

บทที่ 1

บทนำ

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1973 เป็นต้นมาได้เกิดปัญหาทางการเมืองและเศรษฐกิจรวมทั้งทรัพยากรธรรมชาติประเภทปิโตรเลียมและแก๊สธรรมชาติ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีจำนวนจำกัด ได้มีราคาสูงขึ้นมาก จึงทำให้เกิดปัญหาวิกฤตการณ์ราคาน้ำมันแพงเกิดขึ้นทั่วโลกในปัจจุบัน จึงได้มีความพยายามที่จะศึกษาวิจัยและคิดค้นเพื่อพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนชนิดอื่น ๆ ขึ้นมาใช้ทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม และการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ (สมใจ, 2547)

การผลิตเอทานอลจากชีวมวลที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (cellulosic biomass) ได้มีการศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ โดยใช้วัตถุดิบชนิดต่าง ๆ เช่น ฟางข้าวบาร์เลย์ ซึ่งต้องทำการสกัดและแยกเอาเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมาผลิตน้ำตาลแล้วนำน้ำตาลที่ผลิตได้มาเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งเอทานอลที่ได้สามารถเป็นเชื้อเพลิงหรือเป็นสารแต่งเติมในน้ำมันเบนซินเพื่อเพิ่มค่าออกเทน ซึ่งถือได้ว่าเป็นการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่อย่างคุ้มค่าและเกิดประโยชน์อย่างสูงสุด พืชบางชนิด เช่น อ้อย เก็บพลังงานในรูปน้ำตาล สำหรับข้าวโพด มันสำปะหลัง จะเก็บพลังงานในรูปของแป้ง อย่างไรก็ตาม พืชเหล่านี้ไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง เพราะใช้เป็นอาหารซึ่งถือได้ว่ามีความสำคัญมากกว่าหรือให้ผลิตภัณฑ์อื่นที่ราคาสูงกว่า จึงควรใช้ชีวมวลอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า cellulosic biomass ซึ่งเป็นโพลีเมอร์น้ำตาลที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและไม่ได้เป็นอาหารของมนุษย์ เช่น ไม้เนื้ออ่อน ฟางข้าว หล้า แฝก ชังข้าวโพด ชานอ้อย ฯลฯ ซึ่งชีวมวลเหล่านี้เหมาะที่จะเป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่จะผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงมากกว่า (Zhang *et al.*, 2006) และเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทางการเกษตร ดังนั้นในแต่ละปี จึงมีเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรเป็นจำนวนมาก เช่น เศษพืช เศษใบไม้ กิ่งไม้ ฟางข้าว และแกลบ เป็นต้น เศษวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้จะมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก และพืชเมื่อล้มตายลงจะเกิดการทับถมลงในดิน เกิดกระบวนการย่อยสลายทางธรรมชาติ ทำให้ได้สารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์เกิดขึ้น ทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารในดิน (Alexander, 1977)

ในธรรมชาติพบว่ามีจุลินทรีย์หลายกลุ่มเช่น แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท เชื้อรา และโปรโตซัว ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเอนไซม์สามารถย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต สำหรับเซลลูโลสถ้าถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กลูโคส ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตสารชนิดอื่น ๆ ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ยกตัวอย่างเช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ ปุ๋ยหมัก การผลิต single cell protein และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ (กฤษณา, 2538)

ในปัจจุบันเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ผลิตขึ้นจากเชื้อรา โดยเฉพาะ *Trichoderma viride* และ *Aspergillus niger* และได้มีการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตจากเชื้อราดังกล่าว อย่างไรก็ตามการแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และมีกิจกรรมของเอนไซม์ในสภาพความเป็นกรด - ด่างต่าง ๆ กันพร้อมทั้งให้ค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์สูงสุด ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม ผลิตในปริมาณที่สูงกว่าเดิมและเป็นเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความเสถียรภาพได้เช่นเดียวกัน (Zhang *et al.*, 2006)

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีแนวคิดเพื่อทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางในการผลิตเอทานอล เป็นประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยแยกจากฟางข้าว
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
3. บ่งเอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
4. เพื่อโคลนยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกเข้าสู่ *Escherichia coli* (เป็นโครงการต่อเนื่องของปีงบประมาณ 2555)

ขอบเขตและข้อจำกัดของการศึกษา

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากตัวอย่างฟางข้าว พร้อมทั้ง บ่งเอกลักษณ์ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และโคลนยีนเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกเข้าสู่ *Escherichia coli*

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษา

1. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายเซลลูโลสได้
2. ทราบถึงชนิดและสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
3. ศึกษาคุณสมบัติของยีนเซลลูเลสเพื่อใช้ เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

บทที่ 2

ตรวจสอบเอกสาร

เซลลูโลส เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดในธรรมชาติชนิดหนึ่ง เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลสได้ ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เป็นต้น (กนก, 2528) การศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสเริ่มขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1916 โดย Seillier พบว่า เชื้อรา เห็ด แบคทีเรีย แอคทีโนมัยซิส ที่มีอาศัยบนไม้หรือในเนื้อไม้ในธรรมชาติสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ หลังจากนั้นนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านที่ทำการศึกษาและรวบรวมการทำงานของเซลลูเลส เช่น Hoshino และคณะ (1994) ศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์ exoglucanase และ endoglucanase ที่ได้จากเชื้อ *Irplex lacteus* โดยทดสอบบน Valonia cellulose พบว่าเอนไซม์ endoglucanase สามารถเกาะติดเซลลูโลสได้ดีและย่อยสลายเซลลูโลสแล้วได้ oligosaccharide, disaccharide และน้ำตาลชนิดอื่นเป็นผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่า exoglucanase

จะเห็นได้ว่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสมีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้ผลผลิตที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นด้านการเกษตร , เทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรม ยกตัวอย่าง เช่น ความสำคัญของเซลลูเลสในอุตสาหกรรมพวกโพลิเมอร์ที่อาศัยปฏิกิริยา esterification ด้วยกรดอะซิติกสายสั้น ๆ เช่น อะซิติก โปรไพโอนิก หรือ บิวทริก แล้วได้ผลผลิต คือเทอร์โมพลาสติก ซึ่งเป็นพลาสติกที่ใช้ทำผลิตภัณฑ์ประเภท กำไล กรอบแว่นตา ฟิล์มถ่ายรูป เส้นใย ซิกการ์เรต ฟิลเตอร์ ฯลฯ (จักรกฤษณ์, 2529)

สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม จะมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก รวมทั้งขยะตามแหล่งชุมชนที่เป็นกระดาษ มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและไม่ได้มีการจัดการหรือนำไปใช้ประโยชน์เท่าที่ควร ดังนั้นหากนำวัสดุเหลือทิ้งต่าง ๆ เหล่านี้มาย่อยสลายเซลลูโลส โดยใช้เอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจะก่อให้เกิดประโยชน์ทั้งด้านสิ่งแวดล้อมที่ช่วยลดขยะมูลฝอย รวมทั้งการเปลี่ยนขยะเหล่านี้มาเป็นแหล่งพลังงานหรือผลิตภัณฑ์อย่างอื่นได้ นอกจากนี้ยังมีข้อดีว่าการใช้สารเคมีคือการเกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง ไม่มีสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ สามารถควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเกิดปฏิกิริยาได้ (กาพย์พร, 2529; กฤษฎา, 2538)

2.1 การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

พืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่าง ๆ โดยส่วนใหญ่จะมี เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เซลลูโลส (cellulose) และสารจำพวกเพกตินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจัดเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากในผนังเซลล์ (cell wall) ของพืช ในขณะที่พืชยังมีชีวิตและอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ สารดังกล่าวจะไม่ถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากมีสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่หลังจากที่พืชตายหรือมีบาดแผลเกิดขึ้นสารยับยั้งดังกล่าวจะถูกทำลายจึงทำให้โครงสร้างของพืชถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ (www.techno.msu.ac.th)

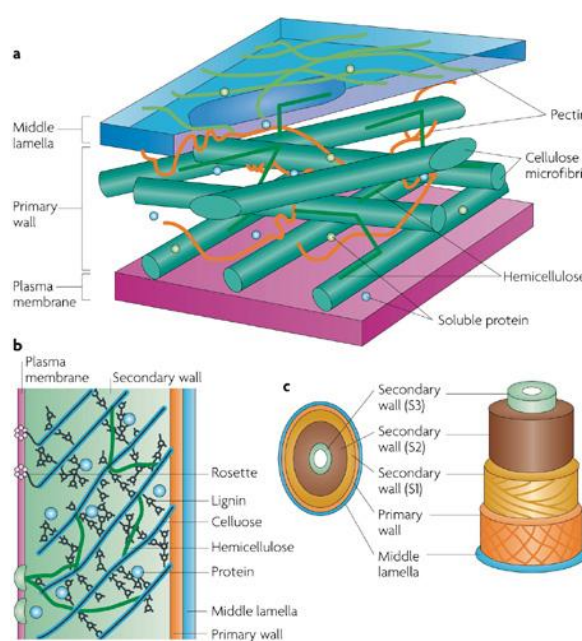
2.2 โครงสร้างของผนังเซลล์พืช

ในธรรมชาติพบว่าทั้งไม้เนื้ออ่อน (soft wood) และไม้เนื้อแข็ง (hard wood) จะแบ่งออกเป็นชั้น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยในแต่ละชั้นของผนังเซลล์พืชจะมีองค์ประกอบดังนี้ (รูปที่ 1)

2.2.1 ชั้น Primary wall (P) จะหนาประมาณ 0.1–0.2 μm ซึ่งประกอบด้วย cellulose microfibril ที่มีการจัดเรียงตัวกันแบบสุ่ม และถูกห่อหุ้มไว้ด้วยร่างแหของ เฮมิเซลลูโลสและสารจำพวก เพกติน

2.2.2 ชั้น Secondary wall (S) จะพบเฮมิเซลลูโลสกระจายอยู่ทั่วไป ชั้น S จะแบ่งย่อยออกเป็นชั้น S_1 , S_2 , และ S_3 โดยชั้น S_1 หนาประมาณ 0.1–0.3 μm และมีลักษณะเป็น cellulose microfibril ที่มีการจัดเรียงตัวกันแบบ Cross hatch ส่วนชั้น S_2 จะหนาประมาณ 1–5 μm ชั้นนี้เป็นชั้นที่ใหญ่ที่สุดในผนังเซลล์ของพืชและการเรียงตัวของ cellulose microfibril จะเป็นระเบียบแบบเส้นขนาน (parallel) สำหรับชั้น S_3 จะหนาประมาณ 0.1 μm มีการจัดเรียงตัวของ cellulose microfibril เป็นแบบ flat helix และพบลิกนินบ้างเล็กน้อย

2.2.3 ชั้น Middle lamella (M) จะเป็นชั้นที่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์ของผนังเซลล์ พืชที่อยู่ติดกัน ชั้นนี้ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยลิกนินและสารจำพวกลิกนิน



Nature Reviews | Genetics

รูปที่ 1 โครงสร้างของผนังเซลล์พืชทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง (Sticklen, 2008)

2.3 เซลลูโลสและโครงสร้างทางเคมี

เซลลูโลสมีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติโดยเฉพาะเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืชชั้นสูง โดยอาจจะพบในสภาพเซลลูโลสที่บริสุทธิ์ เช่น ในฝ้าย หรืออาจจะเกิดร่วมกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเนื้อเยื่อของพืช เซลลูโลสที่พบในพืชอาจจะมาจากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ไม้เนื้อแข็ง ฟาง เยื่อ ลำต้น เปลือก ฯลฯ โดยยังพบว่าเซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิไฮโดรคาร์บอนที่มีมากที่สุดในองค์ประกอบของพืช (วิทยา, 2530) โดยจะมีปริมาณต่ำประมาณ 15% ในพืชที่มีอายุน้อยและจะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 5%

ในช่วงที่พืชมีอายุมากขึ้น นอกจากนั้นยังพบเซลลูโลสในสาหร่าย เส้นใยเชื้อราและผนังเซลล์ของโปรโตซัวบางชนิด (จักรกรฤษณ์, 2529)

เซลลูโลสที่มาจากแหล่งต่าง ๆ พบว่าจะมีโครงสร้างทางเคมีที่เหมือนกันกล่าวคือ จะมีส่วนที่เป็น anhydroglucose โดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะประกอบด้วยสาย β - glucopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -linkages ที่อะตอมของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่าเซลลูโลส 1 โมเลกุล จะประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสมากถึง 1 ,400 – 10,000 โมเลกุล ที่เชื่อมต่อกันเป็นสายยาว และน้ำหนักโมเลกุลของเซลลูโลสจะมีตั้งแต่ 200,000 - 2,000,000 ดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 2

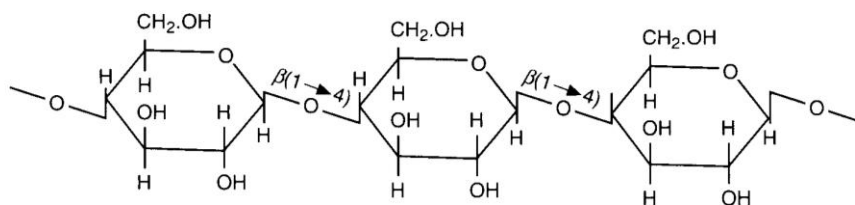
ลักษณะการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β - linkage ที่เป็นสายยาวและไม่มีกิ่งก้านสาขาของเซลลูโลสทำให้เซลลูโลสมีโครงสร้างแบบ β - configuration ส่งผลให้เซลลูโลสมีลักษณะเป็น rigid และ straight เพราะมี intra-inter molecule hydrogen bond จึงทำให้เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ในขณะที่พันธะ α -(1-4) glycosidic ในอะไมโลสจะละลายน้ำได้ดี (กาพย์พร, 2529) นอกจากนี้โมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงกันอยู่เป็นมัด ๆ ที่เรียกว่า fibril เมื่อนำแต่ละ fibril มาขยายพบว่าประกอบด้วยส่วนที่อยู่รวมกันเป็นกระจุกเรียกว่า crystalloid และส่วนที่อยู่รวมกันแบบหลวม ๆ ที่ถูกเรียกว่า amorphous region โดยส่วนของ fibril ต่าง ๆ ที่รวมกันเป็นโมเลกุลเซลลูโลส จะพบได้ในผนังเซลล์พืชซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งเล็ก ๆ ถูกเรียกว่า micelles และเมื่อรวมกันเกิดเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นจะถูกเรียกว่า microfibril นอกจากนี้ยังพบว่าในผนังเซลล์พืชอาจมีโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่น ๆ รวมอยู่ด้วย เช่น xylan, mannans, polyuronides, arabans, galactans โดยโพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างเชื่อมกับเซลลูโลสในผนังเซลล์ จะถูกเรียกว่า cellulans (กนก, 2528; วิทยา, 2530) เซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชจะแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ (Norkrans, 1967; Reguera and Leschine, 2001) คือ

2.3.1 Fringe micelles ใน microfibril ประกอบด้วยส่วน crystalloid และ amorphous โดยส่วนของ crystalloid เป็นบริเวณที่มีการจัดเรียงโมเลกุลอย่างเป็นระเบียบซึ่งมีอยู่ประมาณ 50 - 90 % ส่วนบริเวณ amorphous เป็นบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่าบริเวณ crystalloid

2.3.2 โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

2.3.3 โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นหนาเกิดจากการม้วนไปมา โดยตั้งฉากกับแกนของริบบิ้นและแถบของริบบิ้นจะม้วนเป็นเกลียว

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเซลลูโลสที่พบในองค์ประกอบของพืชชนิดต่าง ๆ จะมีมากน้อยแตกต่างกันตามชนิด อายุ ฤดูกาลการเก็บเกี่ยวของพืช ดังแสดงในตารางที่ 1 รวมทั้งเซลลูโลสที่พบในแต่ละส่วนของพืช ยกตัวอย่างเช่น เปลือก ใบ เมล็ด เป็นต้น ก็มีปริมาณที่แตกต่างกันด้วย



รูปที่ 2 โครงสร้างของเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่พบมากในผนังเซลล์ของพืช โครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสหลาย ๆ หน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบ β (1-4)-glycosidic bond (www.emeraldinsight.com/content_images)

ตารางที่ 1 ส่วนของพืชชนิดต่าง ๆ ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (พูนพิไลและคณะ, 2532)

พืช	ส่วนของต้นพืช	ปริมาณเซลลูโลส (%)
ข้าว	แกลบ	42
ข้าว	ฟางข้าว	32.1
ข้าวโพด	ใบ	36-43
ถั่วเหลือง	ใบ	31
	เปลือก	52
ถั่วลิสง	เปลือก	49
ฝ้าย	เปลือกเมล็ดฝ้าย	60
สั้	เปลือก	62
อ้อย	ชานอ้อย	48-62

