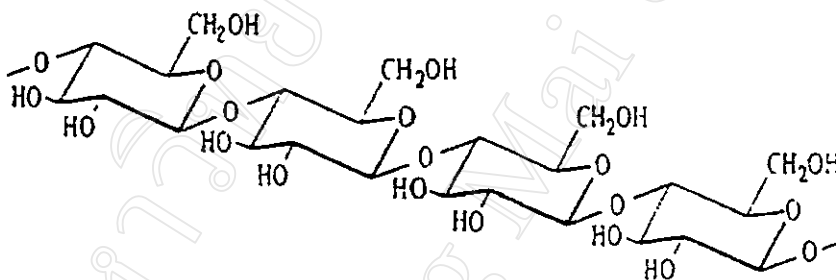


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลส ($C_6H_{10}O_5$) เป็นพวก polysaccharide ที่เป็นเส้นยาวประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคส (glucose) ต่อกันเป็นโพลิเมอร์ (polymer) เชื่อมด้วยพันธะ β -(1-4) glycosidic (รูป 1) มีจำนวนประมาณ 1,000-15,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-2,400,000 คาลตัน (Dalton) (จิตตเสน, 2527) โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงกันเป็นมัดๆ โดยจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน เรียก fibril ซึ่งจะไม่ละลายน้ำ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช ในธรรมชาติเซลลูโลส มักจะเกาะอยู่กับสารจำพวก hemicellulose, pectin, และ lignin (วิภาภัทร, 2534) ซึ่งจะทำหน้าที่คล้ายซีเมนต์ให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ ส่วนเซลลูโลสล้วนๆ จะมีความเหนียว แต่จะนิ่ม เช่น ฝ้าย (เจริญ, 2534)



รูป 1 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : Solomon (1970)

สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม จะมีของเหลือทิ้งจากการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก ถ้าสามารถนำมาใช้ประโยชน์จะช่วยแก้ปัญหาในการกำจัดได้ส่วนหนึ่ง ตัวอย่างของเศษวัสดุการเกษตรที่มีส่วนประกอบเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แสดงดังตาราง 1 และปัจจุบันเศษวัสดุดังกล่าวมีบางส่วนที่ได้นำกลับมาใช้ประโยชน์แล้ว แสดงดังตาราง 2

ตาราง 1 ปริมาณของธาตุโลหะในสารประกอบต่างๆ

วัตถุดิบ	ปริมาณธาตุโลหะ (ร้อยละ)
ฝ้าย	91.0
เนื้อไม้	40.0-45.0
กระดาษหนังสือพิมพ์	40.0-48.0
ฟางข้าวชนิดต่างๆ	
ข้าวสาลี	30.5
ข้าวเจ้า	32.1
ข้าวบาเลย์	40.0
ข้าวโอ๊ต	42.8
ข้าวไรน์	34.0
ขานอ้อย	46.0
เส้นใยขานอ้อย	56.6
ขานอ้อยส่วนแกน	55.4

ที่มา : คัดแปลงจาก Goksoyr and Eriksen (1980)

ตาราง 2 ตัวอย่างเศษวัสดุที่มีธาตุโลหะที่นำมาใช้ในปัจจุบัน

วัสดุเหลือใช้	การนำมาใช้ในปัจจุบัน
1. ขานอ้อย ฟางข้าว พืชไม้เนื้ออ่อน	1. อุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษ เชื้อเพลิง อุตสาหกรรมการย่อยสลายด้วยกรด
2. ไม้ฟุ่ม ไม้วงปีสั้น	2. อุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมทำไม้อัด
3. เศษไม้จากป่า	3. อุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมทำไม้อัด
4. ฟีด	4. เชื้อเพลิง
5. เส้นใยที่เหลือจากอุตสาหกรรมทำเยื่อ	5. นำกลับมาใช้ในอุตสาหกรรมทำแผ่นกระดาษ
6. กระดาษ	6. เชื้อเพลิง
7. เศษกระดาษ	7. นำกลับมาใช้ในอุตสาหกรรมทำแผ่นกระดาษ อุตสาหกรรมการย่อยสลายด้วยกรด
8. เศษเปลือกไม้ต่างๆ	8. เชื้อเพลิง ใช้ปรับปรุงคุณภาพของดิน

ที่มา : Goksoyr and Eriksen (1980)

