การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

OPTIMUM CONDITIONS OF CELLULASE PRODUCTION BY *Bacillus* sp.

ณัฐธิดา จูแย้ม
นริศรา ดอนนอก
รุ่งนภา เจริญรักษา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

OPTIMUM CONDITIONS OF CELLULASE PRODUCTION BY *Bacillus* sp.

ณัฐธิดา จูแย้ม
นริศรา ดอนนอก
รุ่งนภา เจริญรักษา

TB00041
b. 00264902

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMUM CONDITIONS OF CELLULASE PRODUCTION BY *Bacillus* sp.

NUTTHIDA JOOYAM
NARISARA DONNOK
RUNGNAPA CHAROENRAKSA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Optimum Conditions of Cellulase Production by *Bacillus* sp.
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐธิดา จูแย้ม รหัสนักศึกษา 56050691 นางสาวนริศรา ดอนนอก รหัสนักศึกษา 56050707 นางสาวรุ่งนภา เจริญรักษา รหัสนักศึกษา 56050747
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ. ดร. สุวรรณี จรรยาพูน ประธานกรรมการ	
ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการ	
ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐธิดา จูแย้ม รหัสนักศึกษา 56050691
นางสาวนริศรา ดอนนอก รหัสนักศึกษา 56050707
นางสาวรุ่งนภา เจริญรักษา รหัสนักศึกษา 56050747

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)

ภาควิชา เคมี

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันขยะมูลฝอยทางการเกษตรเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งขยะมูลฝอยทางการเกษตรส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลลูโลสซึ่งสามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์เซลลูเลส วิธีการย่อยสลายทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทุกสภาวะจะทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดเหลว NB+CMC ที่อุณหภูมิ 37 °C 240 รอบต่อนาที ขั้นแรกทำการหาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดยเก็บเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง พบว่า เวลาในการเลี้ยงที่ดีที่สุด คือ 36 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0436 U/ml จากนั้นจึงทำการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยเติม กลูโคส ฟรุกโทส แลคโทส มอลโทส ซูโครส และ ไซโลส ความเข้มข้นอย่างละ 1% (w/v) ลงในอาหารเหลว พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ 1% แลคโทส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.6696 U/ml ในส่วนของแหล่งอาหารไนโตรเจนที่เหมาะสม ทำโดยเติม ยีสต์ เพปโตน ทริปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้นอย่างละ 1% (w/v) ลงในอาหารเหลว พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ 1% ยีสต์ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0662 U/ml และสุดท้ายทำการหาสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมโดยปรับอาหารเหลวให้มี pH 5 6 7 8 9 และ 10 ซึ่งพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม คือ pH 8 โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0400 U/ml จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. อย่างมากเมื่อเทียบกับปัจจัยอย่างอื่น โดยการเติมน้ำตาลแลคโตสทำให้มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียได้สูงสุด

คำสำคัญ : *Bacillus* sp. เอนไซม์เซลลูเลส สภาวะที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Optimum Conditions of Cellulase Production from *Bacillus* sp.
Students	Miss Nutthida Jooyam Student ID 56050691
	Miss Narisara Donnok Student ID 56050707
	Miss Rungnapa Charoenraksa Student ID 56050747
Degree	Bachelor of Science Environmental Chemistry
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr. Tippachai Vatanavicharn

Abstract

Nowadays, Agricultural waste has been a big effect to our environment. Agricultural waste mainly consists of cellulose which can be digested by enzyme cellulase. Biological degradation is an alternative method to reduce the waste. This research optimum conditions of cellulase production from *Bacillus* sp. For all conditions, *Bacillus* sp. was cultivated in NB+CMC broth at 37 °C and shook at 240 rpm. First, to find the time to produce the highest enzyme activity, samples were collected every 6 hours until 72 hours. The highest cellulase activity was 0.0436 U/ml at 36 hours. Then, the appropriate carbon source was obtained by adding 1% (w/v) glucose, fructose, lactose, maltose, sucrose and xylose to the liquid feed. The results show that the best carbon source is 1% lactose and had an enzyme activity of 0.6696 U/ml. In case of nitrogen sources, 1% (w/v) yeast, peptone, tryptone, ammonium sulphate, and ammonium chloride was added to liquid feed. The results showed that the best nitrogen source was 1%yeast with an enzyme activity of 0.0662 U/ml. Finally, the optimal pH was determined by adjusting the liquid medium to pH 5, 6, 7, 8, 9, and 10. The results showed that the optimum pH was pH 8 with an enzyme activity of 0.0400 U/ml. This research shows that carbon sources affect the cellulase production of *Bacillus* sp. significantly compared to other factors. By adding lactose, the bacterial cellulase production is maximized.

Keyword : *Bacillus* sp. Cellulase Optimum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษเป็นอย่างสูง ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องให้โครงงานพิเศษออกมาสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ กรรมการคุมสอบ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่ได้ให้ข้อคิดเห็น คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป และ นักศึกษาปริญญาโทห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ สารเคมี ในการวิเคราะห์งานต่างๆจนโครงงานพิเศษนี้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาเคมี และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) ที่เอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สารเคมี ในการทำโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา และผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษา จึงหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้สนใจงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้วิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ณัฐธิดา จูแย้ม
นริศรา ดอนนอก
รุ่งนภา เจริญรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 เซลลูโลส	3
2.1.1 การย่อยสลายเซลลูโลส	5
2.1.2 แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส	5
2.2 เอนไซม์เซลลูเลส	6
2.2.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส	6
2.2.2 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส	7
2.2.3 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	8
2.2.4 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	9
2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	9
2.2.5.1 ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์	9
2.2.5.2 ส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	9
2.2.5.3 เทคนิคในการเพาะเลี้ยง	11
2.2.5.4 ความเป็นกรด-ด่าง	12
2.2.5.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.5.6 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 13
2.2.6 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส 14
2.2.6.1 น้ำหนักโมเลกุล 14
2.2.6.2 อุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง 15
2.2.6.3 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้ง 16
2.2.7 การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ 17
2.3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 18
2.4 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียโดยวัดค่าความขุ่น 19
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 24
3.1 เชื้อแบคทีเรีย 24
3.2 สารเคมี 24
3.2.1 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 24
3.2.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรีย 24
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 25
3.4 การขีดเชื้อบนอาหารแข็ง (Restreak) 26
3.5 การเลี้ยงและการวัดการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อ 26
3.6 การวัดการเจริญเติบโต 27
3.7 การศึกษาแหล่งคาร์บอน 27
3.8 การศึกษาแหล่งไนโตรเจน 28
3.9 การศึกษาสภาวะกรด-ด่าง 28
3.10 การทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรีย (Carboxymethyl cellulase assay) 29
3.11 การทดสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford assay) 29
3.12 การทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีสังเกตวงใส (Clear zone) 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 31

4.1 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสม 31

4.1.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีน 31

4.1.2 ผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง 32

4.1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง 33

4.2 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 33

4.2.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีน 33

4.2.2 ผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง 34

4.2.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง 35

4.3 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 36

4.3.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีน 36

4.3.2 ผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง 37

4.3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง 37

4.4 ผลการศึกษาระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสม 38

4.4.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีน 38

4.4.2 ผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง 39

4.4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง 39

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 40

5.1 สรุปผลการทดลอง 40

5.2 ข้อเสนอแนะ 40

เอกสารอ้างอิง 41

ภาคผนวก ก 46

ภาคผนวก ข 48

ภาคผนวก ค 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้	7
2.2 ปฏิกิริยาการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	8
2.3 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์	14
4.1 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในเวลาต่างกัน	33
4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน	35
4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน	37
4.4 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร pH ที่ต่างกัน	39
ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS	48
ข.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford assay)	49
ข.3 ผลการศึกษาระยะเวลา	50
ข.4 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอน	50
ข.5 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจน	51
ข.6 ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง	51
ข.7 ผลการศึกษาระยะเวลาต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง	52
ข.8 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง	52
ข.9 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง	53
ข.10 ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่างต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง	53
ค.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ชั่วโมงที่ 6, 24, 36 และ 48 ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของเซลลูโลส	3
2.2	โครงสร้างผนังเซลล์พืช (plant cell wall structure)	4
2.3	โครงสร้างเซลลูโลสจากธรรมชาติ	4
2.4	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	19
3.1	ขั้นตอนการแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate แบบฟันปลา	26
4.1	กราฟแสดงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้มของโปรตีนในชั่วโมงที่แตกต่างกัน	32
4.2	กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงในชั่วโมงที่แตกต่างกัน	32
4.3	กราฟแสดงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นของโปรตีนในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	34
4.4	กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	35
4.5	กราฟแสดงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นของโปรตีนในแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	36
4.6	กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงในแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	37
4.7	กราฟแสดงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นของโปรตีนในในอาหารที่มี pH แตกต่างกัน	38
4.8	กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงในในอาหารที่ pH แตกต่างกัน	39
ข.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS	48
ข.2	กราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin ซึ่งทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี (Bradford assay)	49
ข.3	ขนาดวงใสแสดงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อในเวลาที่แตกต่าง	54
ข.4	ขนาดวงใสแสดงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	54
ข.5	ขนาดวงใสแสดงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อในแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	55
ข.6	ขนาดวงใสแสดงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี pH แตกต่างกัน	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
α	แอลฟา
β	เบต้า
γ	แกมมา
µg	ไมโครกรัม
µL	ไมโครลิตร
µmol	ไมโครโมล
°C	องศาเซลเซียส
CMC	Carboxymethylcellulose
g	กรัม
L	ลิตร
M	โมลาร์
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
mm	มิลลิเมตร
NB	Nutrient Broth
nm	นาโนเมตร
OD	Optical density
U/ml	ยูนิตต่อมิลลิลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยมีผู้ถือครองทางการเกษตรประมาณ 5.9 ล้านคน มีเนื้อที่ทางการเกษตรประมาณ 114.6 ล้านไร่ (สำมะโนการเกษตร, 2556) โดยประชาชนส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรมทำให้ในแต่ละปีมีวัสดุเหลือใช้จากกิจกรรมอุตสาหกรรมและกิจกรรมทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรที่สำคัญ เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ทะลายปาล์ม ใบไม้ และเศษวัชพืช เป็นต้น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรปริมาณมากถึง 195,303,000 ตัน/ปี (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550) ก่อให้เกิดปัญหาการจัดการขยะทางการเกษตรตามมา และแหล่งมูลฝอยที่สำคัญส่วนใหญ่มาจากกิจกรรมทางการเกษตร มูลฝอยจากแหล่งดังกล่าวมักประกอบด้วยมูลสัตว์ เศษหญ้า เศษพืช ภาชนะ บรรจุยาปราบศัตรูพืช เป็นต้น ในอดีต ของเสียจากการเกษตรเหล่านี้ส่วนใหญ่ (ยกเว้นภาชนะบรรจุยาปราบศัตรูพืช) มักถูกนำมาไถกลบลงบนพื้นที่ที่จะทำการเพาะปลูก ซึ่งถือเป็นการหมุนเวียนเอาของเสียที่เกิดขึ้นนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้เป็นอย่างดี แต่ในปัจจุบันนี้ได้มีการเร่งผลผลิตให้ได้ปริมาณมากขึ้นตามจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้นซึ่งขยะมูลฝอยทางการเกษตรเหล่านี้มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมเนื่องจากย่อยสลายได้ยาก โดยทั่วไปการแก้ไขปัญหาของขยะทางการเกษตรควรปฏิบัติเพื่อป้องกันและแก้ไขผลเสียที่จะเกิดขึ้น ดังนั้นจึงเกิดการศึกษาแนวทางการลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่จะเกิดขึ้นจากปริมาณขยะทางการเกษตรที่มีแนวโน้มมากขึ้นในทุกๆปี ซึ่งวิธีที่สามารถจัดการกับปัญหาดังกล่าวมีได้หลายวิธี เช่น การเผา ฝังกลบ หมักทำปุ๋ย หรือการแปรสภาพเป็นพลังงาน โดยขยะเหล่านี้บางส่วนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น นำเศษอาหารไปเลี้ยงสัตว์หรือหมักทำปุ๋ย และสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้ ในขณะที่ขยะทางการเกษตรบางชนิดมีเซลลูโลสประกอบอยู่ โดยเซลลูโลสเป็นโพลิแซคาไรด์ขนาดใหญ่ประกอบด้วยน้ำตาล D-glucose จับกันเป็นสายยาวและเมื่อหน่วยกลูโคสต่างๆอยู่ติดกันจะทำให้เกิดแผ่นเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ยาก ซึ่งการย่อยสลายเซลลูโลสให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงเป็นโมเลกุลกลูโคส (glucose) สามารถใช้เอนไซม์เซลลูเลส โดยเอนไซม์เซลลูเลสนี้สามารถสร้างได้จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา หรือแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ คือ *Bacillus* sp. (Ozaki *et al*., 1995), *Cladosporium resinae* sp. (Oh *et al*., 1999) และ *Clostridium* sp. (Ahsan *et al*., 1997) เป็นต้น การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์มีปัจจัยต่างๆที่แตกต่างกัน ดังนั้นการควบคุมการผลิตเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิต ได้แก่ อายุ และ ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ การให้อากาศ และอัตราการเขย่า (Sangrila Sadhu, 2013)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้แบคทีเรียเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการหาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อเป็นการเพิ่มทางเลือกในการกำจัดขยะมูลฝอยและสามารถลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1) ศึกษาเวลาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
2) ศึกษาแหล่งคาร์บอน
3) ศึกษาแหล่งไนโตรเจน
4) ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง
5) ทดสอบประสิทธิภาพการทำงาน
6) หาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

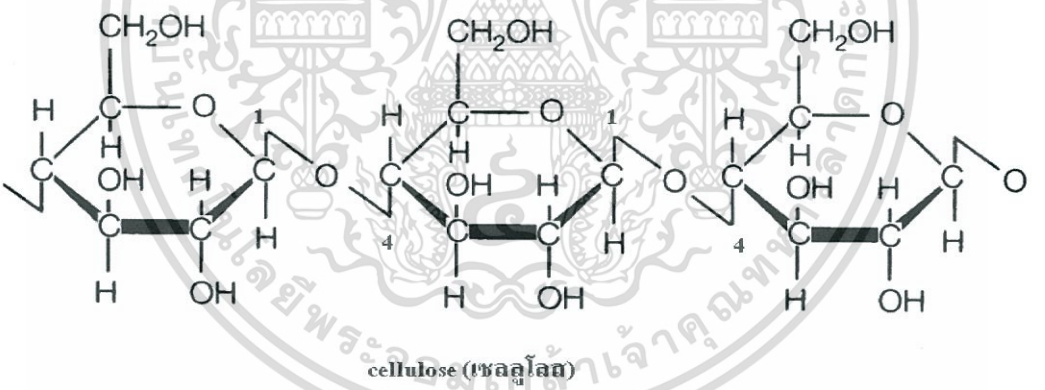
1) ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.
2) ทราบปริมาณการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 45 ของสารประกอบทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่พบมากในผนังเซลล์ของพืช ซึ่งมีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่าร้อยละ 97-99 จัดว่าเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ประกอบด้วย Polymer Chain เรียงขนานกันและยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Fan และคณะ, 1987) สูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ มีโครงสร้างอัดกันแน่นเป็นเส้นตรงไม่มีกิ่ง ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสโดยแต่ละโมเลกุลจะมีกลูโคสตั้งแต่ 1,400-10,000 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลเชื่อมต่อด้วยพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิก (β – 1,4 glycosidic bond) คือระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของกลูโคสโมเลกุลหนึ่งจะจับคาร์บอนตำแหน่งที่4 ของกลูโคสอีกโมเลกุลถัดไป ดังรูปที่ 2.1 (Cowling และ Krik, 1976)