2.4 การย่อยสลายเซลลูโลสและลักษณะสำคัญของเอนไซม์เซลลูเลส

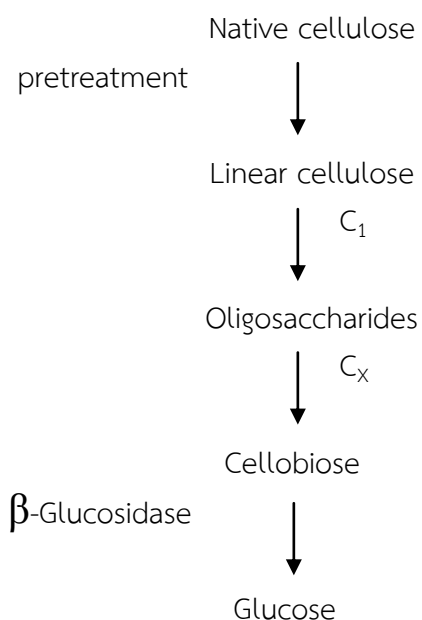
เซลลูโลสจะไม่ละลายด้วยน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายต่างอ่อน แต่จะละลายในกรดและต่างแก่ เมื่อย่อยสลายโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยสลายตัวไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) และได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ชนิดอื่น ๆ เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส คือ เซลลูเลส พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (complex enzyme) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดทำงานร่วมกันคือ C_x [endoglucanases; 1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4], C_1 [exoglucanases; 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases; EC 3.2.1.91] และ β -glucosidases (cellobiases; EC 3.2.1.21) โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะทำหน้าที่ที่แตกต่างกัน คือ

2.4.1 Endoglucanases (C_x) จะย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยจะย่อยสลายด้านในของสายเซลลูโลสแบบสุ่ม

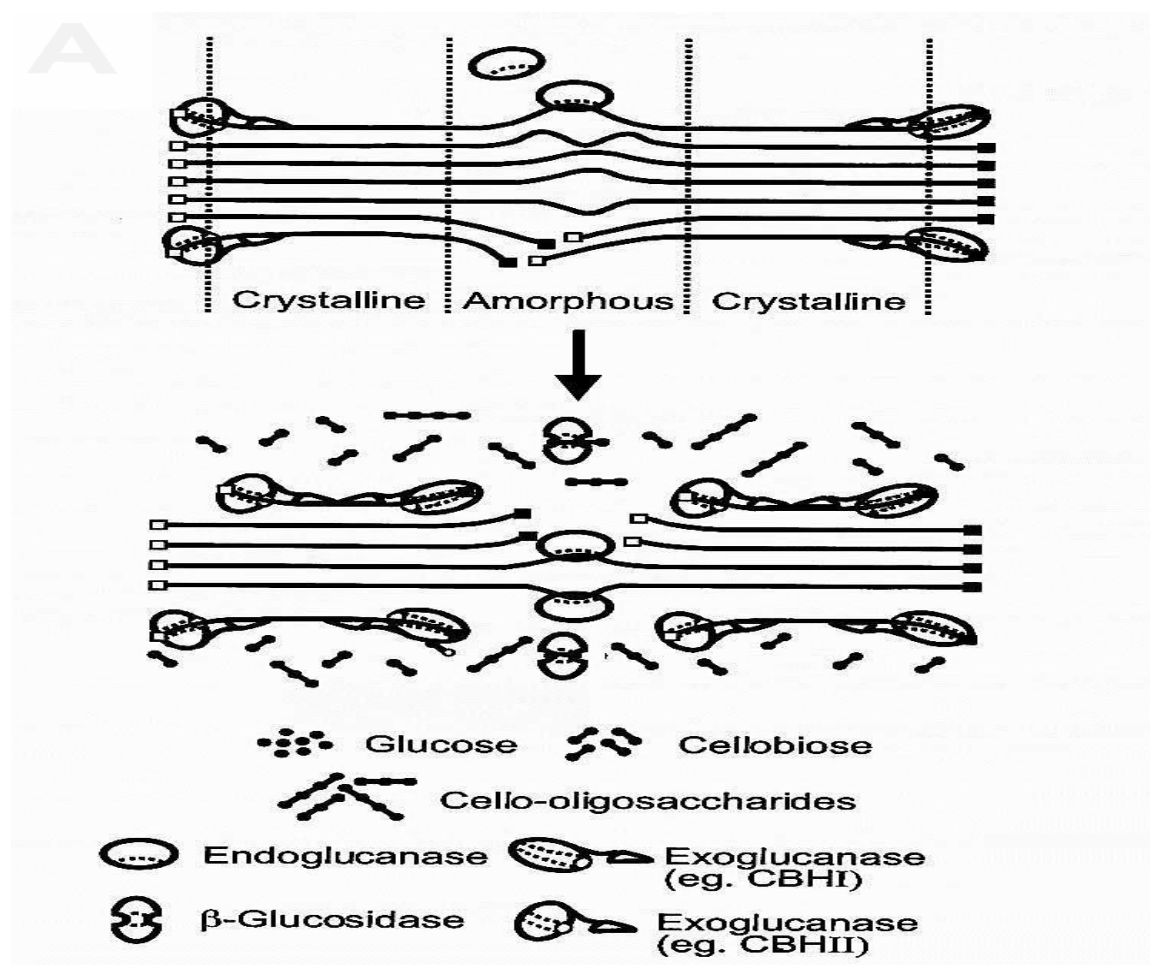
2.4.2 Exoglucanases (C_1) จะย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์ไปเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายด้านปลายของสายเซลลูโลส

2.4.3 β -Glucosidases จะย่อยสลายเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคส

ซึ่งลักษณะการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เชิงซ้อนทั้ง 3 ชนิด ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 3 และ 4 โดยขั้นตอนในการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันในการเข้าทำปฏิกิริยา ไม่ว่าจะเป็นการย่อยสลาย native cellulose หรือการย่อยสลายเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชบริเวณ crystalloid และ amorphous



รูปที่ 3 ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ คือ C_1 (exoglucanases) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสและโอลิโกแซคคาไรด์จากปลายด้านที่ไม่มีอำนาจรีดิวซ์ของสายเซลลูโลสไปเป็นเซลโลไบโอส C_x (endoglucanases) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นเซลโลไบโอส โอลิโกแซคคาไรด์และกลูโคส (น้อยมาก) โดยจะย่อยด้านในของสายเซลลูโลสแบบสุ่ม β -glucosidase ย่อยสลายเซลโลไบโอสเป็นกลูโคส (www.techno.msu.ac.th)



รูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์ (complex enzyme) ในการย่อยสลายเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืช บริเวณ crystalloid และ amorphous โดยจะทำงานร่วมกันในรูปแบบที่เรียกว่า synergistic action คือ exoglucanase เข้าทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสในส่วนที่เป็น crystalline cellulose ซึ่งเป็นบริเวณที่ย่อยสลายได้ยาก ได้เป็นเซลโล -โอลิโกแซคคาไรด์ หรือ เซลโลไบโอส จากนั้น endoglucanase จะย่อยสลายแบบสุ่มบริเวณ amorphous ซึ่งย่อยสลายได้ง่าย ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนนี้คือ เซลโลไบโอส ต่อมาเอนไซม์ชนิดสุดท้าย คือ β -glucosidase ย่อยเซลโลไบโอสต่อจนกระทั่งได้กลูโคส 2 โมเลกุล (www.enzymeindia.com/enzymes/beta-glucanase.asp.)

2.5 จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้จะถูกเรียกว่า cellulolytic microorganism ซึ่งส่วนมากจะอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซิทีส โดยพบทั่วไปในดินเนื่องจากจะมีสารประกอบพวกเซลลูโลสในดินเสมอ ๆ จึงเป็นการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์พวกที่ย่อยสลายของเซลลูโลสอยู่เรื่อย ๆ (แสวง , 2523; กนก, 2528) จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

2.5.1 Aerobic mesophilic microflora เป็นกลุ่มจุลินทรีย์จำพวกที่ต้องการออกซิเจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 15-45 °C และ เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 25 - 35 °C

2.5.2 Anaerobic mesophilic microflora เป็นกลุ่มจุลินทรีย์จำพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถเจริญได้และเจริญได้ดีในขอบเขตของ อุณหภูมิเช่นเดียวกับจุลินทรีย์กลุ่ม aerobic mesophilic microflora

2.5.3 Thermophilic microflora เป็นกลุ่มจุลินทรีย์จำพวกที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 45 - 65 °C โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่แบ่งได้ดังกล่าว สามารถจำแนกเป็นชนิดต่าง ๆ ได้ดังตารางที่ 2

นักวิทยาศาสตร์มีความสนใจที่จะศึกษาวิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ ซึ่งวิธีการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสแต่ละชนิดมีหลักการที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีการต่าง ๆ มาดัดแปลงเพื่อใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่าง ๆ ได้ การศึกษาการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเชื้อรา เริ่มต้นจากความสนใจของนักโรคพืชตั้งแต่ศตวรรษที่ 19 ซึ่ง Waksman (1932) ได้รวบรวมไว้ว่า นักโรคพืชพบแบคทีเรียชนิดไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) และเชื้อราที่เป็นตัวการทำให้เกิดโรคแก่พืชโดยการย่อยสลายเซลลูโลสของพืช

ต่อมานักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้มีการคิดค้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส (Mebeth, 1961; Seiller, 1916; Van Iterson, 1904) นอกจากนี้ Stapp และ Borstels (1934) ได้ประสบความสำเร็จในการแยกเชื้อราและแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสได้ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Enrichment culture technique โดยการนำเอากระดาศกรองวางไว้บนดินที่ขึ้น แล้วนำเอากระดาศนั้นมาใส่ใน cellulose agar แล้วตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารต่อไป

ในปี 1996 Semenov และคณะได้พัฒนาวิธีการใหม่สำหรับใช้ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในดินและการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการตรวจวัดการสูญเสียคุณสมบัติของ cellophane membrane เทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสามารถบอกความสัมพันธ์กันระหว่างอัตราการสูญเสียคุณสมบัติของ membrane ต่อหนึ่งหน่วยของเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (น้ำตาลรีดิวซ์ หน่วย $\mu\text{g/ml/h}$) โดยเชื้อที่ใช้ในการศึกษา คือ *Trichocladium asperum* และ *Acremonium charticola*

Stutzenberger (1972) ได้ศึกษาความต้องการสารอาหารของเชื้อ *Thermomonospora curvata* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ minimal medium พบว่าเมื่อใช้ cotton fiber เป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนแหล่งอื่น ๆ

Stevens และ Payne (1976) ศึกษาการผลิตเซลลูเลสโดยยีสต์ *Trichosporon cutaneum* และ *T. pulluans* พบว่าการใช้ ball-milled filter paper เป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อจะให้เอนไซม์ที่มี activity สูงสุด และลดลงเมื่อใช้ α -cellulose หรือ dewax cotton เป็นแหล่งคาร์บอน

Shewale และ Sadana (1978) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดย *Basidiomycete spp.* พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ คือ cellulose-123 ความเข้มข้นร้อยละ 4 และ Avicel P.H.101 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Maruo และคณะ (1979) ทำการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูโลสได้ คือ *Aspergillus aculeatus* พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ คือ รำข้าวสาลี ร้อยละ 5 และแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด คือ sodium monoglutamate

Vance และคณะ (1980) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Sporocytophage myxococcoides* NCBI 8639 ในอาหารที่มีกลูโคสอยู่ด้วยปรากฏว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและเชื้อจะสร้างเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อใช้ microcrystalline cellulose powder เป็นแหล่งคาร์บอน

Khan (1980) ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสของ *Acetivibrio cellulolyticus* พบว่า เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นมีความสามารถในการย่อยสลาย ball-milled pulp, cotton batting, filter paper microcrystalline cellulose, carboxymethyl cellulose, cellobiose และ xylan ให้เป็น reducing sugar และพบว่า carboxymethyl cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์

Sandhu และ Kalra (1982) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูโลส ไซลานเนส และเพคติเนส โดยเชื้อ *Trichosporon longibrachiatum* โดยมีกลูโคส ไซแลน เพกติน และ carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการผลิตเอนไซม์เซลลูโลสในสารอาหารตั้งต้นทุกชนิดยกเว้นกลูโคส และสร้าง C_1 คือ exoglucanases และ β -glucosidases สูงสุด เมื่อมีเพกตินเป็นแหล่งคาร์บอนและจะลดลงเมื่อใช้ xylan เป็นแหล่งคาร์บอนแต่เชื้อจะสร้าง C_x (endoglucanases) สูงสุด เมื่อมี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน

Weinberg และคณะ (1995) ประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสร่วมกับเอนไซม์เพกติเนส พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากถั่วและฟางข้าวสาลี

2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายเซลลูโลส

อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ คือ

2.6.1 อุณหภูมิ

โดยทั่วไปการย่อยสลายเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์ จะเกิดได้ตั้งแต่อุณหภูมิใกล้จุดเยือกแข็งไปจนถึงจุดสูงสุดที่พวกจุลินทรีย์จะดำรงชีวิตและดำเนินกิจกรรมได้ จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสจะถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมินอกจากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบของประชากรจุลินทรีย์แล้ว การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยอุณหภูมิสูงขึ้น อัตราการทำงาน of เอนไซม์จะเพิ่มขึ้น จนถึงจุดสูงสุดที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุด ถ้าอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมดังกล่าว การทำงานของเอนไซม์จะลดลง การที่อุณหภูมิสูงขึ้นทำให้อัตราการทำงานของเอนไซม์ลดลง เพราะว่าเอนไซม์เป็นโปรตีนซึ่งสามารถเสื่อมสภาพ (denature) ได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง ๆ ส่วนอุณหภูมิต่ำ เอนไซม์จะมีความหนืดมากยิ่งขึ้น จึงหน่วงเหนี่ยวการทำงานของเอนไซม์

2.6.2 ความเป็นกรด - ด่าง (pH)

ในสภาวะความเป็นกรด - ด่าง (pH) ที่เป็นกลางถึงด่าง จุลินทรีย์จำนวนมากสามารถปลดปล่อยเอนไซม์สำหรับย่อยสลายเซลลูโลสและเจริญเตบิโตได้ ส่วนในสภาวะ pH ที่เป็นกรด พบว่าเชื้อราจะมีบทบาทสูงมากในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเฉพาะ pH ที่ 4.0 - 5.0

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส (Alexander, 1976; Alexander, 1977; Reichelt, 1983)

Fungi	Bacteria	Actinomycetes
<i>Alternaria Phoma</i> (1) <i>Aspergillus</i> (1) <i>Polyporus</i> <i>Cheetomium</i> (1) <i>Rhizoctonia</i> <i>Coprinus Rhizopus Curvularia</i> (1) <i>Sporotrichum Foames</i> (2) <i>Thielavia</i> (1) <i>Fusarium</i> (1) <i>Trametes Memnoniella</i> (1) <i>Trichoderma</i> (1) <i>Merulius</i> (2) <i>Trichoderthecium</i> <i>Myrothecium Verticillium</i> <i>Penicillium Zygorhynchus</i>	<i>Achromobacter</i> (1) <i>Angiococcus</i> (1) <i>Bacillus</i> (1) <i>Cellfacicula</i> (1) <i>Cellulomonas</i> (1) <i>Cellvibrio</i> (1) <i>Clostridium</i> (2,3) <i>Corynebacterium</i> <i>Cytophage</i> (1) <i>Polyangium</i> (1) <i>Pseudomonas</i> (1) <i>Sorangium Sporocytophage</i> (1) <i>Vibrio</i> (1)	<i>Micromonospora</i> (1,2) <i>Nocardia</i> (1) <i>Streptomyces</i> (1) <i>Streptasporangium</i> (1)

หมายเหตุ : 1 = Aerobic mesophilic microflora
2 = Anaerobic mesophilic microflora.
3 = Thermophilic microflora.

