample in Thailand was grown in basal medium containing Avicel as a carbon source at pH 7 and 60 °C under anaerobic condition. Xylanolytic-cellulolytic enzyme was found both in the supernatant and in the pellet-bound proteins. The hydrolysis of cellulose and agricultural residues by the pellet-bound enzyme was higher than that of the extracellular enzyme. In contrast, the extracellular enzyme hydrolyzed xylan better than the pellet-bound enzyme. The hydrolysis of agricultural residues such as corn hull, rice straw, corn cob, sugarcane bagasse and rice husk by the pellet-bound enzyme was studied. The result showed that the highest amount of reducing sugar (227 mg/l) was released from corn hull. The enzymatic products from all agricultural residues were glucose and cellobiose.

Keywords : agricultural residue, sugar, *Thermoanaerobacterium* sp., xylanolytic-cellulolytic enzyme

## บทคัดย่อ

*Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทย เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-19 ใน basal medium ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 60°C ในสภาวะไร้จากออกซิเจน โดยใช้อะไวเซลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและกากตะกอน เอนไซม์จากกากตะกอนสามารถย่อยเซลลูโลสและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้มากกว่าเอนไซม์จากน้ำเลี้ยง แต่ในทางกลับกันเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงย่อยไซแลนได้ดีกว่าเอนไซม์จากกากตะกอน จากการศึกษาการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และแกลบด้วยเอนไซม์จากกากตะกอน พบว่าเปลือกข้าวโพดถูกย่อยได้ดีที่สุดและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด (227 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยกลูโคสและเซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทุกชนิด

**คำสำคัญ** : วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร น้ำตาล *Thermoanaerobacterium* sp. เอนไซม์ไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติก

## คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก และมีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรไปประยุกต์ใช้ด้านต่างๆ เช่น อาหารเลี้ยงสัตว์ สิ่งประดิษฐ์ ปุ๋ย เพื่อเพิ่มมูลค่า และลดปัญหาในการกำจัดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร นอกจากนี้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรยังสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่ หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์พืชของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ด้วยเซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติกเอนไซม์ (Pason *et al.*, 2006) ซึ่งมีรายงานการนำน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง (Moure *et al.*, 2006) ส่วนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดอินทรีย์ ไซลิทอล (Millati *et al.*, 2005) และเอทานอล (Doi *et al.*, 2003) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยใช้เซลลูโลไลติกและไซลาโนไลติกเอนไซม์จาก *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19

[1]คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

[1] School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkuntein, Bangkok 10150

[2]สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

[2] Pilot Plant Development and Training Institute, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkuntein, Bangkok 10150

## อุปกรณ์และวิธีการ

เพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 ที่คัดแยกจากดินบริเวณโรงเพาะเห็ดฟางในจังหวัดนครปฐมโดยใช้ Basal medium ซึ่งประกอบด้วย $K_2HPO_4$ ร้อยละ 0.15 $KH_2PO_4$ ร้อยละ 0.29 urea ร้อยละ 0.21 yeast extract ร้อยละ 0.45 mineral solution ($MgCl_2.6H_2O$ ร้อยละ 25 $CaCl_2.2H_2O$ ร้อยละ 3.75 $FeSO_4.6H_2O$ ร้อยละ 0.03) ร้อยละ 0.02 resazurin ร้อยละ 0.0025 cystein ร้อยละ 0.05 และมีอะไวเซลร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 60°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นปั่นแยกกากตะกอนออกจากส่วนน้ำเลี้ยง ด้วยความเร็ว 8,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C เก็บส่วนน้ำเลี้ยงไว้ ส่วนกากตะกอนนำมาล้างด้วยสารละลาย phosphate-buffer saline (sodium choride 0.15 โมลาร์ ใน potassium phosphate buffer 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0) แล้วชะโปรตีนที่เกาะอยู่กับกากตะกอนออก (pellet-bound protein) ด้วย triethylamine ร้อยละ 2 ตามวิธีของ Lee *et al.* (2006) จากนั้นตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส อะไวซิเลส เบต้ากลูโคซิเดส เบต้าไซโลซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะซิติลเอสเทอเรส ตามวิธีของ Pason *et al.* (2006) โดย 1 ยูนิต (U) ของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ให้ผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ ศึกษาการย่อยไซแลนชนิดต่างๆ จาก birchwood (BWX) larchwood (LWX) และ oat spelt (OSX) โดยบ่มเอนไซม์ไซลาเนส 1.0 U กับสับสเตรทร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Somogyi (1952) ส่วนการย่อยเซลลูโลส (คาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลส (CMC) อะไวเซล และเซลลูโลสพาวเดอร์ (CP)) และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ฟางข้าว ชานอ้อย แกลบ เปลือกข้าวโพด และซังข้าวโพด) ทำเช่นเดียวกับการย่อยไซแลน แต่บ่มเซลลูโลสและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร นาน 4 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค thin layer chromatography (Pason *et al.*, 2006)

