การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากผักเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้ เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์

The Isolation of Highly Potential Cellulase Enzymes Producing Microorganisms from Vegetable Wastes for Application in Alcohol Fermentation

นางสาวดวงฤทัย นิคมรัฐ (หัวหน้าโครงการ)

นายมาโนช หลักฐานดี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

หัวข้อวิจัย การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากผักเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้ เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์

ชื่อผู้วิจัย นางสาวดวงฤทัย นิคมรัฐ นายมาโนช หลักฐานดี

หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ปีงบประมาณ 2560

บทคัดย่อ

ทีมผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกนอกเซลล์ ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส จากวัสดุที่เหลือทิ้งทางการเกษตรคือผักและผลไม้เหลือทิ้ง เพื่อให้ได้น้ำตาล ที่สามารถเป็นสารตั้งต้นของการหมักแอลกอฮอล์ และหรือไปใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ ในการศึกษาเมื่อทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 49 ไอโซเลทที่แตกต่างกัน พบว่าชนิดแบคทีเรียและทดสอบดูประสิทธิภาพในการสร้างเซลลูเลส จากการย่อย Carboxymethyl cellulose (CMC) ดูคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี พร้อมทั้งจำแนกชนิดสายพันธุ์ สามารถได้เชื้อแบคทีเรียสองไอโซเลทชนิด Bacillus spp. CE08 และ 49 ซึ่งเป็น aerobic/ facultative aerobic bacteria รูปร่าง bacilli มีความยาว 1-3 μm ย้อยติดสี Gram stainให้สีน้ำเงิน ชอบ substrate ชนิด maltose และ xylose มากกว่า glucose ไม่สามารถหรือย่อยได้น้ำตาลชนิด sucrose และ lactose ได้น้อย สภาวะย่อยได้ดีที่ 40Oc มี optimum pH 4.5 มี cellulase activity ในช่วง 3-4 μ/mg เมื่อยังไม่บริสุทธิ์ และสามารถย่อย Carboxymethyl cellulose ได้ดีที่สุด แต่สามารถย่อยฟางข้าวดีกว่าหญ้าขน แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการย่อยสำลี เชื้อทั้งสองไอโซเลทนี้ คาดว่าจะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการย่อยเซลลูโลสนี้เป็นวิธีทางชีวภาพ ที่ไม่ต้องใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษของสารเคมีที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาให้เกิดมูลค่าต่อชุมชนด้วย

Title The Isolation of Highly Potential Cellulase Enzymes Producing Microorganisms from Vegetable Wastes for Application in Alcohol Fermentation
Name Ms. Duongruitai Nicomrat, Mr. Manoch Lakthandee
Insitute Faculty of Science and Technology, RMUTP
Year 2016

ABSTRACT

The research team has isolated the cellulase producing microorganisms which have capability in producing extracellular cellulase enzyme for cellulosic degradation from leftover agricultural waste materials such as fruits and vegetables. After cellulosic material degradation, the products mainly were sugar moiety being the starting materials for further alcohol fermentation and/or possibly being used in cultivation of common microorganisms. In the study, when different 49 bacterial isolates were tested for their cellulase activity on Carboxymethyl cellulose (CMC), two bacteria, *Bacillus* spp. CE08 and 49 were selected due to high cellulase activity and thus tested for the physical and chemical properties. Their 16S rDNA sequence comparisons were close to Bacillus sp. isolate obtained from the soil. Both isolates are common aerobic/facultative aerobic bacteria with the length of 1-3 μm, Gram positive, and preferring the fermentation of maltose and xylose to glucose while minimal degradation on sucrose and lactose contents. Their optimum digestibility was at 40°C, pH 4.5 for the broth having unpurified extracellular cellulase activity at 3-4 μg /mg. The enzyme could use the substrate CMC the best, but rice straw more slowly but better than grass. However, the enzyme displayed the least digestion effectiveness on cotton. Both of these isolates are expectedly applied in the biological degradation process substituting chemicals that cause pollution problems to the environment. Additionally, this is one promise way to bring value of agricultural waste to the community.

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยเรื่องนี้ ทีมคณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำหรับทุนจากงบประมาณรายได้จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ที่ได้สนับสนุนงานวิจัยนี้ ให้สามารถทำลุล่วงไปได้จนสำเร็จ และขอขอบคุณนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากรธรรมชาติชั้นปีที่ 2 และ นายณัฐพล สัตถาผล ที่ได้ช่วยในขั้นตอนการเตรียมสารเคมี และการลงเชื้อติดตามงาน เก็บ ส่งเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการวิเคราะห์ และการเก็บผลเพื่อการวิเคราะห์ ตรวจวัดขนาดต้นข้าว และรวมถึงการทดสอบการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรในห้องปฏิบัติการ จาก ดร. สิริภัทร ชมัฒพงษ์ วิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญรูป		ฉ
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
	1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
	1.3 .ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
	1.4. สมมุติฐานของโครงการวิจัยนี้	2
	1.5. ระยะทำการวิจัย	5
	1.6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
	1.7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	6
บทที่ 2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
	2.1. เซลลูโลส	7
	2.2. การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส	11
	2.3. คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส	13
	2.4. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์	13
	2.5. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส	16
	2.6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	16
	2.7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	25
	3.1. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส	25
	3.2. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักและเปลือกผลไม้เหลือทิ้ง	26
	3.3. การจำแนกระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (Species Identification)	28
	3.4. การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของไอโซเลตจุลินทรีย์	30
บทที่ 4	ผลการทดลองและอภิปรายผล	31
	4.1. คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย	31

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2. ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส..... 32

4.3. การคัดแยกและบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส..... 35

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ..... 36

5.1. คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย..... 36

5.2. การนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์..... 36

บรรณานุกรม..... 37

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 :. องค์ประกอบของลิกนินเซลลูโลส 10
ตารางที่ 2.2 : ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 14
ตารางที่ 2.3 : ตัวอย่างเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส..... 15
ตารางที่ 3.1 : ความสามารถในการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี spectrophotometry 27
ตารางที่ 3.2 : สภาวะการทำ 16S rDNA gene PCR ของแบคทีเรีย..... 30
ตารางที่ 4.1 : ตัวอย่างเชื้อ Bacillus spp. CE08 และ CE49 เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ..... 32
ตารางที่ 4.2 : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทที่คัดแยกได้ 33
ตารางที่ 4.3 : ปัจจัยอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเชื้อ *Bacillus* spp. CE08 และ CE49 33
ตารางที่ 4.4 : ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส จากไอโซเลท *Bacillus* spp. CE08 และ CE49..... 34
ตารางที่ 4.5 : ปัจจัยของสับสเตรทต่างๆที่มีต่อความสามารถในการย่อยเซลลูโลสของเชื้อ *Bacillus* sp. 35

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 : โครงร่างของงานวิจัยเรื่องการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพใน
การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส..... 4
รูปที่ 2.1 : โครงสร้างของเซลลูโลส..... 8
รูปที่ 2.2 : กระบวนการผลิตไบโอเอทานอลและแนวทางของกระบวนการสร้างสารชีวภาพด้วยการใช้
เอนไซม์และจุลินทรีย์..... 8
รูปที่ 2.3 : โครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อยบีต้า-ดี-กลูโคไพราโนส 10
รูปที่ 2.4 : ตัวอย่างการเจริญเติบโตของ *P. oryzae* ในสภาวะมีเงินนาโน..... 12
รูปที่ 4.1 : แบคทีเรียที่คัดแยกได้ ที่สามารถย่อย CMC 31
รูปที่ 4.2 : pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื่อ CE08 และ CE49..... 34

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในสภาวะปัจจุบันประเทศไทยจำเป็นต้องมีการพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพ เพื่อเป็นพลังงานทดแทน ช่วยลดและประหยัดพลังงาน ลดการนำเข้าเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่เป็นเป้าหมายหลักของ ที่รวมอยู่ในยุทธศาสตร์การพัฒนาพลังงานของประเทศไทยในปัจจุบัน เพื่อเป็นการลดการนำเข้าน้ำมัน และยังสามารถพึ่งพาตนเองด้านพลังงานได้ เป็นทางเลือกให้กับประชาชนตามแนวทางเศรษฐกิจพอเพียงและการพัฒนาที่ยั่งยืน แหล่งพลังงานที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน คือ เอทานอล สามารถใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานโดยเอทานอลที่ได้สามารถนำไปผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อลดการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงให้น้อยลงได้ ซึ่งเรียกว่า แก๊สโซฮอล์

ในการผลิตเอทานอลด้วยการเลือกใช้วัตถุดิบ ที่สามารถแบ่งแยกออกได้เป็น 2 ประเภท คือ 1. น้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล 2. แป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพด ทั้งนี้วัตถุดิบดังกล่าวพบว่า ไม่เพียงพอต่อการผลิตเอทานอลในระยะยาว เพราะพืชอาหารเหล่านี้หากนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล อาจส่งผลให้มีราคาสินค้าอาหารในประเทศที่สูงมากขึ้น ทำให้ได้มีความสนใจเลือกใช้วัตถุดิบ เซลลูโลส ที่ได้จากพืชผัก รวมทั้งพืชผักทางการเกษตรที่เหลือทิ้ง เช่น กากอ้อย ซังข้าวโพด ผักเหลือทิ้ง เปลือกไม้ เปลือกและเมล็ดผลไม้ เหง้ามันสำปะหลัง ทั้งนี้รวมถึงวัชพืช เช่น ผักตบชวา และหญ้า เพื่อเป็นการลดปัญหามลพิษจากการเผาทิ้งวัสดุดังกล่าว และยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์สูงขึ้นด้วย (Rattanachomsri et al., 2009)

พืชผักที่เหลือทิ้งหลังจากกระบวนการตัดคัดแยก และผักผลไม้ที่ไม่สามารถนำไปขายได้ สามารถเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ทางหนึ่ง เนื่องจากผักมีสารเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักดังที่ได้กล่าวไว้ และผักเหล่านี้จัดว่าเป็นแหล่งวัตถุดิบที่หาได้ง่าย สามารถเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ด้วยที่มีหน่วยย่อยชองน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลยาว มีพันธะเกาะกันแข็งแรง ยากแก่การย่อยสลายโดยธรรมชาติ แต่สามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยปกติเซลลูโลสจะอยู่รวมกับส่วนประกอบอื่น ๆ ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นส่วนเสริมที่ขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาของเซลลูโลสกับเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลส

ในปฏิกิริยาการย่อยสลายทางชีวภาพ เซลลูโลสสามารถย่อยสลายได้ดีด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูเลสให้มีขนาดเล็กลง ได้สายสั้นของกลูโคส โดยเอนไซม์นี้สามารถพบได้จากสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่นแบคทีเรีย และรา (Tsao และ Chiang, 1983) โดยส่วนใหญ่จะถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ โดยการถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโดยสิ่งแวดล้อมมาย่อยเซลลูโลสที่อยู่นอกเซลล์ แล้วได้น้ำตาลที่กTrichoderma sp. (Dashtban *et al*., 2009) เอนไซม์นี้ได้มีการศึกษาและทำการสกัดแยกให้บริสุทธิ์และใช้ในอุตสาหกรรมการย่อยกระดาษ และเส้นใยต่างๆ มากมาย