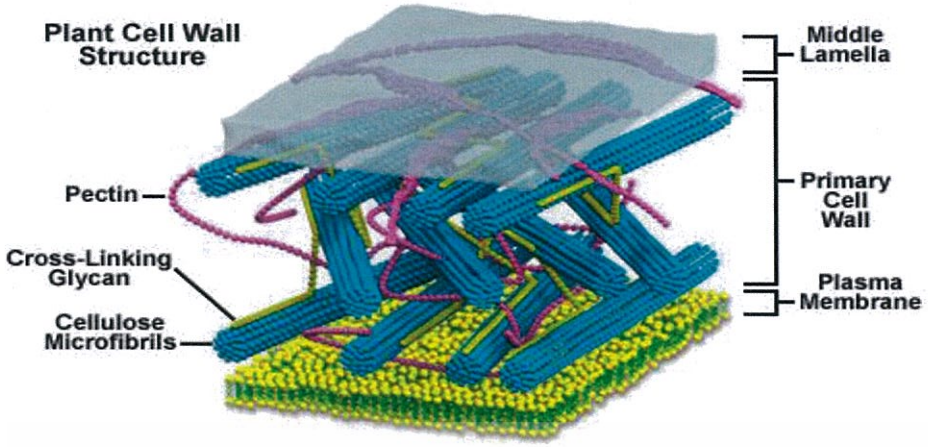


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose (20 กุมภาพันธ์ 2560)

เซลลูโลสเป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์พืช เช่น ผัก ผลไม้ และ เมล็ดธัญพืชโดยอยู่รวมกับเฮมิเซลลูโลส และเพกทินเซลลูโลสจัดเป็นเส้นใยอาหาร (dietary fiber) ชนิดที่ไม่ละลายในน้ำ และไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์กระเพาะเดี่ยว

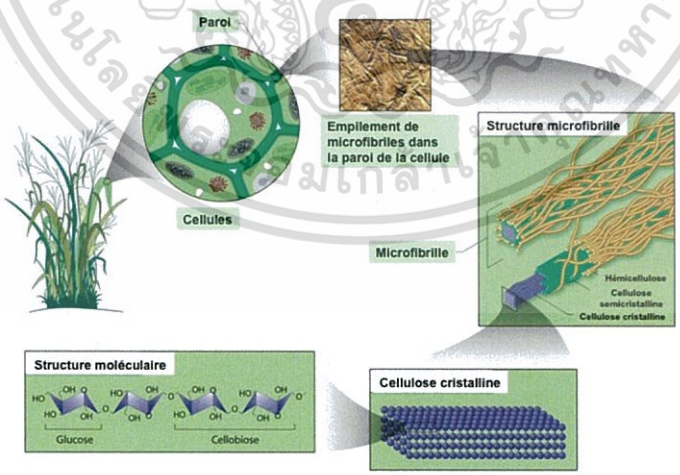
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างผนังเซลล์พืช (plant cell wall structure) ซึ่งมีส่วนประกอบหลักคือ เซลลูโลส และเพกทิน (pectin)

ที่มา http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html (20 กุมภาพันธ์ 2560)

โดยทั่วไปเซลลูโลสจากธรรมชาติ (Native cellulose) จะอยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส (Lingocellulose) คือ เซลลูโลสที่เชื่อมอยู่กับโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น เพคติน เฮมิเซลลูโลส แป้ง โมเลกุลของกลูโคสจะเรียงกันอยู่เป็นมัดๆ เรียกว่า Microfibril เมื่อนำมาขยายดูจะพบว่าประกอบด้วยส่วนที่อยู่รวมกันเป็นกระจุกอัดตัวกันแน่นเรียกว่า Crystalline และส่วนที่อยู่รวมกันแบบหลวมๆ เรียก Amorphous (Skopec และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างเซลลูโลสจากธรรมชาติ

ที่มา: http://www.societechimiquedefrance.fr/cellulose.html (20 กุมภาพันธ์ 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 การย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulose hydrolysis) (Fan และคณะ, 1987)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นผลึกหรือเป็นพอลิเมอร์ เส้นตรงของกลูโคสที่จับกันด้วย β – 1,4 glycosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย นอกจากนี้โดยธรรมชาติของเซลลูโลสจะมี linin จับอยู่ซึ่งเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยา การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือ

1) วิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (Acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งจะต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูง วิธีนี้จะมีข้อจำกัดคือให้ปริมาณกลูโคสต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการด้วย

2) วิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzyme hydrosis) ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะทำให้ปฏิกิริยาการย่อยภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสความดันบรรยากาศเพราะ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก ทำให้ไม่สูญเสียกลูโคสระหว่างเกิดปฏิกิริยาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

ข้อดีของการย่อยเอนไซม์

1) เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำจึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อนทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต

2) ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยา ทำให้ปฏิกิริยาเกิดสมดุลได้เร็ว

3) เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงกับสารตั้งจ้น ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มาก

4) ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น

5) เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามต้องการ

6) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น และสามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยเซลลูโลสได้

7) ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน

2.1.2 แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสมีดังนี้

1) แบคทีเรียในกระเพาะอาหารของสัตว์กินพืช เช่น วัว ควาย ในดิน เช่น *Bacillus* sp. และในทะเล เช่น *Cytophaga* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาพทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative -anaerobe) เช่น *Cellvibrio* sp. และ *Cellulomonas* sp. เป็นต้น

3) แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เช่น *Clostridium thermophilum* และ *Ruminococcus albus* เป็นต้น

4) Myxobacteria เช่น *Sporocytophaga* sp. (รพีพรรณ, 2530)

5) จุลินทรีย์ที่เป็นปรสิตในพืชมีทั้งพวกย่อยเซลลูโลสอย่างเดียว หรือก่อโรคในพืช เช่น *Pseudomonas solanacearum* (ปัจจุบันคือ *Ralstonia solanacearum*) ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช จุลินทรีย์ย่อยไม้ ได้แก่ แอคติโนไมซีส เป็นต้น

2.2 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง เช่นกลูโคส (glucose) โดยพบว่าเอนไซม์นี้สร้างได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา เป็นต้น ส่วนใหญ่ถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโดยสิ่งแวดล้อม เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น จุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำจากจากนั้นจึงดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

2.2.1 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส (Enzyme Classification (E.C)) (พิจิตรา, 2548) เอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์

2.2.1.1 เอนโดกลูคาเนส หรือเอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส (E.C.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ(amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose), ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส(hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่ง พันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม(random) ทำให้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligo-saccharides) เซลโลเพนธาโอส (cellopentaose) เซลโลไตรโอ (cellotriose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักใดขึ้นอยู่กับสมบัติของแต่ละเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.2 เอกโซกลูคาเนส หรือเอกโซ-1,4-กลูคาเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91) (อมรรัตน์, 2547) พบว่า มักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส

2.2.1.3 เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคไซเนส (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง

2.2.2 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่า “เอนไซม์เซลลูเลส” มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ (พรเทพ, 2528) จุลินทรีย์มีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมากจุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสมักอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสิท ดังตารางที่ 2.1 (พรเทพ, 2538)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยสิท
Alternaria sp.	*Bacillus* sp.	*Micromonospora* sp.
Aspergillus sp.	*Cellulomonas* sp.	*Nocardia* sp.
Chaetomium sp.	*Clostridium* sp.	*Streptomyces* sp.
Corprinus sp.	*Corynebacterium* sp.	*Streotosporangium* sp.
Foames sp.	*Cytophaga* sp.	
Fusarium sp.	*Polyangium* sp.	
Myrothecium sp.	*Pseudomonas* sp.	
Penicillium sp.	*Sporocytophaga sp.*	
Polyporus sp.	*Vibrio* sp.	
Rhizoctonia sp.		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยสิท
Sporotrichum sp.		
Thielavia sp.		
Trametes sp.		
Trichothecium sp.		
Trichoderma sp.		
Verticillium sp.		
Zygorhynchus sp.		

ที่มา : (พรเทพ, 2538)

ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์สำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น ชนิด ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิต ซึ่งได้แก่ อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ การให้อากาศ และอัตราการเขย่า (พรเทพ, 2538)

2.2.3 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan *et al*., 1987)

กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็น prohydrolytic step คือสายโซ่ anhydroglucose จะถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นที่สองเกิด hydrolyticcleavage ของสายโพลีเมอร์

ตารางที่ 2.2 ปฏิกิริยาการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ขั้นตอนที่	ปฏิกิริยา
1	Native cellulose $\xrightarrow{\text{Endo- β-glucanase}}$ cellulose
2	Cellulose $\xrightarrow{\text{Exo - β-glucanase}}$ cellobiose
3	Cellobiose $\xrightarrow{\text{Cellobiase}}$ 2 glucose

ที่มา : (Mandels and Reese, 1957)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส อาจทำได้โดยศึกษาการย่อยสลายในอาหารวุ้น จากงานวิจัยก่อนหน้า (Hankin และ Anagostakis, 1977) ได้ทำการวัดความสามารถการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี solid media containing carboxymethycellulose โดยเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร CMC agar วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี จากนั้นเทราดผิวหน้าอาหารด้วย 1% (w/v) aqueous hexadecyltrimethyl ammonium bromide ซึ่ง reagent นี้จะทำให้เกิดการตกตะกอนของ CMC ที่ไม่ถูกย่อยสลาย ทำให้เกิดวงใสของ CMC จากนั้นจึงวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสแล้วหาอัตราส่วน กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และงานวิจัยก่อนหน้า (Apun, 1995) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* บนอาหาร CMC agar บ่มเป็น เวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย 0.1% congo red เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย 1M NaCl ก่อน ตรวจสอบบริเวณใสที่ไม่ติดสีของ congo red ที่เกิดจากการย่อยสลาย CMC โดยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบการวัดการทำงานของเซลลูเลสเบื้องต้น เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก และเห็นผลรวดเร็ว

2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.2.5.1 ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน มีรายงานจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบครบทั้งสามส่วน คือ endoglucanase, exoglucanase และ β-glucosidase ในปริมาณที่พอเหมาะ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีผู้นิยมนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillum* sp., *Bacillus* sp.และ *Clostridium* sp.เป็นต้น

2.2.5.2 ส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1) แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (จิตตเสน, 2529) นำเชื้อ *Homicola nigrescens CM33* มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ cellulose powder, cellulose acetate, CMC และ cellobiose พบว่าอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณเซลลูเลสสูงสุด(ระพีพรรณ, 2530) ได้ทำการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากกระเพาะหมักของโคพื้นเมือง พบว่า *Ruminococcus albus21Aa* มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ Whatman No.1 filter paperpulp นอกจากนั้นยังมีการศึกษาแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนที่เหมาะสมจากธรรมชาติ เช่น การเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens DL-3* พบว่ามีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ rice hull และ rice bran โดยวัดการทำงานของ CMCase ได้เท่ากับ 153.0 และ112 U/ml ตามลำดับ (Lee *et al.*, 2008) และงานวิจัย (ภัทรา และคณะ, 2551) ได้เพาะเลี้ยง *Clostridium thermocellum* พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกข้าวโพดชานอ้อย ซังข้าวโพดและแกลบได้ดี ส่วน (Haq *et al.*, 2006) นำ *Trichoderma harzianum* มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติแตกต่างกัน คือ wheat bran, wheat straw, ricebran, rice husk และ soybean meal พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดในอาหารที่มี wheatbran เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนอกจากนี้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเช่นกัน โดยปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากหรือน้อยเกินไปในอาหารจะส่งผลกระทบให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเติบโตได้อย่างเต็มที่ (ชนิดาและคณะ, 2545) ทดสอบการผลิต extracellular-free xylanase จาก *Alkaliphilic Bacillus firmus K-1* นำไปใช้ในการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลนโดยแปรผันแหล่งคาร์บอนได้แก่ เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย และรำข้าว และแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0.1 0.3 0.5 0.7 0.9 1.0 1.3 และ 1.5% พบว่าเปลือกข้าวโพด 1% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด

2) แหล่งไนโตรเจน

(Keskar, 1992) ได้เพาะเลี้ยง *Penicillium janthinellum* ในอาหารเหลว พบว่าในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเชื้อเจริญได้ไม่ดีและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสน้อยเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่า ammonium sulphate ช่วยให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดีกว่า nitrate และ (*Alietal.*, 1991) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของ *Aspergillus terreus* พบว่า ammonium nitrate เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ให้ค่า enzyme และ specific activity สูงที่สุด นอกจากนี้ (นฤมล, 2544) ได้ทำการศึกษา *Bacillus subtilis CMU 4-4* และ *Bacillus coagulans TI-5* โดยเพาะเลี้ยงใน cellulose broth ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ tryptone, ammonim nitrate, soytone, ammonium sulphate และ peptone พบว่า *Bacillus subtilis CMU4-4* ใช้ tryptone และ *Bacillus coagulans TI-5* ใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด นอกจากนั้น (Oikawa *et al.*, 1994) ได้ทดลองเพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum KU-1* โดยใช้ polypeptone, peptone และ tryptone พบว่าแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้ง 3 ชนิด สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้และจากรายงานของ (Moussa and Tharwat, 2007) เพาะเลี้ยง *Sclerotium rolfsii* โดยมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ potassium nitrate, ammonium sulfate และ DL-asparagine พบว่า *Sclerotium rolfsii* ใช้ DL-asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด

2.2.5.3 เทคนิคในการเพาะเลี้ยง (Goksoyr and Eriksen, 1980)

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีวิธีที่นิยมนำมาใช้ 2 วิธี ดังนี้

1) Submerge culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมอาหารแข็งลงไปและมีการให้อากาศหมุนเวียนตลอดเวลาหรือใช้เครื่องพ่นอากาศ เช่น (Milala *et al.*, 2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* ในสภาวะ submerge culture พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี maize straw เป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด คือ 102 U/ml นอกจากนี้ (ชริดาและคณะ, 2549) เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lentinus* sp. ในสภาวะ solid state และ submerge culture ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแกลบข้าวเจ้าปน พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ submerge culture และ (Fungsin *et al.*, 2008) *พบว่า Aspergillus niger* เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ submerge culture สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เท่ากับ 56.2 U/L

1.1) Shake culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามปกติที่มีการเขย่าตลอดเวลา เช่น (Singh and Kumar, 1998) นำเชื้อ *Bacillus brevis VS-1* มาเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงใน shake-flask culture ที่ความเร็ว 175 รอบต่อนาที สอดคล้องกับรายงานของ (Barron *et al.*, 1995) ซึ่งเลี้ยงเชื้อ *Kluyvermyces marxianus IMB3* สามารถผลิต ethanol เมื่อเจริญในอาหารที่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส และพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน shake-flask culture ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น 21% และ (Desal *et al.*, 1988) ใช้การเพาะเลี้ยงแบบ shake culture ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และ β-glucosidase ของ *Scytalidium lignicola CD-48*