## ผลและวิจารณ์

เมื่อเพาะเลี้ยง *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 ในอาหารที่มีอะไวเซลเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนและอุณหภูมิสูง 60°C เป็นเวลา 5 วัน สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ อะไวซิเลส คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส เบต้ากลูโคซิเดส และเซลโลไบโอไฮโดรเลส และเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก ได้แก่ ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะซิติลเอสเทอเรส ทั้งส่วนน้ำเลี้ยงและกากตะกอน (Table 1) โดยเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกในส่วนน้ำเลี้ยงมีมากกว่าในส่วนกากตะกอน ส่วนเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกพบเอ็นโดเซลลูเลส (อะไวซิเลส และคาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส) ในส่วนกากตะกอนมากกว่าในส่วนน้ำเลี้ยง ขณะที่เอ็กโซเซลลูเลส (เบต้ากลูโคซิเดส และเซลโลไบโอไฮโดรเลส) พบในส่วนน้ำเลี้ยงเป็นส่วนใหญ่

เมื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตน้ำตาลโดยการย่อยเซลลูโลสบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์ในส่วนน้ำเลี้ยงและกากตะกอน พบว่าหลังบ่มเอนไซม์กับเซลลูโลสที่อุณภูมิ 60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สามารถตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากการย่อยเซลลูโลสชนิดต่างๆ ดังแสดงใน Figure 1A โดยเอนไซม์จากส่วนกากตะกอนสามารถผลิตน้ำตาลจากเซลลูโลสบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ได้มากกว่าเอนไซม์ในส่วนน้ำเลี้ยง เนื่องจากในส่วนกากตะกอนมีเซลลูโลไลติกเอนไซม์ชนิดเอ็นโดเซลลูเลสที่มีบทบาทสูงต่อการย่อยเซลลูโลสมากกว่าส่วนน้ำเลี้ยง และเอนไซม์ทั้งสองส่วนปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จาก CMC ได้มากกว่า CP และอะไวเซล ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเนื่องจาก CMC มีโครงสร้างที่จัดเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ ละลายน้ำได้ดี จึงสามารถย่อยได้ง่ายกว่าอะไวเซล และ CP ซึ่งมีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นผลึกที่อัดตัวกันแน่น จึงทำให้ย่อยได้ยากซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของรัตติยา (2546)

Figure 1B แสดงผลการย่อยไซแลนบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ พบว่าการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าเอนไซม์จากกากตะกอน โดยเอนไซม์ทั้งสองส่วนปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จาก LWX ได้มากกว่า BWX และ OSX ตามลำดับ โดย LWX และ BWX เป็นไซแลนจากไม้เนื้อแข็งซึ่งมีส่วนกิ่งก้านน้อยกว่า OSX ที่เป็นไซแลนจากไม้เนื้ออ่อน (Coughlan และ Hazlewood, 1993) ดังนั้นไซลาโนไลติกเอนไซม์จากแบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-19 น่าจะเหมาะสมต่อการย่อยไซแลนที่มีกิ่งก้านน้อย

Table 1 กิจกรรมของเอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยง (extracellular) และกากตะกอน (pellet-bound protein) เมื่อ เพาะเลี้ยง *Thermoanaerobaterium* sp. strain NOI-19 ในอาหารที่มีอะไวเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

| Specific Activity (U/mg Protein) | Source of enzyme | |
|---|---|---|
| | Extracellular | Pellet-bound |
| *Cellulolytic enzyme* | | |
| Avicelase | 0.28 | 0.35 |
| CMCase | 2.72 | 4.12 |
| β-Glucosidase | 10.40 | 1.96 |
| Cellobiohydrolase | 4.73 | 3.91 |
| *Xylanolytic enzyme* | | |
| Xylanase | 4.40 | 1.47 |
| β-Xylosidase | 3.34 | 0.40 |
| Arabinofuranosidase | 1.02 | 0.30 |
| Acetyl esterase | 4.22 | 1.96 |

