ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ — **สาขา**

เทคโนโลยีชีวภาพ — **ภาควิชา**

เรื่อง การคัดแยก ศึกษาสมบัติ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน

Screening, Characterization and Optimization for Carboxymethylcellulase Production by Thermophilic Bacteria from Soil

นามผู้วิจัย นางสาววาทินี คุณเผือก

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดแยก ศึกษาสมบัติ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน

Screening, Characterization and Optimization for Carboxymethylcellulase Production by Thermophilic Bacteria from Soil

โดย

นางสาววาทินี คุณเผือก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วาทินี คุณเผือก 2554: การคัดแยก ศึกษาสมบัติ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D. 122 หน้า

คัดแยกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจำนวน 121 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน 9 บริเวณที่มีการทับถมและย่อยสลายของชีวมวล โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar ที่ผสม CMC ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทดสอบเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยวิธี Congo red พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 41 ไอโซเลทที่ปรากฏวงใสรอบโคโลนีบนอาหาร Nutrient agar ที่ผสม CMC ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไอโซเลทดังกล่าวทดสอบการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารเหลว Nutrient broth ที่เติม CMC ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลท PA1-1 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดเท่ากับ 0.60 U/ml และพบกิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลสเท่ากับ 0.08 U/ml จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพันธุศาสตร์โมเลกุลของจุลินทรีย์ไอโซโซเลทดังกล่าวจัดเป็น *Thermobifida fusca* ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร Basal medium ชนิดต่างๆ พบว่าสูตรอาหารชนิดที่ 3 (Lima *et al*., 2005) เหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้เท่ากับ 0.95 U/ml ได้ใกล้เคียงกับสูตรอาหารชนิดที่ 1 ในขณะที่สามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสสูงสุดเท่ากับ 0.605 U/ml ผลจากแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารชนิดที่ 3 พบว่ายีสต์ขนมปังเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ดีที่สุด ซึ่งมากกว่ายีสต์สกัด เปบโตน และมอลต์สกัด ตามลำดับ โดยยีสต์สกัดเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสได้ดีที่สุด ศึกษาลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 4.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสพบในช่วงพีเอช 4.0-10.0 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเหลืออยู่มากกว่า 80 % ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 องศาเซลเซียส ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยวิธีหาพื้นผิวแบบตอบสนอง (Resonse surface methodology) ประกอบด้วยปัจจัยหลัก ได้แก่ อุณหภูมิและพีเอช พบว่าจากโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอช มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สมการกำลังสองที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) 0.8060 ($p < 0.05$) สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดที่ 0.859 U/ml อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ยืนยันผลในการนำโมเดลไปใช้ด้วยการเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA 1-1 ที่สภาวะดังกล่าวในฟลาสก์และถังหมัก วัดกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีค่าเท่ากับ 0.977 และ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

_____ / ____ / ____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Watinee Kunpeuk 2011: Screening, Characterization and Optimization for Carboxymethylcellulase Production by Thermophilic Bacteria from Soil. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Mangkorn Rodprapakorn, Ph.D. 122 pages.

A total of 121 thermophilic bacteria were isolated from 9 cellulose-decomposing soil samples screening on Nutrient agar with 1% (w/v) carboxymethylcellulose (CMC) at 50°C for 48-72 h of incubation. The isolates were selected in primary screening and examined their carboxymethylcellulase (CMCase) production by using a Congo red test. The result showed positive clear zone of 41 isolates on the Nutrient agar with 1% (w/v) carboxymethylcellulose (CMC). All isolates were observed for CMCase production in Nutrient broth containing 1% (w/v) CMC as a carbon source at 50°C for 48 h. The isolate PA1-1 showed the highest CMCase activity of 0.60 U/ml with Avicelase activity of 0.08 U/ml. Based on its morphology and molecular identification, the organism was classified as *Thermobifida fusca*. Study on the association between the growth of *T. fusca* PA1-1 and cellulase production in different medium was found that CMCase production induced in Basal medium 3 (Lima *et al*., 2005) at 0.95 U/ml which result was similar to Basal medium 1 whereas the highest Avicelase production was detected in this medium at 0.605 U/ml. Study on the effect of nitrogen sources to cellulase formation was carried out in medium 3. The result showed baker yeast was the most effective nitrogen source which gave the higher CMCase induction than yeast extract, peptone and malt extract respectively whereas yeast extract gave the highest Avicelase production. Characterization of CMCase activity showed the optimum pH was 4.0 and the highest relative activity was found at 60°C. The enzyme was stable in the pH range 4.0-10.0 and the residual activity retained up to 80% at 30-60°C. The optimization of CMCase production was studied using the response surface methodology with temperature and pH. It was found that the most significant factors influencing enzyme production were both temperature and pH ($p < 0.05$). The second order polynomial regression model was obtained with an R^2 of 0.8060 ($p < 0.05$). From the result of the optimization, maximum CMCase activity at 0.859 U/ml was achieved at temperature 50 °C and pH 8.0. To confirm te applicability of the model, *T. fusca* PA 1-1 was cultured at this condition in a flask as compared to a fermenter. Carboxymethylcellulase activities were measured at 0.977 and 1.21 U/ml respectively.

_____ _____ __ / __ / __

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับงบสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว) สำนักกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ตลอดจนความช่วยเหลือจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์

ขอบคุณทุกกำลังใจ คำปรึกษา คำแนะนำ น้ำใจ แง่คิดดีๆ และความช่วยเหลือที่ดีมากจากพี่อีฟ พี่ฝ้าย ภา หลี มุนีย์ ก้อย สา ตุ้ย เอ็ม ปุ๊ก แจน พี่วิทย์ เจมส์ เหมือง พิม พร้อม โบว์ ลูกอม พี่นิช พี่ดา พี่ก้อย อู๋ แก้ว ปลา พี่สร้อย พี่กานต์ พี่กุ้ง พี่แป๊ก พี่ส้ม พี่นก พี่แจ๊ม พี่แก้ว พี่จอย พี่นา พี่เน็ต พี่เก๋ พี่ตี๋ น้องเต้ พี่ Emanuele และพี่ ๆ เพื่อนๆ และน้อง ๆ ที่มิได้กล่าวไว้ในที่นี้ ที่มีให้ตลอดมา ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีอุปสรรคบ้าง แต่น้ำใจ และความช่วยเหลือจากเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทำให้เป็นพลังที่จะต่อสู้กับปัญหาจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณกิจกรรมต่างๆ ที่เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ได้ทำร่วมกัน โดยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมานั้นเป็นช่วงเวลาที่ข้าพเจ้ามีความสุขและประทับใจกับมิตรภาพจากทุกๆ คนเป็นอย่างมาก

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรม ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์ และสนับสนุนทางการศึกษาด้วยดีตลอดมา

วาทินี คุณเผือก

พฤษภาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	81
สรุป	81
ข้อเสนอแนะ	83
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	84
ภาคผนวก	103
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	104
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	107
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	112
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	122

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	9
2	จำนวนชุดการทดลองของปัจจัยทั้งหมดจำนวน 2 ปัจจัย ที่ระดับการทดลองจำนวน 4 ระดับ	30
3	ผลการคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสบนอาหารแข็ง NA ที่เติม CMC 1% และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	36
4	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้บนอาหารแข็ง Nutrient agar ที่มี CMC ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอน	37
5	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสของแบคทีเรีย 41 ไอโซเลท ในอาหาร NB ที่มี CMC 1% 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เวลา 48 ชั่วโมง	39
6	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% Similarity) ของลำดับเบส 16S rRNA ระหว่างแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 และแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท	48
7	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที	70
8	ค่าประมาณและการทดสอบสัมประสิทธิ์รีเกรชชั่นของสมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	71
9	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการทำนายและการทดลองที่สภาวะเหมาะสม	75

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ค1	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 1	113
ค2	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 2	113
ค3	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3	114
ค4	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 และมียีสต์ขนมปัง 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	114
ค5	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 และมีเปบโตน 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	115
ค6	กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 และมีมอลต์สกัด 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	116
ค7	ผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	116
ค8	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	117
ค9	ความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่พีเอชต่างๆ	117
ค10	ความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่อุณหภูมิต่างๆ	118
ค11	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	118

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ค12 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในฟลาสก์จาก *T. fusca* PA 1-1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน เพื่อยืนยันความแม่นยำจากการทำนายค่าการวิเคราะห์ด้วยพื้นที่ผิวแบบตอบสนอง 119

ค13 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในถังหมักจาก *T. fusca* PA 1-1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน เพื่อยืนยันความแม่นยำจากการ ทำนายค่าการวิเคราะห์ด้วยพื้นที่ผิวแบบตอบสนอง 120

ค14 น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA 1-1 ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน 121

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างสายเซลลูโลส	4
2	กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	7
3	กลไกการทำงานของเอนไซม์ในระบบ Noncomplexed cellulase system (A) และ Complexed cellulase system (B) บนโครงสร้างของเซลลูโลสที่เป็นระเบียบและไม่เป็นระเบียบ	15
4	การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (MD-250, Marubishi, Japan)	31
5	บริเวณ clear zone ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบด้วยวิธี Congo red บนอาหาร CMC agar ของไอโซเลท TR-5 เมื่อบ่มที่อุณภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	35
6	สัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1	43
7	ภาพถ่ายจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดจากเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลท PA 1-1 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 5 วัน	44
8	โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ผนังเซลล์ไอโซเลท PA 1-1 ที่ย่อยด้วยกรดเพื่อศึกษาชนิดของ diaminopimelic acid	46
9	ลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1	47
10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 1 (Ramachanda *et al.,* 2001) ที่มี CMC 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	50
11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 2 (Misha *et al*. 1984) ที่มี CMC 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	52

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 3 (Lima *et al*., 2005) ที่มี CMC 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	53
13	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 3 ที่มี CMC 1% (w/v) และยีสต์ขนมปัง 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	58
14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่3 ที่มี CMC 1% (w/v) และเปบโตน 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	59
15	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 3 ที่มี CMC 1% (w/v) และมอลต์สกัด 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	61
16	ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	64
17	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	64
18	ผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	66
19	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	66
20	การวิเคราะห์หาพื้นผิวการตอบสนองของการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ	73
21	Contour plots ของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1	74
22	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	77
23	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในถังหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	79

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ก1 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS 111

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC	=	American Type Culture Collection
CMC	=	carboxymethylcellulose
CMCase	=	carboxymetylcellulase
DAP	=	diaminopimelic
SEM	=	scaning electron microscope
U/ml	=	unit per milliliter
μm	=	micrometer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การคัดแยก ศึกษาสมบัติ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน

Screening, Characterization and Optimization for Carboxymethylcellulase Production by Thermophilic Bacteria from Soil

คำนำ

เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการแปรรูปชีวมวลที่เป็นแหล่งเซลลูโลสให้เกิดเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการทางชีวภาพ เช่น กลูโคส และนำมาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเชื้อเพลิง อาหาร สิ่งทอ กระดาษ หรือเอนไซม์บริสุทธิ์ทางการค้า เป็นต้น เนื่องด้วยประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมทำให้มีแหล่งชีวมวลที่หลากหลายและมีจำนวนมากซึ่งยังไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ การใช้ชีวมวลเป็นแหล่งวัตถุดิบและแปรรูปเป็นสารตั้งต้นที่มีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมนับว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับชีวมวลดังกล่าวได้ ทั้งนี้การนำเอาชีวมวลมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดนั้นเกี่ยวข้องโดยตรงกับขั้นตอนการคัดเลือกแหล่งของเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพเพื่อแปรรูปวัตถุดิบเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมากที่สุด เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์ทั่วไป แต่จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำมาใช้ย่อยสลายเซลลูโลสและผลิตเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพ การพิจารณาถึงแหล่งผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ธรรมชาติ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทนความร้อน ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่น่าสนใจประการหนึ่งเมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวไปใช้ร่วมกับกระบวนการทางอุตสาหกรรมภายใต้สภาวะที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง

เอนไซม์เซลลูเลสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (EC 3.2.1.4; 1,4-ß-D glucan 4-glucanohydrolase) หรือเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ทำหน้าที่ในการตัดพันธะ ß-1,4-glycosidic ของโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม จำเพาะต่อโครงสร้างเซลลูโลสที่ไม่เป็นระเบียบ ผลิตภัณฑ์จากการย่อยจะได้โพลีแซคคาไรด์สายสั้น น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลเซลโลไบโอส เอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส หรือเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (EC 3.2.1.91; 1,4-ß-D glucan; cellobiohydrolase (CHB)) ทำหน้าที่ตัดพันธะ ß-1,4 glycoside จากปลายของสายโซ่เซลลูโลส ทั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปลายรีดิวซ์ (reducing end) หรือปลายนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) จำเพาะต่อโครงสร้างที่เรียงตัวเป็นระเบียบ (crystalline cellulose) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous cellulose) และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21; ß-D-glucoside glucohydrolase) ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลเซลโลไบโอส หรือเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสามารถย่อยสับสเตรทสังเคราะห์บางชนิด เช่น p-nitrophenyl glucoside, 4-methyllumbellifery glucoside

ถึงแม้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียทั่วไปจะมีกิจกรรมน้อยกว่าเอนไซม์ที่ได้จากรา และมีการศึกษาที่ไม่แพร่หลายมากนัก แต่คุณสมบัติที่เป็นข้อได้เปรียบของเอนไซม์จากแบคทีเรีย คือ มีความเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้าง และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Wilson, 2003) จากการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งไปที่การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสชอบความร้อนสูง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลบนลำดับเบสของยีน 16S rRNA ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับรูปแบบการสร้างเอนไซม์ในอาหารชนิดต่างๆ รวมถึงแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญและการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ ตลอดจนคุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดสภาวะการทำงานของเอนไซม์ให้มีความเสถียร รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นพื้นฐานสำคัญในการนำจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไปพัฒนาและปรับปรุงใช้ในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชอบความร้อนสูงจากแหล่งดินที่มีการทับถมและย่อยสลายของเซลลูโลส

2. เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชอบอุณหภูมิสูงสุด โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

3. เพื่อศึกษาชนิดของอาหารและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

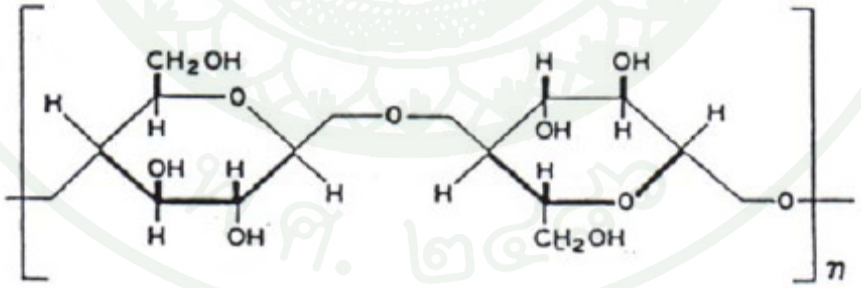
4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทนอุณหภูมิสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่พบมากในธรรมชาติและเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะ ß-1,4 ไกลโคซิดิก (ß-1,4 glycosidic bond) ทำมุม 180 องศาตามแนวแกน มีน้ำตาลเซลโลไบโอสเป็นหน่วยซ้ำของสายโซ่เซลลูโลส ในแต่ละสายโซ่ของเซลลูโลสเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอซิล (-OH) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 กับหมู่ออกซิเจนของโมเลกุลถัดไป และสายเซลลูโลสที่ขนานกันจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนอะตอมที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคสในอีกสายหนึ่ง จึงทำให้เกิดลักษณะของเส้นใย (microfibril) ที่ไม่ละลายน้ำ ทั้งในลักษณะที่เรียงตัวเป็นระเบียบ (crystalline) และเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ขนาดโมเลกุลเซลลูโลสแสดงในรูปของจำนวนน้ำตาลกลูโคสต่อโมเลกุลของเซลลูโลส (degree of polymerization) อยู่ในช่วง 100-14,000 ซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งของเซลลูโลส โดยในบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบจะยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ง่ายกว่าบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบ (Reese *et al*., 1950)



ภาพที่ 1 โครงสร้างสายเซลลูโลส

ที่มา: Ott (1954)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

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

2.1 เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (EC 3.2.1.4; 1,4-ß-D glucan 4-glucanohydrolase) หรือเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ทำหน้าที่ในการตัดพันธะ ß-1,4-glycosidic ของโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม จำเพาะต่อโครงสร้างในลักษณะรูปร่างไม่เป็นระเบียบ เซลลูโลสที่มีกลุ่มอื่นเข้าแทนที่ (substituted cellulose) และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cello-oligosacharide) เช่น acid swollen cellulose เบต้า-กลูแคน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส แต่ไม่แสดงกิจกรรมต่อเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเรียงตัวเป็นระเบียบ (crystalline cellulose) การทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสทำให้ระดับของการเกิดโพลิเมอร์ของเซลลูโลส (degree of polymerization) ลดลงอย่างรวดเร็ว ผลจากการย่อยจะได้โพลีแซคคาไรด์สายสั้น น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลเซลโลไบโอส (Wood, 1992)

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

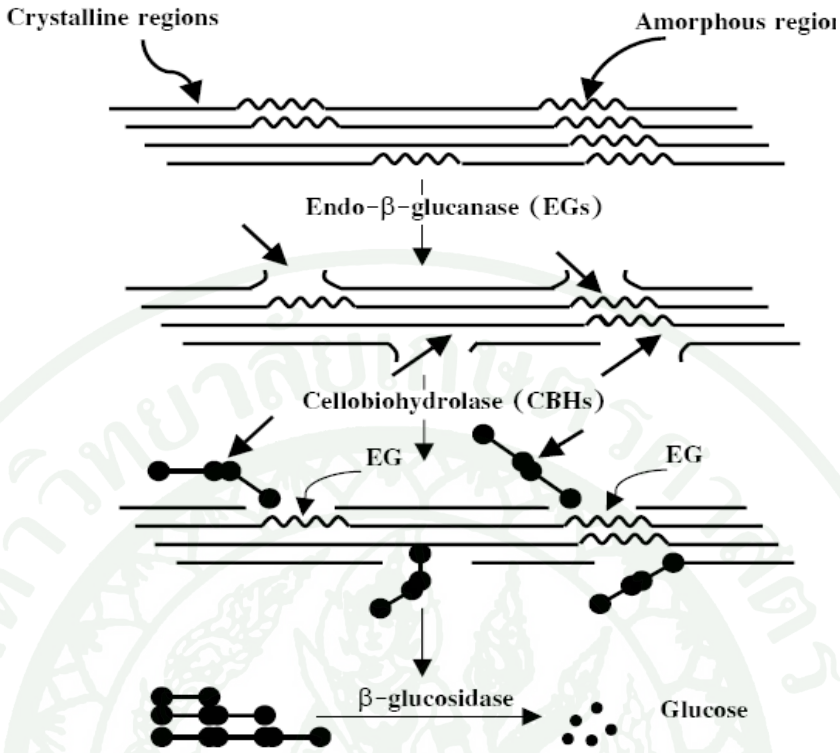
2.3 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21; ß-D-glucoside glucohydrolase) ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลเซลโลไบโอส หรือเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สามารถย่อยสับสเตรทสังเคราะห์บางชนิด เช่น p-nitrophenyl glucoside, 4-methyllumbellifery glucoside (Wood, 1992)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสนั้นมีความยาก เนื่องจากไม่มีสับสเตรทที่จำเพาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด อีกทั้งการย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสยังเกิดในลักษณะการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้ง 3 กิจกรรม (Wood, 1992) โดยกลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายโมเลกุลเซลูโลสจะเกิดขึ้นในลักษณะการทานเสริมกัน (synergism) ของเอนไซม์แต่ละชนิด เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะย่อยโมเลกุลเซลลูโลสในส่วนโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบแบบสุ่ม เนื่องจากการที่เอนไซม์ไม่มีแอกทีฟไซต์ (active site) ที่มีลักษณะเป็นช่องเปิด (groove) ทำให้เกิดปลายด้านรีดิวซ์และปลายนอนรีดิวซ์ และเอนไซม์ CBH เป็นเอนไซม์ที่แอกทีฟไซต์มีลักษณะเป็นโพรง (tunnel) (Terri, 1997) ซึ่งมีความเหมาะสมในการเข้าย่อยที่ส่วนปลายทั้งสองนี้ ทำให้เกิดการย่อยส่วนโครงสร้างที่เป็นระเบียบของเซลลูโลส และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจะเข้าย่อยน้ำตาลเซลโลไบโอสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสต่อไป การทำงานแบบนี้เรียกว่า endo-exo synergism การทำงานแบบเสริมกันนี้สามารถพบได้ในเชื้อราที่ใช้อากาศ เช่น *Trichoderma ressei*, *Penicillium pinophilum*, *T. koningii* และ *Phanerochaete crysosporium* เป็นต้น (Bhat and Bhat, 1997)

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา: Stöhr (1999)

3. เอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรีย

ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่มีบทบาทในการย่อยสลายเซลลูโลสมักพบในราและมีการนำมาใช้ในทางการค้าทั้งอุตสาหกรรมอาหารและสิ่งทออย่างกว้างขวาง จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียนั้นมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เช่นกัน เอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียมีข้อดี คือ แบคทีเรียมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าและสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ง่ายกว่า เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิดสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงซึ่งนับว่าเป็นข้อดีที่สามารถนำไปใช้ได้กับอุตสาหกรรมที่มีปัจจัยเกี่ยวกับความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง รวมทั้งยังทนด่างได้ดีกว่า (รุจิกาญจน์, 2546) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบได้ในหลายกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศ โดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Clostridium, Rhuminococcus* และ *Caldicellulosiruptor* sp. นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Butyrivibrio* และ *Acetivibrio* แบคทีเรียที่ใช้อากาศแกรมบวก เช่น *Cellulomonas*, *Thermobifida*, *Bacillus* และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท เช่น *Micromonospora* และ *Streptomycetes* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียในกลุ่ม gliding bacteria ที่ใช้อากาศ เช่น *Cytophaga* และ *Spirocytophaga* (Lynd *et al.*, 2002) ดังแสดงในตารางที่ 1

การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรียในกลุ่มที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศมีความแตกต่างกัน แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศจะย่อยสลายเซลลูโลสด้วยการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแบบซับซ้อน (complexed cellulase systems) จากออร์แกเนลที่เรียกว่า เซลลูโลโซม (cellulosome) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum* จะมีการผลิตออกมาทั้งบนผิวเซลล์และขับออกสู่น้ำหมัก (Bok *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้อากาศหลายกลุ่มจะไม่สามารถวัดปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยลงสู่น้ำหมักอย่างแน่นอนได้ เนื่องจากเอนไซม์ส่วนมากจะผลิตบนผิวเซลล์และชั้นไกลโคคาลิกซ์ แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเจริญได้ดีขณะที่เซลล์ยึดจับกับสับสเตรท จากการหมักเซลลูโลสด้วยแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศจะให้ปริมาณเซลล์ต่ำ ได้สารที่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักหลายชนิด ได้แก่ เอทานอล กรดอินทรีย์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใช้อากาศทั้งราและแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขับออกนอกเซลล์ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวได้ในน้ำหมัก (Rusmussen *et al.*, 1988; Schwarz, 2001) เอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดจะทำงานร่วมกัน โดยเซลล์ไม่จำเป็นต้องยึดจับกับสับสเตรทเหมือนแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ใช้อากาศ Kauri and Kushner (1985) ทดลองแยกเซลล์ Cytophaga ออกจากเซลลูโลสโดยการแทรกแผ่นกรองระหว่างชั้นเซลล์และซับสเตรท พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ ซึ่งแผ่นกรองที่ใส่คั่นลงไปจะเป็นตัวชะผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและทำให้ลดโอกาสที่จะเกิด Catabolic repression การหมักแบบใช้อากาศของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะได้จำนวนเซลล์สูง นำมาสู่การประยุกต์ใช้เพื่อผลิตโปรตีนจากเซลล์จุลินทรีย์โดยการใช้แหล่งเซลลูโลสเป็นสับสเตรท (El-Nawwi and El-Kader. 1996; Rodiguez and Gallardo, 1993) แบคทีเรียที่ใช้อากาศที่คัดแยกจากดินโดยทั่วไปจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolism) ที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ เช่น *Bacillus*, *Micromonospora* และ *Thermobifida* เป็นต้น โดยมีระยะพักตัวแตกต่างกันและมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิด (Lynd *et al.*, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

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

ที่มา: Lynd *et al.* (2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อมีการย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ จุลินทรีย์จะมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสชนิดที่ขับออกนอกเซลล์ทั้งแบบที่สัมพันธ์และไม่สัมพันธ์กับการเจริญ โครงสร้างหลักของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลส ได้แก่ ส่วนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (catalytic module) และส่วนที่ยึดจับกับสับสเตรท (carbohydrate-binding module, CBM) โดย CBM จะไปจับกับผิวของเซลลูโลสและพาส่วนย่อยสลายเข้าใกล้กับสับสเตรท เมื่อ CBM เริ่มทำงานจะส่งเสริมให้เกิดการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (Reese, 1976) เอนไซม์เซลลูเลสทั้งสามกลุ่ม ได้แก่ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนส และเบต้า-กลูโคซิเดสจะทำงานเสริมกัน (synergism) ลักษณะการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสามชนิดแบ่งได้เป็น 1) การทำงานร่วมกันของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส 2) การทำงานของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสโดยตัดที่ปลายรีดิวซ์และนอนรีดิวซ์ของสายโพลีแซคคาไรด์ 3) การทำงานร่วมกันของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและเบต้า-กลูโคซิเดส จะกำจัดเซลโลไบโอสและเซลโลเดกซ์ทรินซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส 4) การทำงานร่วมกันภายในโมเลกุลของส่วนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาและส่วนที่ยึดจับกับสับสเตรท (Din *et al*., 1994; , Terry, 1997)

