ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ	เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน

Optimization for Carboxymethylcellulase Production by Thermophilic Bacteria from Soil

นามผู้วิจัย นางสาวมูรนีย์ บริบูรณ์สุข

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน

Optimization for Carboxymethylcellulase Production by Thermophilic Bacteria from Soil

โดย

นางสาวมูรนีย์ บริบูรณ์สุข

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข 2557: การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D. 97 หน้า

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดย *Thermobifida fusca* PA 1-1 ได้แก่ ซังข้าวโพด ฟางข้าว ขุยมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และขี้เลื่อย ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์สูงสุด รองลงมาเป็นซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ขี้เลื่อย และขุยมะพร้าว ตามลำดับ โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 0.975 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าพีเอชของน้ำหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 6.99-7.12 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ได้แก่ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดยีสต์ สารสกัดมอลต์ และยีสต์ขนมปัง ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าการใช้สารสกัดยีสต์ให้ผลการผลิตเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือ ยีสต์ขนมปัง เปปโตน สารสกัดมอลต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 1.294 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่ระหว่าง 6.99–7.1 แต่เนื่องจากสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาสูง จึงเลือกใช้ยีสต์ขนมปังซึ่งมีราคาถูกเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อไป การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยวิธีหาพื้นผิวแบบตอบสนองประกอบด้วย 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พบว่าจากโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สมการกำลังสองที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) 0.903 ($p < 0.05$) สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 1.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

_____ _____ ___ / __ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Muranee Boriboonsook 2014: Optimization for Carboxymethylcellulase Production by Thermophilic Bacteria from Soil. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Mangkorn Rodprapakorn, Ph.D. 97 pages.

The effect of carbon sources from agricultural wastes including rice straw, coconut husk, corn peel, corncob and sawdust at 1% (w/v). for Carboxymethylcellulase (CMCase) production of *Thermobifida fusca* PA 1-1 was investigated. In this study, pretreated rice straw induced the highest CMCase activity, next below were corncob, corn peel, sawdust and coconut husk, respectively. The highest CMCase activity of 0.975 U/ml. was released on 5th day at pH 6.99-7.12 by induction of pretreated rice straw. The effect of nitrogen sources including peptone, ammonium sulphate, yeast extract, malt extract and baker's yeast for CMCase production of *T. fusca* PA 1-1 was investigated. Yeast extract showed the highest CMCase activity, next below are baker's yeast, peptone, malt extract and ammonium sulphate, respectively. The highest CMCase activity of 1.294 U/ml was released on 5th day at pH 6.99-7.12 by using yeast extract as nitrogen source. However, price of yeast extract is expensive. Therefore, the cheaper baker's yeast was selected to be used as nitrogen source. The optimization of CMCase production was studied using the response surface methodology with carbon source and nitrogen source. It was found that the most significant factors influencing enzyme production were both carbon source and nitrogen source ($p < 0.05$). The second order polynomial regression model was obtained with an R^2 of 0.903($p < 0.05$). From the result of the optimization, maximum CMCase activity at 1 U/ml was achieved at carbon source 1.75 % (w/v). and nitrogen source 2 % (w/v). To confirm the applicability of the model, *T. fusca* PA 1-1 was cultured at this condition in a shaking flask. And the highest CMCase activities was measured at 1.41 U/ml.

_____ _____ __ / __ / __

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. มังกร โรจน์ประภากร ประธานกรรมการที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและสนับสนุนในการเรียน รวมทั้งการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด กราบขอบพระคุณ รศ. ดร. วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย กรรมการวิชาเอก และ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และ รศ. ดร. วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับความช่วยเหลือจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์

ขอบคุณทุกกำลังใจ คำปรึกษา คำแนะนำ น้ำใจ แง่คิดดีๆ และความช่วยเหลือที่ดีมากตลอดมา จากพี่ตาล พี่นก พี่อุ้ม ก้อย ยา Kurosawa Tomonori เอ็มมี่ เหมือง พี่อีฟ พี่ฝ้าย พี่ภา พี่หลี ตุ้ย ปุ๊ก แจน พี่วิทย์ พี่เจมส์ นุ่น พิม แพร แคร์ เบน พี่ดา พี่ก้อย พี่แก้ว พี่สร้อย พี่กานต์ พี่ส้ม พี่แจ๊ม พี่สาวนิยัม โต๊ะดา และพี่ ๆ เพื่อนๆ และน้อง ๆ ที่มิได้กล่าวไว้ในที่นี้ ที่มีให้ตลอดมา ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีอุปสรรคบ้าง แต่น้ำใจ และความช่วยเหลือจากเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทำให้เป็นพลังที่จะต่อสู้กับปัญหาจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณกิจกรรมต่างๆ ที่เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ได้ทำร่วมกัน โดยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมานั้น เป็นช่วงเวลาที่ข้าพเจ้ามีความสุขและประทับใจกับมิตรภาพจากทุกๆ คนเป็นอย่างมาก

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรม ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์ และสนับสนุนทางการศึกษาด้วยดีตลอดมา

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข

มิถุนายน 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	40
อุปกรณ์	40
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	65
สรุป	65
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	81
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	82
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและวิธีการทดลอง	84
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบจากการทดลอง	89
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	97

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 10
2 องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 25
3 จำนวนชุดการทดลองของปัจจัยทั้งหมดจำนวน 2 ปัจจัย ที่ระดับการทดลอง 5 ระดับ 44
4 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที 59
5 ค่าประมาณและการทดสอบสัมประสิทธิ์รีเกรชชั่นของสมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 60

ตารางผนวกที่

ค1 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน 90
ค2 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ขี้เลื่อยความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน 90
ค3 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน 91
ค4 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ขุยมะพร้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน 91
ค5 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน 92
ค6 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน 92
ค7 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน 93

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค8	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	93
ค9	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดมอล์ตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	94
ค10	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ยีสต์ขนมปังความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	94
ค11	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสมการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	95
ค12	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในฟลาสก์จาก *T. fusca* PA 1-1 เพื่อยืนยันความแม่นยำจากการทำนายค่าการวิเคราะห์ด้วยพื้นที่ผิวแบบตอบสนอง	95
ค13	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการทำนายและการทดลองที่สภาวะเหมาะสม	96

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างสายเซลลูโลส	4
2	กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	8
3	กลไกการทำงานของเอนไซม์ในระบบ Noncomplexed cellulase system (A) และ Complexed cellulase system (B) บนโครงสร้างของเซลลูโลสที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ	14
4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน	45
5	ลักษณะอาหารสูตร Minimal medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al*., 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลิลิตร ที่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ	46
6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน	47
7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ขุยมะพร้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน	48
8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน	49
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ขี้เลื่อยความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน	50
10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	52

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน 53

12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน 54

13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดมอลต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน 55

14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ยีสต์ขนมปังความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน 57

15 การวิเคราะห์หาพื้นผิวการตอบสนองของการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนระดับต่างๆ 62

16 Contour plot ของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 63

17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในฟลาสก์ 63

ภาพผนวกที่

ก1 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS 87

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CMC	=	carboxymethylcellulose
CMCase	=	carboxymetylcellulase
U/ml	=	unit per milliliter
µm	=	micrometer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน

Optimization for Carboxymethylcellulase Production by Thermophilic Bacteria from Soil

คำนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่มากในสิ่งแวดล้อม สามารถหาได้ง่ายเมื่อเทียบกับสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่น พบได้ทั่วไปในผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงทุกชนิด สาหร่าย และ ราบางชนิด สำหรับในประเทศไทย ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม ซึ่งก่อให้เกิดผลพลอยได้และวัสดุอินทรีย์ที่เหลือทิ้ง เช่นใบไม้ กิ่งไม้ ขี้เลื่อย และเศษวัชพืชจำนวนมาก ซึ่งจะส่งผลให้มีเซลลูโลสสะสมในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นทุกปี ในปัจจุบันได้มีการนำวัสดุเหลือทิ้งไปใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย แต่ก็ยังมีเหลือทิ้งอีกจำนวนมาก ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะขึ้น ดังเช่น ปรากฏการณ์หมอกควันมากผิดปกติ ครอบคลุมเขตภาคเหนือตอนบนในช่วงฤดูร้อน การเกิดไฟป่า ดังนั้นการคิดหาวิธีนำเศษใบไม้และวัชพืชไปแปรรูปหรือเพิ่มมูลค่า เช่น การนำไปผลิตปุ๋ยหมัก หรือเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลังงานทดแทน จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว ในการใช้เศษใบไม้และวัชพืชเป็นสารตั้งต้นนั้น จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เข้าทำการย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อผลิตน้ำตาลออกมาก่อน

เอนไซม์เซลลูเลสนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) สามารถผลิตได้ในปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยวิธีอื่น จุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างมาก ได้แก่ เชื้อรา อย่างไรก็ตามมีรายงานแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp., Actinomycete และ Streptomycetes เป็นต้น ในการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นนั้น วิธีการหนึ่งคือ การเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิสูง เนื่องจากเป็นการลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น โดยเชื้อ *Thermobifida fusca* PA1-1เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเพื่อเป็นทางเลือกในการนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายเศษใบไม้ และวัชพืชเพื่อผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส เป็นต้น อันจะนำไปสู่การสร้างพลังงานทดแทนได้ในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *Thermobifida fusca* PA 1-1

2. ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *Thermobifida fusca* PA 1-1

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *Thermobifida fusca* PA 1-1

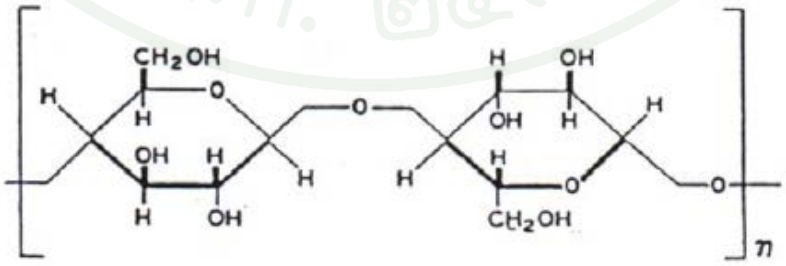
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่สะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ในพืชชั้นสูงทุกชนิด ซึ่งมีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่า 97-99 เปอร์เซ็นต์ จัดว่าเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ ประกอบด้วย polymer chain เรียงขนานกัน และยึดกันด้วย dispersion force และ hydrogen bond ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่น ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆได้ช้า เซลลูโลสใน primary cell wall ประกอบด้วยกลูโคสยาวประมาณ 2,000 โมเลกุล และ ไม่ต่ำกว่า 14,000 โมเลกุลใน secondary cell wall โดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะเกาะกันเป็นคู่ตามยาวและเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คู่ เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) เพื่อให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ของพืช (Fan *et al*., 1987)

ในด้านโครงสร้างทางเคมี เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (glucose) จำนวน 1,000-10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer) เชื่อมกันด้วย β -1, 4-glycosidic bond ระหว่าง alcoholic hydroxyl groups โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 2,000-15,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-2,400,000 ดาลตัน (Dalton) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง (Fan *et al*., 1987)



ภาพที่ 1 โครงสร้างสายเซลลูโลส
ที่มา: Ott (1954)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประชากรส่วนใหญ่ในประเทศไทยประกอบอาชีพเกษตรกรรม ทำให้มีผลพลอยได้ และวัสดุอินทรีย์ที่เหลือทิ้ง เช่น ใบไม้ และเศษวัชพืช จำนวนมาก ก่อให้เกิดปัญหาขยะมูลฝอยตามมา การคิดหาวิธีนำเศษอินทรีย์เหลือทิ้งเหล่านี้ไปแปรรูปหรือเพิ่มมูลค่าจะสามารถช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ส่วนหนึ่ง

เซลลูโลสเมื่อนำมาสลายจะให้กลูโคสซึ่งสามารถเปลี่ยนต่อไปจนได้แอลกอฮอล์ อะซีโตน และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เป็นต้น ได้มีการศึกษาการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสกันมานาน วิธีที่นิยมใช้มี 2 วิธี (สมภพ, 2529) คือ

1.1.วิธีทางเคมี เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงภายใต้อุณหภูมิสูงทำให้ได้กลูโคสแต่จะมีปริมาณต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการรวมอยู่ด้วย

1.2 วิธีทางชีวภาพ เป็นการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาสามารถไฮโดรไลส์เซลลูโลสให้เป็นกลูโคส ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง และไม่เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ เพราะเอนไซม์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก

2. เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสมีหลายชนิด จัดอยู่ในกลุ่มทั้งแบคทีเรียและรา ทั้งชนิดที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ รวมทั้งชนิดที่สามารถเจริญได้ดีทั้งอุณหภูมิปานกลางและสูง (Bhat and Bhat, 1997) เอนไซม์เซลลูเลสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

2.1 เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (EC 3.2.1.4; 1,4-ß-D glucan 4-glucanohydrolase) หรือเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ทำหน้าที่ในการตัดพันธะ ß-1,4-glycosidic ของโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม จำเพาะต่อโครงสร้างในลักษณะรูปร่างไม่เป็นระเบียบ เซลลูโลสที่มีกลุ่มอื่นเข้าแทนที่ (substituted cellulose) และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cello-oligosacharide) เช่น acid swollen cellulose เบต้า-กลูแคน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส แต่ไม่แสดงกิจกรรมต่อเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเรียงตัวปีนระเบียบ (crystalline cellulose) การทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสทำให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระดับของการเกิดโพลิเมอร์ของเซลลูโลส (degree of polymerization) ลดลงอย่างรวดเร็ว ผลจากการย่อยจะได้โพลีแซคคาไรด์สายสั้น น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลเซลโลไบโอส (Wood, 1992)

2.2 เอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส หรือเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (EC 3.2.1.91; 1,4-ß-D glucan; cellobiohydrolase (CHB)) ทำหน้าที่ตัดพันธะ ß-1,4 glycoside จากปลายของสายโซ่เซลลูโลส ซึ่งอาจย่อยจากปลายรีดิวซ์ (reducing end) หรือปลายนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) (Ericksson and Wood, 1985; Terri, 1997) มีความจำเพาะต่อโครงสร้างในลักษณะที่เรียงตัวเป็นระเบียบ (crystalline cellulose) ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลเซลโลไบโอส การทำงานคล้ายกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส คือแสดงกิจกรรมต่อเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (amorphous cellulose) เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลเซลโลไบโอส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไฮดรอกซีเอธิลเซลลูโลส (สุนีย์, 2544) นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถย่อยสับสเตรทที่สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ p-nitrophenyl-ß-D-cellobioside และ nitrophenyl-ß-D-lactoside

2.3 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21; ß-D-glucoside glucohydrolase) ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลเซลโลไบโอส หรือเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สามารถย่อยสับสเตรทสังเคราะห์บางชนิด เช่น p-nitrophenyl glucoside, 4-methyllumbellifery glucoside (Wood, 1992)

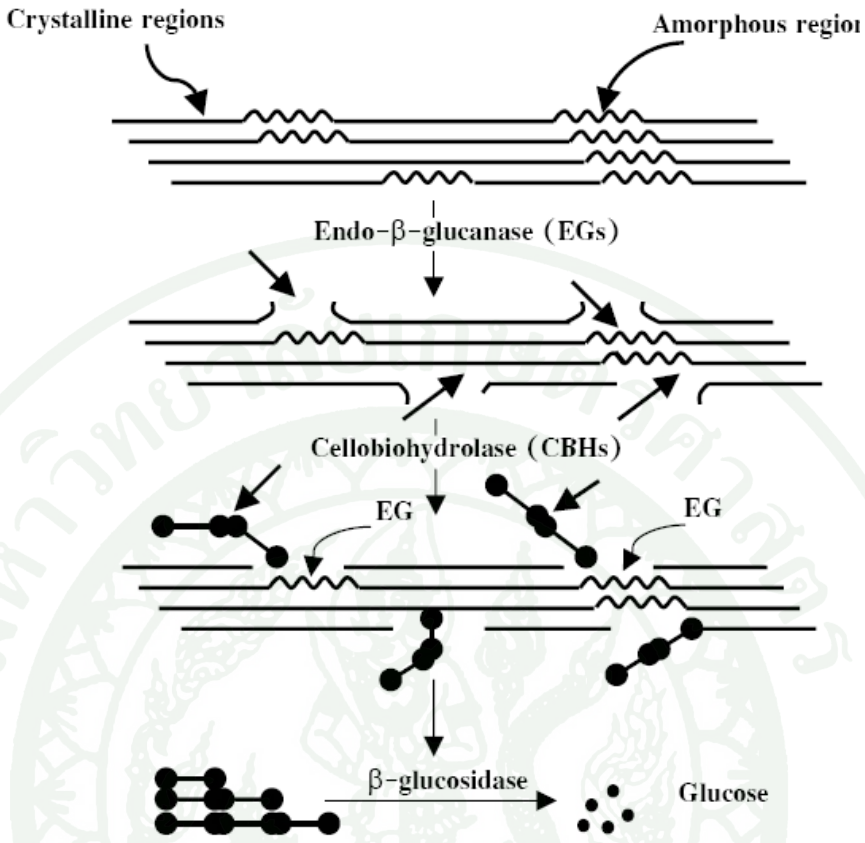
อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสนั้นมีความยาก เนื่องจากไม่มีสับสเตรทที่จำเพาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด อีกทั้งการย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสยังเกิดในลักษณะการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 กิจกรรม (Wood, 1992) โดยกลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสจะเกิดขึ้นในลักษณะการทานเสริมกัน (synergism) ของเอนไซม์แต่ละชนิด เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะย่อยโมเลกุลเซลลูโลสในส่วนโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบแบบสุ่ม เนื่องจากการที่เอนไซม์ไม่มีแอกทีฟไซต์ (active site) ที่มีลักษณะเป็นช่องเปิด (groove) ทำให้เกิดปลายด้านรีดิวซ์และปลายนอนรีดิวซ์ และเอนไซม์ CBH เป็นเอนไซม์ที่แอกทีฟไซต์มีลักษณะเป็นโพรง (tunnel) (Terri, 1997) ซึ่งมีความเหมาะสมในการเข้าย่อยที่ส่วนปลายทั้งสองนี้ ทำให้เกิดการย่อยส่วนโครงสร้างที่เป็นระเบียบของเซลลูโลส และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเข้าย่อยน้ำตาลเซลโลไบโอสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสต่อไป การทำงานแบบนี้เรียกว่า endo-exo synergism การทำงานแบบเสริมกันนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถพบได้ในเชื้อราที่ใช้อากาศ เช่น *Trichoderma ressei*, *Penicillium pinophilum*, *Trichoderma koningii* และ *Phanerochaete crysosporium* เป็นต้น (Bhat and Bhat, 1997)

ดังนั้น crystalline cellulose จะถูกย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ส่วนสับสเตรทที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่ถูกย่อย โดยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดเดียว คือ acid-swollen cellulose, carboxymethyl-cellulose (CMC), cellulose azure และ trinitrophenyl carboxymethyl-cellulose ซึ่งจะถูกย่อยโดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ส่วนสับสเตรทที่ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ได้แก่ MUC (methylumbelliferyl- ß-D-cellobiose) และ pNPC (p-nitrophenyl- ß-D-cellobioside) ส่วน MUG (methylumbelliferyl- ß-D-glycopyranoside) และ pNPG (p-nitrophynyl-ß-D-glycopyranoside) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส นอกจากนี้สับสเตรทที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกันได้แก่ filter paper และ avicel ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส (Han *et al*., 1995) ภาพที่ 2 แสดงลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ได้แก่ รา แบคทีเรีย และ แอคติโนมัยซีท โดยเฉพาะในรานั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ แต่เอนไซม์จากราเกิดกิจกรรมได้ดีที่สภาวะที่เป็นกรด ส่วนเอนไซม์จากแบคทีเรียนั้นมีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูง และทนต่อความเป็นด่างได้ดี ทำให้นำเอนไซม์เซลลูเลสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา: http://www.drpetry.de/artikel/artikel_1.html

3. เอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรีย

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่สำคัญที่สุด เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ทำให้สะดวกต่อการสกัด สามารถผลิตได้ปริมาณมาก ไม่ต้องใช้พื้นที่และเวลามากเหมือนกับการผลิตโดยใช้พืชและสัตว์ ทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำ ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่มีบทบาทในการย่อยสลายเซลลูโลสมักพบในราและมีการนำมาใช้ในทางการค้าทั้งอุตสาหกรรมอาหารและสิ่งทออย่างกว้างขวาง จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียนั้นมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เช่นกัน เอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียมีข้อดี คือ แบคทีเรียมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่า และสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่ายกว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิดสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งนับว่าเป็นข้อดีที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถนำไปใช้ได้กับอุตสาหกรรมที่มีปัจจัยเกี่ยวกับความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง รวมทั้งยังทนด่างได้ดีกว่า (รุจิกาญจน์, 2546) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบได้ในหลายกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศ โดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Clostridium, Rhuminococcus* และ *Caldicellulosiruptor* sp. นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Butyrivibrio* และ *Acetivibrio* แบคทีเรียที่ใช้อากาศแกรมบวก เช่น *Cellulomonas Thermobifida Bacillus* และแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท เช่น *Micromonospora* และ *Streptomycetes* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียในกลุ่ม gliding bacteria ที่ใช้อากาศ เช่น *Cytophaga* และ *Spirocytophaga* (Lynd *et al.*, 2002) ดังแสดงในตารางที่ 1

การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรียในกลุ่มที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศมีความแตกต่างกัน แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศจะย่อยสลายเซลลูโลสด้วยการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแบบซับซ้อน (complexed cellulase systems) จากออร์แกเนลที่เรียกว่า เซลลูโลโซม (cellulosome) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum* จะมีการผลิตออกมาทั้งบนผิวเซลล์และขับออกสู่น้ำหมัก (Bok *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้อากาศหลายกลุ่มจะไม่สามารถวัดปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยลงสู่น้ำหมักอย่างแน่นอนได้ เนื่องจากเอนไซม์ส่วนมากจะผลิตบนผิวเซลล์และชั้นไกลโคคาลิกซ์ แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเจริญได้ดีขณะที่เซลล์ยึดจับกับสับสเตรท จากการหมักเซลลูโลสด้วยแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศจะให้ปริมาณเซลล์ต่ำ ได้สารที่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักหลายชนิด ได้แก่ เอทานอล กรดอินทรีย์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใช้อากาศทั้งราและแบคทีเรีย จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขับออกนอกเซลล์ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวได้ในน้ำหมัก (Schwarz, 2001) เอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดจะทำงานร่วมกัน โดยเซลล์ไม่จำเป็นต้องยึดจับกับสับสเตรทเหมือนแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ใช้อากาศ Kauri and Kushner (1985) ทดลองแยกเซลล์ Cytophaga ออกจากเซลลูโลสโดยการแทรกแผ่นกรองระหว่างชั้นเซลล์และสับสเตรท พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ ซึ่งแผ่นกรองที่ใส่คั่นลงไปจะเป็นตัวชะผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และทำให้ลดโอกาสที่จะเกิด Catabolic repression การหมักแบบใช้อากาศของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะได้จำนวนเซลล์สูง นำมาสู่การประยุกต์ใช้เพื่อผลิตโปรตีนจากเซลล์จุลินทรีย์โดยการใช้แหล่งเซลลูโลสเป็นสับสเตรท (El-Nawwi and El-Kader, 1996; Rodrı´guez and Gallardo, 1993) แบคทีเรียที่ใช้อากาศที่คัดแยกจากดินโดยทั่วไปจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolism) ที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ เช่น *Bacillus*, *Micromonospora* และ *Thermobifida* เป็นต้น โดยมีระยะพักตัวแตกต่างกันและมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิด (Lynd *et al.*, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ชนิด	สายพันธุ์จุลินทรีย์	ที่มา
รา	*Cladorrhinum foecundissimum*	Rexova-Benkova (1973)
	Aspergillus niger	Kumar *et al.* (2000)
	Fusarium oxysporum	Christakopoulos *et al.* (1994)
	Fusarium solani	Qiu *et al.* (2000)
	Humicola grisea var. thermoidea	Wood (1969)
	Neocallimastix frontalis	Takashima *et al.* (1996)
	Penicillium funiculosum	Wilson and Wood (1992)
	Penicillium janthinellum	Wyk (1999)
รา	*Penicillium pinophilum*	Bhat *et al.* (1990)
	Phanerrochate chrysosporium	Wang and Gao (2000)
	Sporotrichum pulverulentum	Eriksson (1978)
	Sporotrichum thermophile	Canevascini *et al.* (1979)
	Talaromecys emersonii	McHale and Coughlan (1980)
	Thermoascus aurantiacus	Khandke *et al.* (1989)
	Trichoderma reesei	Ilmén *et al.* (1997)
	Trichoderma viridae	Beldman *et al.* (1985)
แบคทีเรีย	*Acetobacter xylinum*	Okamoto *et al.* (1994)
	Acidothermus cellulolyticus	Bergquist *et al.* (1999)
	Bacillus circulans	Kim (1995)
	Bacillus amyloliquefaciens	Javier *et al.* (1998)
	Bacillus pumilis	Gordon *at al.* (1973)
	Bacillus subtilis	Nakamura *et al.* (1987)
	Butyrivibrio fibbrisolvens	Hungate (1966)
	Caldibacillus cellovorans	Bergquist *et al.* (1999)
	Caldicellulosiruptor saccharolyticum	Rainey *et al.* (1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด	สายพันธุ์จุลินทรีย์	ที่มา
แบคทีเรีย	*Cellulomonas biazotea*	Rajoka and Malik (1997)
	Cellulomonas fimi	Gilkes *et al.* (1997)
	Cellulomonas flavigena	Bagnara *et al.* (1978)
	Cellulomonas uda	Nishise *et al.* (1985)
	Cellvibrio fulvus	Shafer and King (1965)
	Cellvibrio mixtus	Fontes *et al.* (1998)
	Clostridium absonum	Rani and Nand (2000)
	Clostridium cellulolyticum	Bélaich *et al.* (1997)
	Clostridium papyrosolvens	Pohlschröder *et al.* (1995)
	Clostridium thermocellum	Yagüe *et al.* (1990)
	Eubacterium cellulosolvens	Van Gylswyk and Van der Toon (1986)
	Fervidobacterium islandicum	Huber *et al.* (1990)
	Fibrobacter succinogenes	Ozcan *et al.* (1996)
	Halocella cellulolytica	Simankova *et al.* (1993)
	Pseudomonas fluorescens var.cellulosa	Kim (1987)
	Rhodothermus marinus	Alfredsson *et al.* (1988)
	Ruminococcus albus	Attwood *et al.* (1995)
	Ruminococcus flavefaciens	Flint *et al.* (1989)
	Spirochaeta thermophila	Aksenova *et al.* (1992)
	Thermotoga maritima	Bronnenmeier *et al.* (1995)
	Thermotoga neapolitana	Bok *et al.* (1998)
แอคติโนมัยซีท	*Microbispora bispora*	Bartley *et al.* (1984)
	Thermomonospora fusca	Lin and Wilson (1988)

ที่มา: Lynd *et al.*, (2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (มุกดาและนิ่มนวล, 2527)

4.1 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ จึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อน ทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต

4.2 ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาถึงสภาวะสมดุลได้เร็ว

4.3 เอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นแต่ละชนิดดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มาก

4.4 ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นแต่ละชนิด

4.5 เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามที่ต้องการ

5. ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อมีการย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ จุลินทรีย์จะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิดที่ขับออกนอกเซลล์ทั้งแบบที่สัมพันธ์และไม่สัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ โครงสร้างหลักของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่ ส่วนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (catalytic module) และส่วนที่ยึดจับกับสับสเตรท (carbohydrate-binding module, CBM) โดย CBM จะไปจับกับผิวของเซลลูโลส และพาส่วนย่อยสลายเข้าใกล้กับสับสเตรท เมื่อ CBM เริ่มทำงานจะส่งเสริมให้เกิดการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (Reese, 1976) เอนไซม์เซลลูเลสทั้งสามกลุ่ม ได้แก่ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบต้า-กลูโคซิเดสจะทำงานเสริมกัน (synergism) ลักษณะการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสามชนิดแบ่งได้เป็น 1) การทำงานร่วมกันของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส 2) การทำงานของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสโดยตัดที่ปลายรีดิวซ์และนอนรีดิวซ์ของสายโพลีแซคคาไรด์ 3) การทำงานร่วมกันของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและเบต้า-กลูโคซิเดส จะกำจัดเซลโลไบโอสและเซลโลเดกซ์ทรินซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส 4) การทำงานร่วมกันภายใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

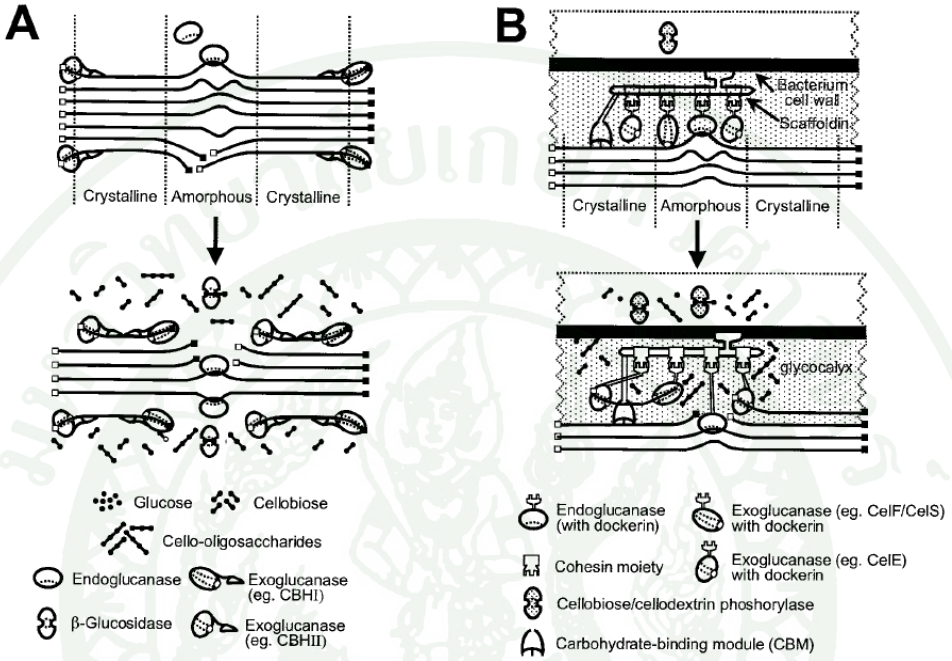
โมเลกุลของส่วนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาและส่วนที่ยึดจับกับสับสเตรท (Din *et al*., 1994; Terri, 1997)

จุลินทรีย์จะมีการพัฒนาตัวเองให้สามารถใช้เซลลูโลสซึ่งในธรรมชาติจะประกอบด้วยอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำหรือส่วนของเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Franklund and Glass, 1987) รา และแอคติโนมัยซีท มีความสามารถในการใช้เส้นใยแทรกซอนเข้าไปในเซลลูโลสก่อนที่จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเข้าสลายภายในสายโพลิเมอร์ของเซลลูโลส (Eriksson *et al*., 1990) โดยวิธีการย่อยสลายสับสเตรทดังกล่าวมีประสิทธิภาพเพียงพอที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งเซลลูโลสได้ กระบวนการนี้จึงไม่จำเป็นที่จะต้องสร้างออร์แกเนลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง หรือเซลลูโลโซม (cellulosome) เรียกระบบการผลิตเซลลูเลสที่เกิดขึ้นนี้ว่า noncomplexed cellulase system ในทางตรงกันข้าม แบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศไม่สามารถที่จะพาตัวเองเข้าไปย่อยสลายสับสเตรทโดยตรง แบคทีเรียเหล่านี้จึงต้องมีวิธีการที่จะใช้แหล่งสับเตรทดังกล่าวเพื่อแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จึงมีการพัฒนาส่วนของเซลลูโลโซมบริเวณตำแหน่งผิวเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายโดยเรียกระบบที่เกิดขึ้นว่า complexed cellulase system

5.1 Noncomplexed cellulase system เป็นระบบที่มีการศึกษาเป็นจำนวนมาก เนื่องจากพบได้ทั่วไปในราที่ใช้อากาศ นอกจากนี้ยังพบในแบคทีเรียที่ใช้อากาศ เช่น *Cellulomonas* และแอคติ-โนมัยซีท เช่น *Thermobifida* หรือ *Thermomonospora* (Lynd *et al*., 2002) *T. ressei* สร้างเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสอย่างน้อยสองชนิด (CHBI และ CHBII) เอนโดกลูคาเนสห้าชนิด (EGI, EGII, EGIII, EGIV และ EGV) และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสองชนิด (BGLI และ BGLII) โดยเอนไซม์ CHBI มีบทบาทในการย่อยสับสเตรทจากปลายรีดิวซ์ ส่วน CHBII จะย่อยจากปลายนอนรีดิวซ์ โดยเป็นการทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสโครงสร้างที่เป็นระเบียบ (microcrystalline) (Henrissat *et al*., 1985, Medve *et al*., 1994) จากการศึกษาทางโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์เอก-โซกลูคาเนสทั้งสองชนิดพบว่า CHBI มีลักษณะประกอบด้วย loop จำนวน 4 loop ทำให้เกิดโพรง (tunnel) ที่มีความยาวขนาด 50 อังสตรอม CHBII ประกอบด้วย loop จำนวน 4 loop ทำให้เกิดโพรงที่มีความยาวขนาด 20 อังสตรอม ด้วยลักษณะที่เป็นโพรงนี้จะทำให้เกิดความสามารถในการย่อยเซลลูโลสจากปลายรีดิวซ์หรือนอนรีดิวซ์ เมื่อเซลลูโลสจะเคลื่อนที่ผ่านโพรงใน CHBI ทำให้เกิดการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอส ซึ่งบางครั้งอาจได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและเซลโล-ไตรโอสตั้งแต่ช่วงแรกของกระบวนการ (Divne *et al*., 1994) โครงสร้างของ EGI มีลักษณะเป็น loop ที่สั้นกว่าทำให้เกิดเป็นช่องเปิด (groove) มากกว่าโพรง ช่องเปิดนี้จะยอมให้เซลลูโลสเคลื่อนที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผ่านเพื่อเข้าสู่กระบวนการย่อยสลาย นอกจากนี้ช่องเปิดดังกล่าวยังพบใน EGII (Sandgren *et al*., 2000) กลไกการทำงานของเอนไซม์ในระบบนี้แสดงในภาพที่ 3 (A)



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของเอนไซม์ในระบบ Noncomplexed cellulase system (A) และ Complexed cellulase system (B) บนโครงสร้างของเซลลูโลสที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ

ที่มา: Lynd *et al*., 2002

เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสมีความจำเป็นต่อการย่อยสลายเซลลูโลสโครงสร้างที่เป็นระเบียบ เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสชนิด CHBI และ CHBII ใน *T. ressei* เป็นเอนไซม์เซลลูเลสหลักคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ ของเอนไซม์เซลลูเลสในโปรตีนทั้งหมดตามลำดับ (Wood, 1992) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ทำให้ระดับของการเกิดโพลิเมอร์ในเซลลูโลสลดลงช้ามาก เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะมีบทบาทสำคัญในการเข้าไปย่อยส่วนที่มีโครงสร้างไม่เป็นระเบียบ ทำให้ระดับการเกิดโพลิเมอร์ในเซลลูโลสลดลงรวดเร็ว และเกิดปลายสายเซลลูโลสที่มีลักษณะยอมให้เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสเข้าทำงานได้ (Terri *et al*., 1998) เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสมีปริมาณน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ของเอนไซม์เซลลูเลสในโปรตีนทั้งหมด พบว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส 3 ชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้แก่ EGI, EGII และ EGIII จะทำงานร่วมกับเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ใน *T. ressei* เซลโลไบโอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CHBI และ CHBII มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลสและเอนโดกลูคาเนส (Holtzapple *et al*., 1990; Medve *et al*., 1998; Mosier *et al*., 1999)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสใน *T. ressei* พบอย่างน้อยสองชนิด โดยเอนไซม์ดังกล่าวมีบทบาทในการย่อยสลายเซลโลไบโอสและโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น เกิดผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส BGLI และ BGLII สามารถเก็บเกี่ยวได้ในน้ำหมัก แต่พบว่าปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวส่วนมากยังคงติดอยู่กับผนังเซลล์ของ *T. ressei* (Messner *et al*., 1990; Usami *et al*., 1990) ซึ่งการที่เอนไซม์ติดอยู่บนผนังเซลล์นี้ทำให้การปลดปล่อยกลูโคสลงสู่สิ่งแวดล้อมลดลง การผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสใน *T. ressei* พบว่ามีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตในรา *Aspergillus* (Reczey *et al*., 1998) นอกจากนี้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *T. ressei* ไม่ทนต่อกลูโคสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (product inhibition) ต่างจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *Aspergillus* ที่ทนต่อกลูโคสได้มากกว่า (Lynd *et al*., 2002)

เอนไซม์เซลลูเลสในราที่ทนอุณหภูมิสูง *Humicola insolens* มีระบบการทำงานที่คล้ายคลึงกับ *T. ressei* ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสอย่างน้อย 7 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส 2 ชนิด (CBHI และ CHBII) และเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส 5 ชนิด EGI, EGII, EGIII, EGIV และ EGV (Schulein, 1997) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์เซลลูเลสใน *H. insolens* เช่น EGI และ EGIII ขาดส่วนที่เข้าจับกับสับสเตรท (CBM) มีผลให้เอนไซม์ EGIII ย่อยสลายสับสเตรทที่ละลายน้ำได้น้อย (Schulein, 1997) สอดคล้องกับการศึกษาของ Boisset *et al*., (2001) ซึ่งศึกษาการตัดต่อยีนที่ผลิตเอนไซม์ CBHI, CHBII และ EGV ใน *Aspergillus oryzae* พบว่า การทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดสามารถสลายสายโพลีแซคคาไรด์ในเซลลูโลสโครงสร้างเป็นระเบียบได้อย่างมีประสิทธิภาพ อัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ CBHI ต่อ CHBII เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมดมีความต้องการเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์ การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสามชนิด สามารถย่อยสลายเซลลูโลสโครงสร้างเป็นระเบียบได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวย่อยสลายเซลลูโลสโครงสร้างเป็นระเบียบได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบคทีเรียในกลุ่มใช้อากาศที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ได้แก่ *Cellulomonas* และ *Thermobifida* หรือก่อนหน้านี้เรียกว่า *Thermomonospora* แบคทีเรียในกลุ่ม *Cellulomonas* ผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสอย่างน้อยหกชนิด และเอกโซกลูคาเนสอย่างน้อยหนึ่งชนิด (Chaudhary *et al*., 1997) เอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดจาก *Cellulomonas* คล้ายคลึงกับเอนไซม์เซลลูเลสที่พบในราที่ใช้อากาศ ที่พบบริเวณส่วนที่ยึดจับกับสับสเตรท (carbohydrate-binding module, CBM) อย่างไรก็ตามพบโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายเซลลูโลโซมใน *Cellulomonas* เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่ใช้เซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่ชอบอุณหภูมิสูง *Thermobifida fusca* หรือ *Thermomonospora fusca* ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เอนโดกลูคาเนส 3 ชนิด (E1, E2 และ E5) เอกโซกลูคาเนสสองชนิด (E3 และ E6) และมีเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มที่มีทั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส (E4) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* มีกิจกรรมสูงต่อเซลลูโลสโครงสร้างเป็นระเบียบจากแบคทีเรีย และมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส (Irwin *et al*., 1993)