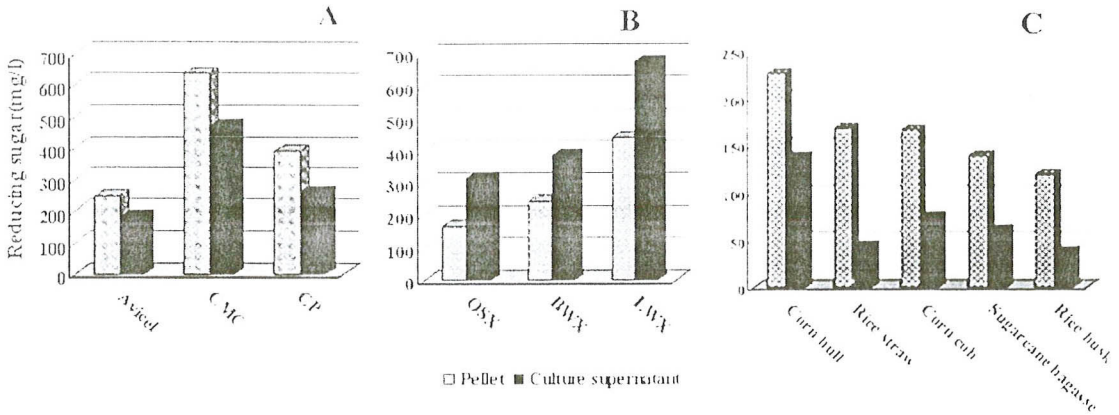


Figure 1 การผลิตน้ำตาลจากสับสเตรทชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์จากส่วนกากตะกอนและน้ำเลี้ยงของ *Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 (A: เซลลูโลส, B: ไซแลน, C: วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร)

การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ โดยเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงและกากตะกอน พบว่าเอนไซม์จากกากตะกอนสามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแล้วปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าเอนไซม์จากน้ำเลี้ยง (Figure 1C) จากการทดลองพบว่าเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงและกากตะกอนสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกข้าวโพดได้มากกว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นๆ อาจเนื่องจากในเปลือกข้าวโพดมีปริมาณของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นๆ (Tachaapaikoon *et al.*, 2006) จึงทำให้เปลือกข้าวโพดถูกย่อยแล้วปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด นอกจากนี้พืชแต่ละชนิดมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน (Kuhad, 1993) จึงทำให้ความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและไซแลนที่เป็นองค์ประกอบในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ NOI-19 แตกต่างกันด้วย

จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายสับสเตรทต่างๆ ด้วยเทคนิค TLC พบว่าหลังการย่อยเซลลูโลสและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส ยกเว้นคาร์บอกซีเมททิลเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ ($G_1$-$G_6$) ส่วนการย่อยไซแลนทั้ง 3 ชนิดได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ($X_1$-$X_5$) (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

## สรุป

*Thermoanaerobacterium* sp. สายพันธุ์ NOI-19 สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติก ได้แก่ อะไวซิเลส คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลส เบต้ากลูโคซิเดส และเซลโลไบโอไฮโดรเลส และเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติก ได้แก่ ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะซิติลเอสเทอเรส สามารถย่อยเซลลูโลสและไซแลนบริสุทธิ์ และเซลลูโลสและไซแลนที่เป็นองค์ประกอบในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ได้ และเปลือกข้าวโพดถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก

การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ เป็นน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต่อไปได้

## คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินหมวดเงินอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2552-2553 ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

## เอกสารอ้างอิง

รัตติยา แววนุกูล. 2546. การศึกษาเซลลูโลโซมจาก *Bacillus circulans* B6. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

Coughlan, M.P. and G.P. Hazlewood. 1993. β-1,4 D-Xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. Biotechnology and Applied Biochemistry. 17: 259-289.

Doi, R.H., A. Kosugi, K. Murashima, Y. Tamaru and S.O. Han. 2003. Cellulosome from mesophilic bacteria. Journal of Bacteriology. 185: 5907-5917.

Kuhad, R.C. 1993. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. Critical Reviews in Biotechnology. 13:151-172.

Lee, Y.S., K. Ratanakhanokchai, W. Piyatheerawong, K.L. Kyu, M. Rho, Y.S. Kim, A. Om, J.W. Lee., G.H. Chon, H. Park and J. Kang. 2006. Production and location of xylanolytic enzymes in alkaliphilic *Bacillus* sp. K-1. Journal of Microbiology and Biotechnology. 16: 921-926

Millati, R., L. Edebo and M.J. Taherzadeh. 2005. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. Enzyme and Microbial Technology. 36: 294-300.

Moure, A., P. Gullon, H. Dominguez and J.C. Parajo. 2006. Advances in the manufacture, purification and application of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. Process Biochemisstry. 41: 1913-1923.

Pason, P., K.L. Kyu and K. Ratanakhanokchai. 2006. *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. Appliedand Environmental Microbiology. 72 :2483-2490.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry. 195: 19-23.

Tachaapaikoon, C., K.L. Kyu and K. Ratanakhanokchai. 2006. Purification of Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. K-8 by Using Corn Husk Column. Process Biochemistry. 41:2441-2445.