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1. ศึกษาและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากผักเหลือทิ้ง

1.2.2. พัฒนาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ต่อไป

1.2.3. เตรียมและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ และสามารถประยุกต์ใช้ในการย่อยวัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อไป

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

-ผักและเปลือกผลไม้เหลือทิ้งได้จากตลาดเทเวศร์ ใกล้มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

-กลุ่มจุลินทรีย์ชนิด แบคทีเรียและเชื้อรา ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส อย่างละ 3 ไอโซเลต ชนิดที่เป็น aerobic microorganisms ในสภาวะ pH 5.5-8 อุณหภูมิ 25-65°C

สถานที่

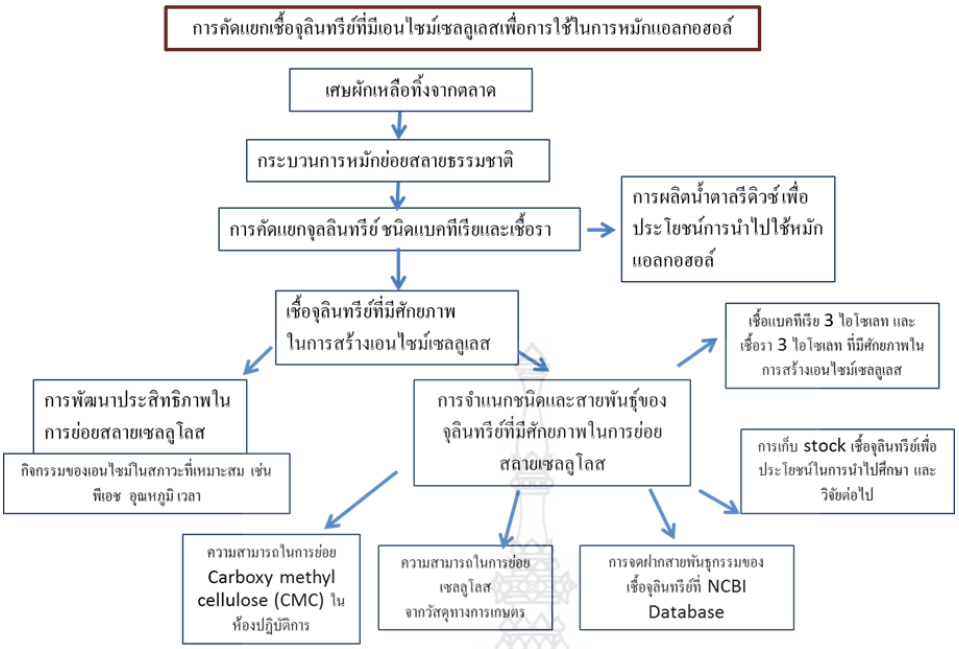
-ศูนย์เทเวศร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

1.4. สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัยนี้

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส หรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ในอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม (Dashtban et al., 2009) เช่น การใช้ในการสลายพืชผัก และกากเหลือจากเกษตรกรรม การย่อยขยะเป็นปุ๋ยหมัก เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ได้แก่ อุตสาหกรรมกระดาษ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสบางชนิดที่เหมาะสมมีส่วนช่วยลดเวลาในการตี (beating time) และช่วยต้านไข (grease resistancc) ทำให้กระดาษมีคุณภาพดี, ในกระบวนการน้ำผักกระป๋อง, ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้เปรี้ยวและทำให้ใส (extraction and clarification of juice) แล้วยังทำให้น้ำาผลไม้ที่ได้เป็นเนื้อเดียวกัน เอนไซม์เซลลูเลสามารถใช้

เป็นส่วนประกอบในส้วมถังเกรอะ (septic tank) เอนไซม์เซลลูเลสจาก Trichoderma reesei ช่วยสลายผนังเซลล์พืช ทำให้มีการเชื่อมโปรโตพลาสต์ (protoplast) ของเซลล์พืชสองชนิดซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ที่มีค่าต่อวงการเกษตรแผนใหม่ และใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากเมล็ดธัญพืช ใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยหมัก นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาผลิตเป็นยาอีกด้วย โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นช่วยเป็นยาขับลมในกระเพาะ และช่วยลดอาการแน่นท้อง เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยเส้นใยได้

ในการศึกษานี้ทีมผู้วิจัยต้องการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกนอกเซลล์ ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส จากวัสดุที่เหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ ที่สามารถเป็นสารตั้งต้นของการหมักแอลกอฮอล์ และหรือไปใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ ประโยชน์ที่ได้มาจากในกระบวนการย่อยเซลลูโลสนี้เป็นวิธีทางชีวภาพ ที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษของสารเคมีที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้ยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาให้เกิดมูลค่า ขั้นตอนหลักของงานวิจัย ทีมผู้วิจัยจะทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ทั้งชนิดแบคทีเรียและเชื้อราจากเศษผักเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้จากตลาดเทเวศร์จำนวน 6 ไอโซเลทของเชื้อจุลินทรีย์มาทำการทดสอบดูประสิทธิภาพในการสร้างเซลลูเลส โดยดูผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยเชื้อที่บริสุทธิ์ และเชื้อผสม และยังดูศักยภาพในการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจริง พร้อมทั้งทำการจำแนกชนิด สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว โดยมีรายละเอียดโครงร่างของงานวิจัยนี้ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงร่างของงานวิจัยเรื่องการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสจากผักเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้ เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์

1.5 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

กิจกรรม/ขั้นตอนการดำเนินงาน	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. ศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย												
2. เตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี วัตถุดิบ เพื่อการศึกษาการย่อยเซลลูโลสของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากผักเหลือทิ้ง												
3. เลี้ยงและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรีย และเชื้อราที่เจริญขึ้นบนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในอาหารแข็ง												
4. ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทที่ได้ในสภาวะของอุณหภูมิ พีเอช และเวลา ที่แตกต่างกัน												
5. ศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักและเปลือกผลไม้เหลือทิ้ง ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์และเชื้อผสม												
6. จำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ ประกอบด้วย แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ และ เชื้อรา 3 สายพันธุ์												
7. เพาะเลี้ยง เพิ่มปริมาณ 3 เชื้อไอโซเลตจุลินทรีย์ ในปริมาณมาก เพื่อการสต๊อกเก็บเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ใช้ในการศึกษาต่อไป												
7. รายงานผลและจัดทำรูปเล่มและนำเสนอผลงานสู่ระดับนานาชาติ												

1.6. **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

งานวิจัยที่ได้นี้จะเป็นทั้งด้านวิชาการคือเป็นองค์ความรู้ ได้ทราบแนวทางของกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพ เพื่อให้ได้น้ำตาลไปใช้ในกระบวนการหมักให้ได้แอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ มีศักยภาพในการย่อยเซลลูโลส ได้เชื้อที่มีศักยภาพที่มีเอนไซม์เซลลูเลส และมีประสิทธิภาพในการย่อยผักและผลไม้ และได้ทราบลำดับเบสของ rDNA ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่มีการฝากไว้ที่ ribosomal DNA database project และ NCBI

งานวิจัยที่ได้นี้จะเป็นด้านนโยบาย ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาจะเป็นแนวทางที่สนับสนุนการจัดการที่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และยังสนับสนุนแนวทางการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่ไม่มีคุณค่าเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ อันเกี่ยวข้องกับการผลิตแอลกอออล์ด้วยการใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างคุ้มค่า สามารถเป็นแนวทางการลดปัญหาของการใช้เชื้อเพลิงนำเข้า ทั้งยังจะเป็นประโยชน์ในระดับของสังคมและชุมชนถึงความสามารถกระบวนการที่ได้จากการศึกษานี้ไปใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสจากพืชต่าง ๆ ให้เกิดประโยชน์การนำไปใช้ที่จหลากหลายได้ต่อไป และผลงานที่ได้จากการวิจัยนี้จะถูกนำเสนอเผยแพร่ในระดับชาติหรือนานาชาติต่อไป

1.7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลผลิต	ตัวชี้วัด			
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	เวลา	ต้นทุน
1. นำเสนอผลงานในระดับชาติ/นานาชาติ	1 ครั้ง	งานประชุมระดับชาติ/นานาชาติ	1 ครั้ง	1,000บาท
2. ชนิดเชื้อจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลนานาชาติของ rDNA Database Project	3 สายพันธุ์	rDNA sequences ในฐานข้อมูล NCBI (PubMed)	3 หัวข้อ	-
3. จัดทำผลงานฉบับสมบูรณ์	1 ฉบับ	เพื่อเผยแพร่เป็นความรู้พื้นฐานเบื้องต้นให้กับผู้สนใจ	1 ฉบับ	1,000 บาท

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การดำเนินงานวิจัยเรื่อง การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากผักเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้ เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ มี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้

2.1. เซลลูโลส

2.2. การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส

2.3. คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

2.4. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์

2.5. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส

2.6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

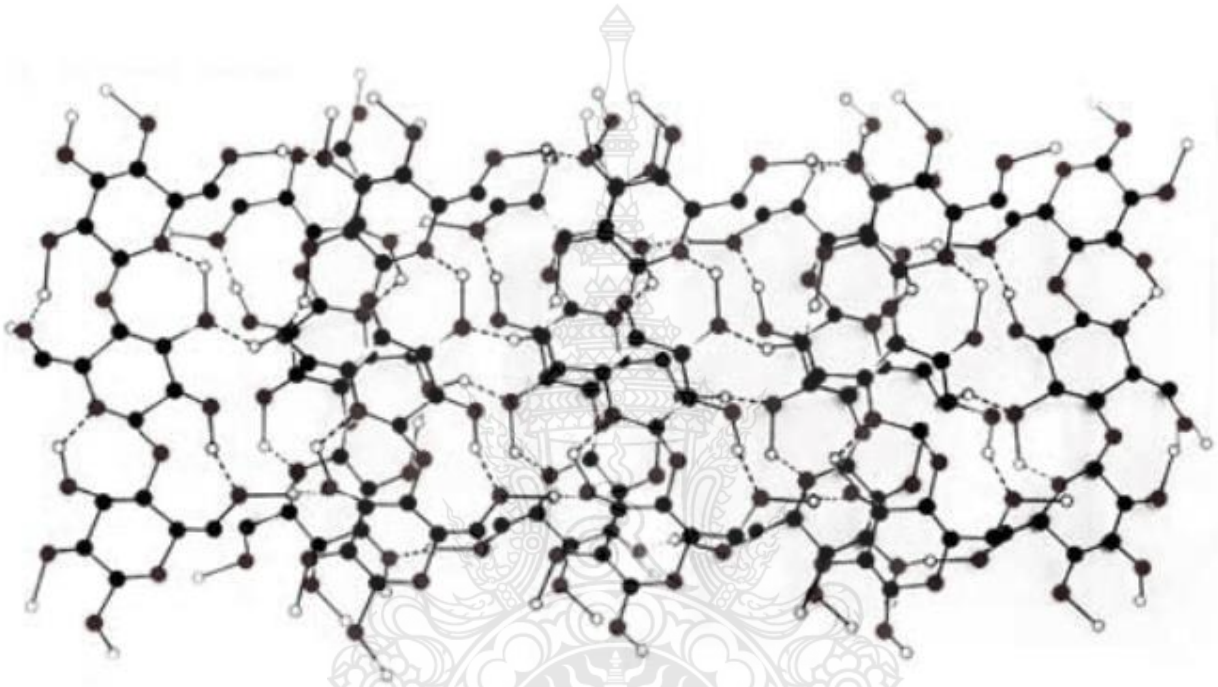
2.7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. เซลลูโลส