จุลินทรีย์จะมีการพัฒนาตัวเองให้สามารถใช้เซลลูโลสซึ่งในธรรมชาติจะประกอบด้วยอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำหรือส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน (Franklund, and Glass**,** 1987) ราและแอคติโนมัยซีทมีความสามารถในการใช้เส้นใยแทรกซอนเข้าไปในเซลลูโลสก่อนที่จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเข้าสลายภายในสายโพลิเมอร์ของเซลลูโลส (Eriksson *et al.*, 1990) โดยวิธีการย่อยสลายซับสเตรทดังกล่าวมีประสิทธิภาพเพียงพอที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งเซลลูโลสได้ กระบวนการนี้จึงไม่จำเป็นที่จะต้องสร้างออร์แกเนลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือเซลลูโลโซม (cellulosome) เรียกระบบการผลิตเซลลูเลสที่เกิดขึ้นนี้ว่า noncomplexed cellulase system ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศไม่สามารถที่จะพาตัวเองเข้าไปย่อยสลายสับสเตรทโดยตรง แบคทีเรียเหล่านี้จึงต้องมีวิธีการที่จะใช้แหล่งสับเตรทดังกล่าวเพื่อแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จึงมีการพัฒนาส่วนของเซลลูโลโซมบริเวณตำแหน่งผิวเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายโดยเรียกระบบที่เกิดขึ้นว่า complexed cellulase system

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1 Noncomplexed cellulase system เป็นระบบที่มีการศึกษาเป็นจำนวนมากเนื่องจากพบได้ทั่วไปในราที่ใช้อากาศ นอกจากนี้ยังพบในแบคทีเรียที่ใช้อากาศ เช่น *Cellulomonas* และแอคติโนมัยซีท เช่น *Thermobifida* หรือ *Thermomonospora* (Lynd *et al.*, 2002) *T. ressei* สร้างเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสอย่างน้อยสองชนิด (CHBI และ CHBII) เอนโดกลูคาเนสห้าชนิด (EGI, EGII, EGIII, EGIV และ EGV) และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสองชนิด (BGLI และ BGLII) (Kubicek and Penttila, 1998) โดยเอนไซม์ CHBI มีบทบาทในการย่อยสับสเตรทจากปลายรีดิวซ์ ส่วน CHBII จะย่อยจากปลายนอนรีดิวซ์ โดยเป็นการทำงานร่วมกันเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสโครงสร้างที่เป็นระเบียบ (microcrystalline) (Henrissat *et al.*, 1985, Medve *et al.*, 1994) จากการศึกษาทางโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสทั้งสองชนิดพบว่า CHBI มีลักษณะประกอบด้วย loop จำนวน 4 loop ทำให้เกิดโพรง (tunnel) ที่มีความยาวขนาด 50 อังสตรอม CHBII ประกอบด้วย loop จำนวน 4 loop ทำให้เกิดโพรงที่มีความยาวขนาด 20 อังสตรอม ด้วยลักษณะที่เป็นโพรงนี้จะทำให้เกิดความสามารถในการย่อยเซลลูโลสจากปลายรีดิวซ์หรือนอนรีดิวซ์ เมื่อเซลลูโลสจะเคลื่อนที่ผ่านโพรงใน CHBI ทำให้เกิดการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลไบโอสซึ่งในบางครั้งอาจได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและเซลโลไตรโอสตั้งแต่ช่วงแรกของกระบวนการ (Divne *et al.*, 1994) โครงสร้างของ EGI มีลักษณะเป็น loop ที่สั้นกว่าทำให้เกิดเป็นช่องเปิด (groove) มากกว่าโพรง ช่องเปิดนี้จะยอมให้เซลลูโลสเคลื่อนที่ผ่านเพื่อเข้าสู่กระบวนการย่อยสลาย นอกจากนี้ช่องเปิดดังกล่าวยังพบใน EGII (Sandgren *et al.*, 2000) กลไกการทำงานของเอนไซม์ในระบบนี้แสดงในภาพที่ 3 (A)

เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสมีความจำเป็นต่อการย่อยสลายเซลลูโลสโครงสร้างที่เป็นระเบียบ เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสชนิด CHBI และ CHBII ใน *T. ressei* เป็นเอนไซม์เซลลูเลสหลักคิดเป็น 60% และ 20% ของเอนไซม์เซลลูเลสในโปรตีนทั้งหมดตามลำดับ (Wood, 1992) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ทำให้ระดับของการเกิดโพลิเมอร์ในเซลลูโลสลดลงช้ามาก เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะมีบทบาทสำคัญในการเข้าไปย่อยส่วนที่มีโครงสร้างไม่เป็นระเบียบ ทำให้ระดับการเกิดโพลิเมอร์ในเซลลูโลสลดลงรวดเร็วและเกิดปลายสายเซลลูโลสที่มีลักษณะยอมให้เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสเข้าทำงานได้ (Terri *et al.*, 1998) เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสมีปริมาณน้อยกว่า 20% ของเอนไซม์เซลลูเลสในโปรตีนทั้งหมด พบว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส 3 ชนิด ได้แก่ EGI, EGII และ EGIII จะทำงานร่วมกับเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในระบบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

T. ressei เซลโลไบโอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CHBI และ CHBII มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลสและเอนโดกลูคาเนส (Holtzapple *et al*., 1990; Medve *et al*., 1998; Mosier *et al*., 1999)

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

เอนไซม์เซลลูเลสในราที่ชอบความร้อน เช่น *Humicola insolens* มีระบบที่คล้ายคลึงกับ *T. ressei* ประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสอย่างน้อย 7 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส 2 ชนิด (CBHI และ CHBII) และเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส 5 ชนิด EGI, EGII, EGIII, EGIV และEGV (Schulein, 1997) อย่างไรก็ตามเอนไซม์เซลลูเลสใน *H. insolens* เช่น EGI และ EGIII ขาดส่วนที่เข้าจับกับสับสเตรท (CBM) มีผลให้เอนไซม์ EGIII ย่อยสลายสับสเตรทที่ละลายน้ำได้น้อย (Schulein, 1997) Boissset *et al.*(2001) ทดลองตัดต่อยีนที่ผลิตเอนไซม์ CBHI CHBII และ EGV ใน *A. orizae* ได้ผลอย่างชัดเจนว่าการทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดสามารถสลายสายโพลีแซคคาไรด์ในเซลลูโลสโครงสร้างเป็นระเบียบได้อย่างมีประสิทธิภาพ อัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ CBHI ต่อCBII เท่ากับ 70% และ 30% ตามลำดับซึ่งเมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมดมีความต้องการเพียง 1-2% การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสามชนิดสามารถย่อยสลายเซลลูโลสโครงสร้างเป็นระเบียบได้มากกว่า 50% ซึ่งการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวย่อยสลายเซลลูโลสโครงสร้างเป็นระเบียบได้น้อยกว่า 10% (Boissset *et al*., 2001)

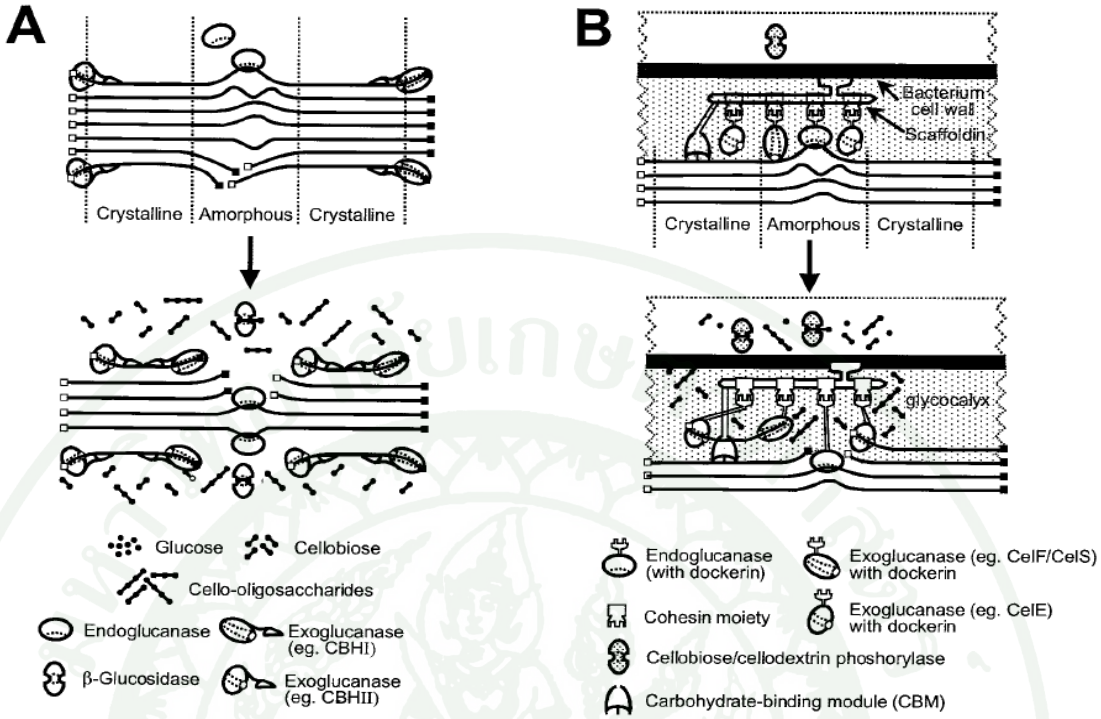
แบคทีเรียในกลุ่มใช้อากาศที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี ได้แก่ *Cellulomonas* และ *Thermobifida* หรือก่อนหน้านี้เรียกว่า *Thermomonospora* แบคทีเรียในกลุ่ม *Cellulomonas* ผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสอย่างน้อยหกชนิดและเอกโซกลูคาเนสอย่างน้อยหนึ่งชนิด (Chaudhary *et*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

al., 1997) เอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดจาก *Cellulomonas* คล้ายคลึงกับเอนไซม์เซลลูเลสที่พบในรา ที่ใช้อากาศที่พบบริเวณ CBM อย่างไรก็ตามพบโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายเซลลูโลโซมใน *Cellulomonas* เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่ใช้เซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่ชอบอุณหภูมิสูง *Thermobifida fusca* หรือ *Thermomonospora fusca* ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เอนโดกลูคาเนส 3 ชนิด (E1, E2 และ E5) เอนโดกลูคาเนสสองชนิด (E3 และ E6) และมีเอนไซม์เซลลูเลสในกลุ่มที่มีทั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูราเนสและเอกโซกลูคาเนส (E4) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* มีกิจกรรมสูงต่อเซลลูโลสโครงสร้างเป็นระเบียบจากแบคทีเรียและมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส (Irwin *et al*., 1993)

4.2 Complexed cellulose systems เป็นระบบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างออร์แกเนลที่เรียกว่า เซลลูโลโซม (cellulosome) ซึ่งจุลินทรีย์จะสร้างขึ้นในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศ แต่ในบางครั้งอาจพบได้ในจุลินทรีย์ทั่วไปทั้งที่สัมพันธ์กับการย่อยสลายเซลลูโลสหรือไม่ก็ตามเซลลูโลโซมมีบทบาทในการที่จะยอมให้เอนไซม์เซลลูเลสเคลื่อนที่ออกมาเข้าใกล้กับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลสแต่ละชนิดบนเซลลูโลโซม นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะทางระหว่างผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลาย เช่น น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ให้เคลื่อนที่ไปยังเซลล์จุลินทรีย์ได้เร็วขึ้น กลไกการทำงานของเอนไซม์แสดงในภาพที่ 3 (B) (Bayer *et al*., 1994; Schwarz, 2001)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



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

ที่มา: Lynd *et al*., 2002

เซลลูโลโซมเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์หลายชนิดซึ่งถูกผลิตขึ้นบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียขณะที่มีการเจริญบนเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวเคลื่อนที่ไปจับกับเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นระเบียบ พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับเซลลูโลโซมในแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* เช่น *C. thermocellum, C. cellulolyticum* และ *C. josui* เป็นต้น โดยเซลลูโลโซมในแบคทีเรียกลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันเพียงองค์ประกอบภายในแต่ละสปีชีส์ เซลลูโลโซมใน *C. thermocellum* มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนขนาดใหญ่ที่ไม่เข้าร่วมทำปฏิกิริยา (non-catalytic) ที่มีการม้วนพับ (scaffold) (CipA) ขนาด 197 กิโลดาลตัน multimodular และสารโคฮิซิน (cohesin) ทั้งหมด 9 ชนิด มีหน่วยย่อยชนิดเอ็กซ์ (X module) หรือหน่วยที่ชอบน้ำจำนวน 4 หน่วย นอกจากนี้ยังประกอบด้วยส่วนที่ยึดจับกับสับสเตรท (CBM) ชนิดแฟมิลี III โปรตีนส่วนที่พับม้วนจะยึดไว้กับผนังเซลล์ด้วยสารโคฮิซินชนิด II ภายในเซลลู

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โลโซมประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 22 หน่วย มีหน่วยย่อยอย่างน้อย 9 หน่วยที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (CelA, CelB, CelD, CelE, CelF, CelG, CelH, CelIN และ CelIP)

5. ประโยชน์ของเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรม

เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม อาหารสัตว์ เครื่องนุ่งห่ม ผงซักฟอก เยื่อกระดาษ เป็นต้น โดยในปัจจุบันงานวิจัยในกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวยังมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งในด้านการผลิตและการศึกษาในระดับโมเลกุล (Bhat, 2000) เอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ มีบทบาทสำคัญในระดับอุตสาหกรรมดังนี้

5.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

5.1.1 อุตสาหกรรมการทำน้ำผลไม้

ในการผลิตน้ำผลไม้ต้องอาศัยกระบวนการสกัด การทำให้ใส และปรับสภาพน้ำผลไม้ให้มีความคงตัว นำเอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลสมาใช้ร่วมกับเอนไซม์เพคติเนสและเฮมิเซลลูเลสมาใช้ในการสกัดและทำให้ใส (Galante *et al*., 1998b; Grassin and Fauquembergue, 1996a) ภายหลังผ่านการบีบหรือบดด้วยวิธีเชิงกลแล้วยังต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวมาช่วยทำให้เนื้อผลไม้เปื่อยยุ่ย กรองง่ายและผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้มีความคงตัว ซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตให้ได้น้ำผลไม้เร็วขึ้น รวมทั้งสามารถคงสภาพของสารที่มีประโยชน์ในน้ำผลไม้ เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะย่อยเพคตินและโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นส่วนของผนังเซลล์พืช จึงสามารถลดความหนืดของน้ำผลไม้และคงเนื้อสัมผัสของน้ำผลไม้ไว้ได้ (Galante *et al*., 1998b; Godfrey and West, 1996b; Uhlig, 1998) โดยหลังจากการย่อยสารกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ยังทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้เป็นพรีไบโอติกและส่วนผสมในอาหารบางชนิดที่ให้แคลอรีต่ำอีกด้วย (Bhat and Bhat, 1997; Mandels, 1985) นอกจากนี้เอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสยังใช้ร่วมกับเอนไซม์แมนนาเนสเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของราและแบคทีเรียบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของอาหารด้านความปลอดภัย (Fuglsang *et al*., 1995) เอนไซม์เพคติเนสนำมาใช้ร่วมกับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เซลลูเลสและฉีดเข้าไประหว่างผิวของผลไม้เพื่อทำให้สามารถปอกง่ายขึ้น คงความกรอบและกลิ่นรสของผลไม้ (Baker and Bruemmer, 1989; Crocco, 1976; Baker and Wicker, 1996)

5.1.2 อุตสาหกรรมเบียร์และไวน์

การผลิตเบียร์เริ่มต้นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ ได้แก่ แอลฟ่าและเบต้า-อะไมเลส คาร์บอกซีเพปทิเดส และเบต้า-กลูคาเนสเพื่อกระตุ้นกระบวนการงอกของข้าวบาร์เล่ย์เป็นข้าวมอลต์ ซึ่งในบางฤดูกาลและปัญหาจากการเก็บเกี่ยวทำให้เอนไซม์ที่อยู่ในเมล็ดข้าวมีการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะเอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสที่ผลิตออกมาน้อยกว่าปกติ ด้วยปัญหาดังกล่าวทำให้เมล็ดข้าวมอลต์ที่ได้ไม่สมบูรณ์โดยทำให้เกิดโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide, NSP) หรือเป็นเบต้า-กลูแคนที่ละลายน้ำเกิดเป็นเจลโดยส่งผลต่อเวลาที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้น กระบวนการหมักและการกรองน้ำเวิร์ท (wort) ทำได้ยาก รวมทั้งทำให้ผลผลิตสุดท้ายที่ได้น้อยลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมเอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสจากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Trichoderma ressei, Aspergillus niger* หรือ *Bacillus subtilis* เพื่อกำจัด ß-1,3 และ ß-1,4 glucan ทำให้ความหนืดในน้ำเวิร์ทน้อยลงและปลดปล่อยน้ำตาลริดิวซ์ซึ่งช่วยส่งเสริมการหมักให้เร็วยิ่งขึ้น (Canales, 1988; Galante *et al*., 1998b; Pajunen, 1986) ในการผลิตไวน์มีเอนไซม์สามกลุ่มที่นำมาใช้ ได้แก่ เอนไซม์เพคติเนส เบต้า-กลูคาเนส และเฮมิเซลลูเลส (Galante *et al*., 1998b) ซึ่งเอนไซม์ดังล่าวมีหน้าที่ช่วยให้ผลไม้เปื่อยยุ่ยเร็วขึ้นและช่วยให้การสกัดแยกสีดีขึ้น กระบวนการกรองและทำให้ใสทำได้ง่ายขึ้น รวมทั้งปรับปรุงคุณภาพและความคงตัวของไวน์ได้ดี นอกจากนี้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสยังทำให้เกิดการเปลี่ยนหมู่อโรเมติกบางกลุ่มทำให้กลิ่นและรสชาติของไวน์ดีขึ้น (Caldini *et al*., 1994; Gunata *et al*., 1990) เอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสจากรา *T. harzianum* นำมาใช้ในการย่อยสลายกลูแคนซึ่งเป็นผนังเซลล์ยีสต์ทำให้การกรองและการทำไวน์ให้ใส (Galante *et al*., 1998b)

5.2 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

เอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสได้นำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ทั้งในสัตว์กระเพาะเดี่ยวและสัตว์เคี้ยวเอื้อง เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีบทบาทในการปรับปรุงคุณภาพของอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว คือ กำจัดปัจจัยที่ส่งผลให้คุณค่าทางอาหารในธัญพืชหรือพืชต่างๆ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับธัญพืชโดยการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เปลือกธัญพืช และกำจัดเบต้า-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลูแคนซึ่งทำให้ความหนืดลดลง สัตว์สามารถย่อยอาหารประเภทแป้ง ไขมัน และโปรตีนได้ง่าย และเพิ่มความสามารถในการดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็กได้ดีขึ้น (Beauchemin *et al*., 1995; Bedford and Classen, 1992) มีการเติมเอนไซม์บางชนิด เช่น โปรตีเอส อะไมเลส หรือกลูคาเนส เข้าไปโดยตรงในอาหารโดยเฉพาะอาหารสำหรับลูกหมูและลูกไก่แรกเกิด เป็นต้น (Galante *et al*., 1998b) มีรายงานการทดลองโดยใช้ยีนที่ผลิตเบต้า-กลูคาเนสจาก *Streptococcus bovis* ในเซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* แล้วจึงผสมเซลล์ที่ได้ดังกล่าวลงในอาหารลูกไก่สูตรปกติด้วยข้าวบาร์เล่ย์เพียงชนิดเดียว เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของลูกไก่อายุ 21 วัน ที่ได้รับอาหารสูตรปกติและสูตรดัดแปลง พบว่าลูกไก่ที่ได้รับอาหารสูตรดัดแปลงมีอัตราการเจริญและกินอาหารได้มากกว่าลูกไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรปกติ (Onderci *et al*., 2007) เอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสและไซแลเนสถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์โดยสามารถกำจัดโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (NSP) เช่น เบต้า-กลูแคนในข้าวบาร์เล่ย์และอะราบินอกไซแลน (Cowan, 1996; Hesselman *et al*., 1982) ซึ่งถ้ามีปริมาณโพลีแซคคาไรด์ดังกล่าวจำนวนมากจะทำให้สัตว์กินอาหารได้น้อยและน้ำหนักตัวลดลง (Bedford and Classen, 1992; Chesson, 1987) อัตราส่วนของเอนไซม์ไซแลเนสต่อเอนไซม์เซลลู-เลสที่เหมาะสมเท่ากับ 6:1 พบว่าทำให้น้ำหนักตัวลูกไก่มากที่สุดโดยอาหารมีส่วนผสมของข้าวสาลีอยู่ประมาณ 60% (Galante *et al*., 1998b) อาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องจะมีส่วนผสมที่ซับซ้อนกว่า ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพคติน ดังนั้นจึงต้องใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพื่อปรับปรุงคุณภาพอาหาร มีรายงานว่าการเติมเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลเนสทางการค้าลงในอาหารสามารถเพิ่มน้ำหนักให้วัวได้มากกว่า 35% (Beauchemin *et al*., 1995)

5.3 อุตสาหกรรมสิ่งทอและผงซักฟอก

กระบวนการฟอกสียีนสมัยเริ่มต้นนั้นมีการนำหินพัมมิชมาใช้เพื่อขัดสีเกิดเป็นสีฟ้าซีดตามที่ต้องการของตลาด แต่ในปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้เพื่อฟอกสีและกำจัดด้ายและปุ่มปมที่ไม่ต้องการในผ้าฝ้ายออกไป ข้อดีของการนำเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการฟอกสียีนนั้นสามารถลดการฉีกขาดของเนื้อผ้าที่เกิดขึ้นระหว่างการขัดด้วยหินด้วยวิธีดั้งเดิม รวมทั้งสามารถใช้เทคโนโลยีเข้ามาควบคุมให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Galante *et al*., 1998b) แต่การใช้เอนไซม์เพื่อฟอกสียีนอาจทำให้เกิดสีตก พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Humicula insolens* และ *T. ressei* ที่มีคุณสมบัติทนกรดร่วมกับเอนไซม์โปรตีเอสเติมลงไปก่อนเข้าเครื่องซักผ้าช่วยลดปัญหานี้ได้ (Galante *et al*., 1998b)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื้อผ้าที่ผลิตจากเส้นใยธรรมชาติ เช่น ผ้าฝ้ายและลินิน ที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลสมีแนวโน้มที่ใยผ้าจะมีลักษณะเป็นปุ่มปมอยู่มากถือเป็นลักษณะที่ทำให้ผ้าคุณภาพต่ำ ดังนั้นกระบวนการกำจัดปุ่มปมของใยผ้าจึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับผ้าใยธรรมชาติได้ มีการนำเอนไซม์เซลลูเลสเข้ามาใช้ร่วมกับวิธีเชิงกลต่างๆ เพื่อกำจัดปุ่มปมผ้าส่วนเกิน นอกจากนี้ข้อดีของการใช้เอนไซม์ คือ สามารถปรับปรุงสีผ้าให้สดใส ทำให้รูปทรงของผ้าสวยงาม ทำให้ผ้ามีสัมผัสนุ่มและมันเงา อีกทั้งยังเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Bhat, 2000)

ผ้าฝ้ายทั่วไปเมื่อมีการซักซ้ำจะหมองคล้ำและเกิดลักษณะเป็นขุยเนื่องจากการเคลื่อนตัวชิดกันของใยผ้า การเติมเอนไซม์เซลลูเลสในผงซักฟอกจะช่วยให้ใยผ้าเรียงตัว กำจัดใยผ้าที่เป็นขุย ทำให้สีสันของเนื้อผ้าสดใสและมีสัมผัสนุ่ม เอนไซม์เซลลูเลสจาก *H. insolens* นำมาใช้ในผงซักฟอกเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกในใยผ้า ทำให้ผ้าสะอาดและนุ่มขึ้น ทำงานได้ดีภายใต้สภาวะด่าง (พีเอช 8.0-9.0) อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยผสมลงไปประมาณ 4% ของปริมาณผงซักฟอกทั้งหมด (Uhlig, 1998)

จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ทำงานได้ในสภาวะด่างเป็นที่สนใจในการนำเอนไซม์มาใช้เพื่อเปรียบเทียบกับผงซักฟอกที่ได้ทางการค้า เอนไซม์เซลลูเลสจากแอคติโนมัยซีท *Thermomonospora* ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณที่มีความร้อนสะสมตามธรรมชาติในอินเดีย (George *et al*., 2000) เป็นเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความเสถียรอยู่ในช่วงพีเอช 7.0 ถึง 10.0 และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เอนไซม์ร่วมกับผงซักฟอกที่ผลิตทางการค้าพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานร่วมกันได้กับผงซักฟอกทดสอบ เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Streptomyces drozdowiczii* ทำงานได้ดีร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าเช่นกัน (Lima *et al*., 2005) เอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 87% ภายหลังทดสอบร่วมกับผงซักฟอกทางการค้าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลู-เลสจาก *S. drozdowiczii* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 595 ยูนิตต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

6.1 ยีสต์สกัด (Yeast Extract)

คำนิยามของ The Food Chemical Codex ให้ความหมายของยีสต์สกัดไว้ว่า “ยีสต์สกัด คือ ส่วนของยีสต์เซลล์ที่ละลายน้ำได้ ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน เพปไทด์ คาร์โบไฮเดรตและเกลือ ยีสต์สกัดได้จากการสลายพันธะเพปไทด์ภายในเซลล์ยีสต์ ซึ่งเกิดขึ้นโดยธรรมชาติโดยกิจกรรมของเอนไซม์จากภายในเซลล์ยีสต์เอง หรืออาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์เกรดสำหรับอาหาร (food grade enzyme) ที่เติมในระหว่างกระบวนการผลิต” ซึ่งเมื่อเซลล์ยีสต์ตายจะเกิดกระบวนการย่อยสลายตัวเองขึ้นตามธรรมชาติ เรียกว่า ออโตไลซิส (autolysis) ในระหว่างนั้นเอนไซม์ต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์จะย่อยสลายส่วนที่เป็นโปรตีนและออร์กาเนลต่างๆ ทำให้ได้เป็นเพปไทด์ (peptide) กรดอะมิโน (aminoacid) วิตามิน (vitamin) รวมถึงส่วนประกอบอื่นๆของเซลล์ออกมา เมื่อแยกเอาส่วนที่ไม่ละลายน้ำหรือส่วนที่เป็นกากเซลล์ออกไป ส่วนที่ได้ เรียกว่า ยีสต์สกัด (Querol and Fleet, 2006)

องค์ประกอบหลักของยีสต์สกัด ใน 100 กรัม ประกอบไปด้วย ไขมัน 0.21 กรัม คาร์โบไฮเดรต 13.04 กรัม ไนโตรเจน5.33 กรัม นิวคลีโอไทด์ 14.6 กรัม และความชื้น 2.74 กรัม (Edens *et al*., 2002) กระบวนการผลิตยีสต์สกัด (Production Process) เริ่มจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คือ ยีสต์ขนมปัง (baker’s yeast) หรือ ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (brewer’s yeast) เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis, Kluyveromyces marxianus* มีกระบวนการต่างๆ ดังนี้