นอกจากนี้แล้ว ยังมีการนำเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย ได้แก่ ใช้เป็นวัสดุพื้นฐานสำหรับอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นวัสดุพื้นฐานสำหรับอุตสาหกรรมกระดาษ ผลิต nitrocellulose สำหรับผลิตวัตถุระเบิด นำมาใช้ใน chromatography และ ion exchange เช่น DEAE-cellulose และ ECTEOLA-cellulose นำมาเป็นตัว stabilizer, thickener และ texturizer ในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น เป็นอาหารสำหรับผลิต single cell protein เพื่อใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ ได้แก่ *Cellulomonas*, *Alcaligenes*, *Thermoactinomyces* เป็นต้น และใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เซลลูเลสจากจุลินทรีย์สลายของเหลือทิ้งทางการเกษตร (เจริญ, 2534)

เซลลูโลสเมื่อนำมาสลายจะให้กลูโคส ซึ่งสามารถเปลี่ยนต่อไปจนได้แอลกอฮอล์ อะซิโตน และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เป็นต้น การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ได้มีการศึกษากันมานาน วิธีที่นิยมใช้มี 2 วิธี (สมภพ, 2529) คือ

1. วิธีทางเคมี เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงภายใต้อุณหภูมิสูง ทำให้ได้กลูโคส แต่จะมีปริมาณต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการด้วย

2. วิธีทางชีวภาพ เป็นการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาสามารถไฮโดรไลส์ เซลลูโลสให้เป็นกลูโคส ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรงและไม่เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ เพราะเอนไซม์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก

ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (มุกดาและนิ่มนวล, 2527)

1. เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ จึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อน ทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต

2. ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาถึงภาวะสมดุลได้เร็ว

3. เอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นแต่ละชนิดดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มาก

4. ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นแต่ละชนิด

5. เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามที่ต้องการ

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

ได้มีการศึกษาเซลลูเลสที่ได้จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ ไล่เดือน ปลวก หอยทาก และจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเซลลูเลสที่สำคัญที่สุด เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ทำให้สะดวกต่อการสกัด สามารถผลิตได้ปริมาณมาก ไม่

ต้องใช้พื้นที่และเวลามากเหมือนกับการผลิตโดยใช้พืชและสัตว์ ทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำ ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลส (สมภพ, 2529) แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลส

แบคทีเรีย	รา
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Aspergillus phonicis</i>
<i>Pseudomonas cellulosa</i>	<i>Myceliophthora thermohola</i>
<i>Sporotophaga myxococcoides</i>	<i>Pestalotiopsis versicolor</i>
<i>Streptomyces antivioticus</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Streptomyces flavogrisens</i>	<i>Trichoderma reesei</i>

ที่มา : วิชาภัทร (2534)

องค์ประกอบและการทำงานของเซลลูเลส

เซลลูเลส ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzyme) ที่ทำงานร่วมกัน คือ

1. เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง เพื่อเป็นขั้นตอนแรกของเซลลูเลส

2. เอนไซม์ C_x หรือ β -1,4 glucanase เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายขั้นตอนที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ กลุ่มนี้มี 2 ชนิด คือ

2.1 Endo- β -glucanase (β -D-glucan glucanohydrolase, EC.3.2.1.4) จะทำหน้าที่ ย่อย β -glucosidic linkage แบบสุ่ม ได้ผลผลิต คือ กลูโคส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลโลไบโอส สามารถย่อยเซลโลเดกซ์ตริน (cellodextrin) เซลลูโลสที่เกิดการพองตัว (swollen cellulose) carboxymethyl cellulose (CMC), hydroxy-ethyl cellulose (HEC) ตรวจสอบเอนไซม์ตัวนี้ใช้ CMC และ HEC เป็นซับสเตรท

2.2 Exo- β -glucanase (1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase EC. 3.2.1.91) หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end สามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึก (crystalline cellulose) หรือย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble cellulose) เป็นเซลโลเดกซ์ตริน และเซลโลไบโอส ตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยการใช้ฝ้าย อวิเซล (avicel) และ amorphous cellulose เป็นซับสเตรท

2.3 β -glucosidase (β -D-glucosylhydrolase EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cello-oligosaccharide) ได้กลูโคส ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดกซ์ทริน ทดสอบเอนไซม์ตัวนี้โดยใช้เซลโลไบโอส, *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside หรือ ซาลิซิน เป็นซับสเตรท