1.2) Static culture การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบสภาวะนิ่ง ไม่มีการเขย่า เช่น การทดลองของ (Kalra and Sandhu, 2004) นำเชื้อ *Trichoderma pseudokonigii* มาเพาะเลี้ยงในสภาวะ shake culture และ static culture พบว่า การเพาะเลี้ยงทั้งสองแบบให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน แต่การทดลองของ (Moussa and Tharwat, 2007) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Sclerotium rolfsii* ในอาหารเหลวพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะ shake culture เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีว่าเลี้ยงในสภาวะ static culture 5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) Solid state หรือ koji-type process การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวอาหารแข็งที่ชื้น ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้เลี้ยงเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย ส่วนผสมของอาหารแข็งประกอบด้วยวัสดุที่เป็นของแข็งแห้ง และน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งส่วน ใหญ่ใช้รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า ฟางข้าว และเสริมอาหารพวกโปรตีน และเกลือที่จำเป็น ดังเช่นรายงานของ (Haq *et al.*, 2006) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* ในอาหารที่มีรำข้าว ฟางข้าว เมล็ดข้าว แกลบ และ ถั่วเหลืองป่น พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดในอาหารที่มีรำข้าวเป็นส่วนประกอบ นอกจาก (Yusoff *et al.*, 1991) ทำการเพาะเลี้ยง *A. terreus SUK-1* ในสภาวะ solid state และ submerge culture โดยมี sugar cane bagasseเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน สภาวะ solid state เชื้อสามารถผลิต reducing sugar และเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ submerge culture เช่นเดียวกันกับการทดลองของ (Grajek, 1987) ซึ่งนำ *Thermoascus aurantiacus* และ *Sporotrichum thermophile* มาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state และ submerge culture พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ solid state เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะ submerge culture

2.2.5.4 ความเป็นกรด-ด่าง

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญและมีกระบวนการชีวเคมีในสภาพที่เป็นกลาง อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์หลายชนิดมีการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดหรือด่างมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น เช่น (Immanuel *et al.*, 2007) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* และ *A. fumigatus* ในอาหารที่มีกาบมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดที่ pH 5 และรายงานของ (Oikawa *et al.*, 1994) ที่เพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum KU-1* ใน cellulose broth พบว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ pH 5.5 เช่นเดียวกันกับ (Singh and Kumar, 1998) ที่เพาะเลี้ยง *Bacillus brevis VS-1* พบว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ pH 5.5 แต่ (Desal *et al.*, 1988) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Scytalidium lignicola CD-48* ใน pH 6 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ (Haq *et al.*, 2005) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum UM-11* พบว่าที่ pH 6 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด ส่วน (ระพีพรรณ, 2530) ใช้ cellulose broth ที่ pH แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยง *Ruminococcus albus 21Aa* พบว่า pH 6.8 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด ในทำนองเดียวกัน (Lee *et al.*, 2008) ได้ทำการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus amyloliquefaciens DL-3 พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในอาหารที่มี pH 7 โดยให้ค่า enzyme activity สูงที่สุด เช่นเดียวกันกับ (ภัทราและคณะ, 2551) ที่พบว่า *Clostridium thermocellum* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดที่ pH 7

2.2.5.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง เช่น (Haq *et al.*, 2005) ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum UM-11* ใน CMCbroth ที่อุณหภูมิ 20-40°C พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 28°C และจากรายงานของ (Kathiresan and Manivannan., 2006) ทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium fellutanum* ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40°C พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด รองลงมาคือ 20 และ 40°C ตามลำดับ การทดลองของ (Immanuel *et al.*, 2007) พบว่า *Aspergillus niger* และ *A. fumigates* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40°C ในอาหารที่มีกากมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่า enzyme activity สูงที่สุด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี sawdust เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ ให้ค่า enzyme activity สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50°C เช่นเดียวกันกับ (Ray *et al.*, 2007) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis CY5* และ *Bacillus circulansTP3* ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25, 30, 35, 40 และ 45°C พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40°C และ ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45°C นอกจากนั้น (นฤมล, 2544) พบว่า *Bacillus subtilis CMU4-4* และ *Bacillus coagulans TI-5* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญแตกต่างกัน คือ 45 และ 37°C ตามลำดับสอดคล้องกับ (Singh and Kumar, 1998) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus brevis VS-1* และพบว่าที่ 37°C เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด

2.2.5.6 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น การเพาะเลี้ยง *Rhizopus stolonifer* ในอาหารที่มี cassava waste เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในวันที่ 2 และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดในวันที่ 10 ส่วน (Pothiraj *et al.*, 2006) ทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium fellutanum* ในสภาวะ submerged fermentation เมื่อนำไปบ่มเป็นระยะเวลา 1-6 วันพบว่า เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีค่า enzyme activity เท่ากับ 79 U/ml ส่วน (Kathiresan and Manivannan., 2006) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma koningii* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง และ (Liu and Yang., 2006) พบอีกว่า *Penicilluim jantheinellum* มีเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 48 ชั่วโมง และ (Keskar., 1992) พบว่า*Anoxybacillus flavithermus EHP1* ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่เวลา 36 ชั่วโมง แต่ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. No. N-4 ในอาหาร CMC medium ของ (Salah *et al.*, 2007) พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด (Horikoshi *et al.*, 1984) ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaceins* ในอาหารที่มี sago pith เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด โดยให้ค่า enzyme activity เท่ากับ 1.30 mg/ml (Apun *et al.*, 2000) และพบอีกว่า *Bacillus subtilis CMU4-4* และ *Bacillus coagulans TI-5* มีเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 18 ชั่วโมง (นฤมล, 2544)

2.2.6 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิด อาจมีคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ โครงสร้างของเอนไซม์ ชนิดและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ประกอบด้วย

2.2.6.1 น้ำหนักโมเลกุล เอนไซม์เซลลูเลสจะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิต แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์

ชนิดของจุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (Daltons)	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus oryzae	130,000	Riou *et al.*, 1998
A. niger CCRC 31494	49,000	Yan and Lin, 1997
Bacillus amyloliquefaciens DL-3	55,118	Lee *et al.*, 2008
Bacillus subtilis KSM-635	40,000	Ozaki *et al.*, 1995
Bacteroides succinogenes S85	43,000	Shellhorn and Forsberg, 1987
Cladosporium resinae	98,000	Oh *et al.*, 1999
Clostridium thermocellum	60,000	Ahsan *et al.*, 1997
Streptomyces flavogriseus	45,000	Mackenzie *et al.*, 1984
Trichoderma reesei	81,000	Chirio and Brown, 1987

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2 อุณหภูมิ และ ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

1) อุณหภูมิที่เหมาะสม และความเสถียร

เอนไซม์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (optimum temperature) เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80°C คล้ายงานวิจัย (Okoshi *et al.*, 1990) พบว่า CMCase จาก *Bacillus* sp. *KSM-522* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานต่างกัน คือเซลลูเลส EI มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60°C ส่วนเอนไซม์ EII และ EIII มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50°C ส่วนการทดลอง (นฤมล, 2544) พบว่า CMCase จาก *Bacillus subtilis CMU4-44* และ *Bacillus coagulans TI-5* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 60°C ส่วน (Lee *et al.*, 2008) พบว่าที่อุณหภูมิ 50°C เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens DL-3* นอกจากนี้ (Berthelot and Delmotte, 1999) ได้ศึกษา β-glucosidase จาก *Rhizobium* sp. USDA 4280 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส คือ 35°C สำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เซลลูเลสนั้นรายงานว่า CMCase จาก *Bacilus subtilis CMU4-44* และ *Bacillus coagulans TI-5* เมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 10 นาที พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิไม่เกิน 60°C ส่วน (Lee et al., 2008) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens DL-3* มีความเสถียรสูงที่สุด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50-70°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นอกจากนี้(นฤมล, 2544) CMCase จาก *Bacillus sp. KSM-522* เมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันเป็นเวลา 30 นาที พบว่าเซลลูเลส EII และ EIII มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงไม่เกิน 50°C แต่ EI มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ ในช่วงไม่เกิน 40 °C แต่การทดลอง (Thomas and Zeikus, 1981) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum LQRI* และ*Trichoderma reesei QM9414* มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 25-50°C ซึ่งเอนไซม์จะเสียสภาพเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที (Okoshi *et al.*, 1990)

2) ระดับความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมและความเสถียร

การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย อาจทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์มีการแตกตัวตรงหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลหรือ side chain ได้ต่างกัน ในสภาวะที่ pH แตกต่างกันจะมีผลให้โครงสร้างสามมิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ค่าหนึ่ง เรียกว่า ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ณ จุดที่ pH มีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะลดลง เอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่สุดใน pH ช่วง 5.0 ถึง 9.0 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและลดช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงขึ้น จนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยา จะไม่เพิ่มขึ้นอีก พบว่า pH ที่เหมาะสมของ CMCase ของ *Bacillus subtillis CMU4-44* และ*Bacillus coagulans* TI-5 คือ pH 5.0 (นฤมล, 2544) ส่วน *Bacillus amyloliquefaciens DL-3* มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส คือ 7.0 และ จากรายงานของ (Salah *et al.*, 2007) พบว่า *Anoxybacillus flavithermus EHP1* ซึ่งเป็น thermophilic bacteria มี pH ที่เหมาะสมคือ 7.5 ส่วนความเสถียรต่อ pH ของเซลลูเลสและพบว่า เซลลูเลสจาก *Bacillus subtilis CMU4-44* มีความเสถียรที่ pH ในช่วง 4.0-8.0 และ *Bacillus coagulans* TI-5 มีความเสถียรต่อ pH อยู่ในช่วง 4.8-6.0 ส่วนรายงานของ (Lee *et al.*, 2008) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens DL-3* เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่ pH ในช่วง 4.0-9.0 นอกจากนี้ (Okada., 1985) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *A. niger* เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ใน pH แตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความเสถียรที่ pH 5.5 - 6.5 และเมื่อ (Yan and Lin, 1997) นำ β-glucosidase จาก *A. niger CCRC-31494* เก็บใน pH ที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 5.0-7.0 (นฤมล, 2544)

2.2.6.3 ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้ง

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกลไก การทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น และลักษณะของ functional group ที่บริเวณ active site ทำให้เข้าใจและสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ รายงานของ (Lee *et al.*, 2008) พบว่า Hg^{2+}, EDTA, Mn^{2+}, N-bromosuccinimide, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+} และ K^{+} มีผลยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens DL-3* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Singh and Kumar., 1998) ที่พบว่า Hg^{2+} และ Ag^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Bacillus brevis VS-1* เช่นเดียวกับ (Thomas and Zeikus., 1981) ที่รายงานว่า Ag^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Clostridium thermocellum LQRI* แต่ Ca^{2+},Mg^{2+} และ Mn^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Trichoderma reesei QM9414 ส่วน Cu^{2+}, Zn^{2+} และ ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether) -N, N-tetraacetic acid มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei QM9414* และ *Clostridium thermocellumLQRI* นอกจากนี้ (Forsberg and Groleau, 1982) ได้ศึกษาความเสถียรของ endo-β-1,4 glucanase และ β-1,4 glucosidase (cellobiase) ที่ผลิตจาก *Bacteroides succinogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติม merthiolate ปริมาณ 40 μg/ml ทำให้ CMCase สูญเสียการทำงาน 20% ระหว่าง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง

2.2.7 การนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ (Goksoyr and Eriksen, 1980)

จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ จึงมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ มาใช้ในกระบวนการผลิตสารสำคัญหลายชนิด โดยมีเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบสำคัญ เนื่องจากหาง่ายและเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมตัวอย่างของการนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์ ได้แก่

1) สกัดสารในใบชา ถั่วเหลือง มันเทศ แป้งข้าวโพด และวุ้น

2) ผลิตน้ำส้มสายชูจากเยื่อส้ม และเยลลี่จากสาหร่าย

3) ย่อยเซลลูโลสที่ตกค้างจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ

4) ย่อยเปลือกถั่วเหลือง

5) เปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่ออาหารของผัก ข้าวเจ้า และข้าวเหนียว

6) เป็นส่วนผสมในผงซักฟอก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขจัดความสกปรกและไม่ทำลายเส้นใยผ้า

7) ช่วยแยกเซลล์เดี่ยว และ active protoplast ของพืช

8) ช่วยทำให้น้ำผัก ผลไม้ ใสขึ้น

9) ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสในสิ่งปฏิกูล

10) นำกลูโคสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์ ไปใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ และโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein)

ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์มาผลิตเพื่อการค้า โดยมีการผลิตอย่างแพร่หลาย ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีจำหน่ายในบริษัทยักษ์ใหญ่ทางด้านสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์หลายแห่ง เช่น ในปี 2008 บริษัท Fluka มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* จำหน่ายในราคา 4,365 บาทต่อ 25 กรัม ส่วนบริษัท Sigma ผลิตจาก *Aspergillus niger* จำหน่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5,000 Units ในราคา 1,656 บาท นอกจากนั้นยังมีการผลิตจาก *Trichoderma reesei* โดยจำหน่าย 5,000 Units ในราคา 3,032 บาท และจาก *Trichoderma viridae* ขาย 5,000 Units ในราคา 5,259 บาท

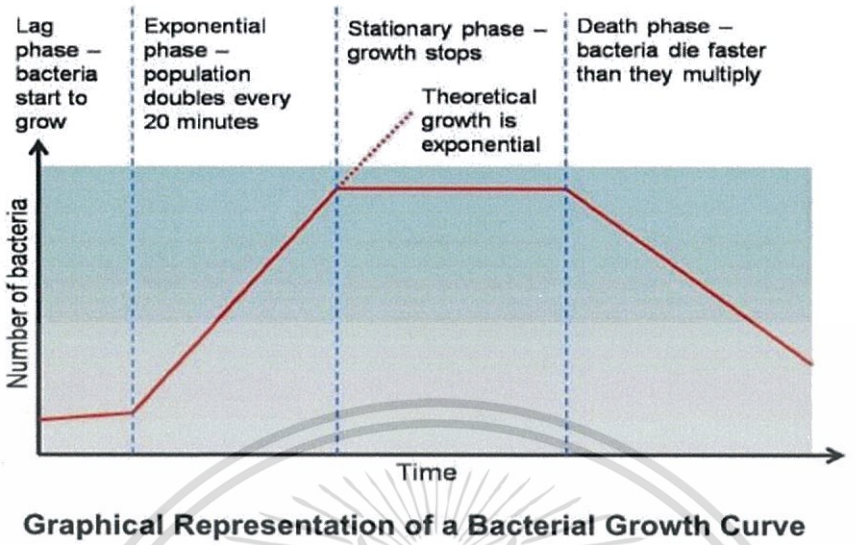
2.3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยว เช่น แบคทีเรียและยีสต์ ตลอดจนโปรโตซัวและสาหร่ายบางชนิดที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว การเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์นั้นไม่ได้หมายความว่าขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น ถึงแม้ว่าบางทีดูเหมือนเป็นเช่นนั้น แต่หมายถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและฟิสิกส์ภายในเซลล์ การเจริญเติบโตเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการดำรงชีวิต เซลล์แต่ละเซลล์มีช่วงอายุที่จำเพาะเจาะจงสำหรับ species หนึ่งๆ การเจริญเติบโตของประชากรนั้นสามารถที่จะตรวจสอบได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์หรือมวลชีวภาพ (biomass) ของประชากรต่อหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งเรียกว่า "อัตราการเจริญเติบโต" (growth rate) เวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรจากเดิมเป็น 2 เท่า เรียกว่า generation time (doubling time) จะแตกต่างกันไปในแต่ละ species ในสภาวะแวดล้อมหนึ่งๆ การเติบโตของจุลินทรีย์สามารถบอกได้โดยการวัด ความขุ่น (turbidity) ของจุลินทรีย์ในอาหารเหลว การเพิ่มขนาดของโคโลนีบนอาหารแข็ง หรือการเพิ่มของจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้การวัดนั้นต้องเทียบกับหน่วยเวลาจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยวจะ เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนด้วยการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 (binary fission) เซลล์รุ่นลูกแต่ละเซลล์มีลักษณะ เหมือนเซลล์แม่ทุกประการ เมื่อการแบ่งเซลล์สิ้นสุดลง จำนวนเซลล์หรือมวลชีวภาพ(biomass) จะเพิ่มเป็น 2 เท่าจากเมื่อก่อนแบ่งเซลล์