2.6.3 ปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน

การเติมอินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียม หรือไนเตรด จะช่วยเร่งการย่อยสลายเซลลูโลสให้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามถ้าเติมในปริมาณที่มากเกินไป อินทรีย์ไนโตรเจนอาจไม่ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายเซลลูโลส พุนฟีโลและคณะ (25 29) พบว่า เมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ลงในอาหารที่มีฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *Aspergillus fumigatus* FKN 125 สามารถสร้างเอนไซม์ FPase และ CMCase ได้สูงเมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

2.6.4 อากาศ

ปริมาณอากาศมีผลต่อการควบคุมชนิดของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน ในสภาพที่ขาดออกซิเจนจะดำเนินกิจกรรมในอัตราที่ช้ากว่าภายใต้สภาพที่มีออกซิเจน ทั้งนี้เพราะภายใต้สภาพขาดออกซิเจนกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสจะก่อให้เกิดพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ได้ไม่มากดังนั้นในการย่อยสลายเซลลูโลสต้องศึกษาความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์ด้วย

2.6.5 สารประกอบคาร์บอนชนิดอื่น ๆ

สารประกอบคาร์บอนชนิดอื่น ๆ จะทำให้เกิดการกระตุ้นการย่อยสลายของเซลลูโลสของกลุ่มจุลินทรีย์ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์จะใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับในระยะแรกการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เมื่อสารประกอบดังกล่าวหมดลงจุลินทรีย์ที่มีปริมาณมากขึ้นจะสามารถย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานต่อไป

2.6.6 ความเข้มข้นของเอนไซม์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์แปรโดยตรงกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาดังนั้น ถ้าปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์มีปริมาณมากการย่อยสลายเซลลูโลสจะพบว่าอัตราการทำงานของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรทจะเร็วขึ้น ส่งผลให้ความเร็วของปฏิกิริยารวดเร็วมากขึ้น

2.6.6 ความเข้มข้นของเซลลูโลส

ถ้าความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์คงที่ แต่ในทางตรงกันข้ามความเข้มข้นของเซลลูโลสกลับเพิ่มมากขึ้นจะพบว่าอัตราการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจนถึง maximum value จากนั้นอัตราเร็วของเอนไซม์จะคงที่ เนื่องจากเอนไซม์อิ่มตัวด้วยสับสเตรทและเมื่อถึงสภาวะนี้ไว้นาน ๆ อัตราเร็วจะลดลง เพราะไม่มีเอนไซม์เหลือพอที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรท

2.6.7 ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ต่างชนิดหรือในชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน ก็ย่อมมีความสามารถที่จะย่อยสลายเซลลูโลสได้แตกต่างกัน เช่น เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีกว่าแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีต ดังนั้นในอุตสาหกรรมต่าง ๆ จึงมักนำเชื้อรามาใช้ให้เกิดประโยชน์ ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรา ที่สามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงและการนำไปใช้ด้วย

2.7 การนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์

การแปรรูปเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกลูโคส ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้นานัปการ นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ดังนี้ (www.techno.msu.ac.th)

2.7.1 ใช้ร่วมกับเอนไซม์ Pectinase และ β -Glucosidases ในการสกัดโปรตีนจากธัญพืช กระถินและถั่วต่าง ๆ

2.7.2 ใช้ร่วมกับเอนไซม์ β -Glucosidases และ Pentosanase ในการย่อยสลายธัญพืช เพื่อใช้เป็นอาหารของสัตว์ปีก

2.7.3 ใช้ร่วมกับเอนไซม์ Pectinase เพื่อลดความหนืดของ gum ทำให้เพิ่มความเข้มข้นน้ำผลไม้ได้ง่าย

2.7.4 ใช้ร่วมกับเอนไซม์ Pectinase, β -Glucosidases และ Hemicellulase ในการกำจัด mucilage และลดความหนืดเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการทำแห้งในการผลิตกาแฟ

2.7.5 ย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส ซึ่งกลูโคสที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว แอลกอฮอล์ และพอลิโอส

2.7.6 ใช้ร่วมกับ β -Glucosidases และ Protease เพื่อสกัดสีองุ่น กุหลาบ ฯลฯ

2.7.7 ใช้ในการแยก fibrous waste ออกจากแป้ง (starch)

2.7.8 ใช้ร่วมกับเอนไซม์ Lipase, Protease และ Amylase สำหรับ drain cleaner

2.7.9 ใช้ร่วมกับเอนไซม์ Protease, Amylase และ Pectinase ในการปรับปรุงกระบวนการหมักน้ำนมถั่วเหลือง

2.7.10 ใช้ร่วมกับเอนไซม์ Protease, Amylase และ Hemicellulase ในการปรับปรุงคุณภาพของขนมปัง

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1.1 Carboxymethyl cellulose (CMC) agar : Glucose (ภาคผนวก ข)
- 3.1.2 Carboxymethyl cellulose agar : No Glucose (ภาคผนวก ข)
- 3.1.3 Carboxymethyl cellulose broth (ภาคผนวก ข)

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 ชุดย้อมสีแกรม
- 3.2.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน
- 3.2.3 3, 5 – Dinitrosalicylic (DNS) 1.0 %
- 3.2.4 3% Hydrogen peroxide solution
- 3.2.5 0.85 % NaCl
- 3.2.6 0.05 M citrate buffer pH 4.8
- 3.2.7 1 N NaOH
- 3.2.8 1 N HCl

3.3 วัสดุอุปกรณ์

- 3.3.1 Autopipette ขนาด 1000 μ l.
- 3.3.2 Pipette ขนาด 1, 5, 10 ml
- 3.3.3 Flask ขนาด 1,000, 500, 250 ml
- 3.3.4 Petridish และกระบอกใส่ petridish
- 3.3.5 Tube ขนาด 16 x 150 mm.
- 3.3.6 Screw cap tube ขนาด 13 x 100 mm.
- 3.3.7 Durhan tube ขนาด 6 x 500 mm.
- 3.3.8 Loop
- 3.3.9 Tip สีฟ้า
- 3.3.10 Bent rod
- 3.3.11 Syringe ขนาด 5, 10 ml
- 3.3.12 Rack
- 3.3.13 Filter paper Whatman No. 1 ขนาด 1 x 6 cm.
- 3.3.14 Beaker ขนาด 25, 50, 100 ml
- 3.3.15 Cylinder ขนาด 1,000, 250 ml
- 3.3.16 Forcept
- 3.3.17 Funnel
- 3.3.18 Thermometer (0 - 100 °C)

3.4 อุปกรณ์ทางด้านวิทยาศาสตร์

- 3.4.1 Laminar flow เครื่องที่ 1 และ 2

- 3.4.2 Spectrophotometer UV 4802
- 3.4.3 Centrifuge 4 °C
- 3.4.4 Autoclave
- 3.4.5 Hot air oven
- 3.4.6 ตู้บ่มแบบเขย่าอุณหภูมิ 37 °C, 30 °C, 42 °C
- 3.4.7 ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 °C, 37 °C, 42 °C, 50 °C
- 3.4.8 pH meter
- 3.4.9 Vortex mixer
- 3.4.10 กล้องจุลทรรศน์
- 3.4.11 เครื่องซั่งสาร 2 ตำแหน่ง
- 3.4.12 อ่างน้ำ 50 °C

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเก็บตัวอย่างฟางข้าว

เก็บตัวอย่างฟางข้าวโดยเก็บตัวอย่างที่อยู่ลึกลงไปจากผิวดิน 1- 5 เซนติเมตร ตัวอย่างฟางข้าวที่เก็บมาต้องเขียนฉลากติดไว้ข้างถุงและนำส่งห้องปฏิบัติการทันทีหรือแช่ตัวอย่างในกระติกน้ำแข็ง เพื่อรักษาสภาพตัวอย่างและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์

3.5.2 การแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส

วิธีการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Kasing (1995) โดยซั่งฟางข้าวแต่ละตัวอย่างมา 10 กรัม แล้วเจือจางด้วย 0.85 % NaCl ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเข้ากัน แล้วปิเปตมาตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร CMC agar : glucose 1.0 % ประกอบด้วย CMC 0.5 g, NaNO₃ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO₄ 0.05 g, yeast extract 0.05 g, glucose 1.0 g, agar 1.7 g, distilled water 100.0 ml และปรับ pH = 7.0 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่น่าสนใจคือ มีลักษณะโคโลนีที่ใหญ่ นำโคโลนีดังกล่าวมาเขียนบนอาหาร CMC agar 0.5 % (CMC 0.5 g, NaNO₃ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO₄ 0.05 g, yeast extract 0.05 g, agar 1.7 g, distilled water 100.0 ml pH = 7.0) ที่ไม่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหาร CMC agar ได้ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเขี่ยเชื้อจากอาหาร CMC agar มา 1 loopful ลงในอาหาร CMC broth (CMC 0.5 g, NaNO₃ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO₄ 0.05 g, yeast extract 0.05 g, distilled water 100.0 ml) พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดอัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและปรับค่า OD₆₆₀ = 0.100 จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10 % inoculum โดยปิเปตเชื้อ 10 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร CMC broth ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมี CMC 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอน (CMC 0.5 g, NaNO₃ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO₄ 0.05 g, yeast extract 0.05

g, agar 1.7 g, distilled water 100.0 ml pH = 7.0) บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อแต่ละตัว โดยจะมีการสุ่มเก็บตัวอย่าง 3 ชั่วโมงเพื่อวัดอัตราการเจริญของเชื้อและ 12 ชั่วโมงเพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้นำตัวอย่าง 10 มล. มาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บน้ำส่วนใสแช่กระดิกน้ำแข็งไว้ จากนั้นนำน้ำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อกระดาษกรอง (filter paper activity) ทำได้โดยนำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วเติมส่วนน้ำใสที่ได้จากการแยกหรือปั่นเหวี่ยงลงไป 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS (ภาคผนวก ค)

3.5.4 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียสร้างโดยวิธี DNS

วิธีการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แบคทีเรียสร้างได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของสมรักษ์, 2537 โดยมีหลักการคือ เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกได้ จะย่อยสลาย CMC และ cellulose ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถตรวจสอบปริมาณน้ำตาลที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายที่สมบูรณ์ของเอนไซม์เซลลูเลสได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับ 3, 5 - dinitrosalicylic acid (DNS) ซึ่งถ้ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสมาก ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นก็จะมีค่าเทียบสี (Abs.₅₂₀) ที่สูงด้วย ดังนั้นในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งก็คือ น้ำตาลกลูโคสในตัวอย่าง สามารถทำได้โดยปิเปตน้ำส่วนใสที่เก็บไว้ในกระดิกน้ำแข็งมาตัวอย่างละ 1.0 มิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี DNS (ภาคผนวก ค) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS (สมรักษ์, 2537)

ยูนิต/มิลลิลิตร = $\frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$

(กรัม/โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

หมายเหตุ : Unit (U) ของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยสลายเซลลูโลสเป็นกลูโคส 1 $\mu\text{mole/min}$ ที่อุณหภูมิ 50 °C

3.5.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเชื้อจากอาหาร CMC no glucose มา 1 loopful ลงในอาหาร CMC broth (CMC 0.5 g, NaNO₃ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO₄ 0.05 g, yeast extract 0.05 g, distilled water 100.0 ml) พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มแบบเขย่าความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและปรับค่า OD₆₆₀ = 0.100 จากนั้นปิเปตเชื้อปริมาตร 10 % inoculum ใส่ลงใน

อาหาร CMC broth ที่มีพีเอช 7.0 โดยทำอุณหภูมิละ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 30 , 37 และ 42 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และจะมีการสุ่มเก็บตัวอย่าง 3 ชั่วโมงเพื่อวัดอัตราการเจริญของเชื้อ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และสุ่มเก็บตัวอย่าง 12 ชั่วโมง เพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity)

3.5.6 การศึกษาความเป็นกรด – ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์

เซลลูเลส

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเชื้อจากอาหาร CMC no glucose มา 1 loopful ลงในอาหาร CMC broth (CMC 0.5 g, NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO_4 0.05 g, yeast extract 0.05 g, distilled water 100.0 ml) พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดอัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและปรับค่า $\text{OD}_{660} = 0.100$ จากนั้นปิเปตเชื้อปริมาตร 10 % inoculum ใส่ลงในอาหาร CMC broth (CMC 0.5 g, NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO_4 0.05 g, yeast extract 0.05 g, distilled water 100.0 ml) ที่มีพีเอชดังนี้ 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 โดยทำพีเอชละ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและจะมีการสุ่มเก็บตัวอย่าง 3 ชั่วโมงเพื่อวัดอัตราการเจริญของเชื้อ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และสุ่มเก็บตัวอย่าง 12 ชั่วโมง เพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity)

3.5.7 การศึกษาความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์

เซลลูเลส

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเชื้อจากอาหาร CMC no glucose มา 1 loopful ลงในอาหาร CMC broth (CMC 0.5 g, NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO_4 0.05 g, yeast extract 0.05 g, distilled water 100.0 ml) พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นปิเปตเชื้อปริมาตร 10 % inoculum ใส่ลงในอาหาร CMC broth ที่มีพีเอชดังนี้ 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ตามสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละเชื้อที่ทดสอบ นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 100 และ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและจะมีการสุ่มเก็บตัวอย่าง 3 ชั่วโมงเพื่อวัดอัตราการเจริญของเชื้อ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และสุ่มเก็บตัวอย่าง 12 ชั่วโมง เพื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity)

3.5.8 การย้อมสีแกรมและทดสอบ Catalase

ทำการย้อมสีแกรมเพื่อดูการติดสีแกรม รูปร่าง ลักษณะและคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ catalase เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 isolates (งามนิจ, 2547) โดยเตรียมเชื้อเริ่มต้น ดังนี้ เชื้อจากอาหาร CMC no glucose มา 1 loopful ลงในอาหาร CMC broth (CMC 0.5 g, NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO_4 0.05 g, yeast extract 0.05 g, distilled water 100.0 ml) พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบใน

การเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง) แล้วนำเชื้อมาแยกและทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase โดยสังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบกับ 3 % H_2O_2 (ภาคผนวก ง)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างฟางข้าว

สามารถเก็บตัวอย่างฟางข้าวบริเวณพื้นที่สัมผัสระหว่างดินและฟางข้าว ซึ่งมีความชื้นพอเหมาะและน่าจะเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารต่าง ๆ รวมทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในการเกิดเมตาบอลิซึมและการดำรงชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ต่อไป

4.2 การแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส

จากการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างฟางข้าว พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหาร CMC ที่มีกลูโคส 1.0 % เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ซึ่งประกอบด้วย CMC 0.5 g, NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO_4 0.05 g, yeast extract 0.05 g, glucose 1.0 g, agar 1.7 g, distilled water 100 ml, pH = 7.0 โดยลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC ที่มีกลูโคส 1.0 % (รูปที่ 5ก) จากนั้นเมื่อทำการคัดเลือกโคโลนีที่ใหญ่แสดงถึงการเจริญได้ดี เชื้อเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC 0.5% ซึ่งประกอบด้วย CMC 0.5 g, NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO_4 0.05 g, yeast extract 0.05 g, agar 1.7 g, distilled water 100 ml, pH = 7.0 และไม่เติมกลูโคส เพื่อยืนยันว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้อาหาร CMC 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอนได้แทนการใช้กลูโคส ผลการทดลองพบว่า มีเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร CMC 0.5 % (รูปที่ 5ข) และจากการย้อมด้วยสี Congo Red ก็พบว่าโคโลนีเดี่ยวที่คัดเลือกมาสามารถย่อย CMC และทำให้เกิด clear zone รอบๆโคโลนีได้ (รูปที่ 5ค) จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวพร้อมทั้งตั้งชื่อเป็นไอโซเลท JD ได้ 48 ไอโซเลท ได้แก่ JD 1, JD 1.1, JD 1.2, JD 1.3, JD 1.4, JD 2, JD 2.1, JD 2.2, JD 2.3, JD 2.4, JD 3, JD 3.1, JD 4, JD 4.1, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 5, JD 5.1, JD 5.2, JD 5.3, JD 5.3, JD 5.4, JD 6, JD 6.1, JD 6.2, JD 6.3, JD 6.4, JD 6.5, JD 6.6, JD 6.7, JD 7, JD 7.2, JD 7.3, JD 7.4, JD 8, JD 8.1, JD 8.2, JD 8.3, JD 8.4, JD 8.5, JD 8.6, JD 8.7, JD 8.8, JD 9, JD 9.1, JD 9.2 และ JD 9.3

เมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญและใช้ CMC 0.5 % เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้แล้วจึงนำเชื้อทั้ง 48 ไอโซเลทมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คือน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสในกระดาษกรองอย่างสมบูรณ์ ซึ่งได้ทดลองหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทั้ง 48 ไอโซเลท ที่คัดเลือกมาได้

ก ข ค



รูปที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างฟางข้าว

- ก ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร CMC ที่มีกลูโคส 1.0 % เป็นแหล่งคาร์บอน
- ข ลักษณะโคโลนีที่คัดเลือกจากอาหาร CMC ที่มีกลูโคส 1.0 % เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการขีดลาก (streak) ลงบนอาหารที่มี CMC 0.5 %
- ค ลักษณะวงใส (clear zone) ที่เกิดรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มี CMC 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน และย้อมด้วยสี Congo Red

