

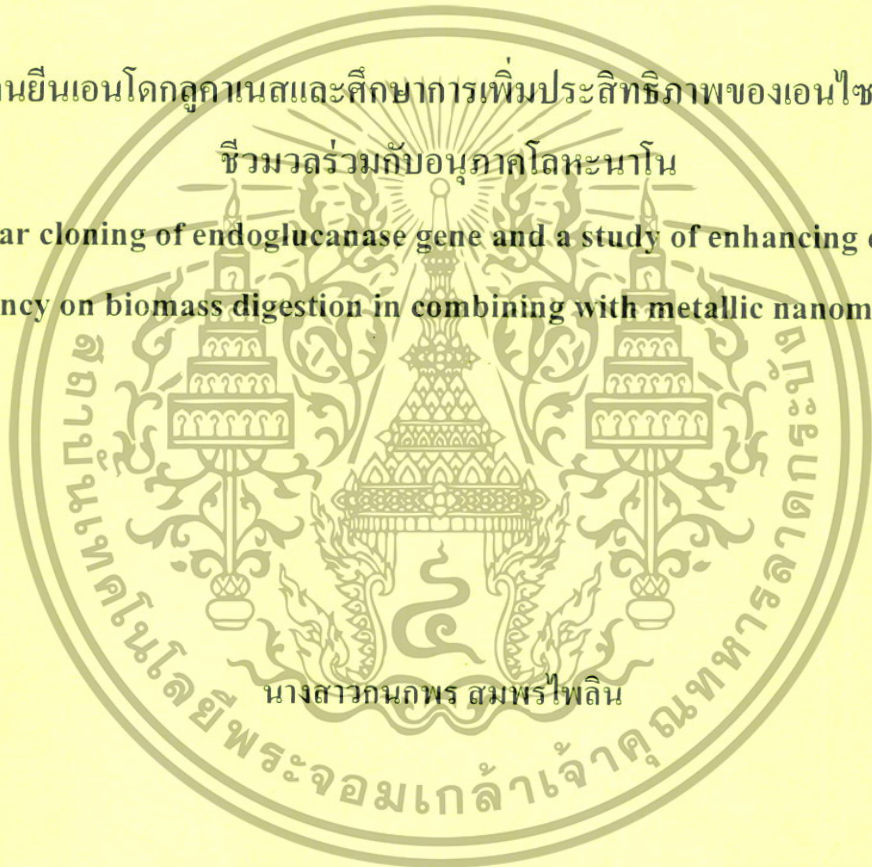


รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีนเอนโดกลูคาเนสและศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อย

ชีวมวลร่วมกับอนุภาคโลหะนาโน

Molecular cloning of endoglucanase gene and a study of enhancing enzymatic efficiency on biomass digestion in combining with metallic nanomaterials



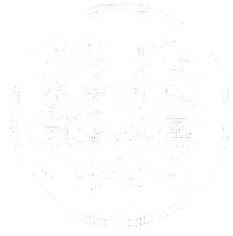
นางสาวกนกพร สมพรไพฑิณ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560-2561

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีนเอนโดกลูคาเนสและศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อย  
ชีวมวลร่วมกับอนุภาคโลหะนาโน  
Molecular cloning of endoglucanase gene and a study of enhancing enzymatic  
efficiency on biomass digestion in combining with metallic nanomaterials

นางสาวกนกพร สมพรไพลิน

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560-2561

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2560 และ 2561 (2560A1180460011, 2561A1180361019) และขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และ บุคลากรวิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง รวมทั้งนักศึกษาที่มาเป็นผู้ช่วยวิจัยที่มีส่วนช่วยสนับสนุนและให้การช่วยเหลือ จนกระทั่ง สามารถดำเนินการงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญ .....	ข
สารบัญภาพ .....	ค
บทที่ 1 บทนำ .....	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย .....	14
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	22
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย .....	23
เอกสารอ้างอิง .....	24
ภาคผนวก .....	26



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลิกโนเซลลูโลส และส่วนประกอบที่พบในพืช .....	4
2.2 ขั้นตอนการใช้ชีวมวลในกระบวนการหมักให้ได้พลังงาน ที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ .....	5
2.3 โครงสร้างของเซลลูโลสและตำแหน่งที่เอนไซม์แต่ละชนิดตัด .....	5
2.4 โครงสร้างคริสตัลของ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส .....	6
4.1 แสดงรูปเจดผลพลาสมิดดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้ .....	15
4.2 แสดงกิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส .....	17
4.3 กิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> .....	18
4.4 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยชีวมวลชนิดต่างๆ .....	19



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ชื่อโครงการ** การโคลนยีนเอนโคคลูคาเนสและศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยชีวมวลร่วมกับ  
อนุภาคโลหะนาโน

แหล่งเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ

ประจำปีงบประมาณพ.ศ. 2560-2561 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 563,500 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย ..... 2 ..... ปี ตั้งแต่ คค 2559 ถึงกย 2561

**ชื่อ-สกุล** หัวหน้าโครงการ กนกพรสมพรไพลิน วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งพลังงานทางเลือก วัสดุเหลือใช้นี้ประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลสที่สามารถ  
ได้รับการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมลกุลเดี่ยวสำหรับการนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในอุตสาหกรรมต่างๆ เซลลูเลสเป็น  
ระบบเอนไซม์ที่มีความปลอดภัยในกระบวนการย่อยเซลลูโลส ในการทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสสาย  
พันธุ์ที่แตกต่างกันและตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส สารพันธุกรรมของเชื้อบาซิลลัสได้ถูกนำมาสกัด และใช้  
เป็นแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนเอนโคคลูคาเนส นำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนได้ไปแสดงออกใน  
แบคทีเรีย *E. coli* และศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์เซลลูเลส ในสายพันธุ์เชื้อที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับเชื้อบาซิลลัส  
เดิม ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *E. coli* ที่มียีนให้เอนไซม์เอนโคคลูคาเนส มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสต่ำกว่าของ  
เชื้อบาซิลลัสสายพันธุ์เดิม อาจเป็นผลเนื่องมาจากเซลลูเลสเป็นระบบเอนไซม์ที่ต้องการการทำงานร่วมกัน การเพิ่ม  
หน่วยย่อยเอนโคคลูคาเนสเพียงหน่วยเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการทำงานในระบบเซลลูโลส นอกจากนี้ ระบบการหลั่ง  
เอนไซม์สู่ภายนอกก็มีความสำคัญต่อการทำงาน ดังนั้นผู้ทดลองจึงทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการปลดปล่อย  
เอนไซม์ลงในอาหารเหลวที่ได้เลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคโลหะนาโนสามารถเพิ่มกิจกรรม  
เอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่โคลนได้มีประสิทธิภาพเพียง  
พอที่จะย่อยชีวมวลที่เตรียมได้จากระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสรุปเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสมีการทำงานในระบบ  
เอนไซม์เซลลูโลสในการย่อยชีวมวล การเพิ่มประสิทธิภาพปลดปล่อยเอนไซม์ที่ผลิตได้สู่ภายนอกเซลล์โดยใช้อนุภาค  
โลหะนาโน เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการย่อยชีวมวล

**คำสำคัญ:** เซลลูเลส, เซลลูโลส, ชีวมวล, ชิงค์ออกไซด์, น้ำตาล, เอนโคคลูคาเนส, อนุภาคนาโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Research Title:** Molecular cloning of endoglucanase gene and a study of enhancing enzymatic efficiency on biomass digestion in combining with metallic nanomaterials

**Researcher:** Kanokporn Sompornpailin

College of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

## ABSTRACT

Agricultural biomass is an alternative resource of energy. This biomass composed of lignocellulose which can be converted into single unit of sugar which was used as energy sources in various industrial processes. Cellulase are safety enzymatic system which are used in cellulose hydrolysis process. Different *Bacillus* species were screening Cellulase activities of different *Bacillus* species were screening and analyzing cellulase activities. *Bacillus* genetic materials were extracted and used as a template for the amplification of endoglucanase gene. These fragments were expressed in *E. coli* and used for analyzing cellulase activities comparing to native *Bacillus* species. However, this *E. coli* have less cellulase activities than *Bacillus* species, because cellulase system required the synergistic work with the other subunits. Endoglucanase subunit may not enough for entire cellulase function. Moreover, the extracellular secretion system is also required. Therefore, the enhancing secretion substances were added to increase a potential of enzymatic releasing into the liquid culture media. The result showed that metal nanoparticle enhanced cellulase activity in liquid culture of bacteria. The cellulase activity of cloning enzyme have a potent in digesting plant biomass which were prepared under tissue culture condition. In summary, endoglucanase containing function of cellulase enzymatic system in biomass hydrolysis. An enhancement of the releasing extracellular enzyme by metal nanoparticle will be benefited in hydrolysis process of biomass.

**Keywords:** cellulase, cellulose, biomass, nanoparticles, Sugar, ZnO, endoglucanase, gene cloning

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ชีวมวล (Biomass) คือ สารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบภายในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะพืช ที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือพืชผลทางการเกษตร ชีวมวลเหล่านี้จัดเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่สามารถหมุนเวียนใช้งานได้อย่างอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถนำไปใช้ผลิตพลังงานเชื้อเพลิง แทนที่การใช้เชื้อเพลิงจากน้ำมันหรือถ่านหินที่มีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้ชีวมวลยังสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการผลิตสารหลายชนิดในอุตสาหกรรมอาหาร และเคมีภัณฑ์

ในปัจจุบันพบว่าชีวมวล โดยเฉพาะในกลุ่มวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มีปริมาณมากและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่ ได้เผาทำลายชีวมวลเหล่านี้ เพื่อให้สะดวกในการจัดการ เนื่องจากในธรรมชาติชีวมวลเหล่านี้ ต้องใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย ชีวมวล เนื่องจากมีโครงสร้างที่ค่อนข้างซับซ้อนประกอบด้วยสารหลายชนิด องค์ประกอบหลักได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) สารเหล่านี้ มีโครงสร้างหน่วยย่อยประกอบด้วยน้ำตาลที่มีดีกรีการเกิดพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) แตกต่างกัน การศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการสลาย โครงสร้างเหล่านี้ ให้ได้ที่ลดความซับซ้อนของโครงสร้าง จนกระทั่งน้ำตาลเป็นแหล่งตั้งต้น เป็นสิ่งจำเป็น สำหรับเป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ หลายชนิด

การใช้ชีวมวลเป็นวัตถุดิบมีขั้นตอนการเตรียมสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) ที่ต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง หรือ ใช้สารเคมี เช่น กรด ค่าง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันการใช้ เอนไซม์ เข้ามามีส่วนช่วยในการเตรียมวัตถุดิบ ยังไม่เป็นที่นิยมเท่าที่ควร เนื่องจาก ส่งผลให้มีต้นทุนการเตรียมวัตถุดิบที่แพงขึ้น แม้ว่าจะให้ผลที่ดีต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก เอนไซม์เหล่านี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นผู้วิจัยจำได้ สนใจทำการแยกยีนที่ให้ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) ที่มีความสำคัญในการเตรียมสภาพวัตถุดิบ ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยศึกษาการโคลนยีนจากสายพันธุ์เชื้อที่พบภายในประเทศ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นน่าจะมีส่วนช่วยลดการนำเข้า และส่งเสริมให้ผู้ชีวมวลสำหรับการหมักในกระบวนการต่างๆ ในอุตสาหกรรมในประเทศ หันมาใช้เอนไซม์ในการการเตรียมสภาพวัตถุดิบเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสภาวะแวดล้อมอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการโคลนยีนจากแบคทีเรียที่พบในประเทศ เพิ่มการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในเซลล์ทดสอบ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังศึกษาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้อนุภาคโลหะขนาดนาโน เพื่อนำเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ที่ได้และสภาวะการใช้ที่เหมาะสมไปพัฒนาในอุตสาหกรรมที่มีการใช้ชีวมวลเป็นแหล่งพลังงานต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส
2. เพื่อการโคลนยีนที่ให้เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากแบคทีเรียและการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์
3. เพื่อเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในเซลล์
4. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส
5. เพื่อศึกษาผลการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยใช้อนุภาคโลหะขนาดนาโน
6. การเตรียมชีวมวลสำหรับการประยุกต์ใช้ โดยการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
7. เพื่อศึกษาแนวทางพัฒนาการใช้เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสกับชีวมวล ในระบบการหมักในอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในการทดลองนี้ ผู้ทดลองได้ทำการศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ที่พบในประเทศ และนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของเชื้อในสภาวะต่างๆ ที่มีการทำงานของเอนไซม์ในประสิทธิภาพสูง ทำการโคลนยีนในสภาวะดังกล่าว โคลนที่ได้นำมาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับโคลนที่พบในฐานข้อมูล GenBank ศึกษาความแตกต่างของลำดับของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีนผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ทำการเพิ่มการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในเซลล์โฮสต์ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง และประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสของเซลล์ การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยใช้อนุภาคโลหะขนาดนาโน เพื่อการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยชีวมวลของพืชที่เตรียมภายในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีวมวล (Biomass) คือ สารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบภายในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในพืชที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือพืชผลทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เปลือกผลไม้ ชี้เถี่ยว และมูลสัตว์ ปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ในปัจจุบันพบว่าชีวมวลโดยเฉพาะในกลุ่มวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มีปริมาณมากและเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่ ได้เผาทำลายชีวมวลเหล่านี้ เพื่อให้สะดวกในการจัดการ แต่การเผาทำลายกลับส่งผลให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ในสถานะธรรมชาติชีวมวลเหล่านี้ต้องใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายชีวมวล

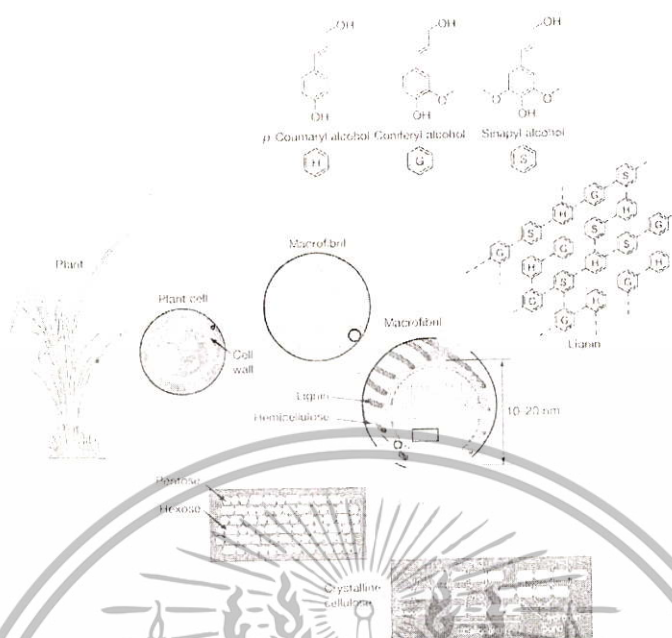
การนำสารชีวมวลมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนกำลังเป็นที่ได้รับการสนใจทั่วโลก และนักวิจัยได้ทำงานวิจัยอย่างแพร่หลายถึงการนำชีวมวลเหล่านี้เปลี่ยนไปเป็นพลังงานในรูปแบบต่างๆ เนื่องจากชีวมวลมีแหล่งกำเนิดที่สามารถผลิตเพิ่มขึ้นหมุนเวียนได้อย่างไม่หมดสิ้น และถูกต้องตามกฎหมาย โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนที่มีการเพิ่มปริมาณชีวมวลได้อย่างรวดเร็ว จึงเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นพลังงานทางเลือกใหม่ ทดแทนการใช้น้ำมันปิโตรเลียม นอกจากนี้สารชีวมวลไม่มีผลต่อการเกิดก๊าซเรือนกระจก เนื่องจากก่อให้เกิดคาร์บอน ไดออกไซด์ สุทธิเท่ากับศูนย์ (คู่มือสารชีวมวลเอเชีย 2008)

ชีวมวลที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร จากฟาร์ม โรงงานการผลิต และจากไร่รวมทั้งวัชพืช โดยเฉพาะหญ้าชนิดต่าง ๆ มีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบ หญ้าหลายชนิดซึ่งเป็นพืชโตเร็วในที่รกร้าง หรือหญ้าที่ปลูกเพื่อรักษาดินเช่น หญ้าแฝก

พืชและวัสดุเหลือใช้จากพืชมีโครงสร้างที่ค่อนข้างซับซ้อน มีลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นส่วนประกอบ สารเหล่านี้ มีโครงสร้างหน่วยย่อยประกอบด้วยน้ำตาลที่มีดีกรีการเกิดพอลิเมอร์ (polymerization) แตกต่างกัน ลิกโนเซลลูโลส (รูปที่ 1) ประกอบด้วย

1. เซลลูโลสมีหน่วยย่อยของน้ำตาล กลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) เป็นสายโพลีแซคคาไรด์ เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด ในพืช
2. เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ของน้ำตาลมากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส เป็นต้น มีสาขาแขนงของสายโพลีแซคคาไรด์
3. ลิกนิน เป็นโพลีเมอร์ของพอลิฟีนอลมีลักษณะค่อนข้างแข็ง เป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ของพืช ทนต่อการย่อยสลายมาก จึงต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนนำไปใช้ในกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

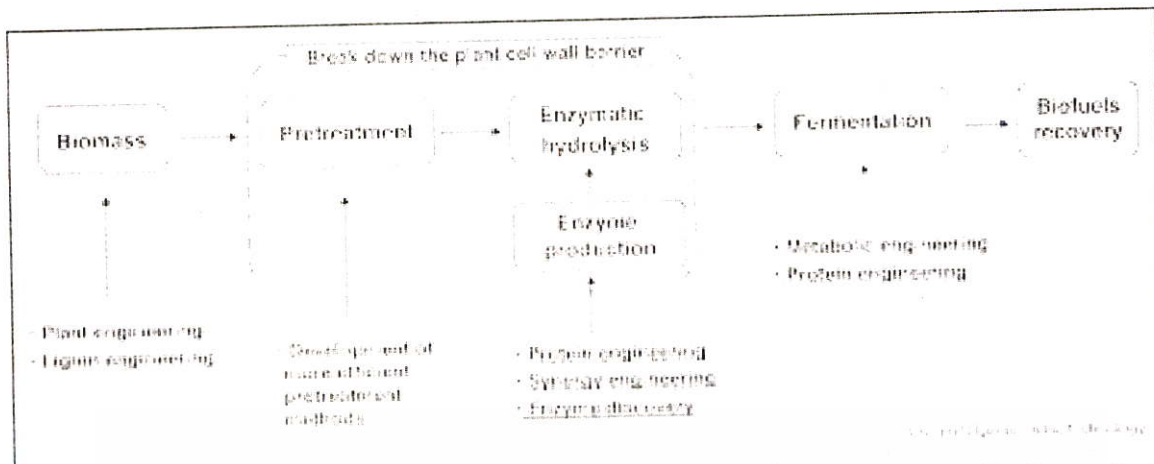


รูปที่ 2.1. ลิกโนเซลลูโลส และส่วนประกอบที่พบในพืช  
ที่มา Potters และคณะ (2010)

จากองค์ประกอบในลิกโนเซลลูโลสในชีวมวลมีโครงสร้างที่มีความแข็งแรงแตกต่างกัน จึงต้องเปลี่ยนชีวมวลเหล่านี้ ให้ได้โครงสร้างที่ลดความซับซ้อน และสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน ดังนั้นการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการสลายโครงสร้างเหล่านี้ เพื่อลดความซับซ้อน และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยชีวมวล จนกระทั่งได้หน่วยย่อยน้ำตาลสำหรับเป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์หลายชนิด การนำชีวมวลมาผ่านขั้นตอนการเตรียมสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) ให้อยู่ในรูปที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ง่าย ในกระบวนการหมัก (fermentation) (รูปที่ 2) ในปัจจุบัน การเตรียมขั้นตอนนี้ ใช้การเตรียมชีวมวลนิยมกระบวนการทางเคมีและกายภาพ เนื่องจากทำได้ง่ายราคาถูก แต่ในปัจจุบันพบว่า การเตรียมด้วยวิธีดังกล่าว ต้องการพลังงานในปริมาณมากในการเตรียม หรือ มีสารเคมีตกค้างที่อาจมีผลต่อสิ่งแวดล้อมในปริมาณในการเตรียมวัตถุดิบ การใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นวิธีการที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมในระดับต่ำ เนื่องจากไม่มีการใช้สภาวะรุนแรง ทางกายภาพและเคมี ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันการใช้ เอนไซม์ เข้ามามีส่วนช่วยในการเตรียมวัตถุดิบ ยังไม่เป็นที่นิยมเท่าที่ควร เนื่องจากการใช้เอนไซม์ ส่งผลให้มีต้นทุนการเตรียมวัตถุดิบที่แพงขึ้นแม้ว่าวิธีการนี้มีผลที่ดีต่อสิ่งแวดล้อม เอนไซม์เหล่านี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ มีผลให้มีค่าใช้จ่ายในกระบวนการทำงานสูงขึ้น

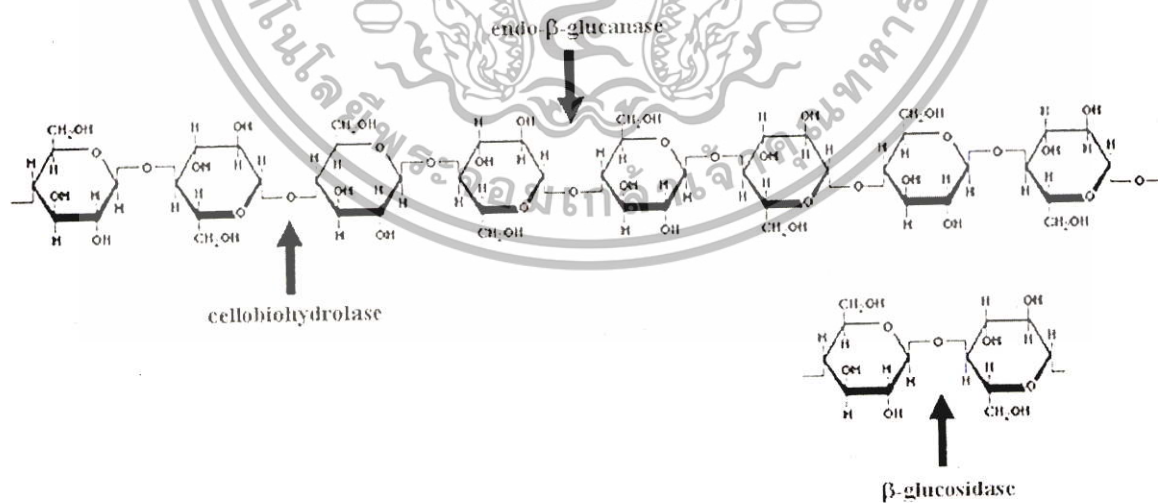
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการใช้ชีวมวลในกระบวนการหมักให้ได้พลังงาน ที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ ที่มา Wen และคณะ 2009

เอนไซม์เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลส เมื่อย่อยสลายเซลลูโลส ได้สมบูรณ์มีผลให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส มี 3 ชนิด การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 3 ชนิด (Zhang และ Zhang, 2013) (รูปที่ 3) เพื่อให้เกิดกระบวนการย่อยที่สมบูรณ์ เอนไซม์แต่ละชนิดมีตำแหน่งการย่อยสายพอลิเปปไทด์ที่แตกต่างกันออกไป เอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ

1. เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase)
2. เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase)
3. กลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลสและตำแหน่งที่เอนไซม์แต่ละชนิดตัด (cellobiohydrolase) และ  $\beta$ -glucosidase ที่มา Kumar และคณะ 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเป็นเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มสำคัญที่ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลส โครงสร้างคริสตัลของ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนสแสดงดังรูปที่ 4 โดยตัดพันธะระหว่างน้ำตาลบริเวณกลางสาย การทำงานที่สมบูรณ์ต้องการการทำงานร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสชนิดอื่นด้วย คือ กลูโคซิเดส และเอกโซกลูคาเนส



รูปที่ 2.4 โครงสร้างคริสตัลของ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส  
ที่มา Protein data bank

ได้มีการเซลลูโลสนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมกระดาษ และ อุตสาหกรรมอาหาร (Cherry และ Fidants. 2003) ปัจจุบัน เซลลูเลส ยังถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงจากธรรมชาติ โดยทำหน้าที่ย่อยสลายชีวมวลทางการเกษตร เพื่อให้ได้ผลผลิตคือน้ำตาลกลูโคสที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป นอกจากนี้ น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้อีกด้วย (Li และคณะ 2009)

ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสได้ กลุ่มหลักที่มีการศึกษาคือ เชื้อรา และ แบคทีเรีย เอนไซม์เซลลูเลสที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันตามแหล่งที่มา (Sadhu และคณะ 2013) ในปัจจุบันมีการมีการศึกษาการแยกและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนจากแบคทีเรียที่ถอดรหัสให้เอนไซม์เซลลูเลส โดยอาศัยการผลิตโปรตีนสายผสม และดูการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในแบคทีเรีย *E. coli* เนื่องจากกระบวนการนี้สามารถให้ผลผลิตของเอนไซม์ในปริมาณที่สูง มีการจัดการง่าย และใช้เวลาน้อย (Lambertz et al., 2014) Li และคณะ (2008) พบว่าการแยกยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และนำมาถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตโปรตีนสายผสมมีการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ได้ออกมาสูงกว่าจากตัวแบคทีเรียเดิมถึงสามเท่า

ชีวมวล (Biomass) ที่ใช้นิยมสำหรับอุตสาหกรรมการหมักในประเทศไทย ที่สำคัญได้การผลิตพลังงานทดแทนเอทานอล และก๊าซผลิตสารเคมีต่างๆ ได้แก่ น้ำตาล กากน้ำตาล การใช้พืช และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานในการหมักในอุตสาหกรรม อาจส่งผลกระทบต่อการใช้น้ำตาลสำหรับเป็นแหล่งอาหารของทารก และผู้มีผลต่อราคาอาหารในประเทศ ดังนั้นการใช้ชีวมวลชนิดอื่นที่ไม่มีผลกระทบต่อแหล่งอาหารจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสม

การใช้ชีวมวลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรือจากอุตสาหกรรมชุมชนที่มีพืชเป็นองค์ประกอบ จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ นอกจากนี้ปริมาณวัชพืชรำจั่วพวงหญ้าเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เช่นหญ้าที่สามารถรักษาการพังทลายของหน้าดิน เช่นหญ้าแฝก ที่มีลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นส่วนประกอบ

ชีวมวลเหล่านี้จัดเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่สามารถหมุนเวียนใช้งานได้อย่างอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถนำชีวมวล ไปใช้ผลิตพลังงานเชื้อเพลิง ทดแทนการใช้เชื้อเพลิงจากน้ำมันหรือถ่านหินที่มีอยู่อย่างจำกัด นอกจากนี้ชีวมวลยังสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการผลิตสารหลายชนิด สารสำคัญหลายชนิด ในอุตสาหกรรมการผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับอาหาร เครื่องสำอางค์ และยา

เอนโดกลูคาเนส เป็นเอนไซม์เซลลูเลสกลุ่มสำคัญที่ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลส แต่ต้องการการทำงานร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสชนิดอื่นด้วย ผู้วิจัยสนใจทำการแยกยีนที่ให้ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) ที่มีความสำคัญใน การเตรียมสภาพวัตถุดิบ ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (Cherry และ Fidants 2003, Kumar และคณะ 2008) โดยศึกษาการโคลนยีนจากสายพันธุ์เชื้อที่พบภายในประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อเป็นแนวทางการผลิตเอนไซม์ภายในประเทศ เพื่อลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นน่าจะมีส่วนช่วยลดการนำเข้า และส่งเสริมให้ผู้ใช้ชีวมวลสำหรับการหมักในกระบวนการต่างๆ ในอุตสาหกรรมในประเทศ และเอนไซม์ร่วมในการเตรียมวัตถุดิบเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การเอนไซม์ยังมีส่วนช่วยลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสภาวะแวดล้อมอีกด้วย

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการโคลนยีนจากแบคทีเรียที่พบในประเทศ เพิ่มการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในเซลล์ทดสอบ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังศึกษาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เพื่อนำเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ได้และสภาวะการใช้ที่เหมาะสมไปพัฒนาในอุตสาหกรรมที่มีการใช้ชีวมวลเป็นแหล่งพลังงานต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

1. Autoclave Laminar air flow
2. Balance
3. Bench top UV transilluminator with digimage system
4. Centrifuge pH meter
5. Gel electrophoresis
6. High speed refrigerated micro centrifuge
7. Incubator
8. Incubator shaker
9. Master cycler
10. Power supply
11. Water Bath
14. Spectrophotometer
15. Oven
16. เครื่องแก้วและอุปกรณ์พลาสติก (Erlenmeyer flask, cylinders, pipettes, glass petri plate, glass plate, test tube, glass bottle)

#### 3.2 สิ่งมีชีวิต

1. หญ้าแฝก
2. *Agrobacterium tumefaciens*
3. *Bacillus subtilis*
4. *Escherichia coli*