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สามารถศึกษาได้จากกราฟการเติบโต (growth curve) โดยที่กราฟการเติบโตปกติ (typical growthcurve) จะแสดงให้เห็นถึงระยะการเติบโต 4 ขั้นด้วยกัน คือ

1. ระยะ lag (A) เซลล์อยู่ในช่วงการปรับตัวก่อนแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน
2. ระยะ log (B) เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบ exponential
3. ระยะ stationary (C) อัตราการเพิ่มมวลชีวภาพเป็น 0
4. ระยะ decline (D) จำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอัตราการเพิ่มจำนวนน้อยกว่าอัตราการตาย (Bikramjit Sen.Team PrepGenie, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ที่มา : Bikramjit Sen. Team PrepGenie, 2009

2.4 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียโดยวัดค่าความขุ่น

ใช้หลักการดูดกลืนคลื่นแสงที่ไม่เท่ากันของจำนวนแบคทีเรียที่มากขึ้น ปริมาณแสงที่ดูดกลืนและกระจายออกจะเป็นสัดส่วนกับความหนาแน่นของเซลล์ เครื่องมือที่ใช้คือSpectrophotometer โดยการนำ suspension ของแบคทีเรียใสในหลอดวัดอ่านเปอร์เซ็นต์แสงที่ผ่านออกมา (%transmittance) ถ้า suspension มีความขุ่นมาก เปอร์เซ็นต์ที่แสงจะผ่านได้มีน้อยโดยทั่วไปมักอ่านค่า Optical density (OD) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นหรือจำนวนเซลล์

ข้อดี สะดวกรวดเร็ว หาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับจำนวนเซลล์ได้เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน(standard curve) เพื่อใช้ในการคำนวณจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียนั้นเอง

ข้อเสีย เชื้อที่จะนำมาวัดต้องมีความขุ่นมากพอ เป็นการวัดทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

(Lugani *et al.*, J Bioprocess Biotech 2015, 5:11) ผลของ pH : pH เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ตลอดจนการผลิตเอนไซม์ ดังนั้น การทดลองดำเนินการออก โดยใช้สื่อเหมาะสมของค่า pH แตกต่างกัน (4, 5, 6, 7, 8) เพื่อศึกษาผลกระทบการผลิตเซลลูเลสการเพิ่มประสิทธิภาพของ pH เพิ่มประสิทธิภาพได้ดำเนินการโดยการปรับค่า pH ช่วงจาก 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า pH ที่เป็นกลางถูกปรับเปลี่ยนโดยใช้ 1N HCl หรือ 1N NaOH หลังการเพาะเชื้อ *Mesorhizobium* ในฟลาสค์เก็บไว้บ่มในอุณหภูมิห้อง เริ่มต้นการอ่านและทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์การลดน้ำตาลการประเมินโดยใช้ DNS

(Arusha P. Nandimath1, 3 *et al.*, 2016) การเจริญเติบโตที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตั้งต้นและคาร์บอนแหล่งที่ถูกนำมาใช้ ค่า pH ของอาหารถูกปรับให้เหมาะสมโดยการดำเนินการเกิดปฏิกิริยาที่ pH ที่แตกต่างกัน ทั้งสอง 2B และ 38B สายพันธุ์ที่ได้รับอนุญาตที่จะเติบโตในสื่อของค่า pH ที่แตกต่างกัน : 4 ,4.5 ,5.0 ,5.5 ,6.0 ,6.5 ,7.0 , 7.5 และ 8.0 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาที่เป็นวัฒนธรรมที่นำการสังเคราะห์ถูกใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์

(S. P. Gautam *et al.*, 2011) ผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างของการผลิตเอนไซม์ เพื่อตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่างที่สภาวะที่เหมาะสม เลี้ยงในฟลาสค์ขนาด 150 mL จำนวน 50 mL กับค่า pH ที่แตกต่างกันในช่วง 3-9 ค่า pH ที่ถูกปรับเปลี่ยนโดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N NaOH ฟลาสค์ถูกเก็บไว้ใน 37°C เป็นเวลา 5 วันของการเลี้ยงเชื้อ

(Sonia Sethi, *et al.*, 2013) สำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการผลิตเซลลูเลสสูงสุด ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตั้งต้นและแหล่งคาร์บอนจะถูกนำและสารตั้งต้นนำมาปรับ pH ของอาหารจะถูกปรับ 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 ในขวดที่แตกต่างกันโดยใช้ 1N HCl และ 1N NaOH และผ่านการฆ่าเชื้อ วัฒนธรรมที่มีการเพาะเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในตอนท้ายของระยะฟักตัวของเซลล์กรองเซลล์ที่ได้รับและใช้เป็นแหล่งเอนไซม์

(SilvaniaA. Ladeirac *et al.*, 2015) เซลลูเลสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีประโยชน์มากที่สุดในอุตสาหกรรม เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรียหรือแอคติโนมัยซีทีท (เป็นแบคทีเรียจำพวกหนึ่งที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา) ในเชิงพาณิชย์ส่วนมากเซลลูเลสเป็นแหล่งกำเนิดของเชื้อรา อย่างไรก็ตาม ยังถือว่าเป็นแบคทีเรียที่แข็งแรงทนทานและผลิตเอนไซม์ได้หลากหลาย เพราะอัตราการเติบโตสูง แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โพลี่แซคคาไรด์ไฮโดรไลซิง ซึ่งรวมถึงเซลลูเลส อย่างไรก็ตามการศึกษาบาซิลัส เซลลูเลสได้จนกระทั่งเมื่อเร็ว ๆ ที่ ข้างหลังของเอนไซม์เชื้อรานี้เป็นส่วนใหญ่เนื่องจากความจริงที่ว่าส่วนใหญ่ *Bacillus* เซลลูเลส ย่อยสลายเซลลูโลส CMC แต่แทบจะไม่ย่อยสลายรูปแบบผลึกเซลลูโลส เซลลูเลสถูกเปิดเผยในกระบวนการทางอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมสิ่งทอในอุตสาหกรรมกระดาษ ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกเช่นทำให้นุ่มนวล

(Nisha., 2015) Cellulase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในสภาพแวดล้อมโดยกิจกรรมของเอนไซม์เช่น endoglucanase ซึ่งเป็นที่รู้จัก ascarboxymethyl เซลลูโลสสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซีทีท และยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูโลสจำนวนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การผลิตได้รับการเน้นบนเชื้อรากว่ากับสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสแยกได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน, บ่อน้ำร้อน, อินทรีย์, อุจจาระของสัตว์เคี้ยวเอื้อง , วัสดุโรงงาน, เสื่อม และ ปุ๋ยหมักเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะขึ้นอยู่กับวัฒนธรรมและพารามิเตอร์ด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน เติมอากาศ เวลาบ่ม ความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ซับซ้อนและมีความต้องการสูงในด้านเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรม เนื่องจากความหลากหลายของโปรแกรมประยุกต์โปรแกรมประยุกต์ที่สำคัญของอุตสาหกรรมสิ่งทอได้ใน 'bio-polishing' ของเสื้อผ้า, ลักษณะของกางเกงยีนส์ และในผงซักฟอกครัวเรือนเพื่อเพิ่มความนุ่มนวลผ้า เซลลูเลสสามารถใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและกระดาษ และ อาหารสัตว์ นอกจากนี้เซลลูเลสยังใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สิ่งทอ อาหาร อุตสาหกรรม ผงซักฟอก และเครื่องหนัง นอกจากนี้ ซึ่งใช้ในการหมักชีวมวลเชื้อเพลิงชีวภาพเส้นใยในการปรับเปลี่ยนและมันยังถูกใช้เพื่อประยุกต์ในทางได้ถูกใช้ในการรักษาและการรักษาบำบัด ขนแกะ และในการเตรียมผ้าฝ้าย

(Yayın tarihi *et al.*, 2012) ทรัพยากรที่เป็นความต้องการของมนุษย์ได้มาจากพืชชีวมวล เซลลูโลสเองก็เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพืชชีวมวล พืชผลิตเซลลูโลส $4x10^9$ ตัน เป็นประจำทุกปี เซลลูเลสในทางพอลิเมอร์มีหน่วยกลูโคสคือ β-1,4 linked glucose units มีโครงสร้างผลึกและไม่ละลายน้ำ จุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของของเสียลิกโน เซลลูโลสเป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญ เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตโดยการหมัก ความสำเร็จเกี่ยวกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสสารทางชีวภาพของวัสดุเซลลูเลสขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเซลลูโลส ไม่ว่าจะเป็นคุณภาพเซลลูโลส อุณหภูมิ อากาศแหล่งคาร์บอน ระยะฟักตัว และค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่างก็เป็นตัวแปรที่สำคัญต่อการผลิตของเอนไซม์เซลลูเลสหลายปีที่ผ่านมา แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ถูกสกัดออกมาและมีลักษณะที่ค่อนข้างโดดเด่นเนื่องจากได้รับเซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพจากแหล่งต่างๆ เช่นดิน, บางส่วนจากพืชเน่าเสีย, น้ำพุร้อน, สารอินทรีย์, อุจจาระของสัตว์เคี้ยวเอื้องและปุ๋ยหมัก นักวิจัยได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเซลลูเลสที่สูงในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในของหมักส่วนที่จมอยู่ใต้น้ำ

(Sangrila Sadhu1 *et al.*, 2013) เชื้อราและแบคทีเรียจะถูกใช้ประโยชน์ความสามารถในการผลิตที่หลากหลายของ cellulases และ hemicellulases โดยส่วนใหญ่เน้นการใช้เชื้อราเนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณมากพอควรและมักจะซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรียเซลลูเลส และง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของดังนั้นจึงสามารถโคลนมากขึ้นอย่างรวดเร็วและผลิตผ่านการรวมตัวกันอีกรอบ ในการเติบโตอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียโฮสต์ อย่างไรก็ตามการแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเซลลูเลสชนิดใหม่จากแบคทีเรียกลายเป็นประโยชน์อย่างกว้างขวาง มีเหตุผลหลายประการสำหรับการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ ได้แก่ i) แบคทีเรียที่มักจะมีอัตราการเติบโตสูงกว่าเชื้อราเพื่อรีคอมบิแนนต์ที่สูงขึ้นให้สามารถผลิตเอนไซม์ ii) แบคทีเรียเซลลูเลสมักจะมีความซับซ้อนมากขึ้นและอยู่ในสารประกอบมัลติ-เอนไซม์ฟังก์ชันที่เพิ่มขึ้นและทำงานร่วมกัน iii) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในความหลากหลายของสิ่งแวดล้อม และอุตสาหกรรมเฉพาะ เช่น thermophilic หรือ psychrophilic alkaliphilic หรือ acidiophilic และ halophilicstrains ซึ่งผลิตเซลลูเลสสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อความเครียดด้านสิ่งแวดล้อม สายพันธุ์เหล่านี้สามารถอยู่รอดและการผลิตเซลลูโลสในสภาวะที่ไม่เอื้ออำนวยซึ่งพบว่ามีเสถียรภาพภายใต้สภาพแวดล้อมและที่อาจจะใช้ในกระบวนการทางชีวภาพนี้อาจเพิ่มขึ้นอัตราการย่อยสลายของเอนไซม์หมักและการกู้คืนสินค้า ขณะนี้นักวิจัยกำลังมุ่งเน้นไปที่การใช้ประโยชน์และการปรับปรุงเอนไซม์เหล่านี้สำหรับการใช้งานในเชื้อเพลิงชีวภาพและ อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ชีวภาพ หลายแบคทีเรียสามารถเติบโตบนเซลลูโลส และหลายผลิตเอนไซม์ที่เร่งการสลายตัวของอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำหรือขอบเขตซึ่งไม่มีรูปร่างที่แน่นอนของผลึกเซลลูโลสอย่างไรก็ตามไม่กี่แบคทีเรียสังเคราะห์ระบบเอนไซม์ที่สมบูรณ์ที่จะส่งผลในการย่อยสลายที่กว้างขวางของวัสดุผลึกที่พบในธรรมชาติ แบคทีเรียเหล่านี้ไม่ควรเรียกว่า "true cellulolytic" แบคทีเรียและแบคทีเรียเหล่านั้นที่ผลิตบาง endoglucanases และ β- glucosidases แต่ไม่สมบูรณ์ระบบ เรียกว่า "pseudocellulolytic" แบคทีเรีย pseudocellulolytic ดังกล่าวอาจได้รับการเข้ารหัสยีนเอนไซม์เหล่านี้จากสายพันธุ์ที่ทดลองจริงโดยการโอนแนวราบมีหลายประเภทที่แตกต่างกันของเชื้อแบคทีเรียที่แยกเป็นจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันของการผลิตเซลลูเลสบางส่วนของแบคทีเรียที่สำคัญและมีลักษณะส่วนประกอบของเซลลูเลส

(Teacher และ Wood, 1982) คัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ด้วยอาหารแข็งที่มี carboxymethyl cellulaose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอนและทดสอบโดยวิธี congo red test จากนั้นตรวจผลการย่อยเซลลูโลสจากการเกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีของจุลินทรีย์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สะดวกและค่อนข้างมีประสิทธิภาพ

(Sharrock, 1988) ได้ทำการศึกษาผลของสีย้อม congo red เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์การย่อยสารประกอบโพลีแซคคาร์ไรด์ จากการทดลองพบว่าสีของ congo red จะจับกับโพลีแซคคาร์ไรด์ที่ไม่ถูกย่อยเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ทำให้สามารถแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยและไม่ย่อยออกจากกันได้ โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้จะปรากฏวงใสรอบโคโลนีอย่างชัดเจน วิธีนี้เหมาะสำหรับการคัดแยกในเบื้องต้นและจำนวนตัวอย่างที่ต้องการคัดแยกเชื้อมีหลายตัวอย่าง