4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

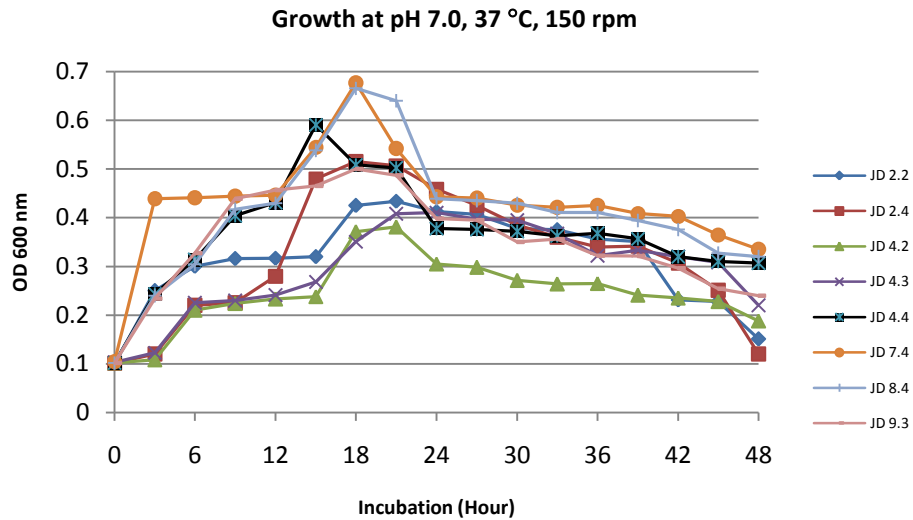
เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้ว 48 ไอโซเลท จึงนำมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5 - Dinitrosalicylic acid (DNS) (สมรักษ์, 2537) โดยในการ screen ครั้งที่ 1 ได้ใช้สภาวะในการเตรียมเชื้อเริ่มต้นและการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C pH = 7.0 , 150 rpm เนื่องจากเป็นสภาวะที่เชื้อมีอัตราการเจริญและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงกว่าสภาวะอุณหภูมิอื่น ๆ ที่ทดสอบคือ 30 °C และ 42 °C ผลการทดลองพบว่า จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 48 ไอโซเลท มีเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายกระดาษกรองมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ ทั้งนี้ได้พิจารณาจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิต/มิลลิลิตรและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดสอบดังกล่าว ได้แสดงดังรูปที่ 6 ผลการทดลองที่ได้แสดงว่า สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างฟางข้าวที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายกระดาษกรองได้ดี ในสภาวะที่ทดลองคือ อุณหภูมิ 37 °C pH = 7.0, ความเร็วรอบในการเขย่า 150 rpm อย่างไรก็ตามสภาวะการเตรียมเชื้อเริ่มต้นและการเลี้ยงเชื้อเพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ดังกล่าวเป็นแค่การ screen เบื้องต้นในการคัดเลือก

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเท่านั้น อาจมีสภาวะอื่น ๆ ที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท จึงต้องทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสควบคู่กับการพิจารณาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วย ดังนั้นเมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง 8 ไอโซเลทแล้ว จึงได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรองต่อไป

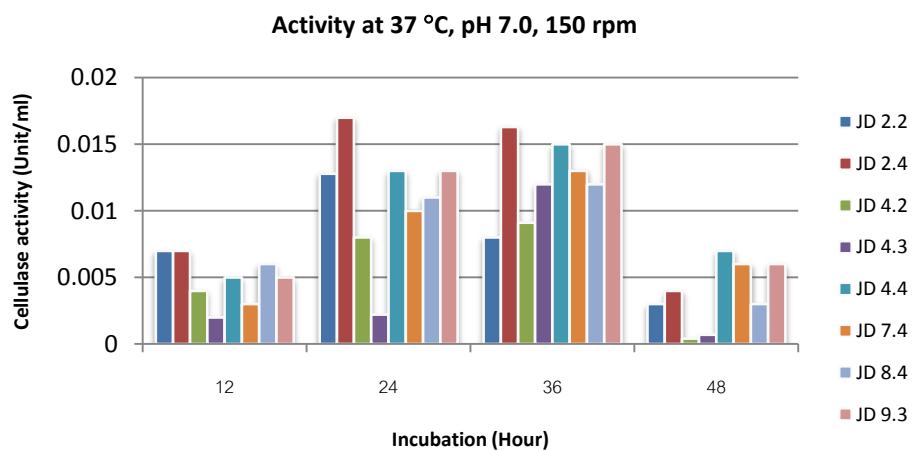
4.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายกระดาษกรองได้สูงในสภาวะเริ่มต้นคืออุณหภูมิ 37°C pH = 7.0, 150 rpm ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ได้แล้วจึงนำมาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อมากที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส จากการทดลอง 3 อุณหภูมิ คือ 30°C , 37°C และ 42°C และพบว่า อุณหภูมิ 30°C , และ 42°C เชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลทมีอัตราการเจริญที่ต่ำพิจารณาจากการวัดค่า $\text{OD}_{660} \leq 0.100$ ในบางไอโซเลท ดังนั้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลทจึงแสดงข้อมูลเฉพาะอุณหภูมิ 37°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญ (รูปที่ 6) และสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 7) และจะพบว่าเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลทมีอัตราการเจริญที่ดีในอุณหภูมิดังกล่าว ระยะการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 – 9 และเพิ่มจำนวนเซลล์ไปจนถึงชั่วโมงที่ 18 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีอัตราการเจริญสูงสุด จากนั้นจะมีการเจริญที่คงที่หรืออาจลดลงตามลำดับ

ดังนั้นอุณหภูมิที่จะนำไปใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป ก็คือ อุณหภูมิ 37°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิเดียวกับการเตรียมเชื้อเริ่มต้นในการ screen ครั้งที่ 1 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลทสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี



รูปที่ 6 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 °C, pH = 7.0, 150 rpm

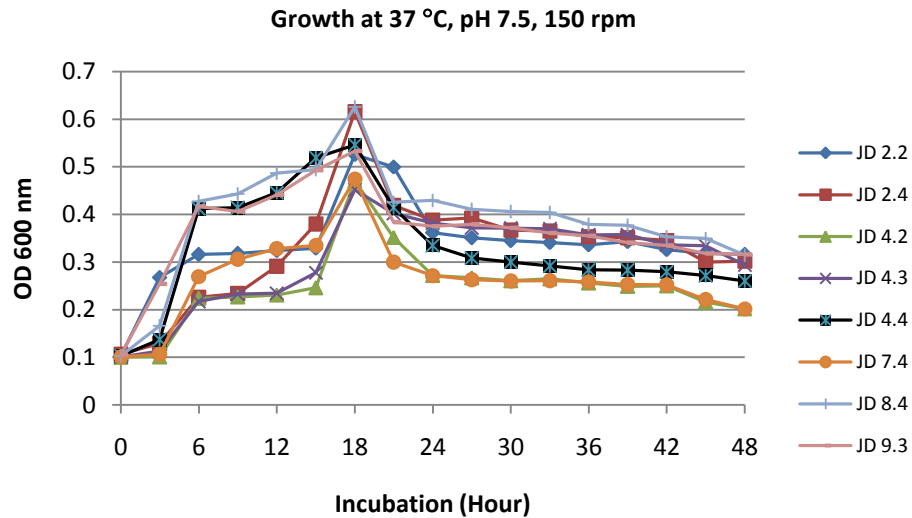


รูปที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C pH = 7.0, 150 rpm

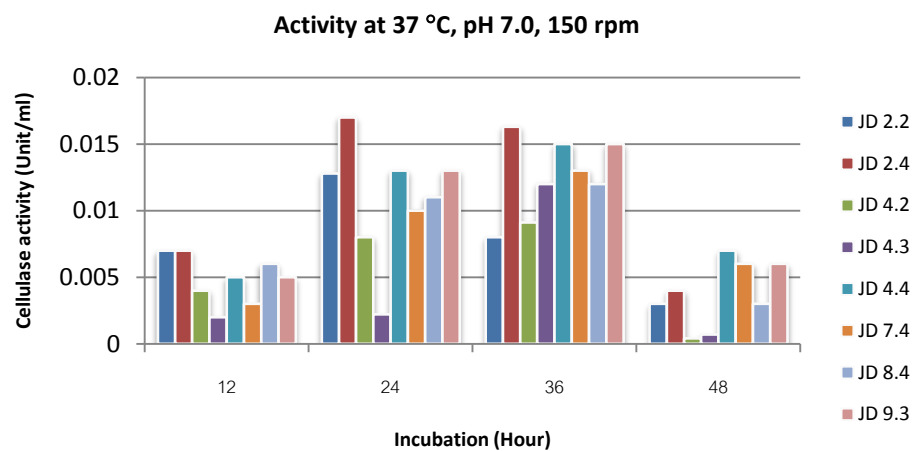
4.5 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

จากผลการทดลองเมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลทที่ดีที่สุดคือ 37 °C แล้วจึงทำการศึกษาความเป็นกรด -ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้ค่าความเป็นกรด -ด่าง ที่แตกต่างกันคือ 5.5 , 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 พบว่า pH ต่าง ๆ มีผลต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 8 ไอโซเลท แสดงดังในรูปที่ 8-15 ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้ทั้งอัตราการเจริญและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสควบคู่กันแล้ว พบว่า pH ที่เหมาะสมต่างกัน

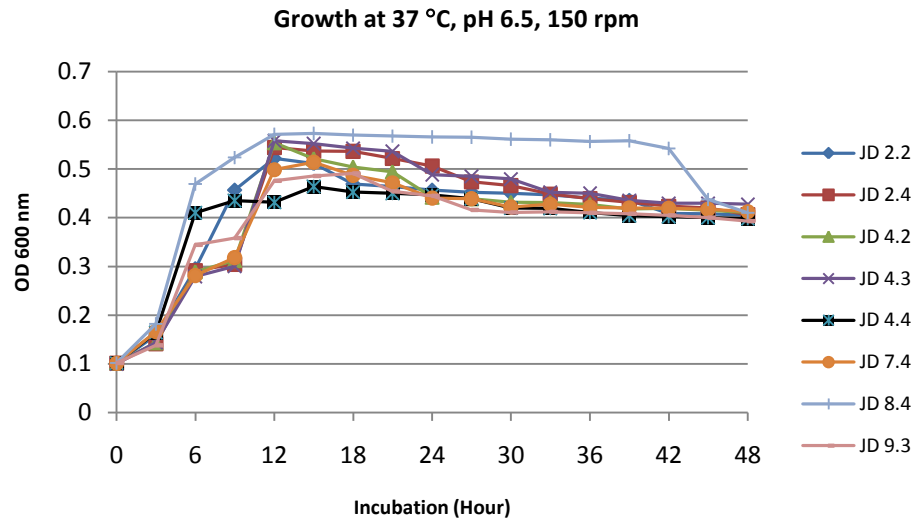
ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ที่ได้ในแต่ละ pH แสดงในตารางที่ 3 เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมและค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลทแล้ว จึงทำการทดลองต่อไป เพื่อศึกษาความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3



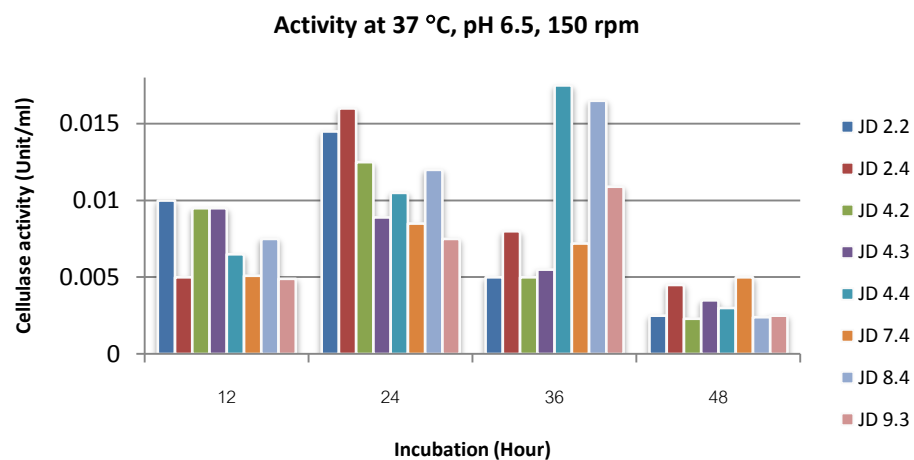
รูปที่ 8 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 7.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm



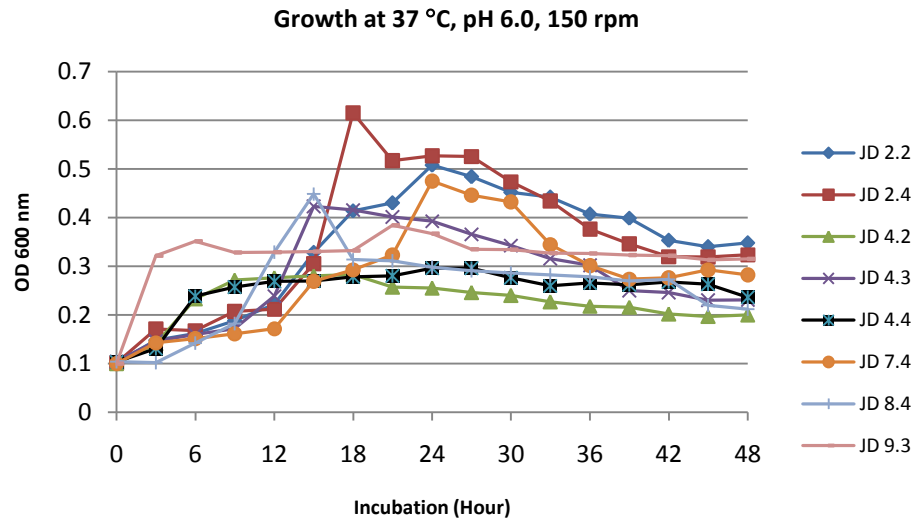
รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C pH = 7.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm



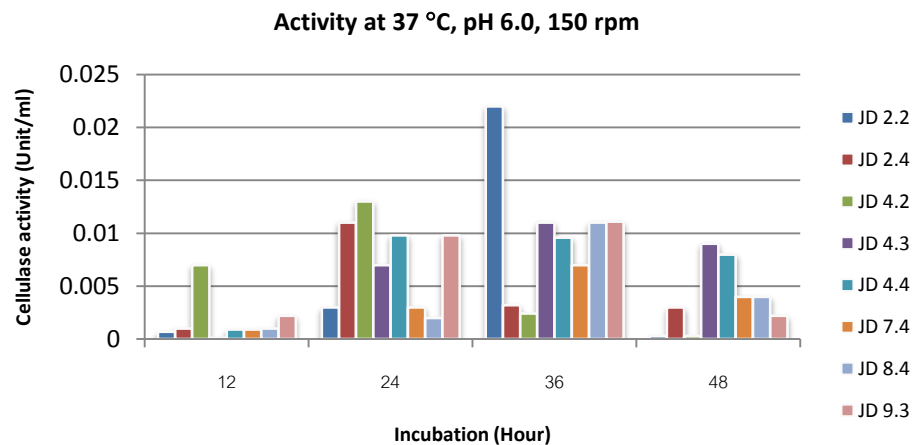
รูปที่ 10 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลตได้แก่ ไอโซเลต JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 6.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm



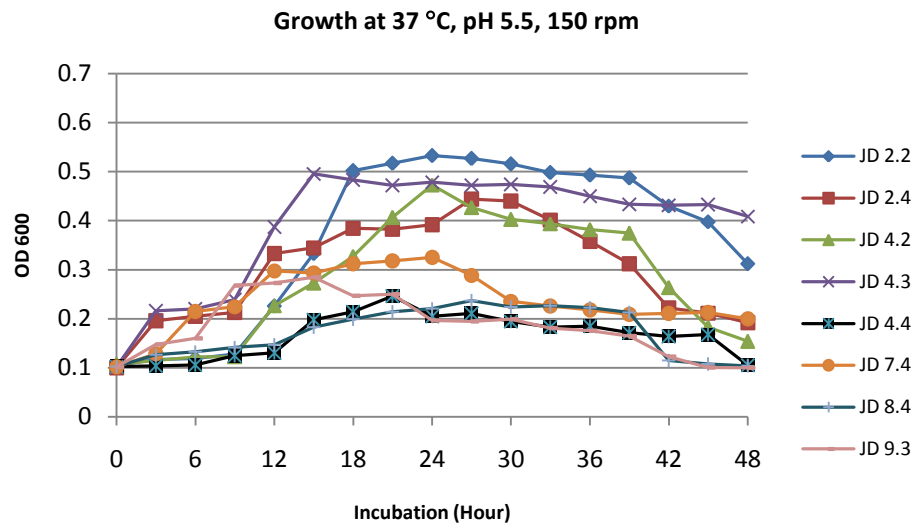
รูปที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C pH = 6.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm



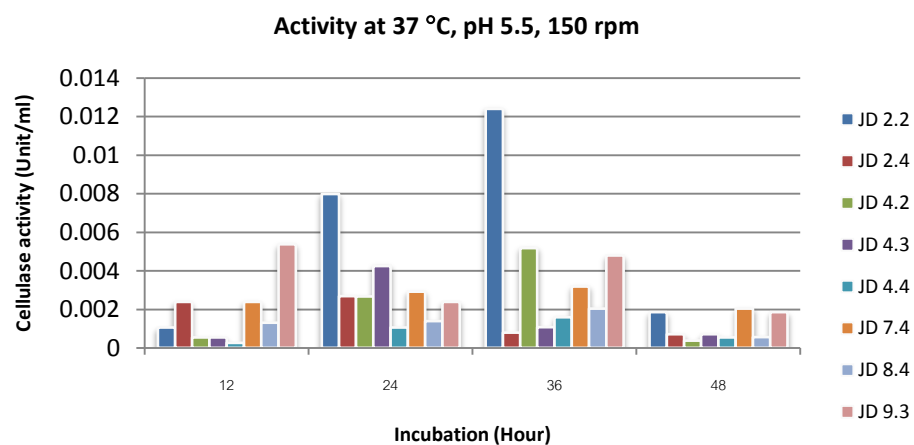
รูปที่ 12 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 6.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm



รูปที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C pH = 6.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm



รูปที่ 14 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลตได้แก่ ไอโซเลต JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 ณ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH = 5.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm

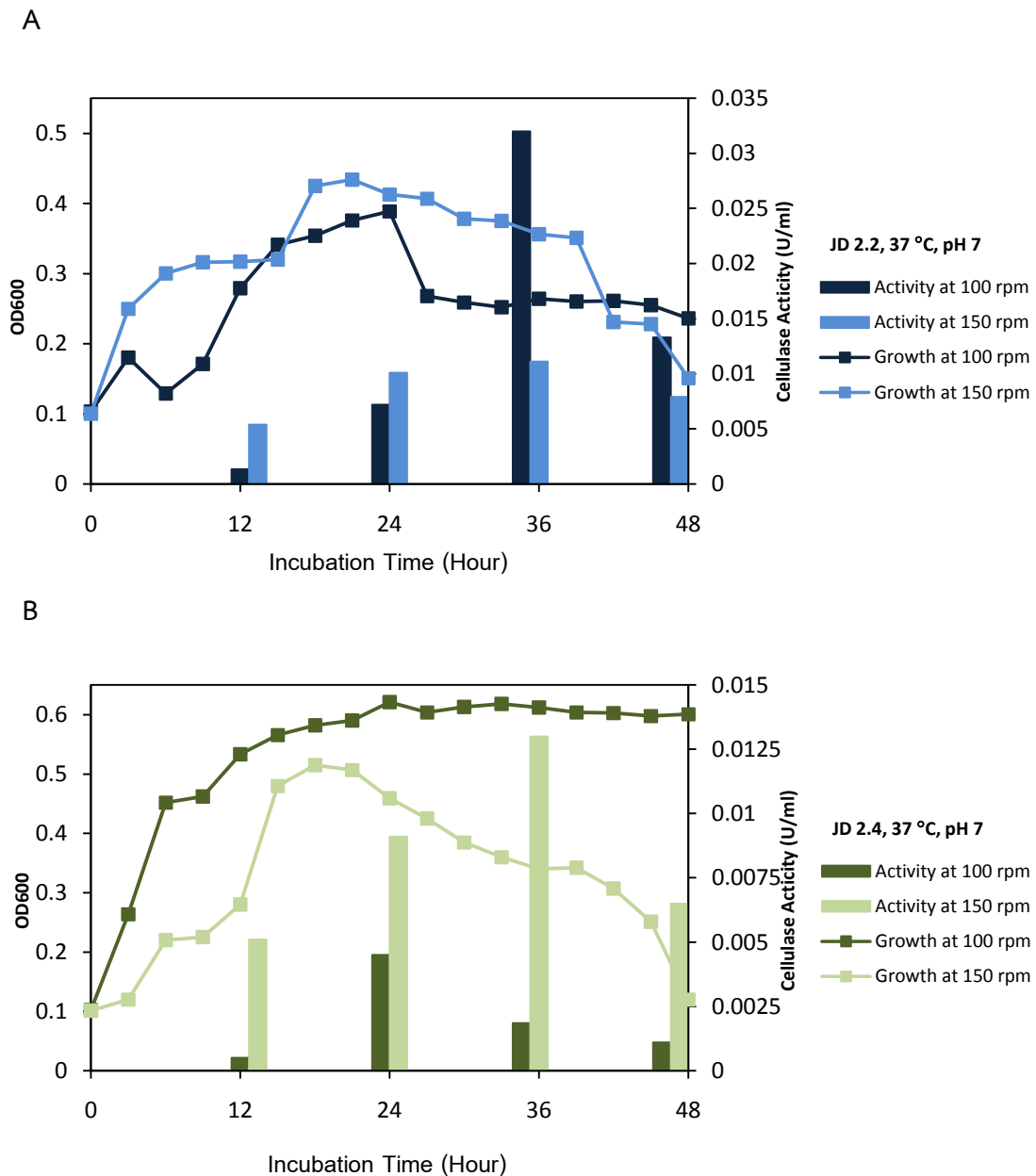


รูปที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มล.) ในการย่อยสลายกระดาษกรอง ณ สภาวะที่ทดลองคืออุณหภูมิ 37 °C pH = 5.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm

4.6 การศึกษาความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

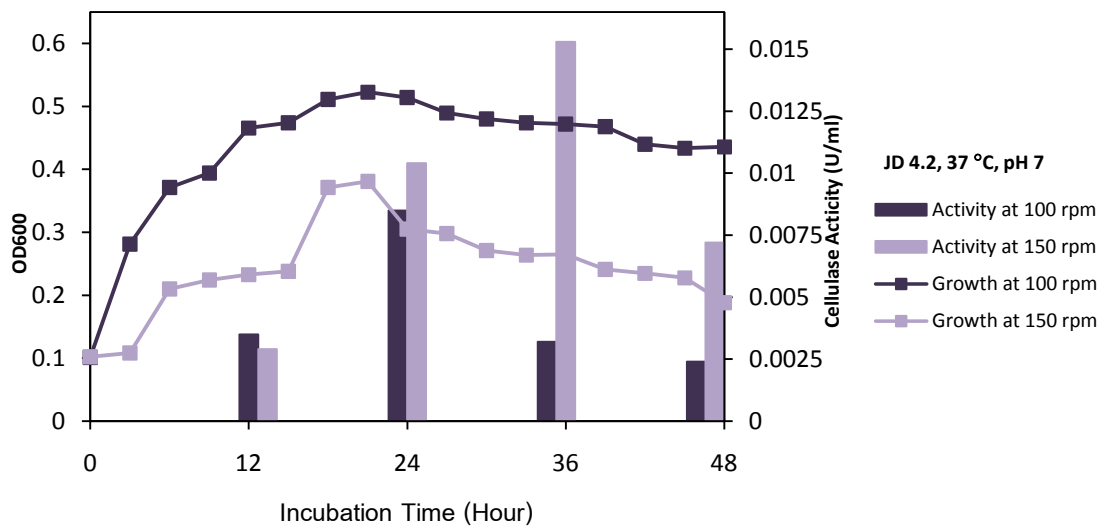
เมื่อได้ค่าอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทแล้ว จึงทำการศึกษาความเร็วรอบของการเขย่า (incubator shaking) โดยเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ผลการทดลองพบว่า ความเร็วรอบในการเขย่าที่แตกต่างกันส่งผลต่ออัตราการเจริญและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียได้ต่างกันในแต่ละไอโซเลท แสดงดังรูปที่ 16 - 19 เมื่อเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่าระหว่าง 100 rpm และ 150 rpm พบว่าความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญต่ำกว่าที่ ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะสูงกว่า

เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 4.4 และ JD 2.4 มีอัตราการเจริญสูงสุดสามารถวัดค่า $OD_{660} = 0.686$ และ $OD_{660} = 0.621$ ตามลำดับในชั่วโมงที่ 15 และชั่วโมงที่ 27 ตามลำดับ ณ สภาวะอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของแต่ละไอโซเลท แสดงดังรูปที่ 20 และ 18 ตามลำดับ นอกจากนี้ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 8.4 มีอัตราการเจริญสูงสุดสามารถวัดค่า $OD_{660} = 0.652$ ในชั่วโมงที่ 18 ณ สภาวะอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม แสดงดังรูปที่ 21 ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญสูงสุดตามลำดับมีดังนี้ ไอโซเลท JD 4.4, JD 8.4 และ JD 2.4 โดยมีสภาวะที่เหมาะสมตามลำดับดังนี้ อุณหภูมิ 37°C pH = 7.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm อุณหภูมิ 37°C pH = 6.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm และอุณหภูมิ 37°C pH = 7.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm โดยมีค่า OD_{660} สูงสุดตามลำดับ คือ 0.686 , 0.652 และ 0.621 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 22 อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ซึ่งมีอัตราการเจริญสูงสุดในสภาวะดังกล่าว เมื่อพิจารณาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแล้วพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิต/มิลลิลิตร) ไม่มากเท่าที่ควรและในทางตรงกันข้ามพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) สูงสุดในสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละไอโซเลทกลับมีอัตราการเจริญไม่ดี ยกเว้นไอโซเลท JD 4.4 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 4.4 และ JD 9.3 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดตามลำดับดังนี้ 0.032 , 0.021 และ 0.020 ยูนิต/มล. ณ สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ ไอโซเลท JD 2.2 ที่อุณหภูมิ 37°C pH = 6.0 ความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm ไอโซเลท JD 4.4 อุณหภูมิ 37°C pH = 7.0 ความเร็วรอบการเขย่า 150 rpm และไอโซเลท JD 9.3 อุณหภูมิ 37°C pH = 6.5 ความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm แสดงดังรูปที่ 23 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลทมีการเจริญและค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (ยูนิต/มล.) เพิ่มขึ้นสูงกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้ในการscreen ครั้งที่ 1 เมื่อเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในสภาวะอุณหภูมิ pH และความเร็วของการเขย่าที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละไอโซเลท สังเกตได้จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรองโดยเฉลี่ยแสดงในตารางที่ 4 ที่มีค่าสูงขึ้น และจากการพิจารณาอัตราการเจริญและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าเชื้อส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในช่วงการเจริญระยะ late stationary phase และ death phase ของการเจริญ ซึ่งเป็นความสัมพันธ์แบบ non growth-associated type

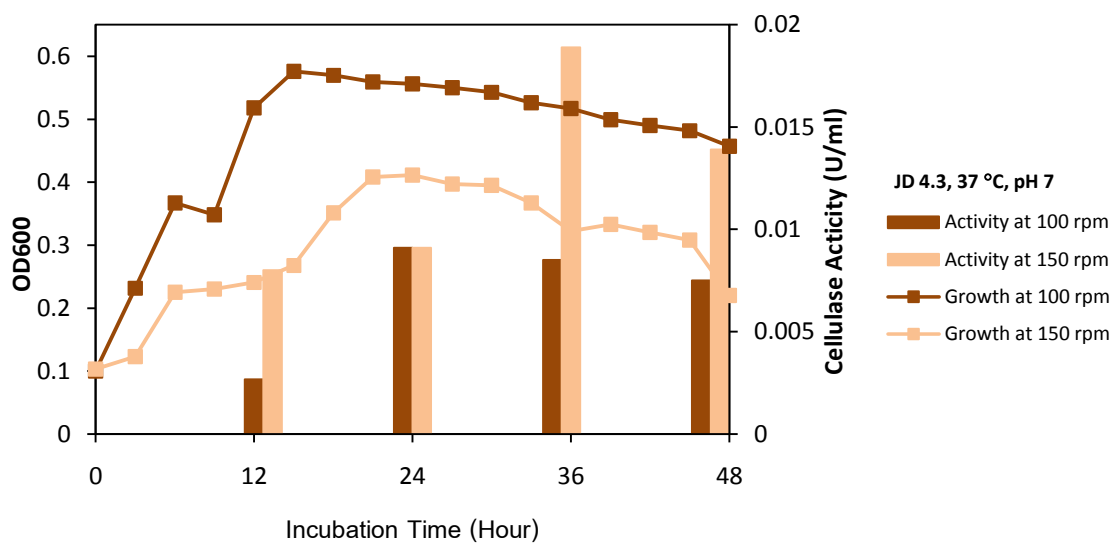


รูปที่ 16 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลท JD 2.2 (A) และ JD 2.4 (B) เมื่อเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ตามลำดับ

A

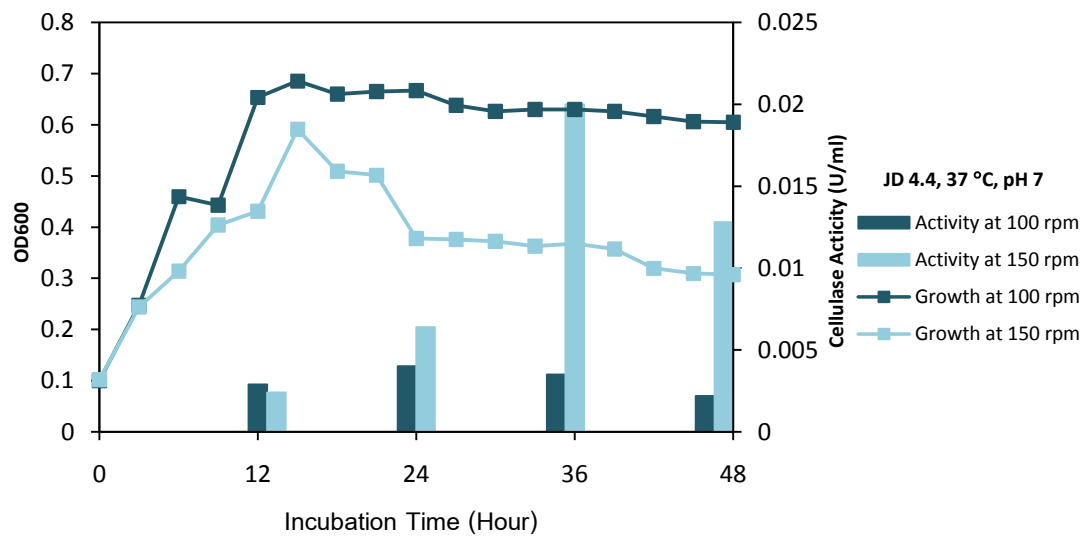


B

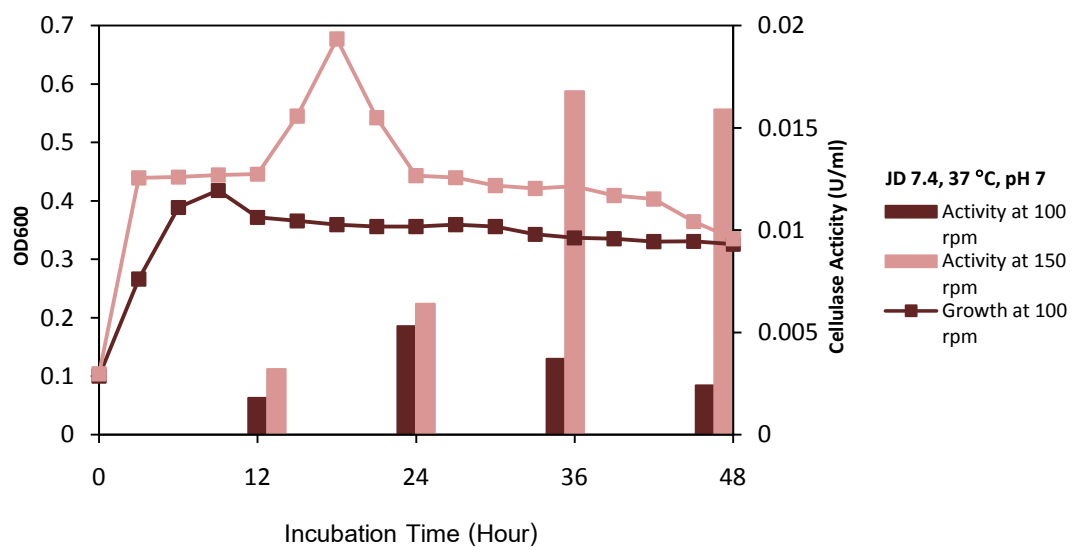


รูปที่ 17 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลท JD 4.2 (A) และ JD 4.3 (B) เมื่อเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ตามลำดับ