1. เก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ออกจากอาหารที่ใช้เลี้ยง (Cell recovery)

2. การย่อยสลายเซลล์ยีสต์ด้วยกระบวนการ ออโตไลซิส (autolysis) ควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของเกลือ ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์ที่ทำงานในขั้นตอนนี้ เช่น เอนไซม์ protease, gluconase, nuclease และ phosphodiesterase

3. แยกส่วนที่ไม่ละลายน้ำและส่วนที่ไม่ต้องการจากเซลล์ยีสต์ เช่น ผนังเซลล์ของยีสต์จะถูกแยกออกจากส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์ที่ละลายน้ำได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. สารละลายยีสต์สกัดที่แยกเอาส่วนที่ไม่ต้องการออกไปแล้ว ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อและทำให้เข้มข้นขึ้น

5. สารละลายยีสต์สกัดที่เข้มข้นและปลอดเชื้อจะถูกนำไปแปรรูปให้อยู่ในรูปต่างๆ เช่น รูปผง (powder), รูปของเหลว (liquid) หรือรูปครีม (paste)

ประโยชน์ของยีสต์สกัด

1. ใช้เป็นสารแต่งกลิ่นรสธรรมชาติสำหรับอาหาร ไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับสุขภาพของผู้บริโภค ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารแทนผงชูรส พบว่ามีการใช้ยีสต์สกัดแต่งกลิ่นอาหารบางชนิดเลียนกลิ่นธรรมชาติของเนื้อสัตว์และชีส ตลอดจนใช้แต่งรสในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ซุป กระป๋อง ซอส อาหารเสริมสำหรับทารก เป็นต้น ยีสต์สกัดและผลิตภัณฑ์จากยีสต์สกัดเป็นที่นิยมบริโภคมากในประเทศแถบยุโรป ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์

2. ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและสารส่งเสริมการเจริญสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จากองค์ประกอบหลักของยีสต์สกัดที่อุดมไปด้วยไนโตรเจน วิตามิน และสารส่งเสริมการเจริญ ยีสต์สกัดจึงถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น สารปฏิชีวนะ ยา อาหารเสริมอุตสาหกรรมผลิตผลิตภัณฑ์จากนม เป็นต้น

6.2 มอลต์สกัด (Malt Extract)

มอลต์สกัดถูกนำมาใช้แพร่หลายในช่วงแรกของศตวรรษที่ 20 เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับเด็กที่อยู่ในเขตเมืองของประเทศอังกฤษ ในมอลต์สกัดอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุมากมาย การผลิตมอลต์สกัดเริ่มจากการปล่อยให้มอลต์เกิดการงอก (malting) โดยจะแช่มอลต์ลงในน้ำเพื่อกระตุ้นให้เกิดการงอก จากนั้นนำมอลต์ไปอบแห้งที่ความร้อนไม่สูงนักเพื่อยับยั้งการงอก ในขั้นตอนนี้จะทำให้เอนไซม์ต่างๆ ในมอลต์ยังคงความเสถียร ซึ่งกระบวนการนี้ทำให้ปริมาณแป้งที่สกัดได้ในมอลต์ประมาณ 7% ของน้ำหนักแห้ง เปลี่ยนไปเป็นคาร์โบไฮเดรต หลังจากนั้นเป็นกระบวนการที่เรียกว่า mashing ซึ่งเป็นขั้นตอนในการสกัดน้ำตาลออกจากมอลต์ โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิหนึ่ง ทำให้เมล็ดมอลต์อุ่นขึ้น ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ในมอลต์ทำงานเปลี่ยน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แป้งในมอลต์ให้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยน้ำตาลมอลโตสเป็นน้ำตาลที่พบมากที่สุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้เรียกว่า wort ซึ่งเมื่อผ่านการทำให้แห้งส่วนที่ได้เรียกว่า มอลต์สกัด ในอุตสาหกรรมเบียร์อาจทำให้เป็นในรูปผงหรืออาจไม่ผ่านความร้อนเพื่อใช้ในรูปน้ำ ขึ้นอยู่กับข้อได้เปรียบและจุดคุ้มทุนต่างๆ องค์ประกอบหลักของมอลต์สกัดใน 100 กรัม ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต 91.0 กรัม ซึ่งประกอบไปด้วย โมโนแซคคาไรด์ 10.0 กรัม ไดแซคคาไรด์ 42.0-43.0 กรัมโอลิโกแซคคาไรด์ 38.0-39.0 กรัมเกลืออนินทรีย์ 1.8 กรัม โปรตีน 7.0 กรัม วิตามิน 0.2 กรัม (Fluckiger-Isler *et al*., 1994)

6.3 เปปโตน (Peptone)

เปปโตน (pepone) คือ โปรตีนที่ถูกย่อยให้โมเลกุลเล็กลงเป็นกรดอะมิโน ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient media) และเป็นส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องใช้เพื่อการเจริญเติบโต โปรตีนซึ่งใช้ในการผลิตเปปโตนมีหลายชนิด เช่น เคซีน (Casein) เจลาติน (gelatin) โปรตีนจากเนื้อสัตว์ ถั่วเหลือง และเซลล์ยีสต์ เป็นต้น คุณสมบัติของ peptones จะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใช้และวิธีการย่อยโปรตีน การย่อยโปรตีนเพื่อให้ได้เปปโตน อาจใช้ กรด ด่าง หรือเอนไซม์ (enzyme) เช่น โปรติเอส (protease) แต่การย่อยด้วยกรดหรือด่าง จะทำลายวิตามินและกรดอะมิโนบางส่วนในโปรตีน

ตัวอย่างของเปปโตนที่ใช้เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์มีดังนี้

Casein Digest Peptone ได้จากการย่อยเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนจากนม พัฒนาขึ้นเพื่อนำมาใช้กับงานด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล อุดมไปด้วยแหล่งไนโตรเจน วิตามิน และกรดอะมิโน ซึ่งใช้เป็นธาตุอาหารหลักสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พบว่า Casein Digest Peptone มีปริมาณกรดอะมิโนชนิดทริปโตเฟนในปริมาณสูง

Pancreatic Digest of Casein (Peptone C1) เป็นโปรตีนจากนมที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ อุดมไปด้วยแหล่งไนโตรเจนและกรดอะมิโนจำนวนมาก เช่น ทริปโตเฟน เป็นส่วนประกอบที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (fastidious microorganisms)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pancreatic Digest of Casein 2 (Peptone C2) เป็นโปรตีนจากนมที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มีปริมาณเพปไทด์ชนิดไดและไตรเพปไทด์ และกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ในปริมาณสูง เป็นส่วนประกอบที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (fastidious microorganisms)

Pancreatic Digest of Gelatin (Peptone G) เป็นโปรตีนจากเจลาตินที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เปบโตนชนิดนี้ไม่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในงานเกี่ยวกับการหมัก นอกจากนี้ยังใช้ร่วมกับอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่เจริญอย่างรวดเร็ว (non-fastidious microorganisms)

Pancreatic Digest of Soybean Meal (Peptone S1) เป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ภายใต้สภาวะควบคุม มีปริมาณไนโตรเจน วิตามิน และคาร์โบไฮเดรตเหลืออยู่ในปริมาณสูง ใช้เป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์เข้าย่อยสลายกากถั่วเหลืองเป็นการช่วยลดปริมาณ bovine spongiform encephalopathy (BSE) ซึ่งมีความเสี่ยงเมื่อนำไปใช้กับงานด้านผลิตวัคซีน

Papaic Digest of Soybean Meal (Peptone S2) เป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ปาเปน (Papane) นำมาใช้เป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์ มีปริมาณไนโตรเจน วิตามิน และคาร์โบไฮเดรตเหลืออยู่ในปริมาณสูง

Peptic Digest of Animal Tissue (Peptone A) เป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเนื้อเยื่อสัตว์ด้วยเอนไซม์ นำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ มีปริมาณของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน กรดอะมิโน วิตามิน และคุณค่าทางอาหารหลากหลาย

Peptone S, Ultrafiltered เป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ปาเปน (Papane) ภายใต้สภาวะควบคุม ใช้เป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์ในงานด้านจุลชีววิทยา มีปริมาณไนโตรเจน วิตามิน และคาร์โบไฮเดรตเหลืออยู่ในปริมาณสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่นำมาใช้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเก็บจากแหล่งดินที่มีการทับถมและย่อยสลายของชีวมวลทางการเกษตรที่มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ ดินบริเวณใต้ต้นไผ่ บ้านบึงบัว อ.นครหลวง จ.พระนครศรีอยุธยา, ดินบริเวณโป่งเดือด จ.เชียงใหม่, กองหมักทลายปาล์มและกองปุ๋ยหมักพืชสดภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, ดินแล้งทุ่งนา จ.ชัยภูมิ, ดินบริเวณหอนางอุสา จ.อุดรธานี, ดินแล้งทุ่งนา จ.หนองคาย, ดินในป่าเขาใหญ่ จ.นครราชสีมา และดินบริเวณซากไม้ผุ เกาะช้าง จ.ตราด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการทดลอง

2. อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 ตู้เขี่ยเชื้อ (microflow biological safety cabinet)

3.2 ตู้บ่มเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (low temperature incubator)

3.3 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 2.5 ลิตร พร้อมระบบควบคุมอุณหภูมิ การให้อากาศ และการกวน (MD-250, Marubishi, Japan)

3.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

3.6 ตู้อบอุณหภูมิ 105^0 C (hot air oven)

3.7 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

3.8 โถดูดความชื้น (desicator)

3.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerator centrifuge)

3.11 เครื่องเขย่าเชื้อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ (thermo shaker)

3.12 เครื่อง lyophilizer

3.13 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่จำเป็น (ดังระบุในแต่ละการทดลอง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การคัดแยกและแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทนอุณหภูมิสูงบนอาหารแข็ง (ดัดแปลงจากศศิธรและนฤมล, 2551)

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมลงในสารละลาย buffer saline ปริมาตร 9 มิลลิลิตรที่ค่าความเจือจางเหมาะสม เกลี่ยลงบนอาหาร Nutrient agar (NA, Himedia, India) ที่เติมCarboxymethylcellulose (CMC, Fluka, Finland) ปริมาณ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยที่เจริญได้มาทำให้บริสุทธิ์โดย streak ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) อีกครั้งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อดังกล่าวบนอาหารเอียง NA ไอโซเลทที่ได้ทั้งหมดนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (Carboxymethylcellulase) โดยการ spot เชื้อบนอาหาร NA ที่เติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นใช้สีย้อม Congo red ความเข้มข้น 0.01% เทบนจานอาหาร บ่มนาน 20 นาที แล้วจึงล้างสีออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เติมกรดอะซิติกความเข้มข้น 5% ลงไปบ่มไว้ประมาณ 5 นาที แบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจะเกิดวงใส (clear zone) ปรากฏอยู่รอบโคโลนีทดสอบ ทำการวัดและบันทึกอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ได้ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในหน่วยมิลลิเมตร (mm.) นำแบคทีเรียในแต่ละไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสบนอาหารแข็งมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารเหลวต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่เก็บรักษาในอาหารเอียง Nutrient agar ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม CMC ปริมาณ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหารเหลวชนิดเดิมปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง crude enzyme ที่ได้โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำส่วนใส (supernatant) มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอวิเซลเลส (ภาคผนวก ข) จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS (Dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959) คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเพื่อศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ในขั้นตอนต่อไป

3. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ และการตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rRNAของเชื้อ แอคติโนมัยซีท

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่และสร้างสปอร์บนอาหาร NA ใช้ loop ขูดสปอร์เชื้อออกมาจำนวน 1 loop แตะบนกระจกปิดสไลด์ จากนั้นย้อมด้วยสี Crystal violet ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างน้ำเปล่าโดยให้ไหลผ่านเบาๆ เพื่อไม่ให้สปอร์เชื้อหลุดออกมา ซับกระจกสไลด์ให้แห้ง นำไปศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อและสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะของเส้นใยและสปอร์

3.2 การศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วยวิธี Thin layer chromatography (ดัดแปลงจากวิธีของ Becker *et al*., 1964)

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA ที่เติม CMC ปริมาณ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 7 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วขูดโคโลนีที่ได้ มาย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 N และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำเอาสารที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์มาทดสอบด้วยวิธี Thin layer chromatography เทียบกับสารมาตรฐาน DAP โดยใช้แผ่น TLC อลูมิเนียมขนาด 20x20 เซนติเมตร ที่เคลือบด้วยเซลลูโลส โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 นำสารละลายที่ได้ตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น TLC โดยเทียบกับสารมาตรฐาน คือ LL และ *meso*-DAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 3 ไมโครลิตร เป่าให้แห้ง

3.3.2 นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในสารละลายผสมที่ประกอบด้วย methanol: H_2O:6N HCl: pyridine ในอัตราส่วน 80: 26: 4: 10 ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่จนสุดแผ่น

3.3.3 นำแผ่น TLC ที่ได้มาผึ่งให้แห้งแล้วฉีดพ่นด้วยสารละลายของ 0.5%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ninhydrin ที่ละลายในอะซีโตนให้ทั่วทั้งแผ่น นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที บันทึกตำแหน่งของสีเหลืองที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบกับ DAP มาตรฐาน

3.3 การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

สกัดดีเอ็นเอจากแอคติโนมัยซีทและทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยแช่เจลในสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 5-10 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV-transilluminator เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder และการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ส่วนปลาย 5' โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปหาลำดับเบสโดยตรง (direct sequencing) ด้วยเครื่อง ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร นำข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rRNA ส่วนปลาย 5’ ที่ได้จากแอคติโนมัยสีทมาเปรียบเทียบกับข้อมูลยีน 16S rRNA ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank, EMBL และ DDBJ โดยใช้โปรแกรม Blastn ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov

4. การศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร Basal Medium ชนิดต่างๆ ในระดับฟลาสก์

ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหาร Basal Medium จำนวน 3 สูตร ได้แก่ 1. Ramachanda *et al.,*1988 2. Misha *et al*., 1984 และ 3. Lima *et al*., 2005 ที่เติม CMC 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเตรียมกล้าเชื้อไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดที่เก็บรักษาในอาหารเอียง NA ลงในอาหาร NB ที่เติม CMC 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ถ่ายกล้าเชื้อปริมาณ 5% โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหารเหลว Basal Medium จำนวน 3 สูตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมงมาทำการมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลส เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมและนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับฟลาสก์

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 4 ปริมาณ 5% โดยปริมาตรต่อปริมาตรลงในอาหาร Basal Medium สูตรที่คัดเลือกจากข้อ 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมแหล่งโตรเจนต่างๆ ได้แก่ ยีสต์ขนมปัง (Fermipan, Singapore) เปปโตน (Himedia, India) และมอลต์สกัด (Himedia, India) ปริมาณ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลส

6. การศึกษาลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

6.1 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

การศึกษาช่วงของพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่แปรค่าพีเอชต่างๆ คือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 โดยใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุมพีเอชในช่วง 3-6 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุมพีเอชในช่วง 6.0-8.0 ใช้สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 8.0-9.0 และใช้สารละลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุมพีเอชในช่วง 9.0-10.0 ทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยแปรค่าอุณหภูมิในช่วงต่างๆ ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส

6.2 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่เสถียรต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่างๆ โดยใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 3.0-6.0 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 6.0-8.0 ใช้สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโม-ลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 8.0-9.0 และใช้สารละลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์ความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 9.0-10.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 6.1

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ทำได้โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 6.1

7. การศึกษาปัจจัยจากอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยวิธีการหาพื้นผิวแบบตอบสนอง

ศึกษาตัวแปรจากอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยถ่ายกล้าเชื้อตามวิธีในข้อ 4 ในอาหาร Basal Medium ชนิดที่ 3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและยีสต์ขนมปังปริมาณ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ มีระดับของตัวแปรทั้งพีเอชและอุณหภูมิจำนวน 4 ระดับ วางแผนการทดลองแบบ 4^2 factorial design และจัดลำดับการทดลองแบบสุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2 รวมทั้งหมด 16 ชุดการทดลอง เก็บตัวอย่างในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จากนั้นนำผลกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป (STATISTICA 5) เพื่อสร้างรูปแบบสมการลำดับที่ 2 (second order model)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 จำนวนชุดการทดลองของปัจจัยทั้งหมดจำนวน 2 ปัจจัย ที่ระดับการทดลองจำนวน 4 ระดับ

การทดลองที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช
1	40	6
2	30	6
3	50	7
4	60	6
5	40	7
6	30	7
7	40	9
8	50	8
9	60	8
10	30	8
11	50	9
12	50	6
13	60	7
14	60	9
15	40	8
16	30	9

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การทดสอบและยืนยันความแม่นยำของการทำนายค่าจากการวิเคราะห์แบบพื้นผิวตอบสนองในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) ในถังหมักขนาด working volume สูงสุด 2.5 ลิตร โดยนำสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองในข้อ 7 มาใช้ในการผลิต กำหนดอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

ภาพที่ 4 การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (MD-250, Marubishi, Japan)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter)

เตรียมกล้าเชื้อโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *T. fusca* PA 1-1 จากหลอดเก็บลงบนอาหาร nutrient agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อจากอาหาร nutrient agar ลงในอาหาร nutrient broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในถังหมัก

8.2 การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture)

8.2.1 เติมอาหาร Basal medium สูตรที่ 3 ลงไป 1.5 ลิตร จากนั้นต่อชิ้นส่วนของถังหมักเข้าด้วยกัน เติม antifoam ปริมาณ 1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อใช้ในการกำจัดฟอง (antifoam) ลงในถังหมัก จากนั้นปิดท่อที่สัมผัสกับของเหลวทั้งหมดด้วย clamp นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8.2.2 ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 8.1 ลงในถังหมักซึ่งมีอาหาร Basal medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ข้อ 8.2.1) จากนั้นนำถังหมักไปประกอบเข้ากับส่วนควบคุมของเครื่องควบคุม ติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิ ต่อท่อน้ำเย็นที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิภายในถังหมักและตั้งค่าการทำงานของเครื่องให้พร้อมใช้งานทุกระบบ โดยกำหนดค่าความเร็วรอบของการกวนคงที่ที่ 200 รอบต่อนาที และค่าอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

8.2.3 เมื่อเตรียมพร้อมระบบของถังหมัก เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก เก็บส่วนใสไว้ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พีเอช และปริมาณโปรตีนด้วยชุดวิเคราะห์โปรตีนสำเร็จรูป (Biorad) ด้วยวิธี Bradford (1976)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

5.1 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

5.2 ระยะเวลาในการวิจัย

การทดลองเริ่มต้นตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2552 สิ้นสุด เดือนกุมภาพันธ์ 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

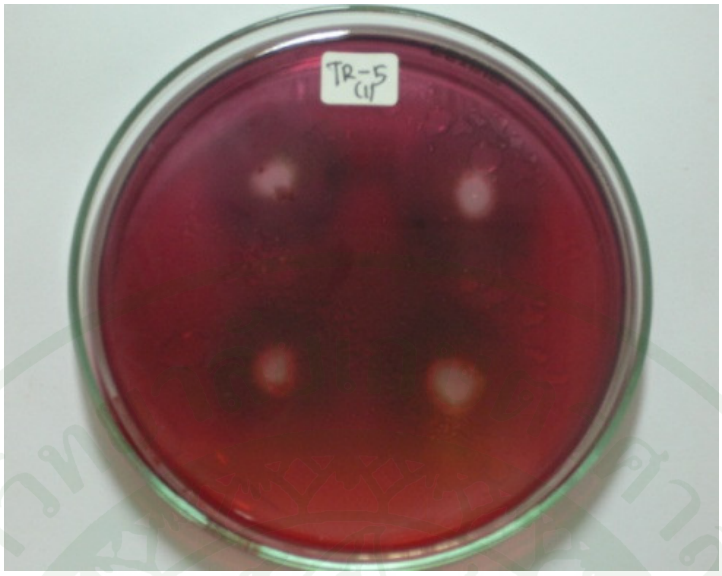
ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

จากการเก็บตัวอย่างดิน 9 บริเวณที่มีการทับถมและการย่อยสลายของชีวมวล ภายในพื้นที่ภาคกลาง เหนือ ตะวันออก และตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 8 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ชัยภูมิ อุดรธานี เชียงใหม่ ตราด นครราชสีมา พระนครศรีอยุธยา และหนองคาย โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA ที่ผสม CMC ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิดังกล่าวได้ทั้งหมด 121 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 3 จากผลการทดลองพบว่าบริเวณดินแล้งทุ่งนา จ. หนองคาย มีจำนวนแบคทีเรียเมื่อทำการคัดแยกที่ 50 องศาเซลเซียส ได้สูงสุดเท่ากับ 18 ไอโซเลท ดินแล้งบริเวณหอนางอุสา จ. หนองคาย และกองปุ๋ยหมักพืชสดบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีจำนวนแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้รองลงมาเท่ากับ 15 ไอโซเลท และ 14 ไอโซเลท ตามลำดับ

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA ที่ผสม CMC ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน โดยเปรียบเทียบขนาดของวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียภายหลังการย้อมด้วยสี Congo red จากการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 41 ไอ-โซเลท จาก 121 ไอโซเลทที่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี ดังแสดงในภาพที่ 5 แหล่งดินที่พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้มากที่สุด คือ ดินแล้งบริเวณทุ่งนา จ.หนองคาย โดยสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่เกิดวงใสได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท รองลงมาเป็นตัวอย่างดินที่บริเวณป่าเขาใหญ่ จ. นครราชสีมา และกองปุ๋ยหมักพืชสด ภายในบริเวณ ม. เกษตรศาสตร์ โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่เกิดวงใสได้เท่ากับ 7 ไอโซเลท (ตารางที่ 3) อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ได้ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของไอโซเลทที่เกิดวงใสทั้งหมด 41 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.20±0.10 ถึง 3.16±0.46 แบคทีเรียไอโซเลทที่มีค่าอัตราส่วนของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากที่สุด คือ TR-5 (ภาพที่ 5) ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณซากไม้ผุเกาะช้าง จ.ตราด และไอโซเลทที่มีค่าอัตราส่วนของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยที่สุด คือ FE 3-5 คัดแยกจากกองปุ๋ยหมักพืชสดภายใน ม.เกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 บริเวณ clear zone ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบด้วยวิธี Congo red บนอาหาร NA ที่ผสม CMC ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ของไอโซเลท TR-5 เมื่อบ่มที่อุณภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ผลการคัดแยกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสบนอาหารแข็ง NA ที่เติม CMC 1% และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ไอโซเลท)	จำนวนแบคทีเรียที่เกิดวงใสเมื่อย้อมด้วยสี Congo red (ไอโซเลท)
ดินใต้ต้นไผ่ บ้านบึงบัว อ.นครหลวง จ.พระนครศรีอยุธยา	11	2
ดินบริเวณโป่งเดือด จ.เชียงใหม่	13	2
กองหมักทลายปาล์ม ม.เกษตรศาสตร์ บางเขน	12	6
ดินแล้งทุ่งนา จ.ชัยภูมิ	13	3
ดินแล้งหอบริเวณนางอุสา จ.อุดรธานี	15	2
ดินแล้งทุ่งนา จ.หนองคาย	18	9
ดินบริเวณป่าเขาใหญ่ จ.นครราชสีมา	13	7
ซากไม้ผุ เกาะช้าง จ.ตราด	12	3
กองปุ๋ยหมักพืชสด ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน	14	7
รวม	121	41

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้บนอาหาร NA ที่มี CMC ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางclear zone (mm.)/เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm.)
ดินกอไผ่ อ.นครหลวง จ.อยุธยา	AY 2-16	1.57±0.30
	AY 2-17	2.08±0.24
	AY 2-21	2.11±0.95
ดินบริเวณโป่งเดือด จ.เชียงใหม่	CH 4-2	1.52±0.14
	CH 2-2	2.38±0.10
กองหมักทลายปาล์ม ม.เกษตร	PA 1-1	2.38±0.14
	PA 1-2	1.40±0.07
	PA 1-3	1.85±0.10
	PA 1-6	1.68±0.19
	PA 1-9	2.88±0.15
	PA 1-10	1.72±0.17
ดินแล้งบริเวณทุ่งนา จ.ชัยภูมิ	CP 1-1	2.75±0.29
	CP 1-3	2.87±0.49
	CP 1-4	2.14±0.30
ดินแล้งหอนางอุสา จ.อุดรธานี	UD 1-1	1.52±0.18
ดินแล้งทุ่งนา จ.หนองคาย	NO 1-11	3.13±0.63
	NO 1-17	2.59±0.48
	NO 2-7	1.27±0.21
	NO 2-12	2.13±0.25
	N0 2-18	1.68±0.18
	N0 3-14	2.55±0.21
	NO 3-21	1.33±0.15
ดินบริเวณป่าเขาใหญ่จ.นครราชสีมา	KO 2-1	1.50±0.15
	K0 2-3	1.57±0.16
	KO 3-1	3.12±0.50
	KO 3-2	1.47±0.00
	KO 3-3	2.38±0.24
	KO 3-4	1.42±0.14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางclear zone (mm.)/เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (mm.)
ดินซากไม้ เกาะช้าง จ.ตราด	TR 1-1	2.00±0.41
	TR 1-4	1.95±0.19
	TR 1-5	3.16±0.46
	TR 1-9	1.50±0.03
กองปุ๋ยหมักพืชสด ม.เกษตร	FE 1-3	2.01±0.13
	FE 3-5	1.20±0.10
	FE 4-2	1.60±0.27
	FE 4-16	1.91±0.22
	FE 4-28	1.91±0.11
	FE 4-29	1.89±0.30

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว

ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารเหลวจากแบคทีเรียทั้งหมด 41 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารแข็ง ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร NA ที่มี CMC ความเข้มข้น 1% เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลทที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้มากกว่า 0.010 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบเพียง 7 ไอโซเลทที่สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลส (ตารางที่ 5) ไอโซเลท PA1-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุดเท่ากับ 0.60±0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสามารถผลิตเอนไซม์เอวิเซลเลสได้เท่ากับ 0.080±0.006 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แหล่งตัวอย่างที่พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด คือ ตัวอย่างปุ๋ยหมักพืชสดภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท และ 3 ไอโซเลทตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 5 โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (ภาคผนวก ข)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสของแบคทีเรีย 41 ไอโซเลท ในอาหาร NB ที่มี CMC 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาเวลา 48 ชั่วโมง