(Ajay และคณะ, 2007) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่มีผลต่อเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Phlebia gigantea* ผู้วิจัยได้ทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของ *P. gigantean* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันไป จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อนำส่วนใส (crude enzyme) มาทดสอบการสร้างการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *T. reesei*. RUT C30 ที่ผลิตทางการค้าจากการทดลอง พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มาCMC (C1) และ Avicel(A) เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลการเกิดวงใสที่มีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์จาก *T. reesei*. RUT C30 (S) จากนั้นทำการทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดลองด้วยการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดย *P. gigantean* ในอาหารเหลว พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกันโดยในอาหารที่มี CMC มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.8 U/ml นอกจากนี้ CMC ยังใช้เป็นสับสเตรทในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียมาจากโครงงานพิเศษที่ใช้ในการศึกษาเรื่องการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัว คือ *Bacillus* sp. ทำการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง NB+CMC ทุกๆ1-2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีและวัสดุที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Broth (NB) บริษัท Himedia
2. Carboxymethylcellulose sodium salt (CMC) บริษัท Sigma
3. Luria – Bertani Broth (LB) บริษัท Bio World
4. Agar Agar Powder บริษัท Himedia
5. ยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Becton Dickinson
6. เพปโทน (Peptone) บริษัท Himedia
7. ทริปโทน (Tryptone) บริษัท Himedia
8. แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride) บริษัท Fisher
9. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) บริษัท Fisher
10. กลูโคส (Glucose) บริษัท Carlo
11. ฟรุกโทส (Fructose) บริษัท Himedia
12. แลคโทส (Lactose) บริษัท Himedia
13. มอลโทส (Maltose) บริษัท Himedia
14. ซูโครส (Sucrose) บริษัท Himedia
15. ไซโลส (Xylose)บริษัท Himedia
16. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) บริษัท Carlo
17. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) บริษัท Carlo

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรีย

1. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride) บริษัท Loba
2. กรดซิตริก (Citric acid) บริษัท Carlo
3. คองโก เรด (Congo red) บริษัท Sigma
4. 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) บริษัท Sigma
5. Anhydrous glucose บริษัท Merck
6. PBS Buffer บริษัท SIgma
7. สารละลายมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) บริษัท Sigma
8. Dye Reagent บริษัท Bio-Rad
9. Enzyme Cellulase

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

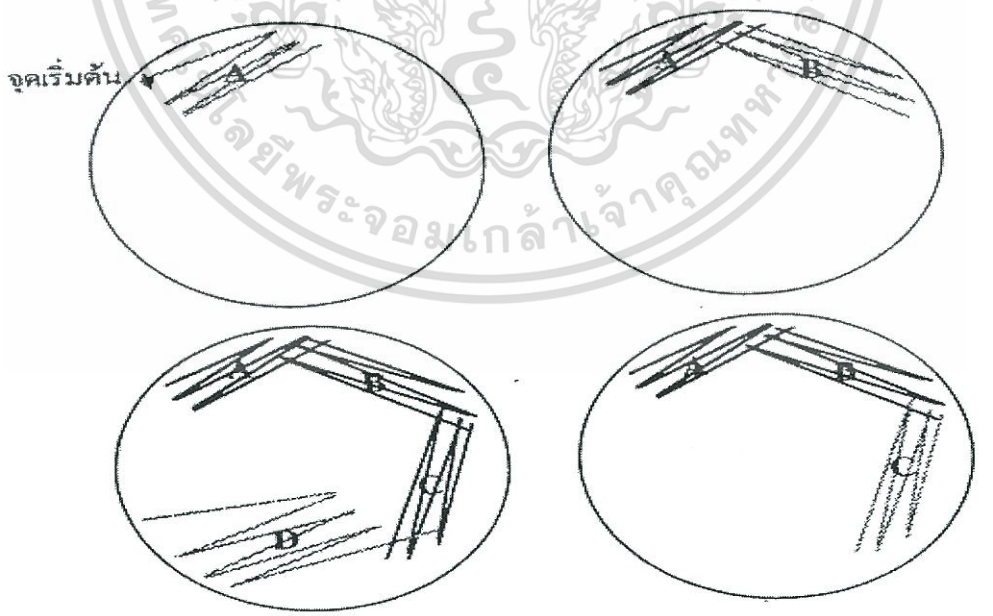
1. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
2. จานเพาะเชื้อพลาสติก
3. จานเพาะเชื้อแก้ว
4. หลอดเซนติฟิวก์ 15 และ 50 ml
5. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 ml
6. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาดต่างๆ
7. คิวเวต (Cuvette)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
10. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
11. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo Centrifuge)
13. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
14. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet)
15. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. เครื่องกวนสาร
17. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Quick Spin)
18. ตู้อบ
19. Water bath
20. หลอดทดลองขนาดต่างๆ

3.4 การขีดเชื้อบนอาหารแข็ง (Restreak)

การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ คือการทำให้เชื้อที่มีปริมาณมากค่อยๆกระจายออกจนแยกเป็นโคโลนี (Colony) เดี่ยวๆ ซึ่งแต่ละโคโลนีจะเจริญมาจากเซลล์เดี่ยวจึงถือเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการในการขีดเชื้อแบบ Four - way cross Streak ใช้ Loop เผาไฟแล้วรอให้เย็นแล้วแตะเชื้อมาขีดบนอาหารแข็งตามแนว (ดังรูปที่ 3.1) โดยในการขีดทุกแนวควรเปลี่ยน Loop ที่ใช้หรือมีการเผาไฟทุกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อที่มากเกินไป เชื้อที่ขีดจะขึ้นรวมกันมากที่รอยขีดแรก (ในรูป รอยขีด A) แล้วค่อยๆกระจายตัวออกลดลงในรอยขีดถัดไป จนแต่ละเซลล์ออกจากกันได้หลังจากที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน แต่ละเซลล์นั้นจะแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ (ในรูป รอยขีดD) ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate แบบฟันปลา

ที่มา : คู่มือ บทปฏิบัติการหลักสูตรเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยวลัยลักษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเลี้ยงและการวัดการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว 1-2 โคโลนีลงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก) บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำมาวัดค่า Optical density ของตัวอย่างให้ได้เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm และบันทึกผล

3.6 การวัดการเจริญเติบโต

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.5 ใส่ลงในอาหารเหลว NB+CMC ปริมาตร 300 ml ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 1,000 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้ incubator shaker มีความเร็วรอบ 240 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อตัวอย่างปริมาณ 5 %(v/v) เพื่อเก็บเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงแรกจนครบ 72 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนการเก็บเชื้อตัวอย่าง คือ นำเชื้อตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm และบันทึกผล แล้วจึงนำเชื้อตัวอย่างไปปั่นตกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำเชื้อส่วนใสเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำตะกอนไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1xPBS เขย่าให้สารละลายบัฟเฟอร์กับตะกอนเป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปต 1 ml ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้งและนำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C นำตะกอนแห้งไปชั่งคำนวณหาน้ำหนักของตะกอน

3.7 การศึกษาแหล่งคาร์บอน

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.5 ใส่ลงในอาหารเหลว NB+CMC ปริมาตร 75 ml ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 ml ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนต่างกัน คือ กลูโคส (Glucose), ฟรุกโทส (Fructose), แลคโทส (Lactose), มอลโทส (Maltose), ซูโครส(Sucrose) และไซโลส (Xylose) (ภาคผนวก ก) เขย่าในตู้ incubator shaker ความเร็วรอบ 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนการเก็บเชื้อตัวอย่าง คือ นำเชื้อตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm และบันทึกผล แล้วจึงนำเชื้อตัวอย่างไปปั่นตกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำเชื้อส่วนใสเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำตะกอนไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1xPBS เขย่าให้สารละลายบัฟเฟอร์กับตะกอนเป็นเนื้อเดียวกันปิเปต 1 ml ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 นาที เทสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้งและนำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C จนตะกอนแห้งแล้วนำไปหาน้ำหนักของตะกอน

3.8 การศึกษาแหล่งไนโตรเจน

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.5 ใส่ลงในอาหารเหลว NB+CMC ปริมาตร 75 ml ที่บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 250 ml ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ยีสต์ (Yeast extract), เพปโตน (Peptone), ทริปโตน (Tryptone), แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium chloride) และ แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) (ภาคผนวก ก) เขย่าในตู้ incubator shaker ความเร็วรอบ 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนการเก็บเชื้อตัวอย่าง คือ นำเชื้อตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm และบันทึกผล แล้วจึงนำเชื้อตัวอย่างไปปั่นตกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำเชื้อส่วนใสเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำตะกอนไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1xPBS เขย่าให้สารละลายบัฟเฟอร์กับตะกอนเป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปต 1 มิลลิลิตรใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้งและนำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C จนตะกอนแห้งแล้วนำไปหาน้ำหนักของตะกอน

3.9 การศึกษาสภาวะกรด-ด่าง

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.5 ใส่ลงในอาหารเหลว NB+CMC ปริมาตร 75 ml ที่บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 250 ml ซึ่งมีค่า pH ที่แตกต่างกันตั้งแต่ pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10 (ภาคผนวก ก) เขย่าในตู้ Incubator shaker มีความเร็วรอบ 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา24 ชั่วโมงโดยมีขั้นตอนการเก็บเชื้อตัวอย่าง คือ นำเชื้อตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm และบันทึกผล แล้วจึงนำเชื้อตัวอย่างไปปั่นตกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10นาที นำเชื้อส่วนใสเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำตะกอนไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1xPBS เขย่าให้สารละลายบัฟเฟอร์กับตะกอนเป็นเนื้อเดียวกัน ปิเปต 1 ml ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้งและนำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C จนตะกอนแห้งแล้วนำไปหาน้ำหนักของตะกอนที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 การทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรีย (Carboxymethyl cellulase assay)

1. เตรียม Substrate โดยละลาย Carboxymethyl cellulase (CMC) 2%(w/v) ในซิเตรท บัฟเฟอร์ pH 4.8 ความเข้น 0.05M (Citrate buffer pH 4.8)
2. เตรียม Glucose Stock Solution ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0.3125 mg/ml
3. กลุ่ม Standard เติม Substrate 125 µL

   กลุ่มเชื้อตัวอย่าง เติม Substrate 125 µL และเชื้อส่วนใสจำนวน 250 µL

   กลุ่ม Blank เติม Substrate 125 µL และ Citrate buffer 125 µL
4. นำไปบ่ม ในตู้ Incubator อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที
5. เติม DNS หลอดละ 750 µL
6. กลุ่ม Standard เติม Citrate buffer pH 4.8 125 µL และ Glucose Stock Solution ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0.3125 mg/ml 125 µL

   กลุ่ม Blank เติม Citrate buffer 125 µL
7. นำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 5 นาที
8. เติมน้ำกลั่น 5 mL ผสมให้เข้ากัน
9. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

3.11 การทดสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford Assay)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0.00, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml
2. กลุ่ม Standard เติมสารละลายมาตรฐาน BSA 10 µL และ 1x dye 200 µL

   กลุ่ม Sample เติมเชื้อส่วนใส 10 µL และ 1x dye 200 µL
3. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12 การทดสอบกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีสังเกตวงใส (Clear zone)

1. เตรียมอาหารแข็ง CMC + Citrate buffer pH 4.8 0.05 M เจาะหลุมสำหรับลงเชื้อ 4 หลุม ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ รองพื้นหลุมด้วยอาหาร CMC + Citrate buffer pH 4.8
2. หยดเชื้อส่วนใสหลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง 2 หลุม หลุมละ 75 µL
3. หยด Enzyme Cellulase 20x เป็น Possitive 1 หลุม หลุมละ 75 µL
4. ลง Citrate Buffer pH 4.8 เป็น Negative 1 หลุมละ 75 µL
5. ใส่ในถุงพลาสติกก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C overnight (8-16 ชม.)
6. นำจานเพาะเชื้อออกมาแช่ Congo red เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วย NaCl 2-3 รอบ แช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที
7. วัดวงใสที่ได้และบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสจากแบคทีเรียเชื้อ *Bacillus* sp. มาจากโครงงานพิเศษ เรื่องการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลวัววิเคราะห์โดยการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส ศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย

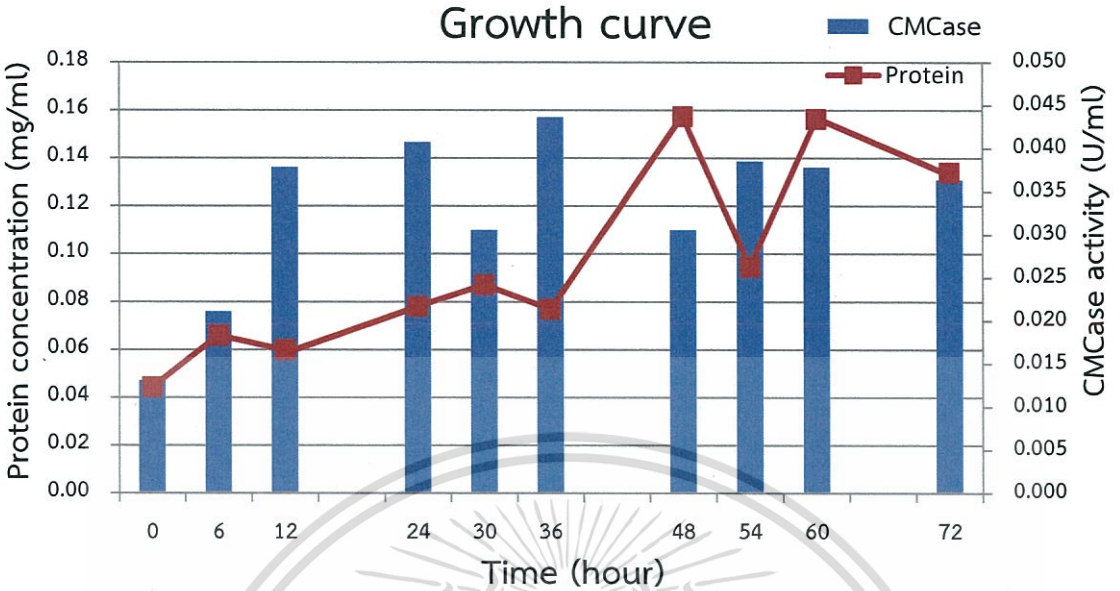
1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายซับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 µmol ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

4.1 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสม

4.1.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีน

การศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเลี้ยงในอาหารเหลว NB+CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมงโดยเก็บเชื้อตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงพบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสค่อยๆเพิ่มขึ้นเนื่องจากอยู่ในระยะ lag phase แบคทีเรียจะมีการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จนถึงชั่วโมงที่ 24 แบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะ log phase แบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตคงที่จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.0407 U/ml และในชั่วโมงที่ 30 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสลดลงไม่เป็นไปตามแนวโน้มในช่วง stationary phase และกลับมาเพิ่มในชั่วโมงที่ 36 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.0436 U/ml เมื่อเข้าสู่ช่วง death phase แบคทีเรียจะตายมากขึ้นส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส น้อยลงและในชั่วโมงที่ไม่เป็นไปตามแนวโน้มอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมในขณะทำการทดลอง ซึ่งผลการทดลองมีความขัดแย้งกับงานวิจัยของ (D.J. Mukesh Kumar *et al*, 2012) ที่พบว่าเวลาที่ดีที่สุดในการเลี้ยงและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสคือ 48 ชั่วโมง จากนั้นได้นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในชั่วโมงที่ 24 และ 36 ไปคำนวณค่าทางสถิติก่อนนำไปศึกษาร่วมกับปัจจัยในด้านคาร์บอน ไนโตรเจน และค่าความเป็นกรดด่าง พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) เมื่อนำไปทดสอบค่าความเข้มข้นของโปรตีนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 0.1575 mg/ml โดยปริมาณโปรตีนที่ได้ส่วนใหญ่มีค่าน้อยกว่าเอนไซม์เซลลูเลส อาจจะเกิดจากการเสื่อมสภาพของสารละลายมาตราฐานหรือการเสื่อมสภาพจากการเก็บรักษาสภาพของเชื้อตัวอย่าง