A

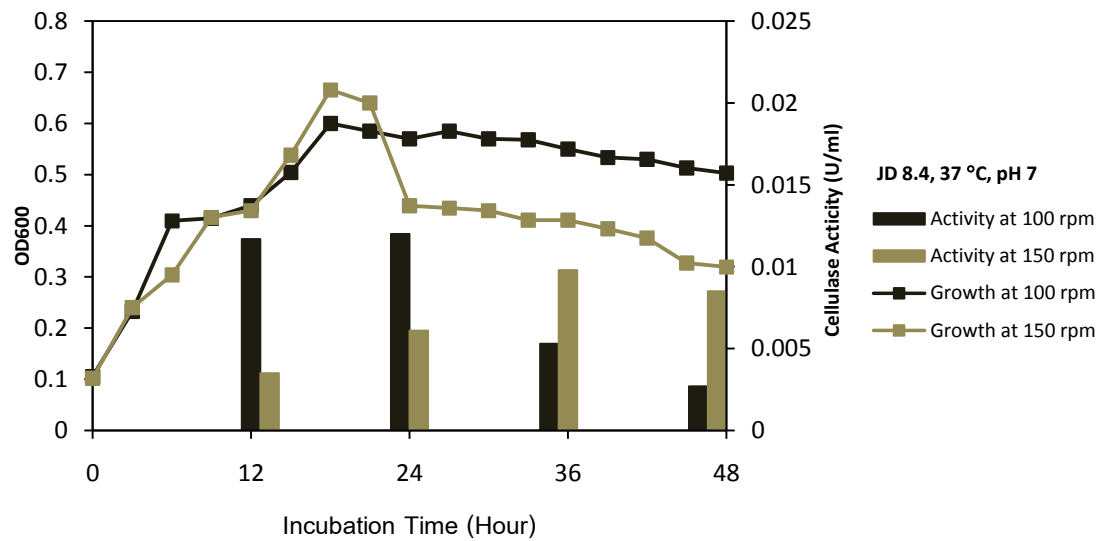


B

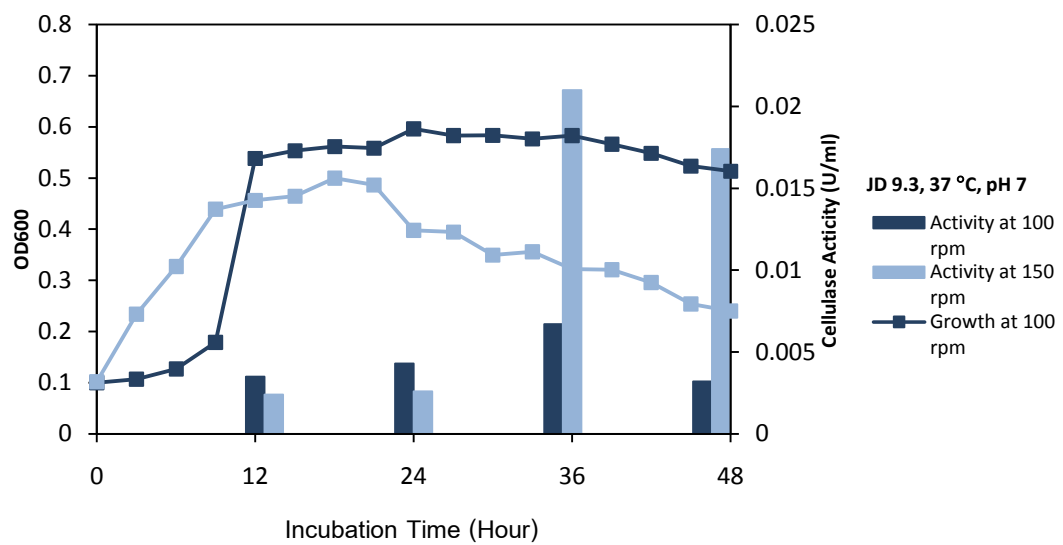


รูปที่ 18 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท JD 4.4 (A) และ JD 7.4 (B) เมื่อเปรียบเทียบความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ตามลำดับ

A



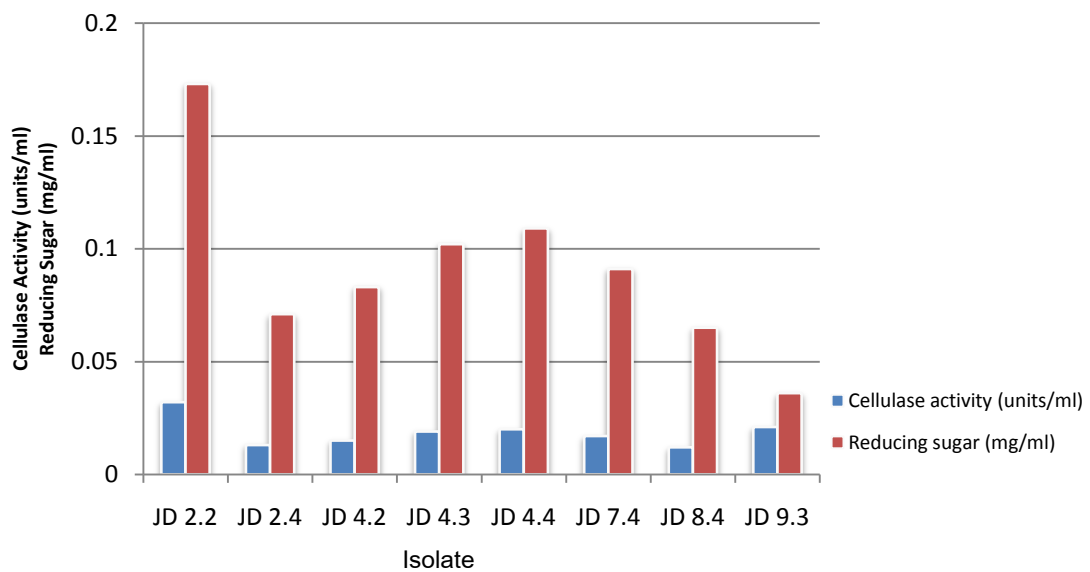
B



รูปที่ 19 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ของเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลท JD 8.4 (A) และ JD 9.3 (B) เมื่อเปรียบเทียบความเร็วยรอบของการเขย่า 100 rpm และ 150 rpm ตามลำดับ

ตารางที่ 3 สภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลต

Isolates	Temperature	pH	Shaking (rpm)	Cellulase activity (units/ml)	Reducing sugar (mg/ml)
JD 2.2	37 °C	6.0	100	0.032	0.173
JD 2.4	37 °C	7.0	150	0.013	0.071
JD 4.2	37 °C	6.5	150	0.015	0.083
JD 4.3	37 °C	7.5	150	0.019	0.102
JD 4.4	37 °C	7.0	150	0.020	0.109
JD 7.4	37 °C	7.0	150	0.017	0.091
JD 8.4	37 °C	6.5	100	0.012	0.065
JD 9.3	37 °C	6.5	150	0.021	0.036



รูปที่ 20 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงสุด และปริมาณน้ำตาล reducing sugar ของแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต ณ สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 3

4.7 การย้อมสีแกรมและทดสอบ catalase

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 ไอโซเลท คือ JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 พบว่า การติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่เป็นแกรมบวก รูปร่างมีทั้งเป็นท่อน และรูปร่างกลม และมีบางไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ แสดงดังตารางที่ 5 นอกจากนี้การศึกษาคูณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท พบว่าในการทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ มีเพียงไอโซเลท JD 9.3 ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ แสดงดังตารางที่ 6 นอกจากนี้ยังได้ทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปสำหรับเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารทั้ง 3 ชนิด คือ NA, NA + 12% NaCl และ glucose yeast extract agar โดยมีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การติดสีแกรม รูปร่าง และการเรียงตัวของแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3

Isolate	Gram's stain	รูปร่าง, การเรียงตัว
JD 2.2	negative	ท่อนสั้น อยู่เป็นกลุ่ม
JD 2.4	negative	ท่อนสั้น อยู่เป็นกลุ่มหรือคู่
JD 4.2	positive	กลม อยู่เป็นกลุ่มหรือเดี่ยว
JD 4.3	positive	กลม อยู่เป็นกลุ่มหรือเดี่ยว
JD 4.4	negative	ท่อนสั้น อยู่เป็นกลุ่ม
JD 7.4	negative	ท่อนสั้น อยู่เป็นกลุ่ม
JD 8.4	positive	กลม อยู่เป็นกลุ่ม
JD 9.3	negative	ท่อนสั้น อยู่เป็นกลุ่ม

ตารางที่ 5 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลสของแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3

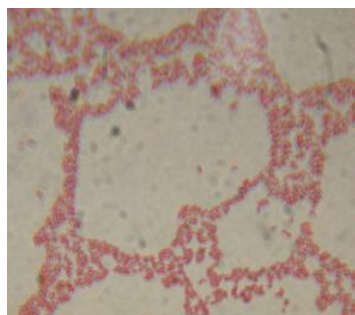
Isolate Name	catalase test
JD 2.2	+
JD 2.4	+
JD 4.2	+
JD 4.3	+
JD 4.4	+
JD 7.4	+
JD 8.4	+
JD 9.3	-

หมายเหตุ : + คือ ให้ผลบวกในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส
 - คือ ให้ผลลบในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส

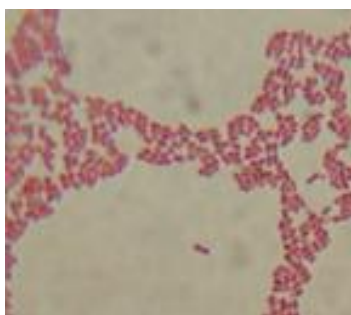
ตารางที่ 6 ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3

Isolate	NA	NA + 12% NaCl	Glucose yeast extract agar
JD 2.2	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, ขอบเรียบ
JD 2.4	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, เยิ้ม, ขอบเรียบ
JD 4.2	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, ขอบเรียบ
JD 4.3	ครีม, กลม, ขอบเรียบ, นูน	ขาว, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, ขอบเรียบ
JD 4.4	ครีม, กลม, นูน	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, เยิ้ม
JD 7.4	ครีม, กลม, ขอบเรียบ, นูน	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, ขอบเรียบ
JD 8.4	ครีม, กลม, ขอบเรียบ, นูน	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, ขอบเรียบ
JD 9.3	ครีม, กลม, pinpoint	ครีม, กลม, ขอบเรียบ	ขาว, กลม, ใหญ่

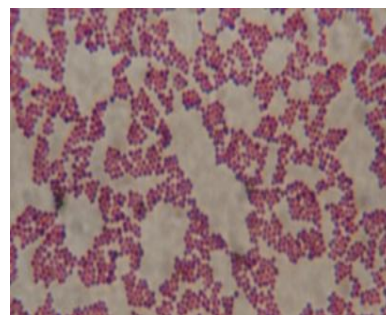
ผลการย้อมสีแกรม



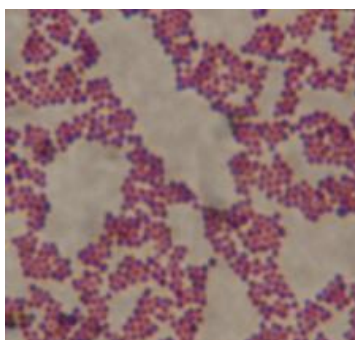
(A)



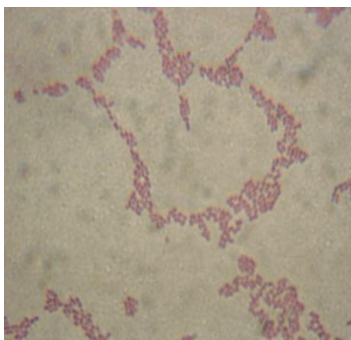
(B)



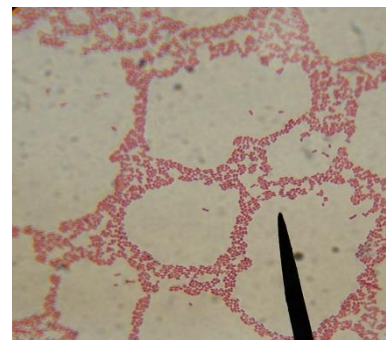
(C)



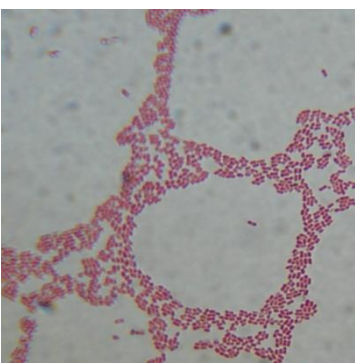
(D)



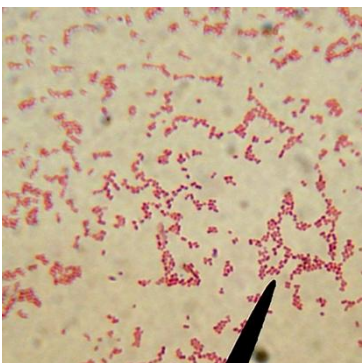
(E)



(F)



(G)



(H)

รูปที่ 21 ลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรมและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลล์ลู
เลส A= JD 2.2, B = JD 2.4, C = JD 4.2, D = JD 4.3, E = JD 4.4, F = JD 7.4, G = JD
8.4 และ H = JD 9.3

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่เรียทั้ง 8 ไอโซเลต ได้แก่ JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 (F = Facultative anaerobe, K/A = Alkaline/Acid, A/A = Acid/Acid)

Isolate	JD 2.2	JD 2.4	JD 4.2	JD 4.3	JD 4.4	JD 7.4	JD 8.4	JD 9.3
Gram's stain	Negative rod	Negative rod	Positive cocci	Positive cocci	Negative rod	Negative rod	Positive cocci	Negative rod
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculine	-	-	-	-	-	-	-	+
MR-VP	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	A/A
Litmus	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
O-F	F	F	F	F	F	F	F	F
Motile	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenyl-Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-

ในการบ่งชี้เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติต่างๆ ทางชีวเคมี (Bergey's Manual of Determinative bacteriology, 1989) พบว่ากลุ่มที่มีรูปร่างทั้งแบบแท่งจะติดสีแกรมลบ และกลุ่มที่มีรูปร่างกลม จะติดสีแกรมบวก และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางอย่างคล้ายคลึงกัน (ตารางที่ 8)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลส

จากการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลส จากตัวอย่างฟางข้าว สามารถแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CMC 0.5% ที่มี carboxymethylcellulose 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน ได้เชื้อแบคทีเรีย 48 ไอโซเลทโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ดังกล่าวสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC 0.5% ที่ไม่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ซึ่งแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดสามารถใช้ CMC 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียแทนการใช้กลูโคสได้ อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างฟางข้าวสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลาย CMC 0.5% ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้แยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างฟางข้าว เท่านั้น เอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสร้างขึ้นเพื่อย่อยสลาย CMC 0.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจไม่สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายตัวอย่างฟางข้าวได้โดยตรง เนื่องจากโครงสร้างและคุณสมบัติของเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของฟางข้าวมีความแตกต่างและย่อยสลายได้ยากกว่า CMC 0.5% ที่เตรียมขึ้น ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจึงมีความซับซ้อนมากกว่าในการย่อยสลายฟางข้าว ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและปลดปล่อยออกมาออกเซลล์เพื่อใช้ย่อยสลายเซลลูโลส ยกตัวอย่างเช่นการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อีกต่อไป

5.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5 – Dinitrosalicylic acid (DNS)

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (สมรักษ์, 2537) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสปลดปล่อยออกมาออกเซลล์เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, pH 7.0 และความเร็วรอบของการเขย่า 150 rpm (screen ครั้งที่ 1) 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JD 2.2, JD 2.4, JD 4.2, JD 4.3, JD 4.4, JD 7.4, JD 8.4 และ JD 9.3 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรองในสภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าวดังนี้ ไอโซเลท JD 2.2 = 0.0013 Unit/ml, JD 2.4 = 0.0170 Unit/ml, JD 4.2 = 0.0091 Unit/ml, JD 4.3 = 0.0120 Unit/ml, JD 4.4 = 0.0150 Unit/ml, JD 7.4 = 0.0130 Unit/ml, JD 8.4 = 0.0120 Unit/ml และ JD 9.3 = 0.0090 Unit/ml จะเห็นได้ว่าผลการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท เมื่อพิจารณาจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง(ยูนิต/มล.) ในแต่ละไอโซเลทที่ได้แล้วพบว่ามีความกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ จากเชื้อแบคทีเรียที่ทดลอง 48 ไอโซเลท ดังนั้นจึงน่าจะยืนยันเบื้องต้นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทั้ง 8 ไอโซเลท มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแล้วปลดปล่อยออกมาออกเซลล์เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ผสมอยู่ในกระดาษกรองได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะดังกล่าวเป็นเพียงการ screenเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรองสูงในสภาวะที่กำหนดเท่านั้น

เห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกมามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ต่างกัน ฉะนั้นอาจมีสถานะในการเจริญและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่ต่างกัน รวมทั้งสภาวะอุณหภูมิ pH และความเร็วยรอบของการเขย่าที่เหมาะสมก็น่าจะเป็นปัจจัยที่ควรศึกษาต่อไป ดังนั้นการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจึงควรหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลทเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้มาก และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสต่อกระดาษกรอง (filter paper activity) ที่สูงเป็นประโยชน์ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

5.3 การศึกษาอุณหภูมิ, pH และความเร็วยรอบของการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก 8 ไอโซเลทมีอัตราการเจริญและค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรองได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , pH 6.0 - 7.5 และความเร็วยรอบของการเขย่าที่เหมาะสม คือ 100 - 150 rpm ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแล้วพบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ เชื้อไอโซเลท JD 2.2 , JD 9.3 และ JD 4.4 สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดคือ 0.032 , 0.021 และ 0.020 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับโดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.173 , 0.112 และ 0.109 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับและสภาวะที่เหมาะสมตามลำดับดังนี้ คือ JD 2.2 สภาวะ pH 6.0, 37 °C, 100 rpm JD 9.3 สภาวะ pH 6.5, 37 °C, 150 rpm และ JD 4.4 สภาวะ pH 7.0, 37 °C, 150 rpm ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper activity) ที่ได้จากการทดลองเป็นค่าที่ใกล้เคียงและสอดคล้องกับงานวิจัย (ผจญ, 2547) ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยคัดเลือกจากดินบริเวณป่าชายเลนที่ทะเลสาบสงขลาเชื้อรหัส PR4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรองสูงสุด = 0.025 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 0.134 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี carboxymethylcellulose 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานและสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ คือ pH =7.0, อุณหภูมิ 30 - 35 °C ความเร็วยรอบของการเขย่า 100 rpm และการทดลองของ Han Ruyang และคณะจาก www.wanfangdata.com รายงานเกี่ยวกับ studies on direct conversion of cellulose to ethanol by a thermophilic anaerobic bacterium, *Clostridium* sp. strain EVA 4. พบว่าจากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียพวกแอนแอโรบิก (*Clostridium* sp. strain EVA 4) ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมัก คือ pH 6.2 – 8.9 อุณหภูมิ 45 – 60 °C (Thermophilic anaerobic bacterium) เชื้อดังกล่าวสามารถเปลี่ยน cellulose filter paper ไปเป็น ethanol ได้ดี