#### 3.3 สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และจีโนมดีเอ็นเอ
4. สารเคมีสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาถูกลูกโซ่
5. สารเคมีสำหรับการโคลนดีเอ็นเอ
6. สารเคมีสำหรับการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย
7. สารควบคุมการเจริญเติบโต
8. ยาปฏิชีวนะ
9. สารเคมีสำหรับตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์

### 3.4 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างชีวมวลโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ  
การนำหน่อกล้วยาเผือกศึกษามาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยปรับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (auxin) และ ไซโตไคนิน (cytokinin) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ สำหรับการใช้กล้วยาเผือกเป็นชีวมวลในการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์
2. การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อจากธรรมชาติ  
คัดเลือกแบคทีเรียจีส *Bacillus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ที่มีการรายงานถึงประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มาเลี้ยงในอาหารเหลว เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารแขวนลอยเชื้อมีค่าความขุ่นของเชื้อ OD600 เท่ากับ 0.5 ทำการหยดสารแขวนลอยเชื้อหยดลงบนอาหารแข็งสูตร NB ที่มีการเติมร้อยละ 1 ของคาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (Carboxyl methylcellulose : CMC) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบการย่อยด้วยเทคนิค Congo red (Wood และคณะ 1988) โดยสังเกตวงไฮรอปโคโลนีเชื้อ ภายหลังจากย้อมด้วย Congo red และล้างออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
3. การเพิ่มจำนวนยีนถอดรหัสให้เอนไซม์เซลลูเลส  
สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ นำมาสกัดดีเอ็นเอ และใช้เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับโคลนยีนเอนโคลูคานีส ซึ่งอยู่ในกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลส ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ไพเมอร์สำหรับการทำ PCR ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอนโคลูคานีส และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนเอนโคลูคานีส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ในปฏิกิริยา PCR ใช้ จีโนมดีเอ็นเอ จากแบคทีเรียเป็นแม่แบบ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้จาก การเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR นำมาเชื่อมต่อเข้ากับ vector และถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* โดยวิธีการ Heat shock method เลี้ยงเชื้อบนอาหารคัดเลือกที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเทคนิค Blue-White screening บนอาหารที่เติม X-Gal และ Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside ทำการเลือกและตรวจสอบโคลน

#### 4. การผลิตโปรตีนลูกผสมในแบคทีเรีย *E. coli*

ถ่ายโอนชิ้นส่วนยีนเอนโคโดลูคานเนสที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว เข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกเป็นโปรตีนและถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการแสดงออก เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย คัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ที่ภายในบรรจุนยีนเอนโคโดลูคานเนส โดยการเลี้ยงบนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลือกโคลนที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน มาศึกษาการแสดงออกของยีนเอนโคโดลูคานเนส

#### 5. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยดูการย่อยสับสเตรทในอาหารแข็ง

ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีเวกเตอร์ภายในบรรจุนยีนเอนโคโดลูคานเนสในอาหารเหลว LB เขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน ถ่ายสารแขวนลอยเชื้อลงเลี้ยงในอาหารใหม่และเลี้ยงที่สภาวะเดิมจนค่าการเจริญของเชื้อที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 เติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 มิลลิโมลาร์ และเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิมนาน 1 ชั่วโมง หยดเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ที่เติม CMC 0.2 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการย่อยของแบคทีเรีย *Bacillus* ตรวจสอบการย่อยโดยสังเกตวงใสรอบโคโลนีเชื้อภายหลังการย้อมสีด้วย Congo red และล้างออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์

#### 6. การศึกษาการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีเวกเตอร์ ซึ่งภายในบรรจุนยีนเอนโคโดลูคานเนส ในอาหารเหลว LB เขย่า 240 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน ถ่ายโอนสารแขวนลอยเชื้อลงเลี้ยงในอาหารใหม่ เลี้ยงที่สภาวะเดิมจนค่าการเจริญของเชื้อที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 เติม IPTG ให้ความเข้มข้น 0.2 mM เขย่าที่ 240 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสนาน 12 ชั่วโมง ทำการเติมอนุภาคนาโน ZnO ความเข้มข้น 0.2 มก.ต่อลิตร และ/หรือ EDTA 3 มก.ต่อลิตร เลี้ยงต่อที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเชื้อที่ชั่วโมงต่างๆหลังการเติมสารเพิ่มการปลดปล่อยมาวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ และตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อใช้ CMC เป็นสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์โดย ปั่นเหวี่ยงสารแขวนลอยเชื้อที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูณส่วนใสคำนวณมาทดสอบด้วยเทคนิค DNS (Miller, 1959) ดังนี้ ผสม ส่วนใส 300 ไมโครลิตร กับ 700 ไมโครลิตร ของ 1 เปอร์เซ็นต์ CMC ที่ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ บ่มที่ 40 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ชั่วโมง เติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มที่ 100 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เพื่อ ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เอน โคกลูคาเนสที่ได้

#### 7. การศึกษากิจกรรมการปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายและหญ้าแฝกในอาหารเหลว

นำส่วนใสที่ได้จากปั่นเหวี่ยงสารแขวนลอยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่เติมอนุภาคนาโน ZnO 0.2 มก.ต่อลิตร มาบ่มร่วมกับ 0.5% CMC, 1% CMC และ 0.5% CMC ร่วมกับชีวมวลของหญ้าแฝก และ ตรวจสอบ ปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิคเทคนิค DNS (Miller, 1959) และคำนวณผลกิจกรรมของเอนไซม์ เอน โคกลูคาเนส

#### 8. การออกแบบทางสถิติ

ในการทดลองใช้ไม่ต่ำกว่า 3 ชั่วโมงแต่ละชุดการทดลอง ออกแบบการทดลองโดยใช้ CRD ผลที่ได้นำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA และ Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อจากธรรมชาติ

จากการทดลอง *Bacillus* ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้ตามเงื่อนไขที่ทดลอง โดยมีแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1 และ 2 สามารถเจริญได้เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ในช่วง 2.4-3.0 เซนติเมตร และให้วงใสรอบโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ในช่วง 2.6-3.2 เซนติเมตร ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 1 มีการเจริญเติบโต และ วงใสรอบโคโลนีเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 2 มีการเจริญเติบโต และ วงใสรอบโคโลนีเท่าเดิมหรือลดลงเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตลดลง ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ในช่วง 1.1-2.0 เซนติเมตร และมีวงใสรอบโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ในช่วง 1.8-2.4 เซนติเมตร

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3 สามารถเจริญได้ดีทั้งที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในช่วง 3.7-4.1 เซนติเมตร และมีวงใสรอบโคโลนีในช่วง 4.0-4.7 เซนติเมตร แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ 3 นี้ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิปรกติ *Bacillus steariothermophilus* จำนวน 1 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญได้ในเงื่อนไขดังกล่าว

#### 4.2 ผลการเพิ่มจำนวนยีนออกอร์หัสให้เอนไซม์เซลลูเลส

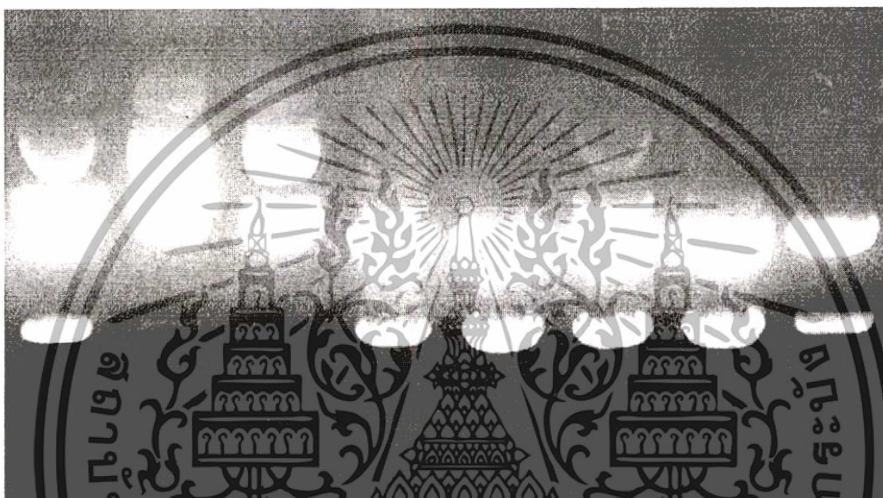
ภายหลังการออกแบบ ไพรมเมอร์ สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนเอนโดกลูคาเนส และนำไปใช้สำหรับ การโคลนยีนโดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซ่ PCR โดยใช้ Genomic DNA ของเชื้อ *Bacillus* เป็นแม่แบบ ภายหลังการทดลองเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เงื่อนไขต่างๆ พบว่ามีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 1500 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนเอนโดกลูคาเนส จากฐานข้อมูล การนำชิ้นดีเอ็นเอ

เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซ่ PCR นี้ไปใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยการโคลนเข้าสู่ดีเอ็นเอโคลนนิ่งเวกเตอร์ และถ่ายโอนเข้าสู่ คอมพิวเตอร์เซลล์ และทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตร ร่วมกับ การเติมสาร IPTG และ X-gal เมื่อนำโคลนที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำเซลล์แขวนลอยมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ตัวอย่างดีเอ็นเอ

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบในเบื้องต้น ว่าขนาดดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ มีขนาดใกล้เคียงกับดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่คือ ประมาณ 1500 คู่เบส ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3 และตรวจสอบซ้ำด้วยการทำ restriction fragment ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คาดว่ามิโนจีนส่วนดีเอ็นเอ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามที่ประมาณการไว้



รูปที่ 4.1 แสดงรูปเจลผลพลาสมิดดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้ และทำ restriction fragment ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการ

เมื่อนำโคลนดีเอ็นเอดังกล่าวส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนดังกล่าว มาตรวจสอบในฐานข้อมูล GenBank พบว่า โคลนที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัส ให้เอนไซม์จักอยู่ในกลุ่ม เอนโดกลูคาเนส ในเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าได้ยีนที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสม เมื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และแปลลำดับเป็นกรดอะมิโนได้ ลำดับดังแสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Amino acid sequences

```

MKRSISIFITCLLITLLTMGGMIASPASAAGTKTPVAKNGQLSIKGTQLVNRDQKAVQLKGISSHGLQWYGEYVKNKDS
LKWLRDDWGITVFRAMYTADGGYIDNPSVKNKVKEAVEAAKELGIYVIDWHILNDGNPNNEKAKEFFKEMSSLYG
NTPNVIYEIANEPNGDVNWKRDIKPYAAEEVISVIRKNDPDNIIIVGTGTWSQDVNDAADDQLKDANVMYALHFYAGT
HGQFLRDKANYASKGAPIFVTEWGTSDASGNGGVFLDQSRWLKYLDSKTISWVWNWNSDKQESSALKPGASKT
GGWRLSDLASGTFVRENILGTDSTKDIPETPSKDQPTQENGISVYRAGDGSMSNSQIRPQLQIKNNGNTTVDLK
DVTARYWYKAKNKGQNFDCDYAQIGCGNVTHKFVTLHKPKQGADTYLELGFKNGLAPGASTGNIQLRLHND
  
```

ทำการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีนเอนโดกลูคาเนสที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว เข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อตรวจสอบทิศทางการแสดงออกของโคลนคัดเลือกโคลนที่มีการแทรกของยีนเอนโดกลูคาเนส ในทิศทางเดียวกับการแสดงออกของโปรโมเตอร์ เพื่อใช้สำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แบคทีเรียชนิดที่ใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสม (BL21) ผลการทดลองพบว่า มีการเข้าไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในเวกเตอร์ ในทิศทางเดียวกับการแสดงออกของยีน 2 โคลน และคนละทิศทางกับการแสดงออกของยีน 3 โคลน

#### 4.3 การผลิตโปรตีนลูกผสมในแบคทีเรีย *E. coli*

นำเวกเตอร์ โคลนที่มีการแทรกของยีนเอนโดกลูคาเนสแทรก ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรียชนิดที่ใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสม (BL21) คัดเลือกเซลล์ โดยการเลี้ยงบนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลือกโคลนที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินมาศึกษาการแสดงออกของยีนเอนโดกลูคาเนส

#### 4.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยดูการย่อยสลายแป้งในอาหารแข็ง

ทำการเลือกแบคทีเรีย โคลนที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน มาศึกษาการแสดงออกของยีนเอนโดกลูคาเนส ด้วยเทคนิค Congo red (Wood et al., 1988) และเทคนิค DNS (Miller, 1959) เพื่อดูกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ได้ ขณะนี้ได้ดำเนินการทำทดลองและอยู่ในระหว่างกรวิเคราะห์ผล ตัวอย่างผลดังแสดงในภาพข้างล่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการย่อย สืบเสาะพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่มีแวกเตอร์ที่มียีนเอนโดกลูคาเนสแทรก มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ต่ำกว่า เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์เดิม ที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นผลเนื่องจาก ไม่มีเอนไซม์อื่นในระบบเซลลูเลสมาทำงานร่วมด้วย จึงทำให้ระบบเอนไซม์เซลลูเลสทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีแวกเตอร์ที่มียีนเอนโดกลูคาเนสแทรกนี้ อาจมีการปลดปล่อยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในระดับต่ำ



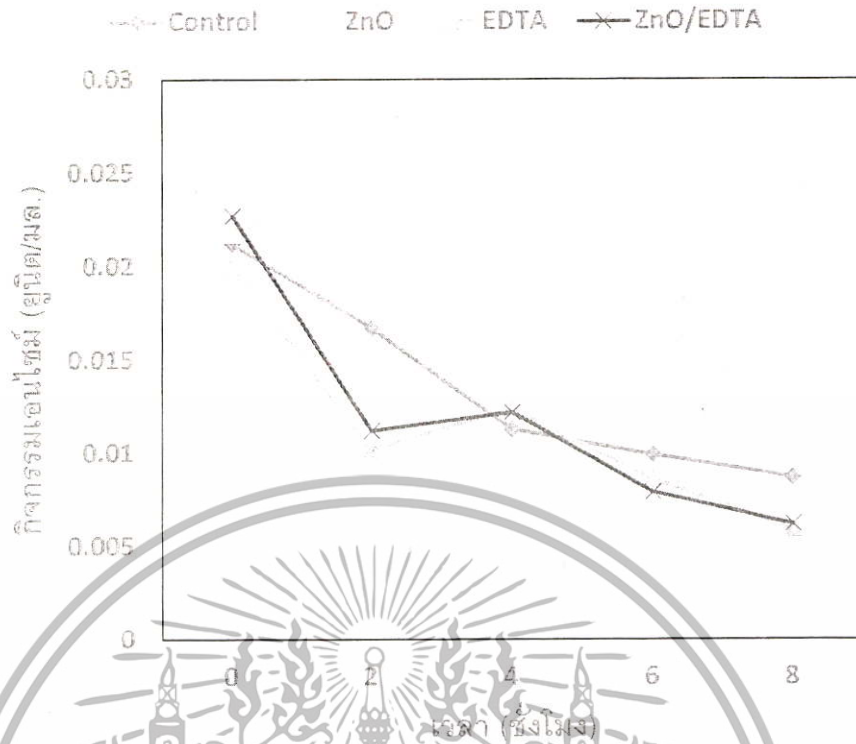
รูปที่ 4.2 แสดงกิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส เชื้อจุลินทรีย์ที่มีแวกเตอร์ที่มียีนเอนโดกลูคาเนสแทรก และเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์เดิม

