

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทนความร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเหตุที่สามารถพบเชื้อแบคทีเรียได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และดินตามธรรมชาติจะมีการทับถมของซากพืชปริมาณสูง ซึ่งเป็นแหล่งสะสมของสารประกอบเซลลูโลส ดังนั้น การนำตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ มาทำการแยกเชื้อจึงมีโอกาที่จะแยกได้ไอโซเลทที่แตกต่างกันได้มาก และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ การแยกเชื้อจะทำบน enriched medium (carboxymethylcellulose agar ; CMC agar) (Prasertsan *et al.*, 1992) ซึ่งมี CMC เป็นสับสเตรตต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เพื่อให้ได้เชื้อที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกเชื้อควรบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องร่วมด้วย เพื่อให้ได้เชื้อ mesophile ที่ทนความร้อน ดินตัวอย่างที่แยกเชื้อได้จะมีจำนวนไอโซเลทที่แตกต่างกันตามตัวอย่างดินแต่ละที่ พบว่าดินตัวอย่างที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 70°C (F5,F6) มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียน้อย เชื้อที่เจริญได้ส่วนใหญ่ในดินแหล่งดังกล่าวอาจเป็น extremely thermophile ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 65 ถึง 85°C (Leuschner and Antranikian, 1995)

การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่แยกได้ ทำโดยเพาะเชื้อบน CMC agar แล้วตรวจสอบด้วย congo red test ซึ่งวิธีนี้ได้รับความนิยมเพราะทำได้สะดวก รวดเร็ว และเสียย้อมมีความคงทนสามารถอ่านผลได้นาน (Teather and Wood, 1982) พบว่าไอโซเลท T1-2 ให้ผลการเกิด clear zone กว้างที่สุด อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความไวต่อวิธีทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ต่างกัน Prasertsan *et al.* (1992) ได้ทดลองแยกเชื้อราจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มได้ 34 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท F33 ให้ผลบวกในการย่อยสลาย filter paper (filter paper ; FP disintegration method) แต่ไม่ให้เกิด clear zone เมื่อเพาะเลี้ยงบน CMC agar (clearing zone method) ส่วนเชื้อราที่ใช้เป็น reference strains จำนวน 9 เชื้อ พบว่า *Aspergillus* sp. TISTR 3092 และ *A. niger* TISTR 3210 ให้ผลกับวิธี clearing zone เท่านั้น ส่วน *Trichoderma viride* TISTR 3167 *T. reesei* TISTR 3230 และ *Sporotrichum pulverulentum* TISTR 3226 ให้ผลบวกเฉพาะวิธี FP disintegration *Trichoderma* sp. 207 ไม่ให้ผลบวกกับทั้ง 2 วิธี และ *Myrothocium verrucaria* TISTR 3225 ให้ผลบวกชัดเจนมากทั้ง 2 วิธีดังกล่าว จึงกล่าวได้ว่าการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเป็นการตรวจสอบเบื้องต้น ซึ่งต้องมีการตรวจค่าการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อในขั้นตอนต่อไป

การตรวจวัดปริมาณเซลลูเลสที่ผลิตโดยเชื้อราและแบคทีเรียด้วย DNS reagent (Miller, 1959) จะบ่มเอนไซม์กับสับสเตรตที่อุณหภูมิ 50°C แต่ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ Ali *et al.* (1991) ได้ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา 2 ชนิด ตามวิธีของ Nelson และ Somogyi โดยบ่มเอนไซม์และสับสเตรตที่อุณหภูมิต่างกันคือ *Aspergillus terreus* บ่มที่ 60°C และ *Trichoderma reesei* บ่มที่ 50°C จะให้ผลการวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับผลการทดลองของ MacDonald *et al.*, 1984 กล่าวคือ *Trichoderma achrasporum* สามารถผลิตเซลลูเลสที่ให้ค่าการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 50°C จากงานวิจัยนี้ พบว่าเชื้อไอโซเลท CMU4-4 ให้ผลการทำงานของเอนไซม์สูงสุด และให้ผลบวกกับการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในขั้นแรกบน CMC agar medium จึงนำไปศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสได้ดีที่สุดต่อไป

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกสู่ภายนอกเซลล์โดยจุลินทรีย์ จะขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณเชื้อ แหล่งคาร์บอน pH อุณหภูมิ การมี inducer และหรือ inhibitor สาร additives เช่น Tween 20 Tween 80 ขนาดของการเพาะเลี้ยง (batch size) การให้อากาศ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (Ali *et al.*, 1991)