5.4 การย้อมสีแกรมและทดสอบ catalase

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 ไอโซเลท เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการบ่งเอกลักษณ์ต่อไปพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่มีการติดสีแกรมบวก (Gram's positive bacteria) รูปร่างส่วนใหญ่กลม และรูปร่างท่อนและมีบางไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้และการสร้างเอนไซม์คาตาเลสพบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์คาตาเลสได้เกือบหมด ยกเว้นไอโซเลท JD 9.3 แสดงว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมาได้มีความแตกต่างกันในลักษณะทางสัณฐานวิทยาและนอกจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้แล้วเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวยังสามารถสร้าง

เอนไซม์คาตาเลสได้อีกด้วย ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ ดังกล่าวมักจะจัดอยู่ในกลุ่ม aerobic และ facultative anaerobic bacteria ยกเว้นพวก streptococci (งามนิจ, 2547) ดังนั้นจึงสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่คัดเลือกได้และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาคุณสมบัติด้านชีวเคมีและการบ่งเอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

จากผลการทดลองในแต่ละขั้นตอนดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 8 ไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายกระดาษกรอง (filter paper) ซึ่งจะเห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาย่อยสลายกระดาษกรองนั้นเป็นเอนไซม์ที่ถูกเรียกว่า FPase ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสในกระดาษกรอง ดังนั้นในการหาประสิทธิภาพหรือหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจึงควรมีการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ร่วมด้วยยกตัวอย่างเช่น กิจกรรม carboxymethylcellulase activity โดยเอนไซม์ CMCase หรือกิจกรรม cellobiase activity โดยเอนไซม์ β -Glucosidase (www.techno.msu.ac.th) อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันว่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสนั้นเป็นการทำงานเชิงซ้อนมีเอนไซม์หลายชนิด (complex enzyme) ที่เข้าทำปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลส ดังนั้นการสังเกตผลการเปลี่ยนแปลงในแต่ละขั้นตอนการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิดอย่างสมบูรณ์ในหลอดทดลองนั้นจึงทำได้ค่อนข้างยากและมีข้อจำกัดเกี่ยวกับระยะเวลาที่เอนไซม์เซลลูเลสเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรท ทำให้ต้องเลือกศึกษาเอนไซม์บางชนิดและดัดแปลงวิธีการในการหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยากันอย่างสมบูรณ์ระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสับสเตรท ซึ่งในการทดลองนี้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายก็คือน้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างเอนไซม์FPase กับกระดาษกรองที่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ ผลการทดลองที่ได้จึงเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นของการทำงานของเอนไซม์ FPase ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มของเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลส อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการทดลองก็น่าจะเป็นประโยชน์ในการนำเอนไซม์ FPase ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เพื่อพัฒนาผลผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลทเป็นแบบ non growth - associated type คือ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสไม่สอดคล้องกับอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย กล่าวได้จากผลการทดลองที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสในระยะการเจริญเข้าสู่ช่วง late stationary phase และช่วง death phase สาเหตุคาดว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียอาจใช้สารอาหารอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC 0.5% (carboxymethylcellulose 0.5 g, NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.1 g, KCl 0.1 g, MgSO_4 0.05 g, yeast extract 0.05 g, agar 1.7 g, distilled water 100.0 ml pH = 7.0) ที่สามารถใช้ได้ง่ายกว่ายกตัวอย่างเช่น yeast extract, NaNO_3 ในช่วงแรกของการเจริญเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์และเมื่อสารอาหารดังกล่าวหมดลงในระยะการเจริญช่วง stationary phase เชื้อแบคทีเรียจึงสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสออกมานอกเซลล์เพื่อใช้ในการย่อยสลาย CMC 0.5% เพื่อในการเจริญของเซลล์ในระยะต่อไป และแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC 0.5% ที่เตรียมขึ้น ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลส (ธวัชชัย, 2532) โดยในการทดลองได้เติม NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อกระตุ้นการย่อยสลายCMC 0.5% เช่นเดียวกับรายงานของ Alexander (1977) ซึ่งกล่าวไว้ว่าการย่อยสลายเซลลูโลสโดยจุลินทรีย์จะเกิดได้ช้า แต่สามารถทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสเพิ่มสูงขึ้นได้

โดยการเติมไนโตรเจนลงไปในสับสเตรท สอดคล้องกับการทดลองของ พูนพิไลและคณะ ในปี 25 29 ที่พบว่าเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *Aspergillus fumigatus* FKN 125 สามารถสร้างเอนไซม์ FPase และ CMCase ได้สูงเมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

และจากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่คัดเลือกได้จากฟางข้าวมีไม่มากและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ต่ำกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Trichoderma* and *Aspergillus* sp. ที่ส่วนใหญ่ใช้ในภาคอุตสาหกรรมหรือทางการค้า ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับบทความจาก www.fao.org/dogrep/w7241e/w7241e08.htm ที่ว่าถึงแม้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีในธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจะมีปริมาณมาก แต่มีเพียงแค่บางชนิดเท่านั้นที่จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแล้วเกิดการย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อรามากกว่าที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง เช่น เชื้อ *Trichoderma* sp. ส่วนแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทจะพบได้น้อย

อย่างไรก็ตามนอกจากปัจจัยที่ศึกษาแล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ควบคุมการย่อยสลายเซลลูโลสในสถานะต่าง ๆ แต่งานวิจัยนี้ไม่ได้ดำเนินการศึกษาในรายละเอียดในแต่ละปัจจัย จึงมีข้อเสนอแนะที่ควรพิจารณาคือการหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ของ crude enzyme ที่ได้ และการบ่งชี้เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ซึ่งจำเป็นต้องมีการดำเนินการวิจัยต่อเนื่อง ทั้งนี้ก็เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์และผลการทดลองที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. กนก รัตนกนกชัย. 2528. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอมิเซลลูเลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร. วิทยาลัยเกษตรศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
2. กาพย์พร กลางสาทร. 2529. การแยกเส้นใยเซลลูโลสออกจากเนื้อไม้เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม . รายงานประจำปีการศึกษา 2529 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
3. กฤษฎา เวทีวุฒาจารย์. 2538. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน. วิทยาลัยเกษตรศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
4. จักรกฤษณ์ หอมจันทร์. 2529. จุลชีววิทยาของดิน (ฉบับจุลภาค-รวมแก่นวิชา). ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 199 หน้า.
5. พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ ธงชัย คัมภีร์ เสียงแจ้ว พิริยพจน์ต์ พิทยากร ลิ้มทอง วรณลดา สุนันทพงศ์ศักดิ์ ปรัชญา ธัญญาดี และน้อย เกษมสุขสกุล. 2529. การผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* FKN 125 บนวัสดุที่เป็นของแข็ง. การประชุมทางวิชาการนานาชาติ ครั้งที่ 24. หน้า 486-494.
6. วิทยา มะเสนา. 2530. จุลชีววิทยาทางดิน. ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 521 หน้า.
7. แสง รวยสูงเนิน. 2523. จุลชีววิทยาของดิน. ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 149 หน้า.
8. Alexander, M.1976. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons.Inc, New York.
9. Alexander, M.1977. Introduction to soil microbiology. 2nd Ed. John Wiley & Sons.Inc, New York.
10. Khan, A.W. 1980. Cellulolytic Enzyme System of *Acetivibrio cellulolyticus*, a Newly Isolated Anaerobe J. Gen. Microbiol. 121: 499-502.
11. Mebeth, I.G. 1961. Study on the decomposition of cellulose in soil. Soil Sci., 1: 437-487.
12. Murao S, Kanamoto, J and Arai, M. 1979. Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing micro-organism. J Ferment Technol 57: 151-156.
13. Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. Adv. Appl .Microbiol. 9: 91-125.
14. Reguera, G. and Leschine, S.B. 2001. Chitin degradation by cellulolytic anaerobes and facultative aerobes from soil and sediment. FEMS Microbiology Letter 204: 367-374
15. Reichelt, J.R. 1983. Toxicology: Industrial enzymology. The Application of Enzyme in Industry, The nature Press.
16. Sanhu, D.K. and Kalra, M.K. 1982. Production of cellulase, xylanase and pectinase by. *Trichoderma longibrachiatum* on different substrates. Trans. Br.mycol.Soc. 79: 409-413.
17. Seiller, G. 1916. A new method of precipitating cellulose for cellulose agar. Centralblatt. Bakt. Parasitenk. abt.II, 44:661-663.

18. Shewale, J.G. and Sadana, J.C. 1978. Cellulase and β -glucosidase production by a basidiomycete species. *Can.J.Microbiol.* 24:1204-1216.
19. Stapp, C. and Borstels, H. 1934. Microbiological investigation on decomposition of forest litter. *Centralblatt.Bakt.Parasitenk.abt. II*, 90:28-66.
20. Steven, B.J.H. and Payne, J. 1976. Cellulase and xylanase production by yeast of the genus. *Trichosporon*. *J.Gen.Microbiol.* 100: 381-393.
21. Sticklen, M.B. 2008. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics* 9, 433-443.
22. Stutzenberger, F.J. 1972. Cellulase production by *Thermomonas sporocurva* isolated from municipal solid waste compost. *Appl.Microbiol.* 22:147-152.
23. Van Iterson, G. 1985. Decomposition of cellulose by aerobic microorganism. *Centralblatt. Bakt. Parasitenk. abt. II*, 11: 689-698.
24. Vance, I., Tophan, C.M., Blayden, S.L. and Tampion, J.1980. Extracellular Cellulase Production by *Sporocytophaga myxococcoides* NCIB 8639 *J.Gen.Microbiol.* 117:235-241.
25. Weinberg, Z.G., Ashbell, G.Hen, Y.and Azrieli, A. 1995. The effect of cellulose and hemicellulase plus pectinase on the aerobic stability and fibre analysis of pea and wheat silages. *Animal Feed Sci.Tech.* 55: 287-293.
26. Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24 (2006) 452–481.

ภาคผนวก ก
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ 8 ค่า OD₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C pH = 7.0, 150 rpm

Isolates	0	3	6	9	12 *	15	18	21	24 *	27	30	33	36 *	39	42	45	48 *
JD 2.2	0.1	0.25	0.30	0.316	0.317	0.32	0.425	0.434	0.413	0.407	0.378	0.375	0.356	0.351	0.231	0.228	0.151
JD 2.4	0.1	0.12	0.220	0.225	0.280	0.48	0.515	0.507	0.459	0.425	0.385	0.360	0.340	0.342	0.307	0.251	0.12
JD 4.2	0.1	0.108	0.210	0.224	0.223	0.238	0.371	0.381	0.305	0.298	0.271	0.264	0.265	0.241	0.235	0.228	0.188
JD 4.3	0.1	0.123	0.225	0.23	0.241	0.268	0.351	0.408	0.411	0.397	0.395	0.367	0.322	0.333	0.32	0.308	0.22
JD 4.4	0.1	0.244	0.314	0.404	0.431	0.591	0.509	0.502	0.378	0.376	0.372	0.363	0.368	0.357	0.32	0.31	0.307
JD 7.4	0.1	0.439	0.441	0.444	0.446	0.545	0.677	0.542	0.443	0.440	0.426	0.421	0.425	0.409	0.403	0.365	0.335
JD 8.4	0.1	0.240	0.304	0.417	0.430	0.538	0.666	0.64	0.439	0.435	0.43	0.411	0.411	0.394	0.376	0.327	0.320
JD 9.3	0.1	0.234	0.327	0.439	0.457	0.465	0.500	0.487	0.398	0.395	0.350	0.356	0.322	0.321	0.296	0.254	0.240

หมายเหตุ: * เป็นชั่วโมงที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วย

ตารางที่ 9 ค่า OD₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C pH = 7.5 , 150 rpm

Isolates	0	3	6	9	12 *	15	18	21	24 *	27	30	33	36 *	39	42	45	48 *
JD 2.2	0.1	0.268	0.316	0.318	0.324	0.329	0.526	0.500	0.362	0.351	0.345	0.341	0.336	0.343	0.326	0.318	0.316
JD 2.4	0.1	0.129	0.226	0.234	0.291	0.380	0.616	0.419	0.388	0.393	0.367	0.365	0.354	0.351	0.346	0.300	0.302
JD 4.2	0.1	0.101	0.224	0.227	0.231	0.246	0.471	0.352	0.272	0.267	0.261	0.265	0.256	0.249	0.250	0.216	0.202
JD 4.3	0.1	0.113	0.217	0.233	0.235	0.278	0.452	0.402	0.382	0.372	0.371	0.370	0.357	0.358	0.336	0.334	0.294
JD 4.4	0.1	0.137	0.412	0.414	0.446	0.519	0.546	0.414	0.335	0.309	0.300	0.292	0.284	0.283	0.280	0.272	0.260
JD 7.4	0.1	0.106	0.270	0.306	0.328	0.335	0.475	0.300	0.272	0.263	0.260	0.261	0.258	0.253	0.352	0.221	0.202
JD 8.4	0.1	0.166	0.428	0.443	0.487	0.494	0.626	0.426	0.430	0.411	0.406	0.404	0.379	0.377	0.353	0.350	0.315
JD 9.3	0.1	0.254	0.417	0.406	0.441	0.493	0.533	0.384	0.375	0.379	0.372	0.361	0.355	0.341	0.335	0.318	0.316

หมายเหตุ: * เป็นชั่วโมงที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วย

ตารางที่ 10 ค่า OD₆₆₀ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C pH = 6.5, 150 rpm

Isolates	0	3	6	9	12 *	15	18	21	24 *	27	30	33	36 *	39	42	45	48 *
JD 2.2	0.1	0.159	0.295	0.457	0.522	0.511	0.469	0.464	0.457	0.452	0.450	0.447	0.440	0.436	0.409	0.408	0.405
JD 2.4	0.1	0.141	0.292	0.304	0.544	0.537	0.536	0.522	0.506	0.474	0.466	0.449	0.439	0.432	0.424	0.420	0.406
JD 4.2	0.1	0.143	0.289	0.312	0.554	0.521	0.504	0.494	0.442	0.439	0.432	0.431	0.427	0.418	0.419	0.415	0.411
JD 4.3	0.1	0.144	0.279	0.300	0.558	0.552	0.543	0.536	0.488	0.485	0.480	0.452	0.450	0.436	0.430	0.430	0.428
JD 4.4	0.1	0.164	0.410	0.435	0.432	0.464	0.453	0.450	0.447	0.439	0.420	0.419	0.411	0.404	0.402	0.400	0.398
JD 7.4	0.1	0.166	0.281	0.318	0.499	0.514	0.487	0.472	0.440	0.439	0.422	0.428	0.421	0.420	0.419	0.417	0.413
JD 8.4	0.1	0.182	0.469	0.524	0.571	0.573	0.570	0.568	0.566	0.565	0.561	0.560	0.557	0.558	0.542	0.438	0.410
JD 9.3	0.1	0.138	0.344	0.358	0.476	0.486	0.491	0.454	0.445	0.416	0.411	0.412	0.410	0.408	0.405	0.400	0.393

หมายเหตุ: * เป็นชั่วโมงที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วย

ตารางที่ 11 ค่า OD₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C pH = 6.0, 150 rpm

Isolates	0	3	6	9	12 *	15	18	21	24 *	27	30	33	36 *	39	42	45	48 *
JD 2.2	0.1	0.148	0.162	0.188	0.222	0.328	0.414	0.430	0.508	0.484	0.452	0.442	0.407	0.399	0.353	0.340	0.348
JD 2.4	0.1	0.171	0.168	0.207	0.212	0.305	0.615	0.517	0.527	0.526	0.474	0.434	0.376	0.346	0.320	0.319	0.324
JD 4.2	0.1	0.141	0.233	0.272	0.276	0.280	0.283	0.257	0.255	0.246	0.240	0.227	0.218	0.216	0.202	0.197	0.200
JD 4.3	0.1	0.146	0.160	0.172	0.239	0.423	0.416	0.401	0.393	0.366	0.343	0.316	0.302	0.250	0.246	0.230	0.231
JD 4.4	0.1	0.131	0.239	0.257	0.269	0.270	0.278	0.280	0.296	0.296	0.276	0.260	0.266	0.262	0.268	0.263	0.236
JD 7.4	0.1	0.143	0.151	0.161	0.172	0.269	0.263	0.323	0.475	0.446	0.432	0.345	0.301	0.274	0.276	0.293	0.282
JD 8.4	0.1	0.102	0.142	0.182	0.326	0.449	0.314	0.311	0.298	0.291	0.286	0.282	0.278	0.270	0.273	0.220	0.212
JD 9.3	0.1	0.322	0.351	0.328	0.329	0.330	0.332	0.384	0.367	0.335	0.334	0.327	0.326	0.323	0.322	0.313	0.315