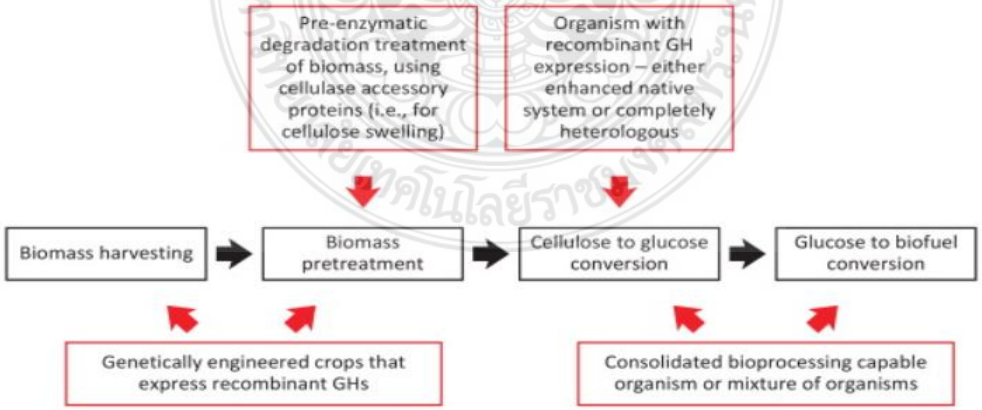
เซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กมาก ลักษณะเป็นแท่ง (rod-shaped units) ที่เรียกว่า ไมเซล (micells) บางครั้งประกอบเป็นหน่วยใหญ่จากไมเซล 10 ถึง 20 หน่วย เป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งโครงสร้างมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นผลึก (cystalline) จึงถูกย่อสลายได้ยาก เป็นส่วนประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุด ประมาณร้อยละ 45 ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ เช่น ฝ้าย มีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่าร้อยละ 97-99 จัดว่าเป็นเซลลูโลสที่บริสุทธิ์ ประกอบด้วยสายโพลิเมอร์เรียงขนาน และยึดติดกันด้วยแรงกระจายตัว (dispersion force) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่น (**รูปที่ 2.1)** ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ได้ช้า เพราะสารไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลลูโลสได้ ยังพบในสาหร่าย และฟังไจหลายชนิด รวมทั้งในสัตว์ทะเลหลายชนิด และเนื่องจากเซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อม โดยจุลินทรีย์จึงเป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญต่อวัฏจักรคาร์บอน

เซลลูโลส เป็นแหล่งวัตถุดิบหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการนำมาผลิตเอทานอลเป็นอย่างมาก เนื่องจากเซลลูโลส เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช และเป็นส่วนที่สำคัญของผนัง เซลล์มีหน้าที่ช่วยเสริมโครงสร้างความแข็งแรงให้แก่พืช เซลลูโลสเมื่อถูกย่อยจะแตกตัวออกให้ น้ำตาลกลูโคสจำนวนมากเพราะลักษณะโครงสร้าง

โมเลกุลของเซลลูโลส ดังนั้นทำให้เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลสมีสมบัติและลักษณะทางเคมีเช่นเดียวกับเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง ซึ่งถ้าสามารถนำเซลลูโลสดังกล่าวมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจะทำให้ช่วยเพิ่มมูลค่าของเสีย ช่วยลดปัญหามลพิษจากการเผาวัสดุดังกล่าวทิ้ง และยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้ง มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงขึ้นด้วย กระบวนการย่อยเซลลูโลสให้ได้เอทานอลดังแสดงในตัวอย่าง**รูปที่ 2.2**

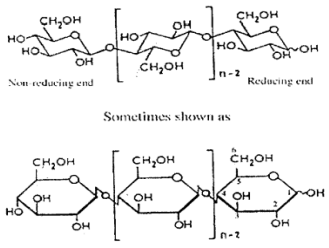


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส (Cellulose)



รูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตไบโอเอทานอลและแนวทางของกระบวนการสร้างสารชีวภาพด้วยการใช้เอนไซม์และจุลินทรีย์

เซลลูโลสเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สามารถถูกย่อยสลายให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมักพบว่าเป็นผลิตผลพลอยได้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ที่จำเป็นต้องมีการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของเซลลูโลสออกก่อน วัตถุดิบประเภทเหล่านี้ที่มี เฮมิเซลลูโลสและ ลิกนิน ซึ่งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ประกอบด้วยลิกนินเซลลูโลส ที่เป็นสารอินทรีย์หลักประเภทคาร์โบไฮเดรต ที่เกิดมาจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลยาว ที่สามารถนำไปแปรรูปเป็นเอทานอลต่อไปได้ แต่ทั้งนี้พบว่าเซลลูโลสที่อยู่ในพืชมีปริมาณที่แตกต่างกันไป และถูกย่อยสลายได้ยาก จำเป็นต้องใช้วิธีทางเคมี และชีวภาพในการย่อยสลาย ตัวอย่างขององค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืชชีวมวลแตกต่างกันไปดังแสดงใน**ตารางที่ 2.2** โดยที่โครงสร้างสายของเซลลูโลสจะต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก โดยเรียงต่อกันเป็นสายตรงที่ไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา จำนวนหน่วยย่อยที่มาต่อขึ้นอยู่กับชนิด และอายุของพืช อาจมี 200-15,000 หน่วย หรือเป็นล้านหน่วย คอนฟิกูเลชัน (configulation) ของบีต้า-ดี-กลูโคไฟราโนส (β-D-glucogyranose) ส่วนใหญ่จะเป็นรูปแบบเก้าอี้ (chair form) (ภาพที่ 8.1) และโมเลกุลของกลูแคนจะมีผิว (surface) เป็นไฮโดรเจนอะตอม โมเลกุลของสายกลูแคนมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) การต่อกันด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก จึงเกิดแรงที่ท าให้สายกลูแคนหมุนบิดตัว ได้ 180 องศา รอบแกน จึงทำให้แต่ละสายมีรูปร่างลักษณะที่เปรียบเสมือนริบบิ้น (flat ribbon) สายกลูแคนแต่ละสายจะมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริล ซึ่งอาจจะม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส หรือม้วนทับกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใย จากการเรียงตัวของโมเลกุลของเซลลูโลสดังกล่าวท าให้สามารถแบ่งรูปร่างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชได้ 3 แบบ ที่แตกต่างกัน ดังแสดงใน**รูปที่ 2.3** (Norkrans, 1967) จากการศึกษาโดยใช้เอกซเรย์ดิฟแฟคชัน (x-ray diffraction) พบว่าไมโครไฟบริลบางส่วนจัดตัวอย่างมีระเบียบ (crystalline) แต่บางส่วนจัดตัวไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ซึ่งในธรรมชาติจะมีส่วนจัดตัวเป็นระเบียบร้อยละ 85 แต่ส่วนที่ไม่เป็นระเบียบร้อยละ 15 ผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจับตัวอยู่เป็นแถบ ๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอดแยกโดยช่องว่าง เมื่อเซลล์แก่เต็มที่ภายในช่องว่างจะเต็มไปด้วยลิกนิน ซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสถูกห่อหุ้มด้วยลิกนิน



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส และหน่วยย่อยบีต้า-ดี-กลูโคไฟราโนส ที่ต่อด้วยพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยย่อยบีต้า-ดี-กลูโคไฟราโนสกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยย่อยถัดไป (พิจิตรา, 2548)

ตารางที่ 2.1. องค์ประกอบของลิกนินเซลลูโลส

Biomass	องค์ประกอบในเซลล์พืช		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าว (Rice straw)	32.1	24	12.5
ฟางข้าวสาลี (Wheat straw)	30.5	28.4	18
ซังข้าวโพด (Comcob)	45	35	15
ต้นปาล์ม (Palm tree)	37.14	30.59	22.32
ต้นมันสำปะหลัง (Potato)	32.2	13.85	26.96
ชานอ้อย (Bagasse)	33.4	30	18.9

ที่มา: Ali et al., 1991.

2.2. การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส

ในธรรมชาติการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ที่เกิดโดยอาศัยการย่อยสลายจุลินทรีย์หลายชนิดรวมกันในสภาพที่มีออกซิเจน ผลที่ได้จากการย่อยสลาย จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อิวมัส ความร้อน และจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ ได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม มีการให้อากาศ และอุณหภูมิที่เหมาะสม มีแหล่งอาหารเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อ

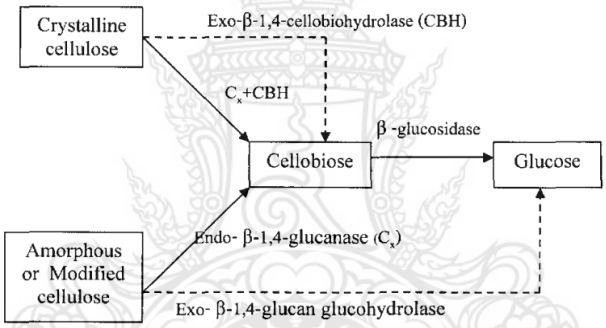
ใช้ในระบบเมตาบอลิซึม และการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน การย่อยสลายเซลลูโลส จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดเจน เอทธานอล กรดฟอร์มิก กรดซัคซินิก กรดบิวทีริก และกรดแลกติก เป็นต้น ซึ่งการย่อยด้วยวิธีนี้ข้อดีกว่าการย่อยด้วยวิธีทางเคมี ซึ่งมีการย่อยสลายด้วยสารเคมี อาทิเช่น การใช้กรด การย่อยสลายวิธีนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นน่ำตาลกลูโลสบางส่วนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไป ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่น และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นที่ติดมากับเซลลูโลส ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้โครงสร้างในส่วนที่เป็นคริสตัลลีน ก็จ าเป็นต้องใช้กรดที่ความเข้มข้น และอุณหภูมิสูงในการย่อยสลายจึงจะได้น้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาย่อยจึงเกิดแบบรุนแรง ภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงสูง และกรดที่ถูกทิ้งออกมายังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย แต่วิธีนี้ฏิกิริยาการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15-20 นาที