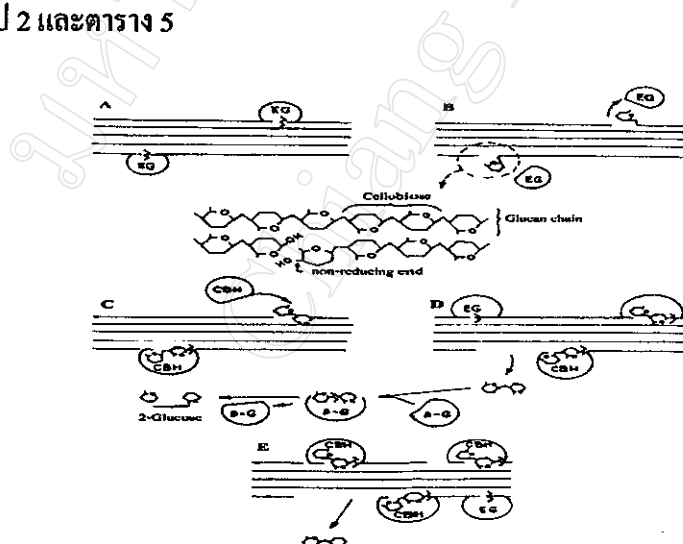
การย่อยสลายสารต่างๆ โดยเซลลูเลสแสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 การย่อยสลายสารต่างๆ โดยเซลลูเลส

ชนิดของเอนไซม์	ชนิดของสาร				
	crystalline cellulose	CMC	amorphous cellulose	cellotetraose	cellobiose
Endo- β -glucanase	-	+	+	+	-
Cellobiohydrolase	+	-	+	+	-
β -glucosidase	-	-	-	+	+

ที่มา : สมรักษ์ (2535)

กลไกการทำงานของเซลลูเลส จะมีการทำงานร่วมกันแบบ synergistic เริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดการบวมตัว (swelling) พร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ endo- β -glucanase และ exo- β -glucanase โดย endo- β -glucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสให้ปลายอิสระ ส่วน exo- β -glucanase จะตัดน้ำตาลกลูโคสทีละ 2 โมเลกุล (cellobiose) จะถูกย่อยสลายต่อไปโดย β -glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคส แสดงรูปแบบการย่อยสลายแบบ synergistic ของเซลลูเลส แสดงในรูป 2 และตาราง 5



รูป 2 กลไกการทำงานของเซลลูเลส

EG: คือ endo- β -glucanase CHB : คือ exo- β -glucanase β G: คือ β -glucosidase

ที่มา : White (1982)

ตาราง 5 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเซลลูเลสที่ทำงานร่วมกันแบบ synergistic

ขั้นตอน	กลไก
1	native cellulose $\longrightarrow$ cellulose เร่งปฏิกิริยาโดย endo- β -glucanase
2	cellulose $\longrightarrow$ cellobiose เร่งปฏิกิริยาโดย endo- β -glucanase
3	cellobiose $\longrightarrow$ 2 glucose เร่งปฏิกิริยาโดย β -glucosidase

ที่มา : สมรักษ์ (2535)

การวัดการทำงานของเซลลูเลส

Goksoyr and Eriksen (1980) พบว่าในการวัดความสามารถในการทำงานของเซลลูเลสนั้นมีด้วยกันหลายวิธี แตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์ของงาน ความเหมาะสมและการนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรมจะใช้วิธีที่สะดวกและมีข้อผิดพลาดน้อยที่สุด ในการวัดการทำงานของเซลลูเลสแบ่งได้ 2 วิธี คือ

1. Practical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของ complex enzyme ซึ่งได้จาก culture filtrate แบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1.1 การสลายให้ได้น้ำตาล (saccharolytic method) เป็นการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง (Mandels, 1977) ได้รวบรวมวิธีการวัดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้ dinitrosalicylic acid reagent (DNS reagent) เป็นสารทดสอบ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของซับสเตรตดังนี้

1.1.1 Filter paper assay เป็นวิธีที่นิยมกันใช้กันมาก เนื่องจากกระดาษกรองสามารถเตรียมได้ง่าย วิธีการ คือ ใช้กระดาษกรองขนาด 1 x 6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) ใส่ในหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของเอนไซม์และบัฟเฟอร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร หาปริมาณ reducing sugar เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย

1.1.2 Cotton assay คล้ายกับ Filter paper assay แต่ใช้เส้นใยฝ้าย 50 มิลลิกรัม เป็นซับสเตรต ทำปฏิกิริยากับบัฟเฟอร์และเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติม DNS reagent หาปริมาณ reducing sugar