5.2 Complexed cellulose systems เป็นระบบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีการสร้างออร์-แกเนลที่เรียกว่า เซลลูโลโซม (cellulosome) ซึ่งจุลินทรีย์จะสร้างขึ้นในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศ แต่ในบางครั้งอาจพบได้ในจุลินทรีย์ทั่วไป ทั้งที่สัมพันธ์กับการย่อยสลายเซลลูโลส หรือไม่สัมพันธ์กับการย่อยสลายเซลลูโลสก็ตาม เซลลูโลโซมมีบทบาทในการที่จะยอมให้เอนไซม์เซลลูเลสเคลื่อนที่ออกมาเข้าใกล้กับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดบนเซลลูโลโซม นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะทางระหว่างผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลาย เช่น น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ให้เคลื่อนที่ไปยังเซลล์จุลินทรีย์ได้เร็วขึ้น กลไกการทำงานของเอนไซม์แสดงในภาพที่ 3 (B) (Bayer *et al*., 1994; Schwarz, 2001)

เซลลูโลโซมเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์หลายชนิดซึ่งถูกผลิตขึ้นบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียขณะที่มีการเจริญบนเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวเคลื่อนที่ไปจับกับเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นระเบียบ พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับเซลลูโลโซมในแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* เช่น *C. thermocellum, C. cellulolyticum* และ *C. josui* เป็นต้น โดยเซลลูโลโซมในแบคทีเรียกลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันเพียงองค์ประกอบภายในแต่ละสปีชีส์ เซลลูโลโซมใน *C. thermocellum* มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนขนาดใหญ่ที่ไม่เข้าร่วมทำปฏิกิริยา (non-catalytic) ที่มีการม้วนพับ (scaffold) (CipA) ขนาด 197 กิโลดาลตัน multimodular และสารโคฮิซิน (cohesin) ทั้งหมด 9 ชนิด มีหน่วยย่อยชนิดเอ็กซ์ (X module) หรือหน่วยที่ชอบน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำนวน 4 หน่วย นอกจากนี้ยังประกอบด้วยส่วนที่ยึดจับกับสับสเตรท (CBM) ชนิดแฟมิลี III โปรตีนส่วนที่พับม้วนจะยึดไว้กับผนังเซลล์ด้วยสารโคฮิซินชนิด II ภายในเซลลูโลโซม ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 22 หน่วย มีหน่วยย่อยอย่างน้อย 9 หน่วยที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (CelA, CelB, CelD, CelE, CelF, CelG, CelH, CelIN และ CelIP)

6. คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาถึงโครงสร้างเซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-60,000 คุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆ ในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (optimal temperature) ประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้ยังมีความคงทนต่อ pH ได้กว้างระหว่าง 4.0 - 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส ได้นานหลายปี หรือสามารถเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วย acetone หรือ ethanol โดยไม่มีปัญหาการสูญเสียคุณสมบัติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันย่อมมีคุณสมบัติแตกต่างกัน (น้อย, 2529) คุณสมบัติของเซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิด อาจมีคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ โครงสร้างของเอนไซม์ ชนิด แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ด้วย คุณสมบัติต่างๆได้แก่

6.1 น้ำหนักโมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูเลสจะแตกต่างกัน ตามแต่ชนิดและแหล่งของจุลินทรีย์

6.2 ผลของพีเอชอุณหภูมิของเซลลูเลส

6.2.1 พีเอชที่เหมาะสมและความเสถียร เอนไซม์มีสภาพไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงพีเอชเพียงเล็กน้อย อาจทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงหรือเพิ่มขึ้นได้ พีเอชจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์มีการแตกตัวตรงหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิล หรือ side chain ได้ต่างกันในสภาวะที่พีเอชแตกต่างกัน จะมีผลให้โครงสร้างของเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชหนึ่ง หรือช่วงพีเอชหนึ่งเท่านั้น เรียกว่า พีเอช

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) ในการเปลี่ยนพีเอชมากๆ อาจทำให้เอนไซม์เปลี่ยนสภาพไปด้วย ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน

6.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมและความเสถียร อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์สูงสุด จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature) ในการทำงานของเอนไซม์นั้นเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส

6.2.3 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้ง สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น และลักษณะของ functional group ที่บริเวณ active site ทำให้เข้าใจ และสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ Lusterio *et al*. (1992) พบว่า endoglucanase จาก *Bacillus* sp. PKM-5430 ถูกยับยั้งโดย Hg^{2+} และ Iwashita *et al.* (1998) พบว่า $AgNO_3$ และ $HgCl_2$ มีผลยับยั้งต่อ β-glucosidase จาก *Aspergilus awamori var. kawachi* และ $FeCl_3$ จะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

7.ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

7.1 ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันมีรายงานจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบครบทั้ง 3 ส่วน คือ endoglucanase, exoglucanase และ β-glucosidase ในปริมาณที่พอเหมาะ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีผู้นิยมนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้แก่ *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Bacillus* sp. และ *Clostridim* sp. เป็นต้น

7.2 ส่วนประกอบทางอาหาร ส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่สำคัญบางชนิด ได้แก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.2.1 แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอน เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเช่นกัน โดยปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากหรือน้อยเกินไปในอาหาร จะส่งผลกระทบให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเติบโตได้อย่างเต็มที่ ชนิดาและคณะ (2545) ทดสอบการผลิต extracellular-free xylanase จาก Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 นำไปใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลนโดยแปรผันแหล่งคาร์บอนได้แก่ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และรำข้าว และแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 1.0 1.3 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปลือกข้าวโพด 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด

7.2.2 แหล่งความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเช่นกัน โดยปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมากหรือน้อยเกินไปในอาหาร จะส่งผลกระทบให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเติบโตได้อย่างเต็มที่

นฤมล (2544) ได้คัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนจากดินซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด จำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 ทดสอบอาหารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ เลี้ยงใน cellulose broth ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหาร 5.5 มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ carboxymethyl cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2 เปอร์เซ็นต์ tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัด enzyme activity ได้ 0.281 unit/ml และ specific activity 1.778 unit/mg protein ส่วน *Bacillus coagulans* TI-5 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เลี้ยงใน cellulose broth ที่มี 0.4 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหาร 5.5 มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ cellulose acetone เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2 เปอร์เซ็นต์ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัด enzyme activity ได้ 0.168 unit/ml และ sprcific activity 1.108 unit/mg protein

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lee and Blackburn (1974) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก thermophilic *Clostridium* sp. โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของ yeast extract แตกต่างกัน พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดค่า enzyme activity ได้เท่ากับ 124 U/ml

7.3 เทคนิคการเพาะเลี้ยง (Goksoyr and Eriksen, 1980) การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีวิธีที่นิยมนำมาใช้ 4 วิธี ดังนี้

7.3.1 Submerge culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมอาหารแข็งลงไปและมีการให้อากาศหมุนเวียนตลอดเวลา หรือใช้เครื่องพ่นอากาศ เช่น Milala *et al.* (2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* ในสภาวะ submerge culture พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี maize straw เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด คือ 102 U/ml นอกจากนี้ ชริดา และคณะ (2549) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lentinus* spp. ในสภาวะ solid state และ submerge culture ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแกลบ ข้าวเจ้าป่น พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ submerge culture

7.3.2 Shaking cultivation การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามปกติที่มีการเขย่าตลอดเวลา เช่น Singh and Kumar (1998) เลี้ยงเชื้อ *Bacillus brevis* VS-1 พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงใน shaking-flask cultivation ที่ความเร็วรอบ 175 รอบต่อนาที สอดคล้องกับรายงานของ Barron *et al.* (1995) ซึ่งเลี้ยงเชื้อ *Kluyvermyces marxianus* IMB3 ที่สามารถผลิต ethanol เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน shaking-flask cultivation ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น 21 เปอร์เซ็นต์

7.3.3 Static culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบสภาวะนิ่ง ไม่มีการเขย่า เช่น การทดลองของ Kalra and Sandhu (2004) ซึ่งนำเชื้อ *Trichoderma pseudokonigii* มาเพาะเลี้ยงในสภาวะshaking cultivation และ static culture พบว่า การเพาะเลี้ยงทั้งสองแบบให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน แต่การทดลองของ Moussa and Tharwat (2007) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Sclerotium rolfsii* ในอาหารเหลว พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ shaking cultivation เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าในสภาวะ static culture 5 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.3.4 Solid state หรือ koji-type process การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวอาหารแข็งที่ชื้น ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้เลี้ยงเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย ส่วนผสมของอาหารแข็งประกอบด้วยวัสดุที่เป็นของแข็งแห้ง และน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งส่วนใหญ่ใช้รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า ฟางข้าวและเสริมอาหารพวกโปรตีนและเกลือที่จำเป็น ดังรายงานของ Haq *et al*. (2006) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* ในอาหารที่มีรำข้าว ฟางข้าว เมล็ดข้าว แกลบ และถั่วเหลืองป่น พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดในอาหารที่มีรำข้าวเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ Yusoff *et al.* (1991) ทำการเพาะเลี้ยง *A. terreus* SUK-1 ในสภาวะ solid state และ submerge culture โดยมี sugar cane bagasse เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state เชื้อสามารถผลิต reducing sugar และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ submerge culture เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Grajek (1987) ซึ่งนำ *Thermoascus aurantiacus* และ *Sporotrichum thermophile* มาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state และ submerge culture พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ submerge culture

7.4 ความเป็นกรด จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญ และมีกระบวนการชีวเคมีในสภาพที่เป็นกลาง อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์หลายชนิดมีการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดหรือด่างมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น เช่น Immanuel *et al.* (2007) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* และ *A. fumigatus* ในอาหารที่มีกาบมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดที่พีเอช 5 สอดคล้องกับ นฤมล (2544) ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 ใน cellulose broth พบว่าพีเอช 5.5 มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด และที่พีเอช 3 ไม่พบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Oikawa *et al*. (1994) ที่เพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 ใน cellulose broth และพบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือพีเอช 5.5

7.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง เช่น Haq *et al.* (2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* UM-11 ใน CMCbroth ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือ 28 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานของ Kathiresan and Manivannan (2006) ทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium fellutanum* ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด รองลงมา คือ 20 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนจิตตเสน (2529) ได้ศึกษา *Homicola nigrescens* CM33 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 45 องศาเซลเซียส และไม่พบการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฟางข้าวป่นเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 40 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ไม่มีการผลิตเอนไซม์เช่นกัน ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับ Immanuel *et al.* (2007) พบว่า *Aspergillus niger* และ *A. fumigatus* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกาบมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่า enzyme activity สูงที่สุด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี sawdust เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อให้ค่า enzyme activity สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันกับ Ray *et al.,* (2007) ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CY5 และ *Bacillus circulans* TP3 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่เมื่อ Stutzenberger (1971) ทำการเพาะเลี้ยง *Thermomonospora curvata* พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีในอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และจากรายงานของ ภัทรา และคณะ (2551) พบว่า *Clostridium thermocellum* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีเมื่อทำการเพาะเลี้ยงใน cellulose broth บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่ต้องการออกซิเจนซึ่งจะเห็นได้ว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

7.6 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ดังเช่น Pothiraj *et al.* (2006) การเพาะเลี้ยง *Rhizopus stolonifer* ในอาหารที่มี cassava waste เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 2 และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดในวันที่ 10 จากการทดลองของจิตตเสน (2529) การเพาะเลี้ยง *Trichoderma reesei* Rut C-30 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 7 วัน เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และในการเพาะเลี้ยง *Homicola nigrescens* CM33 ในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่าเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ วันที่ 5 เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Kathiresan and Manivannan (2006) เพาะเลี้ยง *Penicillium fellutanum* ในสภาวะ submerged fermentation เมื่อนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 1-6 วันพบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน มีค่า enzyme activity เท่ากับ 79 U/ml แต่ Liu and Yang (2006) ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CY5 และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bacillus circulans TP3 เป็นระยะเวลา 24-120 ชั่วโมง พบว่าผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดกันใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดต่างกัน

8. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan *et al*., 1987)

8.1 β-glucosidase จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น เป็นเอนไซม์ที่จำกัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate limiting enzyme) ทำให้มีการสะสมของ cellobiose ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด จากการศึกษาของ Selby and Maitland (1967) พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ต้องทำงานร่วมกัน จึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดี แต่เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง

8.2 สารที่มี configuration คล้ายสารตั้งต้น จะยับยั้งการรวมตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้ เช่น methyl cellulose และ gluconolactones เป็นต้น โดยจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ทำให้การย่อยเซลลูโลสเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

8.3 สารพวก polyols และ erytritol จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glucosidase และ galactosidase โดย erythritol จะรวมตัวกับเอนไซม์ตรงจุด C_3 - C_6 ของ D-glucose

8.4 โปรตีนของเอนไซม์ ถูกทำให้เสียสภาพโดยสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับ SH-group เช่น mercuric ions แต่อาจแก้ไขโดยใช้ cysteine และ chloride ions

8.5 เอนไซม์ endopeptidase สามารถลดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่เอนไซม์ exopeptidase ไม่สามารถย่อยเอนไซม์ exocellulase ที่อยู่ในสภาพปกติ และพบว่าเซลลูเลสสามารถคงทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป

8.6 การทำงานของเอ็นไซม์เซลลูเลสขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์ซึ่งแล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.7 เอนไซม์เซลลูเลสอาจถูกยับยั้งโดย melanin ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด และอาจถูกยับยั้งโดยสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน หรือคอลลอยด์ต่างๆในดิน

8.8 Clay minerals อาจเป็นอุปสรรคต่อการย่อยเซลลูโลสในดินได้ เพราะสามารถดูดซับเซลลูเลส และสารผลิตภัณฑ์บางชนิดได้ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ไม่สามารถทำงานเต็มประสิทธิภาพ

9. *Thermobifida fusca* PA 1-1

Thermobifida fusca PA 1-1 เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นโคโลนีสีขาว สร้างสปอร์มีลักษณะละเอียด และเจริญได้ดีเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนอาหาร nutrient agar เมื่อย้อมแกรมพบว่าติดสีแกรมบวก

Thermobifida fusca เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีท โดยจำแนกอยู่ใน

Phylum: *Actinobacteria*

Class: *Actinobacteriadae*

Order: *Actinomycetales*

Family: *Nocardiopsaceae*

Genus: *Thermobifida*

Specie: *fusca*

ลักษณะของจุลินทรีย์ชนิดนี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง พบได้ในแหล่งวัสดุทางชีวภาพที่มีการย่อยสลาย เป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดซึ่งสามารถย่อยสลายผนังเซลล์พืช โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและลิกโนเซลลูเลส มีบทบาทสำคัญในการศึกษาด้านการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยชีวมวลทางการเกษตร อุตสาหกรรมกระดาษ และการกำจัดขยะ เอนไซม์ที่ได้มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงและพีเอชในช่วง 4-10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. กระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ

เนื่องจากเซลลูโลสในธรรมชาติไม่ได้ประกอบด้วยเซลลูโลสเพียงอย่างเดียว แต่มีสารอื่นประกอบอยู่ด้วย เช่น lignin, pectin และ hemicellulose เป็นต้น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

องค์ประกอบทางเคมี	ฟางข้าว	ขี้เลื่อย	ซัง ข้าวโพด	เปลือก ข้าวโพด	ต้น ข้าวโพด
ค่าวัสดุแห้ง(DM)	90.16	57.99	25.87	22.28	21.27
โปรตีน (CP)	5.23	1.6	5.22	6.18	8.18
ไขมัน (EE)	0.93	0.35	1.46	1.12	2.02
เยื่อใยหยาบ (Crude fiber)	29.78	64	33.19	30.74	28.66
คาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ง่าย (NFE)	44.20	16	62.34	61.62	54.33
เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายเป็นกลาง (NDF)	64.01	46.49	78.35	76.07	62.97
โพแทสเซียม	-	0.21	0.58	-	-
ลิกนิน	3.77	41.24	7.05	3.20	5.59
เซลลูโลส	35.57	27.18	31.95	34.94	32.1
เฮมิเซลลูโลส	24.67	10.62	39.35	37.93	25.28
โซเดียม	-	0.02	-	-	-
ฟอสฟอรัส	0.15	0.04	0.14	0.17	0.3
แมกนีเซียม	-	0.10	0.02	-	-

ที่มา : จีระวัชร์ (2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อกำจัดสารอื่น ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสทำงานได้สะดวกขึ้น โดยการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งมีหลายกระบวนการทั้งกระบวนการทางกายภาพ (Physical pretreatment) การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมี (Chemical pretreatment) และการปรับสภาพโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological pretreatment) อย่างไรก็ตามการเลือกแต่ละกระบวนการปรับสภาพจะส่งผลต่อโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนั้นจำเป็นต้องทราบถึงชนิด โครงสร้างทางเคมีและองค์ประกอบอื่น ๆ ของวัสดุเหลือทิ้งแต่ละชนิดเสียก่อน ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการดำเนินการ และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

10.1 chemical treatment เช่นการใช้กรด (Acid hydrolysis) การใช้ด่าง (Alkaline hydrolysis) การใช้สารละลายอินทรีย์ (Organosolve) การใช้โอโซน การกำจัดลิกนินในเซลลูโลสด้วยซัลไฟท์ (Sulfite pretreat to overcome recalcitrance of lignocelluloses, SPORL) การใช้ของเหลวไอออนิก (Ionic liquid) เป็นต้น

10.1.1 Alkaline treatment

10.1.2 Acid treatment การปรับสภาพ substrate ด้วยกรดแก่หรือด่างแก่ เช่น sulphuric acid (H_2SO_4) หรือ sodium hydroxide (NaOH) จะมีผลทำให้การย่อยสลายเซลลูโลส โดยเซลลูเลสเพิ่มขึ้น การใช้ NaOH ในการปรับสภาพจะมีผลทำให้ lignin และ hemicellulose ละลายน้ำออกมา ส่วนการปรับสภาพด้วยกรดจะทำให้ hemicellulose ละลายน้ำได้ (Moo – Young *et al*., 1978)

10.1.3 Oxidizing agents treatment ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้ได้แก่ $NaC1O_2$, $KBrO_2$, KIO_3, SO_2, และ O_3

10.2 Physical treatment

10.2.1 การใช้ความร้อนและความดัน

10.2.2 การลดขนาดของสารโดยใช้วิธีบดหรือโม่บด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.2.3 Steam explosion process หลักการคือทำให้วัสดุเหลือใช้ที่มีเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบอิ่มตัวด้วยไอน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง เมื่อลดความดันลงน้ำจะระเหยอย่างรวดเร็วจะทำให้ fiber แยกออกจากกัน เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา ความชื้นและอุณหภูมิสูงจะทำให้พืชปลดปล่อยกรดออกมาซึ่งมีผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลสด้วย ดังนั้นกระบวนการนี้มีทั้งผลทางฟิสิกส์และทางเคมีอีกด้วย (Dale and Moreira, 1982) การปรับสภาพ substrate นั้นส่วนใหญ่นิยมใช้หลายวิธีร่วมกัน เช่น อาจใช้ด่างร่วมกับความร้อน หรือใช้วิธีการบดร่วมกับการใช้กรด เป็นต้น

Han and Callihan (1974) ได้ทำการทดลองปรับสภาพฟางข้าวและชานอ้อยโดยใช้ 4 เปอร์เซ็นต์ NaOH 15 นาที 100 องศาเซลเซียส พบว่าทำให้การย่อยสลาย cellulose โดยใช้เชื้อ *Cellulomonas* spp. เพิ่มจาก 29.4 เปอร์เซ็นต์ เป็น 73 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ได้ทำการปรับสภาพด้วย H_2SO_4 แต่ปรากฏว่าไม่พบอัตราการย่อยสลายและได้ทดลองใช้วิธีบด (grinding) การใช้ความดันสูงๆ ปรากฏว่ามีผลเพียงเล็กน้อยต่อการย่อยสลาย

Miron and Daniel (1981) ได้ใช้ SO_2 O_3 และ NaOH ในการปรับสภาพ cotton straw แล้วนำสับสเตรทที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ย่อยสลายต่อโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส จาก *Trichoderma reesei* ผลการทดลองปรากฏว่า SO_2 (ปรับสภาพที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง) ไม่สามารถลดปริมาณ lignin แต่ลดปริมาณ hemicellulose ลง 48 เปอรเซ็นต์ การใช้ O_3 (1 กรัมโอโซน/5 กรัมcotton straw) ลดปริมาณ lignin ลง 40 เปอร์เซ็นต์ และ hemicellulose 54 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการpretreat ด้วย NaOH (25 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก / ปริมาตร 1 สัปดาห์) ไม่สามารถละลายส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืชได้