แบคทีเรียไอโซเลท	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอวิเซลเลส
AY 2-17	0.020±0.003	-
AY 2-16	-	-
AY 2-21	-	-
CH 2-2	0.050±0.003	-
CH 4-2	-	-
CP 1-1	0.050±0.00	-
CP 1-3	0.065±0.006	-
CP 1-4	-	-
FE 1-3	0.155±0.003	-
FE 3-5	0.350±0.003	-
FE 3-10	-	-
FE 4-2	-	-
FE 4-10	-	-
FE 4-16	-	-
FE 4-28	0.260±0.004	0.060±0.007
FE 4-29	0.010±0.001	-
K0 2-1	-	-
KO 2-3	-	-
KO 3-1	-	-
K0 3-2	-	-
KO 3-3	-	-
KO 3-4	-	-
KO 3-14	-	-
N0 1-11	-	-
N0 1-17	-	-
N0 2-8	-	-
N0 2-12	-	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 (ต่อ)

แบคทีเรียไอโซเลท	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอวิเซลเลส
N0 2-14	0.025±0.001	-
N0 2-17	-	-
N0 3-17	0.075±0.004	-
NO 3-21	-	-
PA 1-1	0.60±0.03	0.080±0.006
PA 1-2	0.040±0.001	-
PA 1-3	-	-
PA 1-9	0.115±0.011	-
TR 1-1	0.150±0.003	-
TR 1-5	-	-
TR 1-9	0.055±0.001	-
UD 1-1	0.30±0.003	-
UD 1-2	0.060±0.006	-

หมายเหตุ – หมายถึงกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า 0.010 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเซลลูเลสบนอาหารแข็งไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในอาหารเหลว เช่นเดียวกับการทดลองของ Krootdilaganandh (2000) ที่ทำการคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงและแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า ไอโซเลท CMU-44 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในอาหารเหลวในขณะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งซึ่งวัดจากวงใสของโคโลนีที่ปรากฏเมื่อย้อมด้วยสี Congo red โดยมีขนาดของวงใสเล็กกว่าไอโซเลทอื่นๆ ซึ่งจากการทดลองไอโซเลท TR 1-5 มีค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ได้ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของไอโซเลทที่เกิดวงใสมากที่สุดเมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์บนอาหารแข็ง เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลวพบว่ามีค่าน้อยกว่า 0.010 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไอโซเลทPA 1-1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารเหลวมากที่สุดเท่ากับ 0.60 ยูนิตต่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิลลิลิตร โดยมีค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ได้ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของไอโซเลทที่เกิดวงใสเท่ากับ 2.38±0.14

การศึกษาของศศิธรและนฤมล (2551) คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร NA ที่เติม CMC ปริมาณ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากแหล่งที่มีการทับถมของชีวมวลในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยตอนบนตอนบน และนำเชื้อที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ด้วยวิธี Congo red บนอาหารแข็ง พบเชื้อที่เกิดวงใสรอบรอยเจริญจำนวน 62 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารเหลว CMC broth พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.00-0.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในการทดลองของรุจิกาญจน์ (2546) ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและยีนที่เกี่ยวข้องจากแบคทีเรียในลำไส้ปลวก พบว่าเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสชนิดที่ใช้อากาศบนอาหาร NA ที่เติม CMC ปริมาณ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน มีแบคทีเรียทั้งหมด 70 ไอโซเลทที่ปรากฏวงใสรอบโคโลนีเมื่อทดสอบด้วยวิธี Congo red และเมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลว พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 13 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงกว่า 0.0017 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่า *Bacillus megaterium* CC41 เป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 0.0038 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

รายงานของ Mawadza *et. al*. (2000) คัดแยกแบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศซิมบับเว พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและสามารถใช้เอวิเซลและกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 65-70 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.0 Lee *et. al*. (2007) คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายรำข้าวจากดินและมีการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลส โดยกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสวัดได้สูงสุดเท่ากับ 153 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 รายงานของ Ibrahim and El-diwany (2007) คัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจากบ่อน้ำพุร้อนในอียิปต์ และพบว่า *Anoxybacillus flavithermus* EHP2 มีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 65.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 75 องศาเซลเซียส ที่พีเอช

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เท่ากับ 7.5 และจากรายงานของ Lima *et. al*. (2005) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Streptomycetes drozdowicii* ที่คัดแยกได้จากป่าในประเทศบราซิล พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 595 ยูนิตต่อลิตร เมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ในพีเอชเท่ากับ 5 และยังพบกิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลสเมื่อใช้เอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียที่ใช้อากาศทั่วไปบางสายพันธุ์พบว่าเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่ผลิตไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำหรือโครงสร้างเป็นระเบียบ Kim *et.al*. (2009) คัดเลือกแบคทีเรียจากใต้ทะเลที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53 เป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสภายหลังการทำให้บริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 92 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลส Bischoff *et. al*. (2006) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสทนอุณหภูมิสูงจาก *B. licheniformis* B-41361 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6 เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 183 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลสจากเอนไซม์บริสุทธิ์ จากรายงานของ Schuette *et. al*. (2008) แบคทีเรียในกลุ่ม Sulfolobales เช่น *S. solfataricus* ซึ่งทนอุณหภูมิและกรดได้สูง สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสแต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้เอวิเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินและกองปุ๋ยหมักที่มีการทับถมของชีวมวลจำนวน 9 แหล่ง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA ที่มี CMC ปริมาณ 1% ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง พบว่าแยกเชื้อตัวอย่างได้ 121 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อที่ได้ทั้งหมดทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสบนอาหารแข็ง ด้วยวิธี Congo red พบว่ามีเชื้อจำนวน 41 ไอโซเลทที่ปรากฏวงใสรอบโคโลนี ทดสอบการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสในอาหารเหลว NB ที่มี CMC ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไอโซเลท PA 1-1 มีความสามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลสเท่ากับ 0.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าไม่ได้ใช้เซลลูโลสชนิดไม่ละลายน้ำเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอนไซม์ที่ผลิตไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ในลำดับต่อไป

3. การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลท PA 1-1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร NA

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 บนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสังเกตลักษณะของการเจริญ พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลม มีสีขาวคล้ายผงแป้งละเอียดและแห้ง มีการเจริญของเส้นใยรอบๆ โคโลนีเป็นวงแหวนเมื่อปล่อยให้เจริญนานกว่า 4 วัน มีการสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) โดยที่โคโลนีไม่ฝังอยู่ด้านในเนื้ออาหาร (ภาพที่ 6) จึงสันนิษฐานเบื้องต้นว่าแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวจัดอยู่ในแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาพบเส้นใยหนาแน่น และมีกลุ่มของสปอร์ลักษณะกลมใหญ่ติดอยู่ด้านข้างเส้นใย เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทนี้ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีการเจริญได้ดีที่สุด ในขณะที่น้ำหนักแห้งของเซลล์โดยเฉลี่ยค่อนข้างต่ำ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส (ตารางผนวกที่ ค14)

ภาพที่ 6 สัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1

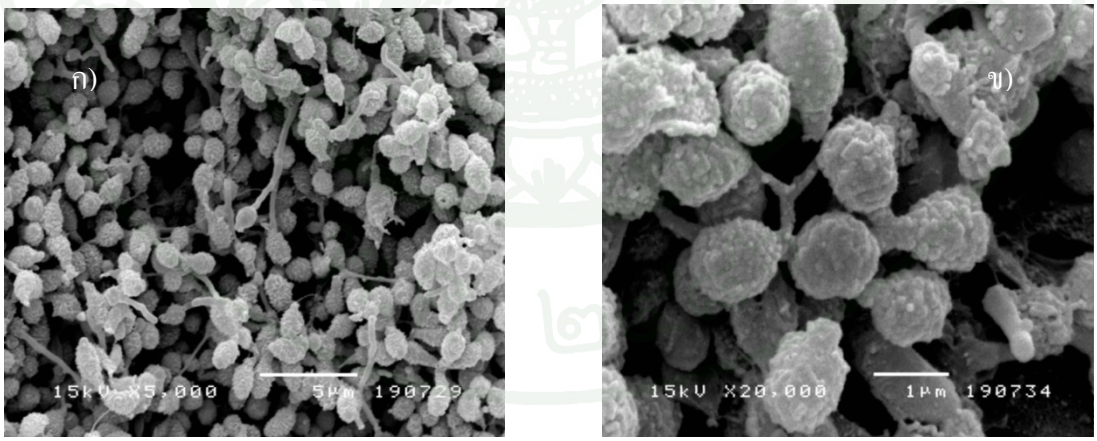
ก) โคโลนีบนอาหาร NA อายุ 4 วัน

ข) เส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (100 เท่า)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศึกษาลักษณะเส้นใยและสปอร์โดยละเอียดโดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy) ของไอโซเลท PA 1-1 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเส้นใยมีลักษณะค่อนข้างตรง มีกลุ่มของสปอร์ (Spore cluster) จำนวนมากและเป็นสปอร์เดี่ยว พบก้านชูสปอร์ (Sporophore) อย่างชัดเจน โดยก้านชูสปอร์จะแตกกิ่งก้านออกเป็น 2 ทิศทาง (Dichotomously branched sporophore) สปอร์มีรูปร่างคล้ายทรงกรวย พื้นผิวของสปอร์ขรุขระและสปอร์มีขนาดประมาณ 1 μm (ภาพที่ 7)

การทดสอบลักษณะทางเคมีของผนังเซลล์ด้วยเทคนิค paper chromatography เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการจัดกลุ่มแอคติโนมัยซีทเบื้องต้น โดยตรวจสอบว่าไอโซเลทนั้นเป็นเซลล์ที่ประกอบไปด้วยกรด diaminopimelic acid (DAP) ชนิด *meso*- หรือชนิด LL หรือเป็นเซลล์ที่ไม่มี DAP หากพบว่าไอโซเลทที่ไม่ทราบชนิดนั้นปรากฏผลไม่พบ DAP เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ เซลล์นั้นอาจจัดเป็นแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Oerkovie* *Promicromonospora* หรือ *Actinoplanes* หากเซลล์ดังกล่าวพบ LL-isomer DAP เซลล์ดังกล่าวอาจจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces Intrasporanium* หรือ *Norcadioides* หากเซลล์ดังกล่าวพบ *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบ อาจต้องศึกษาชนิดของน้ำตาลในเซลล์ควบคู่ไปกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อระบุสายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีทได้ในระดับจีนัส (William *et al*., 1989)

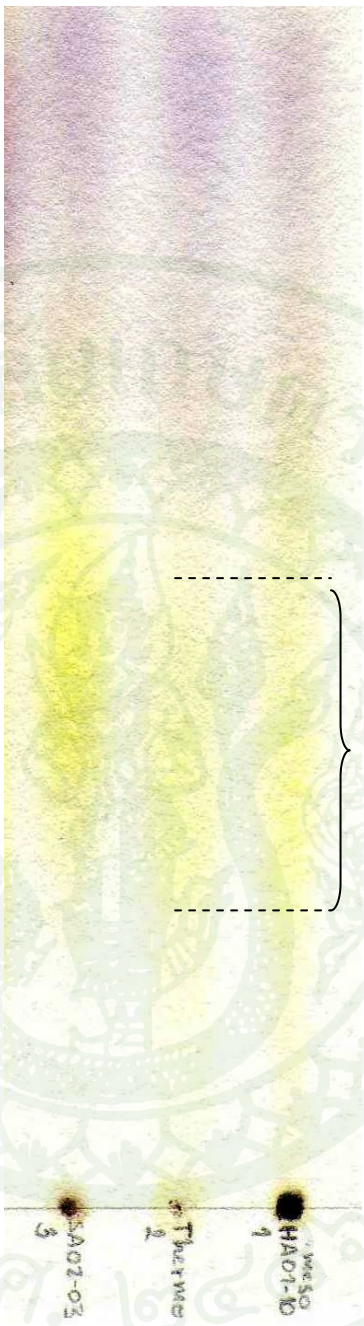


ภาพที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดจากเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลท PA 1-1 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 5 วัน ก) พบกลุ่มของสปอร์จำนวนมากที่ปลายก้านชูสปอร์ ข) การแตกออกของก้านชูสปอร์เป็นแบบสองทิศทาง และพื้นผิวขรุขระ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากภาพที่ 8 พบว่าตัวอย่างผนังเซล์ของไอโซเลท PA 1-1 ที่ย่อยด้วยกรดปรากฏแถบสีเขียวที่ตรงกับแถบของสารละลายมาตรฐาน DAP ชนิด *meso-* (ขวามือ) ในตำแหน่งที่อยู่ต่ำกว่าสารละลายมาตรฐาน LL-DAP เพียงเล็กน้อย จึงสันนิษฐานได้ว่าผนังเซลล์ของไอโซเลท PA 1-1 มีส่วนประกอบของ diaminopimelic acid เป็นชนิด *meso-* ซึ่งในการคัดแยกแอคติโนมัยซีทในดินโดยทั่วไปพบว่าประชากรของแอคติโนมัยซีทที่มีผนังเซลล์ชนิด *meso-* เป็นองค์ประกอบมีจำนวนน้อยกว่าแอคตโนมัยซีทที่มีผนังเซลล์ชนิด LL-DAP อยู่มาก จากการศึกษาของ Xu *et al.* (1996) ที่ได้รายงานความหลากหลายของประชากรแอคติโนมัยซีตจากตัวอย่างดินเขตร้อนของประเทศจีน พบว่าผลการแยกแอคติโนมัยซีททั้งหมดมีประชากรกลุ่ม *Streptomyces* ถึงร้อยละ 83-92 ดังนั้นไอโซเลท PA 1-1 อาจจัดเป็นแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่พบน้อยตามแหล่งดินทั่วไป และต้องการตรวจสอบลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของบริเวณ 16S rRNA ในการหาลำดับเบสเพื่อระบุสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ผนังเซลล์ไอโซเลท PA 1-1 ที่ย่อยด้วยกรดเพื่อศึกษาชนิดของ diaminopimelic acid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรีย

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนจากแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 โดยการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และหาลำดับเบสของ 16S rRNA ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ ได้ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 แสดงดังภาพที่ 9 เมื่อนำลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 มาหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity, % identity) โดยใช้ โปรแกรม BLASTn และเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank ผลแสดงในตารางที่ 6 จากการเปรียบเทียบลำดับเบส (16S rRNA sequence) ของแบคทีเรียไอโซเลท PB233 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBankโดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 ตรงกับแอคติโนมัยซีท *Thermobifida fusca* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) เท่ากับ 100 % เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 พิจารณาร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับเบสของ16S rRNA พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท PA1-1 มีลักษณะต่าง ๆ ตรงกับแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท *Thermobifida fusca*

TAACTCCGGGTGTGCAGTGGATACGGGCAGGCTTGAGGTAGGCAGGGGAGACTGGA
ATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGG
CGGGTCTCTGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACTTTCC
ACGGTTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCT
TAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCACCGGTAATCCTCCA
GAGATGGGGGGTCCTTCGGGGATCGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC

ภาพที่ 9 ลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% Similarity) ของลำดับเบส 16S rRNA ระหว่างแบคทีเรียไอโซเลท PA 1-1 และแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท

สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงที่สุด	Accession No.	ความเหมือน	เบสที่แตกต่าง/เบสทั้งหมด
Thermobifida fusca gene	AB379661	100%	494/494
Uncultured bacterium	AM930291	99%	494/494
Thermobifida fusca EFTL17	FJ79901	99%	493/494
Thermobifida fusca	AM932257	99%	493/494
Thermobifida fusca YX	CP000088	99%	493/494

แอคติโนมัยซีทในจีนัส *Thermobifida* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ทนกรด (non-acid fast) จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Chemoorganotrophic ที่ต้องการอากาศ มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศจำนวนมาก และสร้างสปอร์ที่ทนความร้อน ก้านชูสปอร์แตกเป็นกิ่งก้านแบบสองทิศทางซึ่งจะมีกลุ่มของสปอร์หนาแน่นอยู่บนก้านชูสปอร์ ผนังเซลล์ประกอบด้วย diaminopimelic acid เป็นชนิด *meso-* (Chemotype III) มีกรดไขมันอิ่มตัวในกลุ่ม iso และ anteiso (กรดไขมันกลุ่ม 3e) ส่วนมากพบกรดไขมันอิ่มตัว phosphatidylethanolamine และ glycolipid type II แอคติโนมัยซีทในจีนัสนี้ทั่วไปคัดแยกได้จากดิน ปุ๋ยหมัก และซากพืชที่มีการย่อยสลายที่อุณหภูมิสูง มีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศน์และสิ่งแวดล้อมโดยสามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและย่อยสลายอินทรีย์วัตถุต่างๆ สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม glycoside hydrolase (เซลลูเลส และไซลาเนส) และขับออกนอกเซลล์ เอนไซม์ที่ผลิตได้มีคุณสมบัติทนความร้อน และทนพีเอชในช่วงกว้าง (4-10) ย่อยสลายเซลล์พืชได้หลายชนิดยกเว้นลิกนิน และเพคติน สามารถใช้น้ำตาลทั่วไปและกรดอินทรีย์ได้ จัดอยู่ในไฟลัม *Actinobacteria* เอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจาก *T. fusca* มีทั้งหมด 6 ชนิด โดยมีเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส หรือคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 4 ชนิด และเอนไซม์เอกโซเซลลูเลส หรือเอวิเซลเลส 2 ชนิด นอกจากนี้ยังสร้างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในสร้างเซลล์เพื่อย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคส เอนไซม์เซลลูเลสที่ขับออกนอกแซลล์จาก *T. fusca* มีบทบาทสำคัญในการประยุกต์ใช้เพื่อย่อยสลายชีวมวลทางการเกษตรในการผลิตน้ำตาล และเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Lykidis *et. al*., 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA-1 และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร Basal medium ชนิดต่างๆ

4.1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA-1 และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 1

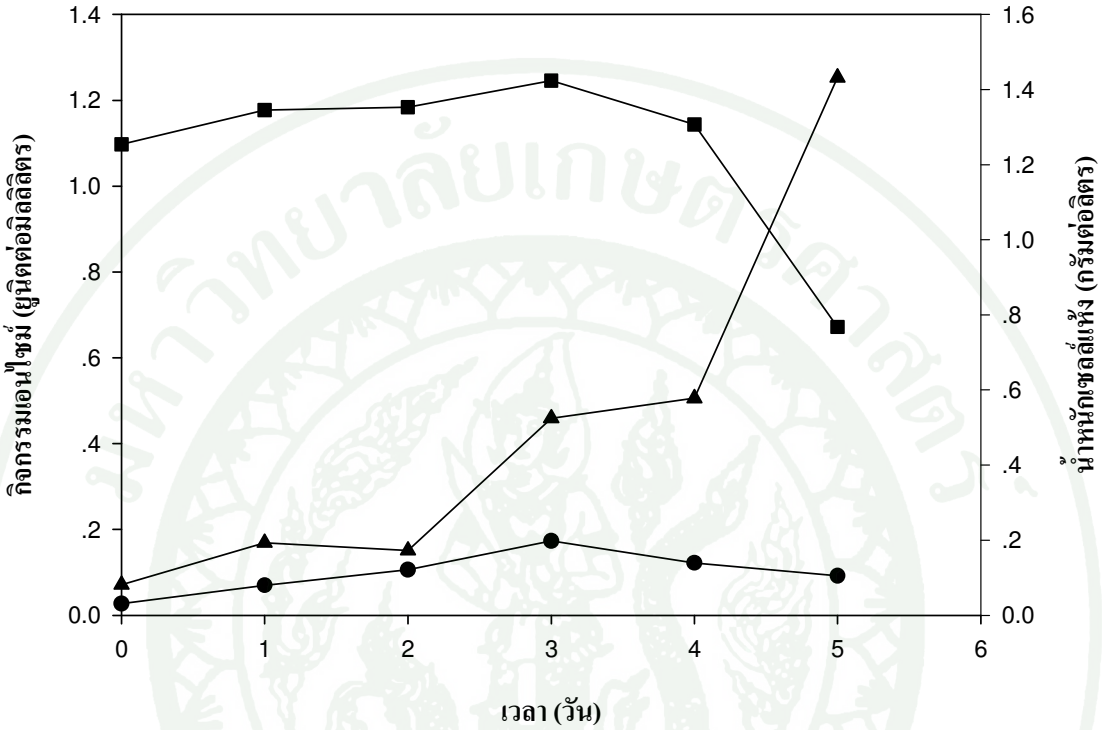
ศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร Basal medium ชนิดต่างๆ โดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งดัดแปลงจากสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแอคติโนมัยซีท *Thermomonospora* จำนวน 3 สูตร ได้แก่ 1. Ramachanda *et al.,*1988 2. Misha *et al*., 1984 และ 3. Lima *et al*., 2005

จากภาพที่ 10 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA-1 ในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 1 (Ramachanda *et al.,* 1988) ที่มี CMC 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุด ณ วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าเท่ากับ 1.424 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำหนักของเซลล์แห้งค่อยๆลดลง ณ วันที่ 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเริ่มขึ้นจากวันแรกการของเพาะเลี้ยงและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์วัดได้สูงสุดเท่ากับ 1.253 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสพบว่ามีระดับต่ำมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ซึ่งพบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 เพียง 0.173 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่าเป็นแบบไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non-growth association) ในขณะที่การผลิตเอนไซม์เอวิเซลเลสนั้นมีในระดับต่ำมาก จึงไม่สามารถอ้างได้ชัดเจนว่าความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์และการเจริญเติบโตเป็นแบบใด

รูปแบบการสร้างเอนไซม์ของ *T. fusca* PA 1-1 สอดคล้องกับการทดลองของ Tuncer *et. al.* (1999) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนโดไซลาเนสและเอนโดกลูคาเนสหรือคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermomonospora fusca* BD25 ด้วยการเติม oat-spelt xylan ปริมาณ 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารชนิดเดียวกัน พบว่าการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง วัดกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.53 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24-48 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 72

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลังจากนั้นการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 178 ซึ่งรูปแบบการผลิตเอนไซม์นั้นเป็นแบบไม่สัมพันธ์กับการเจริญเช่นกัน



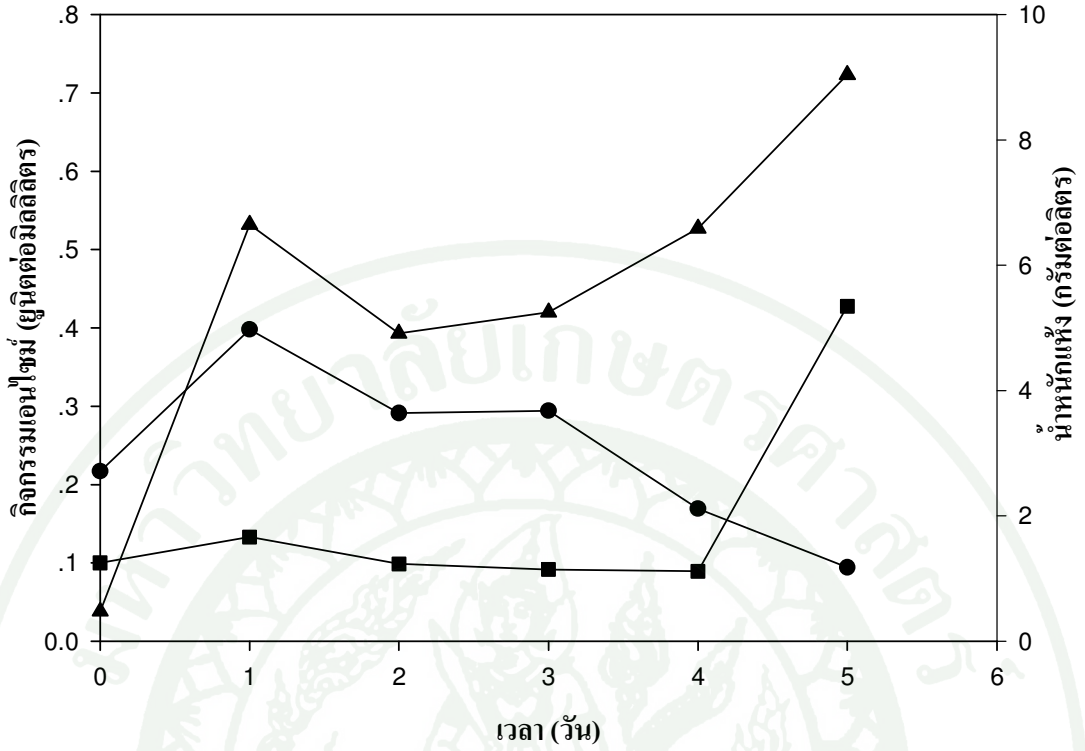
ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 1 (Ramachanda *et al.,* 1988) ที่มี CMC 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง (-■-) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-▲-) และเอนไซม์เอวิเซลเลส (-●-)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA-1 ในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 2

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA-1 ในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 2 (Misha *et al.* 1984) ที่มี CMC 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งค่อนข้างคงที่แต่วันที่ 1 ถึง 4 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีค่าสูงสุด ณ วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง วัดค่าน้ำหนักแห้งได้เท่ากับ 5.343 กรัมต่อลิตร พบว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสร้างขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2 ถึง 5 ของการเพาะเลี้ยงและสัมพันธ์กับการเจริญ วัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากที่สุดในวันที่ 5 เท่ากับ 0.723 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับเอนไซม์เอวิเซลเลสนั้นเริ่มมีการผลิตหลังจากวันแรกของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน และมีค่าสูงสุดในวันที่ 1 เท่ากับ 0.398 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 2 จนถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า การผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นสัมพันธ์กับการเจริญ (growth association) ดังแสดงในภาพที่ 11 รูปแบบการสร้างเอนไซม์สอดคล้องกับการทดลองของ George *et al.* (2001) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermomonospora* sp. ในอาหาร Basal medium ชนิดเดียวกันและเติม cellulose paper powder (CPP) ปริมาณ 4% เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์เป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญ วัดการเจริญทางอ้อมจากโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์พบว่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 และมีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในชั่วโมงเดียวกันเท่ากับ 23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