หมายเหตุ: * เป็นชั่วโมงที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วย

ตารางที่ 12 ค่า OD₆₆₀ ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ณ ชั่วโมงต่าง ๆ สภาวะอุณหภูมิ 37 °C pH = 5.5, 150 rpm

Isolates	0	3	6	9	12 *	15	18	21	24 *	27	30	33	36 *	39	42	45	48 *
JD 2.2	0.1	0.117	0.119	0.128	0.226	0.333	0.502	0.517	0.533	0.527	0.516	0.498	0.493	0.487	0.430	0.398	0.312
JD 2.4	0.1	0.196	0.205	0.213	0.333	0.345	0.385	0.383	0.392	0.444	0.440	0.402	0.358	0.312	0.222	0.212	0.192
JD 4.2	0.1	0.115	0.122	0.123	0.227	0.273	0.327	0.407	0.473	0.427	0.403	0.394	0.382	0.375	0.264	0.183	0.154
JD 4.3	0.1	0.216	0.220	0.239	0.387	0.496	0.483	0.472	0.479	0.472	0.474	0.469	0.450	0.434	0.432	0.433	0.409
JD 4.4	0.1	0.104	0.106	0.125	0.131	0.198	0.214	0.246	0.245	0.211	0.195	0.183	0.185	0.172	0.164	0.168	0.105
JD 7.4	0.1	0.129	0.215	0.225	0.298	0.293	0.312	0.318	0.325	0.289	0.236	0.226	0.218	0.209	0.211	0.213	0.200
JD 8.4	0.1	0.127	0.133	0.142	0.147	0.183	0.199	0.214	0.221	0.237	0.224	0.227	0.223	0.213	0.115	0.108	0.104
JD 9.3	0.1	0.148	0.160	0.268	0.273	0.285	0.247	0.250	0.197	0.195	0.199	0.181	0.176	0.165	0.123	0.101	0.100

ตารางที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C pH = 7.0, 150 rpm ระยะเวลาชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48

Isolates	0	12	24	36	48
JD 2.2	0	0.007	0.0013	0.008	0.003
JD 2.4	0	0.017	0.0163	0.007	0.004
JD 4.2	0	0.008	0.0091	0.004	0.0004
JD 4.3	0	0.0022	0.012	0.002	0.0007
JD 4.4	0	0.005	0.015	0.013	0.007
JD 7.4	0	0.003	0.013	0.010	0.006
JD 8.4	0	0.006	0.012	0.011	0.003
JD 9.3	0	0.005	0.009	0.006	0.0022

ตารางที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C
pH = 7.5, 150 rpm ระยะเวลาชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48

Isolates	0	12	24	36	48
JD 2.2	0	0.0029	0.0048	0.0120	0.0078
JD 2.4	0	0.1070	0.0126	0.0054	0.0048
JD 4.2	0	0.0002	0.0061	0.0139	0.0044
JD 4.3	0	0.0091	0.0157	0.0250	0.0029
JD 4.4	0	0.0083	0.0154	0.0085	0.0067
JD 7.4	0	0.0006	0.0091	0.0072	0.0058
JD 8.4	0	0.0066	0.0074	0.0085	0.0083
JD 9.3	0	0.0024	0.0035	0.0051	0.0013

ตารางที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C
pH = 6.5, 150 rpm ระยะเวลาชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48

Isolates	0	12	24	36	48
JD 2.2	0	0.0100	0.0145	0.0050	0.0025
JD 2.4	0	0.0050	0.0160	0.0080	0.0045
JD 4.2	0	0.0095	0.0125	0.0050	0.0023
JD 4.3	0	0.0095	0.0089	0.0055	0.0035
JD 4.4	0	0.0065	0.0105	0.0175	0.0030
JD 7.4	0	0.0051	0.0085	0.0072	0.0050
JD 8.4	0	0.0075	0.0120	0.0165	0.0024
JD 9.3	0	0.0049	0.0075	0.0109	0.0025

ตารางที่ 16 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C
pH = 6.0, 150 rpm ระยะเวลาชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48

Isolates	0	12	24	36	48
JD 2.2	0	0.0007	0.0030	0.0022	0.0003
JD 2.4	0	0.0010	0.0110	0.0032	0.0030
JD 4.2	0	0.0070	0.0130	0.0024	0.0003
JD 4.3	0	0.0001	0.007	0.011	0.009
JD 4.4	0	0.0009	0.0098	0.0096	0.0080
JD 7.4	0	0.0009	0.0030	0.0070	0.0040
JD 8.4	0	0.0010	0.0020	0.0110	0.004
JD 9.3	0	0.0022	0.0098	0.0111	0.0022

ตารางที่ 17 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะ 37 °C
pH = 5.5, 150 rpm ระยะเวลาชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48

Isolates	0	12	24	36	48
JD 2.2	0	0.0011	0.0080	0.0124	0.0019
JD 2.4	0	0.0024	0.0027	0.0008	0.0007
JD 4.2	0	0.0005	0.0027	0.0052	0.0004
JD 4.3	0	0.0005	0.0043	0.0011	0.0007
JD 4.4	0	0.0003	0.0011	0.0016	0.0005
JD 7.4	0	0.0024	0.0029	0.0032	0.0020
JD 8.4	0	0.0013	0.0014	0.0020	0.0006
JD 9.3	0	0.0054	0.0024	0.0048	0.0019

ตารางที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายกระดาษกรอง (Unit/ml) ณ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ระยะเวลาชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48

Isolates	0	12	24	36	48
JD 2.2	0	0.0013	0.0072	0.0320	0.0133
JD 2.4	0	0.0051	0.0091	0.0130	0.0065
JD 4.2	0	0.0029	0.104	0.0153	0.0072
JD 4.3	0	0.0008	0.0061	0.0189	0.0139
JD 4.4	0	0.0024	0.0064	0.0200	0.0128
JD 7.4	0	0.0032	0.0064	0.0168	0.0159
JD 8.4	0	0.0035	0.0061	0.0098	0.0850
JD 9.3	0	0.0024	0.0026	0.0210	0.0174

ตารางที่ 19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) โดยวิธี DNS ณ สภาวะอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ความเร็วรอบการเขย่า 100 rpm ระยะเวลาชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48

Isolates	0	12	24	36	48
JD 2.2	0	0.0072	0.0390	0.1730	0.0720
JD 2.4	0	0.0029	0.0245	0.0100	0.0058
JD 4.2	0	0.0187	0.0461	0.0173	0.0130
JD 4.3	0	0.0144	0.0489	0.0461	0.0403
JD 4.4	0	0.0158	0.0216	0.0187	0.0129
JD 7.4	0	0.0100	0.0289	0.0202	0.0130
JD 8.4	0	0.0633	0.0648	0.0288	0.0144
JD 9.3	0	0.0187	0.0203	0.0360	0.0173

ตารางที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) โดยวิธี DNS ณ สภาวะอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ความเร็วรอบการเขย่า 150 rpm ระยะเวลาชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36 และ 48

Isolates	0	12	24	36	48
JD 2.2	0	0.0029	0.0600	0.0550	0.0430
JD 2.4	0	0.0273	0.0490	0.0705	0.0350
JD 4.2	0	0.0158	0.0560	0.0830	0.0390
JD 4.3	0	0.0043	0.0331	0.1020	0.0750
JD 4.4	0	0.0129	0.0345	0.1090	0.069
JD 7.4	0	0.0173	0.0300	0.0907	0.086
JD 8.4	0	0.0187	0.0331	0.0532	0.0460
JD 9.3	0	0.0129	0.0143	0.1120	0.0940

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Carboxymethylcellulose agar (CMC agar): Glucose (Kasing, 1995)

Carboxymethylcellulose	0.5 g
NaNO ₃	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
KCl	0.1 g
MgSO ₄	0.05 g
Yeast extract	0.05 g
Glucose	1.0 g
Agar	1.7 g
Distilled water	100.0 ml

ปรับ pH = 7.0 ด้วย 1 N HCl จากนั้นนำไป autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Carboxymethylcellulose agar (CMC agar) : No glucose (ดัดแปลงจาก Kasing, 1995)

Carboxymethylcellulose	0.5 g
NaNO ₃	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
KCl	0.1 g
MgSO ₄	0.05 g
Yeast extract	0.05 g
Agar	1.7 g
Distilled water	100.0 ml

ปรับ pH = 7.0 ด้วย 1 N HCl จากนั้นนำไป autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Carboxymethylcellulose broth (CMC broth) (ดัดแปลงจาก Kasing, 1995)

Carboxymethylcellulose	0.5 g
NaNO ₃	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
KCl	0.1 g
MgSO ₄	0.05 g
Yeast extract	0.05 g
Distilled water	100.0 ml

ปรับ pH = 7.0 ด้วย 1 N HCl จากนั้นนำไป autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารเคมี และวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1. 3% Hydrogen peroxide solution

H_2O_2	3.0 g
H_2O	100 ml

2. Citrate buffer (0.05 M, pH 4.8)

Citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	10.51 g/l.
Sodium Citrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	14.71 g/l.

ละลายสารทั้งสองในน้ำ จะได้ สารละลาย 0.05 M citric acid และสารละลาย 0.05 M sodium citrate ปรับ pH = 4.8 โดยปิเปต 0.05 M citric acid ปริมาตร 667 มล. ละลายในสารละลาย 0.05 M sodium citrate ปริมาตร 1,000 มล. (ผจญ, 2547)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (สมรักษ์, 2537)

3.1 สารเคมี 3 , 5 - Dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0 %

เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มล. เติมสารละลายต่างที่ละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มล.) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน จนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate (rochelle salt) ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มล. เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องจะสามารถเก็บไว้ใช้ได้หลายอาทิตย์

3.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐานเตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล.จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

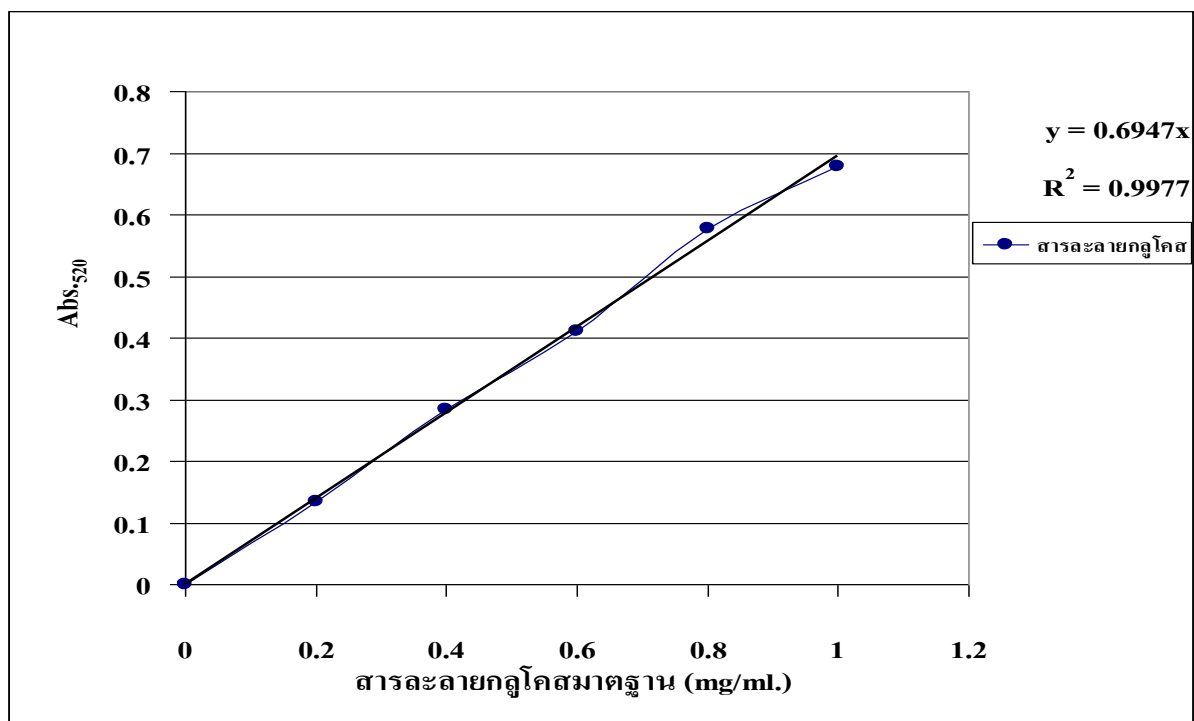
ตารางที่ 21 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
1	0.0	1.00	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.00	1.0

3.3 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้ว) หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องการวิเคราะห์ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร
3. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที
4. แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที
5. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Abs_{520}) กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มล.) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

รูปที่ 24 มาตรฐานกลูโคสสำหรับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS



3.4 การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (สมรักษ์, 2537)

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม / โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

หมายเหตุ : Unit (U) ของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์เซลล์ที่ย่อยสลายเซลล์เป็นกลูโคส
1 $\mu\text{mol/min}$ ที่ 50 °C

ภาคผนวก ง

การย้อมสีแกรม (Gram's straining) (งามนิจ, 2547)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย (single colony)
2. แผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด (glass slide)
3. loop
4. crystal violet
5. Gram's iodine
6. 95 % alcohol
7. Gram's safranin
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. นาฬิกาจับเวลา
10. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง
2. เกลี่ย (smear) เชื้อแบคทีเรียลงบนสไลด์ ทิ้งให้แห้งในอากาศ แล้วตรึงเซลล์โดยทำ heat fix
3. หยด crystal violet ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที
4. ล้าง crystal violet ด้วยการผ่านน้ำประปาเบา ๆ จนสีหมดจากสไลด์
5. หยด Gram's iodine ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที
6. ล้าง Gram's iodine ด้วยการผ่านน้ำประปาเบา ๆ จนสีหมดจากสไลด์
7. หยด 95 % alcohol ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 15 – 30 วินาที
8. ล้าง 95 % alcohol ออกให้หมดโดยผ่านน้ำประปาเบา ๆ
9. หยด Gram's safranin ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 30 วินาที
10. ล้าง Gram's safranin ออกให้หมดโดยผ่านน้ำประปาเบา ๆ
11. ทิ้งให้แห้ง หรือใช้กระดาษซับให้แห้ง นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า
12. สังเกตและบันทึกการติดสีแกรม ขนาด รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย

หมายเหตุ : ถ้าตัวเซลล์ติดสีม่วงของ crystal violet จัดเป็น Gram positive
ถ้าตัวเซลล์ติดสีแดงของ Gram's safranin จัดเป็น Gram negative

ภาคผนวก ฉ

การตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (งามนิจ, 2547)

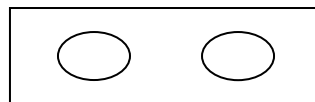
1. เอนไซม์คาตาเลส (catalase) มักจะพบใน aerobic และ facultative anaerobic bacteria ยกเว้นพวก Streptococi ทำหน้าที่กำจัดพิษ คือ H_2O_2 ซึ่งเป็นผลมาจาก O_2 ไปรับอิเล็กตรอนที่ส่งมาตามระบบขนส่งอิเล็กตรอน การตรวจสอบเอนไซม์คาตาเลส มีประโยชน์ในการจำแนกความแตกต่างระหว่าง Micrococcus (+), Staphylococcus (+) และ Streptococcus (-); Bacillus (+) และ Clostridium (-) เป็นต้น

การทดสอบ

1. เชื้อแบคทีเรีย อายุ 18- 24 ชั่วโมง
2. สารเคมี
 - 2.1 3 % H_2O_2
 - 2.2 Phosphate buffer pH = 7.0
3. วัสดุอื่นๆ
 - 3.1 สไลด์แก้ว และหลอดทดลองปลอดเชื้อ
 - 3.2 loop
 - 3.3 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
 - 3.4 dropper

วิธีการทดสอบ

1. หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนสไลด์แก้วด้านละ 1 หยด



H_2O Sample

2. ใช้ loop ปลอดเชื้อแตะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบมาทำให้แขวนลอยในหยดน้ำ (sample) ส่วนอีกด้านใช้เป็นตัวควบคุม
3. ใช้ dropper หยด 3% H_2O_2 ลงบน suspension ของเชื้อแบคทีเรีย (ห้ามหยด 3% H_2O_2 ลงบนสไลด์ก่อนหยดแบคทีเรีย (เพราะอาจเกิด false positive ได้))
4. สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับ control
 - positive test = มีฟองก๊าซเกิดขึ้นมากมายใน 10 นาที
 - negative test = ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น
 - false positive test = เกิดฟองช้า และเกิดเพียง 2- 3 ฟอง จัดเป็น negative test เนื่องจากเอนไซม์ peroxidase