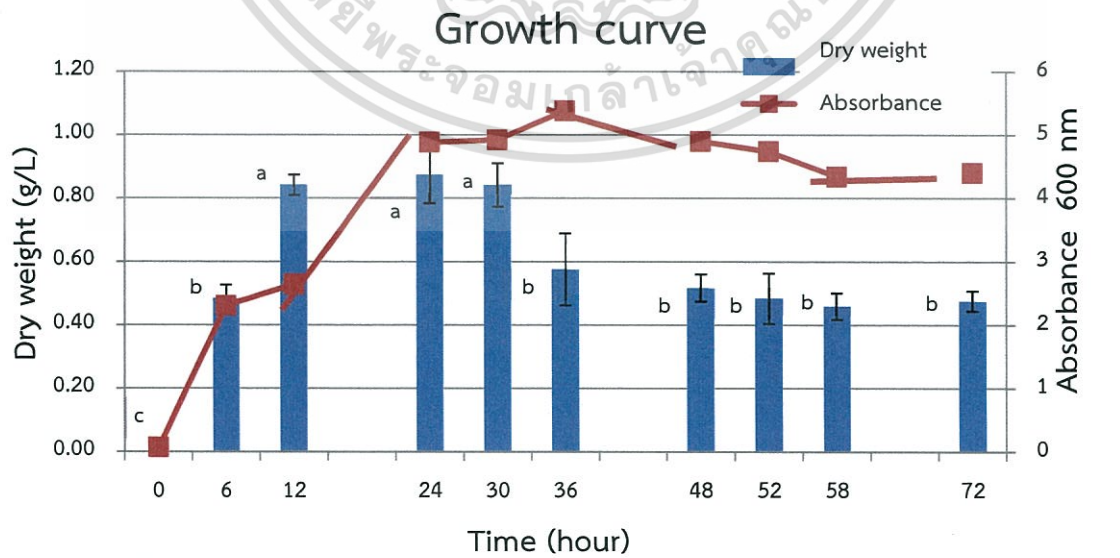
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีนในชั่วโมงที่แตกต่างกัน

4.1.2 ผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. ในอาหารเหลว NB+CMC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บเชื้อตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 600 nm พบว่าชั่วโมงที่ 36 มีค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักแห้งดีที่สุดเท่ากับ 5.38 และ 0.113 g/L ตามลำดับ ซึ่งการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสงไม่สัมพันธ์กับน้ำหนักแห้ง



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงในชั่วโมงที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในเวลาต่างกัน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของอาหารหลุมควบคุมเท่ากับ 27 mm และแบลงค์เท่ากับ 5 mm

เวลา	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm)
0	6
6	6
12	14
24	16
30	15
36	14
48	14
54	14
60	14
72	14

จากการทดลองพบว่า ขนาดของวงใสที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันมาก ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าช่วงเวลาใดที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด แต่สามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เพราะเกิดวงใสขึ้น

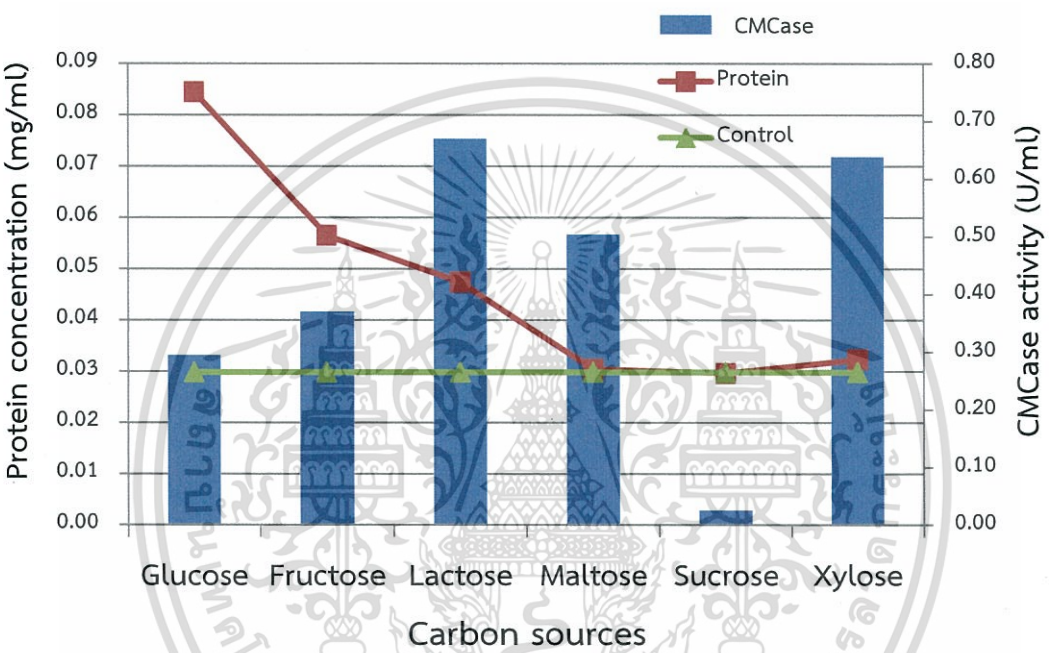
4.2 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

4.2.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีน

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ กลูโคส ฟรุกโทส แลคโทส มอลโทส ซูโครส ไซโลส ความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนโดยการเพิ่มลงไปในอาหารเหลว NB+CMC เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า เมื่อใช้แลคโทสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดคือ 0.6695 U/ml เมื่อเทียบกับชุดควบคุมพบว่า เพิ่มมากขึ้นเป็น 22.5 เท่า เนื่องจาก แลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่มีโครงสร้างซับซ้อนมากกว่าน้ำตาลชนิดอื่นทำให้แบคทีเรียต้องผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาเพื่อย่อยสลาย รองลงมาคือ ไซโลส มอลโทส ฟรุกโทส กลูโคส และ ซูโครส ค่าเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.6383, 0.5038, 0.3700,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.2944 และ 0.0254 U/ml ตามลำดับ ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของซูโครสขัดแย้งกับงานวิจัยของ (D.J. Mukesh Kumar *et al*, 2012) ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงเป็นอันดับที่ 2 รองจากไซแลน การทดสอบค่าความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay พบว่าอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.0845 mg/ml ซึ่งค่าความเข้มข้นของโปรตีนจะไม่แปรผันตรงกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์อาจเนื่องมาจากเอนไซม์เซลลูเลสเกิดการเสื่อมสภาพจากการเก็บรักษาสภาพของเชื้อตัวอย่าง

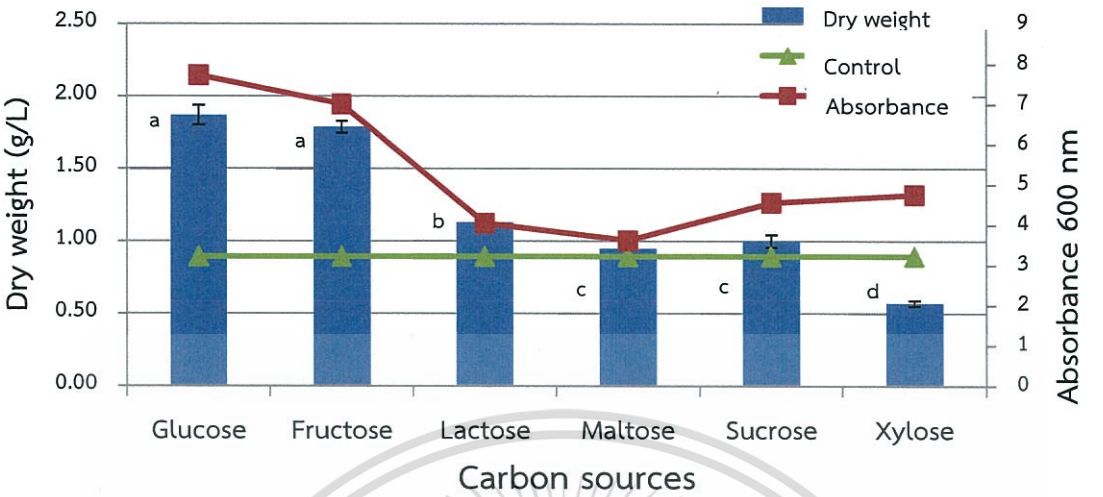


รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นของโปรตีนในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

4.2.2 ผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB+CMC กำหนดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 600 nm ค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักแห้งของกลูโคสดีที่สุดเท่ากับ 7.72 และ 0.055 g/L ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงในแหล่งอาหารคาร์บอนที่แตกต่างกัน

4.2.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของอาหารหลุมควบคุมเท่ากับ 27 mm และ แบลงค์เท่ากับ 5 mm

แหล่งคาร์บอน	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm)
กลูโคส	6
ฟรุกโทส	6
แลคโทส	14
มอลโทส	6
ซูโครส	12
ไซโลส	15

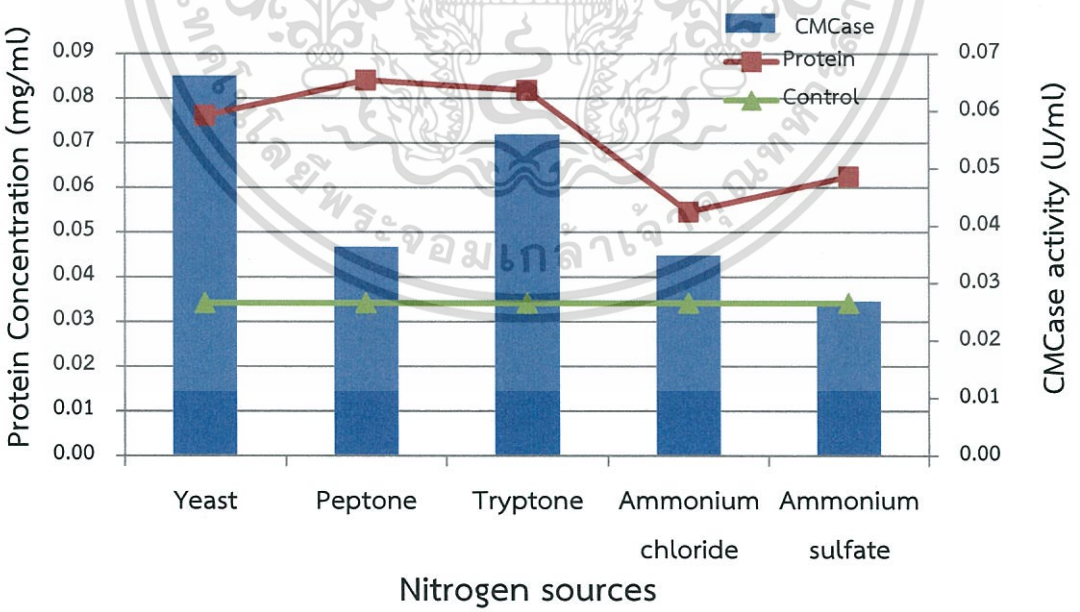
จากการทดลองพบว่า ขนาดของวงใสที่ได้ของแลคโทส และไซโลส มีค่าใกล้เคียงกันและเมื่อนำไปหาค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า แลคโทส และไซโลส สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ใกล้เคียงกัน ส่วนซูโครสที่ให้ขนาดวงใสรองลงมาพบว่า สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อยที่สุดอาจเนื่องจากซูโครสจะถูกเอนไซม์ย่อยสลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้เป็นกลูโคสและฟรุกโทส จึงผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

4.3.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีน

การศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ ยีสต์ เพปโตน ทริปโตน แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเมื่อใช้ยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด คือ 0.0661 U/ml รองลงมาคือ ทริปโตน, เพปโตน, แอมโมเนียมคลอไรด์ และ แอมโมเนียมซัลเฟต ค่าเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.0559, 0.0363, 0.0348 และ 0.0268 U/ml ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาของ (H. N. Prasanna *et al*., 2016) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ (D.J. Mukesh Kumar *et al*, 2012) ซึ่ง yeast extract เป็นสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่อุดมไปด้วย กรดอะมิโน และวิตามินต่างๆที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้สังเคราะห์โปรตีนได้ ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี การวัดปริมาณโปรตีนของเชื้อตัวอย่างด้วยวิธี Bradford assay พบว่าอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นเพปโตน มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.0841 mg/ml รองลงมาคือ ทริปโตนและยีสต์มีค่าเท่ากับ 0.0818 และ 0.0762 mg/ml ซึ่งเพปโตน ก็เป็นแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีคล้ายกับ yeast extract จึงทำให้มีค่าของปริมาณโปรตีนสูงที่สุด

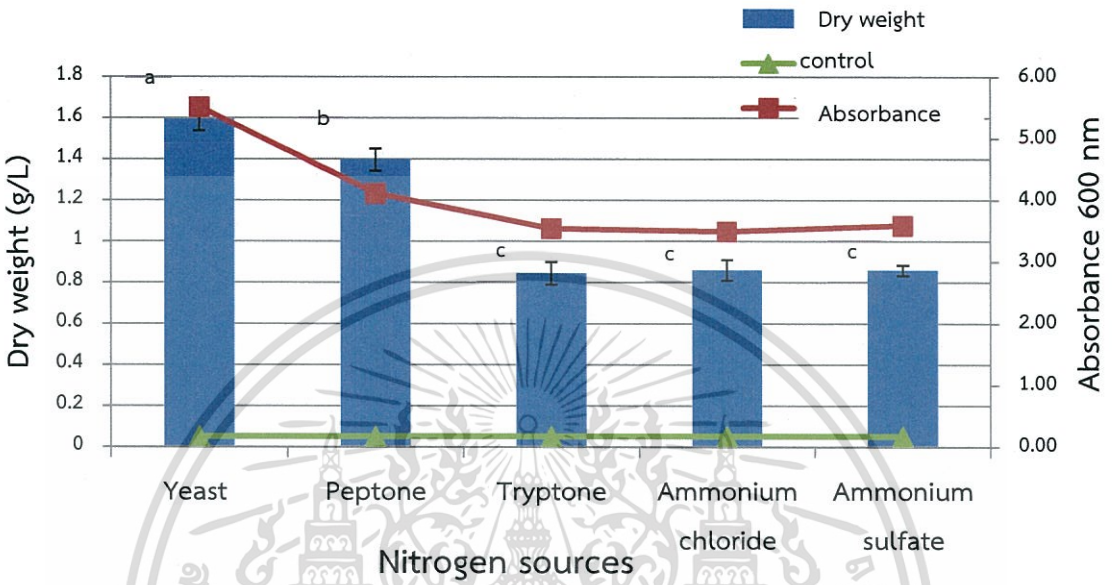


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นของโปรตีนในแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB+CMC กำหนดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 600 nm ค่าความขุ่นและน้ำหนักแห้งของยีสต์ดีที่สุดเท่ากับ 5.51 และ 0.057 g/L ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงในแหล่งอาหารไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