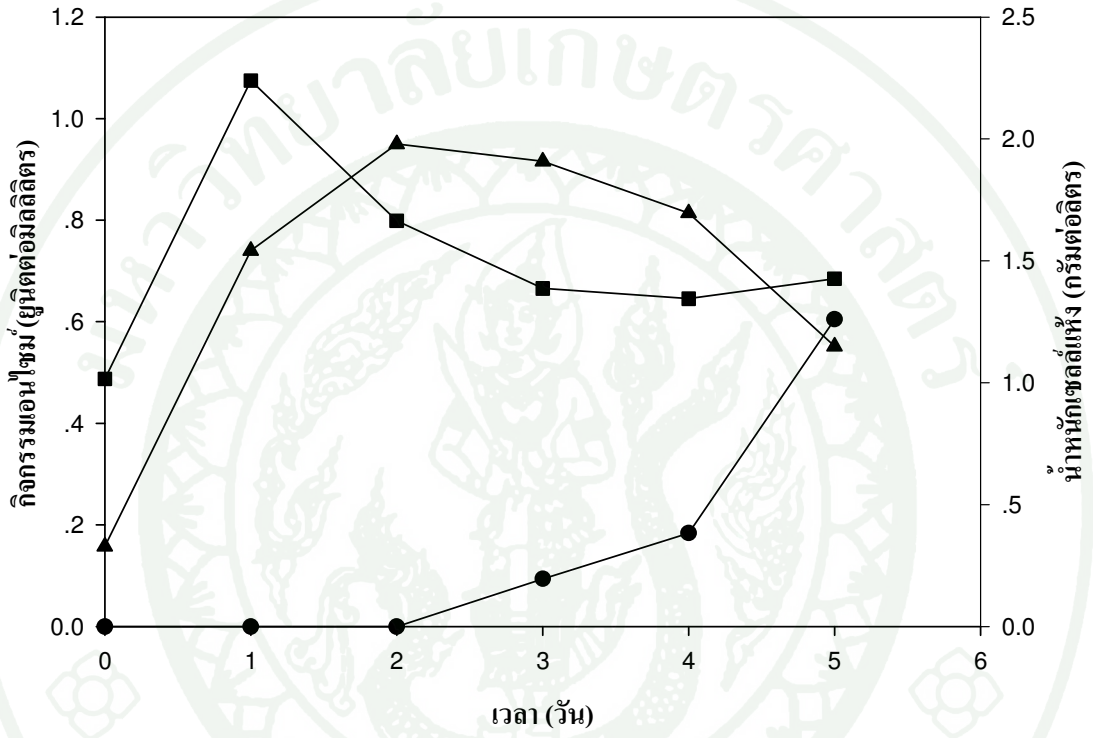
ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 2 (Misha *et al*. 1984) ที่มี CMC 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง (-■-) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-▲-) และเอนไซม์เอวิเซลเลส (-●-)

4.3 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA-1 ในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3

จากภาพที่ 12 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *T. fusca* PA1-1 ในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 (Lima *et al*., 2005) โดยเติม CMC 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และวัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้สูงสุดในวันที่ 1 เท่ากับ 2.239 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นน้ำหนักของเซลล์แห้งจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และ 3 ของการเพาะเลี้ยงจนเริ่มคงที่ถึงวันที่ 5 ในขณะที่การผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเริ่มขึ้นหลัง 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 2 โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นกิจกรรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของเอนไซม์เริ่มลดลงจนถึงวันที่ 5 ขณะที่เอนไซม์เอวิเซลเลสนั้นเริ่มมีการผลิตในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 5 และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.605 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสองเป็นแบบไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non-growth association)



ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 3 (Lima *et al*., 2005) ที่มี CMC 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง (-■-) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-▲-) และเอนไซม์เอวิเซลเลส (-●-)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รูปแบบการสร้างเอนไซม์สอดคล้องกับการทดลองของ Lima *et. al*. (2005) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในสูตรอาหาร Basal medium ชนิดเดียวกันจาก *Streptomyces drooozdowizii* ที่เติม CMC 1% และยีสต์สกัด 0.3% เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสนั้นเป็นแบบไม่สัมพันธ์กับการเจริญ โดยน้ำหนักแห้งจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 0 จนถึง 1 และสูงสุดวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นเซลล์แห้งลดลงและคงที่จนถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง วัดกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้เท่ากับ 595 ยูนิตต่อลิตร

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร Basal medium ทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้เป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีทเพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ นั้น จากผลการทดลองเห็นได้ว่ารูปแบบการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 1 และ 3 เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อสันนิษฐานของ Lynd *et. al*. (2002) ที่ได้รวบรวมข้อมูลว่าในกลุ่มของแบคทีเรียแบบใช้อากาศที่คัดแยกจากดินหรือแหล่งที่มีการทับถมของเศษชีวมวลต่างๆ และมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสนั้น มักมีรูปแบบการสร้างเอนไซม์ที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ หรือมีกระบวนการเมตาบอลิซึมแบบทุติยภูมิ (secondary metabolism) รวมทั้งยังมีระยะพักตัว (resting state) ที่แตกต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ การเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของเอนไซม์ซึ่งพบหลังจากที่เซลล์มีการเจริญสูงสุดนั้นเป็นไปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นขึ้นจากการย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ได้แก่ โอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลต่างๆ เช่น น้ำตาลเซลโลไบโอส ที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจากที่เซลล์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต จะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลส ข้อสันนิษฐานดังกล่าวตรงกับการทดลองของ Lin and Wilson (1987) ที่ศึกษารูปแบบการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* XY โดยใช้เซลลูโลส 0.2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีการเหนี่ยวนำให้สร้างมากขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากที่เซลล์มีการเจริญได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 18 และในชั่วโมงต่อมาพบว่าการสร้างเอนไซม์มีมากอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 48 แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในกรณีของการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสใน Basal medium ชนิดที่ 2 นั้น มีรูปแบบการสร้างเอนไซม์ที่สัมพันธ์กับการเจริญ สันนิษฐานว่าการผลิตเอนไซม์ที่เกิดขึ้นอาจสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหาร โดยนอกจากคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วใน Basal medium ชนิดที่ 2 ยังมีการเติมมอลต์สกัดซึ่งมีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 7% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก นอกจากนี้ยังพบคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่มีมากถึง 91% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่ และโอลิโกแซคคาไรด์ ในจำนวนนี้มีน้ำตาลโมเลกุลคู่สูงถึง 42-43 % โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และพบน้ำตาลมอลโตสสูงถึง 42% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (Fluckiger-Isler *et al*., 1994) น้ำตาลมอลโตสนั้นถือเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกแหล่งหนึ่ง และอาจเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้พร้อมๆ กับการเจริญของเซลล์ตามข้อสันนิษฐานข้างต้นที่ว่าโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลต่างๆ จะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส รูปแบบการสร้างเอนไซม์ที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Lin and Wilson (1987) ที่พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลเซลโลไบโอสปริมาณ 0.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน การสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจาก *T. fusca* XY จะเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเจริญอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเมื่อพิจารณาโครงสร้างของน้ำตาลมอลโตสแล้วมีลักษณะเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่คล้ายกับเซลโลไบโอส แต่โมเลกุลระหว่างน้ำตาลกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะ $\alpha(1\longrightarrow4)$ จึงอาจเป็นไปได้ว่ารูปแบบการสร้างเอนไซม์ในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 2 จะคล้ายคลึงกับการทดลองดังกล่าว

เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบที่มีอยู่ใน Basal medium ชนิดต่างๆ นั้นล้วนส่งผลต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้เช่นกัน เมื่อพิจารณาองค์ประกอบในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 2 แล้วจะพบว่าองค์ประกอบที่เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นมีมากถึง 3 แหล่ง ได้แก่ ยีสต์สกัด มอลต์สกัด และเปบโตน ซึ่งมากกว่าแหล่งไนโตรเจนในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 1 และ 3 ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพียงแหล่งเดียวจากยีสต์สกัด และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์จากแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมไนเตรทตามลำดับ พบว่าการจำกัดแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมีผลในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* XY แต่ผลของการจำกัดแหล่งฟอสฟอรัสนั้นมีไม่มากเท่าการจำกัดแหล่งไนโตรเจน (Lin and Wilson, 1987) จึงอาจเป็นไปได้ว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีมากถึง 3 แหล่งใน Basal medium ชนิดที่ 2 นั้นอาจเหนี่ยวนำให้การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิดได้ไม่ดีเท่ากับอาหาร Basal medium ชนิดที่ 1 และ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสร้างเอนไซม์สองชนิดจาก *T. fusca* PA 1-1ในอาหารทั้ง 3 ชนิดพบว่า เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์เอวิเซลเลส จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส *T. fusca* มีบริเวณ catalytic domain ทั้งหมดจำนวน 4 แฟมิลี ได้แก่ 5, 6, 9 และ 48 โดยในกลุ่มแฟมิลีที่ 6 และ 9 พบการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลส ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสนั้นมีทั้งหมด 6 ยีน แบ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ Cel 5A, Cel 6A, Cel 9A และ Cel 9B และยีนที่สร้างเอนไซม์เอวิเซลเลส 2 ยีน ได้แก่ Cel 6B และ Cel 48A โดยเอนไซม์ที่สร้างจากยีน Cel 9A นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในแฟมิลี 48 จะเข้าไปจับที่ปลายรีดิวซ์ซิ่งของโมเลกุลเซลลูโลส ในขณะที่เอนไซม์ในแฟมิลี 6 จะเข้าไปจับกับบริเวณนอนรีดิวซิ่ง เอนไซม์เอกโซกลูคาเนสที่มาจากแฟมิลิต่างกันเท่านั้นที่ทำให้เกิดการทำงานแบบเสริมกัน (Synergism) (Wilson, 2004) เอนไซม์เอวิเซลเลสนั้นเป็นเอนไซม์ที่จำกัดอัตราการย่อยโมเลกุลในธรรมชาติ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อเซลลูโลสที่มีการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบสูง สันนิษฐานได้ว่าปริมาณการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสจึงมีน้อยกว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จากเอกสารวิชาการในปัจจุบันพบว่าในกลุ่มของแบคทีเรียที่ใช้ทั้งหมดมีเพียง *T. fusca* และ *Cellulomonas fimi* เท่านั้นที่พบกิจกรรมของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสและมีการศึกษาถึงในระดับโมเลกุล

พิจารณาการสร้างเอนไซม์จากสูตรอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่าการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสใน Basal medium ชนิดที่ 1 สูงสุด แต่เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่สร้างในอาหารชนิดที่ 1 นั้นมีค่ากิจกรรมมากกว่าในอาหารชนิดที่ 3 เพียง 0.303 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลสในอาหารชนิดที่ 3 สูงกว่าอาหารชนิดที่ 1 ถึง 3 เท่า การเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 อาจเป็นผลจากในสูตรอาหารดังกล่าวนั้นมีแหล่งฟอสฟอรัสจำนวน 2 แหล่ง ได้แก่ โพแทสเซียมไฮ-ไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ในขณะที่ในอาหารสูตรที่ 1 ไม่มีการเติมแหล่งฟอสฟอรัสใดๆ ลงในอาหาร ซึ่งแหล่งของฟอสเฟตนั้นมีผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* XY (Lin and Wilson, 1987) ดังที่กล่าวข้างต้นเช่นกัน ถึงแม้ว่าการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสจะมีปริมาณต่ำ แต่เอนไซม์ชนิดนี้ถือเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นระเบียบ โดยจะย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสที่อยู่ชั้นนอกสุดและเหนี่ยวนำให้สายน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ชั้นในเกิดความไม่เป็นระเบียบ ส่งผลให้เอนไซม์ชนิดอื่นที่เหมาะสม เช่น เอนโดกลูคาเนส เข้าย่อยสลายได้ต่อไป (Terri, 1997; จารุ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วรรณ, 2548) ดังนั้น Basal medium ชนิดที่ 3 จึงมีความเหมาะสมเบื้องต้นในการนำไปศึกษาการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดในลำดับต่อไป

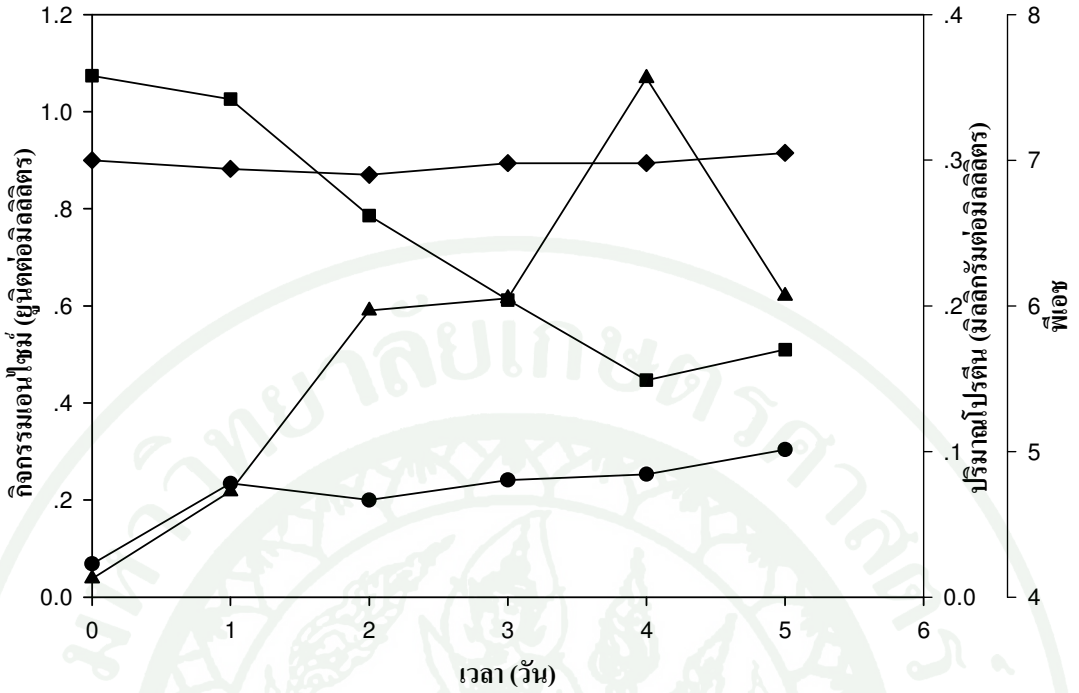
5. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

5.1 การศึกษาการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสโดยใช้ยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจน

ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลส โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ยีสต์ขนมปัง (baker yeast) เปปโตน (peptone) และ สารสกัดมอลต์ (malt extract) เทียบกับการใช้สารสกัดยีสต์ (yeast extract) จากการทดลองข้างต้น (ข้อ 4.3) ที่ความเข้มข้น 1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 เป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เอวิเซลเลส ปริมาณโปรตีน น้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอช

ผลการทดลองเมื่อใช้ยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง วัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.218 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ในช่วงวันที่ 2 และ 3 ของการเพาะเลี้ยง วัดกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 1.069 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสเริ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง ในวันที่ 5 วัดกิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลสได้สูงสุดท่ากับ 0.304 ยูนิตรต่อมิลลิลิตร ขณะที่พีเอชในน้ำหมักค่อนข้างคงที่โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.90-7.05 ขณะที่การเจริญในอาหารดังกล่าวไม่สามารถวัดได้โดยตรง เนื่องจากยีสต์ขนมปังละลายน้ำไม่สมบูรณ์ จึงเหลือตะกอนบางส่วนที่ปะปนมากับเซลล์ภายหลังการปั่นเหวี่ยง ดังนั้นจึงเลือกวัดปริมาณโปรตีนในน้ำหมักจากส่วนใสด้วยชุดวัดโปรตีนสำเร็จรูป (Biorad) ด้วยวิธี Bradford (1976) พบว่าโปรตีนที่วัดได้มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 5 ปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่วัดได้ในวันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 0.149 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารทั้งสองชนิดนั้นพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน การใช้ยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ใกล้เคียงกับยีสต์สกัด ซึ่งมีค่าสูงกว่าเพียง 0.119 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 13

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 3 ที่มี CMC 1% (w/v) และยีสต์ขนมปัง 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาปริมาณโปรตีน (-■-) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-▲-) เอนไซม์เอวิเซลเลส (-●-) และพีเอช (- ◆)

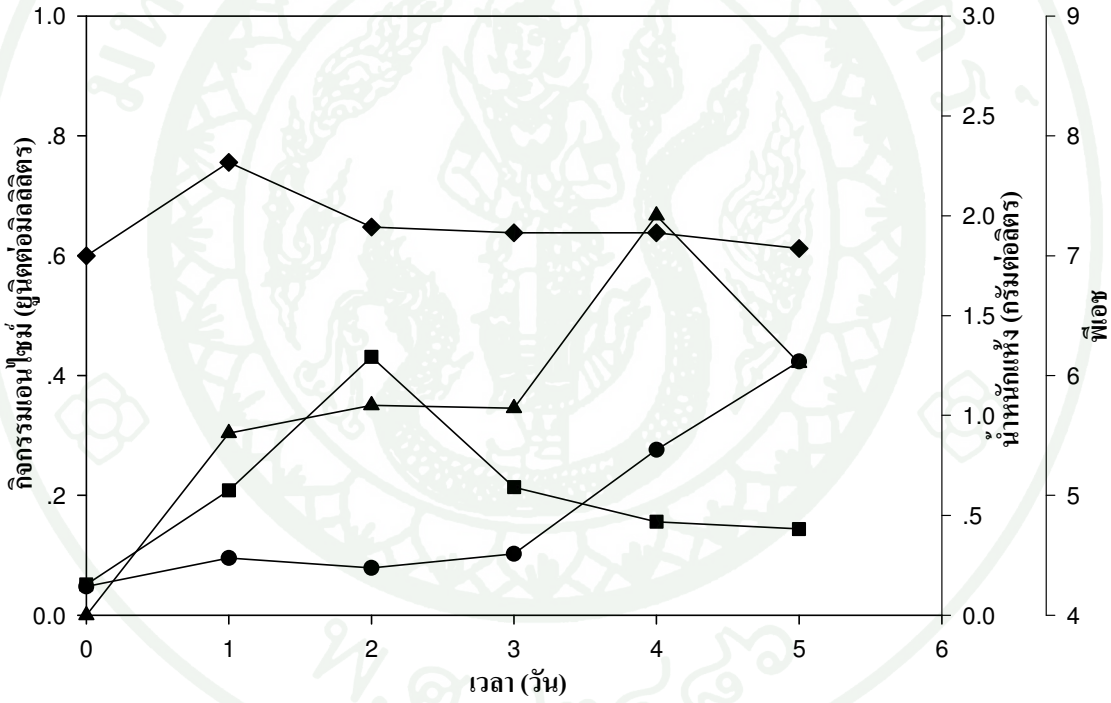
5.2 การศึกษาการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสโดยใช้เปบโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน

การใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซี-เมทิลเซลลูเลสได้คล้ายคลึงกับการใช้ยีสต์ขนมปัง วัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้สูงสุดในวันที่ 2 ของการเจริญเท่ากับ 1.293 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำหนักแห้งลดลงในวันที่ 3 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง การสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 3 จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและวัดกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับเท่ากับ 0.689 ยูนิตรต่อมิลลิลิตร เอนไซม์เอวิเซลเลสเริ่มขึ้นในวันที่ 3 ของเพาะเลี้ยง และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 5 ซึ่งวัดกิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลสได้สูงสุดเท่ากับ 0.423 ยูนิตรต่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิลลิลิตร และพีเอชในน้ำหมักค่อนข้างคงที่การเพาะเลี้ยง มีค่าอยู่ระหว่าง 7.0-7.8 ดังแสดงในภาพที่ 14

กิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่สร้างขึ้น โดยใช้เปบโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีค่าต่ำกว่าการใช้ยีสต์ขนมปังเป็นแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.380 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสได้ใกล้เคียงกัน การเติมเปบโตนเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสได้สูงกว่าเล็กน้อยเท่ากับ 0.129 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รูปแบบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิดเป็นแบบไม่สัมพันธ์กับการเจริญเช่นเดียวกับการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่3 ที่มี CMC 1% (w/v) และเปบโตน 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง (-■-) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-▲-) เอนไซม์เอวิเซลเลส (-●-) และพีเอช (-◆-)

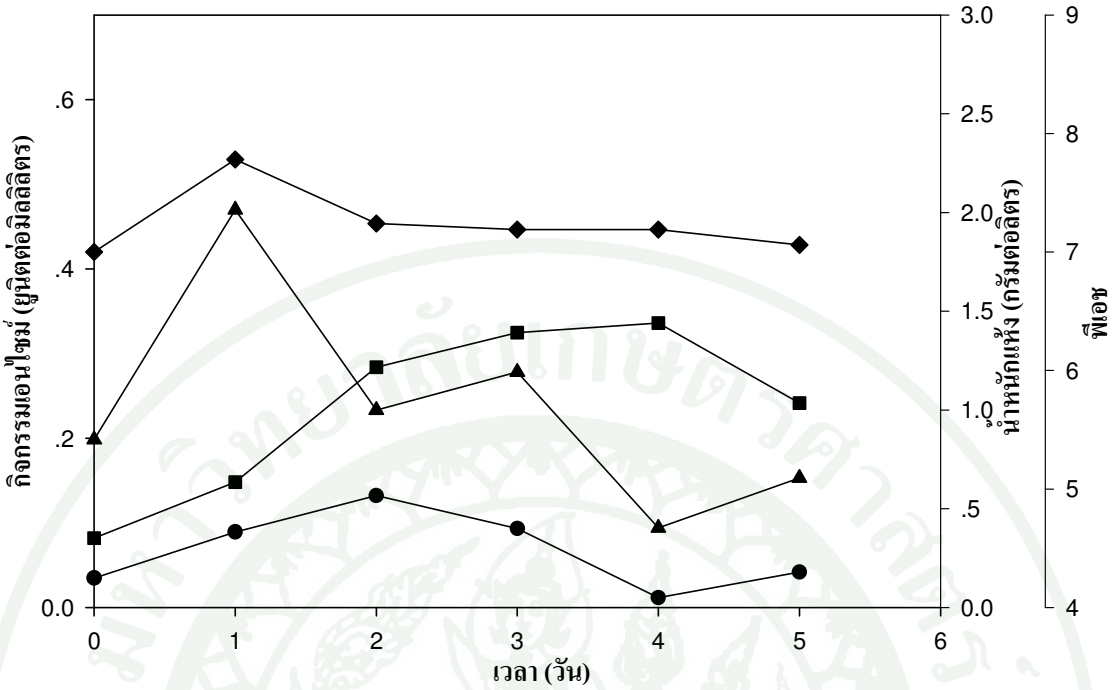
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3 การศึกษาการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสโดยใช้มอลต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

การใช้มอลต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ในระดับต่ำที่สุด โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดในวันแรกเท่ากับเท่ากับ 0.470 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของวันแรก เท่ากับ 0.233 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากวันแรกจนถึงวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 4 ซึ่งมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 1.44 กรัมต่อลิตร การสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสพบว่ามีค่าต่ำมากตลอดการทดลอง ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์วัดได้สูงสุดเพียง 0.132 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง เบื้องต้นสันนิษฐานว่ารูปแบบการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญ ในขณะที่ไม่สามารถระบุได้ว่าการสร้างเอนไซม์เอวิเซลเลสเป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญหรือไม่เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่สร้างมีปริมาณน้อยมาก พีเอชในน้ำหมักค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 6.6-7.0 ดังแสดงในภาพที่ 15

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่เหนี่ยวนำด้วยการใช้แหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิดพบว่า เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสร้างออกมามากที่สุดในอาหารที่เติมยีสต์ขนมปังซึ่งใกล้เคียงกับการใช้ยีสต์สกัด รองลงมาเป็นการใช้เปบโตน และการเหนี่ยวนำพบว่าน้อยที่สุดเมื่อใช้มอลต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับกับการศึกษาของ Khadiga *et. al*. (2009) ที่ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Bacillus alcalophilus* S39 และ *B. amyloliquefaciens* C2 จากผลการทดลองพบว่ายีสต์สกัดสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ได้ดีกว่าการใช้เปปโตน beef extract และแอมโมเนียมคลอไรด์ George *et. al*. (2001) ศึกษาการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Thermomonospora* sp. พบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสได้มากกว่าการใช้เปบโตน และ soymeal ตามลำดับ เป็นที่สังเกตว่าผลการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดจากการใช้มอลต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอยู่ในระดับต่ำและเป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2 ซึ่งข้อสันนิษฐานดังกล่าวนั้นสอดคล้องกับการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส ที่พบว่าเซลลูโลสเป็นสารเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยมีน้ำตาลเซลโลไบโอสเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ (Lynd *et al*., 2002; Zhang *et al*., 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสูตรอาหารที่ 3 ที่มี CMC 1% (w/v) และมอลต์สกัด 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง (-■-) กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-▲-) เอนไซม์เอวิเซลเลส (-●-) และพีเอช (-◆-)

เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของมอลต์สกัดจะมีน้ำตาลมอลโตสมากถึง 42 % โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตสเท่ากับ 9 %, 1.2 % และ 1% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ (Iseler *et al*., 1994) แต่เมื่อพิจารณาโครงสร้างของน้ำตาลมอลโตสพบว่าเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เกิดจากการเชื่อมกันของน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล ด้วยพันธะ $\alpha(1\longrightarrow4)$ ซึ่งคล้ายกับน้ำตาลเซลโลไบโอสที่ประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคส 2 โมเลกุลเช่นกัน แต่เชื่อมกันด้วยพันธะ $\beta(1\longrightarrow4)$ จึงเป็นไปได้ว่าในอาหารที่เติมมอลต์สกัดอาจมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส การศึกษาของ Lin and Wilson (1987) พบว่าน้ำตาลทั้งชนิดรีดิวซ์และนอนรีดิวซ์มีผลในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจาก *T. fusca* XY โดยน้ำตาลกลูโคสมีผลในการยับยั้งมากที่สุดซึ่งใกล้เคียงกับน้ำตาลเซลโลไบโอส รองลงมาเป็นน้ำตาลไซโลส มอลโตส และกาแลคโตสตามลำดับ ผลการทดลองของ Wang *et. al*. (1998) ที่ศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในรา *Trichoderma koningii* G-39 พบว่าเซลโลไบโอสแสดงการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเล็กน้อย ในขณะที่น้ำตาล sopharose เอวิเซล และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์เหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่า และมีรายงานเกี่ยวกับการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในราจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมเลกุลคู่ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่ายในกระบวนการเมตาบอลิซึม (Suto และ Tomita, 2001)