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั้งในเชื้อราและแบคทีเรียมีลักษณะเดียวกันคือการผลิตจะอยู่ภายใต้การควบคุมด้วยระบบ induction และ repression กลไกที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสจะแตกต่างกันตามชนิดจุลินทรีย์ Ali and Sayed (1992) พบว่าการผลิตเอนไซม์โดย *Myrothecium verrucaria* และ *Aspergillus nidulans* จะถูกจำกัดโดยกลไก catabolite repression ส่วน *T. reesei* และ *A. terreus* จะอยู่ภายใต้การควบคุมโดยระบบ induction (Ali *et al.*, 1991) CMC เป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้น จึงใช้อาหารที่มี CMC เป็นส่วนประกอบ การทดลองนี้พบว่า *B. subtilis* CMU4-4 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด ในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้น CMC เป็น 0.1% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasertsan *et al.* (1992) นั่นคือ เมื่อเติม 0.1% CMC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อทดสอบจะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีก 4 เท่า นอกจากนี้ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ศึกษาโดย จิตตเสน (2529) พบว่าเชื้อ *Humicola nigrecens* CM 33B สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจาก CMC เป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่สามารถละลายน้ำได้ จึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า *B. subtilis* CMU4-4 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 45°C เนื่องจาก *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้ จึงสามารถทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงเช่นนี้ได้

และการผลิตเอนไซม์จะลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 55°C และพบว่าไม่มีการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 65°C ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างสามมิติที่สลับซับซ้อนและการที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เอนไซม์จะต้องมีโครงสร้างรูปสามมิติที่เหมาะสมแก่การทำงาน ซึ่งมีผลต่อบริเวณการเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรด (active site) อุณหภูมิสูงจะทำลายพันธะอย่างอ่อนของพันธะ non-covalent ที่ยึดโครงสร้างของเอนไซม์นั้นไว้ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (denaturation) (พัชรา, 2541)ซึ่งจะมีผลต่อ metabolism ของเซลล์ Barron *et al.* (1996) ได้ทดลองเพาะเลี้ยง thermotolerant yeast คือ *Kluyveromyces marxianus* IMB3 เพื่อผลิต ethanol พบว่า เชื้อสามารถเจริญและผลิตเซลลูเลสเพื่อย่อยเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรดใน medium ได้ดีที่อุณหภูมิ 45°C ก่อนที่จะเปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดขึ้นเป็น ethanol ในที่สุด ซึ่งเป็นอุณหภูมิเดียวกับการทดลองนี้ นั่นคือ *B. subtilis* CMU4-4 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45°C

จากการศึกษาค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหาร ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *B. subtilis* CMU4-4 พบว่าเชื้อ สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 7 แต่ไม่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ในอาหารที่มี pH 3 และ 11

Hudson *et al.* (1991) ระบุว่าเชื้อทดสอบ extremely thermophilic anaerobe H173 สามารถผลิตเอนไซม์ CMCase ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ pH 6.5 ถึง 7 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปจะเจริญในสภาวะความเป็นกรดเป็นด่างค่อนข้างปานกลาง ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งที่มาหรือชนิดของจุลินทรีย์ เช่น กรณีเชื้อ alkalophilic *Bacillus* sp ที่แยกได้จากดินตัวอย่างที่มี pH 9.5 จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี 1% CMC และ pH 10 (Khyami-Horani, 1996) โดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญและมีกิจกรรมได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย (จิตตเสน, 2529) จากงานวิจัยของ Keskar (1992) การเพาะเลี้ยง *Penicillium janthinellum* ที่ pH ค่ำมาๆ คือ pH 3 ทำให้มีการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสน้อยมาก เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+) เอนไซม์ส่วนมากจะเร่งปฏิกิริยาได้ในช่วง pH 4 ถึง 10 ถ้าต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 10 จะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวร เพราะเอนไซม์เสียสภาพไปเนื่องจากโครงสร้างโปรตีนถูกทำลาย (พัชรา, 2541)

แหล่งไนโตรเจนในอาหารมีผลต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ถ้าในอาหารไม่มี inorganic nitrogen เชื้อจะเจริญได้ไม่ดี พบว่าเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) ช่วยให้เชื้อสามารถผลิตเซลลูเลสได้ดีกว่า nitrate แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.7% ทำให้เชื้อ *P. janthinellum* ผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด (Keskar, 1992) peptone และ yeast extract เหมาะต่อการผลิต endo และ exo-glucanase (Ali *et al.*, 1991) สำหรับการทดลองนี้พบว่าการใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ร่วมกับ yeast extract ที่

เป็นส่วนประกอบของ medium ในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* CMU4-4 เชื่อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด นั่นคือ เชื่อสามารถใช้ yeast extract ได้ดีกว่า peptone และ casamino acid

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดจากการผลิตของ *B. subtilis* CMU4-4 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เชื่อผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด การเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลดลงในชั่วโมงที่ 12 จากงานวิจัยของ Khyami-Horani (1996) ระบุว่า *Bacillus* sp. strain HC-1 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดในระยะการเจริญช่วง exponential phase หลังเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง เนื่องจากเกิด feed back repression ภายหลังจากมีการผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด โดยน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต จะไปกดกลไก catabolite repression ของการสังเคราะห์เซลลูเลส (Nisizawa, 1970) เนื่องจากเชื่อสามารถใช้กลูโคสที่ละลายในอาหารได้โดยตรง จึงไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจึงลดลงเมื่อมีการสะสมของกลูโคสเพิ่มขึ้น