#### 4.5 การศึกษากิจกรรมการปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในอาหารเหลือ

การศึกษากิจกรรมกระตุ้นการผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเบื้องต้น โดยการเติมอนุภาคโลหะนาโน และ อนุภาคโลหะนาโนร่วมกับสารอินทรีย์ คือ อีดีทีเอ และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสที่ถูกการปลดปล่อยในสารแขวนลอยที่เลี้ยงเซลล์ ผลการทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.3

บรรจุยีนเอนโดกลูคาเนสที่เวลา 0-8 ชั่วโมง เมื่อใช้สารกระตุ้นการปลดปล่อยเอนไซม์ ซิงค์ออกไซด์ (ZnO) ความเข้มข้น 0.2 มก.ต่อลิตร, อีดีทีเอ (EDTA) ความเข้มข้น 3 มก.ต่อลิตร และ ซิงค์ออกไซด์ร่วมกับอีดีทีเอ (ZnO/EDTA) ส่วนชุดควบคุม (Control) ไม่มีการเติมสารกระตุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



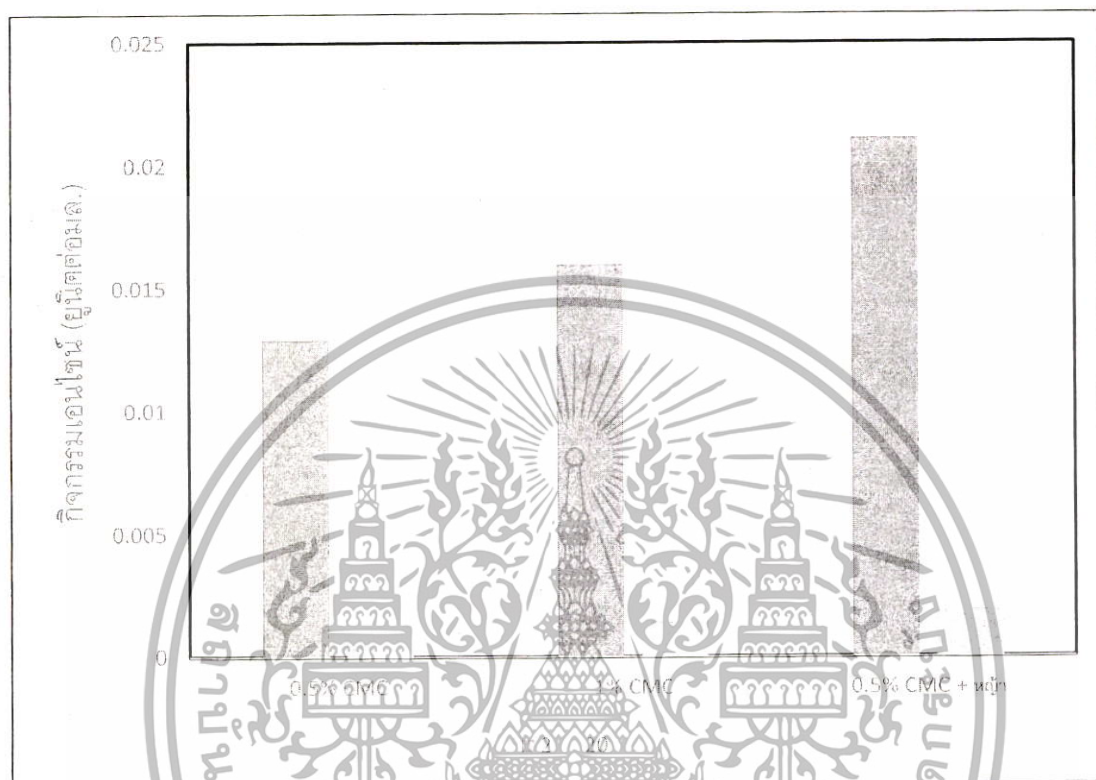
รูปที่ 4.3 กิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* มีเอนไซม์ที่ภายใน

พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่มีเอนโดกลูคาเนส ที่เลี้ยงในสภาวะปรกติ อาหารเหลวที่เลี้ยงเซลล์มีกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 1 เท่า ภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไปกิจกรรมของเอนไซม์ ค่อนข้างคงที่ ส่วนในวิธีการที่เติมอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์พบว่าอาหารเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ มีกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 15-20 ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 หลังจากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์ของอาหารเหลวดังกล่าวมีแนวโน้มลดลง แต่ลดลงน้อยกว่าชุดควบคุม ส่วนในวิธีการที่เติม อีดีทีเอ และอีดีทีเอร่วมกับซิงค์ออกไซด์พบว่าอาหารเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปแบบที่ใกล้เคียงกันคือ กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเร็ว

#### 4.6 การศึกษากิจกรรมการปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายและหญ้าแฝกในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองนี้ ใช้ซิงค์ออกไซด์ในความเข้มข้น 0.2 มก.ต่อลิตร การปลดปล่อยเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาย่อย CMC และ CMC ร่วมกับ ชีวมวลของหญ้าแฝก ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลา 2 และ 20 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยชีวมวลชนิดต่างๆ ที่เวลา 2 และ 20 ชั่วโมง ในสถานะที่มีการเติมอนุภาคนาโน ZnO ในอาหารเหลวที่ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์

จากผลการทดลองพบว่าการเติมชีวมวลจากหญ้าแฝก ร่วมกับ CMC ให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า การใช้ CMC เพียงอย่างเดียว น่าจะเป็นผลเนื่องจากการเติมชีวมวลจากหญ้าแฝก เป็นการเพิ่มปริมาณ เซลลูโลสชนิดที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ซึ่งน่าจะมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงมากขึ้นกว่า การเติม CMC เพียงชนิดเดียว

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถโคลนได้และ ยีนดังกล่าวนำมาแสดงออกใน *E. coli* ได้ประสบความสำเร็จ แต่การทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ในการย่อยซัปปะเทศ CMC ได้ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การทำงานของเอนไซม์ในเซลล์แบคทีเรียเดิม (*B. subtilis*) เหตุผลน่าจะเกิดเนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากเชื้อ *E. coli* นี้เป็นเชื้อก่อโรคในร่างกาย อาจไม่มีเอนไซม์อื่นในระบบเซลล์ มาทำงานร่วมด้วย จึงทำให้ระบบเอนไซม์เซลล์ทำงานไม่เต็มประสิทธิภาพ แต่ การใช้เชื้อ *E. coli* ในการผลิตโปรตีนลูกผสม เป็นระบบที่เหมาะสมในการพัฒนาการผลิตโปรตีนและแยกโปรตีนเพื่อการค้า นอกจากนี้เชื้อนี้มีเพียง เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ทำหน้าที่ตัดพันธะภายในของซัพเสตทเพียงอย่างเดียว และเอื้อประโยชน์ให้เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และ บีตากลูโคซิเดส ( $\beta$  glucosidase) มาร่วมทำงานในการย่อยซัพเสตท (Wertz และคณะ 2010, Tomme และคณะ 1995) เพื่อให้ได้กลูโคสเป็นผลผลิต สำหรับการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้น เชื้อ *E. coli* ที่มีเอนโดกลูคาเนส จึงไม่สามารถแสดง กิจกรรมรวมของเอนไซม์เซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ จึงต้องการการโคลนยีนชนิดอื่นที่ทำงานร่วมกันเพิ่มเติม อีกทั้งเชื้อ *E. coli* อาจมีระบบปลดปล่อยเอนไซม์ออกสู่ภายนอกที่ไม่เทียบเท่าเชื้อ *B. Subtilis* มีผลให้มีปริมาณเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่ำ

เชื้อ *E. coli* ที่มีเอนโดกลูคาเนส เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลววิธีการที่เติมอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์พบว่า พบว่าอาหารเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ มีกิจกรรมของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเพิ่มขึ้นร้อยละ 15-20 มากกว่าวิธีการที่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสถานะปรกติ (ชุดควบคุม) ณ เวลาเดียวกัน ส่วนในวิธีการที่เติม อีดีทีเอ และอีดีทีเอร่วมกับซิงค์ออกไซด์พบว่าอาหารเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ในรูปแบบที่ใกล้เคียงกันคือ กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเร็วกว่าสถานะปรกติ

ในการทดลองนี้ ใช้ซิงค์ออกไซด์ในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ในอาหาร จึงมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลล์เพิ่มขึ้นในสารละลาย ในช่วง 4 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ลดลง อาจเป็นผลเนื่องจากเซลล์และออร์แกเนลภายในเซลล์ ถูกทำลาย ในขณะที่ วิธีการที่เติมอีดีทีเอ ซึ่งมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการปลดปล่อยเอนไซม์ออกสู่ภายนอก (Liu และคณะ 2012) กลับไม่ส่งผลที่ดีในการการทดลองครั้งนี้ อาจเกิดเนื่องจากสายพันธุ์เชื้อที่ทำการทดลองแตกต่างกัน อีดีทีเอเป็นสารที่กระตุ้นการระบบผลิตโปรตีนลูกผสมในเชื้อ *E. coli* แต่การใช้อีดีทีเอ ที่สูงมาก อาจส่งผลในเชิงลบต่อกลไกเมแทบอลิซึมพื้นฐานของแบคทีเรีย จึงส่งผลต่อการผลิต และกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์ ที่ลดลง ดังนั้นอาจต้องมีการปรับปริมาณอีดีทีเอให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อต่อไป

ซิงค์ออกไซด์เป็นโลหะธาตุซึ่งอาจมีผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ จึงน่าจะมีผลสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการปลดปล่อยเอนไซม์ของเชื้อที่เติมลงในอาหารเหลว เนื่องจากมีรายงานวิจัยถึงผลของซิงค์ออกไซด์ต่อผนังเซลล์ทั้งในด้านบวก และด้านลบ (Chayaprasert และ Sompompailin 2017, Khunchuay และ Sompompailin 2017, Khan และคณะ 2015) อนุภาคซิงค์ออกไซด์อาจสัมผัสกับเซลล์โดยตรงมีผลให้เกิดสถานะออกซิเดทีฟ (oxidative) กับองค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Sanjay และคณะ 2014) หรือกระตุ้นการผลิตอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species: ROS) ชนิดต่างๆ ซึ่งส่งผลต่อการทำลายผนังเซลล์ และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติเยื่อเลือกผ่าน (Sirelkhatim และคณะ 2015)

การเติม CMC ที่ค่อนข้างเป็น เซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูง กว่าชีวมวลจากหญ้าแฝก หญ้าแฝก มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับชีวมวลที่มีอยู่ในธรรมชาติ ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม การทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส มีส่วนสำคัญในการลดความซับซ้อนของโครงสร้างชีวมวล มีผลให้เอนไซม์ชนิดอื่นเข้าทำงานได้ดียิ่งขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง *Bacillus* ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ *Bacillus* จำนวน 3 สายพันธุ์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลสตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ทดสอบ แต่และสายพันธุ์ เจริญเติบโตที่อุณหภูมิแตกต่างกันเพียง เมื่อนำทั้ง 3 สายพันธุ์ มาโคลนยีนเอ็น โคคลูคานีส และ โคลนได้สำเร็จ แต่การทำงานของเอนไซม์เอ็น โคคลูคานีส ในการย่อยซับเสตท CMC ได้ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การทำงานของเอนไซม์เอ็น เซลล์แบคทีเรียเดิม (*B. subtilis*) เหตุผลน่าจะเกิดเนื่องจาก เอนไซม์เอ็น โคคลูคานีส ทำหน้าที่ตัดพันธะ ภายในของซับเสตทเพียงอย่างเดียว และเอื้อประโยชน์ให้เอนไซม์อื่นๆ ในกลุ่มเซลลูโลสคือ เอกโซกลู คานีส และ บีตากลูโคซิเดส มาร่วมทำงานในการย่อยซับเสตท เพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูงที่สุด ดังนั้น เชื้อ *E. coli* ที่มียีนเอ็น โคคลูคานีส จึงไม่สามารถแสดง กิจกรรมรวมของเอนไซม์เซลลูเลสได้อย่างสมบูรณ์ จึงต้องการการโคลนยีนชนิดอื่นที่ทำงานร่วมกันเพิ่มเติม อีกทั้งเชื้อ *E. coli* อาจมีระบบ ปลดปล่อยเอนไซม์ออกสู่ภายนอกที่ไม่เทียบเท่าเชื้อ *B. Subtilis* ดังนั้น แบคทีเรียอาจมีกลไกอื่นเพิ่มเติม ที่มีผลควบคุมการผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์เอ็น โคคลูคานีส

การเพิ่มประสิทธิภาพการปลดปล่อยเอนไซม์ออกสู่ภายนอก มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการ ย่อยชีวมวล จากผลการทดลองพบว่า ซึ่งคือออกไซค์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการปลดปล่อยเอนไซม์ ของเชื้อในระบบที่ทำการศึกษา ในการทดลองนี้ ใช้ซึ่งคือออกไซค์ในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการ ปลดปล่อยเอนไซม์ในอาหาร จึงมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้นในสารละลาย ในขณะที่ วิธีการที่เดิมอีดีทีเอ ซึ่งมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการปลดปล่อยเอนไซม์ ออกสู่ภายนอก กลับไม่ส่งผลที่ดีในการการทดลองครั้งนี้ อาจเกิดเนื่องจากสายพันธุ์เชื้อที่ทำการทดลอง แตกต่างกัน นอกจากนี้การใช้อีดีทีเอ ที่สูงมาก อาจส่งผลในเชิงลบต่อกลไกเมแทบอลิซึมพื้นฐานของ แบคทีเรีย จึงส่งผลต่อการผลิต และกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ลดลง ดังนั้นอาจต้องมีการปรับ ปริมาณอีดีทีเอ ให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อต่อไป การทำงานของเอนไซม์เอ็น โคคลูคานีสที่โคลน สำเร็จ มีส่วนสำคัญในการลดความซับซ้อนของโครงสร้างชีวมวลที่ใช้ในอุตสาหกรรม เพื่อ ประสิทธิภาพการใช้ชีวมวลที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

#### สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

1. ยีนที่ผลิตเอนไซม์ทำหน้าที่ในการย่อยเซลลูโลส
2. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่มีโปรตีนลูกผสม
3. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสอย่างมีประสิทธิภาพสูง
4. วิธีประยุกต์ใช้อนุภาคโลหะนาโน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ในการย่อยเซลลูโลส
5. วิธีการเตรียมชีวมวลในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเซลลูโลส
6. แนวทางประยุกต์ใช้เอนไซม์ในระบบการหมักชีวมวลชนิดต่างๆ
7. เป็นส่วนหนึ่งของการผลิตกำลังคนด้านวิทยาศาสตร์
8. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง
  - 1) K. Sompompailin and C. Khunchuay. Optimal temperature of *Bacillus subtilis* cellulase on breaking down carboxymethylcellulose biomass. STEMa2018, (Proceedings) pattaya Thailand July, 18-20-2018. Paper ward.
  - 2) K. Sompompailin and C. Khunchuay. Cellulase Activity of *Bacillus* species and Trends in Utilizing Biomass Resources. Thailand Research Symposium 2018 (Proceedings) accepted. (Oral Presentation)
9. การเผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ISI อย่างน้อยจำนวน 1 เรื่อง
  - 1) C. Khunchuay and K. Sompompailin. A Proper Concentration of Carbon Black Nanoparticles Enhances Growth of The Regenerated Vetiver Grass. Pak. J Bot., 49(6) 2333-2338 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- Chayaprasert, W. and Sompornpailin, K. (2017) Suitable concentration of ZnO nanoparticles enhanced biomaterial synthesis and plant cell protection, *Applied Mechanics and Materials*, DOI: 10.4028/www.scientific.net/amm.866.21.
- Cherry, J. R., and Fidants, A. L. (2003) Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 438–443.
- Li, W., Zhang, W. W., and Yang, M. M. (2008) Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 40, 195-201.
- Li, X. H., Yang, H. J., Roy, B., Wang, D., Yue, W. F., Jiang, L. J., Park, E. Y. and Miao, Y. G. (2009) The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization. *African Journal of Biotechnology*, 8, 2418-2422.
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2017) Nanoparticles; Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.arabj.2017.05.011>
- Khunchuay, C. and Sompornpailin, K. (2017) Beneficial effects of Zinc Oxide nanoparticles on plant regeneration of Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). *Applied Mechanics and Materials*, DOI: 10.4028/www.scientific.net/amm.866.25.
- Kumar, R., Sing, S., Singh, O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35: 377-391.
- Lambertz, C., Garvey, M., Klinger, J., Heesel, D., Klose, H., Fischer, R., Commandeur, U. (2014) Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnology for Biofuels*, 7(135), 1-15.
- Lui, S-L., Du, K., Chen, W-Z., Lui, G., Xing, M. (2012) Effective approach to greatly enhancing selective and secretion and expression of three cytoplasmic enzymes in *Escherichia coli* through synergistic effect of EDTA and lysozyme. *J Ind. Microbiol Biotechnol.* 39: 1301-1307.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical. Chemistry*, 31, 426-428.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Potters, G., Van Goethem, D. & Schutte, F. (2010) Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. *Nature Education* 3(9):14
- Sanjay, S. S., Pandey, A. C., Kumar, S., Paydey, A. K. (2014) Cell membrane protective efficacy of ZnO nanoparticles. *SOP Tr Nanotec.* 1 21-29.
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M. B., Hasan, H., Mohamad, D. (2015) *Nano-Micro Lett.* 7: 219. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- Tomme, P. Warren, R. A. J., and Gilkes N. R. (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology.* 37, 1–81.
- Wen, F., Nair, N.U., Zhao, H. (2009) Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. *Current Opinion in Biotechnology.* 20: 412-419.
- Wertz, J. L., Bedue, O., and Mercier, J. P. (2010) *Cellulose Science and Technology*, 1st ed. CRC Press, Switzerland
- Wood, P.J., Erfle, J.D., and Teather, R.M. (1988) Use of Congo red polysaccharide interaction complex formation between Congo red and polysaccharide in detection and assay of polysaccharide hydrolases. *Methods in Enzymology.* 160, 59-74.
- Zhang, X. Z., and Zhang, Y. H. P. (2013) Cellulases; Characteristics, sources, production, and application. Page 131-146 in S. T. Yang, A. Hasham, El. Enshasy, and N. Thongchul, editors. *Bioprocessing Technology in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymer.* John Wiley & Son, Inc. Publish.
- <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2010/Pearson/endoglucanase.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก

### 1. ผลงานตีพิมพ์

- 1) K. Sompornpailin and C. Khunchuay. Optimal temperature of *Bacillus subtilis* cellulase on breaking down carboxymethylcellulose biomass. STEMa2018, (Proceedings) pattaya Thailand July, 18-20 2018. Paper ward. (เอกสารแนบ)
- 2) K. Sompornpailin and C. Khunchuay. Cellulase Activity of *Bacillus* species and Trends in Utilizing Biomass Resources. Thailand Research Symposium 2018 (Proceedings) accepted. (Oral Presentation) (ตอบรับและอยู่ในระหว่างการตีพิมพ์)
- 3) C. Khunchuay and K. Sompornpailin. A Proper Concentration of Carbon Black Nanoparticles Enhances Growth of The Regenerated Vetiver Grass. Pak. J Bot., 49(6) 2333-2338 2017 (เอกสารแนบ)

### 2. ประวัติผู้เขียน

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกนกพร สัมพร ไพลิน
2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Kanokporn Sompornpailin
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก  
ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวเคมี วิทยาลัยนานาชาติเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถ. ฉลองกรุง ลาดกระบัง กทม. 10520  
โทรศัพท์ 02-326-8000 ต่อ 2168 โทรสาร 0-2329-8265  
E-mail: kanokporn.so@kmitl.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
  - a. Doctor of Pharmaceutical Sciences (Molecular Biology and Biotechnology), Chiba University, Japan
  - b. Master of Science (Biotechnology), Chulalongkorn University, Thailand
  - c. Bachelor of Science (Agriculture Technology; Second class Honors), King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมหาบัณฑิต) ระบุสาขาวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- a. Metabolic Engineering and Functional Genomics
- b. Plant Cell culture
- c. Plant Physiology
- d. Plant Metabolite analysis

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

ผลงานตีพิมพ์ ตั้งแต่ปี 2010

- O. Ketchart, S. Porntheeraphat, J. Nukeaw and K. Sompornpailin. Al Nanoparticles Deposited on PCR Tube Enhance DNA Amplification at Suitable  $MgCl_2$  Concentration. Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, October, 4-6 2010 Pattaya, Thailand. 208-213
- O. Ketchart, S. Porntheeraphat, J. Nukeaw and K. Sompornpailin. PCR Tube Deposited with Al Nanoparticles Enhance DNA Amplification. Proceeding of NanoThailand, 2010 122-125.
- P. Darachai, S. Chutipaijit, S. and K. Sompornpailin. Carbon Sources and Supporting Materials in Callus Induction Effects on the Regeneration of *Indica* Rice (*Oryza sativa* L. cv RD6 and RD15). Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, October, 4-6 2010 Pattaya, Thailand; 266-271
- K. Sompornpailin, S. Chutipaijit. Relative of the flavonoid contents to antioxidant activity in Thai rice seeds. *J Srinakharinwirot U (Science and Technology)* January 2011 Vol 3, 95-101
- K. Sompornpailin, S. Kanthang. High accumulation of flavonoid pigments in transgenic tobacco overexpressing PAP1 gene. *J Srinakharinwirot U (Science and Technology)* January 2011 Vol 3, 102-106
- S. Chutipaijit, K. Sompornpailin. Polyamines in Plant response to various abiotic stresses. *SWU Sci. J.* 2011 Vol 27 No 1 215-229
- S. Chutipaijit, S. Cha-um, K. Sompornpailin. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. indica. *Australian Journal of Crop Sciences* 2011 5(10) 1191-1198 **IF 1.63**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- P. Darachai, S. Chutipaijit, S. and K. Sompornpailin. Effect of Carbon Sources and Gelling Agents on Callus Induction and Regeneration Efficiency of Thai Rice (*Oryza sativa* L. cv. RD6) 1st International Symposium on Technology for Sustainability - ISTS2011, KMITL, Bangkok, Thailand, AGT003, 20-22
- Chutipaijit, S. Cha-um, K. Sompornpailin. Influence of salinity on growth and antioxidant enzyme activities in indica rice cultivars (*Oryza sativa* L.) 1st International Symposium on Technology for Sustainability - ISTS2011, KMITL, Bangkok, Thailand, AGT004, 23-26
- S. Chutipaijit, S. Cha-um, K. Sompornpailin. An evaluation of water deficit tolerance screening in pigmented indica rice genotype. *Par. J. Bot.*, 2012 44(1): 65-72, **IF 0.947**
- S. Chutipaijit, K. Sompornpailin. The Biotechnology Application in the chemical Industry. *King Mongkut's Agro-Industry J.* 2012 3(1): 30-43
- K. Sompornpailin and S. Kanthang Significant Protection of Flavonoids in Transgenic Plants from Radiation. ACSS 2012/ACSEE 2012 Osaka, Japan (oral presentation)
- K. Sompornpailin, S. Chutipaijit. Enhancement of plant regeneration efficiency from mature grain of Thai indica rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) *Pak. J. Bot.*, 2012 44(4): 1385-1390 **IF 0.947**
- S. Kanthang and K. Sompornpailin. Increasing Plant Flavonoid Biomaterials in Response to UV-A Light. *Advanced Materials Research*, 2013 802: 74-78. (Scopus database)
- K. Sompornpailin and S. Kanthang. Plant Genetic Engineering for antioxidant flavonoids production and their protective activities, 4th International conference on nutrient & physical activity in aging, obesity & cancer (NAPA 2013) Chonburi Thailand, Aug 14-17, 2013: 59 Oral Presentation
- K. Sompornpailin and S. Kanthang. Tobacco expressing *PAP1* increases the responses to PAR and UV-A by enhancing soluble sugar and flavonoids and elevating plant protections. *Pak. J. Bot.*, 2015 47(2): 595-602.
- K. Sompornpailin and S. Kanthang. Tobacco randomly inserted *TT8* differently enhance light signals and flavonoid accumulation. *Pak. J. Bot.*, 2015 47(4): 1303-1309.
- K. Sompornpailin. Enhancing flavonoid antioxidant compounds in plant by using metabolic engineering and stressor. Thailand Research Symposium 2015 (Proceedings) 133-138. (Oral Presentation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- S. Kanthang and K. Sompornpailin. Antioxidant activity in petal extract of *PAP1* transgenic tobacco. *Applied Mechanics and Materials*. 2015 804: 195-198. (SJR 0.15)
- C. Khunchuay and K. Sompornpailin. The effects of cytokinins of plant regeneration of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* A. Camus cv. roiet). *Applied Mechanics and Materials*. 2015 804: 259-262. (SJR 0.15)
- K. Sompornpailin and C. Khunchuay. Synergistic effects of BAP and kinetin media additives on regeneration of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) *Aus. J. Crop Sci.* 2016 10 (5):726-731.
- K. Sompornpailin. Design and Synthesis of Flavonoid Biomaterial using Metabolic engineering STEMa2016, invited speaker, pattaya Thailand July, 27-29 2016.
- C. Khunchuay and K. Sompornpailin. Beneficial Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Plant Regeneration of Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) *Applied Mechanics and Materials*. 2017-866: 25-28 doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.866.25
- W. Chayaprasert and K. Sompornpailin. Proper Concentration of ZnO Nanoparticles Enhanced Biomaterial Synthesis and Plant Cell Protection. *Applied Mechanics and Materials*. 2017 866: 21-24 doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.866.21
- D. Dangrit and K. Sompornpailin. Enhancing Biosynthesis of Flavonol Protective Biomaterials Using FLS Transgenic. *Applied Mechanics and Materials*. *Applied Mechanics and Materials*. 2017 866: 29-32 doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.866.29
- D. Dangrit and K. Sompornpailin. Antioxidant Activities of Transgenic Flower Over-expressing FLS and TT8 involving in flavonoid biosynthesis. *Applied Mechanics and Materials*. 866: 29-32 doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.879.78 Mach 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ ให้ตราพระราชบัญญัติขึ้นไว้โดยปริยายแห่งราชอำนาจ  
โดยมีพระปรมาภิไธย พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ และพระบรมราชินีนาถ

มาตรา ๑  
ให้ตราพระราชบัญญัติขึ้นไว้โดยปริยายแห่งราชอำนาจ  
โดยมีพระปรมาภิไธย พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ และพระบรมราชินีนาถ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Optimal temperature of *Bacillus subtilis* cellulase on breaking down carboxymethylcellulose biomass

Kanokporn Sompornpailin<sup>1</sup> and Chonnikarn Khunchuay<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology

Ladkrabang, Bangkok, 10520 Thailand

E-mail : kanokporn.so@kmitl.ac.th

**Abstract**— Cellulose biomaterials are an abundant renewable resource mainly producing from plant. These biopolymer materials are digested into the glucose units by physical, chemical and enzymatic mechanisms. The digested units are used as an energy resource, which has a potential to convert into several kinds of industrial products. Cellulase, a combination enzymatic system, functions as biopolymer breaking down is identified from various organisms. Three strains of *Bacillus subtilis* containing cellulase activity were selected and screened for cellulolytic activities. Equal volume of each strain was spotted on agar petri disk containing 1% carboxymethylcellulose (CMC) and followed by incubated at 37, 40 and 45°C for 6 hours. Bacteria on CMC plate were analyzed hydrolytic activity by flooding of the plates with 0.1% Congo red followed by washing with NaCl. Diameters of bacterial growth and clear zone were measured. The result shows that all three strains have capability to hydrolyze CMC at relative high temperature (40 and 45°C). The ratio of clear zone diameter and colony diameter of bacteria under 40°C are similar to those under 37°C condition. This ratio of all bacteria is the highest when bacterial strains were cultured under 45°C condition. However, two strains of bacteria slowly grow under 45°C condition. Therefore, Three *Bacillus* strains have a capacity to secrete extracellular cellulase and these enzymes have potential to function at high temperature (45°C).

**Keywords**— *Bacillus subtilis*, biomass, cellulose, cellulase, thermophilic bacteria

### 1. INTRODUCTION

Agricultural residues such as rice straw, sugarcane bagasse and animal excreta, are low-cost biomass which is a renewable lignocellulose resource. Lignocellulose is composed of lignin, cellulose and hemicellulose. Cellulose is the main component in lignocellulose. Their structure is a linear polymer of glucose which are linked together by  $\beta$  1,4-glycosidic bonds. These polymers are attached into micro- fibrils by hydrogen bond. Microfibrils are gathering together into macrofibrils by the matrix network of hemicellulose and lignin [1].