1.1.3 CMC assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดการทำงานของเซลลูเลส เนื่องจาก CMC เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดี จึงสะดวกต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (Miller, 1959) ในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะผสม 1% CMC ใน 0.05M citrate buffer pH 4.8 กับเอนไซม์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม DNS reagent เพื่อหาปริมาณ reducing sugar

1.1.4 Amorphouse cellulose assay วิธีนี้จะวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ 1% walseth cellulose ใน 0.05M citrate buffer pH 4.8 กับเอนไซม์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงเพื่อเอาส่วนใสไปเติม DNS reagent แล้วหาปริมาณ reducing sugar

1.2 การตรวจสอบโครงสร้างของเซลลูโลสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังเกิดการย่อย

ในกรณีที่การย่อยสลายเซลลูโลสไม่สมบูรณ์หรือไม่เกิดน้ำตาลขึ้น จะตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส วิธีการที่ใช้ คือ การวัดความเหนียวของเส้นใยฝ้ายก่อนและหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในเวลาที่กำหนด ซึ่งต้องใช้เครื่องมือและความละเอียดสูง นอกจากนี้ยังอาจตรวจสอบเส้นใยอิสระที่เกิดจากการย่อยสลายกระดาษกรอง และการหาน้ำหนักของซับสเตรทที่หายไป

2. Biochemical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของ complex cellulase เฉพาะแต่ละองค์ประกอบเท่านั้น

2.1 Endoglucanase นิยมใช้ CMC และ hydroxyethyl cellulose เป็นซับสเตรทโดยวัดจากค่าความหนืดที่เปลี่ยนไป ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเวลาของปฏิกิริยาเปลี่ยนไป เป็นวิธีที่ยุ่งยาก จึงใช้วิธีวัดปริมาณ reducing sugar ที่เกิดขึ้นแทน

2.2 Exoglucanase ไม่มีซับสเตรทที่จำเพาะต่อ exoglucanase การวัดความสามารถในการทำงานขององค์ประกอบนี้จึงจำเป็นต้องทำให้ได้ส่วนที่บริสุทธิ์ของ exoglucanase เสียก่อน แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยากับซับสเตรทซึ่งจะใช้เซลลูโลสที่มีอัตรา polymerization ต่ำๆ เช่น อวิเซล และเซลลูโลสที่ผ่านการแช่ด้วยกรดฟอสฟอริก

2.3 β -glucosidase นิยมใช้เซลโลไบโอส และ *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside(pNPG) เป็นซับสเตรทโดยการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยเซลโลไบโอส ส่วน pNPG เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนต จากนั้นวัดปริมาณ reducing sugar ที่ปลดปล่อยออกมา

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลส (Goksoyr and Eriksen, 1980)

1. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบครบทั้ง 3 ส่วน คือ endoglucanase, exoglucanase และ β -glucosidase

2. ส่วนประกอบทางอาหาร ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะไม่มีที่อาหารจำเพาะต่อการเพาะเลี้ยงและการผลิตเซลลูเลส แต่จะประยุกต์ใช้ตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังการทดลองของ Abhaykumar and Dube (1992) ที่ใช้อาหาร 3 ชนิด ในการเพาะเลี้ยง *Vibrio agar-liquefaciens* ได้แก่ Kadota medium, Zobell medium, Mandels and Sternberg medium ทั้ง 3 ชนิดมี 1% CMC เป็นแหล่งคาร์บอนแต่มีองค์ประกอบอื่นๆ แตกต่างกัน พบว่า exoglucanase จะผลิตได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงใน Mandels and Sternberg medium ส่วน endoglucanase และ β -glucosidase จะให้ปริมาณสูงเมื่อเพาะเลี้ยงใน Kadota medium และ Zobell medium