4.3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของอาหารหลุมควบคุมเท่ากับ 27 mm และ แบลงค์เท่ากับ 5 mm

แหล่งไนโตรเจน	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm)
ยีสต์	13
เพปโตน	12
ทริปโตน	11
แอมโมเนียมคลอไรด์	12
แอมโมเนียมซัลเฟต	15

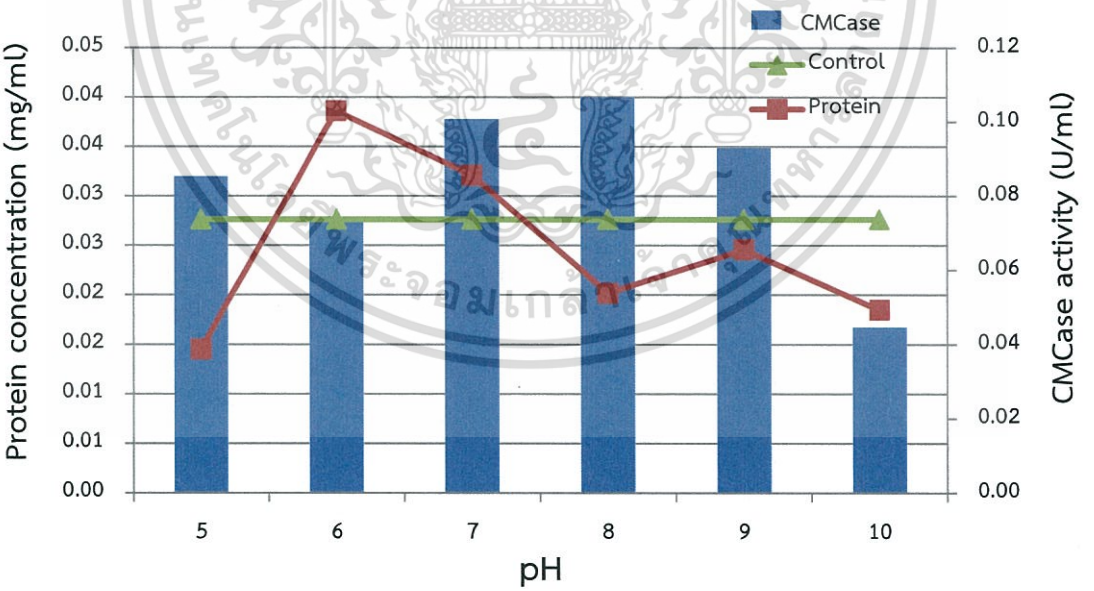
จากการทดลองพบว่า ขนาดของวงใสที่ได้ของแอมโมเนียมซัลเฟต มีขนาดใหญ่ที่สุดแต่เมื่อนำไปหาค่ากิจกรรมเอนไซม์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ต่ำสุด เนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตเจนอนินทรีย์เชื้อแบคทีเรียจึงเจริญเติบโตได้น้อยทำให้การผลิตเอนไซม์ได้น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสม

4.4.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นโปรตีน

pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ หากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้น้อย ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ก็จะน้อยลงด้วย ซึ่งผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยปรับพีเอชของอาหาร NB + CMC ให้มี pH 5 6 7 8 9 และ 10 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มี pH 8 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.0399 U/ml รองลงมาคืออาหารที่มีพีเอช 7 9 5 6 และ 10 ตามลำดับ ค่าเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 0.0378, 0.0348, 0.0319, 0.0276 และ 0.0167 U/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย (D.J. Mukesh Kumar *et al*, 2012) ที่อาหาร pH เท่ากับ 8 มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากที่สุด เท่ากับ 63 U/ml และวัดปริมาณโปรตีนของเชื้อตัวอย่างด้วยวิธี Bradford assay จากการทดลองพบว่าปริมาณโปรตีนของอาหาร pH 6 ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.1030 mg/ml ในขณะที่อาหารทีมี pH 5, 7, 8, 9 และ 10 มีปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อาจเกิดขึ้นจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ไม่เหมาะสมทำให้เอนไซม์ไม่จับกับซับสเตรท

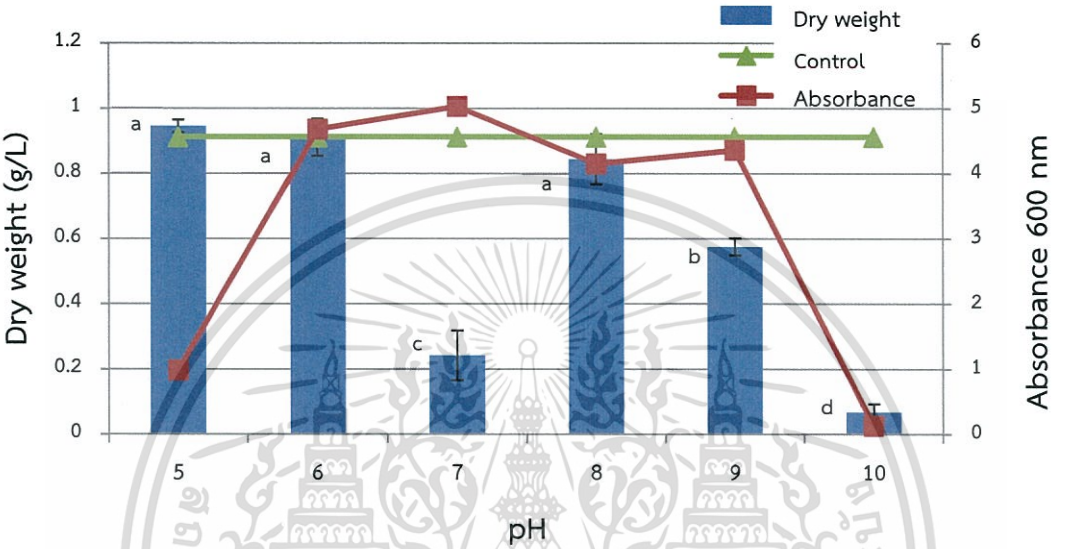


รูปที่ 4.7 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารที่มี pH แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสง

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB+CMC กำหนดค่าความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 600 nm ค่าความขุ่นของ pH 7 ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 5.03 น้ำหนักแห้งของ pH 7 และ 8 ดีที่สุดเท่ากับ 0.0764 และ 0.0768 g/L ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงใน pH ที่แตกต่างกัน

4.4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 4.4 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน pH ที่ต่างกัน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของอาหารหลุมควบคุมเท่ากับ 27 mm และ แบลงค์เท่ากับ 5 mm

pH	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm)
5	7
6	15
7	14
8	14
9	14
10	6

จากการทดลองพบว่า ขนาดของวงใสในช่วง pH 6 7 8 และ9 มีที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันมากทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่า pH ใดที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดแต่สามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้เพราะเกิดวงใสขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการทดลองในสภาวะที่แตกต่างทางด้านแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1% (w/v) แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1% (w/v) และความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว NB+CMC พบว่าสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอน คือ 1%แลคโตส แหล่งไนโตรเจน คือ 1%ยีสต์ และสภาวะความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ pH 8 จะให้ค่ากิจกรรมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เหมาะสมที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียผลการทดลองที่ได้ทั้งค่ากิจกรรมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้นของโปรตีน ค่าความขุ่นและน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มไม่ไปในทางเดียวกัน อาจจะเกิดความผิดพลาดจากระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเชื้อที่มีระยะเวลาห่างของเวลาที่ไม่ต่อเนื่อง ทำให้ไม่สามารถคำนวณเวลาการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่แน่นอน และควรทำการทดลองเพิ่มสภาวะในการควบคุมอุณหภูมิเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองให้ครอบคลุมและมีความน่าเชื่อถืออย่างยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรองกาญจน์ เรืองสากล, ชุติรัตน์ เล้ารัตนอารีย์ และ ปาลิตา วัชรวันทานนท์. 2555. **การปรับปรุงพันธ์และคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลายพันธ์ที่ผลิตไฮโดรเจนจากเซลลูโลส.** กรุงเทพฯ : โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโลโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิตตเสน อรุณศรี. 2529. **การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อราที่เจริญที่อุณหภูมิสูง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นฤมล นะธรรมโม. 2544. **สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียทนร้อน.** เชียงใหม่ : สาขาวิชาชีววิทยาบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พนิดา วรรธนันท์ชัย, พรฤดี มารีน และ หนึ่งฤทัย มากภิบาล. 2555. **การศึกษาการเตรียมวัสดุปิดแผลจากแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับใบสาบเสือ.** กรุงเทพฯ : โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณทิพา ธงทอง. 2547. **การโคลนนิ่งยีนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.** กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์.

พิรุฬห์พร ศรีมงคล. 2552. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเซลลูเลสและไซลาเนส.** กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภัทรา ผาสอน, จักรกฤษณ์ ตชะอภัยคุณ, นิษก์นิภา สุนทรกุล, คิน เลย์ คู และกนก รัตนะกนกชัย. 2551. **การคัดแยกแบคทีเรียชอบร้อนที่เจริญในสภาวะไม่ต้องการอากาศเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.** กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข.2557.**การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมททิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน.**กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระพีพรรณ อินปั๋นแก้ว. 2530. **แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส.**เชียงใหม่ : สาขาวิชาชีววิทยาบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รัชรา, สมบูรณ์ และ มาโมรุ. 2557. **การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่แยกจากกระเพาะหมักของวัว.**ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริพรรณ, สุพัตรา และ อรพรรณ. 2558. **การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส.**กรุงเทพฯ: โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาเคมีสิ่งแวดล้อม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์. 2554. **การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม.** สงขลา : วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ajay, P.N., Priya M. and Trevor, W.S. 2007. **The coffect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulose by *Phlebia gigantean*.** EnzMicrob. Technol. 40 : 1464-1468

Arusha P. Nandimath, Kiran R. Kharat, Shanti G. Gupta and Arun S. Kharat. 2016. **Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates.** : African Journal of Microbiology Research : 1996-0808

B. Adney and J. Baker. 1996. **Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP).**

D.J. Mukesh Kumar[1], P.D. Poovai[2], C.L. Puneeth Kumar[2], Y.Sushma Saroja[2], A. Manimaran[2] and P. T. Kalaichelvan[1]. 2012. **Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its Biostoning activity.** ISSN 0975-5071 USA CODEN : DPLEB4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fan, L.T., M.M. Gharpuray and Y.H. Lee. 1987. **Cellulose Hydrolysis. 1st Edn.** Springer Verlag, Berlin, Germany, pp: 1-68.

Goksoyr, J. and Eriksen, J. 1980. **Cellulase in economic microbiology.Academic Press.** New York.

H. N. Prasanna, G. Ramanjaneyulu, B. Rajasekhar Reddy. 2016. **Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp.** : ORIGINAL ARTICLE : Biotech : DOI 10.1007/s13205-016-0483-x.

Haq, K., K. Shahzadi, U. Hameed, M.M. Javed and M,A. Qadeer. 2016. **Solid-state fermentation of cellulose by locally isolated *Trichoderma harzianum* for the exploitation of agriculture by-products.** Pakistan J. Biological Sci. 9(9) 1779-1782.

Immanuel, G., C.M.A. Bhagavath, P.I. Raj, P. Esakkriraj and A. Palavesam. 2007. **Production and partial purification of cellulose by *Aspergillusniger* and *A. fumigates* fermented incoirwaste and sawdust.** The Internet J.Microbiol. 3(1) : 1-12

Kathiresan K, Manivannan S. 2006. **α-amylase production by Penicilliumfellutanum isolated from mangrove rhizosphere soil.** Afr. J. Biotechnol. 5 : 829-832

Kathiresan, K. and S. Manivannan. 2006. **Cellulase production by *Penicillium fellutanum* isolated from costal mangrove rhizospere soil.** Res. J. Microbiol. 1(5) : 438-442.

Keskar, S.S. 1992. **"Cellulase production by Penicillium janthinellum."** World J. Microbiol.Biotech. 8(5): 534-535

Liu, J. and J. Yang. 2006. **Cellulase producing by Trichoderma koningii AS3.4262 in soild-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry.** Food Technol. Biotechnol. 45(4) : 420-425.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oikawa, T., M. Takagi and M. Ameyama. 1994. **Detecction of carboxymethycelllase activity in Acetobacter xylinum KU-1.** Bioscience Biotechnol. Biochemistry. 58(11) : 2102-2103.

P. Nisha. 2015. **Cellulase production optimization using cellulolytic bacteria.** International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences, 5 (1), 2249-9504

Pothiraj, C., P.Balaji and M.Eyini. 2006. **Enhanced production of cellases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste.** AfrJ.Biotechnol. 5(20) : 1882-1885.