These agricultural residues are great unexploited resources due to their complicated glucose storage of cellulose structure. Therefore, enhancing capabilities of agricultural residue utility enhance energy security and economic benefit. These residues are targeted to be converted into energy resources for fermenting industrial products. Various physico-chemical pretreatments of lignocellulose are performed to gain the basic chain of cellulose [2]. Pretreatment of lignocellulose decreases the crystalline and increases solubility of materials, which affects the available surface area and porosity of biomaterials [1]. These pretreatments of biomaterials are facilitated the hydrolysis process by enzymatic system.

This chain is hydrolyzed into glucose by biological process using the enzymatic system. The complex of cellulases is synergistic work in hydrolysis cellulose. This complex composes of three different enzymatic functions, endoglucanase, exoglucanase and  $\beta$  glucosidase [3, 4].

Nowadays, cellulases are used paper, textile, food and pharmaceutical industries and have a trend to increase their

use in bio-friendly industrial process. Cellulases are produced by several microorganisms such as bacteria and fungi. However, cellulases activities under thermophilic condition (>40°C) are required for the industrial process [5]. *Bacillus* species are a single cell, which is easy to culture in controllable condition and also convenient to separate the enzymatic system which will be used in an industrial process. In addition, these bacteria, is fast growth and capability to grow and to use biomass under relative high temperature [6, 7, 8].

Physical parameter of culturing bacterial strain can be affected on cell growth and activity of cellulolytic enzymes. *Bacillus* species have a potential to produce extracellular cellulase under thermophilic condition [9]. These enzymes will be exploited in various industrial processes to receive abundant product of cheaply sugar energy.

In this experiment, screening cellulolytic activity of *Bacillus* species under different temperatures was performed by hydrolyzing carboxymethyl cellulose plate.

### 2. PROCEDURE

#### *Bacterial strains and culture conditions*

Three *Bacillus* sp. stains containing cellulolytic enzyme activity under thermal condition were screened and selected from TISTR Culture Collection, Thailand Institute of Scientific and Technological Research.

*Bacillus subtilis* TISTR008, TISTR025, TISTR1460 Under an experiment, *Bacillus* strains were cultured in Nutrient Broth (NB) medium at their optimal growth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

temperature and shaking at 200 rpm. Agar at 1.5 % was added to make the semi-solid medium.

#### Analysis of growth and cellulase activity

Bacillus cell suspension was cultured at 37°C until OD 600 reached 0.4. Equal volume of (3 microliters) each strain was spotted on agar petri disk containing 0.2% carboxymethyl cellulose (CMC) as a substrate and followed by incubated at 37, 40 and 45°C for 16 hours. Diameter of bacterial growth were measured.

Bacteria grew on CMC plate were analyzed hydrolytic activity. The bacterial cells were washed with 2% sodiumhypochloride, following with sterile distill water and flooded with 0.2% congo red for 45 minutes, these cells were destained with 1 M sodium chloride (NaCl). Clear zone was measured and calculated ratio of the enzymatic index (diameter of clear zone/diameter of colony)

#### Statistical analysis

The experimental treatments were performed with replicated. The result data were statistically analysis using One-way ANOVA and pair T-test of SPSS program. Duncan's multiple range tests (DMRT) was used to analyzing mean of data at a probability of 0.05.

### 3. RESULT AND DISCUSSION

Three strains of *Bacillus subtilis* were grown on plate with CMC as a cellulase substrate under three different temperature conditions. The culturing plates were measured diameter of colony indicating bacterial growth (Fig. 1A). The same plate was sequentially stained with Congo Red and quantitatively investigated the cellulase enzymatic activity and the average of clear zone diameter, colony diameter is calculated (Fig. 1B and 1C).

Under experimental condition, *B. subtilis* strain 1460 showed the highest average diameter of bacterial colony grown on plate under all cultured conditions, 37, 40 and 45°C. Moreover, this strain had better growth in high temperature (40 and 45°C) than that in normal temperature (37°C). While, *B. subtilis* strains 008 and 025 decreased their growth, when the culture temperature was higher than 40°C. The 008 strain showed the smallest colony under 45°C culture condition.

Bacterial colony produced extracellular enzyme and released in a culture medium. The releasing cellulase hydrolyzed CMC substrate in the culture plate. The clear zone around colony evidently indicated after staining with Congo red. The clear zone of each colony was analyzed by measuring a diameter of colony clear zone. These results are related with a size of the bacterial colony. *B. subtilis* strain 1460 showed the largest average diameter of bacterial clear zone in all condition. Under 45°C culturing condition, colony have the longest diameter, following with 40 and 37°C.

A diameter of the clear zone may not precisely indicate the activity of cellulase. [5] Therefore, ratio of diameter of clear zone and colony growth was calculated. These data indicated that under 45°C condition, all culture strains had higher ratio of diameter of clear zone and colony than

lower temperature condition did. Under this 45°C condition, *B. subtilis* strain 008 significantly showed the highest ratio of diameter of clear zone and colony (1.55) at significant level with the other strains and conditions. At 37 and 40°C culturing condition, all tested strains are no statistic different in this ratio.

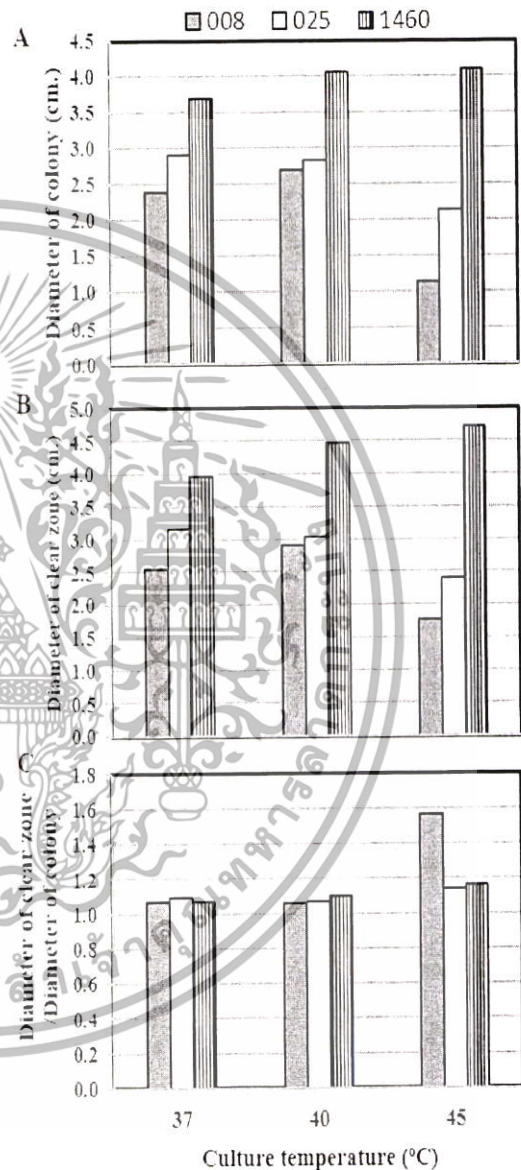


Fig. 1. Growths and cellulase activities of three strain of *Bacillus subtilis* (TISTR008, 025 and 1460) on CMC agar plate under 37, 40 and 45°C A: the average of colony diameter, B: the average of clear zone diameter, C: the average of clear zone diameter/ colony diameter.

Our result showed that optimal temperature of all tested *B. subtilis* are in the range of 37-40°C depending on the culture strains, similar to previous research [7, 10]. Under

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

optimal temperature, bacteria have normal growth and accumulate cellulase enzyme within their cell. In this temperature, clear zone of cellulase lysis substrate directly depend on colonial growth and their ratio of clear zone size and colony size is approximately 1.1.

*B. subtilis* strain 1460 showed the highest average diameter of colony and clear zone on plate culturing at 45°C, while *B. subtilis* strain 008 results are presented the best in ratio clear zone and colony diameter at the same temperature. At this temperature, *B. subtilis* strain 008 severely reduced their growth, because half size of colony is presented when it compared to size of colony under normal culturing condition (37-40°C). This result indicated an improper growth condition of bacteria.

The high temperature condition may induce oxidative stress of bacterial cell, and injured cell membrane. The cellular component including cellulase enzyme may release from the cell. Temperature was found to be effect on the secretion of extracellular enzyme [6]. Therefore, at 45°C, ratios of clear zone and colony are highest in all stains, especially in non-thermophilic strain (008), although, it was slowly growth under 45 °C. This knowledge can be used for controlling cellulase production in specific the strain of *B. subtilis*

#### 4. CONCLUSION

Optimal temperatures for growth and cellulase activity of *B. subtilis* bacteria depend on the nature of their strain. The result shows that all three strains have capability to hydrolyze CMC at relative high temperature (40 and 45°C). The ratio of all bacteria is the highest when bacterial strains were cultured under 45°C condition. Thermophilic strain of *B. subtilis* presented large colony size and, also clear zone size indicating the better growth with cellulase activity. However, non-thermophilic strain of *B. subtilis* showed the highest ratio of clear zone size and colony size, which implied high activity of extracellular enzyme.

#### ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by the National Research Council of Thailand (NRCT) and the National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Ministry of Science and Technology, Thailand, through its program of Center of Excellence Network.

#### REFERENCES

- [1] Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B. and Ramakrishnan, S. (2011). Ramachandran, and Subramanian Ramakrishnan, "Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review." *Enzyme Research*, 17, pp, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>.
- [2] Zawawy, W.K.E., Ibrahim, M.M., Abdel-Fattah, Y. R., Soliman, N.A. and Mahmoud, M.M. (2011) Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. *Carbohydrate Polymer*, 84, 865-871.
- [3] Wertz, J.L., Bedue, O., and Mercier, J.P. (2010) *Cellulose Science and Teechnology*, 1<sup>st</sup> edu. CRC Press, Switzerland
- [4] Tomme, P., Warren, R. A. J., and Gilkes N. R. (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 37, 1–81
- [5] Acharya, S., & Chaudhary, A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 844–856. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300001>
- [6] Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnology*, 2013, 985685. <http://doi.org/10.5402/2013/985685>
- [7] Sadhu S, & Maiti T.K. (2013) Cellulase Production by Bacteria: A Review *British Microbiology Research Journal*, 3, (3) 235-257
- [8] Lambertz C., Garvey M., Klinger J., Heesel D., Klose H., Fischer R, and Commandeur U. (2014) Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic synenzymes: a review. *Biotechnol Biofuels*, 18:7(1):135. doi: 10.1186/s13068-014-0135-5.
- [9] Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Christopher, L.P., and Sani R.K. (2010) Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour Technol*, 101(22):8798-806. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.001.
- [10] Jansová, E., Schwarzová, Z., and J. Chaloupka (1993) Sporulation and synthesis of extracellular proteinases in *Bacillus subtilis* are more temperature-sensitive than growth. *Folia Microbiologica*, 38, 22–24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## A PROPER CONCENTRATION OF CARBON BLACK NANOPARTICLES ENHANCES GROWTH OF THE REGENERATED VETIVER GRASS

CHONNIKARN KHUNCHUAY AND KANOKPORN SOMPORNPAILIN\*

College of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

\*Correspondence author e-mail: kanokporn.so@kmitl.ac.th; Tel: (+66)2-326-8000 ext. 2168, Fax: (+66)2-329-8265

### Abstract

Carbon black (CB) nanoparticles were used in enhancing efficiency of the plant regeneration process under tissue culture condition. The calli of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) were induced by using axillary bud as the explant. These calli were subjected onto plant regeneration medium, Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with  $1 \text{ mgL}^{-1}$   $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA),  $2 \text{ mgL}^{-1}$  6-benzylaminopurine (BAP) and  $2 \text{ mgL}^{-1}$  kinetin, adding  $0-70 \text{ mgL}^{-1}$  concentrations of carbon black (CB) nanoparticles. After six week incubation, vetiver calli developed on the medium supplemented with  $40 \text{ mgL}^{-1}$  CB nanoparticles showed the rather high frequencies of plant regeneration (93.75%), nevertheless no statistically different with other treatment did. Media containing CB nanoparticles in the range  $40-60 \text{ mgL}^{-1}$  significantly affected on enhancing the average of shoot number per callus more than other CB concentration did. Especially, the average shoot lengths of plantlets derived from  $40$  and  $50 \text{ mgL}^{-1}$  CB media (1.73 and 2.19 cm) are longer than those from non CB or other CB concentration media (0.88-1.05 cm) at the significant level. Adding CB nanoparticles in regeneration medium effects on enhancing electrical conductivity and decreasing the pH value. The concentration of CB nanoparticle effected the ratio of colloidal sizes which was found in the medium. The proper concentration of CB generates the optimum property of the regeneration medium which can promote the average of shoot number per callus, and enhanced shoot elongation of vetiver grass in the regeneration process.

**Key words:** Vetiver grass, Carbon black, Nanoparticles, Plant regeneration, Plant growth.

### Introduction

Nowadays, the applications of nanoparticles in agricultural, industrial and medical products are rising their uses. (Salata, 2004; Stark *et al.*, 2015). Widely utilized nanoparticles in large industrial scale are metal oxide nanoparticles (titanium dioxide, aluminium oxide, cesium dioxide, and zinc oxide), metal nanoparticles (silver and iron), and carbon-based nanoparticles (fullerene, carbon nanotube and carbon black) (Abbas *et al.*, 2013; Anjum *et al.*, 2016). Synthesized nanoparticles with a range of 1-100 nm diameters possess exceptional chemical, electrical, mechanical, and magnetic characteristics that are very different from those of the bulk materials (Monica & Cremonini, 2009). Current researches have indicated that nanoparticles tend to be more bioreactive than larger particles of the same material. Carbon black (CB) nanoparticles are made up of nonmetallic carbon elements and classified as a paracrystalline carbon form (Kang & Wang, 1997). This NPs appears spherical morphology containing the functional surfaces which have a high potential for reacting with organic molecules and also themselves. Therefore, they agglomerate into colloidal clusters in water base solution (Wang *et al.*, 2005).

CB nanoparticles are widely used in various industrial products such as paint, tire, and rubber goods (Bourdon *et al.*, 2012), therefore, these particles are increasing in demand. Lately, biotechnology researchers have been using nanoparticles in agricultural experiments, especially in increasing plant yields. Recently, various kinds of nanoparticles have been successfully used for enhancing growth efficiency and seed germination of several plant species (Milewska-Hendel *et al.*, 2016). ZnO nanoparticles in an optimal concentration were also shown to induce germination of reddish, rape, and corn (Lin & Xing, 2007)

and also to increase growth of *Brassica nigra* Seedlings (Zafar *et al.*, 2016). In addition, carbon nanotubes were found to promote growth of cucumber and onion roots (Yang & Watts, 2005). However, only a few experiment concerns about the effects of nanoparticles on calli growth and development.  $\text{TiO}_2$  nanoparticles has been shown to dramatically increase in size of barley callus by inducing cell division and expansion without negative effect on callus qualities (Mandeh *et al.*, 2012).