การย่อยด้วยวิธีทางชีวภาพอาจจะมาจากการใช้สารที่ปล่อยมาจากจุลินทรีย์ โดยการแยกสารนำมาใช้โดยตรง เช่น การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส วิธีนี้เป็นวิธีที่เฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับสารประกอบเซลลูโลส โดยจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปนมา จึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งค่อนข้างบริสุทธิ์ ลักษณะการย่อยจะเกิดขึ้นช้าๆ ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในที่มีอุณหูมิซึ่งสิ่งมีชีวิตสามารถเจริญเติบโตได้ และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นก็ไม่รุนแรง นอกจากนี้ก็อาจไม่จำเป็นต้องใช้ภาชนะที่ทนทานต่อการกัดกร่อน ต้นทุนจึงต่ำกว่า และยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หากแต่วิธีนี้น้ำตาลกลูโคสที่ได้อยู่ในรูปสารละลายเจือจาง (Abu Baker et al., 2010) เอนไซม์ที่ถูกย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกรวมว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ภายในโครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลสหน่วยเล็กที่สุดหากการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส ระบบของเอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์ (Enzyme Classification (E.C)) ดังนี้

2.2.1. เอนโดกลูคาเนส หรือเอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส (E.C.3.2.1.4) (พิจิตรา, 2548) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยตัดย่อยเซลล์ที่ ตำแหน่งพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (random) ท าให้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligo-saccharides) เซลโลเพนธาโอส (cellopentaose) เซลโลไตรโอส(cellotriose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักใดขึ้นอยู่กับสมบัติของแต่ละเอนไซม์

2.2.2. เอกโซกลูคาเนส หรือเอกโซ-1,4-กลูคาเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91) พบว่ามักท าหน้าร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการท างานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส

2.2.3. เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคไซเนส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง กลไกลการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน ้าตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกันแสดงเป็นแผนภูมิได้ดัง**รูปที่ 2.4**



รูปที่ 2.4 กลไลการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส (อมรรัตน์, 2547)

ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatinafulica) และจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นโปรโตซัว แบคทีเรีย แอคติโนมัยสิท และเชื้อรา จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความสามารถในการย่อยลสายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่ พบว่าเชื้อรา (celllulolytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่เป็นเอกซ์ตร้าเซลลูลาร์เอนไซม์ (extracellular enzyme) คือ เซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ท าให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลส และสะดวกต่อการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในการศึกษา หรือใช้ในอุตสาหกรรม (พิจิตรา, 2548)

2.3. คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน มีสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด (Siriporn *et al.*, 2012) นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.8 ถึง 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 และ 4.0 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปี หรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอน ด้วยอะซิโตน หรือเอทธานอล โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ย่อมมีสมบัติแตกต่างกัน

2.4. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยจุลินทรีย์

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีสายยาว จุลินทรีย์เองไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง แต่จุลินทรีย์สามารถสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้ (พรเทพ, 2528)

จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลส มีหลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในกลุ่มเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสิท ดังแสดงใน**ตารางที่ 2.2** (พรเทพ, 2538)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยสิท
Alternaria sp.	*Bacillus sp.*	*Micrormonospora sp.*
Aspergillus sp.	*Cellulomonas sp.*	*Nocardia sp.*
Chaetomium sp.	*Clostridium sp.*	*Streptomyces sp.*
Corprinus sp.	*Corynebacterium sp.*	*Streotosporangium sp.*
Foames sp.	*Cytophaga sp.*	
Fusarium sp.	*Polyangium sp.*	
Myrothecium sp.	*Pseudomonas sp.*	
Penicillium sp.	*Sporocytophaga sp.*	
Polyporus sp.	*Vibrio sp.*	
Rhizoctonia sp.		
Sporotrichum sp.		
Thielavia sp.		
Trametes sp.		
Trichothecium sp.		
Trichoderma sp.		
Verticillium sp.		
Zygorhynchus sp.		

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิต ซึ่งได้แก่ อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศ และอัตราการเขย่า

เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสสามารถเริ่งปฏิกิริยาการสลายพันธะบีต้า-1,4 ไกลโคซิดิค หากการย่อยสมบรูณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายเซลลูโลส กลูโคสที่อยู่ในพืชมาจากการสังเคราะห์แสงของพืช ซึ่งเป็นทรัพยากรที่ใหญ่ที่สุดของธรรมชาติในการผลิตเซลลูโลส จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Polyporus* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sporotrichum* sp. และ *Zygorhynchus* sp. เป็นต้น แบคทีเรีย เช่น *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Sporocytophaga* sp. และ *Vibrio* sp. เป็นต้น และ แอคติโนมยัสิท เช่น *Streptomyces* sp., *Micromonospora* sp., และ *Streptosporangium* sp. เป็นต้น (พรเทพ, 2537) งานวิจัยนี้มีวัตถประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในการ

ย่อยสลายกากมันสำปะหลังเพื่อผลิต เป็นน้ำตาลซึ่งเป็นการนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ไม่มีมูลค่ามาใช้ประโยชน์และยังเป็นการลดของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อรา

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตเพื่อการค้าส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์เซลลูเลสผสม ที่สกัดได้จากเชื้อราชนิดที่แตกต่างกันไป และให้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้องค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการผลิต การเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสกระทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง ขึ้นอยู่กับความเหมะสม การที่จะให้ผลผลิตเอนไซม์สูงและให้คุณภาพดีนั้นจะต้องมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ชนิดอาหารที่ใช้ต้องเหมาะสม พีเอช การปนปื้อน รวมทั้งคำนึงถึงราคาต้นทุนในการผลิตด้วย นอกจากนี้การใส่สารเร่งการเจริญ แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ สารเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ก็เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงด้วย สารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ สารประกอบเซลลูโลส อนุพันธ์ของเซลลูโลส และสารที่พันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก เช่น cellobiose, sepharose และ lactose เป็นต้น (Tsao and Chaing, 1983)

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (พรเทพ, 2538)

Agaricus bisporus	*Chrysosporium lignorum*
Ascobolus furfuraceus	*Cladosporium Cladosporioides*
Aspergillus aculeatus	*Coriolus versicolor*
A. Fumigates	*Dichomistus sqalens*
A. Niger	*Eupenicillium javanicum*
A. phoenicis	*Fusarium moniliforme*
A. Terreu	*Fusarium sp.*
	F. solani
A. wentii	*Thraustotheca clavata*
Btryodiplodia theobromac	*Torula thermophile*
Chaetomium globosum	*Volvariella volvacea*
	Verticillium albo-atrum

2.5. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส

มีการศึกษาให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไลการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยเซลลูโลส โดยมีการใช้เทคนิคในการแยก(isolation) ทำบริสุทธิ์(purification) ก่อนการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ (characterization) โดยงานวิจัยเกี่ยวกับการทำเอนไซม์เซลลูเลสให้บริสุทธิ์นั้นสามารถใช้เทคนิคที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสารแต่ละตัวที่ต้องการแยก เช่น ขนาดของโปรตีน ประจุ, ความสามารถในเกาะกับสารชีวโมเลกุล (พิจิตรา, 2548) เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส และจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส หรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ในอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม (Dashtban et al., 2009) เช่น การใช้ในการสลายพืชผัก และกากเหลือจากเกษตรกรรม การย่อยขยะเป็นปุ๋ยหมัก เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ได้แก่ อุตสาหกรรมกระดาษ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสบางชนิดที่เหมาะสมมีส่วนช่วยลดเวลาในการตี (beating time) และช่วยต้านไข (grease resistance) ทำให้กระดาษมีคุณภาพดี, ในกระบวนการน้ำผักกระป๋อง, ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้เปรี้ยวและทำให้ใส (extraction and clarification of juice) แล้วยังทำให้น้ำาผลไม้ที่ได้เป็นเนื้อเดียวกัน เอนไซม์เซลลูเลสามารถใช้เป็นส่วนประกอบในส้วมถังเกรอะ (septic tank) เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* ช่วยสลายผนังเซลล์พืช ทำให้มีการเชื่อมโปรโตพลาสต์ (protoplast) ของเซลล์พืชสองชนิดซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ที่มีค่าต่อวงการเกษตรแผนใหม่ และใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากเมล็ดธัญพืช ใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยหมัก นอกจากนี้ยังมีการน าเอนไซม์เซลลูเลสมาผลิตเป็นยาอีกด้วย โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นช่วยเป็นยาขับลมในกระเพาะ และช่วยลดอาการแน่นท้อง เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยเส้นใยได้

2.6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.6.1. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูง และมีองค์ประกอบครบท 3 ส่วน คือ endoglucanase ,exoglucanase, β- glucosidase

2.6.2. ส่วนประกอบทางอาหารในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะไม่มีอาหารที่จำเพาะต่อการเพาะเลี้ยงและการผลิตเซลลูเลส แต่จะประยุกต์ใช้ตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังการทดลองของ (Abhay Kumar and Dube, 1992) ที่ใช้อาหาร 3 ชนิด ในการเพาะเลี้ยง Vibrio agar-liquefaciens ได้แก่ Kodota medium, Zobell medium, Mandels and Sternberg medium ทั้ง 3 ชนิดมี Carboxymethyl cellolose (CMC) ร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนแต่มีองค์ประกอบอื่นๆแตกต่างกัน พบว่า exglucanase จะผลิตได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงใน Mandels and Sternberg medium ส่วน endoglucanase และ β- glucosidase จะให้ปริมาณสูงเมื่อเพาะเลี้ยงใน Kodota medium และ Zobell medium

1) แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอน เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเซลลูเลส โดยส่วนใหญ่ได้แก่ เซลลูโลส Carboxymethyl cellolulose (CMC) หรือพวกวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

2) แหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการผลิตเซลลูเลส เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ ร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์ แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักได้แก่ แก๊สแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนอาจใช้ในรูปของกรดอะมิโน หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์เจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน

2.6.3. สภาวะของการเพาะเลี้ยงในการผลิตเซลลูเลสขึ้นกับปัจจัยต่างๆได้แก่

1) ความเป็นกรด-ด่าง การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และการทำงานของเอนไซม์จะถูกควบคุมโดยพีเอช พีเอชที่เหมาะสมต่อความเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดยทั่วไปยีสต์ และราเจริญได้ดีในชวนพีเอชที่ต่ำกว่าแบคทีเรีย ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารปกติ อาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่จะช่วยรักษาระดับของพีเอชให้คงที่ แต่ในกระบวนหมักหลายชนิด พีเอชในน้ำหมักเปลี่ยนแปลงเร็วมากจนไม่อาจรักษาพีเอชไว้ได้ เป็นผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญหรือผลิตผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในการหมักแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงหนึ่งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงสุด จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีและมีกิจกรรมต่างๆในสภาพเป็นกลาง (จิตตเสน, 2529) ได้เพาะเลี้ยง Homicola nigrescens CM 33 ใน Cellulose broth พบว่า pH 5.5 มีความเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด และที่ pH 4.5 จะไม่มีการผลิตเซลลูเลส และเช่นเดียวกับเชื้อ *Acetobacter xylinum* KU-1 แต่ (ระพีพรรณ, 2536) พบว่าเมื่อใช้cellulose broth ที่

pH ต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ruminococcus albus* 21 Aa ที่ pH 6.8 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด

2) อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ในธรรมชาติจุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-90 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ช่วงหนึ่ง ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำว่าช่วงนี้จะส่งผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่ส่งผลให้มีการเจริญสุงสุดในช่วงเวลาสั้น เรียกว่า optimum growth temperature (Honda et al, 1985) ตัวอย่างเช่น จิตตเสน (2529) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Homicola nigrescens* CM 33 B ในอาหาร cellulose broth พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะมาต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 45 องศาเซลเซียส ส่วนระพีพรรณ (2536) ที่ใช้ cellulose broth ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ruminococcus albus* 21 Aa บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 37 องศาเซลเซียส

3) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง การผลิตเซลลูเลสของเชื้อแต่ละชนิดจะใช้เวลาต่างกัน โดยจิตตเสน (2529) ได้เลี้ยงเชื้อ *Homicola nigrescens* CM 33 B ในอาหาร cellulose broth พบว่า เวลาที่เหมาะมาต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนระพีพรรณ (2536) ได้เพาะเลี้ยง *Ruminococcus albus* 21 Aa พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด

2.7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัสดุเหลือทิ้งและโครงสร้างของพืช

จากอดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในงานด้านอุตสาหกรรมมากมาย โดยเฉพาะในด้านอาหาร เช่นการผลิตขนมปัง เครื่องดื่ม น้ำเชื่อม เนยแข็ง ไอศกรีม น้ำผลไม้ ผัก ไข่ เนื้อ สิ่งทอ กระดาษ ซักล้าง และด้านการแพทย์ ในต่างประเทศได้มีการนำเอนไซม์เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลสมาใช้อย่างกว้างขวาง และประเทศไทยได้มีการนำมาใช้มากขึ้นเรื่อย ๆ โดยผู้นำรายใหญ่ที่นำเอนไซม์เหล่านี้มา เช่น บริษัทอิสทเอเชียติก อายิโน๊ะโมะโต๊ะ ฮงฮวด และทาเคตาจำกัด อุตสาหกรรมที่มีการนำเอาเซลลูเลสมาใช้ ได้แก่ อุตสาหกรรมผลิตกลูโคส แป้ง สิ่งทอ เบียร์ น้ำผลไม้ น้ำมันพืช กระดาษ และน้ำนมถั่วเหลือง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์เซลลูโลส

ในปัจจุบันได้มีความสนใจในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสใส่ใช้มากขึ้น โดยต้องการทำให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับต่างประเทศ เพื่อการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม เปลี่ยน

สถานภาพของทรัพยากรธรรมชาติให้เป็นมูลค่า หรือมีคุณภาพสูงขึ้น เช่น การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากกลุ่มราแอคติโนมัยซีส และแบคทีเรีย ศึกษาดูความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

เพื่อการทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไลการทำงานเอนไซม์เซลลูเลส ต่อการย่อยเซลลูโลสนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้เทคนิคในการแยก(isolation) ทำบริสุทธิ์ (purification) แล้วจึงสามารถศึกษาสมบัติของเอนไซม์ (characterization) ได้ พบว่างานวิจัยเกี่ยวกับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลส ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายด้วยการใช้เทคนิคส่วนใหญ่ เพื่อดูคุณสมบัติของสารแต่ละตัวที่ต้องการแยก เช่น ขนาดของโปรตีน, ประจุ, ความสามารถในเกาะกับสารชีวโมเลกุล เป็นต้น จากงานการศึกษาของ Li et al (2010) ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus subtilis* YJ1 โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatograpy) และเจลฟิวเทชัน (gel filtration) (Li et. al., 2010) เช่นเดียวกับการทดลองของ Arifin และคณะ ที่ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus pumilus* EB3 (Arifin et. al., 2006) นอกจากนี้ยังมีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* strain CH43 และ HR68 โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟส, เจลฟิวเทชั่น, โครมาโตกราฟีแบบไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิง (isoelectric focusing chromatography) และ SDS PAGE (Abu et al., 2010)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนใหญ่มาจากการศึกษาการสร้างเอนไซม์นี้จากเชื้อจุลลินทรีย์ โดยได้จากตัวอย่างหลากหลาย เช่น พืช ผัก หญ้า ที่หมัก หรือเกิดการเน่า จากดิน จากลำไส้สัตว์กินพืช ปลวก โดยมักเริ่มที่การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่คาดว่าสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เอาตัวอย่างดังกล่าวมาเจือจางโดยวิธี 10 fold dilution แล้วนำ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC (carboxymethyl cellulose) แบบแข็ง แล้วทำการคัดเลือกแบคทีเรียและทำให้บริสุทธิ์ สามารถทดสอบดูประสิทธิภาพของเชื้อในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยวิธี Congo Red Plate assay (Lee et al., 2008) ด้วยวิธีการดู clear zone ของความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งมาจากเป็นบริเวณที่เกิดการย่อยสลายซับสเตรทโดยเอนไซม์เซลลูเลส และบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีหาลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้จากจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อแต่ละไอโซเลท โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลจาก GenBank (http://blast.ncbi. nlm.nih.gov) วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA

นฤมล (2544) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของแบคทีเรียทนร้อน ทำการคัดแยกจากตัวอย่างดินพบว่าตัวอย่างดินที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดจำนวน 2 ไอโซเลท คือ CMU4-4 และ TI-5 โดยพบว่าไอโซเลท CMU4-4 คือ Bacillus subtilis และ ไอโซเลท TI-5 คือ *Bacillus coagulans* พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 เจริญเจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คืออาหาร cellulose broth ที่มี KH_2PO_4 ร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 5.5 ที่มี Carboxymethyl cellulose ร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งคาร์บอน tryptone ร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยงปั่นเวลา 18 ชั่วโมง มีกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.281 U/ml และ specific activity 1.778 U/mg protein ส่วน *Bacillus coagulans* TI-5 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เลี้ยงในอาหาร cellulose broth ที่มี KH_2PO_4 ร้อยละ 0.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH ของอาหาร 5.5 มี cellulose acetate ร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งคาร์บอน peptone ร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.168 U/ml และ specific activity 1.108 U/mg protein เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีสภาวะที่เหมาะต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส pH 4.0-8.0 มปฏิกิริยาสูงสุดเกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากที่ปฏิกิริยาจะลดลง ส่วนเซลลูเลสที่ผลิตจาก *Bacillus coagulans* TI-5 มีสภาวะที่เหมาะต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5.0 มีความเสถียรที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศา-เซลเซียส pH 4.0-6.0 และปฏิกิริยาสูงสุดเกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที หลังจากที่ปฏิกิริยาจะลดลง

เลอลักษณ์ และคณะ (2535) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสในวัสดุอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. 26R สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบ พบว่าเชื้อราทั้ง 14 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกมา มีศักยภาพในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบ 11 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อราในสกุล *Aspergillus* และ 3 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราในสกุล *Rhizopus* และพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสจากเชื้อ *Rhizopus* sp. 26R คือ วัสดุอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของรำข้าวสาลี รำข้าวเจ้าและแกลบในอัตราส่วน 6:12:2 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 58 และpH เริ่มต้น 5.6 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ประมาณ 140 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือ 700 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักสดของวัสดุสารอาหาร

ชนิดา (2543) ได้รายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสใน shake flask ของ alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานกระดาษบางปะอิน พบว่า เปลือกข้าวโพดร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไซลาเนสเมื่อเทียบกับรำข้าว และเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหนี่ยวนำให้ *Bacillus firmus* ผลิตโปรตีนที่มีขนาด 49 39

และ33 กิโลดอลตัน เพิ่มขึ้นมากกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น โดยโปรตีนที่ผลิตได้อาจเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม xylanolytic enzyme ซึ่งมีส่วนช่วยในการย่อยไซแลนทำให้ตรวจวัดกิจกรรมของไซลาเนสได้สูงสุด และพบว่ายูเรียร้อยละ 0.40 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนาสูงสุด เมื่อเทียบกับ แอมโมเนียไนเตรต แอมโมเนียซัลเฟต โซเดียมไนเตรท โดยไซลาเนสที่ผลิตได้ใน mineral salt medium ที่มีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย ร้อยละ 0.4 เป็นแหล่งไนโตรเจนมีกิจกรรมของไซลาเนส 1.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

งานวิจัยของ Bashir et al (2013) ที่แยกจุลินทรีย์ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสจากลำไส้ปลวก กิ้งกือเม็ด (pill bugs) หนอนกอข้าวสีครีม (yellow stem-borers) พบว่า แบคทีเรียมี 42 สายพันธุ์ ดังนี้ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillaceae* ร้อยละ 50 Enterobacteriaceae ร้อยละ 26 *Microbacteriaceae* ร้อยละ 17 *Paenibacillaceae* ร้อยละ 5 และ *Promicromonosporaceae* ร้อยละ 2 อีกทั้งยังพบว่าแบคทีเรียรหัส A11 และ A21 สร้างเอนไซม์ย่อย avicel และ p-nitrophenyl-β-D-cellobiose ได้

สิริวรรณ แก้วชิงดวง (2554) ศึกษาการสภาวะการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรดที่เหมาะสมเพื่อผลิตเป็นเอทานอล พบว่าการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) โดยทำการย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และการย่อยด้วยเอนไซม์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส ย่อยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสย่อยที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่งโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 899.11 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง และเมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปหมัก พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์จะให้ปริมาณ เอทานอลที่สูงกว่าน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยกรด

ทีมงาน สุภัทร ภัทรกิจโสภณ (2551) ได้เสนอการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธีทางเคมี ให้ได้น้ำตาล โดยการย่อยสลายหญ้ากินนีสีม่วง หญ้าเนเปียร์ยักษ์ หญ้าแพนโกล่าและหญ้ารูซี่ ที่มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ด้วยกรดซัลฟูริกและการฉายรังสีแกมมาร่วมกับกรดซัลฟูริก ได้น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลฟรุ๊กโตส และน้ำตาลกลูโคส สำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล จากขนาดของหญ้า 710 µm, อุณหภูมิ 121°C เป็นระยะเวลา 10 min ด้วยความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก 5%-10% (อัตราส่วนหญ้าต่อกรดซัลฟูริก 1:10 w/v) และปริมาณรังสี 500-1100 kGy พร้อมกับการฉายรังสีแกมมาร่วมกับกรดซัลฟูริก ปริมาณน้ำตาลที่ได้ คิดเป็น 54.28%, 58.37%, 74.15% และ 65.95% (w/w) ของปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีในหญ้าตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายโดยใช้รังสีแกมมาร่วมกับกรดซัลฟูริก มีค่าสูงกว่าการใช้กรดซัลฟู

ริกเพียงอย่างเดียว 8%, 9%, 12% และ 8% (w/w) ในหญ้ากินนีสีม่วง หญ้ารูซี่ หญ้าเนเปียร์ยักษ์ และหญ้าแพนโกล่า ตามลำดับ