การสร้างเอนไซม์เซลลูเลสใน *T. fusca* PA 1-1 พบว่าเกิดจากการเหนี่ยวนำของน้ำตาลเซลโลไบโอส ในทางตรงกันข้ามถ้ามีปริมาณน้ำตาลเซลโลไบโอสมากเกินไปมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้เช่นกัน (Zhang *et al*., 2006) ขณะที่น้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่ามีผลในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ (Spiridonov and Wilson, 1999) โดยกลไกดังกล่าวมีความสัมพันธ์จากการสังเคราะห์โปรตีนและการทรานสคริปชันของยีน Cel5A (Lin and Wilson, 1988) การเพาะเลี้ยง *T. fusca* ในอาหารที่เติมเซลลูโลสและน้ำตาลเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าน้ำตาลเซลโลไบโอสเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (Chen and Wilson, 2007) การสร้างเอนไซม์เอนโดเซลลูเลสและเอกโซเซลลูเลสมีกลไกต่างกัน การเหนี่ยวนำพบในเอนไซม์เอกโซเซลลูเลสสูงกว่าในเอนโดเซลลูเลส (Spiridonov and Wilson, 2001)

นอกจากนี้การเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* XY ยังมีผลมาจากการจำกัดแหล่งไนโตรเจนเช่นกัน (Lin and Wilson, 1987) เมื่อพิจารณาส่วนประกอบที่มีอยู่ในยีสต์สกัดและเปบโตนพบว่า ในยีสต์สกัดจะมีส่วนประกอบที่เป็นไนโตรเจนเท่ากับ 98 มิลลิกรัมต่อกรัม ในขณะที่เปบโตนจากแหล่งต่างๆ ทั้งในเนื้อสัตว์ ปลา และเคซีนมีปริมาณไนโตรเจนประมาณ 118-120 มิลลิกรัมต่อกรัม (Lischig, 1998) ด้วยปริมาณไนโตรเจนในยีสต์สกัดที่มีน้อยกว่าในเปบโตนนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าการใช้เปบโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนในเปบโตนมีทั้งหมด 17 ชนิด โดยมีกรดอะมิโนชนิดที่มีวงอะโรมาติก ได้แก่ ฟีนิลอะลานีลและไทโรซีน (Gray *et al*., 2006) ในขณะที่ยีสต์สกัดมีกรดอะมิโนทั้งหมด 16 ชนิด โดยมีกรดอะมิโนชนิดที่มีวงอะโรมาติก ได้แก่ ฟีนิลอะลานีลและไทโรซีนเช่นกัน (Edens *et al*., 2002) ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความสำคัญเพื่อเป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับแอคติโนมัยซีทและมีราคาค่อนข้างสูง (Lima *et al*., 2005) ในงานวิจัยครั้งนี้จึงทดลองใช้ยีสต์ขนมปังซึ่งมีราคาถูกเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน รวมถึงเปบโตนและมอลต์สกัดซึ่งนิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับแอคติโนมัยซีทเช่นกัน ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของยีสต์ขนมปังซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้เทียบเท่ากับการใช้ยีสต์สกัด ดังนั้นยีสต์ขนมปังจึง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นทางเลือกที่อาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อผลิตเอนไซม์ในอนาคต ซึ่งอาจลดต้นทุนด้านการผลิตได้มากขึ้น

6. การศึกษาลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

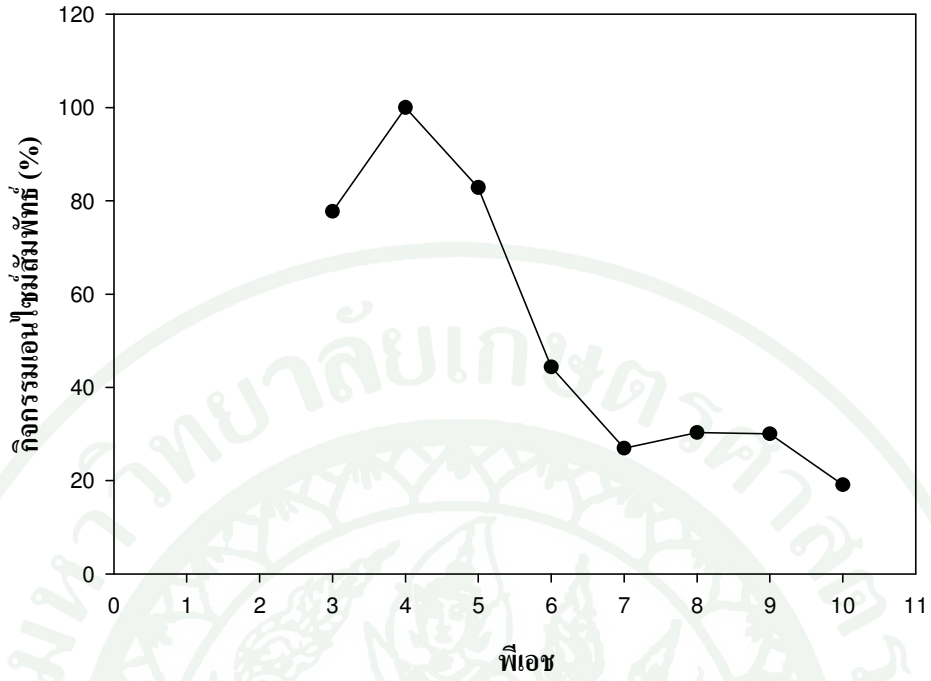
6.1 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

การศึกษาช่วงของพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่แปรค่าพีเอชต่างๆ คือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 โดยใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 3.0-6.0 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 6.0-8.0 ใช้สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 8.0-9.0 และใช้สารละลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 9.0-10ใจ ทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยแปรค่าอุณหภูมิในช่วงต่างๆ ได้แก่ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส

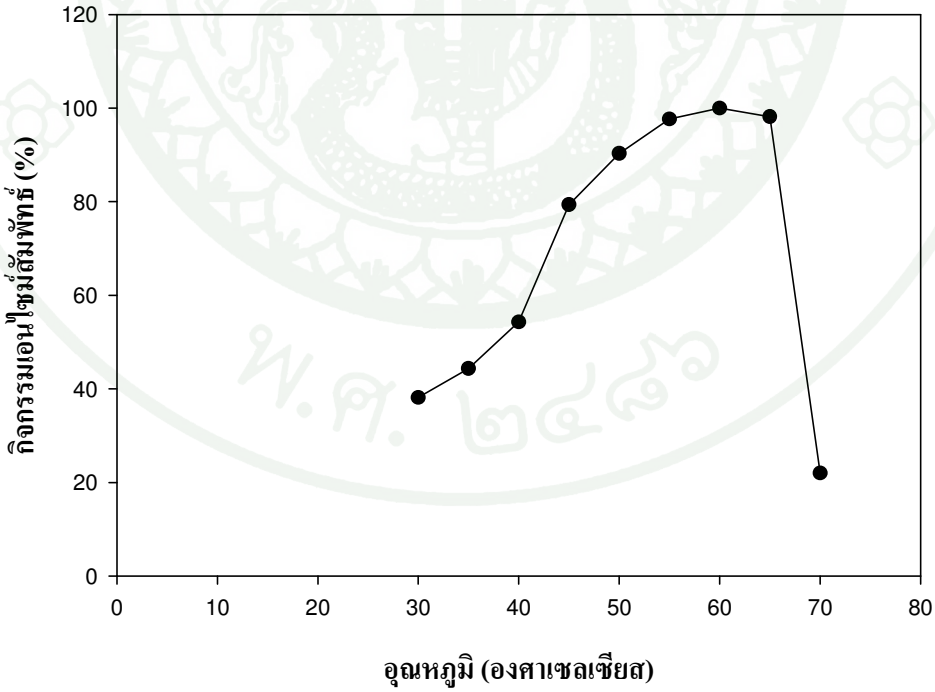
จากภาพที่ 16 เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 4.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์ลดลงเท่ากับ 82.87 เปอร์เซ็นต์เมื่อพีเอชมีค่าเท่ากับ 5 และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อพีเอชเท่ากับ 7.0 เท่ากับ 26.97 เปอร์เซ็นต์ และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ต่ำสุดเท่ากับ 19.10 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 10.0

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสแสดงดังภาพที่ 17 กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์เหลืออยู่เท่ากับ 98.17 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าต่ำสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 21.99 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส



ภาพที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่เสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

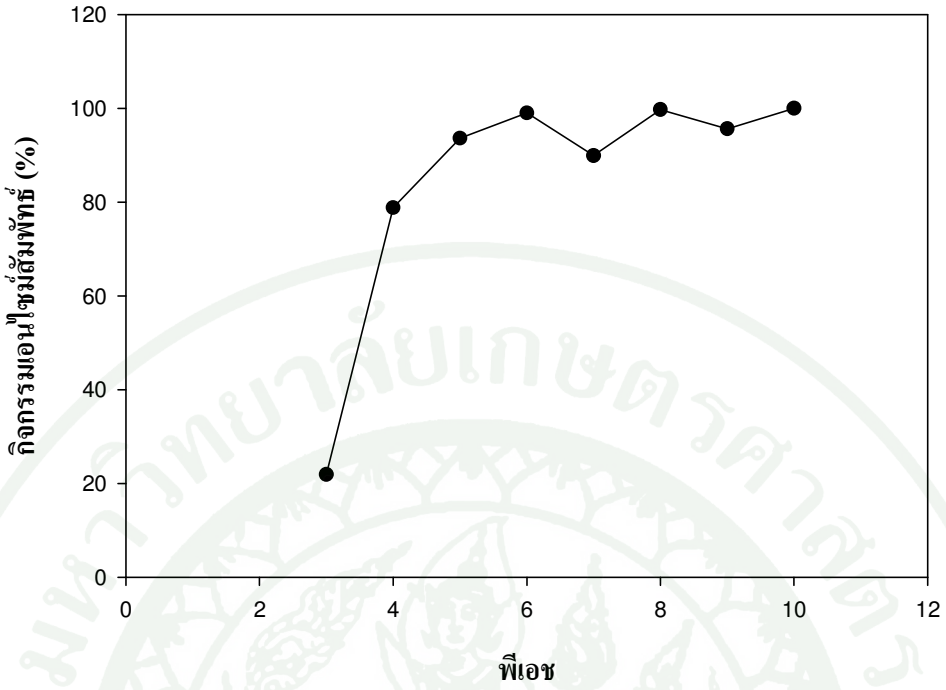
การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่างๆ ทำได้โดยเจือจางสารละลายเอนไซม์ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุมพีเอช 3.0-6.0 และเจือจางสารละลายเอนไซม์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ควบคุมพีเอชในช่วง 6.0-8.0 ใช้สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 8.0-9.0 และใช้สารละลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ควบคุมพีเอชในช่วง 9.0-10.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 6.1

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ทำได้โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 6.1

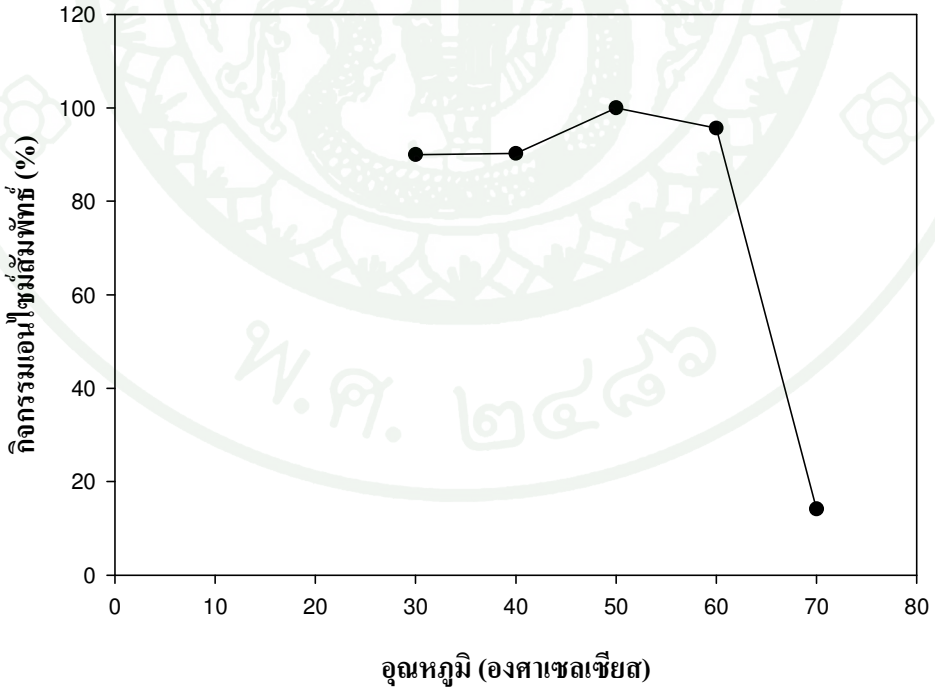
ความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสพบในช่วงพีเอชกว้างเท่ากับ 4.0-10.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงพีเอช 5.0-10.0 กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่าเหลืออยู่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีความเสถียรสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ที่พีเอชเท่ากับ 10 ดังภาพที่ 18

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์แสดงในภาพที่ 19 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเหลืออยู่มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์ลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 14.15 เปอร์เซ็นต์ โดยเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสมีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 ผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส



ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ทำงานได้ดีที่พีเอชในช่วงกรดเล็กน้อย และช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ค่อนข้างสูงปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ George *et al*. (2000) ที่ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *Thermomonospora* sp. ภายหลังทำให้บริสุทธิ์โดยการทำเอนไซม์ให้เข้มข้น ผ่านคอลัมน์ cellulose affinity และ gel filtration พบว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ได้ทำงานได้ดีที่พีเอช 5 และเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายหลังบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหลือมากกว่า 60% เมื่อเวลาผ่านไป 7 ชั่วโมง เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้างตั้งแต่ 6-10 ซึ่งวัดกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ได้มากกว่า 70% เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่สร้างจาก *Streptomyces drozdowizii* พบว่าทำงานได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 5 และมีความเสถียรในพีเอชช่วงกว้าง โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์ได้มากกว่า 50% ในช่วงพีเอช 3.0-10.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงที่เท่ากับ 100 % เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Lima *et al*., 2005)

เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจาก *Thermomonospora* sp. เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์พบว่าทำงานได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 8.0 และมีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง (4.0-10.0) กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Anish *et al*., 2006) ในขณะที่เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากการศึกษาของ Hagerdal *et al*. (1980) พบว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สร้างจาก *T. fusca* ทนความร้อนสูงและเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง (4.0-10.0) จึงเป็นข้อได้เปรียบต่อเอนไซม์ที่สร้างจากราซึ่งมีความเสถียรในช่วงพีเอชแคบกว่า (Wilson, 2004; Lykidis *et al*., 2007) ซึ่งถ้ามีการพัฒนาปรับปรุงการผลิตได้เพิ่มมากขึ้นน่าจะสามารถนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมจริงได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 บนเครื่องเขย่า โดยวิธีการหาพื้นผิวการตอบสนอง (Response Surface Methodology)

การผลิตเอนไซม์ใน *T. fusca* ส่วนมากมุ่งเน้นไปที่การศึกษาในระดับโมเลกุลเพื่อควบคุมและเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในขณะที่การศึกษาพื้นฐานเกี่ยวกับสภาวะการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีจำนวนไม่มากนัก การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่ทำให้ทราบข้อมูลสำคัญในการพัฒนาปรับปรุงเพื่อการผลิตระดับใหญ่ต่อไป ค่าพีเอชและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ของแบคทีเรีย การลำเลียงสารเข้าออกและเมแทบอลิซึมของเซลล์ (มลนพรรษ, 2551) โดยพีเอชและอุณหภูมิมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์กล่าวคือ พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะมีผลต่อการแตกตัวของไอออน (ionization) ของ prototropicgroup ซึ่งได้แก่หมู่เคมีในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ส่งผลให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาและการจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น และอุณหภูมิยังเป็นตัวช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ที่โมเลกุลของสารปฏิกิริยา เกิดการชนกันมากขึ้นต่อหน่วยเวลา ดังนั้นอุณหภูมิจึงเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ให้เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (กฤษดากร, 2549 และ ปราณี, 2547) จากการศึกษาของ Tuncer *et al.* (1999) พบว่าสภาวะในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูเลสจาก *T. fusca* BD 25 เหมาะสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 7.0-8.0

วิธีทดลองแบบเดิมที่ศึกษาแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์นั้นทำให้ไม่สามารถทราบความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์และสภาวะเหมาะสมที่แท้จริงของการทดลองได้ (มลนพรรษ, 2551) ด้วยเหตุนี้การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 บนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ จึงเลือกใช้วิธีการหาพื้นผิวการตอบสนอง โดยวิธีออกแบบการทดลอง full factorial design การศึกษาของ Bocchini *et al.* (2002) ได้ออกแบบการทดลอง 3^3 full factorial design และใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยพื้นผิวตอบสนองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูเลสจาก *B. circulan* D1 โดยศึกษาจากปัจจัยที่มีอิทธิพล ได้แก่ ปริมาณไซแลนเริ่มต้น พีเอช และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าพีเอชไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรมพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 19.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองจริงที่มีค่าเท่ากับ 22.45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อให้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งหมดที่มีต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์ทั้งหมด 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส, X_1) และค่าพีเอชเริ่มต้น(พีเอช, X_2) โดยมีจำนวนปัจจัยละ 4 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 มีจำนวนชุดการทดลองทั้งหมด 18 ชุดการทดลอง ซึ่งเพิ่มการทดลองในสภาวะที่อุณหภูมิ 50 พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 จำนวน 2 ชุดการทดลองเพื่อลดความผิดพลาด (error) ที่เกิดขึ้นจากการทดลอง แสดงค่าของตัวแปรอิสระของแต่ละการทดลองในรูปของรหัสมิติ (dimensionless codes, Xi) และปัจจัยของการทดลอง ดังตารางที่ 8 ทำการทดลองผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่สภาวะต่าง ๆ ทั้ง 18 ชุดการทดลอง โดยกำหนดความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 5% และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการทดลองทั้ง 18 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 7) ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้ multiple regression analysis (SPSS 11.5) ได้ค่าต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 8

จากตารางที่ 8 จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์กับปัจจัยที่นำมาศึกษา (อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงและค่าพีเอชเริ่มต้น) ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และนำมาสร้างตัวแบบของสมการถดถอย โดยมีสมการดังนี้

$$\textbf{CMCase activity (Y)} = -7.344 + 0.038X_1 + 1.673X_2 + 0.009X_1X_2 - 0.001X_1^2 - 0.127X_2^2 \qquad (1)$$

เมื่อ Y= กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลิลิตร)

X_1 = อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง (องศาเซลเซียส)

X_2 = พีเอชเริ่มต้น (pH)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที

การทดลองที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
1	40	6.0	0.0905
2	30	6.0	0.0800
3	50	7.0	0.7214
4	60	6.0	0.0557
5	40	7.0	0.1531
6	30	7.0	0.3654
7	40	9.0	0.3978
8	50	8.0	0.9824
9	60	8.0	0.6368
10	30	8.0	0.1044
11	50	9.0	0.8745
12	50	6.0	0.0974
13	60	7.0	0.5869
14	60	9.0	0.7340
15	40	8.0	0.4906
16	30	9.0	0.1032
17	50	8.0	1.0230
18	50	8.0	1.0717

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ค่าประมาณและการทดสอบสัมประสิทธิ์รีเกรชชั่นของสมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

พารามิเตอร์	ค่าประมาณ	*p*-value
Constant	-7.344	0.027
X_1	0.038	0.463
X_2	1.673	0.036
X_1X_2	0.009	0.043
X_1^2	-0.001	0.093
X_2^2	-0.127	0.016

โดย ค่าตอบสนอง คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (CMCase activity)
R-squared (R^2) = 0.806

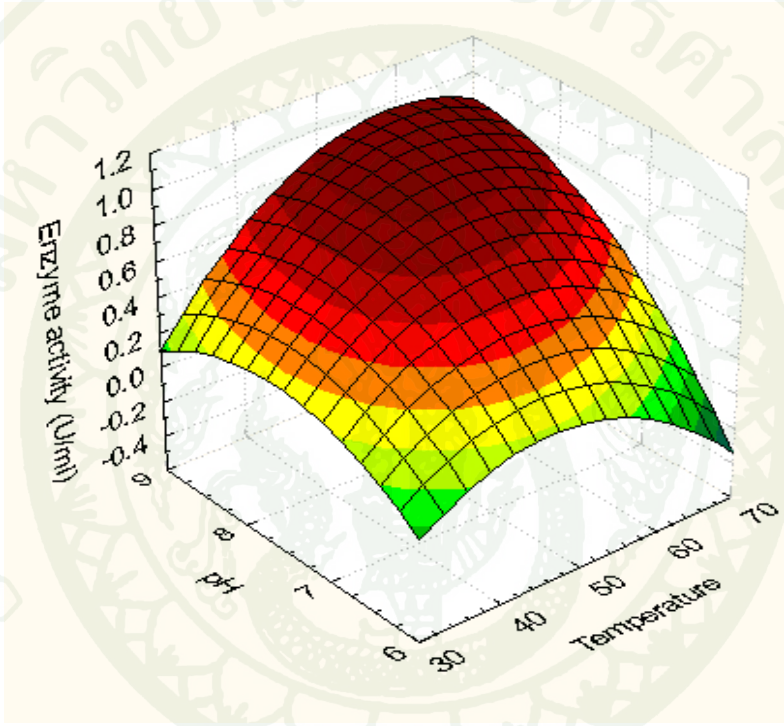
จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ตารางที่ 7) ด้วยการใช้ Multiple regression analysis (SPSS 11.5) ได้ค่าประมาณและการทดสอบสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสดังแสดงในตารางที่ 8 สามารถสร้างสมการที่แสดงผลการตอบสนองของค่ากิจกรรมเอนไซม์ระหว่างความสัมพันธ์ของอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงและพีเอชเริ่มต้นในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (สมการที่ 1) เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิการตัดสินใจ (R^2) ของปัจจัยที่นำมาศึกษาจำนวน 2 ปัจจัยที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เท่ากับ 0.806 แสดงให้เห็นว่าสมการที่ 1 ที่สร้างขึ้นมีความแม่นยำในการใช้ทำนายค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากอิทธิพลของอุณหภูมิและค่าพี-เอชเริ่มต้น จากตารางที่ 8 ซึ่งแสดงค่าประมาณและการทดสอบสัมประสิทธิ์ถดถอยของสมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ได้สมการถดถอยที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P=0.05) (ตารางผนวกที่ ข11) พบว่า ปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ (X_1) และพีเอชเริ่มต้น (X_2) มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p<0.01) พบว่าพีเอชมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) และความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน ขณะที่อุณหภูมิไม่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเลสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสกับปัจจัยที่นำมาศึกษาในรูปแบบของการวิเคราะห์หาพื้นผิวการตอบสนอง (response surface plot) ด้วยการนำสมการที่ 1 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STATISTICA (Release 5.0, Stasoft, USA) พบว่าสมการพื้นผิวการตอบสนองสามารถทำนายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่าง ๆ และกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และมีลักษณะของสมการแบบพาราโบลาที่แสดงให้เห็นถึงช่วงค่าของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (ภาพที่ 20) นอกจากนี้ยังพล็อตเส้นโครงร่างแบบ contour plot ควบคู่ไปเพื่อแสดงให้เห็นรูปร่างของพื้นผิวการตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น (ภาพที่ 21) ในการศึกษารูปแบบพื้นผิวตอบสนองนั้นเป็นการทำนายค่าของปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัย เพื่อหาสภาวะเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *T. fusca* PA 1-1 ในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงที่สุด พบว่าช่วงค่าที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ได้สูง คือ ช่วงอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียส และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0-9.0 เมื่อพิจารณผลการทดลองในชุดที่ 8 17 และ 18 (ตารางที่ 7) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 พบว่าเป็นสภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงที่สุด เท่ากับ 0.9824, 1.0230 และ 1.0717 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากสมการพื้นผิวการตอบสนองจากเส้นโครงร่าง contour plot (ภาพที่ 21) สามารถทำนายค่าของสภาวะที่ส่งผลต่อการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส โดยสภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด (ตั้งแต่ขอบเส้นสีแดงเข้าไป) อยู่ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 46 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 7.5 ขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ได้จริง นอกจากนี้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากการทำนายมีค่าเท่ากับ 0.859 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ยังใกล้เคียงกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จริงจากการทดลองเช่นกัน จากการศึกษาของ Tuncer *et al*. (1999) เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* BD 25 พบว่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกโนเซลลูเลสเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอชในช่วง 7.0-8.0 ตามลำดับ จีนัส *Thermobifida* sp. เป็นแอคติโนมัยซีทที่ชอบอุณหภูมิสูงปานกลาง (moderately thermophilic bacteria) (Lykidis *et al*., 2007) จึงเป็นที่สังเกตว่าเอนไซม์ที่สร้างขึ้น ณ อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส นั้นมีค่าค่อนข้างต่ำ จากรายงานของ George *et al*. (2000) ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Thermomonospora* sp. พบว่าแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่คัดแยกเจริญได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอชในช่วง 8-9 ในขณะที่การศึกษาของ Anish *et al*. (2006) พบว่าเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ผลิตจากจาก *Thermomonospora* sp. ทำงานได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 8.0 และมีความเสถียรในช่วงพีเอชกว้าง (4.0-10.0) กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทดสอบและยืนยันความแม่นยำของการทำนายค่าจากการวิเคราะห์แบบพื้นผิวตอบสนองนั้น จึงคัดเลือกสภาวะจำนวน 4 สภาวะ ที่อยู่ในพื้นที่บริเวณด้านบนของแผนภาพ contour plot (ภาพที่ 12)