Carbon-based nanoparticles are expected to be less inducing oxidative stress and cytotoxicity than metal oxide nanoparticles are (Yang *et al.*, 2009). These nanoparticles have been reported to have both advantage and disadvantage effects on plant physiology (Husen & Siddiqi, 2014; Aslani *et al.*, 2014). Several reports have shown the positive effects of carbon-based nanoparticles (fullerol and carbon nanotube) at a proper concentration on plant growths [Kole *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2011]. However, there has yet been any report of using CB nanoparticles to enhance plant regeneration efficiency *In vitro*.

The concentration of CB particles in the media is considered to affect on the agglomerated CB particles. Various sizes of agglomerated particles effect surface area and contribute the physicochemical properties of media. These media properties may influence on calli development and regeneration. In this study, we investigated the effect of CB nanoparticle concentrations on the properties of the plant regeneration medium. Consequently, the influences of these CB particles in regeneration medium were analyzed for developing of vetiver calli. In addition, qualities of plant cells grown in medium containing different CB concentrations were determined, in order to find a suitable concentration of CB for the plant cell development. These data can be used for estimating the productive concentration for other varieties of plant cells.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Materials and Methods

**Preparation of CB colloid stock solution:** The manufactured CB nanoparticles are uniformly spherical shape with a diameter in range 50 nm, derived from commercial company (Thai Carbon Black). These nanoparticle were dispersed in deionized water by ultrasonication at 37 kHz frequency for 30 minutes. This solution was used as a stock solution for preparing all plant regeneration media.

**Plant media preparation:** The basal medium in the both stages of callus induction and plant regeneration was MS medium (Murashige & Skoog 1962). Callus induction medium was supplemented with 2 mgL<sup>-1</sup> NAA, 1 mgL<sup>-1</sup> BAP and 20 gL<sup>-1</sup> sucrose, while plant regeneration medium was supplemented with 1 mgL<sup>-1</sup> NAA, 2 mgL<sup>-1</sup> BAP, 2 mgL<sup>-1</sup> kinetin and 30 gL<sup>-1</sup> sucrose (Sompornpailin & Khunchuay, 2015). This plant regeneration medium was added with different concentrations of CB nanoparticles (0, 30, 40, 50, 60 and 70 mgL<sup>-1</sup>). The pH of the CB supplemented medium was adjusted to 5.7 with potassium hydroxide (KOH). All plant culture media were added agar up to make 8 gL<sup>-1</sup> and autoclaved for 15 minutes at 121°C.

**CB colloidal size distribution and effects on media properties:** The distribution of CB colloidal sizes and their effects on the plant regeneration medium were analyzed under liquid condition. The particle size distribution of CB colloid was determined by Delsa Nano Particle Analyzer. The electrical conductivity (EC) and pH of each sterilized medium differently containing CB were measured with a conductivity meter (CON 6/TDS 6 Conductivity/TDS meter) and a pH meter (UB-5, Denver instrument). Three replicates were done for statistical analysis of data.

**Effects of CB concentrations on plant regeneration:** Aseptic axillary bud of *Vetiveria zizanioides* L. Nash cv. Suratthani was used as explant. In the callus induction stage, axillary buds were cultured on callus induction medium at 25±2°C under a dark condition for 4 weeks. After that, the calli were transferred onto a fresh medium of the same formula and then cultured under the same condition for another 2 weeks. The same size of proliferating calli was used for the regeneration process. Calli prepared in the previous step were cultured on plant regeneration medium supplemented with different concentrations of CB nanoparticles following the protocol of media preparation. The calli were incubated at 25±2°C with a 16-h light/8-h dark photoperiod for 6 weeks. The percentage of plant regeneration, number of shoots per callus, the length of shoot and the morphology of the plantlets were recorded at six weeks. The percentage of plant regeneration were calculated using the following equation.

$$\text{Plant regeneration (\%)} = \frac{\text{Number of calli produced plantlets}}{\text{Number of total calli}} \times 100$$

**Electrolyte leakage of plantlet:** After culturing on media containing CB nanoparticles, plantlets were analyzed for the electrolyte leakage. Plantlets from each treatment were collected and cut into 0.5-cm pieces. These pieces were immersed in deionized water at 30°C. After thirty-minute immersion, the electrical conductivity (EC<sub>i</sub>) of the water with the immersed pieces of plantlets was measured with a handheld conductivity meter. Then, after six hours of immersion, the electrical conductivity (EC<sub>f</sub>) was measured again. Finally, the water with the immersed pieces of plantlets was boiled at 100°C for 1 minute and cooled down to room temperature. Then, the electrical conductivity (EC<sub>t</sub>) was measured again. These electrical conductivity values were used to calculate the percentage of electrolyte leakage of the plantlets from this following equation:

$$\text{Electrolyte leakage of the (\%)} = \frac{\text{EC}_f - \text{EC}_i}{\text{EC}_t - \text{EC}_i} \times 100$$

**Statistical analysis:** The experimental results were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the effects of different treatments. Means were separated by using Duncan's multiple range test (DMRT) at a probability level of 0.05. All statistics were computed by SPSS software.

## Results and Discussion

**Effects of CB concentrations on colloidal sizes and media properties:** Since the nutrient compositions in the culture media and CB concentration might affect the clustering of CB. Therefore, the sizes of CB colloid in nutrient-filled aqueous medium without agar was determined. The result showed that the colloid sizes of CB in all concentrations of media were classified in the range of 500 nm to 2500 nm (small size particles) and over than 5000 nm (large size particles) in a diameter (Table 1). The ratio of dispersion percentages of small size and large size particles is approximately 40 to 60. The percentage of small size CB colloids is increased when CB concentration elevated up to 50 mgL<sup>-1</sup>. CB concentrations higher than 50 mgL<sup>-1</sup> effected on an increasing percentage of large size CB colloids. Concentration of CB nanoparticles influenced on both EC and pH values of liquid media. These results showed in Fig. 1. Regeneration medium, adding with CB in the range 30-50 mgL<sup>-1</sup> showed the increasing EC level of medium. However, the CB concentration at a level higher than 50 mgL<sup>-1</sup> did not clearly increase the EC level of medium. Adding CB concentrations at 30, 40 mgL<sup>-1</sup> to medium effects on decreasing the pH value of the medium from 5.5 to 5.33, 5.27, respectively. Media containing 40 and 50 mgL<sup>-1</sup> CB have similar pH value (5.25). Media containing 60 and 70 mgL<sup>-1</sup> CB slightly reduced the pH level (5.23 and 5.21, respectively) after comparing to those containing 40 and 50 mgL<sup>-1</sup> CB.

The dispersion and stability of CB colloids in a medium depend on the repulsive and attractive forces between the all of the components in the colloidal suspension. The attractive forces can be determined

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

from the surface energy of CB colloids and the ionic strength of the medium. Under the experimental condition, the same ionic strength of the medium was used. Therefore, colloidal size distributions were variable depending on the CB concentration. Carbon atoms in CB are arranged in paracrystalline structures which is short and medium range ordering in lattice (Voyles *et al.*, 2001). This lattice surface of CB has hydrophobic property which causes CB particles easily aggregation into colloids in aqueous solution (Hadana *et al.*, 2013). When the energy of CB surface is much higher than other aqueous-based suspension components which CB particles are dispersive as colloid, thereby these particles attract each other and aggregate into clusters (Wang *et al.*, 2005). CB particles have high surface area which contains the functional group of chemically-bonded oxygen (i.e., hydroxylic acid, carboxylic acid). In aqueous solution, these functional groups transfer a hydrogen ion to water molecule and hydroxonium ion are formed. Therefore, pH and EC of media were changed when the different concentrations of CB were added.

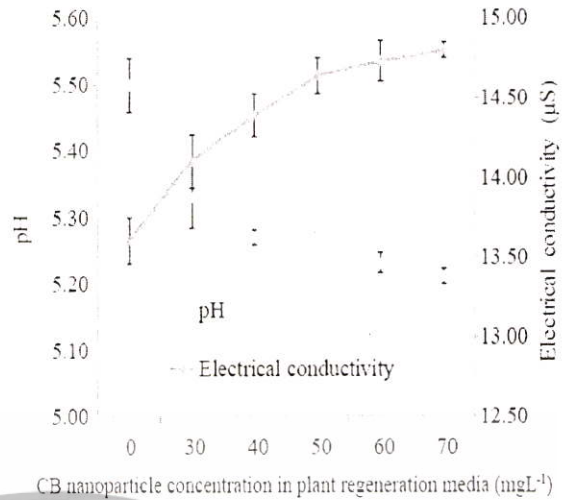


Fig. 1. The pH and electrical conductivity values of the plant regeneration medium supplemented with different concentrations of CB nanoparticles (0, 30, 40, 50, 60 and 70 mgL<sup>-1</sup>) after autoclaving.

Table. 1. The percentages of small and large sizes of CB colloids at concentration in the range of 30-70 mgL<sup>-1</sup> distributed in the plant regeneration medium.

CB concentration in culture medium (mgL <sup>-1</sup> )	The average of colloidal sizes	
	Small size (500-2,500 nm)	Large size (>5,000 nm)
30	41.91±2.29 <sup>c</sup>	58.09±2.29 <sup>a</sup>
40	45.25±5.02 <sup>b</sup>	54.75±5.02 <sup>a</sup>
50	62.53±8.46 <sup>a</sup>	37.47±8.46 <sup>b</sup>
60	56.64±6.21 <sup>b</sup>	43.36±6.21 <sup>b</sup>
70	45.33±4.05 <sup>c</sup>	54.17±4.05 <sup>b</sup>

The difference letters in each column show the significant difference at p<0.05

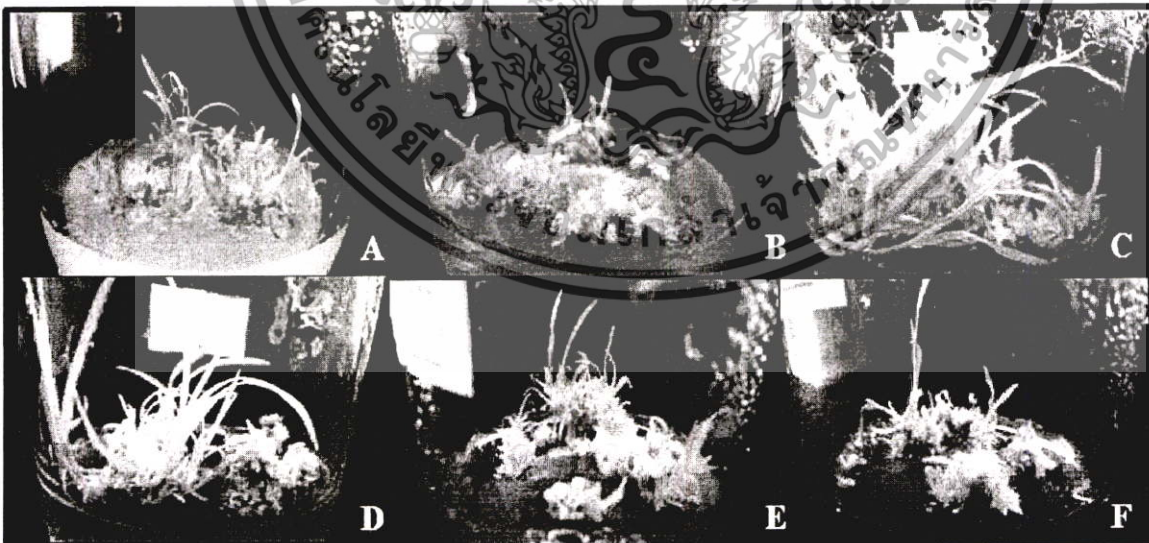


Fig. 2. Morphology of vetiver regeneration on plant regeneration medium added with different concentrations of CB nanoparticles under 16-h light/8-h dark photoperiod for 6 weeks later. Plantlets developed on plant regeneration medium with 0 mg L<sup>-1</sup> (A), 30 mgL<sup>-1</sup> (B), 40 mgL<sup>-1</sup> (C), 50 mgL<sup>-1</sup> (D), 60 mgL<sup>-1</sup> (E) and 70 mgL<sup>-1</sup> CB nanoparticles (F), respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Table 2. The concentrations of CB nanoparticle added in plant regeneration medium effect on vetiver developments.**

The concentration of CB nanopartiles (mgL <sup>-1</sup> ) in plant regeneration medium	Plant regeneration (%)	Average shoot no. per callus (shoots)	Average shoot length per callus (cm)
0	87.50 ± 14.4 <sup>a</sup>	8.20 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.08 <sup>c</sup>
30	87.50 ± 14.4 <sup>a</sup>	8.38 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.88 ± 0.05 <sup>c</sup>
40	93.75 ± 12.5 <sup>a</sup>	9.71 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.09 <sup>a</sup>
50	87.50 ± 14.4 <sup>a</sup>	9.50 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.09 <sup>b</sup>
60	87.50 ± 14.4 <sup>a</sup>	9.60 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.14 <sup>c</sup>
70	81.25 ± 12.5 <sup>a</sup>	9.00 ± 0.5 <sup>ab</sup>	0.90 ± 0.19 <sup>c</sup>

The difference letters in each column show the significant difference at  $p \leq 0.05$ .

#### Effects of media containing CB on plant development:

Explants were cultivated on a callus induction medium under darkness of tissue culture condition for six weeks. Yellow-creamy calli were then subcultured into several plant regeneration media supplemented with different concentrations of CB. The percentages of plantlets developed from calli on each plant regeneration medium were recorded at 6 weeks and shown in Table 2. Media supplemented with CB nanoparticles at 30, 40, 50, 60, and 70 mgL<sup>-1</sup> showed slightly higher average percentages of developed green spots than the plain medium with no CB nanoparticles did, but the differences were not statistically significant. Calli cultured on media containing different concentrations of CB nanoparticles were developed into the similar morphologies of green spots (data not showed). These green spots further developed into shoots within 3-4 weeks. At 6 weeks of incubation period, the average percentages of plantlets produced from the regeneration media adding CB nanoparticles were not statistically different from that without adding CB nanoparticles. Even though, calli cultured on the regeneration medium containing 40 mgL<sup>-1</sup> CB nanoparticles yielded a rather high in the average percentage of plantlets (93.75%). The averages of shoot numbers generated from media supplemented with 40-60 mgL<sup>-1</sup> CB were in the range of 9.50-9.71 shoots per callus. These averages are significantly higher than those from the media without CB or media supplemented with 30 mgL<sup>-1</sup> CB, (8.20 and 8.38 shoots, respectively). Moreover, calli on the medium supplementing with 40 mgL<sup>-1</sup> CB nanoparticles produced the longest shoot length (2.19 cm in average) following with those on the medium supplemented with 50 mgL<sup>-1</sup> CB did (1.73 cm shoot length in average), as shown in Fig. 2 and Table 2. Plantlet grew up quickly on both media adding 40 and 50 mgL<sup>-1</sup> CB nanoparticles. Calli grew on medium containing high concentrations of CB (60-70 mgL<sup>-1</sup>) show that the proliferating plant cell and also growth and development of plantlets were lesser than those on medium containing 40-50 mgL<sup>-1</sup> CB. In this experiment, even though, the slightly high CB concentration (60-70 mgL<sup>-1</sup>) in the media seem to reduce growth and development of plant cell when compared to the media with proper CB concentrations (40-50 mgL<sup>-1</sup>). These plant growth and development data; plant regeneration percentage and average shoot length are the same statistical group as those data from the non CB containing medium. Under this experimental condition, medium containing 40 mgL<sup>-1</sup> CB nanoparticles is the optimum concentration of CB nanoparticles, which enhances the

developmental efficiency of green spot into shoots and also increase the shoot length of vetiver grass (Table 2). These results showed that CB nanoparticles at a suitable concentration is not toxic to vetiver plantlets, similar to the study of red spinach grown in a nano-carbon supplemented medium which showed a non-toxic result (Begum & Fugetsu, 2012).