2.1 แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอน เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเซลลูเลส จากการศึกษาการผลิตเซลลูเลสของ *Peronia oedipus* ที่เจริญในชั้นสเตรทต่างๆ คือ กระดาษกรอง, soluble CMC และกลูโคส เป็นเวลา 35 วัน พบว่า soluble CMC จะเป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด และในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะไม่มีการผลิตเอนไซม์ ส่วนความเข้มข้นของชั้นสเตรทต่อการผลิตเซลลูเลส พบว่ากระดาษกรองที่ความเข้มข้น 114.0 mg/ml จะให้ปริมาณ reducing sugar 0.6 unit/ml และ CMC ที่ความเข้มข้น 20.0 mg/ml จะให้ปริมาณ reducing sugar 0.7 unit/ml (Denison and Koehn, 1977) นอกจากนี้ Oikawa *et al.* (1994) ได้ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาการผลิตเซลลูเลสจาก *Acetobacter xylinum* KU-1 พบว่า glycerol เป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเซลลูเลส ส่วนแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติที่มีการศึกษา เช่น ในการเพาะเลี้ยง *Penicillium janthinellum* พบว่ามีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลส ได้แก่ รำข้าว กากชานอ้อยและรำข้าวสาลี ซึ่งวัดการทำงานของ CMCase ได้ 40, 39 และ 32 unit/ml ตามลำดับ ส่วนอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนจะไม่มีการผลิตเซลลูเลส (Keskar, 1992) ส่วนจิตตเสน (2529) ได้นำเชื้อ *Hemicola nigrescens* CM 33 B มาเพาะเลี้ยงใน cellulose broth ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ cellulose power, cellulose acetate, CMC และ cellobiose พบว่าอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณเซลลูเลสสูงสุด แต่จากการทดลองนำ *Ruminococcus albus* 21Aa ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากกระเพาะหมักของโค พบว่ามีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ Whatman No.1 filter (ระพีพรรณ, 2530)

2.2 แหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการผลิตเซลลูเลส เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง โดยแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตของแต่ละเชื้อจะแตกต่างกัน บางชนิดจะ

เหมาะสมกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์สารและบางชนิดจะเหมาะสมกับอนินทรีย์สาร เช่น รายงานของ Jin and Toda (1989) ที่ได้ทำการศึกษา *Clostridium thermocopriae* โดยเพาะเลี้ยงใน cellulose broth ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนต่างๆ คือ yeast extract, casitone และ tryptone พบว่าอาหารที่มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงที่สุด คือมากกว่า casitone และ tryptone 40-60% นอกจากนั้นได้มีการทดลองการเพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 โดยใช้ polypeptone, peptone และ tryptone พบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดสามารถกระตุ้นให้เชื้อมีการผลิตเซลลูเลส และยังพบอีกว่า yeast extract จะไม่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลส (Oikawa *et al.*, 1994) ส่วนระพีพรรณ (2530) ได้ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ soytone, tryptone, casitone และ peptone พบว่า tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสของ *Ruminococcus albus* 21Aa และมีรายงานอีกว่ามีเชื้ออีกหลายชนิดที่ต้องการแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์สาร เช่น Ali *et al.* (1991) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสของ *Aspergillus terreus* พบว่า ammonium nitrate ที่ความเข้มข้น 0.25% จะมีความเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส ส่วนจิตตเสน (2529) เพาะเลี้ยง *Hemicola nigrescens* CM33B ในอาหารเหลว พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ potassium nitrate นิภาวรรณ (2534) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสของ *Pseudomonase* sp 16 พบว่า ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ให้ค่า specific activity และ activity สูงที่สุด และนอกจากนั้น Keskar (1992) ได้รายงานว่า *Pennicillium janthinellum* ผลิตเซลลูเลสสูงที่สุดเมื่อมี ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจนเช่นกัน

3. เทคนิคในการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่นิยมมี 4 วิธี คือ

- 3.1 Submerge culture การเพาะเลี้ยง ในอาหารเหลว ซึ่งมีการพ่นอากาศลงไป
 - 3.2 Shake culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีการเขย่าตลอดเวลา
 - 3.3 Stationary culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว
 - 3.4 Koji-type process การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยให้เจริญบนผิวอาหารแข็งที่ขึ้น
4. สภาพะของการเพาะเลี้ยงในการผลิตเซลลูเลสขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่

4.1 ความเป็นกรดต่าง จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีและมีกิจกรรมต่างๆ ในสภาพเป็นกลาง จิตตเสน (2529) ได้เพาะเลี้ยง *Hemicola nigrescens* CM 33 ใน cellulose broth พบว่า pH 5.5 มีความเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด และที่ pH 4.5 จะไม่มีการผลิตเซลลูเลส และเช่นเดียวกับเชื้อ *Acetobacter xylinum* KU-1 Oikawa *et al.* (1994) พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส เท่ากับ 5.5 เช่นกัน แต่ระพีพรรณ (2530) พบว่าเมื่อใช้ cellulose broth ที่ pH ต่างๆ ในการ

เพาะเลี้ยง *Ruminococcus albus* 21Aa ที่ pH 6.8 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสมากที่สุด และ Keskar (1992) ได้พบว่า pH 4.5-5.5 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสของ *Pennicillium janthinellum* ส่วนที่ pH 3.0 มีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่ต่ำมาก และที่ pH 6.5 ไม่มีการผลิตเอนไซม์