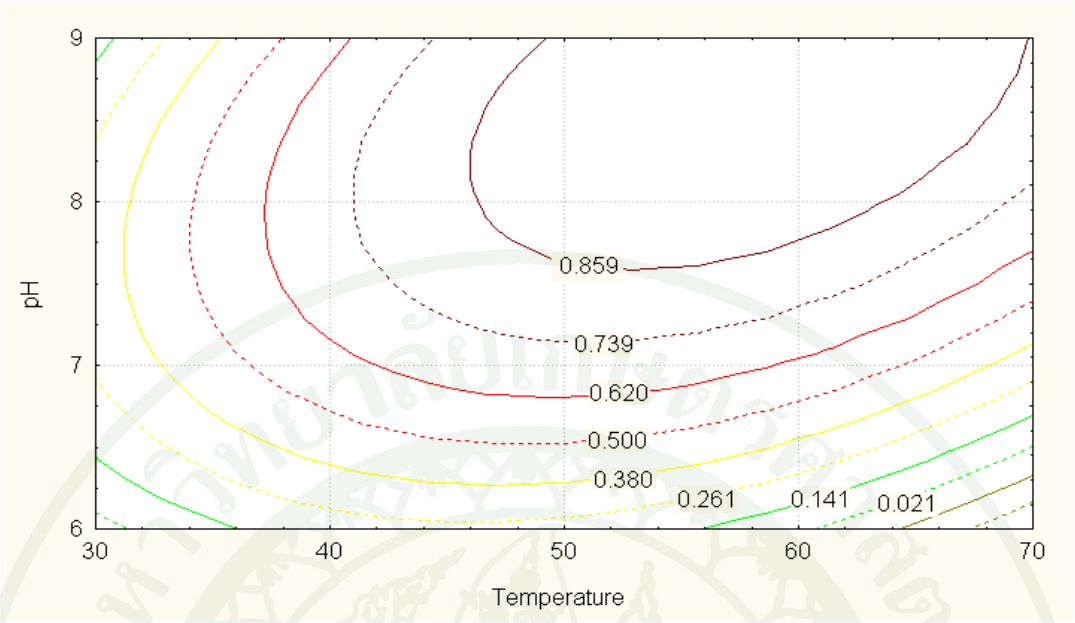
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการทำนายว่าเป็นสภาวะที่จะมีการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ตั้งแต่ 0.859 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือมากกว่า เป็นตัวแทนในการยืนยัน สภาวะที่คัดเลือก ได้แก่ การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และ 8.5 และการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และ 9.0 จึงนำสภาวะดังกล่าวไปทดลองซ้ำอีกครั้ง



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์หาพื้นผิวการตอบสนองของการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 Contour plots ของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การทดสอบและยืนยันความแม่นยำของการทำนายค่าจากการวิเคราะห์แบบพื้นผิวตอบสนองในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เพื่อยืนยันความแม่นยำจากการทำนายค่าการวิเคราะห์ด้วยพื้นที่ผิวแบบตอบสนอง จึงทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA 1-1 อีกครั้งที่สภาวะต่างๆ เป็นเวลา 4 วัน ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าการผลิตเอนไซม์ไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเท่ากับ 0.934 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และ 8.5 ที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.692 และ 0.670 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จริงจากการทดลองนั้นใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยพื้นผิวตอบสนองซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.859 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าขอบเขตของสภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองนั้นมีช่วงกว้าง แต่จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมซึ่งทำให้การผลิตเอนไซม์สูงสุดนั้นอยู่ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส จึงคัดเลือกสภาวะดังกล่าวไปทดสอบการผลิตเอนไซม์ในระดับฟลาสก์และถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการต่อไป

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ได้จากการทำนายและการทดลองที่สภาวะเหมาะสม

อุณหภูมิ	พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
		ค่าจากการทำนาย	ค่าจากการทดลอง
ประมาณ 48 ขึ้นไป	ประมาณ 7.5 ขึ้นไป	0.859	
50	8.0		0.934±0.12
	8.5		0.749±0.05
60	8.0		0.692±0.03
	8.5		0.670±0.06

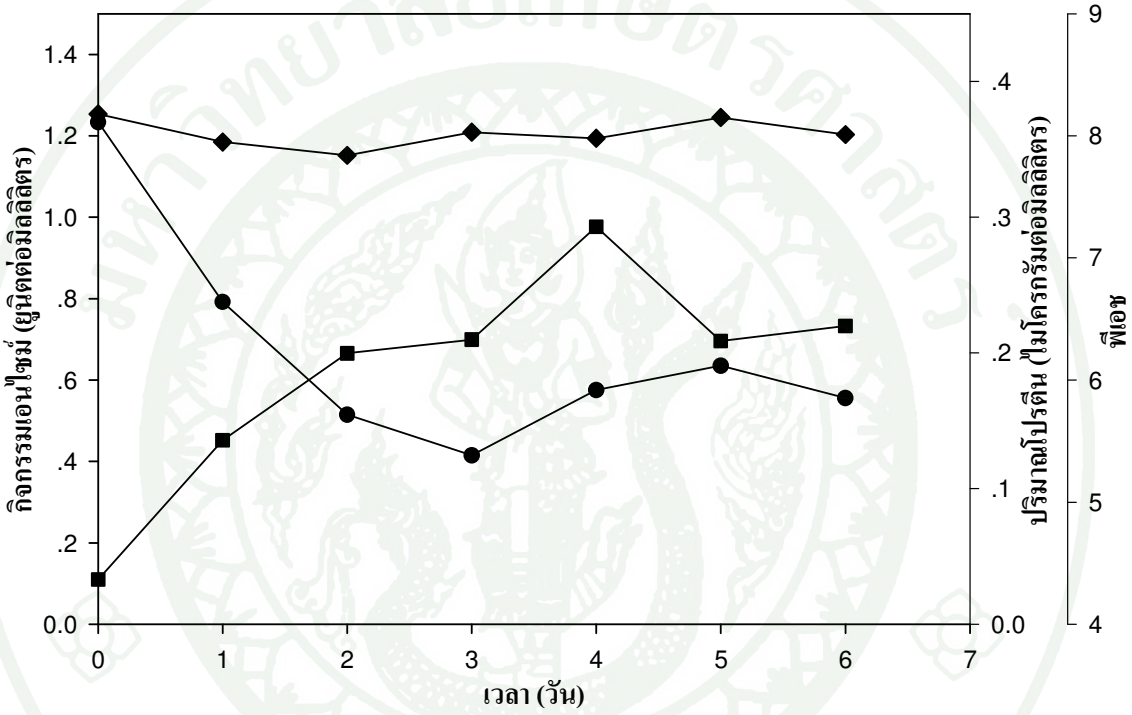
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ในระดับฟลาสก์อีกครั้ง ซึ่งการทดลองข้างต้นนั้นเป็นการทดลองที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่เกิดขึ้นเฉพาะวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง การทดลองครั้งนี้จึงเริ่มศึกษาการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่วันที่ 0 ไปจนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ใช้ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 โดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและยีสต์ขนมปังปริมาณ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง และค่อนข้างคงที่ในช่วงวันที่ 2 ถึง 3 หลังจากนั้นพบกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.977 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลงในวันที่ 5 และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 ในทางตรงข้ามปริมาณโปรตีนที่พบในส่วนใสของน้ำหมักมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจากวันแรกของการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นถึงกิจกรรมของ *T. fusca* PA 1-1 ที่มีการใช้โปรตีนจากยีสต์ขนมปังซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างต่อเนื่อง จนปริมาณโปรตีนต่ำที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง อาจเป็นผลจาก *T. fusca* PA 1-1 ผลิตเอนไซม์ขึ้นมาได้สูงสุด หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนที่วัดได้ค่อนข้างคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ค่าพีเอชที่วัดได้ในน้ำหมักมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากมีค่าอยู่ระหว่าง 7.84-8.18 ดังแสดงในภาพที่ 22

การทดลองระดับฟลาสก์ไม่สามารถควบคุมปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น การให้อากาศ พีเอช และอุณหภูมิ ได้แม่นยำเท่ากับการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอัตโนมัติซึ่งมีระบบควบคุมการทำงานและยังสามารถกำหนดความเร็วในการกวนซึ่งจะส่งผลต่อการละลายของออกซิเจนน้ำหมัก โดยปริมาณอากาศที่ได้รับมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ (มลนพรรษ, 2551) จากการทดลองผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (MD-250, Marubishi, Japan) กำหนดสภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกับการผลิตเอนไซม์ระดับฟลาสก์ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่อัตราการให้อากาศและการกวนเท่ากับ 1.0 vvm และ 200 รอบต่อนาทีตามลำดับ ซึ่งอ้างอิงจากการทดลองของ Deng and Fong (2009) จากผลการทดลองพบว่าการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์พบว่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 มีค่าเท่ากับ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 84 เมื่อพิจารณาจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณโปรตีนพบว่ามีการใช้อย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 42 ซึ่งมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.087 ยูนิตต่อมิลลิลิตรหลังจากนั้นปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นตรงกับช่วงที่มีการผลิตเอนไซม์ที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 60 ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่เซลล์หลั่งโปรตีนบางชนิดออกนอกเซลล์เพิ่มขึ้นหรือเซลล์อาจเริ่มแตก จึงทำให้เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ปะปนออกมาในน้ำหมัก



ภาพที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (-■-) ปริมาณโปรตีน (- ●-) และพีเอช (- ◆)

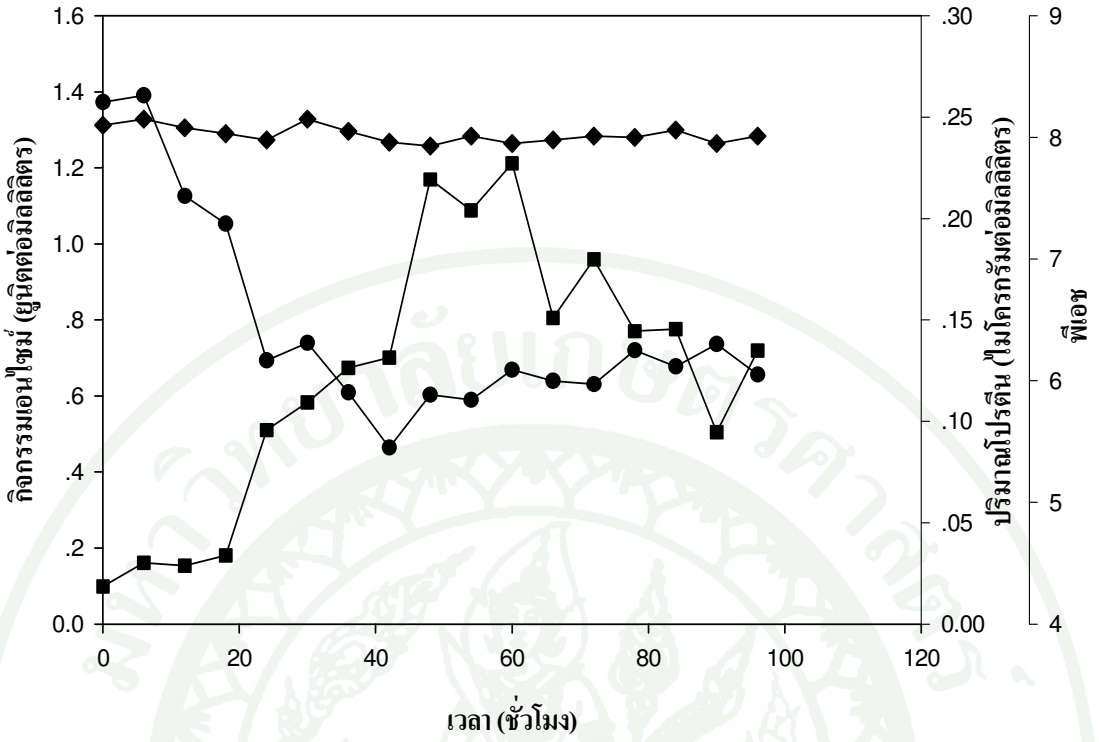
การเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมักซึ่งมีระบบการควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์และสนับสนุนให้เซลล์มีการผลิตเอนไซม์และสารต่างๆ ได้มากขึ้นนั้น พบว่าปริมาณเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ผลิตขึ้นในถังหมักมีกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์จากในถังหมักและฟลาสก์ได้เท่ากับ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.977 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 23) ตามลำดับ ผลจากการให้อากาศซึ่งควบคุมได้ในถังหมักมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลโดยตรงต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งจากการทดลองของ Deng and Fong (2009) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศมากสูงขึ้น ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. fusca* ATCC BAA-629 เพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน เมื่อศึกษาในระดับเซล์แล้วพบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักซึ่งมีการควบคุมอัตราการให้อากาศและการกวนนั้นส่งผลให้ปริมาณ ATP ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ถึง 3 เท่า หมายความว่าปริมาณพลังงานที่เกิดจำนวนมากในเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักนั้นมีผลให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งรวมถึงเอนไซม์สูงขึ้นด้วย เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *T. fusca* PA 1-1 พบว่าเป็นแอคติโนมัยซีทที่มีการสร้างเส้นใย ในสภาวะการเลี้ยงที่มีการกวนในถังหมักนั้นทำให้เกิดแรงเฉือน (shear force) ซึ่งมีผลโดยตรงต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Gusek *et al.*, 1991) การเพาะเลี้ยงเซลล์ในฟลาสก์ซึ่งเป็นการกวนเป็นแบบหมุนวน (rotary shaker) จะมีลักษณะการกวนที่ไม่รุนแรงเท่ากับการกวนในถังหมักแบบ stirred tank ซึ่งมีใบพัด อัตราการกวนที่เร็วนั้นทำให้เกิดแรงเฉือน มีผลต่อโครงสร้างและความเสถียรของเอนไซม์ได้อีกทางหนึ่ง Kao *et al.* (2007) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของอัตราการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์พบว่าอัตราการกวนและการให้อากาศที่สูงมากเกินไปจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์คือทำให้เซลล์แตกหรือ autolysis และยังมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

การศึกษาของ Deng and Fong (2009) ทดสอบสภาวะที่ใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนโดกลูคาเนสจาก *T. fusca* ATCC BAA-629 ในถังหมัก พบว่าที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และทดลองให้อากาศสูงขึ้นจนถึง 1 vvm พบว่าการเพิ่มอัตราการให้อากาศมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงขึ้น ในขณะที่ไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสแต่อย่างใด ในขณะเดียวกันที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเพิ่มความเร็วในการกวนไปจนถึง 400 รอบต่อนาที พบว่าเซลล์มีการเจริญค่อนข้างช้าและมีผลได้ของเซลล์ต่ำที่สุดซึ่งเป็นผลจากแรงเฉือนที่มากเกินไป ในด้านการผลิตเอนไซม์พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสทั้งหมดมีค่าสูงสุดที่ความเร็วความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที และใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงโดยใช้การกวนที่ 200 รอบต่อนาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.086 และ 2.067 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นผลจากการออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์ ขณะที่เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสนั้นพบมากขึ้นเมื่อลดระดับการกวนลงเท่ากับ 50 รอบต่อนาที เท่ากับ 1.646 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้การกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และ 400 รอบต่อนาที มีกิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่วัดได้เท่ากับ 1.528 และ 1.262 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในถังหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลูเลส (-■-) ปริมาณโปรตีน (-●-) และพีเอช (- ◆-)

จากการศึกษาของ Tuncer *et al*. (1999) ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูเลสจาก *T. fusca* BD25 พบว่าการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูงสุดในอาหารที่เติมฟางข้าว 0.8 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็ว 150 รอบต่อนาที วัดกิจกรรมเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.53 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในการทดลองเดียวกันยังศึกษาผลจากการเติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเป็นแหล่งคาร์บอนและพบว่าคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเพียง 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อผลิตโดยใช้ถังหมักควบคุมแบบอัตโนมัติ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 เท่า ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ในขณะที่เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสมีการผลิตน้อยลงเท่ากับ 0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่เซลล์มีการผลิตเอนไซม์สูงสุดพบว่าเอนไซม์ทั้งในกลุ่มลิกโนเซลลูเลสและเอนโดกลูคาเนสผลิตเอนไซม์ในระยะเวลาเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ซึ่งการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในถังหมักแบบอัตโนมัติมีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเจริญและค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 60 โดยช่วงเวลาดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในครั้งนี้ที่มีการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องไปยังชั่วโมงที่ 60

จากการทดสอบและยืนยันความแม่นยำของการทำนายค่าจากการวิเคราะห์แบบพื้นผิวตอบสนองในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพสรุปได้ว่าสภาวะที่ได้จากการทำนายค่านั้นมีความแม่นยำในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA1-1 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตทั้งในระดับฟลาสก์และถังหมักอัตโนมัตินั้นควบคุมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์จากการทำนายด้วยพื้นที่ผิวตอบสนองเท่ากับ 0.859 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์และถังหมักที่สภาวะดังกล่าววัดกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้เท่ากับ 0.977 และ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 96 และ 60 จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำนายด้วยพื้นผิวตอบสนองและสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในกาปรับปรุงศักยภาพการผลิตทั้งในระดับฟลาสก์และอุตสาหกรรมต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการเก็บตัวอย่างดิน 9 บริเวณที่มีการทับถมและย่อยสลายของชีวมวล เบื้องต้นสามารถคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสซึ่งปรากฏวงใสบนอาหารแข็งด้วยวิธี Congo red ได้จำนวน 40 ไอโซเลท นำไอโซเลททั้งหมดทดสอบการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสในอาหารเหลวพบว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสบนอาหารแข็งไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในอาหารเหลว โดยไอโซเลท PA1-1 สามารถผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในอาหารเหลวได้สูงสุดและเป็นไอโซเลทเดียวที่พบกิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลส

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท PA1-1 พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลมและมีสีขาวคล้ายผงแป้ง มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ โดยที่โคโลนีไม่ฝังอยู่ด้านในเนื้ออาหาร ศึกษาลักษณะเส้นใยและสปอร์โดยละเอียดด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบเส้นใยที่มีลักษณะค่อนข้างตรง มีกลุ่มสปอร์จำนวนมากและเป็นสปอร์เดี่ยวมีขนาดประมาณ 1 μm โดยก้านชูสปอร์แตกออกเป็นสองทิศทาง พื้นผิวของสปอร์ขรุขระและมีรูปร่างคล้ายทรงกรวย ศึกษาส่วนประกอบของ diaminopimelic acid พบว่าเป็นชนิด *meso*- เมื่อตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลจากการหาลำดับเบสบนยีน 16s rRNA พบว่าไอโซเลท PA1-1 ตรงกับแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ *Thermobifida fusca* ซึ่งมีเปอร์เซ็นตคล้ายคลึงเท่ากับ 100 % เมื่อเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank

ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหาร Basal medium จำนวน 3 ชนิด พบว่าอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 เหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิดได้ดี ถึงแม้ว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่สร้างขึ้นในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 ใกล้เคียงกับชนิดที่ 1 แต่อาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 นี้เหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์เอวิเซลเลสสูงสุด จึงคัดเลือกอาหารสูตรดังกล่าวมาศึกษาในลำดับต่อไป ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั้งสองชนิด พบว่ายีสต์ขนมปังเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นยีสต์สกัด เปบโตน และมอลต์สกัด ตามลำดับ ซึ่งการใช้มอลต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดในระดับต่ำมาก สันนิษฐานว่าน้ำตาลมอลโตสที่มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มากถึง 42 % โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีผลในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ในขณะที่การจำกัดแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนในยีสต์สกัดและเปบโตนจากแหล่งอ้างอิงพบว่าในยีสต์สกัดมีส่วนประกอบที่เป็นไนโตรเจนต่ำกว่าในเปบโตน ซึ่งอาจทำให้การเหนี่ยวนำเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์สกัดมากกว่าการใช้เปบโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 4.0 และกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์พบในช่วงพีเอชกว้างเท่ากับ 4.0-10.0 และกิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์มีค่าเหลืออยู่มากกว่า 80% ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 องศาเซลเซียส การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA-1 ด้วยวิธีวิเคราะห์จากการหาพื้นผิวตอบสนอง โดยทำการทดลองในระดับฟลาสก์ และออกแบบการทดลองชนิด full factorial design นำค่าการทดลองที่ได้จาก 18 ชุดการทดลอง วิเคราะห์ค่าทางสถิติ multiple regression analysis (SPSS 11.5) ได้สมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสดังนี้

$$\text{CMCase activity (Y)} = -7.344 + 0.038X_1 + 1.673X_2 + 0.009X_1X_2 - 0.001X_1^2 - 0.127X_2^2$$

เมื่อค่า Y คือ กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ค่า X_1 คือ อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง และ X_2 คือ พีเอชเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง และจากสมการดังกล่าวสามารถนำไปหากราฟพื้นผิวการตอบสนอง ซึ่งจากกราฟสามารถบอกขอบเขตสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คืออุณหภูมิตั้งแต่ 46 องศาเซลเซียสขึ้นไป และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 7.5 ขึ้นไป ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการทำนายเท่ากับ 0.859 ยูนิต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองจริง พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 เป็นสภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสได้สูงสุด ทดสอบและยืนยันความแม่นยำของการทำนายค่าจากการวิเคราะห์แบบพื้นผิวตอบสนองพบว่าการเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 96 และ 60 ระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 0.977 และ 1.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากข้อได้เปรียบของคุณสมบัติเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชกว้างและทนอุณหภูมิสูง รวมทั้งทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นพื้นฐานสำคัญในการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์และเพิ่มศักยภาพการผลิตในลำดับต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. เอนไซม์เอวิเซลเลสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซับสเตรทที่เป็นระเบียบ (Crystalline cellulose) ดังนั้นการเพิ่มศักยภาพการผลิตเอนไซม์เอวิเซลเลสให้มีปริมาณสูงขึ้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาในอนาคต การแปลงพันธุ์หรือใช้เทคนิคทางพันธุ-วิศวกรรมอาจเป็นวิธีเพื่อพัฒนาให้เอนไซม์เอวิเซลเลสผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ได้มากขึ้น

2. คุณสมบัติของเอนไซม์คารบอกซีเมทิลเซลลูเลสที่ศึกษาเป็นคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จากน้ำหมัก ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ผลจากไอออนต่างๆ ที่มีอยู่ในอาหาร สารอื่นๆ หรือโปรตีนที่ไม่ใช่เอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสที่เซลล์ขับออกมาในน้ำหมัก จึงอาจมีผลต่อการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ที่แท้จริง ดังนั้นควรศึกษาวิธีการทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนดังกล่าวและทำให้ได้เอนไซม์บริสุทธิ์ในการศึกษาลำดับต่อไป

3. ควรเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนหรือแหล่งคาร์บอนราคาถูกที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นหรือเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเษตร เพื่อใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารหลักในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบที่มีอยู่ในวัสดุดังกล่าวว่าในองค์ประกอบเหล่านั้นมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ได้หรือไม่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษดากร จริโมภาส. 2549. **การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *Bacillus* sp. ที่ชอบด่างในอาหารเหลว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จารุวรรณ สนมวัฒนะวงศ์. 2548. **เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสในเห็ดนางรม, Pleurotus ostreatus 10.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร.** ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

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

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

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

ศศิธร ไกรฤทธิชัย และ นฤมล ทองไว. 2551. **การแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส**. การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34, กรุงเทพฯ.

อนันต์ บุญปาน. 2550. **การศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Aksenova, H. Y., F. A. Rainey, P. H. Janssen, G. A. Zavarzin, and H. W. Morgan**.** 1992. *Spirochaeta thermophila,* new species, an obligately anaerobic, polysaccharolytic, extremely thermophilic bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol**. 42**:**175–177.

Alfredsson, G. A., J. K. Kristja´nsson, S. Hjorleifsdo´ttir, and K. O. Stetter**.** 1988. *Rhodothermus marinus,* new genus new species, a thermophilic, halophilicbacterium from submarine hot springs in Iceland. **Microbiology**. 134**:**299–306.

Anish, R., M. S. Raman and M. Rao. 2006. Application of cellulases from alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. In biopolishing of denims. **Biotechnol. Bioeng**. 96:48-56.

Attwood, G.T., F. Herrera, L.A. Weissenstein and B.A. White. 1996. An endo- ß-1,4-glucanase gene (*celA*) from the rumen anaerobe *Ruminococcus albus* 8: cloning, sequencing, and transcriptional analysis. **Can. J. Microbiol**. 42: 267-278.

Bagnara, C., C. Gaudin, and J. P. Be´laı¨ch. 1987. Physiological properties of *Cellulomonas fermentans*, a mesophilic cellulolytic bacterium. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 26**:**170–176.

Baker, R.A. and J.H. Bruemmer. 1996. Quality and stability of enzymitically peeled and sectioned citrus, pp. 140-8. In S. Nagy and J.A. Attaway, eds. **Citrus nutrition and quality**. American chemical society, Washington DC.

_____. and L. Wicker. 1996. Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. **Trends Food Sci Technol**. 7: 279-84.

Bartley, T., C. Waldron and D. Eveleigh. 1984. A cellobiohydrolase from a thermophilic actinomycete *Microbispora bispora*. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 9: 334-337.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Beauchemin, K.A., L.M. Rodes and V.J.H. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of streers fed dry forages. **Can J Anim Sci**. 75: 641-4.

Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E. and H.A. Lechevalier. 1964. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates. **Applied Microbiology**. 12: 421-423.

Bedford, M.R. and H.L. Classen. 1992. The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chicks, pp 361-70. In: J. Visser, G. Kusters-van Someren MA, A.G.I. Voragen, eds. ***Xylan*** **and** ***Xylanases*** **, Progress in Boitechnology, Vol.7**. Elseveir, Amsterdam.

Beldman, G., M.F. Searle-van Leeuwen, F.M. Rombouts and F.G.J. Voragen. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride* : Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanase, exoglucanase and ß-glucosidases. **Eur. J. Biochem**. 146: 301-308.

Beldman, M., A. Kusters-van Someren and A.G.J. Voragen, eds. **Progress in biotechnology, Vol.7., Xylans and axaylanase**. Elsevier, Amsterdam.

Bellamy, W. D. 1977. Cellulose and lignocelluloses digestion by thermophilic actinomycetes for single cell protein production. **Dev. Ind. Microbiol**. 18:249-254.

Be´guin, P., J. Millet and J. P. Aubert**.** 1992. Cellulose degradation by *Clostridium thermocellum:* from manure to molecular biology. **FEMS Microbiol**. **Lett**. 100**:**523–528.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bélaich, J-P., C. Tardif, A. Bélaich and C. Gaudin. 1997. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. **J. Biotechnol**. 57: 3-14.

Bergquist, P. L., M. D. Gibbs, D. D. Morris, V. S. J. Te'o, D. J. Saul and H. W. Morgan. 1999. Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol**. 28**:**99–110.

Bhat. 1994. Purification and characterization of an extracellular ß-glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. **Eur. J. Biochem**. 224: 379-385.

Bhat, M. K**.** 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv**. **18:**355–383.

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

_____ , A.J. Hay, M. Claeyssens and T.M. Wood. 1990. Study of the mode of action and site specificity of the endo-(1-4)- ß-D-glucanases of the fungus *Penicillium pinophilum* with normal, H3 labelled, reduced and chromogenic cellooligosaccharides. **Biochem. J**. 266: 371-378.

Bhat, S., R. A. Hutson, E. Owen and M. K. Bhat**.** 1997. Determination of immunological homology between cellulosome subunits and cloned endoglucanases and xylanases of *Clostridium thermocellum*. **Anaerobe**. 3: 347–352.

Bischoff, K. M., A. P. Rooney, X. L. Li, S. Liu and S. R. Hughes. 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol Lett**. 28:1761–1765.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bocchini, D. A., H. F. Alves-Prado, L. C. Baida, I.C. Roberto, E. Gomes and R. Da Silva. 2002. Optimization of xylan production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. **Process Biochem**. 38;727-731.

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

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

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

Bronnenmeier, K., A. Kern, W. Liebl and W.L. Staudenbauer. 1995. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. **Appl. Environ. Microbiol**. 61: 1399-1407.

Caldini, C., F. Bonomi, P.G. Pifferi, G. Lanzarini and Y.M. Galante. 1994. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidase for aroma enhancement in wine. **Enzyme Microb Technol**. 16: 286-91.

Canales, A.M., R. Garza, J.A. Sierra and R. Arnold. 1998. The application of ß-glucanase with additional side activities in brewing. **MBAA Tech Q**. 25: 27-31.

Canevascini, G., M.R. Coudray, J.P. Ray, R.J.G. Southgate and H. Meier. 1979. Induction and catabolic repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **J. Gen. Microbiol**. 110: 291-303.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Chesson, A. 1987. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets, pp 71-89. In: Haresign W., D.J.A. Cole, eds. **Recent advances in animal nutrition**. Butterworths, London.

Cowan, W.D. 1996. Animal feed, pp 360-71. In: Godfrey T. and S. West, eds. **Industrial Enzymology. 2nd ed**. Macmllan Press, London.

Crocco, S. 1976. New way to modify flavor. **Food Eng**. 48:6-8, 10.

Deng, Y. and S. S. Fong. 2009. Influence of culture aeration on the cellulase activity of *Thermobifida fusca*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 9:2155-2159.

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

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

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Eriksson, K.E. 1978. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Biotechnol. Bioeng**. 70: 317-332.

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

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

Flint, H.J., C.A. McPherson and J. Bisset. 1989. Molecular cloning of genes from *Ruminococcus flavefaciens* encoding xylanase and ß-(1,3-1,4)-glucanase activities. **Appl. Environ. Microbiol**. 55: 1230-1233.

Fontes, C.M.G.A., J.H. Clarke, G.P. Hazlewood, T.H. Fernandes, H.J. Gilbert and L.M.A. Ferreira. 1998. Identification of tandemly repeated type VI cellulose-binding domains in an endoglucanase from the aerobic soil bacterium *Cellvibrio mixtus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 49: 552-559.

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

Fuglsang, C.C., C. Johansen, S. Christgau and J. Adler-Nissen. 1995. Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. **Trends Food Sci Technol**. 6: 390-6.

Galante, Y.M., A. DE Conti and R. Monteverdi. 1998a. Application of *Trichoderma* enzymes in textile industry, pp 311-26. In: G.F. Harman and C.P. Kubicek, eds**. *Trichoderma* & *Gliocladium*-Enzymes, biological control and commercial applications. Vol2**. Taylor & Francis, London.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Galante, Y.M., A. DE Conti and R. Monteverdi. 1998b. Application of *Tricoderma* enzymes in textile industry, pp 327-42. In: G.F. Harman and C.P. **Kubicek, eds. *Tricoderma* & *Gliocladium*-Enzymes, biological control and commercial applications. Vol2**. Taylor & Francis, London.

Gilkes, N.R., E. Kwan, D.G. Kilburn, R.C. Miller and R.A.J. Warren. 1997. Attack of carboxymethylcellulose at opposite ends by two cellobiohydrolases from *Cellulomonas fimi*. **J. Biotechnol**. 57: 83-90.

Godfrey, T.1996. Textiles, pp 360-71. In: Godfrey T. and S. West, eds. **Industrial enzymology, 2nd ed**. Macmilla Press, London.

_____ and S. West. 1996a. Introduction to industrial enzymology, pp 1-8. In: Godfrey T. and S. West, eds. **Industrial enzymology, 2nd ed**. Macmilla Press, London.

_____ and _____. 1996b. **Industrial Enzymoogy, 2nd ed**. Macmillan Press, London.

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

_____ and _____2001. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: Influence of additives on thermostability. **Bioresour Technol**. 78:221-224.

Gordon, R. E., W. C. Haynes, and C. Hor-Nay Pang**.** 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture handbook. **Agricultural Research Service, US.Department of Agriculture.** Washington, D.C. 427.

Grassin, C. and P. Fauquemgergue. 1996a. Fruit juices, pp 226-4. In: Godfrey T. and S. West, eds. **Industrial Enzymology, 2nd ed**. Macmillan Press, UK.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Grassin, C. and P. Fauquemgergue. 1996b. Fruit juices, pp 374-83. In: Godfrey T. and S. West, eds. **Industrial Enzymology, 2nd ed**. Macmillan Press, UK.

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

Gusek, T. W., Johnson, R. D., Tyn, M. T. and Kinsella, J. E. 1991. Effect of agitational shear on growth and protease production by *Thermomonospora fusca*. Biotechnol Bioeng. 37:371-374.

Hagerdal, B., Ferchak JD, Pye EK. 1980. Saccharification of cellulose by the cellulolytic enzyme system of *Thermomonospora* sp. I. Stability of cellulolytic activities with respect of time, temperature and pH. Biotechnol Bioengener. 22:1515–26.

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

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

Hesselman, K., K. Elwinger and S. Thimke. 1982. Influence of increasing levels of ß-glucanase on the productive value of barley diets for broiler chickens. **Animal Feed Sci Technol**. 7: 351-8.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Huber, R., C. R. Woese, T. Langworthy, J. K. Kristja´nsson, and K. O. Stetter**.** 1990. *Fervidobacterium islandicum*, new species, a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the "*Thermotogales*." **Arch. Microbiol**. 154**:**105–111.

Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. **Academic Press**. **Inc**. New York, N.Y.

Ibrahim, A.S.S. and A.I. El-diwany, 2007. Isolation and identification of new cellulases Producing thermophilic bacteria from an egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. **Aust. J.Basic Applied Sci**. 1:473-478.

Ilmén, M., S. Saloheimo, M.L. Onnela and M.E. Penttilä. 1997. Regulation of cellulose gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol**. 63(4): 1298-1306.

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

Fluckiger-Isler, R., S. M. Zwez, J. M. Kahn and P. walter. 1994. Dietary components of malt extract such as maltodextrins, proteins and inorganic salts have distinct effects on glucose uptake and glycogen concentrations in rats. **American Inst. Nutri.** 22:1647-1653.

Jervis, E. J., C. A. Haynes and D. G. Kilburn**.** 1997. Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. **J. Biol. Chem**. 272**:**24016–24023.

Kao, P.M., C. Chin-I, H. Shu-Chen, C. Yung-Chi, T. Po-Jen and L. Yung-Chan. 2007. Effects of shear stress and nass tranfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. **Biochem Engineer J.** 34: 172-178.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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

Khandke, K.M., P.J. Vithayathil and K.S. Murthy. 1989. Purification of xylanase, ß-glucosidase, endocellulase and exocellulase from thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus.* **Arch. Biochem. Biophys**. 274: 491-500.

Kim, B. H**.** 1987. Carbohydrate catabolism in cellulolytic strains of *Cellulomonas, Pseudomonas*, and *Nocardia*. **Korean J. Microbiol**. 25**:**28–33.

Kim, C. 1995. Characterization and substrate specificity of an endo- ß -1,4-D-glucanase I (avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. **Appl. Environ. Microbiol**. 61: 959-965.

Kim B.K., B.H. Lee, Y.J. Lee, I.H .Jin, C.H. Chung and J.W. Lee. 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme Microb Technol**. 44:411-416.

Krootdilaganandh J. 2000. Isolation and selection of thermotolerant bacteria capable of producing cellulase. **Chiang Mai: Chiang Mai University Press**. 20-21.

Kumar, R., J. S. Dahiya, D. Singh and P. Nigam. 2000. Production of endo-1,4- ß -glucanase by a biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum*. **Biores. Technol**. 75: 95-97.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lee, Y. J., B. K. Kim, B. H. Lee, K. I. Jo, N. K. Lee, C. H. Chung, Y. C. Lee and J. W. Lee. 2007. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 ustilizing rice hull. **Biores. Technol**. 99:378-386.

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

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

_____ and _____. 1988. Identification of a *celE*-binding protein and its potential role in induction of the *celE* gene in *Thermomonospora fusca*. **J. Bacteriol**. 170:3843-3846.

_____ and _____. 1998. Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. **J. Bacteriol**. 180:3529-3532.

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

Lykidis A, K. Mavromatis, N. Ivanova, I. Anderson, M. Land, G. DiBartolo, M. Martinez, A. Lapidus, S. Lucas, A. Copeland, P. Richardson, D.B. Wilson and N. Kyrpides. 2007. Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. **J. Bacteriol**. 189:2477–2486

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

Mandels, M. 1985. Applications of cellulases. **Biochem Soc. Trans**. 13: 414-5.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mawadza, R. Hatti-Kaul, R. Zvauya and B. Mattiasson. 2000. Purification and characterisation of cellulases produced by two Bacillus strains. **J. Biotechnol**. 83:177–187.

McHale, A. and M.P. Coughlan. 1980. Synergistic hydrolysis of cellulose by components of the extracellular cellulase system of *Talaromyces emersonii*. **FEBS Lett**. 117: 319-322.

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

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

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

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

Mishra, C., S., Keskar and M. Rao. 1984. Production and properties of extracellular xylanase from *Neurospora crassa*. **Appl. Environ. Microbiol**. 48, 224-228.

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

Nakamura, A., T. Uozumi and T. Beppu. 1987. Nucleotide sequence of a cellulase gene of *Bacillus subtilis*. **J. Biochem**. 164: 317-320.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nishise, H., A. Ogawa, Y. Tani and H. Yamada**.** 1985. Studies on microbial glycerol dehydrogenase. 4**:** glycerol dehydrogenase and glycerol dissimilation in *Cellulomonas* sp. NT3060. **Agric. Biol. Chem**. 49**:**629–636.

Okamoto, T., S. Yamano, H. Ikeaga and K. Nakamura. 1994. Cloning of the *Acetobacter xylinum* cellulase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 42: 563-568.

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

Ozcas, N., C. Cunningham and W.J. Harris. 1996. Cloning of a cellulase gene from the rumen anaerobe *Fibrobacter succinogenes* SD35 and partial characterization of the gene product. **Lett. Appl. Microbiol**. 22: 85-89.

Pajunen, E. 1986. Optimal use of ß -glucanase in worth production, pp. 137-48. In: EBC-Symposium on worth production. **Monograph XI**. Maffliers, France.

PohlschrÖder, M., E. Canale-Parola and S.B. Leschine. 1995. Ultrastructural diversity of the cellulase complexes of *Clostridium papyrosolvens* C7. **J. Bacteriol**. 177: 6625-6629.

Qiu, X., B. Selinger, L.-J. Yanke and K.-J. Cheng. 2000. Isolation and analysis of two cellulase cDNAs from *Orpinomyces joyonii.* **Gene**. 245: 119-126.

Querol A, and Fleet G. 2006. Yeasts in Food and Beverages. **The Yeast Handbook, Volume 2**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Rainey, F. A., A. M. Donnison, P. H. Janssen, D. Saul, A. Rodrigo, P. L. Bergquist, R. M. Daniel, E. Stackebrandt and H. W. Morgan**.** 1994. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. **FEMS Microbiol. Lett**. 120**:**263–266.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rajoka, M.I. and K.A. Malik. 1997. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. **Biores. Technology**. 59: 21-27.

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

Rani, D.S. and K. Nand. 2000. Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702. **Proc. Biochem**. 36: 355-362.

Rapp, P. and A. Beerman**.** 1991. Bacterial cellulases. p. 535–595. *In* C. H. Haigler and P. J. Weimer, eds. **Biosynthesis and biodegradation of cellulose**. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

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

_____ , R. G. H. Sui and H. S. Levinson**.** 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **J. Bacteriol**. 59**:**485–497.

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

Rexova-Benkova, L. 1973. The size of an *Aspergillus niger* extracellular endopolygalacturonase. **Eur. J. Biochem**. 39: 109-115.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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

Schuette, S.E B., I. Kataeva, J. Westpheling, M. W. Adams and R. M. Kelly. 2008**.** Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects. **Biotechnol.** 19:210-217.

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

Semêdo, L.T.A.S., R.C. Gomes, E.P.S Bon, R.M.A. Soares, L.F. Linhares and R.R.R . Coelho. Endocellulase and exocellulase activities from two *Streptomyces* strain isolated from a forest soil. **Appl Biochem Biotechnol**. 2000; 84: 267-76.

Shafer, M. L., and K. W. King**.** 1965. Utilization of cellulose oligosaccharides by *Cellvibrio gilvus*. **J. Bacteriol**. 89**:**113–116.

Simankova, M. V., N. A. Chernych, G. A. Osipov, and G. A. Zavarzin**.** 1993. *Halocella cellulolytica*, gen. nov. sp. nov., a new obligately anaerobic, halophilic, cellulolytic bacterium. Syst**. Appl. Microbiol**. 16**:**385–389.

Singh, S., B., Pillay, V. Dilsook and B.A. Prior. 2000. Production and properties of hemicellulases by a *Thermomyces lanuginosus* strain. **The Society for App. Microbiol**. 88:975-982.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Spiridonov, N. A. and Wilson, D. B. 2001. Cloning and biochemical characterization of BglC, a beta-glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. **Curr Microbiol**. 42: 295-301.

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

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

Takashima, S., A. Nakamura, M. Hidaka, H. Masaki and T. Uozumi. 1996. Cloning, sequencing, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **J. Biotechnol**. 50: 137-147.

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

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

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

Uhlig, H. 1987. 1998. Industrial enzymes and their applications. **New York: John Wiley & Sons, Inc**. 67-9.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Van Gylswyk, N. O., and J. J. T. K. Van der Toon. 1986. Description and designation of a neotype strain of *Eubacterium cellulosolvens* (*Cillobacterium cellulosolvens*). **Int. J. Syst. Bacteriol**. 36**:**275–277.

Wang, J. and P. Gao. 2000. *In vitro* expression of *Penicillium janthinellun* cellobiohydrolase I gene in a coupled transcription-translation system. **J. Biotechnol**. 81: 205-209.

Wang, C.-H., T. –H. Hseu and C.-M. HUANG. 1998. Induction of cellulose by cellooligosaccharides in *Trichoderma koningii* G-39. **J. Biotechnol**. 9: 47-60.

William, S.T., M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol 4. **Wiliam&Wilkins**. Baltimore.

Wilson, D. B. 2004. Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. **The Chemical Record.** 4:72-82.

Wilson, C.A. and T.M. Wood. 1992. The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* : isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen bond-ordered cellulose. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 37:125-129.

Wood, T.M. 1969. The cellulase of *Fusarium solani* : Resolution of the enzyme complex. **Biochem. J**. 115: 457-464.

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

Wyk, J.P.H. 1999. Hydrolysis of pretreated paper materials by different concentrations of cellulase from *Penicillium fumiculosum*. **Bioresource Technology**. 69: 269-273.

Xu, L. H., Q. R. Li and C. L. Jiang. 1996. Diversity of soil actinomyces in Yunan, China. **Appl. Environ. Microbiol**. 62:244-248.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yagüe, E., P. Béguin and J.-P. Aubert. 1990. Nucleotide sequence and deletion analysis of the cellulase-encoding gene *celH* of *Clostridium thermocellum*. **Gene**. 86: 61-67.

Zhang, Y.H.P., M.E. Himmel and J.R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnol Adv**. 24:452–481

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1 Nutrient agar

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

2. Basal Medium ชนิดที่ 1 (ดัดแปลงจาก Ramachandra *et al.*, 1988)

Carboxymethylcellulose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
$(NH_4)_2\ SO_4$	0.1	กรัม
NaCl	0.3	กรัม
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0.1	กรัม
$CaCO_3$	0.02	กรัม
$FeSO_4.7H_20$	1.0	กรัม
$MnSO_4.7H_20$	0.2	กรัม
$ZnSO_4.7H_20$	0.9	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. Basal Medium ชนิดที่ 2 (ดัดแปลงจาก Mishra *et al.*, 1984)

Carboxymethylcellulose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Malt extract	3.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	กรัม
$CaCl_2$	0.3	กรัม
$MnSO_4.7H_20$	0.0016	กรัม
$ZnSO_4.7H_20$	0.0014	กรัม
$FeSO_4.7H_20$	0.005	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. Basal Medium ชนิดที่ 3 (ดัดแปลงจาก Lima *et al*., 2005)

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

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

\

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารเคมีและการวิเคราะห์

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

1.1 สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์

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

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

ผสมสารลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

1.2 สารลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

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

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

ผสมสารลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

1.3 สารลาย Tris-HCL บัฟเฟอร์

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

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

ผสมสารลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 สารลาย Glycine-NaOH บัฟเฟอร์

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

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

ผสมสารลาย A และ B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

2. การวัดค่าความขุ่น

นำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

3. การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 15 นาที แยกส่วนใส (supernatant) เพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือและเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 15 นาทีอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้ใส่ลงบนแผ่นอลูมิเนียมฟลอยด์ที่ทราบน้ำหนักแห้งแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นอลูมิเนียมฟลอยด์มาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desicator) ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังสมการ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักแผ่นอลูมิเนียมฟลอยด์และเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักแผ่นอลูมิเนียมฟลอยด์(กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (Miller, 1959)

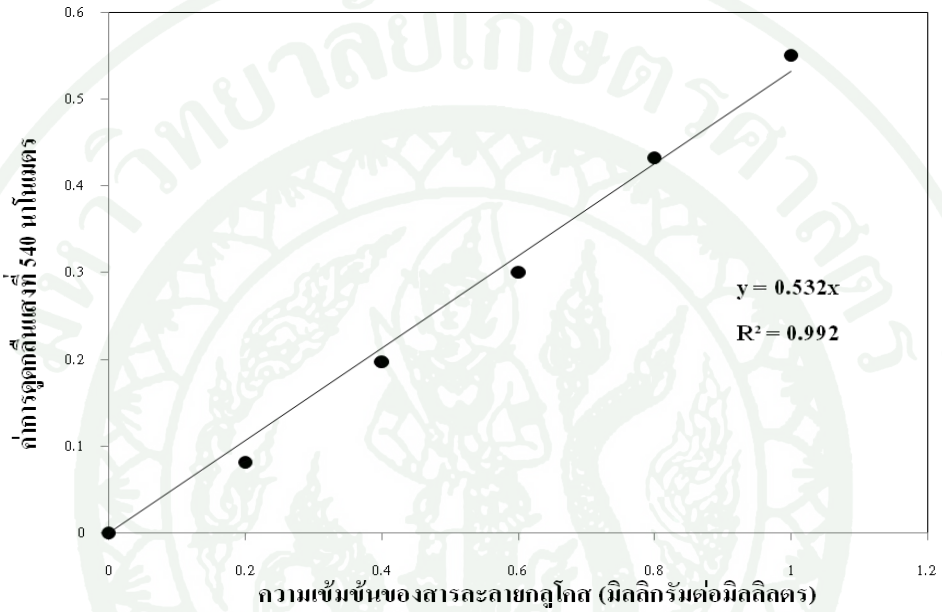
วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) โดยเตรียมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ที่ใช้เป็นสับสเตรท ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มสารแต่ละตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันและบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรแล้วทำการต้มเป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส เตรียมจากการใส่สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.2-1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองซึ่งแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DNS 2 มิลลิลิตร นำไปต้มนาน 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วยการแช่แข็ง เติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา plot กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เตรียมสารละลาย blank โดยใช้น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ตามขั้นตอนข้างต้น เตรียมสารละลาย DNS โดยชั่ง 3,5-Dinitrosalicylic acid 20 กรัม ละลายน้ำ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 300 มิลลิลิตรลงไป คนให้ใส แล้วค่อยๆ เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตจำนวน 600 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 2,000 มิลลิลิตร และเก็บในที่มืด กำหนดให้ 1 ยูนิต ของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เอวิเซลเลส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อ 3 โดยใช้สารละลายเอวิเซลเลสเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 เป็นซับสเตรท



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานการหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS

6. วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total releasable soluble protein)

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ข้อมูลจากการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 1

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอวิเซลเลส	
0	0.071±0.07	0.027±0.00	1.254±0.02
1	0.169±0.02	0.070±0.03	1.345±0.02
2	0.151±0.19	0.106±0.06	1.353±0.01
3	0.459±0.30	0.173±0.06	1.424±0.06
4	0.506±0.25	0.122±0.12	1.307±0.07
5	1.253±0.07	0.092±0.11	0.768±0.04

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค2 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 2

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอวิเซลเลส	
0	0.038±0.00	0.217±0.00	1.251±0.02
1	0.532±0.35	0.398±0.40	1.661±0.02
2	0.393±0.12	0.291±0.10	1.233±0.01
3	0.420±0.04	0.294±0.16	1.145±0.06
4	0.527±0.09	0.169±0.03	1.115±0.07
5	0.723±0.05	0.094±0.00	5.343±0.04

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค3 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอวิเซลเลส	
0	0.158±0.06	0.00±0.00	1.016±0.09
1	0.740±0.19	0.00±0.0	2.239±0.18
2	0.950±0.14	0.00±0.00	1.665±0.15
3	0.916±0.07	0.094±0.05	1.387±0.27
4	0.814±0.06	0.184±0.04	1.345±0.14
5	0.552±0.08	0.605±0.04	1.427±0.06

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค4 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 และมียีสต์ขนมปัง 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอวิเซลเลส		
0	0.038±0.03	0.068±0.04	3.162±0.18	7.00
1	0.218±0.03	0.234±0.06	3.351±0.30	6.94
2	0.590±0.13	0.200±0.04	3.481±0.70	6.90
3	0.615±0.07	0.24±0.02	3.405±0.23	6.90
4	1.069±0.36	0.253±0.03	3.420±0.25	6.98
5	0.621±0.14	0.304±0.13	3.106±0.86	7.05

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค5 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 และมีเปบโตน 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอวิเซลเลส		
0	0.000±0.00	0.048±0.02	0.153±0.05	7.00
1	0.304±0.11	0.095±0.09	0.625±0.20	7.78
2	0.350±0.16	0.078±0.03	1.293±0.07	7.24
3	0.345±0.32	0.102±0.04	0.641±0.07	7.19
4	0.689±0.07	0.276±0.03	0.467±0.11	7.19
5	0.421±0.14	0.423±0.03	0.431±0.04	7.06

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค6 กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสและเอวิเซลเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ชนิดที่ 3 และมีมอลต์สกัด 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
	คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	เอวิเซลเลส		
0	0.198±0.18	0.035±0.03	0.351±0.27	7.00
1	0.470±0.17	0.089±0.08	0.635±0.23	6.65
2	0.233±0.16	0.132±0.01	1.276±0.13	6.63
3	0.278±0.19	0.098±0.06	1.392±0.24	6.64
4	0.097±0.0	0.012±0.01	1.441±0.01	6.68
5	0.153±0.15	0.042±0.04	1.035±0.18	6.61

หมายเหตุ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ค7 ผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

พีเอช	**กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (%)**
3.0	77.76
4.0	100.00
5.0	82.91
6.0	44.41
7.0	26.98
8.0	30.36
9.0	30.07
10.0	19.11

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค8 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

อุณหภูมิ	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (%)
30	36.06
35	51.62
40	57.50
45	78.35
50	89.14
55	96.37
60	100.05
65	96.86
70	18.02

ตารางผนวกที่ ค9 ความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่พีเอชต่างๆ

พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (%)
3.0	18.51
4.0	66.58
5.0	79.08
6.0	83.62
7.0	80.96
8.0	84.23
9.0	80.80
10.0	84.48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค10 ความเสถียรของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจาก *T. fusca* PA 1-1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (%)
30	93.55
40	94.80
50	103.97
60	99.44
70	14.71

ตารางผนวกที่ ค11_ ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของสมการการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส

Source of variation	*df*	Sum of squares	Meansquare	F-ratio	p-value
Model	5	1.825	0.365	9.990	0.001
Residual	12	0.438	0.037		
Total	17	2.263			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค12 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในฟลาสก์จาก *T. fusca* PA 1-1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน เพื่อยืนยันความแม่นยำจากการทำนายค่าการวิเคราะห์ด้วยพื้นที่ผิวแบบตอบสนอง

เวลา (วัน)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.110±0.06	0.37±0.00	8.18
1	0.452±0.049	0.238±0.02	7.95
2	0.666±0.17	0.155±0.01	7.84
3	0.699±0.08	0.125±0.01	8.03
4	0.977±0.19	0.173±0.00	7.98
5	0.696±0.17	0.191±0.00	8.15
6	0.733±0.17	0.167±0.00	8.01

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค13 กิจกรรมเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสในถังหมักจาก *T. fusca* PA 1-1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.0 ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน เพื่อยืนยันความแม่นยำจากการทำนายค่าการวิเคราะห์ด้วยพื้นที่ผิวแบบตอบสนอง

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พีเอช
0	0.098±0.03	0.254±0.01	8.15
6	0.161±0.05	0.261±0.00	7.95
12	0.153±0.08	0.155±0.01	7.84
18	0.181±0.01	0.125±0.01	8.03
24	0.510±0.06	0.173±0.00	7.98
30	0.583±0.11	0.191±0.00	8.15
36	0.674±0.12	0.167±0.00	8.05
42	0.701±0.05	0.087±0.00	7.96
48	1.169±0.10	0.113±0.00	7.93
54	1.088±0.01	0.111±0.00	8.01
60	1.212±0.19	0.125±0.00	7.95
66	0.805±0.10	0.120±0.01	7.98
72	0.959±0.09	0.118±0.00	8.01
78	0.770±0.07	0.135±0.00	8.00
84	0.776±0.14	0.127±0.00	8.06
90	0.505±0.15	0.138±0.00	7.95
96	0.719±0.07	0.123±0.00	8.01

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค14 น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *T. fusca* PA 1-1 ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 30,40 และ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

เวลา (วัน)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	30 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส	50 องศาเซลเซียส
0	0.0178	0.0154	0.0174
1	0.0213	0.0171	0.0388
2	0.0164	0.0165	0.4810
3	0.0106	0.0139	0.0264
4	0.0094	0.0127	0.0260

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาววาทินี คุณเผือก
วัน เดือน ปี ที่เกิด	28 กันยายน 2526
สถานที่เกิด	พระนครศรีอยุธยา
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานดีเด่น/หรือรางวัลทางวิชาการ	Proceeding: International Conference on Biotechnology for Healthy Living, The 22nd Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์