Chen and Gong (1982) ได้ทำการย่อยสลาย microcrystalline cellulose และ Avicel โดยใช้เอนไซม์ cellulases จากเชื้อ *trichoderma viride* โดยปรับสภาพด้วยสารละลายเข้มข้นของ$ZnCl_2$ และ HCl ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ความร้อน 145 องศาเซลเซียส 6 นาที เมื่อเย็นแล้วนำไปตกตะกอนด้วย acetone แล้วจึงนำเซลลูโลส ไปย่อยสลายโดยเอนไซม์ต่อไป

Vidand (1982) ได้ใช้วิธีทางฟิสิกส์และทางเคมีในการปรับสภาพฟางข้าวก่อนที่จะไปย่อยสลายโดยเอนไซม์ พบว่าการใช้การบด (grinding) และตามด้วยการใช้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส 30 นาที จะเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้มาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mes – Hartree *et al.* (1983) ปรับสภาพฟางข้าวบาร์เล่ย์ ฟางข้าวสาลี ต้นข้าวโพด และต้นอัลฟาฟา โดยวิธีทำให้เนื้อเยื่อแยกออกจากกันด้วยไอน้ำร้อน (steam explosion) ก่อนที่จะนำไปย่อยสลายโดยเอนไซม์ cellulases จากเชื้อ *Trichoderma E58*

Rao *et al.,* (1983) ได้ทำการทดลองปรับสภาพชานอ้อยด้วย 1 N NaOH ที่ทำให้ร้อน และ neutralize ด้วย HC1 และปรับสภาพด้วยไอน้ำเปรียบเทียบกับชานอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ ปรากฏว่าชานอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโดยการย่อยสลายของเซลลูเลส จากเชื้อ *Penicillium funiculosum* 17 เปอร์เซ็นต์ ปรับสภาพด้วยด่าง และ neutralize เปลี่ยนเป็นน้ำตาล 63 เปอร์เซ็นต์ และ ส่วนที่ปรับสภาพด้วยไอน้ำเปลี่ยนเป็นน้ำตาล 52 เปอร์เซ็นต์

Ginnivan *et al.* (1997) พบว่าการปรับสภาพหญ้าและฟางข้าวบาร์เล่ย์ด้วย NaOH 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะทำให้ย่อยสลายเซลลูโลส โดยเชื้อ *Thermomonospora fusca* และ *Pseudonorcardia thermophila* ดีขึ้น

พิไลลักษณ์ (2524) ไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่เตรียมจากชานอ้อย (bagasse) ลำต้นข้าวโพด (corn stalk) และกระดาษกรอง (filter paper) โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อเห็ด 3 ชนิด คือ เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Qye1) เห็ดแชมปิยอง (*Agaricus bisporus* (Lang) sing) และเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sagor caju* (Fr.) singer) เมื่อมีการปรับสภาพเซลลูโลสด้วยสารละลาย cadoxen จะทำให้การไฮโดรไลซ์ได้ผลดีกว่าไม่มีการปรับสภาพด้วย cadoxen กล่าวคือได้กลูโคสมากขึ้น จากการทดลองพบว่า เซลลูโลสจากชานอ้อยถูก Hydrolyse โดยวิธีดังกล่าวได้กลูโคสมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อเห็ดนางฟ้าในช่วงฤดูหนาวมีปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสมากกว่าเชื้อเห็ดชนิดอื่นๆ เป็นการแสดงว่า การเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าเป็นไปได้ดีกว่าเชื้อเห็ดอื่นๆ ในฤดูหนาว

กนก (2528) ศึกษาเชื้อที่แยกจากถังหมักก๊าซชีวภาพ ในสารอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดี และผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (ไซลาเนส) ได้ดีกว่าเอนไซม์เซลลูเลส ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ พบว่าเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อจะผลิตไซลาเนสได้ดีกว่าใช้ไซแลน (larch wood) ของบริษัท Sigma เชื้อจะผลิตเอนไซม์ และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ inoculum 4 เปอร์เซ็นต์ ในเปลือกข้าวโพด ขนาดเล็กกว่า 40 mesh ปริมาณของเปลือกข้าวโพดต่อ Mineral salt ที่ประกอบด้วย $NaNO_3$ 2 กรัม K_2HPO_4 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม $MnSO_4.H_2O$ 0.02 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$FeSO_4.7H_2O$ 0.02 กรัม และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เท่ากับ 2 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นของสารอาหารอยู่ในช่วง 6.75 – 7.00 อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส การศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้เป็น Inductive enzyme ซึ่งจะมีการผลิตเอนไซม์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น การเลี้ยงเชื้อในกลูโคส เซลโลไบโอส หรือไซโลสเพียงอย่างเดียวเชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดร่วมกับกลูโคส 0.01 เปอร์เซ็นต์ เซลโลไบโอส 0.2 เปอร์เซ็นต์ หรือไซโลส มากกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณการผลิตเอนไซม์จะมากขึ้นกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเพียงอย่างเดียว แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จะนานขึ้น การขยายระดับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรการผลิตให้มากขึ้นจะต้องเพิ่มรอบการเขย่าให้สูงขึ้น เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูง ส่วนการศึกษาการขยายระดับเบื้องต้นของการขยายระดับการผลิตใน Fermenter ขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรของสารอาหาร 1.5 ลิตร พบว่าการเพิ่มอัตราการให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้เร็วขึ้น แต่เวลาที่ให้กิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์จะนานขึ้น พีเอชของสารอาหารจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในช่วงแรกที่เชื้อมีการเจริญเติบโตจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นจะค่อยๆเพิ่มมากขึ้น โปรตีนของสารละลายจะเพิ่มขึ้นพร้อมๆ กับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ การศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่ผลิตได้พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0 – 6.5 และเอนไซม์ที่ผลิตได้จะทนต่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียล

จิตตเสน (2529) ศึกษาการแยกเชื้อราที่สามารถสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดิน มูลสัตว์ ไม้ผุ ใบไม้ผุ และปุ๋ยหมัก จำนวน 100 ตัวอย่าง บน cellulose agar ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้เชื้อรา 41 ไอโซเลท เป็น *Mucor* spp. 4 ไอโซเลท, *Humicola* spp. 17 ไอโซเลท *Aspergillus* spp. 14 ไอโซเลท *Torula* spp. 3 ไอโซเลท *Sporotrichum* spp. 2 ไอโซเลท และเชื้อที่ไม่สามารถบ่งชนิดได้ 1 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อราทั้งหมดไปทดสอบความสามารถในการสลายเซลลูโลสโดยวิธี congo red test เปรียบเทียบกับ *Humicola* sp. 27B และ *Myceliopthora thermophila* CM1 ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงที่มีในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่พบว่า *Humicola* sp. ไอโซเลท CM 33B มีความสามารถในการสลายเซลลูโลสดีที่สุด เมื่อทำการตรวจสอบถึงระดับสปีชีส์ ปรากฏว่าเป็น *Humicola nigrescens* CM 33B จากการนำเชื้อดังกล่าวไปศึกษาผลของปัจจัยบางประการต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าจากแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด ไนโตรเจน 6 ชนิด แหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมคือ carboxymethylcellulose และ ไนโตรเจน คือ potassium nitrate เชื้อนี้สามารถผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์ได้ดีในอาหารที่มี pH 5.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งได้แก่ ฟางข้าว แกลบ ขี้เลื่อย ที่ผสมและไม่ผสมรำข้าว พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีในฟางข้าวที่ไม่ผสมรำข้าว ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

จุฑารัญ (2544) ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนจากดินตามแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ได้ทั้งหมด 122 ไอโซเลท นำแต่ละไอโซเลทมาเพาะเลี้ยงบน carboxymethylcellulose (CMC) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย CMC ด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ congo red และ 1 M NaC1 ปรากฏผลของการเกิดวงใสรอบรอยเจริญของเชื้อเป็นจำนวน 77 ไอโซเลท และเมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลสโดยการเพาะเลี้ยงใน CMC broth เขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าไอโซเลท CMU 4-4 ให้ค่า enzyme activity สูงสุดเท่ากับ 0.066 ยูนิต/มิลลิลิตร และค่า specific activity เท่ากับ 0.110 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำไอโซเลท CMC4-4 มาศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อใน cellulose producing medium โดยมี CMC ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 7 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา12 ชั่วโมง วัดค่า enzyme activity และค่า specific activity ได้สูงสุดเท่ากับ 0.024 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 0.044 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีบางประการพบว่าไอโซเลท CMC4-4 เป็น *Bacillus subtilis*

นฤมล (2544) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทนร้อนที่มีผู้แยกได้จากตัวอย่างดินซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด จำนวน 2 ไอโซเลท คือ CMU4-4 และ T1-5 พบว่าไอโซเลท CMU4-4 คือ *Bacillus subtilis* และไอโซเลท T1-5 คือ *Bacillus coagulans* ทดสอบอาหารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือเลี้ยงใน cellulose broth ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH ของอาหาร 5.5 มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ carboxymethyl cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2 เปอร์เซ็นต์ tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัดกิจกรรมเอนไซม์ได้ 0.281 unit/ml และ specific activity 1.778 unit/mg protein ส่วน *Bacillus cougulans* T1-5 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เลี้ยงใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

cellulose broth ที่มี 0.4 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH ของอาหาร 5.5 มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ cellulose acetate เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2 เปอร์เซ็นต์ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัดกิจกรรมเอนไซม์ได้ 0.168 unit/ml และ specific activity 1.108 unit/mg protein

เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล pH 5.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส pH 4.0 – 8.0 ปฏิกิริยาสูงสุดเกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นปฏิกิริยาจะลดลง และจะคงที่เมื่อบ่มเป็นเวลา 60 นาที ส่วนเซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus coagulans* T1-5 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5.0 ความเสถียรไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส pH 4.8-6.0 และปฏิกิริยาเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที หลังจานั้นจึงลดลง และจะคงที่เมื่อบ่มเป็นเวลา 60 นาที เอนไซม์จาก *Bacillus subtillis* CMU4-4 จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทชนิดต่างๆได้แก่ carboxymethyl cellulose, locus bean gum, xylose และ Arabic gum แต่เอนไซม์จาก *Bacillus coagulans* T1-5 ไม่ทำปฏิกิริยากับ Arabic gum และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์กับ carboxymethyl cellulose เมื่อทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ทั้ง 2 ไอโซเลท มี glucose และ cellobiose เป็นองค์ประกอบ

กุศุมา (2547) ได้ศึกษาการผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยใช้ cellulosome-like multiezyme complex จาก *Bacillus circulans* B-6 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วย crude enzyme ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย พบว่าเปลือกข้าวโพดถูกย่อยได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย ซังข้าวโพด ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว และ degree of hydrolysis ของเปลือกข้าวโพดเท่ากับ 53.6 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการบ่มด้วยเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 30 ยูนิตของไซลาเนส และ 4.2 ยูนิตของ carboxymethyl cellulase (CMCase) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ ได้แก่ ไซโลส ไซโลไบโอส กลูโคส และเซลโลไบโอส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชนิดา (2547) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus firmus* K-1 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยใช้น้ำหมัก 500 มิลลิลิตร เมื่อมีเปลือกข้าวโพด 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรีย 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าด้วยความร้อน พบว่าการผลิตไซลาเนสเพิ่มขึ้นตามปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ การเจริญของเซลล์ และปริมาณโปรตีน สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสของ *Bacillus firmus* K-1 คือที่พีเอช 10.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยไซลาเนสที่ผลิตได้มีแอคติวิตี 0.96 U/ml ที่เวลาหมัก 24 ชั่วโมง

จารุวรรณ (2547) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108 *A. niger* TISTR 3425 *Trichoderma reesei* TISTR 3081 และ *Chaetomium globosum* TISTR 3093 ในการเลี้ยงแบบอาหารแข็งที่มีขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นสับสเตรท ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานแปรรูปไม้ยางพาราที่มีมากในภาคใต้ของประเทศไทยพบว่า เชื้อ *A. fumigatus* TISTR 3108 มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และให้ค่าแอคติวิตี้เท่ากับ 1.05 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 4 วันในสภาพที่สับสเตรทมีความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาผลของสปอร์เริ่มต้น พีเอชเริ่มต้น และชนิดของแหล่งไนโตรเจนโดยเปรียบเทียบระหว่างยูเรียและแอมโมเนียมไนเตรท ในการผลิตเอนไซม์ พบว่า การใช้สปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท พีเอชเริ่มต้นที่ 4 และใช้ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1.40 3.52 และ 3.55 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 4 วัน ส่วนการแปรสภาพขี้เลื่อยไม้ยางด้วยการบด การใช้ความร้อน และการใช้ด่างไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ปิยะมาศ (2547) ศึกษาการย่อยสลายวัตถุดิบ 3 ชนิด ได้แก่ ฟางข้าว แกลบ และขี้เลื่อย เพื่อคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล พบว่าฟางข้าวสามารถให้ผลผลิตน้ำตาลไซโลสสูงที่สุดโดยมีสภาวะในการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 126 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ที่อัตราส่วนระหว่างฟางข้าวต่อสารละลายกรดซัลฟิวริกคือ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นทำการศึกษาการลดปริมาณสารพิษด้วยวิธีโอเวอร์ไลมิง และ ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าระยะเวลาในการลดสารพิษที่เหมาะสมคือ 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างผงถ่านกัมมันต์ต่อไฮโดรไลเสทเท่ากับ 1 ต่อ 100 น้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลระหว่างอาหารสังเคราะห์และไฮโดรไลเสท โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 พบว่าอัตราการผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำตาลไซลิทอลในอาหารสังเคราะห์ และไฮโดรไลเสทเท่ากับ 0.2730 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลส ตามลำดับ

ฆาสิณี (2548) ได้ศึกษาวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 4 ชนิด คือ แกลบ ฟางข้าว ต้นข้าวโพด และเปลือกสับปะรด ถูกนำมาปรับสภาพทั้งกายภาย และทางเคมี โดยกรดและเบส 6 ชนิดได้แก่ Acetic acid, Hydrochloric acid, Phosphoric acid, Sulfuric acid, Sodium hydroxide และ Potassium hydroxide เป็นเวลา 1 7 14 21 และ 28 วัน ที่ความเข้มข้น 2 M เพื่อให้เหมาะสมต่อการเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 โดยการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Semi-solid culture medium (SS medium) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเปลือกสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด Acetic acid เป็นเวลา 7 วัน จะถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณมากกว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดอื่นๆ คือได้น้ำตาลรีดิวซ์ 77.5 g/L ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงสุดเมื่อผ่านการปรับสภาพด้วยกรดหรือเบสในช่วงเวลา 1 – 14 วัน จากการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด – เบสตามระยะเวลาที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด มาหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้องพบว่าเปลือกสับปะรด (5 g) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย Sodium hydroxide เป็นเวลา 7 วัน ให้กรดมะนาวสูงสุดคือ 17.67 g/L ทั้งนี้ ประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2 เมื่อใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพจะมีค่ามากกว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 ของการหมักและมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป

สุภาวินี (2550) ได้ศึกษากากตะกอนเยื่อกระดาษจากระบบบำบัดน้ำเสียประกอบด้วยเซลลูโลส ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคสได้ โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. เรียกขั้นตอนนี้ว่า Saccharification เป็นขั้นตอนที่ประหยัดต้นทุนการผลิต ไม่ใช้สารเคมี และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม การศึกษาแบ่งได้ 3 ขั้นตอน คือ ลำดับที่หนึ่งศึกษาเปรียบเทียบความเหมาะสมของระบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการถ่ายและเติมอาหารครึ่งหนึ่งทุก 3 4 และ 5 วันตามลำดับ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อราประกอบด้วย Carboxymethyl cellulose 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าระบบกึ่งต่อเนื่องที่มีค่ากลูโคสสูงสุด คือ ระบบที่มีการถ่ายและเติมอาหารทุก 5 วัน มีค่ากลูโคสเฉลี่ย 0.486 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า conversion yield 4.86 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเอนไซม์แอคติวิตี้ 0.043 หน่วยต่อมิลลิลิตร การทดลองลำดับที่สอง คือ การนำเอนไซม์ที่แยกได้จากระบบกึ่งต่อเนื่อง ที่มีการถ่ายและเติมอาหารครึ่งหนึ่งทุก 3 4 และ 5 วัน มาใช้ย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า เอนไซม์ทั้งสามระบบสามารถย่อยกากตะกอนเยื่อกระดาษเป็นกลูโคสโดยเฉลี่ยประมาณ 0.273 0.214 และ 0.240 มิลลิกรัม และมีค่า conversion yield 2.73 2.14 และ 2.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการทดลองสุดท้าย คือ การนำกากตะกอนเยื่อกระดาษซึ่งเป็นแหล่งเซลลูโลสมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในระบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการถ่าย และเติมอาหารทุก 5 วัน โดยเปรียบเทียบการใช้สัดส่วนกากตะกอนเยื่อกระดาษที่แตกต่างกัน พบว่าระบบที่ใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีกลูโคสเฉลี่ย 0.270 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า conversion yield 2.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการทดลองนี้ยังสามารถปรับปรุงให้กลูโคสสูงขึ้น โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะให้เหมาะสม เช่น มีการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยกรด และการใช้อุณหภูมิสูงทำปฏิกิริยา

ศศิธร (2550) ศึกษาแบคทีเรีย 142 ไอโซเลท แยกจากตัวอย่างดิน มูลสัตว์ ขอนไม้ผุ และปุ๋ยหมัก ภายในภาคเหนือตอนบน จำนวน 40 ตัวอย่าง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร carboxymethylcellulose (CMC) agar บ่มที่อุณหภูมิ 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยวิธี congo red พบว่ามี 68 ไอโซเลท ที่ทำให้เกิดบริเวณใสรอบรอยเจริญของเชื้อ ซึ่งเมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเพาะเลี้ยงใน CMC broth พบว่าไอโซเลท CM12 ให้ค่า enzyme activity และ specific activity สูงที่สุด โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มี pH 6.5 มี CMC 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ และค่า specific activity ได้เท่ากับ 194.80 2.05 U/µg protein ตามลำดับ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีเบื้องต้นพบว่าไอโซเลท CM12 จัดอยู่ในจีนัส Bacillus สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ crude enzyme ของ *Bacillus* sp. CM12 คือ 50 องศาเซลเซียส และ pH 4.5 โดย crude enzyme นี้ สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น sucrose starch chitin และ inulin ได้เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. CM12 ในอาหารพื้นฐานที่มีใบไม้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ใบสัก และใบหูกวางถูกย่อยได้ดีกว่าใบพิกุล และใบลำไย เมื่อทำการย่อยใบสักที่มีความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์ บ่มเป็นเวลา 3 วัน และใบหูกวางที่มีความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ บ่มเป็นเวลา 9 วัน ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 270.59 ± 0.1 µg/ml 258.44 ± 0.1 U/ml 139.90 ± 1.1 µg/ml และ103.52 ± 0.8 U/ml ตามลำดับเมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. CM12 ในอาหารพื้นฐานที่มีใบหูกวางเป็นแหล่งคาร์บอน9 วัน ก่อนเติม *Zymomonas mobilis* TISTR551 พบว่าสามารถผลิตแอลกอฮอล์สูงที่สุด 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11. การหาพื้นที่ผิวการตอบสนอง (Response Surface Methodology)

การวิเคราะห์การหาพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) เพื่อหาการตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด ในการปรับปรุง พัฒนา จากสภาวะในการผลิตทั้งหมด (Raymond *et al*., 1995) และนำข้อมูลทางด้านปริมาณ (quantitative data) มาสร้างการวิเคราะห์เชิงถดถอย เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรและค่าตอบสนองในรูปของสมการทางคณิตศาสตร์ ซึ่งสามารถนำสมการเหล่านี้มาสร้างภาพกราฟสามมิติ (response surface plot) ที่แสดงระดับของตัวแปรในแนวระนาบและแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรและพร้อมกันนั้นยังสามารถแก้ปัญหาสมการหลายตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันของตัวแปรตอบสนอง (dependent variable) กับคุณลักษณะทางด้านปริมาณของผลิตภัณฑ์ กระบวนการ และพารามิเตอร์ที่ออกแบบ (ศิริวัลภา, 2547)