4.2 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น จิตตเสน (2529) ได้ศึกษา *Hemicola nigrescens* CM 33 B โดยเพาะเลี้ยงใน cellulose broth พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส คือ 45 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะไม่มีการผลิตเซลลูโลส และเมื่อนำมาเพาะในอาหารแข็ง (ฟางข้าวป่น) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส คือ 40 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะไม่มีการผลิตเซลลูโลสเช่นกัน นอกจากนั้นสมภพ (2529) ยังพบว่าเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Aspergillus fumigatus*, *Myceliophthora thermophila* และ *Trichoderma reesei* เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน คือ 30, 40, และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนระพีพรรณ (2530) ที่ใช้ cellulose broth ในการเพาะเลี้ยง *Ruminococcus albus* 21Aa บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส คือ 37 องศาเซลเซียส และนิภาวรรณ (2534) ได้เพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp 16 ในอาหารแข็งที่มีกากขานอ้อยและรำข้าวสาลี พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูโลส คือ 37-45 องศาเซลเซียส และยังมีผู้พบว่า *Pennicillium janthinellum* (Keskar, 1992) และ *Acetobacter xylinum* KU-1 (Oikawa et al., 1994) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส คือ 50 องศาเซลเซียส

4.3 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง การผลิตเซลลูโลสของเชื้อแต่ละชนิดจะใช้เวลาต่างกัน จิตตเสน (2529) ได้ศึกษา *Hemicola nigrescens* CM 33 B เมื่อเพาะเลี้ยงใน cellulose broth พบว่าเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส คือ วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง พบว่าเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสในวันที่ 5 เช่นกัน ส่วนระพีพรรณ (2530) ได้เพาะเลี้ยง *Ruminococcus albus* 21Aa พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุด ส่วนการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp 16 ในอาหารแข็งที่มีกากขานอ้อยและรำข้าวสาลี บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส คือ 4 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส คือ 1 วัน (นิภาวรรณ, 2534) และพบอีกว่า *Pennicillium janthinellum* มีเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูโลส คือ 48 ชั่วโมง (Keskar, 1992) และ *Acetobacter xylinum* KU-1 มีเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส คือ 96 ชั่วโมง (Oikawa et al., 1994)

คุณสมบัติของเซลล์

คุณสมบัติของเซลล์จากจุลินทรีย์แต่ละชนิด อาจมีคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ โครงสร้างของเอนไซม์ ชนิดและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ด้วย คุณสมบัติต่างๆ ได้แก่

1. น้ำหนักโมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุลของเซลล์จะแตกต่างกัน ตามแต่ชนิดและแหล่งของจุลินทรีย์ ตัวอย่างน้ำหนักโมเลกุล แสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 น้ำหนักโมเลกุลของเซลล์จากจุลินทรีย์

ชนิดของจุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (daltons)	เอกสารอ้างอิง
<i>Aspergillus oryzae</i>	130,000	(Riou <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. niger</i> CCRC 31494	49,000	(Yan and Lin, 1997)
<i>Cladosporium resinae</i>	98,000	(Oh <i>et al.</i> , 1999)
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	45,000	(Mackenzie <i>et al.</i> , 1984)
<i>Trichoderma reesei</i>	81,600	(Chirio and Brown, 1987)
<i>Bacillus subtilis</i> KSM-635	40,000	(Ozaki <i>et al.</i> , 1995)
<i>Bacteroides succinogene</i> S85	43,000	(Shellhorn and Forsberg, 1984)
<i>Clostridium thermocellum</i>	60,000	(Ahsan <i>et al.</i> , 1997)

2. ผลของ pH, อุณหภูมิต่อเซลล์

2.1 pH ที่เหมาะสมและความเสถียร

เอนไซม์มีสภาพไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม การเปลี่ยนแปลง pH เพียงเล็กน้อย อาจทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงหรือเพิ่มขึ้นได้ pH จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์มีการแตกตัวตรงหมู่เอมิโน และหมู่คาร์บอกซิล หรือ side chain ได้ต่างกัน ในสถานะที่ pH แตกต่างกันจะมีผลให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH หนึ่ง หรือช่วง pH หนึ่งเท่านั้น เรียกว่า pH ที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) ในการเปลี่ยน pH มากๆ อาจทำให้เอนไซม์โปรตีนเอนไซม์เปลี่ยนสภาพไปด้วย (denature) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน (มุกดาและนิมมวล, 2527) Hoh *et al.* (1992) พบว่า pH ที่เหมาะสมของ β -glucosidase ของ *Aspergillus niger* คือ 4.6 ส่วน *A. niger* CCRC 3149 มี pH ที่เหมาะสมของ β -glucosidase คือ 5.0 (Yan and Lin, 1997) ซึ่งเท่ากับ *A. oryzae* ที่มี pH เหมาะสมของ β -glucosidase คือ 5.0 เช่นกัน (Riou *et al.*, 1998) ส่วน *A. kawachii* มี pH ที่