PRASAD M.P. AND SETHI R. 2013. **Optimization of cellulose production from a novel bacterial isolate *Mesorhizobium* sp. From marine source.** Journal of Enzyme Research 2013 ; 0976-7657

R.M. wood, P.J. 1982. **Use of congo red polysaccharide interation in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen.** Appl. Environ Microbiol .43:777-780

S. P. Gautam, *et al.*, 2011. **Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novel Cellulolytic Fung.** : Research Article : Biotechnology Research International. : doi : 10.4061/2011/810425

Silvania A. Ladeira, Erica Cruz, Andria B. Delatorre, Jo. Barbosa and Meire Lelis Leal Martins. 2015. **Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp.** Electronic Journal of Biotechnology

Singh, V.K. and A. Kumar. 1998. **Producction and purification of an extracellular celllase fron *Bacillus brevis* VS-1.** Biochemistry and Molecular Biol. Int. 45(3) : 443-452.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sonia Sethi, Aparna Datta, B. Lal Gupta, and Saksham Gupta. 2013. **Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil.** Hindawi Publishing Corporation : Biotechnology

Yogita Lugani, Rajesh Singla and Balwinder Singh Sooch. 2015. **"Optimization of Cellulase Production from Newly Isolated *Bacillus* sp. Y3"**: Bioprocessing & Biotechniques : Bioprocess Biotech.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงชนิดเหลว

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้
NB+CMC	
1. Yeast Extract	3.0 g/L
2. Peptone	5.0 g/L
3. Carboxymethylcellulose (CMC)	10.0 g/L
LB	
1. Peptone	10.0 g/L
2. Yeast Extract	5.0 g/L
3. Sodium chloride	10.0 g/L

ก.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงชนิดเหลวของแหล่งคาร์บอน

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้
1. Yeast Extract	3.0 g/L
2. Peptone	5.0 g/L
3. Carboxymethylcellulose (CMC)	10.0 g/L
4. แหล่งคาร์บอน	0.1 g/L

ก.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงชนิดเหลวของแหล่งไนโตรเจน

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้
1. Yeast Extract	3.0 g/L
2. Peptone	5.0 g/L
3. Carboxymethylcellulose (CMC)	10.0 g/L
4. แหล่งไนโตรเจน	0.1 g/L

ก.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณที่ใช้
1. Yeast Extract	3.0 g/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Peptone	5.0 g/L
3. Carboxymethylcellulose (CMC)	10.0 g/L
4. Agar	15.0 g/L

ก.5 การเตรียมสีย้อมคองโกเรด (Congo Red) ความเข้มข้น 0.1% (w/v)

คองโกเรด (Congo Red)	0.1 g
น้ำกลั่น	100 ml

ก.6 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์(NaCl) ความเข้มข้น 1M

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	58.44 g
น้ำกลั่น	1000 ml

ก.7 การเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05M pH 4.8

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการและปรับปริมาตรเป็น 1L

สารละลาย A : 0.05 M citric acid 10.51 g ในน้ำกลั่น 1L

สารละลาย B : 0.05 M sodium citrate 14.7 g ในน้ำกลั่น 1L

***หมายเหตุ** ผสมสารละลาย A 23 ml และสารละลาย B 27 ml

ก.8 การปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเหลว

ปรับอาหารเหลว NB+CMC ด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

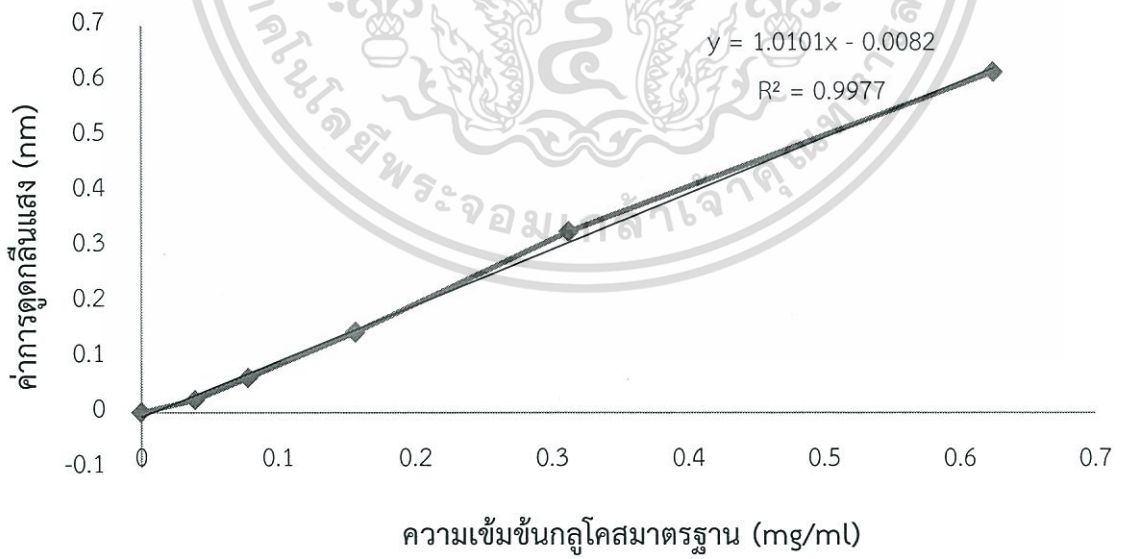
ภาคผนวก ข

ข้อมูลกราฟมาตรฐานและผลการทดลอง

ข.1 ข้อมูลกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ความเข้มข้นกลูโคสมาตรฐาน (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0.039063	0.023
0.078125	0.063
0.15625	0.145
0.3125	0.327
0.625	0.616

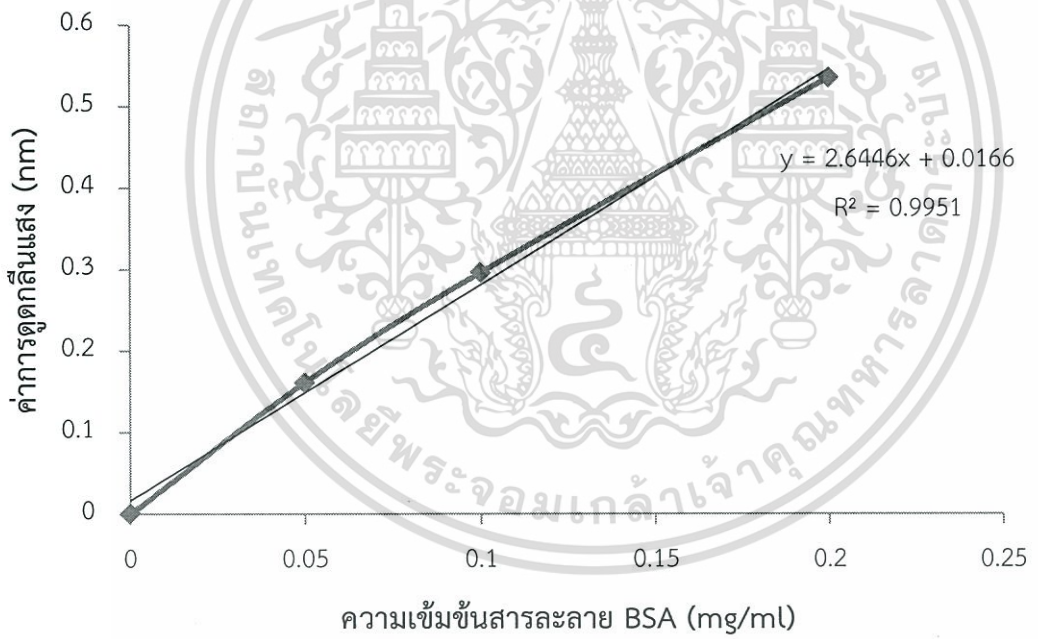


รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford assay เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm
0	0
0.05	0.161
0.1	0.296
0.2	0.535



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ซึ่งทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อและการการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ตารางที่ ข.3 ผลการศึกษาในเวลาที่ต่างกัน

ชั่วโมง	OD Abs (600 nm)	Abs (540 nm)	Enzyme activity (U/ml)	Abs (595 nm)	Protein (µg/ml)
0	0.06	0.006	0.0131	0.134	0.0444
6	2.30	0.017	0.0211	0.191	0.0659
12	2.64	0.040	0.0378	0.175	0.0599
24	4.88	0.044	0.0407	0.223	0.0780
30	4.92	0.030	0.0305	0.247	0.0871
36	5.38	0.048	0.0436	0.220	0.0769
48	4.90	0.030	0.0305	0.433	0.1575
54	4.74	0.041	0.0385	0.267	0.0947
60	4.34	0.040	0.0378	0.430	0.1563
72	4.40	0.038	0.0364	0.371	0.1340

ตารางที่ ข.4 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	OD Abs (600 nm)	Abs (540 nm)	Enzyme activity (U/ml)	Abs (595 nm)	Protein (µg/ml)
Glucose	7.00	0.393	0.2944	0.24	0.0845
Fructose	7.72	0.497	0.3700	0.166	0.0565
Lactose	4.04	0.909	0.6696	0.142	0.0474
Maltose	3.61	0.681	0.5038	0.097	0.0304
Sucrose	4.55	0.023	0.0254	0.095	0.0296
Xylose	4.75	0.866	0.6383	0.102	0.0323
NB + CMC	4.85	0.029	0.0298	0.117	0.0380

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	OD Abs (600 nm).	Abs (540 nm)	Enzyme activity (U/ml)	Abs (595 nm)	Protein (µg/ml)
Yeast	5.51	0.079	0.0662	0.218	0.0762
Peptone	4.11	0.038	0.0364	0.239	0.0841
Tryptone	3.54	0.065	0.0560	0.233	0.0818
Ammonium chloride	3.49	0.036	0.0349	0.161	0.0546
Ammonium sulfate	3.59	0.025	0.0269	0.182	0.0625
NB + CMC	4.76	0.035	0.0342	0.166	0.0565

ตารางที่ ข.6 ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง

pH	OD Abs (600 nm).	Abs (540 nm)	Enzyme activity (U/ml)	Abs (595 nm)	Protein (µg/ml)
5	0.98	0.032	0.0320	0.119	0.0387
6	4.68	0.026	0.0276	0.289	0.1030
7	5.03	0.040	0.0378	0.243	0.0856
8	4.15	0.043	0.0400	0.159	0.0538
9	4.36	0.036	0.0349	0.190	0.0656
10	0.13	0.011	0.0167	0.147	0.0493

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 ผลการศึกษาระยะเวลาต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ระยะเวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.533	0.433	0.467	0.500	0.043
12	0.867	0.833	0.800	0.867	0.032
24	0.767	0.967	0.833	0.933	0.092
30	0.833	0.767	0.833	0.933	0.069
36	0.567	0.467	0.533	0.733	0.113
48	0.467	0.533	0.567	0.500	0.043
54	0.567	0.533	0.433	0.400	0.079
60	0.467	0.400	0.467	0.500	0.042
72	0.467	0.500	0.500	0.433	0.032

ตารางที่ ข.8 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Glucose	1.776	1.896	1.936	1.872	0.068
fructose	1.896	1.936	1.872	1.800	0.042
Lactose	1.936	1.872	1.800	1.768	0.020
maltose	1.872	1.800	1.768	1.744	0.049
sucrose	1.800	1.768	1.744	1.840	0.044
xylose	1.768	1.744	1.840	1.128	0.019
NB+CMC	1.744	1.840	1.128	1.136	0.068

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.9 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

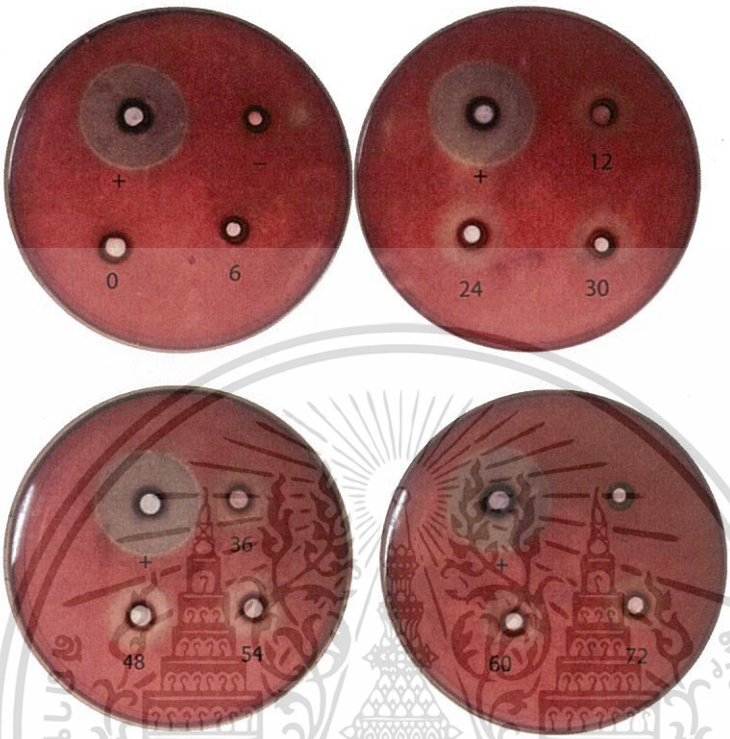
แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
yeast	1.632	1.632	1.512	1.608	0.057
peptone	1.632	1.512	1.608	1.384	0.054
tryptone	1.512	1.608	1.384	1.392	0.055
NH_4Cl	1.608	1.384	1.392	1.472	0.050
NH_3SO_4	1.384	1.392	1.472	1.344	0.025
NB+CMC	1.392	1.472	1.344	0.904	0.051

ตารางที่ ข.10 ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่างต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

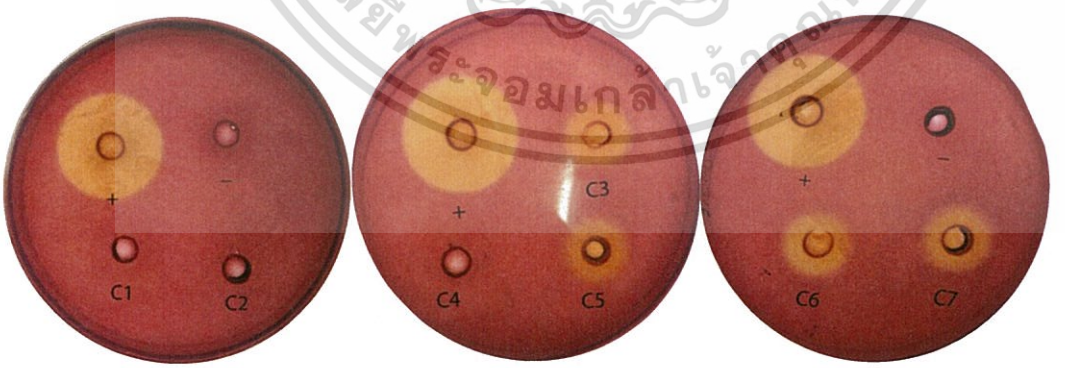
pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
5	0.936	0.968	0.920	0.960	0.019
6	0.968	0.920	0.960	0.848	0.057
7	0.92	0.960	0.848	0.880	0.076
8	0.96	0.848	0.880	0.920	0.077
9	0.848	0.880	0.920	1.000	0.026
10	0.88	0.920	1.000	0.192	0.026

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง



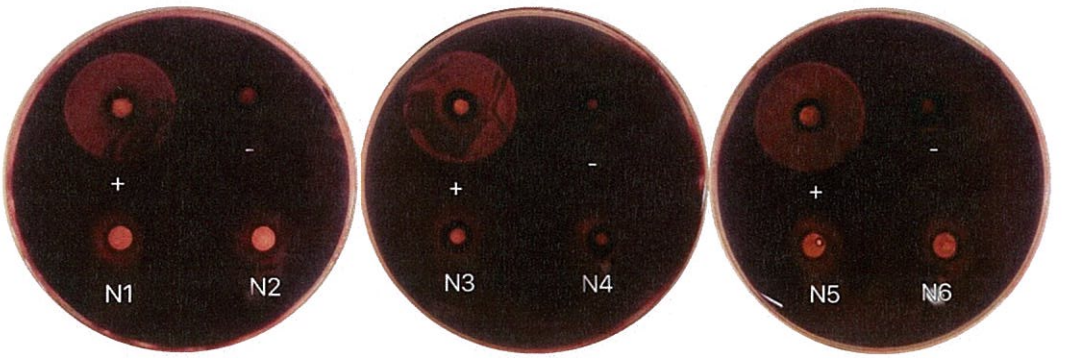
รูปที่ ข.3 ขนาดวงใสแสดงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อในเวลาที่แตกต่างกัน



รูปที่ ข.4 ขนาดวงใสแสดงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อใน

แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.5 ขนาดวงใสแสดงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อในแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

รูปที่ ข.6 ขนาดวงใสแสดงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อในที่pH แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 6, 24, 36 และ 48

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

		N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	6 ชั่วโมง	3	.025267	.003828	.0022101
	24 ชั่วโมง	3	.034733	.0107039	.0061799
	36 ชั่วโมง	3	.031233	.0049541	.0028603
	48 ชั่วโมง	3	.027933	.0138897	.0080192
	รวม	12	.029792	.0087629	.0025296

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	Between Groups	.000	3	.000	.582	.643
	Within Groups	.001	8	.000		
	Total	.001	11			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (g/L)

Duncan

ปัจจัย	N	Subset for alpha = 0.05
		1
6 ชั่วโมง	3	0.025267
24 ชั่วโมง	3	0.027933
36 ชั่วโมง	3	0.031233
48 ชั่วโมง	3	0.034733
Sig.		.275

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้