Although CB nanoparticles did not make a statistically significant difference in plant regeneration frequency, but they could significantly help an increase of shoots per callus. Calli cultured on regeneration media with the optimum concentration of CB produced a high number of shoots presented after 6 weeks of incubation period. CB particles may act like activated charcoal that facilitates long-term embryonic development in a medium, because it removes some growth-stunting compounds in the culture medium (Motoike *et al.*, 2001), or it may act like carbon nanotubes that induce the growth of tobacco cells by stimulating the genes involved in cell division and water transport (Khodakovskaya *et al.*, 2012).

The shoot length of vetiver grown in this study significantly depended on the concentration of CB nanoparticles adding in the plant regeneration media. This plant elongation effect may be attributed to the CB nanoparticles inducing more water absorption, hence more nutrients carried into plant cells, like carbon nanotubes do—carbon nanotubes form new capillaries that increase water uptake in addition to the regular means of water absorption (Pripathi *et al.*, 2011). However, nanoparticles at high concentration may cluster and the big clusters may not be able to penetrate through the cell membrane pores, so that they can not enhance water and mineral absorptions into the cell, similar to the clustering behavior of carbon nanotubes at high concentration (Dai, 2002).

The sizes of CB nanoparticle are smaller than the size of activated charcoal. These colloids of CB nanoparticles contain the porous carbon matrix which undergoes physicochemical properties with the plant nutrition. Therefore, these particles are useful in a control of the nutrient releasing in the agricultural process (Siddiqui *et al.*, 2015). Moreover, the CB surface area contains various kinds and degrees of oxygen complexes depending on the manufacturing conditions (Bradley *et al.*, 1995). The chemically-bonded oxygen, especially carboxylic acids, on a surface of CB have potential to react with ionic bases in the regeneration medium and to form carboxylate salts. A cation can substitute the hydrogen position of the hydroxyl group and produce water and carbon dioxide as the by products. Enhancing level of carbon dioxide in tissue culture condition may

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

increase photosynthetic rate of the regenerated plant. Moreover, carboxylic acids on CB surface are naturally modified to thioesters which known as derivatives of coenzyme A in plant metabolic reactions. Plants grown in media containing appropriated CB concentration may increase metabolic reaction insight plant, therefore significantly enhance their biomass.

High concentration of CB could not enhance plant biomass because these chemically-bonded oxygens might react with the positive charge of metal elements such as iron and zinc. These elements are co-factor of several enzymes, consequently reducing biosynthesis of plant metabolites. For these reasons, media containing CB at a higher level than an appropriate concentration tend to show the deteriorated effects to the culturing plant, since number of functional groups on the surface area of CB is high and also affects the characteristics of chemical reaction.

**Analysis of cell membrane integrity:** Electrolyte leakages of vetiver leaf tissues were used to indicate an integrity of plant cell membrane. Six-week-old plantlets developed in regeneration media supplemented with or without CB nanoparticles at different concentrations were analyzed. The electrolyte leakage results are presented in Fig. 3. It was found that vetiver leaves grown in the plant regeneration medium without CB nanoparticles exhibited a percentage of electrolyte leakage (42.33%) higher than leaves grown in media adding CB nanoparticles at all concentration did. The percentages of electrolyte leakage were significantly reduced when CB nanoparticles at concentration in the range of 30-70 mgL<sup>-1</sup> were added into the medium. The plantlets developed on media adding 40 mgL<sup>-1</sup> CB nanoparticles gave the lowest percentage of electrolyte leakage. This result is concordant with the growth and development of plantlet data. Moderate high concentrations of CB nanoparticles (in the range of 50-70 mgL<sup>-1</sup>) in the plant regeneration medium slightly increased cell membrane injury over the optimal concentration of 40 mgL<sup>-1</sup>. However, these concentrations in the media inflicted less level of electrolyte leakages than non CB or 30 mgL<sup>-1</sup> CB containing media.

Electrolyte leakage of plant cell was measured for evaluating cell membrane integrity which was damaged from various abiotic stresses including nanoparticles. Electrolyte leakage value normally indicated a oxidative stress of plant physiology. For example, the red spinach cells leaked more electrolytes when more carbon nanotube particles were added in media at the relative high concentration, in the range of 125-1000 mgL<sup>-1</sup> and caused adverse effects on their plants (Begum & Fugetsu, 2012). In our experiment, these electrolyte leakage results are different from those studies. All plants grown on media with CB nanoparticles were presented a lower level of electrolyte leakage from cell than that on media without CB. Our experiment used low to moderate concentrations of CB that was found not only to be non-toxic to vetiver cells, but also enhance shoot growth and development. Perhaps, the plant cell underwent self-protection from undesired foreign particles by responding

with a defensive mechanism like cell wall thickening (Husen & Siddiqi, 2014). Therefore, electrolyte leakages of plant cell grown in CB containing medium are lesser than non CB medium. However, higher than the proper concentrations of CB nanoparticles in media affected the producing compact plantlets with shorter shoots.

The chemical characteristics of CB surfaces can act as the generators for reactive oxygen species (ROSs) in cellular systems (Hussain *et al.*, 2009; Jacobson *et al.*, 2008). High concentration of CB contains a high surface area. It may generate high level of ROSs which have a potential to elevate cellular oxidative stress higher than a proper concentration of CB. Therefore, unappropriated CB concentrations may directly effect on the plant nutrient composition and harmful cellular components via mediating ROSs. These ROSs are well known as the cascade signals which regulate cellular mechanisms at DNA level. (Mroz *et al.*, 2007; Mroz *et al.*, 2008).

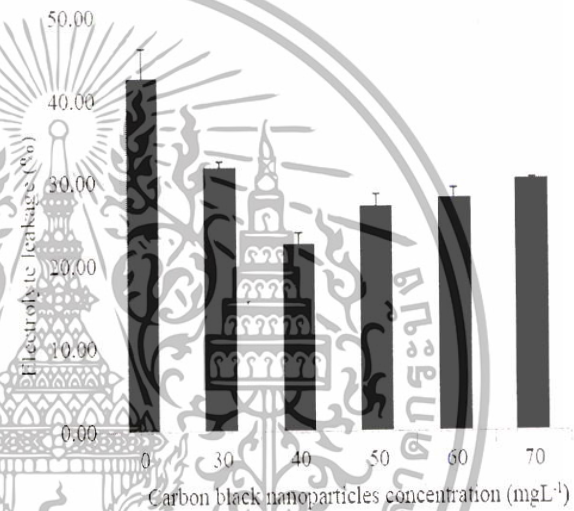


Fig. 3. The electrolyte leakage percentages of plantlets were grown on plant regeneration medium without or with CB nanoparticles at 6 weeks.

**Conclusion**

An addition of the CB nanoparticles effected on pH and EC properties of the regeneration medium and also affected the culturing plant cell. In this experiment, plantlets generated from media with CB nanoparticles presented lower electrolyte leakage than those from the non CB medium. This result indicated that the CB treated plants did not face with drastic stress conditions. Low to moderate concentrations of CB were found to be non-toxic to the plantlets regenerated *via* calli under tissue culture condition. The proper concentration of CB nanoparticles (40 mgL<sup>-1</sup>) in regeneration medium was exhibited a long shoot and high quality of plantlets after a long period culturing. These non toxic CB concentration can be applied in tissue culture medium of other grass or dicotyledonus plant species for enhancing growth and development.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## References

- Abbas, K., F. Simonelli, U. Holzwarth, I. Cydzik, A. Bulgheroni, N. Gibson and J. Kozempel. 2013. Feasibility study of production of radioactive carbon black or carbon nanotubes in cyclotron facilities for nanobioscience applications. *Appl. Radiat. Isotopes*, 73: 44-48.
- Anjum, S., B.H. Abbasi and Z.K. Shinwari. 2016. Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles for biomedical applications: Challenges and Opportunities. *Pak. J. Bot.*, 48: 1731-1760.
- Aslani, F., S. Bagheri, N.M. Julkapli, A.S. Juraimi, F.S.G. Hashemi and A. Baghdadi. 2014. Effects of engineered nanomaterials on plants growth: An overview. *Sci. World J.*, 2014: 1-28.
- Begum, P. and B. Fugetsu. 2012. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L) and the role of ascorbic acid as an antioxidant. *J. Hazard. Mater.*, 243: 212-222.
- Bourdon, J.A., A.T. Saber, S. Halappanavar, P.A. Jackson, D.M. Wu, K.S. Hougaard, N.R. Jacobsen, A. Williams, U. Vogel, H. Wallin and C.L. Yauk 2012. Carbon black nanoparticle intratracheal installation results in large and sustained changes in the expression of miR-135b in mouse lung. *Environ. Mol. Mutagen.*, 53: 462-468.
- Bradley, R.H., I. Sutherland and E. Sheng. 1995. Relationship between carbon black surface chemistry and energy. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 91: 3201-3207.
- Dai, H. 2002. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. *Acc. Chem. Res.*, 35: 1035-1044.
- Hanada, Y., S. Masuda, M. Iijima and H. Kamiya 2013. Analysis of dispersion and aggregation behavior of carbon black particles in aqueous suspension by colloid probe AFM method. *Adv. Powder Technol.*, 24: 844-851.
- Husen, A. and K.S. Siddiqi. 2014. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system. *J. Nanobiotechnol.*, 12: 16.
- Hussain, S., S. Boland, A. Baeza-Squiban, R. Hamel, L.C.J. Thomassen, J.A. Martens, M.A. Billon-Galland, J. Fleury-Feith, F. Moisan, J.C. Pairon and F. Marano. 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260: 142-149.
- Jacobsen, N.R., G. Pojana, P. White, P. Motter, C.A. Cohn, K.S. Korsholm, U. Vogel, A. Marcomini, S. Loft and H. Wallin 2008. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the F61-Mutatrade mark Mouse lung epithelial cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49: 476-487.
- Kang, Z.C. and Z.L. Wang. 1997. Chemical activities of graphitic carbon spheres. *J. Mol. Catal. A Chem.*, 118: 215-222.
- Khodakovskaya, M.V., K. de Silva, A.S. Biris, E. Dervishi and H. Villagarcia. 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano.*, 6: 2128-2135.
- Kole, C., P. Kole, K.M. Randunu, P. Choudhary, R. Podila, P.C. Ke, A.M. Rao and R.K. Marcus 2013. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: First evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnol.*, 13.
- Lin, D.H. and B.S. Xing 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.*, 150: 243-250.
- Mandeh, M., M. Omid and M. Rahaie 2012. *In vitro* influences of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue culture. *Biol. Trace Elem. Res.*, 150: 376-380.
- Milewska-Hendel, A., R. Gawecki, M. Zubko, D. Stróz and E. Kurezyńska. 2016. Diverse influence of nanoparticles on plant growth with a particular emphasis on crop plants. *Acta Agrobot.*, 69: 1694.
- Monica, R.C. and R. Cremonini 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62: 161-165.
- Motoike, S.Y., R.M. Skirvin, M.A. Norton and A.G. Otterbacher. 2001. Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. *Plant Cell Tiss. Org. Culture*, 66: 121-131.
- Mroz, R.M., R.P.F. Schins, H. Li, E.M. Drost, W. Macnee and K. Donaldson 2007. Nanoparticle carbon black driven DNA damage induces growth arrest and AP-1 and NF kappa B DNA binding in lung epithelial A549 cell line. *J. Physiol. Pharmacol.*, 58: 461-470.
- Mroz, R.M., R.P.F. Schins, H. Li, L.A. Jimenez, E.M. Drost, A. Holownia, W. MacNee and K. Donaldson. 2008. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. *Eur. Respir. J.*, 31: 241-251.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Salata, O.V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotech.*, 2: 3.
- Siddiqui, M.H., M.H. Al-Whaibi, F. Mohammad and M.Y. Al-Khaishany. 2015. Role of nanoparticles in plants. In *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and their impact on plants*, (Eds.): Siddiqui, M.H., M.H. Al-Whaibi and F. Mohammad. 19-35: Springer International Publishing.
- Sompornpailin, K. and C. Khunchuay. 2015. Synergistic effects of BAP and kinetin media additives on regeneration of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) *Aust. J. Crop Sci.*, 10: 726-731.
- Stark, W.J., P.R. Stoessel, W. Wohlleben and A. Hafner. 2015. Industrial applications of nanoparticles. *Chem. Soc Rev.*, 44(4): 5793-805.
- Tripathi, S., S.K. Sonkar and S. Sarkar 2011. Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3: 1176-1181.
- Voyles, P.M., N. Zotov, S.M. Nakhmanson, D.A. Drabold, J.M. Gibson, M.M.J. Treacy and P. Keblinski. 2001. Structure and physical properties of paracrystalline atomistic models of amorphous silicon. *J. Appl. Phys.*, 90: 4437-4451.
- Wang, C., K.C. Pam and C.B. Tan. 2005. Dissolution and swelling behaviors of random and cross-linked methacrylic acid-ethyl acrylate copolymers. *Langmuir*, 21: 4191-4199.
- Yang, H., C. Liu, D. Yang, H. Zhang and Z. Xi. 2009. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.*, 29: 69-78.
- Yang, L. and D.J. Watts. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, 158: 122-132.
- Yuan, H.G., S.L. Hu, P. Huang, H. Song, K. Wang, J. Ruan, R. He and D.X. Cui 2011. Single walled carbon nanotubes exhibit dual-phase regulation to exposed *Arabidopsis* mesophyll cells. *Nanoscale Res. Lett.*, 6.
- Zafar, H., A. Ali, J.S. Ali, I.U. Haq and M. Zia. 2016. Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: growth dynamics and antioxidative response. *Front Plant Sci.*, 20(7): 535.

(Received for publication 23 December 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้