เหมาะสมของ β -glucosidase คือ 4.5-5.0 (Iwashita *et al.*, 1998) และยุพดี (2527) ที่ได้ศึกษาเอนไซม์จาก *Trichoderma viride*-TISTR 3161 พบว่าเซลลูเลส cel I และ cel II มี pH ที่เหมาะสมแตกต่างกัน โดย cel III มี pH ที่เหมาะสม คือ 4.0 ในขณะที่ cel II มี pH ที่เหมาะสม คือ 4.0-6.0 ส่วน Bok *et al.* (1998) ที่ศึกษาเอนไซม์จาก *Thermotoga neapolitana* พบว่าเซลลูเลส CelA มี pH ที่เหมาะสม คือ 6.0 ส่วน CelB มี pH ที่เหมาะสม คือ 6.0-6.6

ส่วน pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียที่เรยน Mori (1992) ได้ศึกษาเอนไซม์จาก *Clostridium thermocellum* ซึ่งเป็น thermophilic มี pH ที่เหมาะสม คือ 5.0-6.0 และ Ahsan *et al.* (1996) พบว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *Clostridium thermocellum* มี pH ที่เหมาะสม คือ 6.5 ส่วนเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. No. N-4 ซึ่งเป็น alkalophilic bacteria มี pH ที่เหมาะสมของ CMCase คือ 10.0 (Horikoshi *et al.*, 1984) ส่วน pH ที่เหมาะสมของ endoglucanase จาก *Bacillus* sp. KSM-522 จะแตกต่างกัน คือ EI เท่ากับ 6.0 ส่วน EII และ EIII เท่ากับ 7.0-10.0 (Okoshi *et al.*, 1990) Berthelot and Delmotte (1999) ได้ศึกษา β -glucosidase จาก *Rhizobium* sp. USDA 4280 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 6.0-6.5

ความเสถียรต่อ pH ของเซลลูเลส จากรายงานของ Okada (1985) พบว่าเซลลูเลสจาก *A. niger* เมื่อเก็บไว้ที่ pH ต่างๆ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเสถียรที่ pH 5.0-8.0 และอีกชุดเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีความเสถียรที่ pH 5.5-6.5 นอกจากนั้นได้มีการทดลองนำ β -glucosidase จาก *A. niger* CCRC-31494 โดยเก็บที่ pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความเสถียรที่ pH 5.0-7.0 (Yan and Lin, 1997) ส่วนความเสถียรของเซลลูเลส จาก *Clostridium thermocellum* โดยเก็บที่ pH ต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อยู่ที่ pH 5.0-10 (Ahsan *et al.*, 1997) ส่วนเซลลูเลสจาก *Bacillus* sp KSM-522 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเสถียรโดย CMCase EI ที่ pH 5.0-10.0 และ EII, EIII ที่ pH 6.0-11.0 (Okoshi *et al.*, 1990) และ β -glucosidase จาก *Bacillus* sp PKM-5430 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มีความเสถียรในช่วง pH ไม่เกิน 12.7 (Lusterio *et al.*, 1992)

2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมและความเสถียร

อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์สูงสุด จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นั้น Okoshi *et al.* (1990) พบว่า CMCase จาก *Bacillus* KSM-522 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานต่างกัน คือ เซลลูเลส EI เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ EII, EIII เหมาะสมที่ 50 องศาเซลเซียส ส่วน β -glucosidase จาก *Bacillus* PKM-5430 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 55 องศาเซลเซียส