การศึกษาพื้นที่ผิวตอบสนองเป็นการสร้างพื้นที่ผิวตอบสนองเพื่อแสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนองที่มีต่อปัจจัยเชิงปริมาณที่เหมาะสมให้ได้ผลการตอบสนองที่ดีที่สุด วิธีการหาพื้นที่ผิวตอบสนองจึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ได้จริงในการวิเคราะห์ผลการทดลอง (รุ่งทิวา, 2543)

11.1 การออกแบบการทดลอง (ศิริวัลภา, 2547, และอนุวัตร, 2549)

โดยทั่วไปรูปแบบของพื้นที่ผิวตอบสนองนั้นมักจะพิจารณาในรูปแบบของสมการเส้นถดถอย (regression equation) ในการกะประมาณค่าพารามิเตอร์หรือสัมประสิทธิ์เชิงเส้นแบบถดถอย (regression coefficient) โดยทั่วไปมักแสดงในรูปสมการลำดับที่สอง (second order model) สำหรับแผนการทดลองที่รู้จักกันดี ได้แก่ 2k เซ็นทรัลคอมโพสิต (central composite design) หรือ 2k แฟคทอเรียล (factorial design) โดยพิจารณารูปแบบสมการลำดับที่สองที่มีตัวแปรอิสระ 3 ตัวซึ่งสามารถจะแสดงได้ดังสมการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$Y = \beta 0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon$$

(1)

เมื่อ Y คือ ตัวแปรตอบสนอง (dependent variable)

X_i คือ ตัวแปรอิสระตัวที่ 1

β_i คือ พารามิเตอร์

n คือ จำนวนข้อมูลหรือขนาดตัวอย่าง

ε คือ ความคลาดเคลื่อน

บางครั้งในการวางแผนการทดลองจะต้องทำการทดลองเบื้องต้น เพื่อช่วยในการกำหนดตัวแปรเริ่มต้น และช่วงที่เหมาะสมสำหรับแบบการทดลองที่สุด โดยช่วงของแต่ละตัวแปรเริ่มต้นในการออกแบบจะต้องทำการคัดเลือกอย่างระมัดระวัง และช่วงเหล่านี้ควรมีความครอบคลุมเพียงพอที่จะกำหนดผลการทดลองจริง ๆ ของแต่ละตัวแปรเริ่มต้นที่เหมาะสม การศึกษาตัวแปรตอบสนองต้องมีลักษณะของค่าตอบสนองที่เปลี่ยนแปลง โดยมีสาเหตุจากตัวแปรอิสระ (independent variable) จากนั้นจึงวางแผนการทดลองให้ครอบคลุมช่วงของระดับปัจจัย ส่วนใหญ่การวางแผนการทดลองที่นำมาใช้กันจะวางตัวอย่างที่สำคัญให้ใกล้กับจุดกึ่งกลางของช่วง เพื่อที่จะลดจำนวนของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ การวางแผนการทดลองจะขึ้นกับลักษณะของสมการที่ใช้ในการ fit ข้อมูลของการทดลองอีกด้วย ถ้าหากว่ามีการวางแผนเพียงพอ first – degree factorial ค่าของตัวแปรเริ่มต้นจะเกิดขึ้นเพียง 2 ระดับ แต่ถ้าหากว่าพิจารณาเป็น quadratic effect การวางแผนการทดลองจะขยายไปรวมเอาจุดที่เรียกว่า α-point ($\pm\alpha$) และจุดกึ่งกลางของตัวอย่างและจำนวนของระดับของปัจจัยต่อตัวแปรที่เพิ่มขึ้นจนถึง 5 ระดับ ซึ่งในการทดลองนี้จะมีการพิจารณาในรูปแบบของ first – degree factorial เนื่องจากปัจจัยที่ต้องการศึกษามีเพียง 2 ปัจจัย

11.2 การนำเสนอผลในรูปแบบของกราฟ (Graphical representation)

การอธิบายถึงความสำคัญของสมการเชิงเส้นแบบถดถอยและนัยสำคัญของตัวแปรอิสระ (independent variable) ที่มีความสัมพันธ์ต่อกัน จากการวิเคราะห์ด้วยสมการกำลังสอง จะได้ผลที่เป็นเส้นตรง หรือ response surface ที่เป็นเส้นค่าคงที่ของตัวแปรตอบสนอง ซึ่งจะอธิบายด้วยภาพโดยการใช้ปัจจัยอิสระ 2 ชนิด และให้ปัจจัยอิสระอื่น ๆ คงที่ การใช้วิธีการอธิบายด้วยภาพโดยการศึกษารูปร่างของ response surface และให้ค่าผลตอบสนองที่สูงสุดที่ตั้งขึ้นอย่างคร่าว ๆ เพื่อใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในโปรแกรมการพลอตแบบ contour plot และ surface plot จะเห็นผลของพารามิเตอร์ของกระบวนการต่อคุณภาพการผลิต ความแปรปรวนของการผลิต อย่างไรก็ดีการอธิบายด้วยภาพไม่มีความสามารถเพียงพอที่จะทำได้เมื่อมีตัวแปรอิสระมากกว่า 21 ตัวแปร และยากขึ้นเมื่อมีการแปลผลที่มีจำนวนผลตอบสนอง (dependent variable) เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงไม่ค่อยนิยมนำวิธีการที่ใช้ภาพอธิบายสำหรับการแก้ปัญหาที่มีผลตอบสนองหลายชนิด

วิธีการหาพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface methodology) มักจะนำมาใช้ในการกำหนดปัจจัยที่มีผลต่อสภาวะของการผลิตให้ได้การตอบสนองที่ดีที่สุด และมีความเฉพาะต่อกระบวนการผลิตหรือต่อผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังใช้ในการหาปัจจัยใหม่ ๆ ที่มีผลต่อการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้คุณภาพของการผลิต หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพมากกว่าเดิม ดังนั้นวิธีการหาพื้นที่ผิวตอบสนอง จึงเป็นวิธีการออกแบบการทดลองที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากมีปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อสภาวะการผลิตหลายปัจจัยร่วมกัน

Teri *et al.* (2007) ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โพลีกาแลกทูโรเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของเพคติเนส ด้วยวิธีการหาพื้นที่ผิวการตอบสนอง โดยกำหนดปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของมอลทริน corn steep liquor (CSL) ความเร็วรอบของการเขย่าและอัตราส่วนเชื้อตั้งต้น พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โพลีกาแลคทูโรเนสสูงสุดที่สภาวะความเข้มข้นของมอลทริน 120 กรัมต่อลิตร CSL 0 กรัมต่อลิตร ความเร็วรอบ 350 รอบต่อนาที และอัตราเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 2×10^7 cfu ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นถึง 74 เปอร์เซ็นต์

Sharma *et al.* (2006) ได้ผลิตเอนไซม์เพคติเนสที่มีคุณสมบัติทนต่อสภาวะด่างและทนอุณหภูมิสูงได้ โดยทำการวางแผนการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตด้วยวิธีการหาพื้นที่ผิวการตอบสนอง ได้กำหนดปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตทั้งหมด 3 ปัจจัย คืออัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน K_2HPO_4 และค่าพีเอช โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสสูงสุดที่คำนวณได้จากสมการเท่ากับ 20,184 U/L เมื่อกำหนดสภาวะการผลิตเอนไซม์ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 11 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และค่าพีเอชเท่ากับ 8.5 และเมื่อทำการผลิตเอนไซม์เพคติเนสตามสภาวะที่กำหนด พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสที่ได้มีค่าเท่ากับ 21,000 U/L ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่ได้จากการคำนวณ แสดงให้เห็นว่าสมการที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการหาพื้นที่ผิวการตอบสนองนั้นให้ผลที่น่าเชื่อถือได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มลนพรรษ (2551) ศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพคเตทไลเอสได้ดี จากการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของเพคตินเริ่มต้นที่ 15 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพคเตทไลเอส นอกจากนี้ยังทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพคเตทไลเอสด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ซึ่งประกอบด้วยปัจจัยหลัก 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเร็วรอบของการเขย่า (X_1, 100-300 รอบต่อนาที) อุณหภูมิ (X_2, 25-45 องศาเซลเซียส) และพีเอช (X_3, 5.5-9.5) จากโมเดล พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอชมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ โดยสมการกำลังสองที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) 0.9600 ($p<0.001$) สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพคเตทไลเอสสูงที่สุดเท่ากับ 84.5 U/ml คือความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการกวน และการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์เพคเตทไลเอสในถังหมักระดับปฏิบัติการขนาด 5 ลิตร โดยกำหนดอัตราการให้อากาศ 0.5-2.0 vvm ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที (กำหนดให้อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8) พบว่าที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ส่งผลให้กิจรรมของเอนไซม์เพคเตทไลเอสต่ำลง เนื่องจากแรงเฉือนมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์จึงต้องลดอัตราการกวนลง จากการทดลองในถังหมักระดับปฏิบัติการ พบว่าที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 สามารถผลิตเอนไซม์เพคเตทได้สูงที่สุดคือ 110.42 U/ml

นิสา (2552) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และผลิตโปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวไหมได้ดีที่สุด แยกได้จากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตเส้นไหม โดยเริ่มจากการคัดเลือกวัตถุดิบ และพบว่าแป้งมันไฮโดรไลซ์ แป้งถั่วเหลือง และ skim milk เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารเหนี่ยวนำที่เหมาะสมตามลำดับ เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Responsesurface methodology) โดยปัจจัยที่นำมาศึกษา คือปริมาณแป้งถั่วเหลือง ปริมาณ skim milk และความเร็วรอบในการเขย่า พบว่าสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 91.2 เปอร์เซ็นต์ โดยสภาวะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับฟลาสก์คือ แป้งถั่วเหลือง 2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) skim milk 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และความเร็วรอบในการเขย่า 280 rpm ให้ค่าทำนายของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 1,575.5 units/ml ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์มีค่ามากกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมถึง 2.2 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ยังได้เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. C4 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร เพื่อเป็นการยืนยันความสำคัญของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 โดยควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่พีเอช 7.5 อัตราการกวน 350 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm และค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ให้คงที่ตลอดการทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 1,898.1 units/ml โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร BMSM ในระดับฟลาสก์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

Thermobifida fusca PA 1-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ คัดแยกมาจากทลายปาล์ม เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อซึ่งผสมกับกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จาก นางสาว วาทินี คุณเผือก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารสูตร Minimal medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.,* 1988) ซึ่งประกอบด้วย Carboxymethylcellulose 10.0 กรัม ยีสต์ขนมปัง 0.5 กรัม $NaNO_3$ 1.2 กรัม KH_3PO_4 3.0 กรัม K_2HPO_4 6.0 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม $CaCl_2$ 0.05 กรัม $MnSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม $ZnSO_4.7H_2O$ 0.001 กรัม น้ำกลั่น 1ลิตร จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.0

2. อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 ตู้เขี่ยเชื้อ (microflow biological safety cabinet)
2.2 ตู้บ่มเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (temperature incubator)
2.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
2.5 ตู้อบอุณหภูมิ 105^0 C (hot air oven)
2.6 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerator centrifuge)
2.9 เครื่องเขย่าเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (thermo shaker)
2.10 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่จำเป็น (ดังระบุในแต่ละการทดลอง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารสูตร Minimal medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.,* 1988) ที่มีคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเตรียมกล้าเชื้อ *Thermobifida fusca* PA 1-1 ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่เก็บรักษาในอาหารเอียง Nutrient agar ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวปรับค่าความขุ่นของตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ให้ได้ 0.01 - 0.02 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ลงในอาหาร CMC broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 36 ชั่วโมง ถ่ายกล้าเชื้อปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหารเหลวสูตร Minimal medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total releasable soluble protein) ตามวิธีของ Bradford (1976) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูเลส

2. การศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ดูดกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีในข้อที่ 1 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหารสูตร Minimal medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.,* 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ ซังข้าวโพด ขุย-มะพร้าว แกลบ ฟางข้าว และขี้เลื่อย ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร วัสดุเหลือใช้เหล่านี้ผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วย 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ นึ่งในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง เมื่อเย็นแล้วล้างด้วยน้ำจนค่าพีเอชเป็นกลาง อบให้แห้งก่อนนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์ขนมปัง 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นาน 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total releasable soluble protein) ตามวิธีของ Bradford (1976) และวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์-บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวางแผนการทดลองหาแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลองของข้อมูลโดยวิธี One-Way ANOVA แบบ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมทางสถิติ

3. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ดูดกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีในข้อที่ 1 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงในอาหาร Minimal medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.,* 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมแหล่งคาร์บอนชนิดดีที่สุดจากข้อ 2 ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน สารสกัดยีสต์ ยีสต์ขนมปัง และสารสกัดมอลต์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นาน 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total releasable soluble protein) ตามวิธีของ Bradford (1976) และหากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส

การวางแผนการทดลองหาแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลองของข้อมูลโดยวิธี One-Way ANOVA แบบ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมทางสถิติ

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์คาร์-บอกซีเมทิลเซลลูเลสสด้วยพื้นที่ผิวแบบตอบสนอง (Response surface methodology)

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์คาร์-บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยถ่ายกล้าเชื้อตามวิธีในข้อ 1 ในอาหาร Minimal medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al*., 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมชนิดแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดจากข้อ 2 และเติมชนิดแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดจากข้อ 3 ในปริมาณ 0.02 0.5 1.75 3 และ 3.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Total releasable soluble protein) ตามวิธีของ Bradford (1976) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลส วางแผนการทดลองแบบ 2 ปัจจัย 5 ระดับโดยแต่ละทรีตเมนท์ประกอบด้วยการทดลอง 3 ซ้ำ และจัดลำดับการทดลองแบบสุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2

ปัจจัย A คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 5 ระดับประกอบด้วย

A_1 คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

A_2 คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

A_3 คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

A_4 คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 3.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

A_5 คือ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 3.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 5 ระดับประกอบด้วย

B_1 คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 0.02 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

B_2 คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

B_3 คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

B_4 คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

B_5 คือ ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 3.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ชุดการทดลองของปัจจัยทั้งหมดจำนวน 2 ปัจจัย ที่ระดับการทดลอง 5 ระดับ

Run number	Code level		ชุดการทดลอง	
	ปัจจัย A	ปัจจัย B	ปัจจัย A	ปัจจัย B
1	1	1	3	3
2	1	-1	3	0.02
3	-1	1	0.02	3
4	-1	-1	0.02	0.02
5	+1.414	0	3.52	1.75
6	0	+1.414	1.75	3.52
7	-1.414	0	0.02	1.75
8	0	-1.414	1.75	0.02
9	0	0	1.75	1.75
10	0	0	1.75	1.75
11	0	0	1.75	1.75

5. สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

5.1 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

5.2 ระยะเวลาในการวิจัย

การทดลองเริ่มต้นตั้งแต่เดือนมกราคม 2554 สิ้นสุด เดือนพฤษภาคม 2557

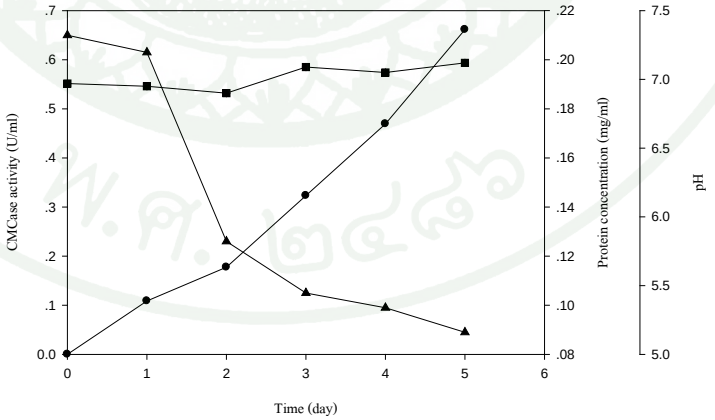
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน

1.1 การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้ซังข้าวโพด ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้อย่างต่อเนื่อง วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 0.661 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4 ขณะที่ค่าพีเอชในน้ำหมักค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.9-7.12 การศึกษาการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนคือ ยีสต์ขนมปัง ไม่สามารถวัดได้โดยตรง เนื่องจากยีสต์ขนมปังละลายไม่สมบูรณ์เหลือตะกอนบางส่วนปะปนมากับเซลล์ภายหลังการปั่นเหวี่ยง ดังแสดงในภาพที่ 5 ดังนั้นจึงเลือกวัดปริมาณโปรตีนในน้ำหมักจากส่วนใสด้วยวิธี Bradford (1976)



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ซังข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

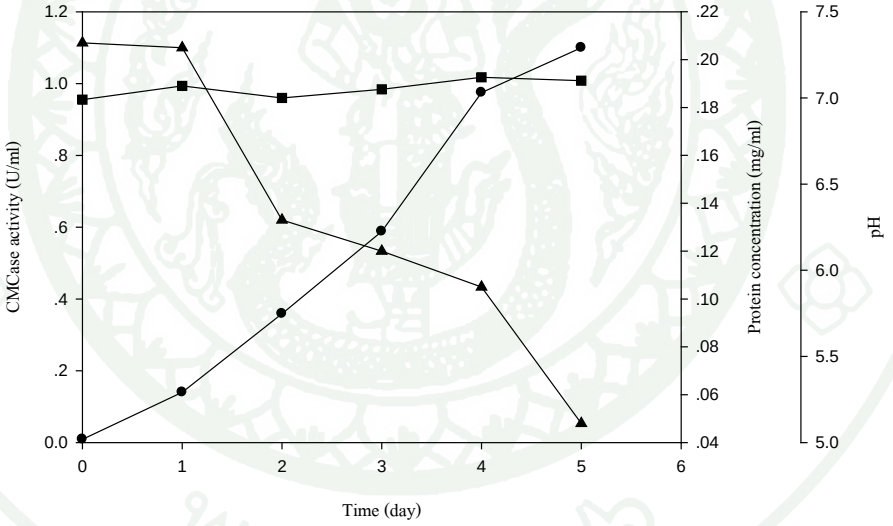
ภาพที่ 5 ลักษณะอาหารสูตร Minimal medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al*., 1988) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลิลิตร ที่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

เมื่อศึกษาการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารที่ใช้ซังข้าวโพด ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าโปรตีนที่วัดได้มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.089 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งรูปแบบการผลิตเอนไซม์ของ *T. fusca* PA 1-1 สอดคล้องกับการทดลองของ Tuncer *et. al.* (1999) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนโดไซลาเนส และเอนโดกลูคาเนส หรือคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermomonospora fusca* BD25 ด้วยการเติม oat-spelt xylan ปริมาณ 0.40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารชนิดเดียวกัน พบว่าการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง และวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.530 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24-48 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 หลังจากนั้นการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 178

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้ฟางข้าว ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าฟางข้าวสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 1.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 6 ขณะที่ค่าพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.99-7.12 เมื่อศึกษาการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารโดยวิธี Bradford (1976) พบว่าโปรตีนที่วัดได้มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.048 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

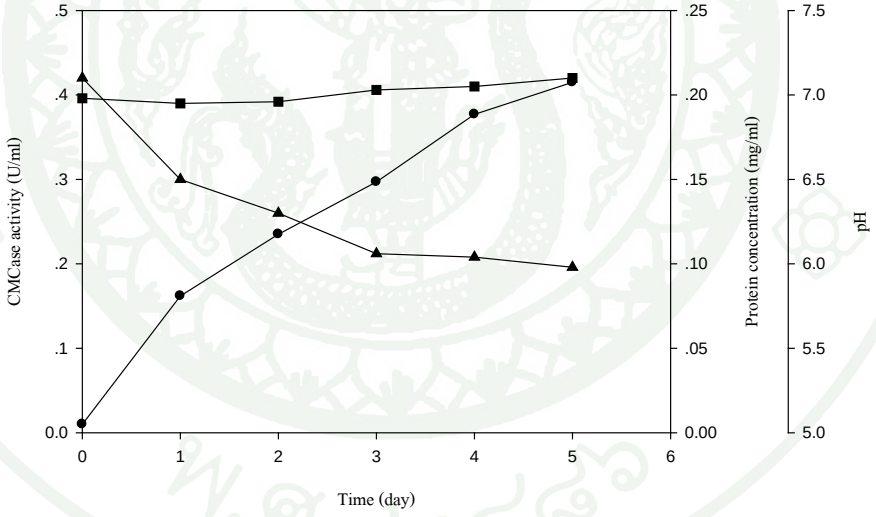


ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้ขุยมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้ขุยมะพร้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มสูงขึ้นอย่างคงที่ตลอดช่วงของการเพาะเลี้ยง วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 0.415 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 7 ขณะที่ค่าพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.95-7.1 เมื่อวัดการเจริญของเชื้อ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารด้วยวิธี Bradford (1976) พบว่าโปรตีนที่วัดได้มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 5 ปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

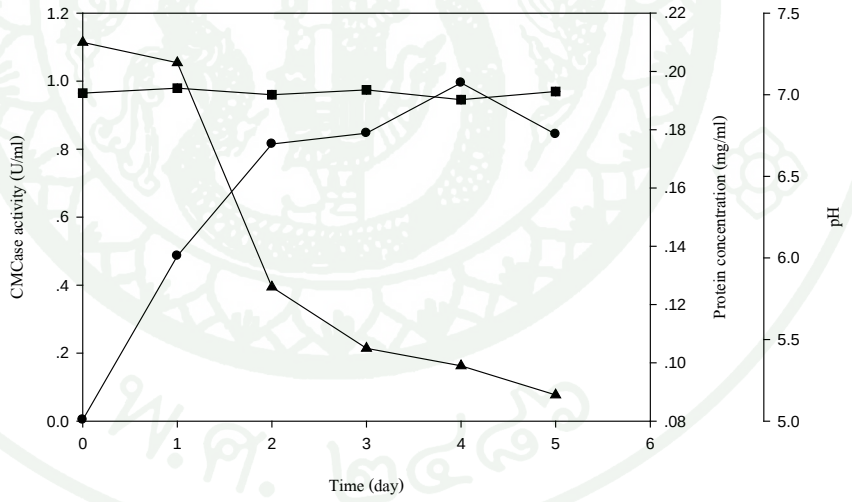


ภาพที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ขุยมะพร้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้เปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์-บอกซีเมทิลเซลลูเลสค่อนข้างคงที่ในช่วงวันที่ 3 และ 4 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสลดลงในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 0.995 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 8 ขณะที่ค่าพีเอชในน้ำหมักค่อนข้างคงที่โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.97-7.04 การเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารวัดด้วยวิธี Bradford (1976) พบว่าโปรตีนที่วัดได้มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 5 โดยปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.112 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

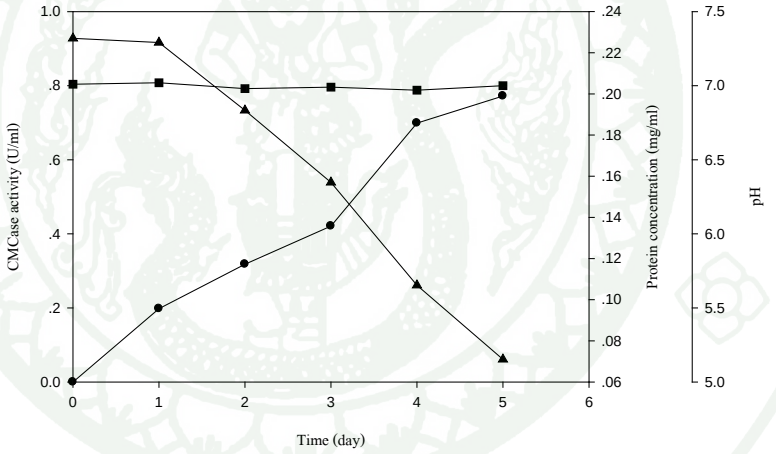


ภาพที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เมื่อใช้เปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.5 การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้ขี้เลื่อยเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยใช้ขี้เลื่อยความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 0.772 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.97-7.02 เมื่อวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) เพื่อวัดการเจริญของเชื้อพบว่าโปรตีนที่วัดได้มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.071 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 9



กราฟที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ขี้เลื่อยความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา คือ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ซังข้าวโพด ฟางข้าว ขุยมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และขี้เลื่อย พบว่าฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพสามารถ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุด เมื่อเทียบกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นๆ โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 1.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ มีองค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างที่ต่างกัน (Kuhand, 1993) ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ จากการทดลอง พบว่าฟางข้าวสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุด อาจเนื่องจากฟางข้าวมีส่วนประกอบที่เป็นเซลลูโลสมากถึง 35.57 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส 24.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการที่วัสดุเหลือทิ้งชนิดอื่นๆ เหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้น้อย เนื่องจากมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่น้อย และมีปริมาณซิลิกาและลิกนินสูงด้วย ฟางข้าวจึงเป็นอีกหนึ่งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์คาร์-บอกซีเมทิลเซลลูเลส

2. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

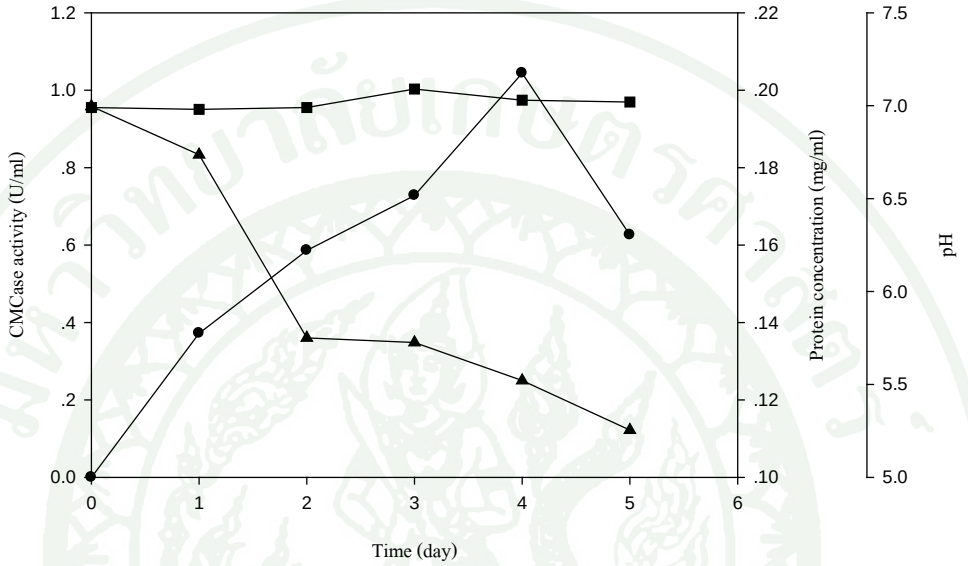
2.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เปปโตน (Peptone) แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate) สารสกัดยีสต์ (yeast extract) สารสกัดมอลต์ (malt extract) และยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหาร Minimal Medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al*., 1988) นาน 5 วัน วัดปริมาณการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พี-เอช และศึกษาการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารโดยการวัดปริมาณโปรตีนในน้ำหมักจากส่วนใสด้วยวิธี Bradford (1976) เพื่อหาปริมาณโปรตีน

ผลการทดลองเมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอซี-เมทิลเซลลูเลสอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกของการพาะเลี้ยง โดยการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสค่อนข้างคงที่ในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 1.044 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.98–7.09 เมื่อศึกษาการเจริญ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารซึ่งวัดด้วยวิธี Bradford (1976) พบว่าโปรตีนค่อนข้างคงที่ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และลดลดอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3 โดยปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



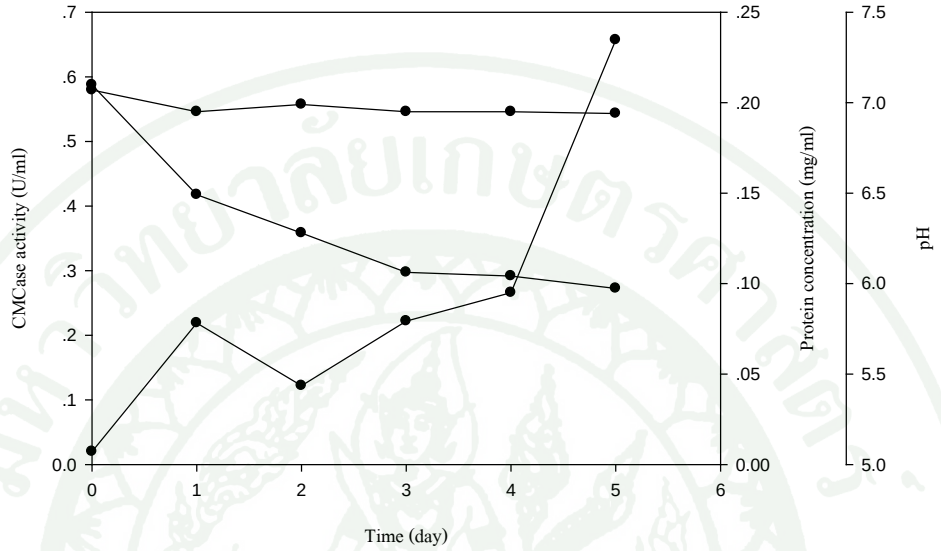
ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

2.2 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสได้คล้ายคลึงกับการใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน *T. fusca* PA 1-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการเพาะเลี้ยง โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.657 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่ระหว่าง 6.94–7.07 การเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารซึ่งวัดด้วยวิธี Bradford (1976)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พบว่าปริมาณโปรตีนสูงสุดในวันแรกของการเพาะเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าปริมาณโปรตีนลดลงอย่างคงที่ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง



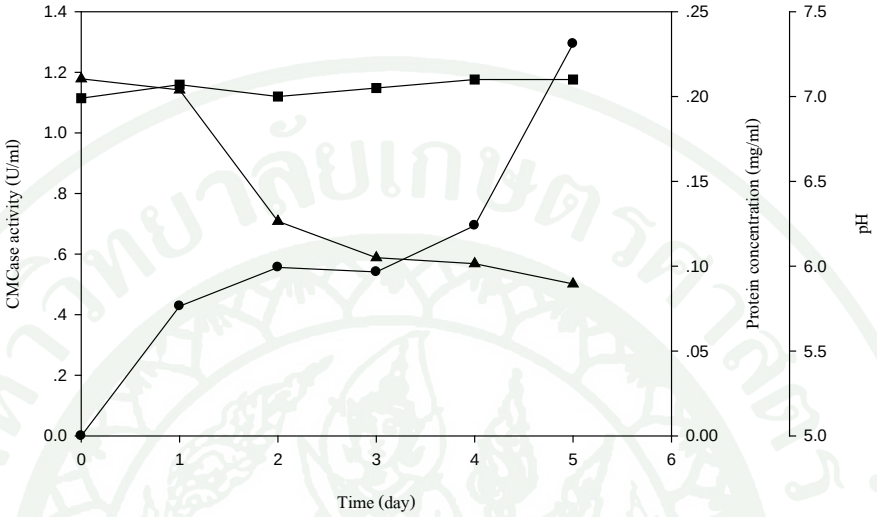
ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

2.3 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

การใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *T. fusca* PA 1-1 ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสได้คล้ายคลึงกับการใช้โดยเปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยการใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น *T. fusca* PA 1-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสอย่างคงที่ตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง และผลิตเอนไซม์อย่างรวดเร็วในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 1.294 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารซึ่งวัดด้วยวิธี Bradford (1976) พบว่าปริมาณโปรตีนลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีค่าเท่ากับ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่โดยมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.99–7.1



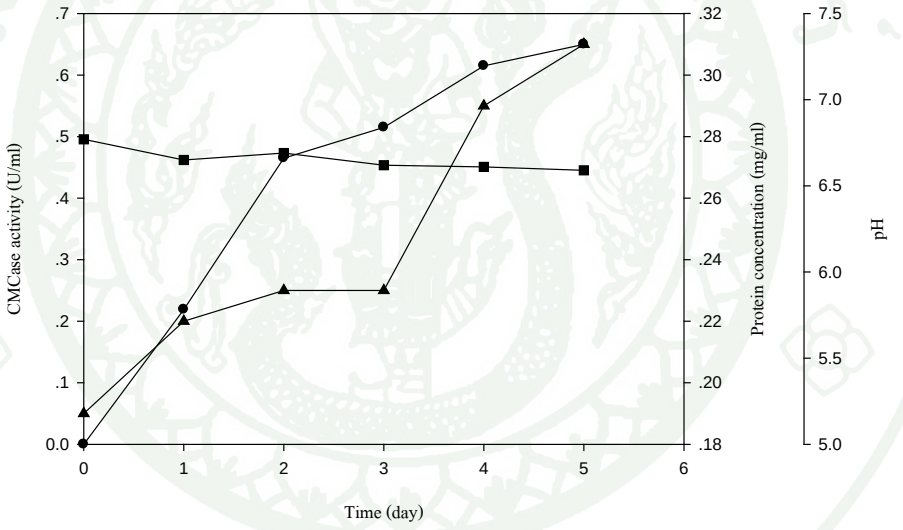
ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

รูปแบบการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหาร Minimal Medium ที่มีการใช้เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน สอดคล้องกับการทดลองของ Lima *et. al*. (2005) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในสูตรอาหาร Basal medium ชนิดเดียวกันจาก *Streptomyces drooozdowizii* ที่เติมคาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยีสต์สกัด 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่า เมื่อวัดการเจริญด้วยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) พบว่าน้ำหนักแห้งจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 0 จนถึง 1 และสูงสุดวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นเซลล์แห้งลดลงและคงที่จนถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้เท่ากับ 595 ยูนิตต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยสารสกัดมอลต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

การใช้สารสกัดมอลต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *T. fusca* PA 1-1 ผลิตเอนไซม์คาร์-บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารซึ่งวัดด้วยวิธี Bradford (1976) พบว่าปริมาณโปรตีนค่อนข้างคงที่ในวันที่ 2 และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงโดยปริมาณโปรตีนสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 0.485 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.99–7.1



ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดมอลต์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นที่สังเกตว่าเมื่อใช้มอลต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ในระดับต่ำ โดยเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของสารสกัดมอลต์นั้น พบว่ามีน้ำตาลมอลโตสมากถึง 42 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส เท่ากับ 9 1.2 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อพิจารณาโครงสร้างของน้ำตาลมอลโตสพบว่าเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เกิดจากการเชื่อมกันของน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล ด้วยพันธะ $\alpha(1\longrightarrow4)$ ซึ่งคล้ายกับน้ำตาลเซลโลไบโอสที่ประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคส 2 โมเลกุลเช่นกัน แต่เชื่อมกันด้วยพันธะ $\beta(1\longrightarrow4)$ จึงเป็นไปได้ว่าในอาหารที่เติมมอลต์สกัดอาจมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส การศึกษาของ Lin and Wilson (1987) พบว่าน้ำตาลทั้งชนิดรีดิวซ์และนอนรีดิวซ์มีผลในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจาก *T. fusca* XY โดยน้ำตาลกลูโคสมีผลในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสมากที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำตาลเซลโลไบโอส รองลงมาเป็นน้ำตาลไซโลส มอลโตส และกาแลคโตสตามลำดับ

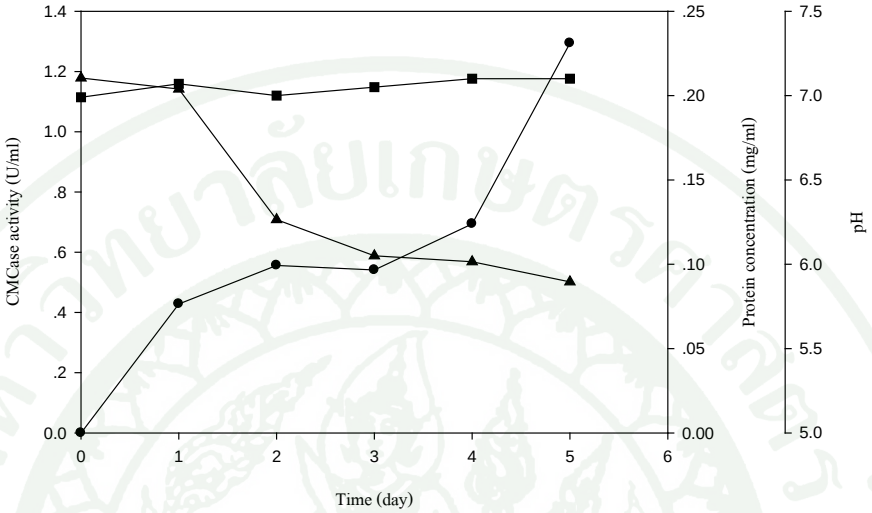
การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน สอดคล้องกับการทดลองของ George *et al*. (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermomonospora* sp. ในอาหาร Basal medium ชนิดเดียวกัน และเติม cellulose paper powder (CPP) ปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์เป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญ วัดการเจริญทางอ้อมจากโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ พบว่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในชั่วโมงเดียวกันเท่ากับ 0.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.5 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสโดยยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจน

การใช้ยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างต่อเนื่องตลอดการพาะเลี้ยง สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 1.251 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารซึ่งวัดด้วยวิธี Bradford (1976) พบว่าปริมาณโปรตีนค่อนข้างคงที่ในวันที่ 1 และลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงโดยปริมาณโปรตีนต่ำสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชในน้ำหมักค่อนข้างคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.99–7.1 จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 และการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่าคล้ายคลึงกับการใช้เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ยีสต์ขนมปัง ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

เมื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิล-เซลลูเลส โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เปปโตน (Peptone) แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate) สารสกัดยีสต์ (yeast extract) สารสกัดมอลต์ (malt extract) และยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) พบว่า เมื่อใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน *T. fusca* PA 1-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสได้สูงที่สุด รองลงมาคือ ยีสต์ขนมปัง เปปโตน สารสกัดมอลต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ การศึกษาของ Khadiga *et. al*. (2009) ซึ่งศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลสจาก *Bacillus alcalophilus* S39 และ *B. amyloliquefaciens* C2 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าการใช้เปปโตน beef extract และแอมโมเนียม-คลอไรด์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ยีสต์ขนมปังซึ่งมีราคาถูกเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนต่อไป ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของยีสต์ขนมปังที่มีต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ใกล้เคียงกับการใช้สารสกัดยีสต์ ดังนั้นยีสต์ขนมปังจึงเป็นทางเลือกที่อาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอนาคตซึ่งจะช่วยลดต้นทุนด้านการผลิตได้อย่างมากขึ้น

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 บนเครื่องเขย่าด้วยวิธีการหาพื้นผิวการตอบสนอง

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 บนเครื่องเขย่าด้วยวิธีการหาพื้นผิวการตอบสนอง ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ central composite design โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ทั้งหมด 2 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, X_1) และแหล่งไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, X_2) โดยมีรหัสของตัวแปร 5 ระดับ คือ $-\alpha$, -1, 0, +1 และ $+\alpha$ ดังแสดงในตารางที่ 4 ออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 11 การทดลอง โดยแสดงค่าของตัวแปรอิสระของแต่ละการทดลองในรูปของรหัสมิติ (dimensionless code, Xi) และปัจจัยการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที

การทดลองที่	แหล่งคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	แหล่งไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
1	3	3	0.39
2	3	0.5	0.42
3	0.5	3	0.74
4	0.5	0.5	0.39
5	3.52	1.75	0.45
6	1.75	3.52	1.04
7	0.02	1.75	0.4
8	1.75	0.02	0.32
9	1.75	1.75	0.87
10	1.75	1.75	0.9
11	1.75	1.75	0.89

นำค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้ multiple regression analysis ได้ค่าต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ค่าประมาณและการทดสอบสัมประสิทธิ์รีเกรชชั่นของสมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

พารามิเตอร์	ค่าประมาณ	*p*-value
Constant	-0.23	0.254
X_1	0.702	0.004
X_2	0.488	0.015
X_1X_2	-0.061	0.168
X_1^2	-0.184	0.004
X_2^2	-0.070	0.078

โดย ค่าตอบสนอง คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (CMCase activity)
R-squared (R^2) = 0.903

จากตารางที่ 5 จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์กับปัจจัยที่นำมาศึกษา (แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน) ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และนำมาสร้างตัวแบบของสมการถดถอย โดยมีสมการดังนี้

$$\textbf{CMCase activity (Y)} = 0.702X_1 + 0.488X_2 - 0.0061X_1X_2 - 0.184X_1^2 - 0.070X_2^2 + 0.23 \quad \textbf{(2)}$$

เมื่อ Y = กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลิลิตร)
X_1 = แหล่งคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)
X_2 = แหล่งไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ดังแสดงในตารางที่ 4 ด้วยการใช้ Multiple regression analysis ได้ค่าประมาณและการทดสอบสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสดังแสดงในตารางที่ 5 และสามารถสร้างตัวแบบของสมการ ซึ่งแสดงผลการตอบสนองของค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสระหว่างความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ระดับต่างๆ ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (สมการที่ 2)

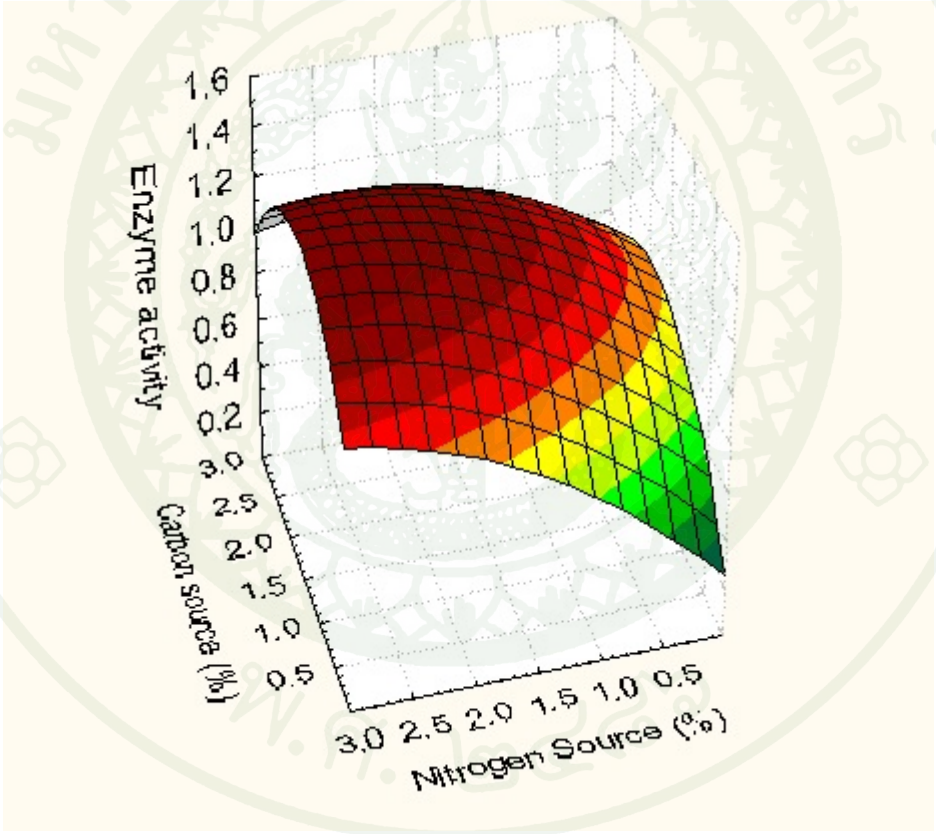
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของปัจจัยที่นำมาศึกษาจำนวน 2 ปัจจัยที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เท่ากับ 0.903 แสดงให้เห็นว่าปัจจัยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และสมการที่ 2 ที่สร้างขึ้นมีความแม่นยำในการใช้ทำนายค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน จากตารางภาคผนวกที่ ค7 ซึ่งแสดงค่าประมาณและการทดสอบสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ได้สมการถดถอยที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P=0.05) (ตารางผนวกที่ ค7) พบว่า ปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (X_1) และแหล่งไนโตรเจน (X_2) มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p<0.01)

อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสกับปัจจัยที่นำมาศึกษาในรูปแบบของการวิเคราะห์หาพื้นผิวการตอบสนอง (response surface plot) ด้วยการนำสมการที่ 2 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STATISTICA พบว่าสมการพื้นผิวการตอบสนองสามารถทำนายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่าง ๆ และกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และมีลักษณะของสมการแบบพาราโบลาที่แสดงให้เห็นถึงช่วงค่าของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (ภาพที่ 15) นอกจากนี้ยังพล็อตเส้นโครงร่างแบบ contour plot ควบคู่ไปเพื่อแสดงให้เห็นรูปร่างของพื้นผิวการตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น (ภาพที่ 16) ในการศึกษารูปแบบพื้นผิวตอบสนองนั้นเป็นการทำนายค่าของปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA 1-1 ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงที่สุด พบว่าช่วงค่าที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ได้สูง คือ แหล่งคาร์บอน 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแหล่งไนโตรเจน 3.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อพิจารณผลการทดลองในชุดที่ 6 9 10 และ 11 (ตารางที่ 4) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 3.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเป็นสภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงที่สุด เท่ากับ 1.04 0.87 0.9 และ 0.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากสมการพื้นผิวการตอบสนองจากเส้นโครงร่าง contour plot (ภาพที่ 16) สามารถทำนายค่าของสภาวะที่ส่งผลต่อการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยสภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด (ตั้งแต่ขอบเส้นสีแดงเข้าไป) อยู่ในช่วงแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 3.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ได้จริง นอกจากนี้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากการทำนายมีค่าเท่ากับ 1.323 ยูนิตต่อ

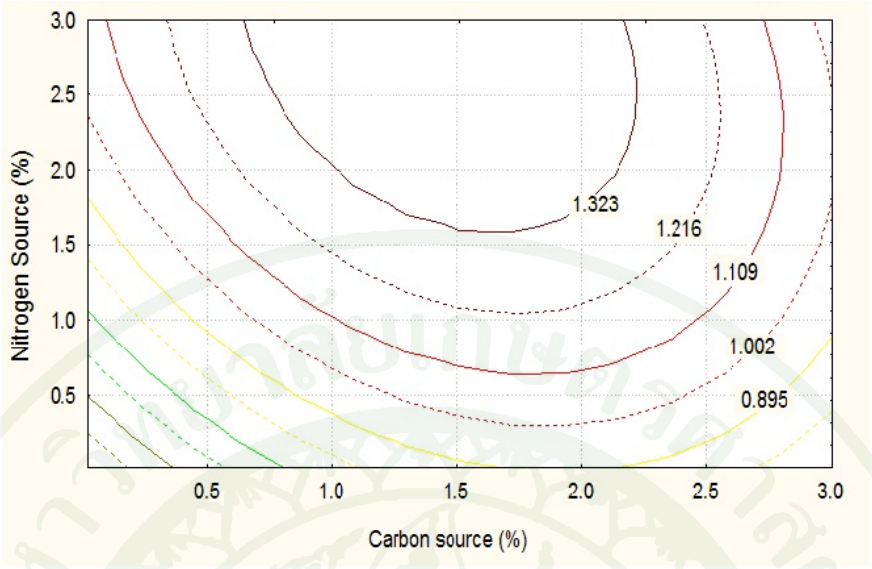
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิลลิลิตร มีค่าใกล้เคียงกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จริงจากการทดลองเช่นกัน เพื่อทดสอบและยืนยันความแม่นยำของการทำนายค่าจากการวิเคราะห์แบบพื้นผิวตอบสนองนั้น จึงคัดเลือกสภาวะจำนวน 6 สภาวะ ที่อยู่ในพื้นที่บริเวณด้านบนของแผนภาพ contour plot (ภาพที่ 16) ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการทำนายว่าเป็นสภาวะที่จะมีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ตั้งแต่ 1.323 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือมากกว่า เป็นตัวแทนในการยืนยัน สภาวะที่คัดเลือก ได้แก่ การเพาะเลี้ยงที่แหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1.5 1.75 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จึงนำสภาวะดังกล่าวไปทดลองซ้ำอีกครั้ง

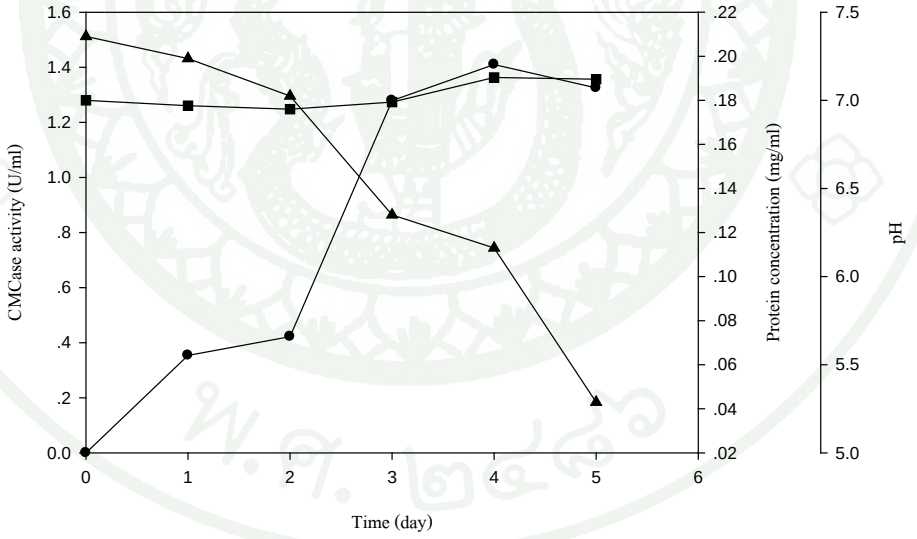


ภาพที่ 15 การวิเคราะห์หาพื้นผิวการตอบสนองของการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 โดยเพาะเลี้ยงนาน 4 วัน ที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนระดับต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 Contour plot ของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1



ภาพที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในฟลาสก์ เมื่อใช้ยีสต์ขนมปัง ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนและยีสต์ขนมปังความเข้มข้น 3.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-●-) ปริมาณโปรตีน (-▲-) และพีเอช (-■-)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลองเมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกของการพาะเลี้ยง และมีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 1.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยพีเอชของน้ำหมักค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.95–7.12 การเจริญของ *T. fusca* PA 1-1 ในอาหารซึ่งวัดด้วยวิธี Bradford (1976) พบว่าโปรตีนค่อนข้างคงที่ในวันแรกของการเพาะเลี้ยงและลดลดอย่างต่อเนื่องโดยปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบและยืนยันความแม่นยำของการทำนายค่าจากการวิเคราะห์แบบพื้นผิวตอบสนองในระดับฟลาสก์ พบว่าสภาวะที่ได้จากการทำนายค่านั้นมีความแม่นยำในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในระดับฟลาสก์นั้นควบคุมที่แหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์จากการทำนายด้วยพื้นที่ผิวตอบสนองเท่ากับ 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ดังกล่าว วัดกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้เท่ากับ 1.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำนายด้วยพื้นผิวตอบสนอง และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการปรับปรุงศักยภาพการผลิตทในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา คือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ซังข้าวโพด ฟางข้าว ขุยมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และขี้เลื่อย พบว่าฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการปรับสภาวะสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดโดยสามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 0.975 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นซังข้าวโพด เปลือกข้าวโพด ขี้เลื่อย และ ขุยมะพร้าว ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ มีองค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างที่ต่างกัน (Kuhand, 1993) ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ ดังนั้นฟางข้าวจึงเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ได้แก่ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดยีสต์ สารสกัดมอลต์ และยีสต์ขนมปัง ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเมื่อใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุด รองลงมาคือ ยีสต์ขนมปัง เปปโตน สารสกัดมอลต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้สูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 1.294 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความสำคัญเพื่อเป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหารสำหรับแอคติโนมัยซีทแต่มีราคาสูง งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ยีสต์ขนมปังซึ่งมีราคาถูกเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองขั้นต้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของยีสต์ขนมปังซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ใกล้เคียงกับการใช้สารสกัดยีสต์ ดังนั้น ยีสต์ขนมปังจึงมีศักยภาพสูงเพื่อการผลิตเอนไซม์ในอนาคตซึ่งจะช่วยลดต้นทุนด้านการผลิตได้อย่างมาก

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ด้วยวิธีวิเคราะห์จากการหาพื้นผิวตอบสนอง ประกอบด้วยปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าจากโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สมการกำลังสองที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) 0.903 ($p < 0.05$) โดยทำการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในระดับฟลาสก์ และออกแบบการทดลองชนิด full factorial design นำค่าการทดลองที่ได้จาก 11 ชุดการทดลอง วิเคราะห์ค่าทางสถิติ multiple regression analysis ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการทำนายเท่ากับ 1.323 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริง พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุด 1.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุด ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นพื้นฐานสำคัญในการเพิ่มศักยภาพการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. สมควรศึกษาวิธีการทำเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

2. สมควรศึกษาผลของไอออนต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์นี้ เพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้งานเอนไซม์ต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนก รัตนะกนกชัย. 2528. **การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร**.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทลัยาเกษตรศาสตร์.

กุศุมา แก้วอินทะจักร์. 2547. **การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดย cellulosome-like multienzyme complex จาก *Bacillus circulans* B-6**.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ฆาสิณี พูลพิพัฒน์. 2548. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* Yang no.2**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศรีนครินวิโรฒ.

จารุวรรณ มณีศรี. 2547. **การใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

จิตตเสน อรุณศรี. 2529. **การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราที่เจริญที่อุณหภูมิสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์. 2547. **ตารางคุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบอาหารสัตว์**. สำนักพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

จุฑารัญ ครุดิลกานันท์. 2544. **การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียทนความร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ชนิดา เลิศศลารักษ์, กนก รัตนะกนกชัย และคิน เลย์ คู. 2545. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต cellulose-free Xylanase จาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1. **วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ**. มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____. 2547. การผลิตไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลสในถังหมักที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนโดย alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1. **วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ**. มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี.

ชริดา ปุกหุต, จุฑามาส จิตต์เจริญ และอรัญญา พิมพ์มงคล. 2549. **การย่อยสลายแกลบข้าวเจ้าโดยวิธีชีวภาพด้วยเชื้อราที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้**. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 32**.** กรุงเทพมหานคร.

นฤมล นะธรรมโม. 2544. **สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทนร้อน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

น้อย เกษมสุขสกุล. 2529. **การผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูงบนวัสดุที่เป็นของแข็ง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิสา ร่มส้มซ่า. 2552. **สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ลอกกาวไหม จาก *Bacillus* sp. C4 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง**.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยะมาศ สระบัว. 2547. **การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการแปรรูปไม้เพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิไลลักษณ์ กุลวงศ์. 2524. **การไฮโดรไลซ์ด้วยเซลลูเลสที่สกัดจากเชื้อราชนิดต่างๆ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภัทรา ผาสอน, จักรกฤษณ์ ตชะอภัยคุณ, นิษก์นิภา สุนทรกุล, คิน เลย์ คู และกนก รัตนะกนกชัย. 2551. **การคัดแยกแบคทีเรียชอบร้อนที่เจริญในสภาวะไม่ต้องการอากาศเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มลนพรรษ สงพิมพ์. 2551. **การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพคเตทไลเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 ด้วยวิธีการหาพื้นผิวการตอบสนอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มุกดา ฐิตะสุต และนิ่มนวล โอกูม่า. 2527. **สารชีวโมเลกุล**. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ

รุจิกาญจน์ นาสนิท. 2546. **การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและยีนที่เกี่ยวข้องจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุ่งทิวา วันสุขศรี. 2547. **การสกัดโปรตีนในปลายข้าวหอมมะลิเพื่อทำแป้งข้าวเจ้าบริสุทธิ์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิมลทิพย์ ไตรปัญญา, จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, กนก รัตนะกนกชัย และคิน เลย์ คู. 2550. **การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วาทินี คุณเผือก. 2554. **การคัดแยก ศึกษาสมบัติ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมภพ สุวรรณรัฐ. 2529. **เอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigates.*, *Myceliophora thermophila.* และ *Trichoderma viride* บนอาหารแข็ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2544. **เอกสารคำสอนวิชาการสลายตัวและกระบวนการย่อยสลายด้วยวิธีชีวภาพ.** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุภาวินี นิลเขต. 2550. **การใช้ตะกอนเยื่อกระดาษเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกลูโคสและเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในปฏิกรณ์กึ่งต่อเนื่องขนาดระดับห้องปฏิบัติการ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร ไกรฤทธิชัย. 2550. **การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อยสลายใบไม้**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศิริวัลภา เกษศิลป์. 2547. **การผลิตและสมบัติของแป้งคาร์บอกซีเมทิลจากแป้งมันสำปะหลัง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนุวัตร แจ้งชัด. 2549. **สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์.** ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Barron, N., R. Marchant, L. Mchale and A.P. Mchale. 1995. Studies on the use of athermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharificationand ethanol formation from cellulose.**Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43:518-520.

Bayer, E.A., E. Morag and R. Lamed. 1994. The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology. **Trends Biotechnol**. 12:379–386.

Bhat.and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential applications. **Biotechnol.Adv**.15: 583-620.

Boisset, C., C. Petrequin, H. Chanzy, B. Henrissat and M. Schu¨lein. 2001. Optimized mixtures of Recombinant *Humicolainsolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. **Biotechnol.Bioeng**. 72:339–345.

Bok, J.D., D.A. Yernool and D.E. Eveleigh. 1998. Purification, characterization, and molecular analysis of Thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoganeapolitana*. **Appl. Environ. Microbiol**. 64: 4774-4781.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal.Biochem**. 72:248-254.

Chaudhary, P., N.N. Kumar and D.N. Deobagkar. 1997. The glucanases of *Cellulomonas*. **Biotechnol.Adv**. 15:315–331.

Chen, L. F. and C.S. Gong. 1982. Enzymatic hydrolysis of cellulose pretreatment with zinc chloride and hydrochloric acid. **Biotechnol.Bioeng.Symp**. 12:57-65.

Dale, E.B. and M.J. Moreira. 1982. A freeze explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. **Biotechnol.Bioeng**. 12:31-43.

Din, N., H.G. Damude, N.R. Gilkes, R.C. Miller, R.A.J. Warren and D.G. Kilburn. 1994. C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. **Proc. Natl. Acad. Sci**. **USA**. 91**:** 11383–11387.

Divne, C., J. Stahlberg, T. Reinikainen, L. Ruohonen, G. Pettersson, J.K.C. Knowles, T.T. Teeri and T.A. Jones. 1994. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei.* **Sci**. 265**:**524–528.

Edens, N. K., L. A. Reaves, M. S. Bergana, I. L. Reyzer, P. O. Mara, J. H. Baxter and M. K. Snowden. 2002. Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat *adipocytes* in vitro. **J. Nutr**. 132:1141-1148.

El-Nawwi, S.A. and A.A. El-Kader. 1996. Production of single-cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: effect of culture factors. **Biomass Bioenerg**. 11**:**361–364.

Ericksson, K.E.and T.M. Wood. 1985. Biosynthesis and biodegradation of wood component**.** **Academic press Ltd, London**.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____, L.R.A. Blanchette and P. Ander. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. **Springer-Verlag, New York, N.Y**.

Fan, L.T., M.M. Gharpuray and Y.H. Lee. 1987. Cellulose hydrolysis. **Springer-VerlagberlinHeidelberg**. London.

Franklund, C.V. and T.L. Glass. 1987. Glucose uptake by the cellulolytic ruminal anaerobe *Bacteroides succinogenes*. **J. Bacteriol**. 169:500–506.

George, S.P., Ahmad A. and Rao M.B. 2001. Studies on carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresour Technol**. 77:171–175.

Ginnivan, M.J., J.L. Woods and J.R. O'callaaghan. 1977. Thermophilic fermentation of pig faeces and strew by actinomycetes. **J. Appl. Bacteriol**. 43: 231-238.

Goksoyr, J. and J. Eriksen. 1980. Cellulase in economic microbiology. **Academic Press**. New York.

Grajek, W. 1987. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. **Appl.Microbiol. Biotechnol.** 26:126-129.

Gray, V. L., M. O. Reilly, C. T. Muller, I. D. Watkins and D. Lloyd. 2006. Low tyrosine content of growth media yields alflagellate *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. **Microbiology**. 152: 23-28.

Han, S.J., Y.J. Yoo and H.S. Kang. 1995. Characterization of bifunctional cellulase and its structural gene. **J. Biol. Chem.** 270**:**26012–26019.

Han, Y.M. and C.D. Callihan. 1974. Cellulose Fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth. **Appl. Microbial**. 27:159-165.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Haq, K., U. Hameed, K. Shahzadi, M. M. Javed, S. Ail and M. A. Qadeer. 2005. Cotton sacchrarifying activity of cellulase by *Trichoderma harzianum* UM-11 in shake flask. **Int. J. Botany.** 1(1):19-22.

Haq, K., K. Shahzadi, U. Hameed, M.M. Javed and M. A. Qadeer. 2006. Solid-state fermentation of cellulase by locally isolated *Trichoderma harzianum* for the exploitation of agriculture by-products. **Pakistan J. Biological Sci**. 9(9):1779-1782.

Henrissat, B., H. Driguez, C. Viet and M. Schu¨lein. 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. **Bio/Technology**. 3**:**722–726.

Holtzapple, M., M. Cognata, Y. Shu and C. Hendrickson. 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnol.Bioeng**. 36**:**275–287.

Immanuel, G., C.M.A. Bhagavath, P.I. Raj, P. Esakkirajand A. Palavesam. 2007. Productionand partial purification of cellulase by *Aspergillusniger* and *A. fumigates* fermented incoir waste and sawdust. **The Internet J.Microbiol.** 3(1):1-12.

Irwin, D.C., M. Spezio, L.P. Walker and D.B. Wilson.1993. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. **Biotechnol.Bioeng**.42:1002–1013.

Iwashita, K., K. Todoroki, H. Kimura, H. Shimoi and K. Ito. 1998. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β-glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **BioscienceBiotechnol.Biochemistry**. 62(10):1938-1946 .

Kalra, M.K. and D.K. Sandhu. 2004. Optimal production of cellulolytic enzymes and theirlocation in *Trichoderma pseudokinigii*. **Biotechnol.Bioengineering**. 27(10):1445-1450

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Khadiga, A. T. A. A., W. A. Mashhoor, A. N. Sharaf and H. M. A. A. Hoda. 2009. Nutritional and enviromental factors affecting cellulose production by two strains of celulolytic Bacilli. **Autralian J. Basic and App. Sci**. 3(3): 2429-2436.

Kathiresan, K. and S. Manivannan. 2006. Cellulase production by *Penicillium fellutanum* isolated from costal mangrove rhizosphere soil. **Res. J.Microbiol.** 1(5):438-442.

Kauri, T. and D. J. Kushner. 1985. Role of contact in bacterial degradation of cellulose.**FEMS Microbiol.Ecol.** 31:301–306.

Kuhand, R. C. 1993. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospect. **Critical Reviews in Biotechnology**, Vol. 13, pp.151-172.

Lee, B.H. and T.H. Blackburn. 1974. Cellulase production by themophilic *Clostridium* species. **Appl.Microbiol.** 30(3):346-353.

Lima, A. L. G., R.P. Nascimento, E. P. S. Bon and R. R. R. Coelho. 2005. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**. 37: 272-277.

Lin, E. and D.B. Wilson. 1987. Regulation of ß-1,4-Endoglucanase synthesis in *Thermobifida fusca.* **App. and Environ. Microbiol**. 53:1352:1357.

Lischig, T. 1998. Hemicellulasen Von *Penicillium simplicissimum*: produktion, charakterisicrung und Anwendung in Der biobleiche. Doctoral thesis. **Graz University of Technology**.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Liu, J. and J. Yang. 2006. Cellulase producing by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry**. Food Technol. Biotechnol.** 45(4):420-425.

Lusterio, D.D., F.G. Suizo, N.M. Labunos, M.N. Vallendor, S. Ueda, S. Kawai, K. Koike, S. Shikata, T. Yoshimatsu., S. Ito. 1992. Alkali- resistant, alkaline endo-1,4-β-glucanase produced by *Bacillus* sp. PKM-5430.**Biotech.Biochem**.56(10): 1671-1672.

Lynd, L.R., P.J. Weimer, W.H. Zyl and I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization. **Fundamental and Biotechnol**. 66: 506-577.

Medve, J., J. Stahlberg and F. Tjerneld. 1994. Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I andcellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. Biotechnol.Bioeng. 44:1064–1073.

Medve, J., J. Karlsson, D. Lee and F. Tjerneld. 1998. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by Cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. **Biotechnol.Bioeng**. 59:621–634.

Mes - Hartree, M., C. Hogen, R. D. hayesand J. N. Saddler. 1983. Enzymatic hydrolysis of *Trichoderma* cellulases and the fermentation of the liberated sugars to ethanol. **Biotechnol.** Let. 5:101-106

Messner, R., K. Hagspiel and C.P. Kubicek. 1990. Isolation of a ß-glucosidase-binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei.* **Arch. Microbiol.** 154:150–155.

Milala, M.A., A. Shugaba, A. Gudado, A.C. Ene and J.A. Wafar. 2005. Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*. **J. Agri and Biol Sci.** 1(4):325-328.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Miller, G.M., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal.Chem. 31, 426-428.

Miron, J. and B.G. Daniel. 1981. Effect of chemical treatments on the degradability of cotton strew by rumen microorganism and by fungal cellulose. **Biotechnol.Bioeng**. 23:2863-2873.

Moo-Yang, M., D. S. Chahal and D. Vlach. 1978. Single cell protein from various chemically pretreated wood substrates using *Chaetomium cellulolyticus*. Biotechnol.Bioeng. 20: 107-118.

Mosier, N. S., P. Hall, C. M. Ladisch, and M. R. Ladisch. 1999. Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 65:23–40.

Moussa, T.A.A. and N.A. Tharwat. 2007. Optimization of cellulase and β-glucosidase induction by sugarbeet pathogen *Sclerotium rolfsii*. **Afr. J. Biotechnol.** 6(8):1048-1054.

Oikawa, T., M. Takagi and M. Ameyama. 1994. Detection of carboxymethylcellulase activity in *Acetobacter xylinum* KU-1. **Bioscience Biotechnol.Biochemistry**. 58(11):2102-2103.

Ott, E. 1954. **Cellulose and cellulose derivatives**. Interscience Publishers, Inc., New York.

Pothiraj, C., P. Balajiand M. Eyini. 2006. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. **AfrJ.Biotechnol**. 5(20):1882-1885.

Ramachandra, M., D.L., Craeford and G. Hertel. 1988. Characterisation of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolyticactinomycete *Streptomyces viridosporus*. Appl Environ Microbiol. 54: 3057– 63.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rao, M., R. Seeta and D. Vasanti. 1983. Effect of pretreatment on the hydrolysis of cellulose by *Penicillium funiculosum* cellulase and recovery of enzyme. **Biotechnol.Bioeng**. 25: 1863-1871.

Ray, A.K., A. Bairagi, G.K. Sarkar and S.K. Sen. 2007. Optimization of fermentation condition for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. **ActaIchthyologica ET Piscatoria**. 37(1):47-53.

Raymond H. M. and C. M. Douglas. 1995. **Response surface methodology** : process and product optimization using designed experiments.

Reese, E.T. 1976. History of the cellulase program at the U.S. army natick development center. **Biotech.Bioeng.Symp**.6: 9-20.

Reczey, K., A. Brumbauer, M. Bollok, Z. Szengyel and G. Zacchi. 1998. Use of hemicellulose hydrolysate for ß-glucosidase fermentation. **Appl. Biochem.Biotechnol**. 70–72:225–235.

Rodrı´guez, H. and R. Gallardo. 1993. Single cell protein production from bagasse pith by a mixed bacterial culture. **ActaBiotechnol.** 13:141–149.

Sandgren, M., A. Shaw, T.H. Ropp, S. Wu, R. Bott, A.D. Cameron, J. Stahlberg, C. Mitchinsonand T.A. Jones. 2000. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 A° resolution. **J. Mol. Biol.** 308**:**295–310.

Schulein, M. 1997. Enzymatic properties of cellulases from *Humicolainsolens*. **J. Biotechnol**. 57:71–81.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Selby, K. and C.C. Maitland. 1967. The cellulose of *Trichoderma viridae*. Separation of the components involved in the solubilization of cotton. **Biochemical J**. 104(3):716-724.

Sharma D. C. and T. Satayanarayana. 2006. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by Bacillus pumilus dcsrl in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresource Technology**. 97: 727-733.

Singh, V.K. and A. Kumar. 1998. Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* VS-1. **Biochemistry and Molecular Biol. Int**. 45(3):443-452.

Stöhr, R. 1999. Build-up and mode of action of enzymes for the textile industry. Available Source: http://www.drpetry.de/artikel/artikel_1.html. 05 May 2009.

Stutzenberger, F.J. 1971. Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. **Appl.Microbiol**. 22(2):147-152.

Suto, M. and F. Tomita. 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulose in fungi. **J. Biosci. Bioengng**. 92(4): 305-311.

Usami, S., K. Kirimura, M. Imura and S. Morikawa. 1990. Cellular localization of the constitutive ß-glucosidase in *Trichoderma viride*. **J. Ferment. Bioeng**. 70:185–187.

Tari C., N.G´´ogus and F. Tokatli. 2007. Optimization of biomass, pell size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. **Enzyme Microbial Technol**. 40: 1108-1116.

Terri, T.T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolase. **Trends Biotechnol**. 15:160-167.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____, A. Koivula, M. Linder, G. Wohlfahrt, C. Divne and T. A. Jones**.** 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose. **Biochem. Soc. Trans**. 26**:**173–178.

Tuncer, M., A.S. Ball., A. Rob and M. T. Wilson. 1999. Optimization of extracellular lignolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermobifida fusca* BD25**. Enzyme and Micro.Tech.** 25:18-47**.**

Vidand.C., S. Roussos, M. Raimbault and F. Deschamps. 1982. Effect of various pretreatments on the accessibility of cellulose contained in corn strew to cellulases of *Trichoderma hazianum*. Cah.Orstom. **Ser. Boil**. 45: 17-23.

Wood, T. M. 1992. Fungal cellulases. **Biochem. Soc. Trans**. 20**:**46–53.

Yusoff, W. M., M. I. Massadeh and K. Jalil. 1991. Solid substrate and submerged culture fermentation of sugar cane bagasse for the production of cellulase and reducing sugars by local isolate, *Aspergillus terreus* SUK-1. **Journal of Microbiology andBiotechnology**. 10(6):770-775.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1 Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Basal Medium (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.*, 1988)

Carboxymethylcellulose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
$NaNO_3$	1.2	กรัม
KH_2PO_4	3.0	กรัม
K_2HPO_4	6.0	กรัม
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2$	0.05	กรัม
$MnSO_4.7H_20$	0.01	กรัม
$ZnSO_4.7H_20$	0.001	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและวิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารเคมีและการวิเคราะห์

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

1.1 สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์

1.1.1 สารละลาย A: สารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งกรดซิติก 42.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1.2 สารละลาย B: สารละลายโซเดียมซิเตรทเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไตรโซเดียมซิเตรท 52.82 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

1.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1.2.1 สารละลาย A: สารละลายโมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต 31.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.2.2 สารละลาย B: สารละลายไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต 53.63 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ผสมสารลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

1.3 สารละลาย Tris-HCL บัฟเฟอร์

1.3.1 สารละลาย A: สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยละลายกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 17.25 มิลลิลิตรในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.3.2 สารละลาย B: สารละลาย Tris-(hydroxymethyl) aminomethane เข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งTris-(hydroxymethyl)aminomethane 24.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 สารละลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์

1.4.1 สารละลาย A: สารละลาย Glycine เข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่ง Glycine 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.4.2 สารละลาย B: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

2. การวัดค่าความขุ่น

วัดค่าความขุ่นของตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดัดแปลงจากวิธีของ Miller *et al.* (1959)

3.1 ผสมสารละลายสับสเตรทและสารละลายเอนไซม์เข้าด้วยกัน พร้อมวางลูกแก้วปิดปากหลอด และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.2 จากนั้นเติมสารละลาย DNS และ นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที พร้อมวางลูกแก้วปิดปากหลอด หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

3.3 วัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเทียบหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.4 เตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนลายละลายสับสเตรทและสารละลายเอนไซม์ทดลองเหมือนตัวอย่างข้างต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

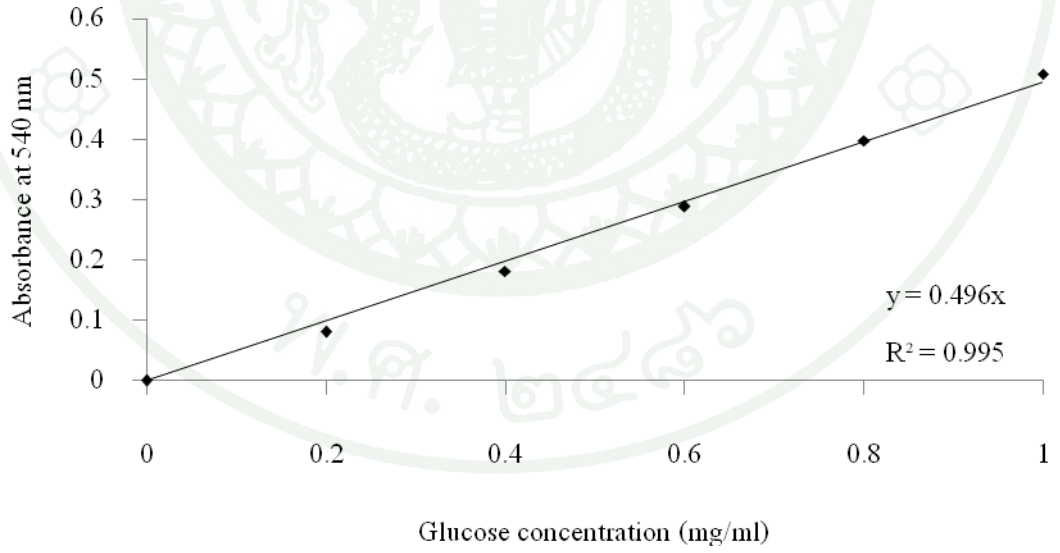
กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (unit/ml) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.4 การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.4.1 เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายกลูโคสผสมกับสารละลาย DNS

3.4.2 นำไปต้มน้ำเดือด 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

3.4.3 นำสารละลายมาตรฐานไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน



ภาคผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total releasable soluble protein)

นำน้ำหมักปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 15 นาที แยกส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford (1976) โดยใช้ชุดวิเคราะห์โปรตีนสำเร็จรูป (Biorad) โดยนำส่วนใสที่ได้เจือจางในน้ำกลั่น ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันกับสารละลายของชุดวิเคราะห์โปรตีนสำเร็จรูป ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเทียบปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานbovine serum albumin ที่ระบุในคู่มือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบจากการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ซังข้าวโพด ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.00±0.01	0.20±0.01	6.97
1	0.117±0.01	0.29±0.01	6.95
2	0.191±0.01	0.37±0.03	6.90
3	0.35±0.03	0.24±0.04	7.09
4	0.05±0.06	0.17±0.02	7.05
5	0.71±0.01	0.11±0.02	7.12

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค2 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ขี้เลื่อยความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.00±0.02	0.21±0.02	7.01
1	0.21±0.03	0.24±0.05	7.02
2	0.34±0.06	0.13±0.01	6.98
3	0.45±0.03	0.11±0.02	6.99
4	0.75±0.02	0.10±0.03	6.97
5	0.83±0.01	0.10±0.02	7.00

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้เปลือกข้าวโพดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.00±0.02	0.21±0.02	7.01
1	0.52±0.03	0.20±0.03	7.04
2	0.88±0.06	0.13±0.01	7.00
3	0.91±0.03	0.11±0.02	7.03
4	1.07±0.02	0.10±0.02	6.97
5	0.91±0.01	0.09±0.01	7.02

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค4 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ขุยมะพร้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.09±0.16	0.19±0.01	6.98
1	0.17±0.16	0.22±0.03	6.95
2	0.25±0.16	0.23±0.02	6.96
3	0.32±0.16	0.23±0.05	7.03
4	0.41±0.13	0.29±0.01	7.05
5	0.45±0.14	0.31±0.01	7.10

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค5 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ฟางข้าวความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.01±0.06	0.21±0.03	6.99
1	0.14±0.02	0.20±0.02	7.07
2	0.36±0.04	0.13±0.02	7.00
3	0.59±0.07	0.12±0.02	7.05
4	0.98±0.05	0.11±0.01	7.12
5	1.10±0.03	0.09±0.01	7.10

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค6 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.00±0.00	0.20±0.01	6.99
1	0.37±0.04	0.29±0.01	6.96
2	0.59±0.07	0.37±0.03	6.99
3	0.73±0.01	0.24±0.04	7.09
4	1.04±0.01	0.17±0.02	7.03
5	0.63±0.18	0.11±0.02	7.02

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค7 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.06±0.01	0.21±0.02	7.07
1	0.22±0.13	0.24±0.05	7.04
2	0.12±0.05	0.13±0.01	6.99
3	0.22±0.14	0.11±0.02	6.95
4	0.266±0.11	0.10±0.03	6.95
5	0.66±0.24	0.10±0.02	6.94

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค8 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.00±0.00	0.21±0.02	6.99
1	0.43±0.19	0.20±0.03	7.07
2	0.56±0.10	0.13±0.01	7
3	0.54±0.18	0.11±0.02	7.05
4	0.70±0.12	0.10±0.02	7.10
5	1.30±0.04	0.09±0.01	7.1

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค9 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้สารสกัดมอล์ตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.00±0.00	0.19±0.01	6.77
1	0.22±0.00	0.22±0.03	6.65
2	0.47±0.01	0.23±0.02	6.69
3	0.52±0.02	0.23±0.05	6.62
4	0.62±0.00	0.29±0.01	6.61
5	0.65±0.01	0.31±0.01	6.59

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค10 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเมื่อใช้ยีสต์ขนมปังความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจนบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 5 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.00±0.00	0.21±0.03	7.01
1	0.22±0.00	0.20±0.02	7.04
2	0.38±0.00	0.13±0.02	7.00
3	0.48±0.00	0.12±0.02	7.03
4	1.25±0.04	0.11±0.01	6.97
5	0.81±0.00	0.09±0.01	7.06

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสมการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

Source of variation	*df*	Sum of squares	Mean square	*F* - ration	*p* - value
Model	5	0.648	0.130	9.317	0.014
Residue	5	0.070	0.014		
Total	10	0.718			

R-squared (R^2) = 0.903 ; adjusted *R* – squared = 0.806

ตารางผนวกที่ ค12 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในฟลาสก์จาก *T. fusca* PA 1-1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เพื่อยืนยันความแม่นยำจากการทำนายค่าการวิเคราะห์ด้วยพื้นที่ผิวแบบตอบสนอง

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.00±0.00	0.21±0.01	7.00
1	0.35±0.03	0.20±0.02	6.97
2	0.42±0.07	0.18±0.04	6.95
3	1.28±0.06	0.13±0.01	6.99
4	1.41±0.06	0.11±0.03	7.13
5	1.33±0.08	0.04±0.01	7.12

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค13 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการทำนายและการทดลองที่สภาวะเหมาะสม

แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
		ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง
ประมาณ 1 ขึ้นไป	ประมาณ 1 ขึ้นไป	1.323	
1.5	1.5		1.26±0.06
	2		1.36±0.06
1.75	1.5		1.28±0.07
	2		1.41±0.01
2	1.5		1.26±0.02
	2		1.35±0.03

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวมูรนีย์ บริบูรณ์สุข
วัน เดือน ปี ที่เกิด	19 มีนาคม 2528
สถานที่เกิด	นราธิวาส
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตศรีวิชัย
ผลงานตีพิมพ์	Optimization of carbon souce for Carboxymethylcellulase Production by *Thermobifida fusca* PA 1-1.Proceeding: Thailand research Symposium 2012 Nationnal Research Council of Thailand (NRCT), Thailand
การทำงาน	สำนักประสานงานชุดโครงการ “อ้อยและน้ำตาล” วช.-สกว.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์