นุศรา จักษุทิพย์ และกิ่งกาญจน์ ม่วงไหมทอง (2547) ได้ทำการเปรียบเทียบการย่อยสลายกระดาษด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และต้ม แล้วทำการย่อยด้วยวิธีทางชีวภาพของการใช้เอนไซม์ จากกระดาษที่มีเซลลูโลสประกอบอยู่ 80.27 % เฮมิเซลลูโลส 10.45 % และลิกนิน 9.28 % เมื่อผ่านการแช่กระดาษในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 M 24 hr แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70°C นาน 90 min แล้วย่อยเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* และ *Trichoderms harzianum* และใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมักแอลกอฮอล์ จากกระดาษจำนวน 3 กรัม เอนไซม์เซลลูเลสจำนวน 75 mL และยีสต์ จำนวน 10 mL ในอาหารเสริมและสารละลายอะซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.04 M ที่มี pH เท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 35°C โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *A. fumigatus* และ *T. harzianum* สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นเอทานอลได้เท่ากับ 0 และ 0.0443 %v/v ตามลำดับ สำหรับวิธีการย่อยสลายด้วยการหมักแบบต่อเนื่องจะได้ปริมาณเอทานอล 0.2583 % v/v

สวลี ดีประเสริฐ และคณะ (2555) ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเป็นน้ำตาล โดยนำกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร มาแปรรูปเป็นน้ำตาลด้วยการดำเนินงานแบบต่อเนื่องเป็น 2 ขั้นตอน คือขั้นแรกคือใช้เอนไซม์ย่อยเซลลูโลส (CTec 2) 1 มิลลิลิตร ในการย่อยเวลา6 ชั่วโมง ให้น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด 8.21, 15.77 กรัมต่อลิตร และขั้นตอนที่สองเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ใช้เวลาในการย่อย 2 ชั่วโมง ให้น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด 18.24, 73.56 กรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสใช้เวลาในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล 12 ชั่วโมงให้น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด 65.80 , 73.56 กรัมต่อลิตร

นุศรา และ กิ่งกาญจน์ (2547) ได้ทำการศึกษาดูการย่อยสลายเซลลูโลสจากกระดาษ แล้วทำการผลิตเอทานอล ด้วยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพร่วมกัน จากการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง กับกระดาษที่มีเซลลูโลสประกอบอยู่ 80.27 % เฮมิเซลลูโลส 10.45 % และลิกนิน 9.28 % แล้วต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ให้กระดาษที่มีเซลลูโลสประกอบอยู่ 98.17 % เฮมิเซลลูโลส 0.71 % และลิกนิน 1.12 % เมื่อทำย่อยเซลลูโลสและวิธีการย่อยเซลลูโลสและหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* และ *Trichoderms harzianum* เพื่อการย่อยเซลลูโลส และใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อการหมักแอลกอฮอล์ พบว่าจากกระดาษจำนวน 3 กรัม

เมื่อย่อยด้วย เอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 75 มิลลิลิตร และยีสต์จำนวน 10 มิลลิลิตร ในอาหารเสริมและสารละลายอะซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.04 โมลาร์ ที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* และ *Trichoderms harzianum* สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นเอทานอลได้เท่ากับ และ 0.0443 %v/v ตามลำดับ

Asha และ Prema (2007) ได้ศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus pumilis* โดยทำการทดลองเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารประกอบจากแหล่งวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดต่างๆ ดังนี้ เปลือกข้าว, ฟางข้าว, ขี้เลื่อย, ชานอ้อย, กากะพร้าวและร าข้าวสาลี จากการศึกษาพบว่า ร าข้าวสาลี เป็นแหล่งอาหารที่ทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด ทั้งนี้เพราะในรำข้าวสาลีประกอบด้วยน ้าตาลที่ละลายน้ำได้ เช่น glucose 42.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง, xylose 15.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง Arabinose 3.1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และ galactose 2.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนั้นยังได้ท าการศึกษาผลของความชื้น และ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วย พบว่ามีความชื้นมากกว่า 75 เปอร์เซนต์ เป็นความชื้นที่เหมาะสมมากที่สุด สำหรับ pH 8-9 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์

Juhasz และ คณะ (2005) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C30 โดยทำการหาแหล่งชนิดของคาร์บอน (carbon source) ที่เหมาะสมที่สุดที่ท าให้เชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C30 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ ต้นสนใบสั้น, ต้นหลิว, ซังข้าวโพด และ Solka Floc ซึ่งเกิดนำวัตถุดิบเหล่านั้นมาใช้เป็นสับสเตรทนั้นต้องนามาผ่านการแปรรูปทางเคมีที่เหมาะสมก่อน จากการศึกษาพบว่า ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมท่สุดที่ทำให้ *Trichoderma reesei* RUT C30 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด ส่วน Solka Floc, ต้นหลิว และต้นสนใบสั้นให้กิจกรรมเอนไซม์รองลงมาตามลำดับ

ทีมวิจัยของ Anand et al (2009) ที่ทำการแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้สามารถย่อยเซลลูโลส ไซแลน เพคตินและแป้ง โดยแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus circulans* และแกรมลบ ได้แก่ *Proteus vulgaris Klebsiella pneumonia Escherichia coli Citrobacter freundii Serratia liquefaciens Enterobacter* sp. *Pseudomonas fluorescens P. aeruginosa Aeromonas* sp. และ *Erwinia* sp. นอกจากนั้น *Pr. vulgaris*

K. pneumonia และ *C. freundii* สร้างเอนไซม์ในกลุ่มย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic) และไซแลน (Xylanolytic) *P. fluorescens* และ *Erwinia* sp. สร้างเอนไซม์ในกลุ่มย่อยเพคติน (Pectinolytic) รวมถึง *K. pneumonia* ย่อยแป้งได้ *Aeromonas* sp. สามารถย่อย CM cellulose และ ไซแลน ส่วน *S. liquefaciens* สร้างเอนไซม์ย่อย CMcellulose ไซแลน และเพคติน ในขณะที่ *B. circulans* สร้างเอนไซม์ย่อย CMcellulose ไซแลน เพคติน และแป้ง ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียซึ่งสามารถย่อยโพลีแซคคาไรด์ทั้ง 4 ชนิดได้มากกว่า นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Enterobacter cloacae สามารถย่อย CMcellulose ไซแลน เพคติน และแป้ง ซึ่งแยกได้จากตัวอย่าง

Ekperigin (2007) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย Acinetobacter anitratus และ Branhamella sp. สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดย *A. anitratus* สามารถย่อย CMC และกลูโคสได้สูงสุดเท่ากับ 0.48 และ 0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *Branhamella* sp. ย่อย CMC และกลูโคสได้สูงสุดเท่ากับ 2.56 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* (homology ร้อยละ 99) *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 91) และ *Enterococcus raffinosus* (homology ร้อยละ 99) เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อย CMC ได้มี 9 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus thuringiensis Bacillus cereus Enterococcus raffinosus Enterobacter aerogenes Bacillus tequilensis Acinetobacter soli Enterococcus gallinarum Bacillus subtilis* และ*Enterobacter cloacae*

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยเรื่อง การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากผักเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้ เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ มีขั้นตอนการทำงานในรายละเอียดการดังต่อไปนี้

3.1. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

3.2. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักและเปลือกผลไม้เหลือทิ้ง

3.3. การจำแนกระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (Species Identification)

3.4. การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของไอโซเลตจุลินทรีย์

3.1. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

3.1.1 การเลี้ยงและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรีย

การเลี้ยงและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียที่เจริญขึ้นบนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยทำการเจือจาง (Dilution technique) ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) แล้วดูดมา 1 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคการกวาดจาน (spread plate technique) เรียบร้อยแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา สังเกตลักษณะโคโลนี แล้วเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคการ re-streak ลงในอาหาร Tryptic soy agar (TSA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่ได้นำมาส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วเลือกไอโซเลที่แตกต่างที่บริสุทธิ์มา1 ลูปมาเลี้ยงในอาหาร NB แล้วบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และลงเชื้อเหล่านี้ในอาหารแข็ง ด้วยอาหารแข็งชนิด NA และ PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ตามประเภทของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นตอนต่อไป

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลท

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อไอโซเลทบริสุทธิ์ ที่ได้จำนวน 300 ไอโซเลท บนอาหาร Carboxymethyl cellulose (CMC) agar ($NaNO_3$ 1 กรัม, K_2HPO_4 1 กรัม, KCl 0.5 กรัม $MgSO_4$ 0.5 กรัม, Yeast extract 0.5 กรัม, CMC 4 กรัม และ Agar 15 กรัม) (Kasana et al., 2008) โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ

มาประมาณ 5 โคโลนี แล้วเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาแตะบนอาหาร CMC agar จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำจานไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ที่ 28°C นาน 1 วัน สำหรับเชื้อแบคทีเรีย แล้วทดสอบโดยวิธี Gram's Iodine ด้วยการเทสารละลาย Gram's Iodine (Iodine 1 กรัม, potassium iodide 2 กรัมในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70) ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย (Kasana *et al*., 2008) และการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของการเกิดบริเวณใส (clear zone) 5 นาที แล้วเทออกเพื่อสังเกต และวัดขนาดวงใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยสลาย CMC การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแบคทีเรียทคัดเลือกได้ โดยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างวงใสจากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยเลือกใช้ positive control ขอ cellulase enzyme จาก *Apergilllus niger* (Sigma) 10 mg/ mL และน้ำกลั่น

3.2. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักและเปลือกผลไม้เหลือทิ้ง

การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักและเปลือกผลไม้เหลือทิ้ง ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์และเชื้อผสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ CMC broth และดูลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2.1 ดูการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ของเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูเลสแบบ extracellular cells

3.2.1.1. การวัดอัตราการผลิตน้ำรีดิวซ์ (ug/ mL) จากวัสดุ carboxymethyl cellulose (CMC) ในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Tabao *et al*., 2010)

การวัดน้ำตาลรีดิวซ์

ในการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะใช้วิธี Dinitrosalicylic Acid Method (Miller, 1959) ที่ได้จากสารละลาย DNS ที่ประกอบด้วย 3,5-Dintrosalicylicsacids 1.55 กรัม ฟีนอล 0.15 มิลลิลิตร โซเดียมซัลไฟต์ 0.075 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมตาร์เตรท 30 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.9 กรัมในปริมาตรรวมที่มีน้ำ 150 มิลลิลิตร ที่เก็บสารละลายในขวดสีชา โดยการใช้สารละลายมาตรฐานของปฏิกิริยาที่นำ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายของน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 1 มิลิลิตร มิลลิลิตร แทน) แล้วเติมสารละลาย DNS (3-5 Dinitrosalicylic acid) reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็น

ทันที เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร การวิเคราะห์ตัวอย่างนำ culture broth ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (culture supernatant) ซึ่งคือสารละลายเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยในหลอดทดลองมีส่วนผสม คือ สารละลายเอนไซม์หยาบปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ สารตั้งต้นที่กรณีเอนไซม์เซลลูเลสจะใช้สารละลาย CMC ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ซึ่งละลายใน citrate buffer ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8) มีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm จาก**ตารางที่ 3.1**

ตารางที่ 3.1 ความสามารถในการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี spectrophotometry

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0	0
0.2	0.004
0.4	0.009
0.4	0.009
0.6	0.018
0.8	0.052
1.0	0.079
2.0	0.213
3.0	0.397
4.0	0.542
5.0	0.648
6.0	0.808
7.0	0.918

3.2.1.2. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford Protein Assay ในสภาวะของ พีเอช อุณหภูมิ และเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์

การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีน ด้วยวิธีของ Lowry (Lowry et. al., 1951) และเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin (BSA) การทำเอนไซม์บริสุทธ์ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนโปรตีนจาก crude enzyme โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 70, 80 และ 90 % ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บเกี่ยวโปรตีนโดยปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 10,000 รอบ/ นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนดว้ย 50 mM Tris-HCl pH 9.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วไดอะไลซีส (dialysis) สารละลายที่ได้ใน 50 mM Tris-HCl pH 9.0

3.2.2 ดูการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ของเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูเลสแบบ extracellular cells ด้วยการวัดอัตราการผลิตน้ำรีดิวซ์ (ug/ mL) จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือผักเหลือทิ้งจากตลาด และเปลือกทุเรียน เปลือกขนุนและเปลือกส้มโอ

3.3. การจำแนกระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (Species Identification)

การจำแนกระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ และ เชื้อรา 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการดังนี้

3.3.1 Genomic extraction

การสกัดแยกดีเอนเอจากจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยการปั่นแยกเซลล์ด้วยการปั่นที่ความเร็วสูง 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วแยกเซลล์ แล้วทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย TE (Tris-HCl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 mM) 2 รอบ ก่อนการสกัดดีเอนเอ ซึ่งเริ่มต้นด้วยการนำเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเซลลูเลสได้ มาทำการ streak plate เพื่อแยกเชื้อใหเปนโคโลนี เดียว (single colony) ในอาหารแข็ง บมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปนเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นใช ไมจิ้มฟนที่อบฆาเชื้อแลวแตะโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 50 มิลลิลิตร บมบน เครื่องเขยา ความเร็ว 200 รอบตอนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปนเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบ เวลาทำการเก็บเกี่ยวเซลลโดยใสใน microtube ขนาด 1 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ 8,000 รอบตอนาที เปนเวลา 2 นาที เพื่อเก็บเซลลเทสารละลายสวนบนทิ้ง นำตะกอนเซลลมาลางดวย Tris – Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (TE buffer) 567 ไมโครลิตร เติม 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 30 ไมโครลิตร เอนไซม Proteinase K ความเขมขน 20 มิลลิกรัมตอมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบมไวที่ 37 องศาเซลเซียส เปนเวลา 1

ชั่วโมง แลวเติม 5M sodium chloride ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขยาใหเขากัน บมตอ 10 นาที แล้วทำการกำจัดโปรตีนโดยการเติม สารละลาย Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 1 เทา ผสมใหเขากันโดยเอียงหลอดกลับไปกลับมา จากนั้นจะนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบตอนาทีเปนเวลา 5 นาที ดูดสารละลายสวนบนใสในหลอดใหม กำจัดโปรตีนที่เหลือดวย Phenol/Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่า ซ้ำอีกครั้ง แล้วทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติม isopropanal 0.6 เทา ของปริมาตรที่มีอยู นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบตอนาทีเปนเวลา 15 นาที เทสารละลายสวนใสทิ้ง ล้างเกลือที่ติดมากับตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบตอนาทีเปนเวลา 15 นาที เทสารละลายสวน ใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอใหแหง ละลายดวยน้ำกลั่นนึ่งฆาเชื้อ 30 ไมโครลิตรเก็บไวที่ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose gel ใน 0.5x Tris – Borate – EDTA buffer (TBE buffer) โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ 4 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร ผานกระแสไฟฟากระแสตรงความตางศักย 100 โวลต เปนเวลา 60 นาที แล้วนำแผน agarose gel มายอมด้วย ethidium bromide นาน 15 นาที และ แชน้ำอีก 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใตแสงอัลตราไวโอเลต ถายภาพดวย gel documentation

3.3.2 PCR-16S rDNA sequencing ด้วยการใช้ universal primers ของ 27f และ 1505r สำหรับแบคทีเรีย จะได้ขนาดความยาว amplicon ประมาณ 1000 bp จะได้ขนาดความยาว amplicon ประมาณ 500-900 bp

ในการทำ PCRด้วย primers และใช้สภาวะของปฏิกิริยาดังแสดงใน**ตารางที่ 3.2** แล้วทดสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ว่าได้ขนาด 1.5 Kb ไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose gel ใน 0.5xTBE buffer โดยแบงผลิตภัณฑ PCR ที่ไดมา 6 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร เมื่อพบว่าได้แถบที่ต้องการถูกต้อง แล้วนำผลผลิต PCR (PCR Product) ดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป Spin CleanTM PCR Purification Kit นำตัวอย่าง PCR Product ที่ได้จะส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังต่างประเทศ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gene Bank Database

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทำ 16S rDNA gene PCR ของแบคทีเรีย

Primer	Reaction	Condition
Bact-27f Bact-1505r	1Xbuffer (100 mM KCl, 20 mM Tris) 1.5 mM $MgCl_2$, 250 µM dNTPs, 0.5 µM Primers, 1.25 units of Taq Polymerase, 1µL of DNA sample	Start 95°C 10 min 1 cycle doing for denaturation 95°C 1 min and Annealing 55°C 1.30 min for 30 cycles and then extension 72°C 1 min, extension 72°C 10 min

3.3.3 เปรียบเทียบลำดับดีเอนเอที่อ่านได้กับ rDNA database sequence ที่มีอยู่บนฐานข้อมูล NCBI และ rDNA Database Project website (http://www.uniprot.org/blast/)

3.4 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของไอโซเลตจุลินทรีย์

การพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อไอโซเลตจุลินทรีย์เพื่อการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้ใช้งานต่อไป จะทำการเพาะเลี่ยงเชื้อแบคทีเรียในปริมาณมากในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่ม ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เก็บเชื้อมาแบ่งใส่หลอดเล็กขนาด 600 ไมโครลิตรแล้วเติมกลีเซอรอล ในปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -20°C ได้ไม่เกิน 1 ปี

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

จากการดำเนินงานวิจัยเรื่อง การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากผักเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้ เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ มีผลการทดลองรายละเอียดการดังต่อไปนี้

4.1. คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

4.2. ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

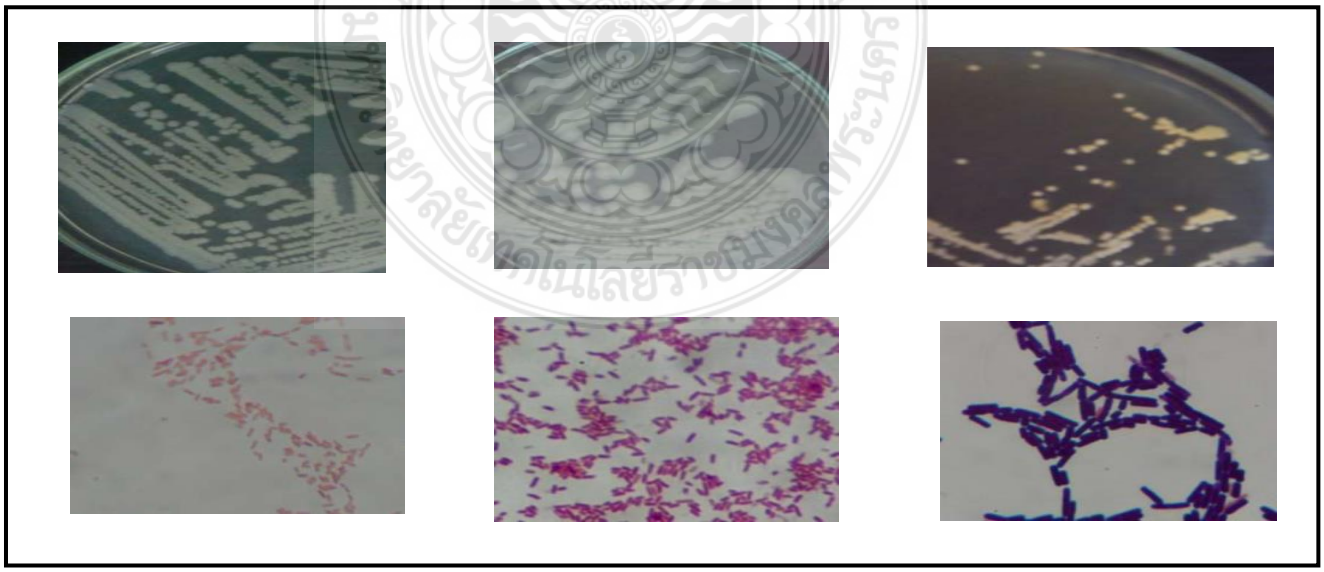
4.3. การคัดแยกและบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

4.1. คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่ได้พบว่าเป็นเชื้อชนิด aerobic/ facultative aerobic bacteria ที่มีรูปร่างเป็น bacilli ที่มีความยาว 1-3 μm ที่ไม่สามารถสร้าง H_2S หรือใช้ nitrate แต่สามารถสร้างกรดได้จากการใช้น้ำตาลต่างๆ ดังแสดงต่อไป

4.1.1 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเศษผักและผลไม้

จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ ที่รวมทั้งสิ้นได้ 42 ไอโซเลทมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง และย้อมสีแกรมแล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 4.1 พบว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่มรูปร่างเป็น *Bacilli* ส่วนใหญ่ย้อยติดสี Gram staining ให้สีน้ำเงิน เป็นแกรมบวกมากกว่า Gram negative ซึ่งติดสีแดง ดังแสดงใน**รูปที่ 4.1**



รูปที่ 4.1. ตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกที่สามารถย่อย CMC (บน) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง และเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ย้อมติดสีกรัม ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า(ล่าง)

4.1.2. ลักษณะทางเคมีและชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์

ลักษณะทางเคมีและชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ถูกคัดเลือกมามี 2 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ดีและสามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน เมื่อพิจารณาแหล่งพลังงานคาร์บอนที่เชื้อ *Bacillus* spp. CE08 และ CE49 เลือกใช้ต่างๆ คือ glucose, sucrose, maltose, xylose, และ Lactose จาก**ตารางที่ 4.1** พบว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลทชอบ maltose และ xylose มากกว่า glucose แต่ไม่สามารถหรือ ย่อยได้น้อยกับน้ำตาลชนิด sucrose และ lactose

ตารางที่ 4.1. ตัวอย่างเชื้อ *Bacillus* spp. CE08 และ CE49 เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เพื่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

Carbon Source	Cellulase Production CE08/CE48
Glucose	++/ +++
Sucrose	+/-
Maltose	++++/++
Xylose	++++/++
Lactose	+/-

4.2. ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อทำการทดสอบดูประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลเลสที่สร้างแบบ extracellular cellulase ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* spp. CE08 และ CE49 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาณ 200 mL เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา24 ชั่วโมงที่ 37°C แล้วปั่นแยกเซลล์ออก พบว่าได้เอนไซม์ที่เป็น crude cellulase enzyme จากไอโซเลทจำนวน 42 ไอโซเลท ได้สองไอโซเลท ที่สามารถทำงานได้ดี และในระยเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.2**

ตารางที่ 4.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (U/mg) ของเชื้อไอโซเลทที่คัดแยกได้

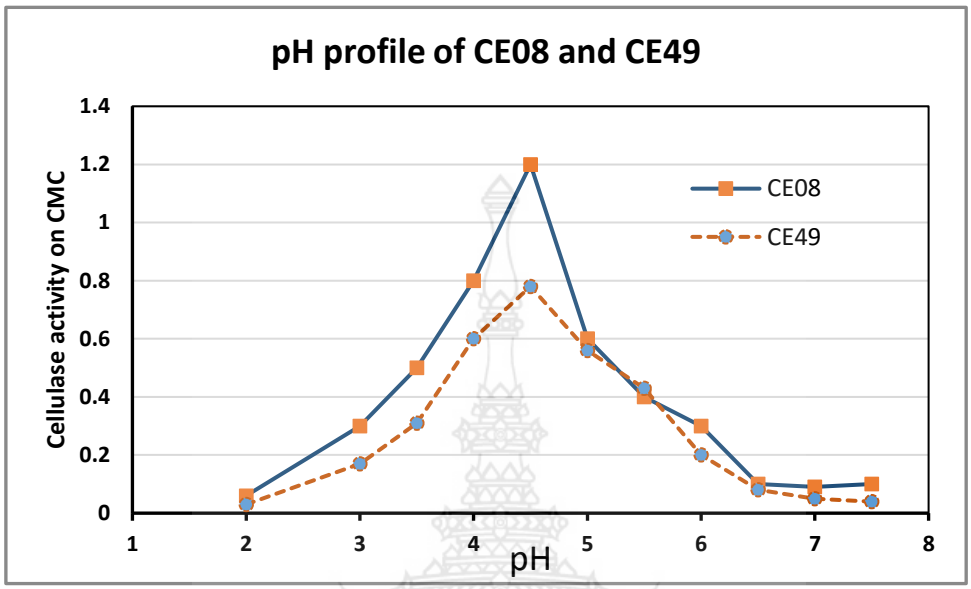
Isolates on CMC				
hr	CE05	CE18	CE08	CE49
6	0.04	0.02	0.03	0.04
12	0.06	0.48	0.05	0.08
18	0.05	0.06	0.06	0.04
24	0.04	0.07	**0.8**	0.06
30	0.06	0.05	0.05	**1.2**
36	0.05	0.07	0.04	**0.2**

ในช่วงอุณหภูมิ 40^{O}c พบว่าเชื้อเหล่านี้สามารถย่อย CMC ได้ดังแสดงใน**ตารางที่ 4.3** และมีความสามารถในการย่อยสับสเตรทชนิดเซลลูโลสต่างๆ

ตารางที่ 4.3. ปัจจัยอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเชื้อ *Bacillus* spp. CE08 และ CE49 ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ภายใต้สภาวะของอุณหภูมิ 30-80^{O}C

Temperature (°C)	Cellulase Production CE08/CE49
30	+/ +
40	+++/++
50	++/+
60	-
70	-
80	-

เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลเลสที่สภาวะ 40^{O}c pH 4.5 (**รูปที่ 4.2**) ซึ่งพบว่าเป็นช่วงที่เหมาะสม สามารถพบ Specific activity ในช่วง 3-4 U/mg ของเอนไซม์ ที่ทำการย่อย CMC ในระยะเวลาที่จำกัด ดังแสดงใน**ตารางที่ 4.4**



รูปที่ 4.2 pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื่อ CE08 และ CE49

ตารางที่ 4.4. ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส จากไอโซเลท *Bacillus* spp. CE08 และ CE49 และเอนไซม์ที่ขายในท้องตลาดเป็นตัวควบคุม

แหล่งของเอนไซม์	Cellulase activity (U/mg)
Aspergillus niger (Sigma)	56.34
Trichoderma viride (Signa)	10.12
CE08	4.10
CE49	2.78

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไอโซเลที่ได้มีเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถย่อย Carboxymethyl cellulose ได้ดี แต่สามารถย่อยฟางข้าวช้ากว่า CMC แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยดีกว่าหญ้าขน แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการย่อยสำลี

(**ตารางที่ 4.5**.) ทั้งนี้เนื่องจากเซลลูโลสในสำลีติดกับลิกนินอย่างเหนียวแน่น และอาจมีองค์ประกอบอื่นๆที่ทำให้ย่อยเซลลูโลสได้ยาก

ตารางที่ 4.5. ปัจจัยของสับสเตรทต่างๆที่มีต่อความสามารถในการย่อยเซลลูโลสของเชื้อ *Bacillus* sp. CE08 โดยมีสับสเตรท CMC เป็นตัวควบคุม

substrates	Relative Cellulase Activity
CMC	100
ฟางข้าว	14
หญ้าขน	10
สำลี	2

4.3. การคัดแยกและบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองพบว่า เชื้อไอโซเลทที่ได้ เป็นเชื้อชนิด *Bacillus spp.* CE08 และ CE49 โดยมี homology ของ 16S rDNA sequence ที่มีความยาว 750 bp เทียบกับลำดับเบสจาก NCBI ด้วยการ BLAST มีความคล้ายกับเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากดิน 99.5%

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การดำเนินงานวิจัยเรื่องการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากผักเหลือทิ้งและเปลือกผลไม้ เพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1. คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

5.2 การนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

5.1. คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย

คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียสองไอโซเลทที่ได้ถูกคัดเลือก พบว่าเป็นเชื้อชนิด aerobic/ facultative aerobic bacteria ชนิด *Bacillus* spp. CE08 และ 49 ที่มีรูปร่างเป็น bacilli ความยาว 1-3 μm ย้อยติดสี Gram staining ให้สีน้ำเงิน ไม่สามารถสร้าง H_2S หรือใช้ nitrate เชื้อทั้งสองไอโซเลทชอบ maltose และ xylose มากกว่า glucose ไม่สามารถหรือย่อยได้น้ำตาลชนิด sucrose และ lactose ได้น้อย สามารถถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสภายนอก ที่สภาวะ 40^{O}c มี optimum pH 4.5 มี cellulase activity ในช่วง 3-4 μ/mg เมื่อยังไม่บริสุทธิ์ สามารถย่อย Carboxymethyl cellulose ได้ดี แต่สามารถย่อยฟางข้าวช้ากว่า CMC แต่มีประสิทธิภาพในการย่อยดีกว่าหญ้าขน แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการย่อยสำลี

5.2 การนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่เน้นให้องค์ความรู้ ได้ทราบแนวทางของกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพ เพื่อให้ได้น้ำตาลไปใช้ในกระบวนการหมักให้ได้แอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติที่มีศักยภาพในการย่อยเซลลูโลส ซึ่งเป็นแนวทางที่สนับสนุนการจัดการที่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม สนับสนุนแนวทางการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่ไม่มีคุณค่าเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ อันเกี่ยวข้องกับการผลิตแอลกอออล์ด้วยการใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างคุ้มค่า สามารถเป็นแนวทางการลดปัญหาของการใช้เชื้อเพลิงนำเข้า กระบวนการทีได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสจากพืชต่าง ๆ ให้เกิดประโยชน์การนำไปใช้ที่จหลากหลายได้ต่อไป

บรรณานุกรม

จาตุรงค์ จงจีน และสุพรรนี อะโอกิ. 2550. การคัดแยกและจำแนกเชื้อราทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน. Agricultural Sci. J. 38: 291-294.

จิตตเสน อรุณศรี. 2529. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโยเชื้อราที่อุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นฤมล นะธรรมโน. 2544. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทนร้อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. เชียงใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ระพีพรรณ อินปั่นแก้ว. 2536. แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เลอลักษณ์ จิตรดอน พลวัณฑ์ มหาขันธ์ วิเชียร กิจปรีชาวนิช นภา โล่ห์ทอง. 2535. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์วัสดุอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. 26R ที่สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบ วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.) 26: 374-383.

สิริวรรณ แก้วชิงดวง. 2554. การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตนำน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำาปะหลัง โดยการบำบัดขั้นต้น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีและการจัดการ สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สวลี ดีประเสริฐ, ศุภชัย บุญนำมา, วิทยา บุตรทองมูล, บุปผา ชินเชิดวงศ์ และวีระ โลหะ. (2555). การใช้ประโยชน์จากกากมันสำาปะหลังเพื่อผลิตเป็นน้ำตาล. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 15(3), 39-4

อมรรัตน์ บุญมาศิริ. 2547. การทำเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากเชื้อรา *Pseudeurotium* sp. HT 14/1 ให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. น. 6-14.

Abu Baker NK, Abd-Azia S, Hassan MA, Ghazali FM. 2010. Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. Biotechnology. 9 (1): 73-78.

Ali S, Sayed A, Sarker TI, Alam R. 1991. Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 43:518-520.

Anand, A. A. P., Vennison, S. J., Sankir, S. G., Prabhu, D. I. G., Vasan, P. T., Raghuraman, T., Geoffrey, C. J., and Vendan, S. E. 2009. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx*

mori that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. Journal of Insect Science. 10 (107): 1-20.

Asha, C. and Prema, P. 2007. Production of cellulose-free endoxylanase from novel alkalophikic thermotolerent *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling Bioresource Technology (485-490).

Bashir, Z., Kondapalli, V. K., Adlakha, N. Sharma, A., Bhatnagar, R. K., Chandel, G., Yazdani, S. S. 2013. Sci. Rep. 3: 2558.

Dashtban M, Schraft H, Qin W. 2009. Fungal Bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspective. Int. J. Biol. Sci. 5: 578-595.

Ekperigin, M. M. 2007. Preliminary studies of cellulose production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella* sp. African Journal of Biotechnology. 6(1): 28-33.

Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., and Gulati, A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Current Microbiology. 57(5): 503-507.

Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Suka-Aho, M. and Viikari, L. 2005. Characterizatiion of Cellulose and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* oon various carbon sources. Process Biochemistry 40(11): 3519-3525.

Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's Iodine. Curr Microbiol. 57: 503-50.

Lee, Y.J., Kim, B. K., Lee, B. H., Jo, K. I., Lee, N. K., Chung, C. H., Lee, Y. C., and J. W. Lee. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresour Technol. 99(2):378-86.

Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. Adv. Appl. Icrobail. 9: 91-215

Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., Champreda, V. 2009. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multienzyme activity and ethanol fermentation by Candida tropicalis. Journal of Bioscience and Bioengineering. 170(5): 488-493.

Siriporn, C., Yuka, M., Wonnop, V., Kota, O., Gaku, S., Seung, H. L., Kazuhiko, I. 2012. Application of thermophilic enzymes and water jet system to cassava pulp. Bioresource Technology. 126: 87-91.

Tabao Nik SC, Monsalud RG. 2010. Screening and optimization of celluase production of *Bacillus* strains isolated from Philippine mangroves. Phillippines Journal of systematic biology. 4: 79-87.

Tsao, G. T. and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulos technology, pp. 296-326. In Smith, J. E., D. R. berry and Kristiansen, (eds). The filamentous Fungi : Fungal Technology. New York : John Wiley & Sons Ins.