(Lusterio *et al.*, 1992) สำหรับจุลินทรีย์พวก thermophilic จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานสูง ดังรายงานของ Mori (1992) พบว่า CMCase จาก *Clostridium thermocellum* ซึ่งเป็น thermophilic มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60 องศาเซลเซียส และ Ahsan *et al.* (1997) พบว่าเอนไซม์จาก *Clostridium thermocellum* มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 70 องศาเซลเซียส ส่วนเซลล์จากเชื้อรา *A. niger* CCRC 31494 มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 55 องศาเซลเซียส (Yan and Lin, 1997) ส่วน *A. kawachii* มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60 องศาเซลเซียส (Iwashita *et al.*, 1998) และยังพบว่า *Acetobacter xylinum* KU1 (Oikawa *et al.*, 1994) และ *Cladosporium rysinae* (Oh *et al.*, 1999) มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส Bok *et al.* (1998) ได้ศึกษา *Thermotoga neapolitana* พบว่าเซลล์ CelA มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 95 องศาเซลเซียส ส่วน CelB มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 106 องศาเซลเซียส และ Berthelot and Delmotte (1999) ได้ศึกษา β -glucosidase จาก *Rhizobium* sp. USDA 4280 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 35 องศาเซลเซียส

ส่วนความเสถียรต่ออุณหภูมินั้น Okoshi *et al.* (1990) รายงานว่า CMCase จาก *Bacillus* KSM-522 เมื่อต้มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเซลล์ EII, EIII มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส แต่ EI ไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส ส่วน Bok *et al.* (1998) พบว่าเอนไซม์จาก *Thermotoga neapolitana* มีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 106 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 130 นาที และจะลดลงครึ่งหนึ่งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 26 นาที และพบว่า endoglucanase จาก *Clostridium Thermocellum* มีความเสถียรอยู่ในช่วงไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส (Ahsan *et al.*, 1997)

3. ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้ง

Lusterio *et al.* (1992) พบว่า endoglucanase จาก *Bacillus* sp. PKM-5430 ถูกยับยั้งโดย Hg^{2+} และ Iwashita *et al.* (1998) ก็พบว่า $AgNO_3$ และ $HgCl_2$ มีผลยับยั้งต่อ β -glucosidase จาก *Aspergillus kawachii* และ $FeCl_3$ จะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Ho *et al.* (1999) พบว่า Ag^+ , Fe^+ , Mn^{2+} , Zn^+ , Hg^{2+} , SDS และ *p*-chloromercuribenzoate มีผลยับยั้งการทำงานของ β -glucosidase จาก *Cladosporium rusinae* ส่วน Oikawa *et al.* (1994) ได้ศึกษา *Acetobacter xylinum* KU1 รายงานว่า Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของ CMCase นอกจากนั้น Chen *et al.* (1994) ได้ศึกษาการทำงานของ β -glucosidase จาก *Orpinomyces* sp. PC-2 ซึ่งเป็นฟังไจในกระเพาะ rumen ของโค พบว่า Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} และ Ni^{2+} จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และ Ag^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , SDS และ *p*-Chloromercuribenzoate จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และ Berthelot and Delmotte (1999) ได้ศึกษา β -glucosidase จาก *Rhizobium* sp. USDA 4280 พบว่า NH_4^+ , K^+ จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ส่วน Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^+ , และ Fe^{2+} จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การแบ่งจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (นงลักษณ์และปรีชา, 2541; Cowen, 1968)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกัน จึงสามารถแบ่งจุลินทรีย์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. ไสโครไฟล์ (Psychrophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่ 0 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 15 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า พวกนี้จัดเป็นไซโครไฟล์ที่แท้จริง (obligate psychrophile) อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญ คือ 30 องศาเซลเซียส แต่บางพวกมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญ คือ 35 องศาเซลเซียส จึงจัดเป็น facultative psychrophile หรือ psychrotroph ตัวอย่าง เช่น *Pseudomonase*, *Micrococcus* เป็นต้น

2. มีโซไฟล์ (Mesophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลางระหว่าง 25-40 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิค่าสุดที่เจริญที่ 5-25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสมที่ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ที่ 43 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง เช่น *Neisseria*, *Salmonella*, *Vibrio* เป็นต้น

3. เทอร์โมไฟล์ (Thermophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 45-60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 60-85 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง เช่น *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces* เทอร์โมไฟล์บางพวกเจริญในช่วงของมีโซไฟล์ จึงเรียกว่า facultative thermophile หรือ eurithermophile บางพวกเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส เรียกว่าเทอร์โมไฟล์แท้จริง (stenothermophile)

นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดมีชีวิตรอดอยู่ได้ในอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ซึ่งเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า Thermotolerant หรือ Thermoduric สำหรับ Thermotolerant bacteria ส่วนใหญ่สามารถมีชีวิตรอด และสามารถเพิ่มจำนวนในช่วงอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียสได้ และยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียสได้